

人脐血干扰素的研究

II. 人脐血干扰素五种提纯方法的比较 及人脐血干扰素若干性质的探讨

杨崇泰 吴淑华 杨新科 侯云德 傅秋林

(中国医学科学院流行病学防治研究所, 北京)

本文比较了硫氰化钾盐析法、硫酸铵分级盐析法、混合盐析法、直接超速离心法以及离子交换层析法等五种提纯人脐血干扰素方法的优缺点。从操作简便、纯度高、活性强等方面综合考虑,以硫氰化钾盐析法和硫酸铵分级盐析法较为理想。经我们改进后的硫氰化钾盐析法和硫酸铵分级盐析法,可使人脐血干扰素比活性分别提高到 $2-6 \times 10^4$ 单位/毫克蛋白和 $1-1.4 \times 10^4$ 单位/毫克蛋白。经鉴定人脐血干扰素是一种糖蛋白,其分子量为 28,000。

干扰素是在干扰素诱生剂作用下,由细胞合成的一种蛋白质。大量的实验研究和临床实践已证明,外源性干扰素是一种具有广谱抗病毒的生物制剂^[1]。它对于病毒性疾病的防治有着光明的前途,因此,研制大量高效价人外源性干扰素是十分必要的。

近几年来,随着生物化学、分子遗传学、分子病毒学的发展,对干扰素的生化本质,基因控制等理论有了进一步的认识,制备和提纯干扰素的研究也有较大的进展。许多作者相继采用了盐析法、离子交换层析法、凝胶过滤、制备电泳^[2,6]、亲和层析^[3]、辅酶 A 特异结合^[4]、疏水结合法^[5]等,可使外源性干扰素活性提高到 10^8 国际单位/毫克蛋白以上。但是,这些方法尚缺乏系统的比较,目前仅停留在少量的实验性理论研究阶段。应用于临床治疗的外源性干扰素,不仅来源困难,其纯度和活性也达不到上述水平。如 Strander^[6] 为治疗肿瘤用的盐析法提纯人白血球干扰素活性达 $3.5 \times 10^5-10^6$ 国际单位/毫升,比活性达 10^4 国

际单位/毫克蛋白; Emödi^[7] 为治疗带状疱疹制备的人白血球干扰素,比活性为 10^4 国际单位/毫克蛋白。临床应用时,常有发烧反应^[6-8],因此,迫切需要研究可供临床应用的高效价纯的外源性干扰素的简便制备方法。

我们首次报道^[9],用人脐带全血代替成人白细胞制备干扰素,不仅方法简便,而且单位产量比后者可提高 1 倍左右。本文比较直接超离心法、硫氰化钾盐析法、硫酸铵分级盐析法、混合盐析法以及离子交换层析法等五种提纯人脐血干扰素方法的优缺点;并探讨了某些影响盐析法提纯人脐血干扰素的因素以及人脐血干扰素的某些理化性质。

材料与方法

一、材料来源

新鲜人脐带全血,以新城鸡瘟病毒为干扰素诱生剂,制备出人脐血干扰素粗制品^[9]。干扰素

本文于 1977 年 11 月 28 日收到。

粗制品 (CIF) 原始效价为 2—4,000 单位/毫升, 蛋白质含量为 10—15 毫克/毫升。

二、人脐血干扰素提纯方法

1. 直接超速离心法: 取人脐血干扰素粗制品若干毫升加入离心管中, 用 MSE-75 型超速离心机水平 60,000 转/分, 选用从 20,000—60,000 转/分 (31,000—287,000 $\times g$) 七种不同转速, 于 4℃ 条件下, 分别离心一小时, 离心后沉淀以无菌磷酸缓冲盐水溶解, 分别取上清和沉淀测其活性效价并进行鉴定。

