

免疫亲和层析生产高纯度尿激酶的研究

沈金玉 丁宝玉* 邵联合** 丛进阳

(清华大学化工系, 北京 100084)

尿激酶(Urokinase)简称UK(E.C.3.4.21.31)^[1,2]是一种纤维蛋白溶酶原激活剂,在临床上可用于治疗血栓,存在于正常人的尿液中。按国内目前普遍使用的尿激酶精制工艺^[3]收率低,仅为40%左右,产品比活最高仅达 $4-5 \times 10^4$ IU/mg蛋白,而且工艺流程长、设备投资大。

用单克隆抗体亲和层析纯化尿激酶是一种简单而有效的方法。它利用抗原-抗体之间的特异性识别反应,一步纯化即可使粗产品提高到精品的纯度。此技术具有流程简单,收率高,单抗柱可反复使用,作为亲和柱配基的单克隆抗体亦可大规模生产等优点。本文的目的是利用我们建立的抗尿激酶1B4杂交瘤细胞株所分泌的抗体建立亲和层析柱,用它对粗尿激酶进行精制研究。

材料及方法

(一)材料

1. 粗尿激酶:东北鸭绿江制药厂提供,比活1000IU/mg蛋白。上柱纯化前用相应平衡缓冲液进行透析。

2. 杂交瘤细胞株:按Köhler和Milstein的方法^[4]用南京大学提供的纯尿激酶免疫BALB/c小鼠,取其脾脏B淋巴细胞与SP2/0骨髓瘤细胞(北京医科大学免疫室赠),以PEG(MW4000)为融合剂进行细胞融合^[5]。经多次筛选和克隆后,最终获得3株抗尿激酶杂交瘤细胞株。用其中的1B4细胞株分泌的抗体进行实验。

(二)方法

1. 腹水中抗体的纯化:1B4细胞在BALB/c小鼠腹腔中所诱发的腹水,用50%饱和度的硫酸铵沉淀,经两次洗涤后,溶解在0.01mol/L磷酸缓冲液(pH8.0)中,并对此缓冲液进行透析。然后经过DEAE、DE52弱碱性阴离子交换树脂进行纯化。用分别含0—0.5mol/L氯化钠的磷酸缓

冲液进行线性梯度洗脱,各洗脱峰用聚丙烯酰胺凝胶电泳^[6]检出抗体峰,收集抗体蛋白峰部分,即得纯化的单克隆抗体。

2. 纯化抗体与Sepharose 4B的偶联:Sepharose 4B(北京大学出品)经溴化氢活化后与ε-氨基己酸反应生成接臂的中间体。然后再与N-羧基琥珀酰亚胺反应生成活化酯,保存于正丁醇中。用此活化酯和一定量的单克隆抗体反应生成偶联载体,并用乙醇胺封闭未反应的活性基团后装入层析柱。

3. 尿激酶的活性分析:采用气泡上升法^[7](或称纤维蛋白管法)进行。

4. 蛋白含量分析:采用Brodford法^[8]。

结果及讨论

用6g接臂活化酯与52.3mg纯化的1B4抗体反应,生成每克胶偶联有8.7mg单抗的工作载体装柱($\phi 1 \times 8$ cm),此单抗柱用磷酸缓冲液(pH7.0)平衡。

(一)上柱液流速对吸附的影响

抗原与抗体在柱内的反应主要取决于抗原向载体颗粒内部扩散的阻力。因此,增加流动相在柱内的接触时间将有利于抗原的吸附。表1给出了上柱液流速对吸附的影响。

表1 流速对尿激酶吸附的影响

流速(ml/h)	上柱液总活性(IU)	流出液总活性(IU)	活性吸附率(%)
10	2.6×10^4	1210	95.3
20	2.6×10^4	2530	90.3
40	2.6×10^4	2881	89.0

本文于1991年9月4日收到。

本课题得到国家自然科学基金化学部资助。

* 现在深圳工作。

**现在中国科学院化工冶金所读研究生。

(二) 上柱液 pH 值对吸附的影响

上柱液的 pH 值是影响吸附的最活跃的因素。溶液的 pH 值影响蛋白质的电荷, 因而也影响抗原-抗体之间的亲和反应。尿激酶稳定的 pH 值范围在 1—10 之间, 而过低的 pH 值会造成抗原-抗体复合体的分解, 不利于吸附, 所以可试验的 pH 范围在 5.0—9.0 之间。表 2 列出了在 3 个不同 pH 值下吸附尿激酶的情况。

