

# 静脉注射免疫丙种球蛋白 柱层析分离的研究\*

冯榕荫 梁国眉 林燕宜 林木良

(中山大学测试中心)

**摘要** 用凝胶渗透谱色法(GPC)检测了柱层析分离纯化后所得的免疫丙种球蛋白(IgG)组分。结果表明,使用DEAE阴离子交换纤维素-葡聚糖凝胶A-50柱层析法能从人血浆蛋白中分离出不含聚集体的纯IgG单体。对肌注IgG制剂使用葡聚糖凝胶Sephacryl S-200凝胶过滤法能除去IgG中的聚集体,但却不能分离出存在于其中的小量血清白蛋白;但使用DEAE阴离子交换纤维素柱层析法效果却恰好相反。

**关键词** 凝胶渗透色谱法, 血浆蛋白柱层析分离, 阴离子交换纤维素, 葡聚糖凝胶, 静脉注射免疫丙种球蛋白

采用低温Cohn氏乙醇法或利凡诺法从人血浆中分离提取的免疫丙种球蛋白(IgG)含有引起人体产生过敏性休克的抗补体活性的IgG聚集体<sup>[1,2]</sup>。本文着重研究不含聚集体的IgG的分离提纯方法。这对进一步研制适合于静脉注射用IgG制剂是很有意义的。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

利凡诺法提取的肌注IgG、人血浆均由广州市中心血站提供。DEAE阴离子交换纤维素是由Whatman公司生产, DEAE阴离子交换纤维素-葡聚糖凝胶A-50由瑞典Pharmacia公司生产, Sephacryl S-200葡聚糖凝胶由美国Sigma化学公司生产。其他均为A·R试剂。

紫外连续检测:国产XZ-85-1型核酸蛋白紫外连续检测仪;紫外检测:美国Beckman公司的DU-8B紫外-可见分光光度计;GPC实验:日本Waters公司208型凝胶渗透色谱仪。

### 1.2 血清蛋白的柱层析分离

人血浆解冻并过滤去脂类和纤维蛋白凝块后,滤液经超速离心除去不溶物质得下层黄色血清液。使用A-50色谱柱,起始缓冲液用0.01mol/L磷酸盐(PB),梯度洗脱液为0.01mol/L PB和0.01mol/L PB及0.3mol/L PB各350ml,柱体积 $46 \times \phi 1.6$ cm,装柱

本文1992年6月1日收到

\* 广州市科委重点研究项目资助,梁雪薇曾参加部分研究工作

高度35cm.

血清 1 ml用起始缓冲液透析过夜,然后上柱并进行洗脱,洗脱速度0.5ml/min,采用紫外连续检测并连续收集所分离的各蛋白组份.

### 1.3 DEAE阴离子交换纤维素进一步分离纯化肌注IgG

使用DEAE柱层析法,起始缓冲液用0.05mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)HCl(pH = 8),混合梯度洗脱液为150ml起始缓冲液和150ml起始缓冲液 + 300mmolNaCl;分离柱为21×φ1.6cm,使用15g DEAE,分离肌注IgG(10%) 1.5~2 ml,洗脱速度1.3ml/min.

洗脱后所收集的全部试管样品均用UV检测,波长为210nm和280nm;并把经UV检测后所确定的2个分离蛋白组份分别集中起来.

### 1.4 使用葡聚凝胶Sephacryl S-200进一步分离纯化IgG

对肌注IgG作进一步的S-200凝胶过滤,用0.05mol/L NaCl溶液作洗脱液,速率为200ml/min;用280nm波长的紫外连续检测;弃去IgG峰前部分受聚集体污染的部分;而仅收集洗脱出IgG峰的中、后部分为纯IgG组分;调节pH至7,并用生理盐水保存.