2. 硫氰化钾盐析提纯法: 取人脐血干扰素粗制品若干毫升, 经 2,500 转/分离心 20 分钟, 弃除沉淀物, 以 6N HCl 调 pH 至 3.0, 置 4℃ 平衡过夜, 翌日将溶液移入沉淀瓶中, 向溶液中滴加等量的 1M KCNS (pH 3.0) 溶液, 或加入灭菌的固态 KCNS, 使其溶液终浓度为 0.5M, 边加边摇, 立即产生大量絮状黄色沉淀, 于 4℃ 放置过夜, 使其充分反应, 次日 3,000 转/分离心 20 分钟, 弃上清, 沉淀以粗制品原体积的 1/30—1/50 的 0.1M NaAC 溶液 (pH 7.3) 溶解, 然后, 在 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 中透析, 4℃ 过夜, 透析至无 CNS⁻ 离子存在 (以 AgNO₃ 试剂检查无白色沉淀出现)。浓缩的干扰素溶液再于 MSE-75 型制备超速离心机 SW-40,000 转/分 (25,000 $\times g$), 于 4℃, 离心 1 小时 (或 Phawe 超速离心机制备转头 25,000 $\times g$), 上清液为提纯的干扰素。根据需要可重复以上过程再进行第二次提纯。

3. 硫酸铵分级盐析提纯法:

(1) 粗制干扰素若干毫升经 2,500 转/分离心 20 分钟, 弃除沉淀, 上清以 6NHCl 调至 pH 2.0, 于 4℃ 下, 平衡过夜。

(2) 25% (NH₄)₂SO₄ 盐析。翌日, 向干扰素溶液中加入灭菌的固态 (NH₄)₂SO₄, 使其终浓度为 25%, 边加边摇, 产生絮状沉淀, 置 4℃ 过夜, 次日 3,000 转/分离心 20 分钟, 弃沉淀取上清。

(3) 55% 饱和 (NH₄)₂SO₄ 盐析。将饱和硫酸铵以 10 NH₄SO₄ 调至 pH 6.0, 滴加进上清液中, 边加边摇, 使其饱和度为 55%, 4℃ 放置过夜, 次日, 3,000 转/分离心 20 分钟, 弃上清。

(4) 透析。沉淀物以 0.05 M 磷酸缓冲液溶解, 然后对 0.05 M 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 透析过夜, 4℃, 透析至无 NH₄⁺ (以奈氏试剂检查) 及

SO₄²⁻ 存在 (以 BaCl₂ 检查) 为止。

(5) 超速离心。将透析液于 Phawe 超速离心机制备 1 号转头, 25,000 $\times g$ 离心 1 小时, 弃沉淀, 上清液为提纯的干扰素 (第一次)。

(6) 二次提纯。将第一次提纯之干扰素再重复以上全部过程得到第二次提纯之干扰素产品。

4. 混合盐析提纯法: 用 KCNS 和 (NH₄)₂SO₄ 联合进行盐析, 即将粗制人脐带血干扰素先用 25% (NH₄)₂SO₄ 盐析, 上清液再经 0.5 M KCNS 盐析, 透析及超速离心, 所得上清液为提纯之干扰素 (具体步骤同前 2、3 法)。

5. 离子交换层析法: 选用羧甲基-交联葡聚糖-C₆₀ (CM-Sephadex-C₆₀), 按常规进行预处理、膨胀、灭菌, 柱为 2.5 \times 30 厘米, 装柱后, 以 pH 4.0, 0.01M HAC 缓冲液平衡, 样品为经硫酸铵盐析法提纯之干扰素 (PIF), 加样后进行分段洗脱, 洗脱使用三种不同的缓冲液, 即 0.01 M HAC 缓冲液 (pH 4.0); 0.1M 磷酸缓冲液 (P/B) 含 0.1 M NaCl (pH 7.2); 0.01 P/B 含 1M NaCl pH 7.2。收集液各管于紫外分光光度计测定波长 280 毫微米吸收值, 一般出现三个峰形, 第三峰为提纯干扰素, 经脱盐浓缩可得到提纯产品。

三、提纯干扰素的鉴定方法

1. 干扰素活性效价测定: 采用细胞病变抑制法^[9], 干扰素活性效价为单位/毫升, 比活性为单位/毫克蛋白。

2 干扰素蛋白含量测定: 采用直接紫外分光光度法, 即将样品于紫外分光光度计测得波长 280 毫微米和 260 毫微米的光吸收值, 以经验公式计算蛋白含量^[10]。

