

亲和层析法纯化人绒毛膜促性腺激素

王顺友 戚少然 唐玉钗 朱忠勇

(南京军区福州总医院,福州 350001)

提 要

本文介绍了一种应用抗 hCG β 亚单位单克隆抗体亲和层析提纯 hCG 的方法。结果表明,该法具有简便、快速、经济、产品活性高等优点。hCG 回收率为 96%,免疫学活性 17000IU/mg 蛋白,生物学活性(小鼠子宫称重法)达到 10 000U/mg 蛋白以上。

关键词 人绒毛膜促性腺激素 (hCG), 亲和层析, 提纯

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 是分子量约 40kD 的糖蛋白,主要从早孕妇女尿中提取。传统的提取方法包括乙醇、丙酮沉淀及多次、复杂的层析过程^[1];或采用高效疏水色谱法^[2],需要昂贵的设备及特殊的色谱柱,且 hCG 的得率不高。本实验采用抗 hCG β 亚单位单克隆抗体与 Sepharose 4B 偶联的亲和层析法,简便、快速地从孕妇尿中提取到纯化的 hCG。

材料与 方法

一、仪器和试剂

抗 hCG β 亚单位单克隆抗体 D₉: 由本室制备^[3]。溴化氰活化的 Sepharose 4B Pharmacia 产品。聚乙二醇 (PEG) 20 000: 上海化学试剂厂产品。ELISA hCG 免疫活性测定试剂盒 Syntro Biosearch 公司产品。hCG 含量测定放免药盒 上海生化制品研究所产品。超滤浓缩器及滤膜(截留值 10kD): 系上海瑞

丽分析仪器厂产品。

平衡液 0.01mol/L Tris-HCl (pH7.2), 0.15mol/L NaCl。

解离液 0.1mol/L 甘氨酸-HCl (pH2.5), 7mol/L 脲。

二、方法

1. 抗 hCG β 亚单位单克隆抗体亲和层析柱的制备 取纯化的单克隆抗体 D₉ 5ml (5.6 mg/ml), 按产品说明,与 2g Sepharose 4B 干胶偶联。淋洗装柱后用解离液模拟洗脱,平衡液平衡后将层析柱置 4°C 保存。收集全部流出液,测定 A_{280} , 按消光系数 $\epsilon = 0.74$ 计算免疫球蛋白含量,得偶联率为 84%。

2. hCG 测定

免疫活性 按 Syntro Biosearch 公司产品说明书的方法,ELISA 显色后,根据光密度从标准曲线计算 hCG 免疫活性,单位为 mIU/ml。

生物活性 参照 Koyama 等的方法^[4],选

参 考 文 献

- 1 Genest J *et al.* *Br Heart J*, 1986; 56: 302
- 2 孙雅贤等. *河北医药*, 1987; 9(3): 185
- 3 陈泮藻等. *中华核医学杂志*, 1986; 6(3): 147
- 4 Nielsen MD *et al.* *Acta Endocr*, 1971; 67: 104
- 5 Richards A M *et al.* *J Hypertension* 1987; 5(2): 227

- 6 Juppner H *et al.* *Biochem Biophys Res Comm.* 1986; 139(3): 1215
- 7 Herrmann H C *et al.* *Am Heart J*, 1988; 115 (6): 1213
- 8 钱志豪等. 第二届全国心肺内分泌学术会议汇编 1988; 68
- 9 温绍君等. *首都医学院学报*, 1990; 11(1): 48

[本文于1990年7月3日收到,12月19日修回]

