

· 研究简报 ·

## 免疫丙种球蛋白的缔合与分离及其动态性质\*

梁国眉 冯榕荫 梁雪薇 林木良

(测试中心)

**摘要** 用凝胶渗透色谱法研究了聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、血清白蛋白和医用明胶等稳定剂对免疫丙种球蛋白(IgG)的作用和效果,结合准弹性激光光散射法研究了它们对IgG分子平移扩散系数和流体力学尺寸的影响。结果表明,PVP和血清白蛋白对IgG单体起着屏蔽稳定作用而防止其自身凝聚,但并不与IgG形成复合物,因而不会改变IgG单体的分子结构与构型。

**关键词** 凝胶渗透色谱法,准弹性激光光散射,静脉注射免疫丙种球蛋白,聚乙烯基吡咯烷酮,血清白蛋白

静脉注射用免疫丙种球蛋白(IgG)必须排除引起人体产生过敏性休克的抗补体活性的IgG聚集体<sup>[1]</sup>。为此,除着力研究不含聚集体的IgG分离提取方法外,还必需建立IgG中聚集体的定性和定量检测方法。本文用凝胶渗透色谱法(GPC),对用利凡诺法从人血中提取的肌注IgG样品,和分别加入聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、血清白蛋白、医用明胶等的IgG样品进行了研究,检测IgG的聚集体及其含量变化;结合准弹性激光光散射法(QELLS)研究这些合成高分子和生物大分子的加入对IgG平移扩散系数( $D_T$ )和流体力学尺寸( $R_H$ )变化的影响。

### 1 实验部份

1.1 试剂 利凡诺法提取的人血IgG、血清白蛋白由广州市中心血站提供。PVP,  $M_w$ 为 $8.8 \times 10^4$ ,日本生产。医用明胶及某些SH试剂,如巯基乙醇和谷胱甘肽等均均为分析纯试剂。

1.2 GPC实验 仪器为日本Waters公司的208型LC/GPC色谱仪,色谱柱是Waters公司的Protein Park 300SW,分子量范围为10000~400000,采用波长为210nm的紫外检测器;用细胞色素C( $M = 1.17 \times 10^4$ )、牛血清白蛋白( $M = 6.8 \times 10^4$ )和卵清白蛋白( $M = 4.5 \times 10^4$ )等标样进行色谱柱校正,洗提液为0.5mol/L的生理盐水。通过标样的分子量和保留时间关系获得校正曲线。然后分别对IgG和添加不同稳定剂的IgG样品溶液进行检测,从凝胶色谱图定性分析IgG聚集体的存在,并用矩形法和分峰法对聚集体含量作定量计算。

1.3 QELLS实验 使用美国LDC/Milton Roy公司的KMX-6/DC小角激光光散射

本文1990年10月8日收到

• 广州市科委重点研究资助项目

仪结合美国Langle Ford公司的1096相关仪作准弹性激光光散射或称动态光散射或光子相关光谱的测量。测定各种IgG样品溶液散射光强度的时间自相关数,并应用累积分析程序拟合按单指数方式衰减的散射光场的时间自相关函数,获得溶液中IgG的 $D_T$ ,通过 $D_T$ 对浓度(C)依赖性的测量,获得无限稀溶液的 $D_T^{0,C^{2,3}}$ :

$$D_T = D_T^0(1 + K_d C)$$

通过Stokes-Einstein方程,获得溶液中散射大分子IgG的 $R_H^{[3]}$ :

$$R_H = K_B T / (6\pi\eta D_T^0)$$

式中, $T$ 为绝对温度(K), $K_B$ 为波尔兹曼常数, $K_B = 1.38 \times 10^{-16} \text{g} \cdot \text{cm}^2 / \text{s}^2 \text{K}$ 。

## 2 结果与讨论

2.1 IgG聚集体的表征及其离解、缔合性能的探讨 表1列出了GPC的实验数据。

表1 GPC法测定IgG的聚集体含量  
Tab. 1 Aggregation contents in Immunoglobulin G determined by gel permeation chromatography