3. 干扰素纯度的鉴定: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法^[12,13] 鉴定, 丙烯酰胺 (Acrylamide, 广州南中塑料厂出品), 经氯仿法重结晶, N,N'-甲叉双丙烯酰胺 (N,N'-methylene-Bisacrylamide, 广州南中塑料厂出品), 经丙酮法重结晶而得。凝胶浓度为 70%。分离胶聚合采用 0.14% 过硫酸钾-DMPN (二甲氨基丙腈) 系统, 隔层胶的聚合采用 0.04% 核黄素-DMPN 系统荧光光聚合。分离胶高度为 6 厘米, 隔层胶高度为 0.5 厘米。电极缓冲液为 0.05 M Tris-0.38 M 甘氨酸缓冲液 (pH 8.3)。样品中加入一滴 30% 蔗糖, 再加少量

0.05% 溴酚蓝做示踪剂。加样量为 50—100 微克。电泳时电流强度为 3.4 毫安/凝胶管,电压平均 13 伏/厘米,电泳历时 1.5—2 小时。电泳后,用 0.05% 氨基黑 10B 溶液染色 1 小时,然后以 7% 醋酸溶液脱色过夜。以凝胶区带条数鉴定干扰素的纯度。

4. 糖蛋白鉴定方法:根据 Zacharius 和 Zall^[14] 的方法加以改进。Schiff 试剂的配制使用碱性品红,试剂配好后应为淡桔黄色。电泳后的凝胶首先用 15% 的三氯醋酸固定一小时,然后,用 1% 过碘酸浸泡一小时,用流动水冲洗 90 分钟,一定要把 IO_2^- 洗净,再于 Schiff 试剂中染色过夜,次日以亚硫酸溶液 (1% 偏亚硫酸钠 10 毫升,加 10 毫升 2N HCl 加水至 200 毫升) 洗二小时,出现红色区带者为糖蛋白成份。

实验结果

一、人脐血干扰素五种不同提纯方法的效果比较

我们分别使用直接超速离心法(I 法)、硫氰化钾盐析法(II 法)、硫酸铵分级盐析法(III 法)、混合盐析法(IV 法)以及离子交换层析(V 法)等五种方法,进行了 50 批人脐血干扰素提纯试验。对各种方法提纯前后的产品,同时测定了它们的蛋白质含量,干扰素的活性效价,干扰素比活性及产品纯度(以凝胶电泳曲带条数表示)。各种方法提纯效果有很大差别,其结果归纳如表 1。

表 1 人脐血干扰素五种不同方法提纯效果比较

| 提纯方法 名称 | 蛋白质含量 | | | | | 干扰素活性效价 | | | | | 干扰素比活性 | | | 提纯产 品之纯 度(电 泳曲带 数) |
|---|-----------|---------------|-----------|-------------|------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------|----------------------|---------------------------|-------------|--------------------------------|
| | 提 纯 前 | | 提 纯 后 | | 回收率 (%) | 提 纯 前 | | 提 纯 后 | | 回收率 (%) | 提纯前 (单位/ 毫克蛋白) | 提纯后 (单位/ 毫克蛋白) | 提高 倍数 | |
| | 毫克/ 毫升 | 总蛋白 (毫克) | 毫克/ 毫升 | 总蛋白 (毫克) | | 工作单 位/毫 升 | 总活性 (单位) | 工作单 位/毫 升 | 总活性 (单位) | | | | | |
| I 直接超速 离心法 (60,000 转/ 分—287,000 ×g) | 10.56 | 105.6 | 2.4 | 3.2 | 3 | 1536 | 15360 | 128 | 506.8 | 3.3 | 145 | 53 | — | 4—5 |
| II KCNS 盐析法 | 10—15 | 1000— 1500 | 1—6 | 6—105 | 0.6—7 | 1536— 3738 | 1.5— 3.7× 10 ⁵ | 7—10 ×10 ⁴ | 0.45— 2.22× 10 ⁵ | 30—60 | 145— 220 | 2—6× 10 ⁵ | 138— 273 | 1—3 |
| III (NH ₄) ₂ SO ₄ 分级盐析法 | 10—15 | 1000— 1500 | 0.6—4 | 0.5— 45 | 0.05— 3 | 1536— 3738 | 1.5— 3.7× 10 ⁵ | 7—10 ×10 ⁴ | 0.45— 1.48× 10 ⁵ | 30—40 | 145— 220 | 1—1.4 ×10 ⁵ | 636— 683 | 1—2 |
| IV 混合盐析法 | 10—15 | 1000— 1500 | 0.8—4 | 20— 120 | 2—8 | 1536— 3738 | 1.5— 3.7× 10 ⁵ | 0.8—1 ×10 ⁴ | 0.075— 0.37 ×10 ⁵ | 5—10 | 145— 220 | 0.4—1 ×10 ⁴ | 27—45 | 2—3 |
| V 离子交换 层析法 | 15.25 | 610 | 0.25 | 0.125 | 0.02 | 3318 | 1.33× 10 ⁵ | 4.8× 10 ⁴ | 0.24× 10 ⁵ | 18 | 214 | 1.92× 10 ⁵ | 897 | 1 |