### 1.5 GPC实验

用GPC色谱仪,分别对上述不同柱层析方法收集出的各蛋白组份进行GPC检测,以确定蛋白种类及IgG中是否含有聚集体<sup>[2]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 人血清蛋白在A-50的柱层析分离

使用A-50色谱柱从人血清蛋白中分离收集到5个蛋白组分的GPC谱如图1所示.经GPC鉴定,最先洗脱出来的第1和第2种蛋白组份为IgG,如图中1、2的α峰所示.GPC校正曲线获得其分子量约为 $1.5 \times 10^5$ ,若与利凡诺法提取的IgG的GPC谱图比较,它没有IgG峰左侧的聚集体肩峰<sup>[2]</sup>.这些结果都表明A-50柱层析分离法可直接从人血清蛋白中提取出不含聚集体的IgG.这一结果与Frieser等使用离子交换色谱法从人血浆蛋白生产IgG和白蛋白所得的结果一致<sup>[9]</sup>.

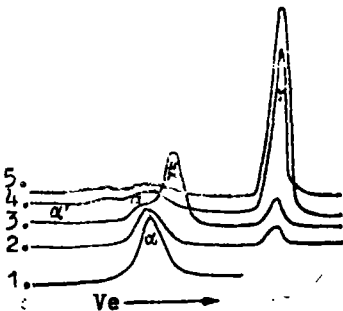


图1 人血浆蛋白经DEAE A-50色谱柱分离后收集的5种不同蛋白组份的GPC谱图(样品层析分离前先经超速离心和脱盐处理)

Fig. 1 GPC spectra of five different protein fractions collected from DEAE Sephadex A-50 column (Sample was centrifuged and desalted before being chromatographed)

接着洗脱出来的第3种蛋白组份主要是血清白蛋白,如图中曲线3的β峰所示,相应分子量范围为 $6.6 \times 10^4 \sim 6.9 \times 10^4$ .同时仍混有少量第1、第2种未洗脱完全的不含聚集体的IgG组份.

最后洗脱出来的第4、第5组份主要是一些分子量较小( $M$ 为 $5 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ )的残留血浆蛋白质分子,如图中曲线4、5的 $\gamma$ 峰示;同时还含有很小量的未洗脱完全的IgG( $\alpha$ 峰),但与第1、2、3种组份里的IgG不同,随着洗脱缓冲液梯度洗脱的离子强度的增加,这些IgG已产生部分缔合而形成自身聚集体( $\alpha'$ 峰),当IgG大量存在时,它则以肩峰的形式出现,其相应分子量范围是 $2.5 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^5$ ,表明强离子强度可使IgG单体发生缔合。

## 2.2 肌注IgG制剂的进一步柱层析分离

**2.2.1 DEAE阴离子交换纤维素的柱层析分离** 图2是肌注IgG样品经DEAE柱层析分离后的全部洗脱液的UV检测结果。按此结果可收集到2个不同的蛋白组份。经GPC进一步定性检测,第一组份主要是IgG( $\alpha$ 峰),第二组份主要是血清白蛋白( $\beta$ 峰),其GPC谱如图3所示。从第一组份IgG的GPC谱仍含有的聚集体的肩峰, (即 $\alpha'$ 峰,  $M$ 为 $2.5 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ )。这一事实表明使用DEAE层析法只能使在肌注IgG样品中的不同蛋白组份根据泳动速度的差异在不同离子强度缓冲液的洗脱下,依次分离出来,达到进一步纯化IgG组份的目的;而在肌注IgG中存在的自身聚集体<sup>(1,2)</sup>,依然不能用DEAE层析分离出来。这是由于DEAE是阴离子交换纤维素,不是分子筛色谱,所分离的组份不是按分子流体体积来分离,而是按蛋白质种类而分离,所以能分离出存在于IgG中的血清白蛋白,但并未能除去IgG中的聚集体。