样品溶液		GPC参数		IgG聚集体含量(%)		
样品名称	$\phi_w^*$	$M_n \times 10^{-4}$	$M_w \times 10^{-4}$	分散性(D)	矩形法**	分峰法***
IgG(1)/0.15mol/L NaCl aq	0	8.20	11.80	0.144	3.84	5.82
$C_{\text{IgG}(1)} = 4.2 \times 10^{-4} \text{g/ml}$	0	8.02	11.30	0.165	3.79	
	PVP,0.054	10.02	13.14	0.130	3.20	4.31
	PVP,0.32	10.10	12.15	0.120	2.63	2.65
	PVP,0.49	10.23	12.25	0.119	2.50	1.81
	谷胱苷肽,0.066	10.36	13.40		2.80	4.76
	巯基乙醇,0.066				3.73	6.40
IgG(2)/0.15mol/L NaCl aq.	0	9.05	12.03	0.133	2.74	4.73
$C_{\text{IgG}(2)} = 4.2 \times 10^{-4} \text{g/ml}$	人血白蛋白,0.23	9.27	12.59	0.136	2.97	4.94
	人血白蛋白,0.35	9.45	12.40	0.131	2.47	2.89
	人血白蛋白,0.38	9.01	11.70	0.130	2.33	2.99
	医用明胶,0.057	9.74	13.20	0.136	3.62	5.76
	医用明胶,0.39	9.72	13.34	0.137	3.85	5.46
IgG(3)/0.15mol/L NaCl aq.	0	9.80	13.40	0.137	3.83	5.46
$C_{\text{IgG}(3)} = 4.2 \times 10^{-4} \text{g/ml}$	人血白蛋白,0.056	9.66	13.15	0.136	3.64	5.10

- \*  $\phi_w$ : IgG中添加物所占重要份数;
- \*\* GPC谱图中IgG聚集体肩峰下切片的矩形面积之和占整体峰切片的矩形面积之和的百分数;
- \*\*\* 按高斯分布原则从GPC谱图中分别描出IgG聚集体及IgG的峰面积,用称重法求出聚集体峰面积所占的百分数

图1是几种IgG溶液的GPC谱图。

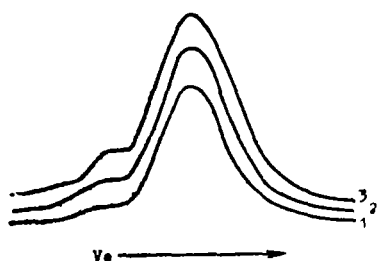


图1 几种IgG溶液的GPC谱图

Fig. 1 Comparison of several solutions of Immunoglobulin G by gel permeation chromatography

1. IgG(1)-PVP/0.15mol/L NaCl aq.,  $\phi_{wPVP} = 0.32$
2. IgG(1)/0.15mol/L NaCl aq.
3. IgG(2)-医用明胶/0.15mol/L NaCl aq.,  
 $\phi_{w\text{医用明胶}} = 0.39$

结果都表明, 用利凡诺法从人血中提取的IgG均含有其自身的聚集体, 如GPC谱图中的肩峰所示。从GPC校正曲线获得这些聚集体的相应分子量范围为 $2.5 \times 10^5 \sim 5.5 \times 10^5$ , 包括二聚体和多聚体, 其含量在5~8%左右(分峰法)。据报道<sup>[1]</sup> Cohn氏乙醇法提取的肌注IgG, 其聚集体含量更多, 甚至高达20%。

加入不同重量份数的PVP, 使原来IgG聚集体的含量从5.82%分别降至4.31%, 2.65%和1.81%(按分峰法计算)。这与静态光散射的实验结果<sup>[4]</sup>是一致的, IgG在生理盐水中测得 $M_w$ 为 $2.0 \times 10^5$ , 而加入10%以下的PVP, 测得 $M_w$ 为 $1.70 \times 10^5$ , 更接近于IgG单体的分子量( $M = 1.5 \times 10^5$ )。可见, 这种无毒的水溶性高分子能抑制IgG聚集体的形成, 同时具有使已缔合的IgG聚集体重新离解为单体的能力。

实验表明, 血清白蛋白对IgG单体也有一定的稳定作用, 但能力比PVP弱; 医用明胶的加入能进一步加强IgG的自身缔合聚集能力; 其他的一些小分子蛋白质稳定剂如谷胱甘肽、巯基乙醇等作用不明显。

PVP及血清白蛋白对IgG单体的稳定作用是有实用意义的, 选择 $M_w$ 大约为2500的PVP便能保证它完全排出体外<sup>[5]</sup>。据报道PVP在性能与行为上具有许多与蛋白质相似的性质, 特别是血清白蛋白。这些类似的性质, 使PVP一直是用于人造血浆的使用<sup>[6,7]</sup>。

### 2.2 IgG溶液的动态性质

表2列出了用准弹性激光光散射技术测定IgG单体在溶液中的平移扩散系数和流体力学尺寸。

实验结果表明, 在IgG的生理盐水溶液中不论是否加入PVP或血清白蛋白, 所测得IgG的 $R_H$ 均为 $120 \pm 3 \text{ \AA}$ 左右, 分子的尺寸并没有发生变化; 而单独测血清白蛋白和PVP分子的 $R_H$ 则大得多,  $M_w$ 为 $8.8 \times 10^4$ 和 $4.5 \times 10^4$ 的PVP其 $R_H$ 分别是213  $\text{\AA}$ 和141  $\text{\AA}$ ; 而血清白蛋白的 $R_H$ 为252  $\text{\AA}$ 。因此, 从 $R_H$ 测定的研究结果来看, 可以认为PVP和白蛋白分子均不会与IgG的单体分子相结合而形成复合物, 因而它们的加入不会破坏IgG的单体分子结构与构象, 所以不会影响IgG抗体的生物活性。这一实验事实与IgG抗体分子仅与能和它产生特异反应的相应抗原相结合而生成抗原抗体复合物的这一特性是一致的<sup>[8]</sup>。