根据表 1 的结果,经提纯后的干扰素蛋白质含量以 V 法最低,为 0.25 毫克/毫升,总蛋白质回收率只有 0.02%;III 法次之,蛋白含量为 0.6—4 毫克/毫升,回收率为 0.05—3%;提纯后干扰素活性效价以 II、III 法最高为 7—10×10⁴ 单位/毫升, I 法

最低为 128 单位/毫升;提纯干扰素比活性以 V 法最高,为 1.92×10⁵ 单位/毫克蛋白,III 法次之为 1—1.4×10⁵ 单位/毫克蛋白, I 法最低为 53 单位/毫克蛋白;提纯产品纯度, V 法最纯,为一条区带, III 法 1—2 条, I 法则为 4—5 条。综合提纯产品的纯

度,干扰素的活性和比活性等项指标,说明提纯效果以离子交换层析法为优,(NH₄)₂SO₄ 分级盐析法和 KCNS 盐析法次之,直接超离心法最差。

二、盐析法提纯人脐

血干扰素的结果

根据五种不同方法提纯效果的比较,从方法简便,活性高,适用于临床治疗需要的角度出发,我们确定采用 KCNS 盐析法和 (NH₄)₂SO₄ 分级盐析法。对这两种方法,

我们进行了进一步实验。实验结果表明, KCNS 盐析法和 (NH₄)₂SO₄ 分级盐析法提纯之干扰素活性均可从 2—4,000 单位/毫升提高到 7—10×10⁴ 单位/毫升,蛋白含量分别由 10—15 毫克/毫升下降至 0.6—4 毫克/毫升及 1—6 毫克/毫升,比活性从 145—220 单位/毫克蛋白提高到 2—6×10⁴ 单位/毫克蛋白及 1—1.4×10⁵ 单位/毫克蛋白,分别提高了 138—273 倍及 636—683 倍。表 2 所示为这两种提纯方法提纯效果的比较。

表 2 盐析法提纯人脐血干扰素结果

| 样品编号 | 提纯方法 | 体 积 | | 蛋白质含量 | | | 干扰素活性效价 | | | 比 活 性 | |
|----------------------|--|------------|--------------------|---------------------|-------------|------------|---------------------|--------------------------|------------|----------------------|------|
| | | 体积 (毫升) | 浓缩 倍数 | 蛋白含量 (毫克/ 毫升) | 总蛋白 (毫克) | 回收率 (%) | 效价 (单位/ 毫升) | 总效价 (单位) | 回收率 (%) | 比活性 (单位/ 毫克蛋白) | 提高倍数 |
| CIF ₇₆₋₂₀ | 粗制品 | 100 | 0 | 12.4 | 1240 | 100 | 3318 | 3.3×10 ³ | 100 | 267.5 | — |
| PIF ₂₁ | (NH ₄) ₂ SO ₄ 第一次提纯 | 3.5 | 28.6 | 8.5 | 29.8 | 2.4 | 4.1×10 ⁴ | 1.4×10 ⁵ | 42.4 | 4824 | 18 |
| PIF ₂₃ | (NH ₄) ₂ SO ₄ 第二次提纯 | 0.9 | 3.9 (原液 111) | 0.6 | 0.54 | 0.045 | 7.5×10 ⁴ | 0.68× 10 ⁵ | 20.6 | 1.25×10 ⁵ | 467 |
| CIF ₇₇₋₃ | 粗制品 | 100 | 0 | 9.2 | 920 | 100 | 3738 | 3.7×10 ³ | 100 | 415 | — |
| PIF ₄₃ | KCNS 二次提纯 | 3.0 | 33 | 1.68 | 5.04 | 0.54 | 8.2×10 ⁴ | 2.5×10 ⁵ | 67.5 | 4.8×10 ⁴ | 115 |