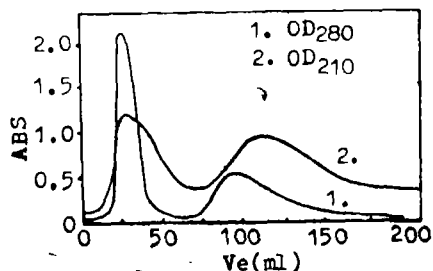


图2 肌注IgG的DEAE柱层析洗脱液的紫外光谱图

Fig. 2 UV spectra of the eluted solutions from the DEAE anion IgG hanger cellulose column for exc for intramuscular injection

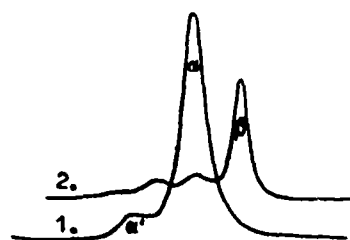


图3 两种蛋白组份的GPC谱图

Fig. 3 The GPC spectra of the two protein fractions collected according to the results shown in Fig. 2

**2.2.2 肌注IgG制剂的S-200凝胶过滤分离** 肌注IgG制剂使用Sephacryl S-200葡聚糖凝胶作进一步分离后的GPC谱图如图4中曲线2所示。与未经S-200过滤的肌注IgG谱比较(图4曲线1),它已不含IgG聚集体的肩峰。表明S-200凝胶过滤法能除去肌注IgG中所含的聚集体。因为凝胶过滤法是按照分子的流体体积进行分离的,当IgG被洗脱时,其聚集体部份由于分子量较大,先被洗脱出来。在监测凝胶过滤全过程的UV谱中,可弃去受聚集体污染的那部分IgG,而收集出不含聚集体的IgG组份。最后经GPC检测,确实达到除去其自身聚集体的目的。这一结果与Dejanov等使用S-200凝胶过滤法进一步纯化IgG而获得可用于静脉注射IgG的结果是一致的<sup>(4)</sup>。但S-200凝胶过滤法

却不能分离存在于肌注IgG中的白蛋白,原因是它们的分子量较接近,且白蛋白相对含量较少,其分子量对应的最大出峰时间已包含在IgG峰的整个对称的出峰时间内。为了避免IgG聚集体的污染,所接收的IgG是最好应在洗脱峰的中、后部份,因此白蛋白更是包含在内,所以S-200凝胶过滤未能进一步分离IgG中的白蛋白,但在DEAE层析法中却能满意地获得它们的进一步分离。这是两种不同的柱层析法对肌注IgG进一步分离纯化所获得的不同结果,也是不同载体的不同分离原理所致。

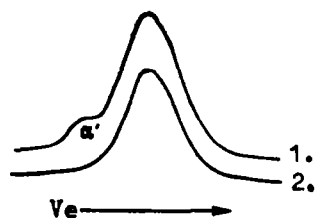


图4 市售肌注IgG制剂(1)和经S-200凝胶过滤后(2)的GPC谱图

Fig. 4 Comparison of the monomer concentration of IgG by gel filtration on Sephacryl S-200  
The GPC spectra of a commercial IgG for intramuscular injection before (1) and after (2) being treated by gel filtration on Sephacryl S-200

感谢项目协作单位广州市中心血站提供人血浆蛋白样品和肌注IgG样品。

### 参 考 文 献

- 1 梁国眉, 冯榕荫, 梁雪薇. 中山大学学报(自然科学版), 1991, 30(3): 58~62
- 2 梁国眉, 冯榕荫, 梁雪薇, 林木良. 中山大学学报(自然科学版), 1992, 31(1): 123~127
- 3 Frieseen A D *et al.* Separation of Plasma Proteins, Joint Meeting of the 19th Congress of the International Society of Haematology, Budapest, 1982. Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB, 1983, 118~124
- 4 Dejanov II *et al.* Separation of Plasma Proteins, Joint Meeting of the 19th Congress of the International Society of Haematology, Budapest, 1982. Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB, 1983, 141~194