用体重 16—18g 的雌性小鼠 15 只, 随机分成 5 组, 每组 3 只, 经腹腔分别注射生理盐水 (对照组) 或用生理盐水作不同稀释的 hCG 提取物, 每次注射 0.2ml, 早晚各 1 次, 共 3 天。第 4 天晨拉颈处死小鼠, 子宫称重, 以子宫重于对照组 2 倍者为阳性, 生物活性计算如下:

$$\text{生物活性单位} = \frac{\text{阳性最高稀释度}}{1.2\text{ml}}$$

hCG 含量 采用上海生化制品所的放免药盒按产品说明进行测定, 结果为 hCG ng/ml。

3. 尿液浓缩 收集早孕妇女 (停经后 2—3 个月) 24h 尿, 弃去沉淀, 先用 PEG 20 000 浓缩 10 倍, 再超滤浓缩 5 倍, 浓缩物对平衡液进行透析。

4. 亲和层析 将平衡好的样品离心, 4 000 r/min, 10min, 取上清上柱, 流速 4ml/h。待样品全部进入柱床后, 用平衡液淋洗至 $A_{280} < 0.1$, 加入解离液, 以 0.6ml/管收集全部洗脱液, 逐管测定 A_{280} 值及 hCG 免疫活性。将具有 hCG 免疫活性的洗脱液合并, 平衡透析后测定 hCG 免疫活性、生物活性、含量及蛋白质浓度。

结果与讨论

1. 亲和层析 结果如图 1 所示。hCG 免疫活性与 A_{280} 吸收峰完全一致, 表明 hCG 完全在蛋白质洗脱峰之内, 与杂蛋白分离很完全。

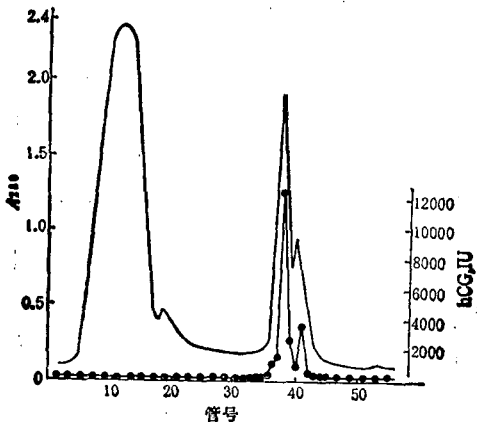


图 1 hCG 亲和层析结果
— A_{280} , ··· hCG 免疫活性, ↓ 洗脱

2. hCG 回收率 将原尿、浓缩尿、提取液经适当稀释后, 采用放免法测定 hCG 含量, 计算回收率 (表 1)。从原尿到 PEG 浓缩, 回收率达到 93.5%, 再经超滤浓缩后只有 67.4%, 而从超滤浓缩至亲和层析提纯, 回收率高达 96.0%。

表 1 hCG 回收率测定结果 ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$)

	原尿	PEG 浓缩	超滤浓缩	提取液
阶段回收率	—	93.5 ± 2.5	67.4 ± 5.7	96.0 ± 3.3
总回收率	—	93.5 ± 2.5	62.3 ± 4.0	60.0 ± 6.0

3. hCG 活性测定

生物活性 最高阳性稀释度为 1:20 000 以上, 蛋白质浓度为 0.346mg/ml, 生物活性单位为 10 200U/mg 蛋白 (表 2)。

表 2 hCG 生物活性测定结果 (小鼠子宫重 mg)

小鼠编号	hCG 稀释度				
	0 (对照组)	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000
1	8.8	179.0	89.0	42.3	12.0
2	17.1	122.0	39.2	55.3	7.9
3	8.8	78.4	64.6	29.0	22.9
均值	11.6	126.5	64.2	42.2	14.3