从表 2 可见,人脐血干扰素粗制品 CIF₇₆₋₂₀, 原始效价为 3318 单位/毫升,比活性为 267.5 单位/毫克蛋白,经第一次硫酸铵分级盐析提纯,得到提纯产品 PIF₂₁ 效价为 4.1×10⁴ 单位/毫升,比活性为 4824 单位/毫克蛋白,再经第二次提纯效价则可提高到 7.5×10⁴ 单位/毫升,比活性为 1.25×10⁵ 单位/毫克蛋白,比活性提高了 467 倍。CIF₇₇₋₃ 人脐血干扰素粗制品比活性从 415 单位/毫克蛋白,提高至 4.8×10⁴ 单位/毫克蛋白,提高 115 倍。

图版 I-1 为人脐血干扰素经 (NH₄)₂SO₄ 提纯前后的电泳结果,表明粗制干扰素 CIF₇₆₋₂₆ 具有 6 条区带,说明含有 6 种蛋

白质成份,而 PIF₂₁ 有带_{3,4,6} 三条区带,说明经过一次硫酸铵分级盐析提纯区带_{1,2,5} 蛋白成份被去除,区带_{3,4} 二种蛋白成份的含量也有显著减少,PIF₂₃ 只有一条曲带,说明经第二次硫酸铵分级盐析又去除了 PIF₂₁ 中区带_{3,4} 蛋白质成份,余下区带₆ 为提纯之干扰素蛋白成份,它的活性效价为 8.5×10⁴ 单位/毫升。

图版 I-2 是人脐血干扰素经 KCNS 盐析提纯前后电泳结果,图版 I-2 中 A 是 CIF₇₆₋₂₀ 粗制人脐血干扰素,具有六条区带即六种蛋白质成份,经过固态 KCNS 盐析提纯得到产品 PIF₂₁(B),主要具有区带成份,还有少量曲带_{3,4} 成份,从而说明

KCNS 盐析法提纯干扰素,也能得到基本上纯的干扰素制剂,但其纯度较硫酸铵分级盐析法略低些。

三、盐析法提纯干扰素的影响因素

1. 盐溶液 pH 值的影响: 为了寻求盐析中盐溶液合适的 pH 值,我们曾用同一批干扰素粗制品(如 C1F₇₆₋₁₀),相同的样品量(1 毫升),分为八组,分别调 pH2—9,然后加入等量 1 M KCNS 溶液,KCNS 溶液也预先调为 pH2—9,与 pH 值相对应的样品混合,摇匀,置 4℃ 过夜,次日 3,000 转/分离心 20 分钟,沉淀于 0.1 M NaAC 溶液中,使其复溶,2—8 倍稀释,然后,用直接紫外分光光度法测其各管蛋白质含量,结果如图 1。

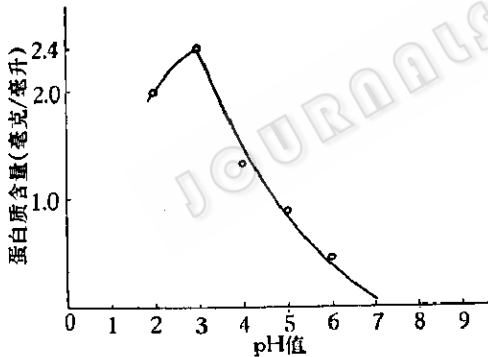


图 1 盐溶液 pH 值对盐析之影响

实验结果表明,盐溶液的 pH 值对盐析影响是很大的,在 pH 3.0 时蛋白含量最高 2.4 毫克/毫升,而 pH 3.0 以后蛋白含量逐渐降低, pH 7.0—9.0 时则几乎无蛋白沉淀产生,此时,尽管再加 2—3 倍以上量的 KCNS 溶液,也仍然不能使干扰素蛋白沉淀下来。据此,使用 KCNS 盐析法, KCNS 溶液 pH 值以 2—3 为宜。同样,经实验证明使用 (NH₄)₂SO₄ 分级盐析法,第一级 25% (NH₄)₂SO₄ 盐析时,最适 pH 为