表 2 pH 值对尿激酶吸附的影响

pH 值	上柱液总活性 (IU)	流出液总活性 (IU)	活性吸附率 (%)
8.5	1.5×10^5	1.4×10^5	6.7
6.4	6.7×10^4	3.1×10^4	54
5.5	7.1×10^4	5.4×10^4	24

由表 2 可知, 微酸性的上柱液吸附效果优于其他 pH 值。

(三) 上柱液离子强度对吸附的影响

抗体-抗原之间的亲和反应在很大程度上依赖于蛋白质分子间的疏水反应和静电作用。所以, 溶液中的离子强度将直接影响尿激酶的吸附率。实验时先将单抗柱用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.4) 充分平衡后, 再加入含一定浓度 NaCl 的同一磷酸缓冲液的尿激酶溶液。表 3 列出了实验结果。

表 3 上柱液中 NaCl 浓度对尿激酶吸附的影响

上柱液中 NaCl 浓度 (mol/L)	上柱液总活性 (IU)	流出液总活性 (IU)	活性吸附率 (%)
0.04	2.6×10^4	1210	95.3
0.06	2.6×10^4	1700	93.5
0.08	2.6×10^4	5480	78.9

由此可见, 为保证有较高的吸附率, 必须使

上柱液中离子强度保持最小。但过小的离子强度会造成较严重的非特异性吸附。两者之间必须进行优化组合。

(四) 洗涤液的选择

为保证产品的纯度, 选择合适的洗涤液是非常重要的。一般选用柱平衡液进行洗涤, 它虽然不会造成吸附产品的损失, 但洗涤效果不好, 较强的非特异性吸附杂蛋白质不易被除去。所以, 一般应选择一种既能保证产品不被洗脱, 又能除去大部分杂蛋白质的洗涤剂。我们选用了含 0.15 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液为洗涤剂。

(五) 洗脱液的选择

一种是含高浓度 NaCl 的 1—2 mol/L 磷酸缓冲液, 另一种是含低浓度 NaCl 的甘氨酸缓冲液 (pH 2.5), 两种洗脱液都能满足洗脱要求。但用酸洗脱必须立即用碱进行中和。

图 1 表示在亲和层析纯化尿激酶过程中, 用上述工艺条件所获得的各流出液的蛋白质检测图谱。

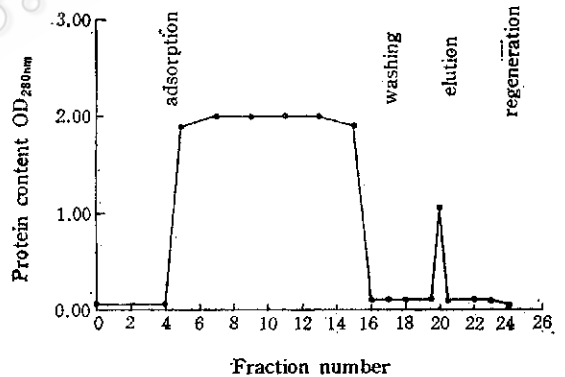


图 1 免疫亲和层析纯化尿激酶图谱

参 考 文 献

- [1] 范亚平: 医药工业, 17(9):32—35, 1986.
- [2] 唐明龙等: 国外医学——合成药、生化药制剂分册, 7(2):75—78, 1986.
- [3] 吉林大学尿激酶组: 吉林大学学报, 2:119, 1979.
- [4] Köhler, G. S and Milstein, C, *Nature*, 256: 495, 1975.
- [5] Oi, v. J. and Herzenberg, L. A, *Immunology*, 351, 1980.
- [6] Laemmli, U. K. et al., *Nature*, 227: 680, 1970.
- [7] 中华人民共和国卫生部 WSI-12-79, 1979.
- [8] Bradford, M. M. et al., *Anal. Biochem*, 72: 228, 1976.

Immunoaffinity Chromatography for Production of Highly Purified Urokinase

Shen Jinyu Ding Baoyu Shao Lianhe Cong Jinyang

(*Department of Chemical Engineering, Tsinghua University 100084*)

Hybridoma technique was used to establish some cell lines of hybridoma secreting monoclonal antibodies against urokinase. One of the monoclonal antibodies (1B4) was purified and coupled to Sepharose 4B, which served as matrix to purify crude urokinase with original specific activity 1000 IU/mg Protein. After one step purification the specific activity of urokinase increased to over 8×10^4 IU/mg. protein, reaching highly purified degree. Its total recovery was over 60%.

Key words Urokinase; monoclonal antibody; affinity chromatography