免疫活性 ELISA 法测定收集液的免疫活性为 5 912IU/ml, 即 17087IU/mg 蛋白。

hCG 是由 α , β 异二聚体构成的糖蛋白, 分子量约 40kD。它在孕妇尿中以多种形式存在, 其中包括在一般免疫学检查中起作用的 β 亚单位核心结构 (β subunit core structure)^[5]。这一结构由于分子量较小 (约 10kD), 在超滤浓缩时有可能漏出到滤液之中。从表 1 的结果可以看出, hCG 从 PEG 浓缩-超滤浓缩的回收率只达到 67.4%, 提示有大量免疫活性 hCG 丢失。由于 hCG 在高浓度尿 (10mol/L) 存在下发生解离, 所以, 我们将尿的浓度控制在 7 mol/L, 但图 1 中仍可见洗脱峰有一肩峰, 这有可能是由于尿液中游离的 β 亚单位与层析柱结合后, 在洗脱时由于分子量小而滞后流出所造成的, 或者是在洗脱条件下有部分 hCG 发生解离。有人曾依据 hCG 是糖蛋白而设计用凝集素亲和层析法制备 hCG^[4]。由于凝集素的

(下转第 364 页)

参 考 文 献

- 1 Delucas L J, Suddath F L, Snyder R *et al.* *J Crystall Growth*, 1986; 76: 681
- 2 Bugg C E. *Protein crystal growth in space*. AIAA-87-0387, AIAA 25th Aerospace Science Meeting, Nevada: Reno, Jan. 12, 1987
- 3 Timasheff S N, Arakawa T. *J Crystall Growth*, 1988; 90: 39
- 4 Blundell T L, Johnson L M. *Protein Crystallography*. New York: Academic Press, 1976: 108
- 5 Seiker L C. *J Crystall Growth*, 1988; 90: 31
- 6 Pusey M, Witherow W, Naumann R. *J Crystall Growth*, 1988; 90: 105
- 7 Kam Z, Shore H B, Feher G. *J Mol Biol*, 1978; 123: 539

[本文于1990年9月7日收到,11月17日修回]

EFFECTS OF SOLUTION FLOW ON THE GROWTH MORPHOLOGIES OF EGG-WHITE LYSOZYME CRYSTALS AT ISOELECTRIC POINT

Liu Shan, Huang Tao, Xiao Wen, Zhou Yaohe

(National lab of solidification processing, northwestern polytechnical university, Xi'an 710072)

Abstract

A careful study has been made on different morphologies of lysozyme crystals at isoelectric point under isothermal and constrained growth conditions. It is found that the morphologies are closely related to solution flow. Judging by the experimental results, the cessation of biological crystal growth is due to the solute-depletion zone stably existing around the growing crystals. Reducing or removing the solute-depletion zone may ensure the continuous crystal growth. This approach throws some light on the possibility of growing large-dimensional biological crystals.

Key words egg-white lysozyme, solution, flow, cessation of crystal growth, constrained solution growth, large-dimensional crystals

(上接第 387 页)

糖结合部位无特异性,因此, hCG 的纯度无法保证,并且,解离液中的糖不易除去,柱再生也受到一定限制。我们制备的亲和层析柱已使用十数次,时间半年以上,尚未见有明显活性丧失。与其它几种纯化方法比较,本法的回收率,免疫活性明显提高,生物活性基本相同^[1,6]。

目前, hCG 纯品已广泛用于诊断试剂和临床用药,特别是对闭经、子宫出血、黄体功能不全及不孕等疾病的治疗。本文介绍的亲和层析提纯 hCG 的方法由于具有简便、经济、快速、活性高等优点,为大量生产和纯化 hCG 提

供了一条很有希望的途径。

参 考 文 献

- 1 Bahl Omp. *J Biol Chem*, 1969; 244: 567
- 2 Yuki Y, Nishimura R, Mochizuki M. *Acta Obst Gynaec Jpn*, 1986; 38: 417
- 3 戚少然,唐玉钗,杨春富等. 解放军医学杂志,1986;11: 377
- 4 Koyama K, Toda K, Kuriyama D *et al.* *Acta Endocrinologica*, 1986; 112: 579
- 5 Kato Y, Braunstein G D. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66: 1197
- 6 王海云,徐一树,德淑兰等. 生殖与避孕,1982; 2: 12

[本文于1990年7月9日收到,11月16日修回]