2—3.0, 而 55% 饱和 (NH₄)₂SO₄ 盐析时最适 pH 为 5—6.0。

2. 盐溶液浓度的影响: 配制 2 M KCNS 溶液,以无离子水分别稀释为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 M 8 个浓度,每个浓度各取 2 支试管,每管 1 毫升,调 pH 至 3.0,然后各管分别加入 1 毫升干扰素粗制品(如 C1F₇₆₋₁₀),摇匀,4℃ 过夜。次日,3,000 转/分离心 20 分钟,沉淀溶于 0.1 M NaAC 并稀释至 8 毫升,使沉淀完全复溶,溶液于紫外分光光度计测定光密度 280 毫微米值。盐溶液浓度与光密度 280 毫微米即沉淀蛋白含量关系如图 2。图 2 说明,在同一 pH 值情况下, KCNS 溶液在 0.5 M 以上至 2 M,沉淀蛋白含量无明显差别,只是在浓度 1.0 M 以上沉淀产生的速度有所加快。因此,使用 KCNS 盐析法提纯人脐血干扰素时 KCNS 溶液以 0.5 M KCNS 溶液浓度为宜。

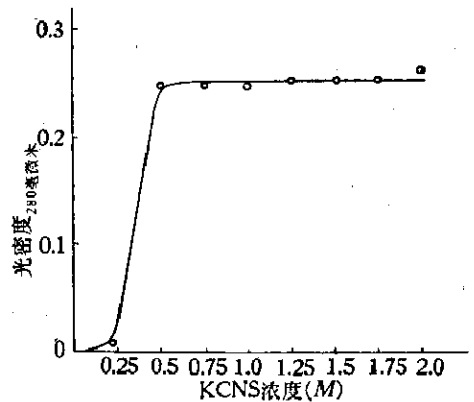


图 2 盐溶液浓度对盐析的影响

3. 超离心速度对盐析法提纯的影响: 取同一批干扰素粗制品(如 C1F₇₆₋₂₆),采取完全相同的步骤,所得浓缩的干扰素,第一组以 25,000 × g, 4℃ 超离心 1 小时,第二组以 105,000 × g, 4℃,超离心 1 小时,吸取上清所得提纯之干扰素。第一组产品活性效价为 17,920 单位/毫升,蛋白含量为

6.4 毫克/毫升,第二组的活性效价为 17,920 单位/毫升,蛋白含量为 5.5 毫克/毫升。两组的活性相同,高速组蛋白含量略低一些。结果说明超速离心速度对盐析法影响不大。因此,我们选用了 $25,000 \times g$, 于 4°C 下,离心 1 小时。

四、人脐血干扰素若干

理化性质的探讨

1. 人脐血干扰素 CIF_{76-26} 经硫酸铵分级盐析提纯的产品 PIF_{11} , 再经 CM-葡聚糖-C_{50} 离子交换柱层析, 阶段洗脱收集, 收集液分别测定光密度 260 毫微米, 所得曲线如图 3, 出现三个峰形。将三个峰收集液分别测定干扰素活性, 只有第三峰有活性, 效价为 4.8×10^4 单位/毫升。将第三峰干扰素提纯产品浓缩后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 电泳后凝胶用 Schiff 试剂染色, 胶柱上出现一条红色区带, 如图版 I-3 所示。因 Schiff 试剂是对糖蛋白的特异性染色剂, 凝胶柱上出现红色曲带(相当于图版 I-1 中区带位置), 证明所鉴定干扰素是一种糖蛋白成份。

