

用大型反相高效液相制备色谱法 分离基因工程白细胞介素-2

杨 青

(沈阳军区军事医学研究所 沈阳 110031)

摘要 探索了大规模生产制备基因工程白细胞介素-2(rIL-2)的新工艺,采用等度和线性梯度相结合的方法,用大型反相高效液相制备色谱法分离提纯 rIL-2,并用电泳仪等测量了提纯物的纯度,结果表明:用新方法制备的 rIL-2纯度大于95%,冻干后成品比活大于 10^{10} IU/g,且上样量大,在实际生产中应用价值很高。

关键词 高效液相制备色谱法,白细胞介素-2

1 前言

白细胞介素-2即T细胞生长因子,是由T细胞产生的淋巴因子,它在治疗肿瘤、增强免疫力等方面具有广泛的应用前景^[1,2]。目前国内外分离、提纯基因工程白细胞介素-2(rIL-2)主要是使用一种阴离子表面活性剂 SDS(十二烷基硫酸钠)助溶,使分离达到一定的纯度。这种方法存在的一个最大的缺点是:如果 rIL-2提纯液中的 SDS 去除不完全,残留的微量 SDS 将会对人体造成危害,而且普通制备柱上样量小,成本高^[3-6]。本实验尝试了新的方法:上样液中不加 SDS 助溶,而采用等度、线性梯度洗脱相结合的方法,用大型反相高效液相制备色谱法进行分离纯化。研究结果表明:用本文的方法,大量上样提纯后的 rIL-2在含量、纯度、活性等方面均满足要求,效果良好。

2 实验部分

2.1 原料

Sephacryl S-200柱后的 rIL-2收集液(用6mol/L 盐酸胍作流动相),复性,然后超滤浓缩、透析除盐。除盐后的溶液即为 RP-C₁₈制备柱的上样液。

2.2 高效液相制备色谱仪及分离条件

Waters Delta 4000高效液相制备色谱仪,配170进样器,486紫外检测仪,Millennium 2010色谱数据处理库。色谱柱:Waters 的 PrepPark Holder Assembly (C₁₈, 4.0cm × 30cm),用0.1%三氟乙酸(TFA)溶液平衡待用。

分离提纯条件:流动相为 A:水+0.1% TFA,

B:乙腈+0.1% TFA,分离条件见表1。检测波长 280nm,洗脱液流速:10mL/min。进样后收集各分离组分,分离谱图见图1。

表1 rIL-2洗脱条件

时间(分) Time(min)	流动相组成(A:B) Mobile phase composition(A:B)
0~10	65:35
15~25	50:50
35~50	40:60
55~60	0:100

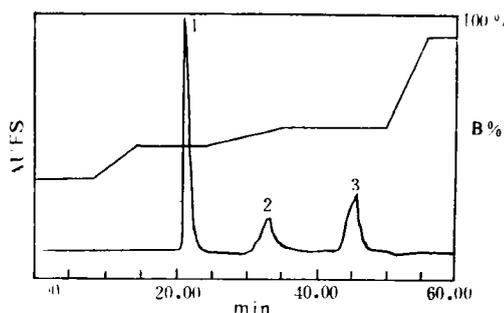


图1 rIL-2反相高效液相制备色谱分离谱图

Fig. 1 The chromatogram of rIL-2 on preparative RP-HPLC

3 结果与讨论

进样后收集保留时间在40~50min之间和乙腈浓度为60%的组分,测其纯度,结果见图2和图3。

图2是对乙腈浓度为60%的收分进行的还原 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分子量测定。选用银染色,测定结果显示此峰为纯 rIL-2。



图2 第三峰的还原
SDS-PAGE 谱图

Fig. 2 SDS/PAGE
analysis of peak 3

A 为第三峰。
Peak 3 is A.

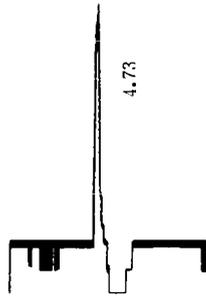


图3 第三峰的高效液相
色谱法分析谱图

Fig. 3 Chromatogram of
peak 3 on HPLC

图3是对乙腈浓度为60%的收分进行高效液相色谱法的分析测定。其中,检测仪为 Beckman Gold System,洗脱液为甲醇/0.1% TFA,梯度洗脱,流速 0.5mL/min,检测波长280nm。由检测结果可以看出:此峰的纯度大于95%。

分离谱图中的第二峰内也含有部分 rIL-2,可将其回收,重新上样分离。

由于本方法采用的是大型制备柱,且上样液中不含 SDS,因而 rIL-2与杂蛋白的分离复杂难辨。在实验初期,我们曾采用现行的简单易行的线性梯度洗脱,但 rIL-2不能与杂蛋白完全分开。后经多次反

复实验,将洗脱条件改为目前的等度和线性梯度洗脱相结合的方法,延长了 rIL-2的出峰时间,从而大量上样时,rIL-2能得到最佳的分离并能使出峰完全。上述测定结果表明,此方法可成功地用于分离制备 rIL-2。其最大优点在于去除了目前在上样前使用 SDS 助溶的不足之处,且上样量大,产品纯度大于 95%,冻干后成品经活性检测比活大于 10^{10} IU/g,因而在实际应用中很有推广价值。

参 考 文 献

- 1 Smith K A. Ann Rev Immunol, 1984; 2:319
- 2 Mule I J, Shu S, Rosenberg S A. J Immunol, 1985; 135:645
- 3 Maleolm P, Weir M P, Sparks J. J Biochem, 1987; 245:85
- 4 Koichi Kato, Takao Yamada, Kenji Kawahara. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1985; 130(2):692
- 5 徐明波,孟文华,马贤凯.生物化学杂志,1994;10(3):376
- 6 Weir M P, Sparks J, Chaplin A M. J Chromatogr, 1987; 396(2):209

Purification of Recombinant Human Interleukin-2 by Large-Scale Preparative Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Yang Qing

(Military Medical Institute of Shenyang Military Region, Shenyang, 110031)

Abstract Interleukin-2 (IL-2), has now been purified from natural and recombinant sources by a variety of methods, including small scale preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), but the yield is low, and these methods are not suited to prepare IL-2 in practice. In the present paper we describe a new method for purification of recombinant human IL-2 (rIL-2) by large-scale preparative RP-HPLC in detail. In this method rIL-2 has been purified by Sephacryl-200 and further purified by large-scale preparative RP-HPLC. Gradient elution was performed with acetonitrile and water containing 0.1% trifluoroacetic acid and without the addition of sodium dodecyl sulfate (SDS). The separation results showed three chromatographic peaks. SDS polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE) and HPLC analyses conclude that the third peak is rIL-2. Its purity is over 95%. Further analyses showed the specific activity of rIL-2 purified with this method is over 10^{10} IU/g. The second peak also has some rIL-2 and can be purified for the second time.

Key words preparative high performance liquid chromatography, interleukin-2