## Study on Column Chromatographies of Immunoglobulin G for Intravenous Injection

Feng Rongyin\* Liang Guomei Lin Yanyi Lin Muliang

**Abstract** Immunoglobulin G (IgG) fractions separated and purified with column chromatographies were detected by gel permeation chromatography. The results show that the pure IgG uncontaminated by aggregated IgG (AGG) is obtained from human blood plasma by DEAE Sephadex A-50 anion exchanger cellulose column chromatography. The AGG can be removed and the human serum albumin can not be separated from IgG solution used for intramuscular injection by gel filtration on Sephacryl S-200, whereas these results are exactly contrary by using the DEAE anion exchanger cellulose column.

\* Instrumentation Analysis and Research Center, Zhongshan University

**Keywords** gel permeation chromatography, column chromatography separation, plasma proteins, anion exchanger cellulose, sephadex, immunoglobulin G

· 简 讯 ·

## 英国科学文摘(SA)收录我校自然科学学报

据中国科技信息研究所 1992 年 12 月发表的《1991 中国科技论文统计与分析》(年度研究报告), 英国科学文摘(SA)收录我国期刊 67 种, 中山大学学报(自然科学版)名列其中。英国科学文摘收录的我国科技期刊名称如下:

- |                                                 |                                                 |               |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------|
| 1 声学学报                                          | 23 电子科学学刊                                       | 45 仪器仪表学报     |
| 2 天文学报                                          | 24 华中理工大学学报                                     | 46 半导体学报      |
| 3 天体物理学报                                        | 25 分子科学(国际版)                                    | 47 空间科学学报     |
| 4 自动化学报                                         | 26 东南大学学报                                       | 48 中国物理快报     |
| 5 电子学报                                          | 27 上海交通大学学报                                     | 49 科学通报       |
| 6 地球物理学报                                        | 28 哈尔滨工业大学学报                                    | 50 中国物理       |
| 7 数学学报                                          | 29 同济大学学报                                       | 51 理论物理通讯     |
| 8 应用数学学报                                        | 30 清华大学学报                                       | 52 核化学与放射化学   |
| 9 力学学报                                          | 31 厦门大学学报                                       | 53 高能物理与核物理   |
| 10 固体力学学报                                       | 32 浙江大学学报                                       | 54 通信学报       |
| 11 金属学报                                         | 33 计算数学(英文版)                                    | 55 计算数学       |
| 12 气象学报                                         | 34 小型微型计算机系统                                    | 56 计算机科学与技术   |
| 13 物理学报                                         | 35 核聚变与等离子体物理                                   | 57 固体电子学研究与进展 |
| 14 低温物理学报                                       | 36 核技术                                          | 58 情报科学技术     |
| (Acta Physica Temper-<br>aturae Hemilis Sinica) | 37 海洋与湖沼                                        | 59 中国电机工程学报   |
| 15 北京大学学报(自然科学版)                                | 38 中国生物医学工程学报                                   | 60 中国科学 A 辑   |
| 16 中山大学学报(自然科学版)                                | 39 计算机学报                                        | 61 大气科学       |
| 17 地震学报                                         | 40 红外研究                                         | 62 地震与地质      |
| 18 电子技术应用                                       | 41 中国激光                                         | 63 真空科学与技术    |
| 19 天文学进展                                        | 42 低温物理学报                                       | 64 物理         |
| 20 电力系统自动化                                      | (Chinese Journal of Low<br>Temperature Physics) | 65 发光学报       |
| 21 大连理工大学学报                                     | 43 中国机械工程学报                                     | 66 中国激光       |
| 22 电工技术杂志                                       | 44 中国核物理杂志                                      | 67 核科学与工程     |

英国科学文摘 1991 年收录我国刊物 67 种, 比 1990 年增收 4 种, 它们是: 发光学报, 中国激光, 核科学与工程, 中国物理。

(张 文)