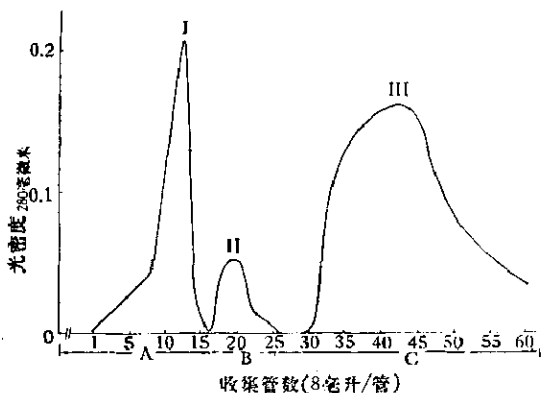


图3 人脐血干扰素离子交换层析图
 CM-葡聚糖-C_{50} 柱, 30×2.5 厘米, 流速 1 毫升/分,
 洗脱液: A: 0.01M HAC 缓冲液, $\text{pH}4.0$;
 B: 0.01M P₈B- 0.1M NaCl, $\text{pH}7.2$;
 C: 0.01M P₈B- 1M NaCl, $\text{pH}7.2$ 。

2. 人脐血干扰素分子量的测定

根据 Shapiro 和 Weber^[15,16] 的由电泳迁移率计算分子量的方法。取人脐血干扰素提纯样品 50 微克, 按常规进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后测量胶柱长度 (L_1), 柱顶端至溴酚蓝指示剂距离 (D_1), 染色后胶柱长 (L_2) 和色带移动距离 (D_2), 然后, 根据公式计算该蛋白质的电泳迁移率 V_e 。如提纯之人脐血干扰素 PIF_{23} , 其分子量测定结果如下:

$$V_e = \frac{D_2 L_1}{D_1 L_2} = \frac{5.0 \times 5.8}{5.5 \times 7.0} = 0.753$$

根据计算所得之 PIF_{23} 蛋白电泳迁移率, 从已知分子量的铁蛋白、牛血清清蛋白、溶菌酶等标准样品所制得的分子量测定的标准曲线上, 查得人脐血干扰素分子量为 28,000。

讨 论

本文比较了五种不同方法提纯人脐血干扰素, 其优缺点列于表 3。由表可见, 从操作简便, 重复性强, 活性回收率高, 纯度大等方面综合考虑, 以 KCNS 盐析法和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析法, 可使干扰素的比活性分别提高到 $2-6 \times 10^4$ 单位/毫克蛋白和 $1-1.4 \times 10^5$ 单位/毫克蛋白。

由于本实验室采用病毒抑制法测定干扰素的效价, 测定的细胞也非国际上规定的敏感细胞, 因此, 本实验室的干扰素工作单位要比国际单位大。我们使用的 KCNS 盐析法中 KCNS 是固态的, 使其终浓度为 0.5M , 这样操作更为简便。硫酸铵盐析法提纯干扰素, 在文献中多见于使用其它方法中的处理手段, 如离子交换层析法、凝胶过滤法、制备电泳、亲和层析等^[2-5,11], 为了简化手续, 我们省去了以后的繁琐步骤, 使用固态 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 第一级盐析, 去除大分子杂

表 3 五种不同干扰素提纯方法优缺点比较

| 方法名称 | 提纯产品 活性效价 | 比活性 | 操作简易程度 | 产品纯度 | 可重复性 | 全流程所需时间 |
|--------------------------------------|--------------|-----|--------|------|------|---------|
| 直接超离心法 | 低 | 低 | 繁 | 不纯 | 强 | 8 小时 |
| KCNS 盐析法 | 高 | 较高 | 简单 | 较纯 | 强 | 6 天 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级盐析 | 高 | 高 | 简单 | 纯 | 较强 | 5 天 |
| 混合盐析法 | 较低 | 较低 | 较简单 | 较纯 | 差 | 5 天 |
| 离子交换层析法 | 较高 | 最高 | 繁 | 纯 | 较差 | 10 天 |

蛋白物质, 再使用液态饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析, 如此反复 2—3 次, 同样可得较高效价的提纯人脐血干扰素。