结合上文<sup>[4]</sup>对 $M_w$ 、 $[\eta]$ 的测定及本文GPC的研究均表明, PVP和白蛋白能通过大分子链的静电范德华力及链结构的亲水疏水特性产生对IgG单体分子的亲和性, 从而削弱了IgG自身分子的亲和缔合及聚集作用。因此在肌注IgG中加入PVP或白蛋白能在一

表2 准弹性激光光散射法测定IgG溶液的动态性质  
 Tab. 2 Characterization of dynamic properties for Immunoglobulin G solutions by quasi-elastic laser light scattering

样品溶液	$\phi_w$	平移扩散系数( $D_T$ ) ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	流体力学尺寸( $R_H$ ) $\text{\AA}$
IgG(1)/0.15mol/L NaCl aq.	0	$3.55 \times 10^{-7}$	$123.0 \pm 0.44\%$
IgG(2)/0.15mol/L NaCl aq.	0	$3.60 \times 10^{-7}$	$120.5 \pm 0.60\%$
IgG(3)/0.15mol/L NaCl aq.	0	$3.51 \times 10^{-7}$	$124.6 \pm 0.50\%$
IgG(1)/0.15mol/L NaCl aq.	PVP, 0.054	$3.72 \times 10^{-7}$	$122.4 \pm 0.60\%$
	PVP, 0.32	$3.57 \times 10^{-7}$	$119.4 \pm 0.56\%$
	PVP, 0.49	$3.66 \times 10^{-7}$	$117.5 \pm 0.85\%$
PVP/C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH ( $\bar{M}_w = 8.8 \times 10^4$ )	0	$1.84 \times 10^{-7}$	$213.0 \pm 0.50\%$
PVP/C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH ( $\bar{M}_w = 4.5 \times 10^4$ )	0	$2.81 \times 10^{-7}$	$141.3 \pm 1.7\%$
血清白蛋白/H <sub>2</sub> O	0	$1.73 \times 10^{-7}$	$252.5 \pm 0.50\%$
IgG(3)/0.15mol/L NaCl aq. 血清白蛋白, 0.35		$3.53 \times 10^{-7}$	$124.5 \pm 0.50\%$

一定程度上减少IgG的聚集体, 这样在静脉注射过程中, 便能有效地减少由于IgG聚集体中单体FC段构象的改变而导致人体抗补体活性的过敏反应发生。这对IgG用于静脉注射的进一步研究和探索是有一定实际意义的。

感谢项目协作单位广州市中心血站提供IgG样品和血清白蛋白样品。

### 参 考 文 献

- 1 柏乃庆, 血液保存, 第二版, 上海:上海科学技术出版社, 1984:288
- 2 Gulari Er, Gulari Es, Chu B *et al.* Polymer, 1979, 20: 347
- 3 Berac B J, Pecora. Dynamic Light Scattering with Application to Chemistry, Biology and Physics, New York: Wileyinterscience, 1976: 38
- 4 梁国眉, 冯榕荫, 梁雪薇. 中山大学学报(自然科学版), 1991, 30(3):58
- 5 Haaf F, Sanner A, Straub F. Polymer J, 1985, 17: 143
- 6 Molyneux P, Ahmed G S. Kolloid Z U Z Polymere, 1973, 251: 310
- 7 Inoue Masami, Takayukiotsu, J Polymer Sci, Polymer Chem Ed, 1976, 14:1933
- 8 陶慰孙, 李惟, 姜涌明等. 蛋白质分子基础, 第一版, 北京: 人民教育出版社, 1982: 280

## Association, Separation and Dynamic Properties of Immunoglobulin G

*Liang Guomei\**    *Feng Rongyin*    *Liang Xuewei*    *Lin Muliang*

**Abstract** The effects of several stabilizers on aggregation and dynamic properties of Immunoglobulin G (IgG) in aqueous solutions were studied by gel permeation chromatography and quasi-elastic laser light scattering. The results showed that both polyvinyl-pyrrolidone and human serum albumin were of protection and stabilization for IgG and restrained it from intramonomer association while did not form complexes with IgG, therefore, the addition of them did not change the structure and conformation of the IgG monomer.

**Keywords** gel permeation chromatography, quasi-elastic laser light scattering, Immunoglobulin G for intravenous use, polyvinyl-pyrrolidone, human serum albumin

---

\* Instrumentation Analysis and Research Center