过去已经证明, 人白细胞干扰素是一种糖蛋白 (glycoprotein)^[17,18]。Knight^[2] 用人成纤维细胞干扰素经过提纯得到一个具有干扰素活性的多肽, 这个多肽经特异的糖蛋白染色——Schiff 试剂染色, 证明人成纤维细胞干扰素也是糖蛋白。我们的实验结果证明人脐血干扰素也是一种糖蛋白, 是与人白细胞干扰素, 人成纤维细胞干扰素具有相同的化学本质。

我们利用电泳迁移率法测定人脐血干扰素分子量约为 28,000, 它比人白细胞干扰素 (25,000) 人成纤维细胞干扰素 (20,000) 的分子量略大些。但总的来看, 干扰素分子量是很小的, 它们经 $100,000 \times g$ 超离心不沉淀, 我们在实验中曾用 $287,000 \times g$ 超速离心, 干扰素仍不沉淀, 活性部分仍留在上清液中。

关于干扰素的分子量, 很久以来认为是具有多型性的。Carter 氏^[19] 曾提出干扰素分子是由一万数千分子量为单位, 在一定条件下可有 2 倍或 2 倍以上复合体存在, 但也有人用变性试验否定了这个假设。Matsuo 氏^[11] 用凝胶过滤法分析了干扰素的有效成份, 认为干扰素分子具有三种表面电荷的不同类型, 等等。我们认为, 在尚未

得到干扰素的结晶, 搞清它的结构以前, 尚难对干扰素分子量做出肯定的结论。

参 考 文 献

- [1] Finter, N. B.: in Finter, N. B. "Interferons and Interferon inducers" pp. 363, 1973.
- [2] Knight, E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 73:520, 1976.
- [3] Paucker, K.: in "Effects of Interferon on cells, Virus and the Immune System" Academic Press, New York. p. 539, 1975.
- [4] Davey, M. W., et al.: *J. Biol. Chem.*, 249: 6354, 1974.
- [5] Huang, J. W., et al.: *J. Biol. Chem.*, 249: 4665, 1974.
- [6] Strander, H., et al.: *Cancer*, 51:733, 1973.
- [7] Emödi, G., et al.: *Scand. J. Ind. Dis.*, 7: 1, 1975.
- [8] Greenberg, H. B., et al.: *N. E. J. M.*, 295:517, 1976.
- [9] 吴淑华等: 微生物学报, 18 (3): 225—231, 1978.
- [10] Kalcker, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 167:461, 1947.
- [11] Matsuo, A., et al.: *Japan. J. Microbiol.*, 18:1, 1974.
- [12] Davis, B. J.: *Annals New York Acad. Sci.*, 121:404, 1964.
- [13] Maizel, J. V.: in "Methods in Virology Vol. 5." pp. 180, 1971.
- [14] Zacharius, R. M., et al.: *Anal. Biochem.*, 30:149, 1969.
- [15] Shapiro, A. L., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28:515, 1967.
- [16] Weber, K.: *J. Biol. Chem.*, 244:4106, 1969.
- [17] Dorner, F., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70:1981, 1973.

[18] Havell, E. A., et al.: *Virology*, 63:475, 1975.

[19] Carter, W. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67:620, 1970.

A STUDY ON THE INTERFERON FROM HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD

II. COMPARISON OF PURIFICATION METHODS OF INTERFERON AND PRELIMINARY STUDY OF ITS CHARACTERISTICS

Yang Chong-tai Wu Shu-hua Yang Xin-ke Hou Yun-de Fu Qiu-lin

(*Institute of Epidemiology Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

A comparative study on the methods for the purification of interferon from human umbilical cord blood has been carried out. The methods studied were the salting out by potassium thiocyanate, the classical salting out by ammonium sulfate, mixed salting out procedure, direct ultracentrifugation and ion exchange chromatography. The first two methods were found to be more preferable as they possess the following advantages:

simplicity in the preparation of specimens under study, time saving, higher yields of purified interferon, and higher specific activities. By means of these two methods, the specific activities of the final products were increased to $2-6 \times 10^4$ units/mg protein and $1-1.4 \times 10^5$ units/mg protein respectively. Preliminary characterization indicated that human cord blood interferon is a glycoprotein with a molecular weight of 28,000.