

两水相萃取法从重组大肠杆菌匀浆液中提取干扰素 α_1 的研究

周长林* 关岳 邬行彦

(华东化工学院生化工程系, 上海 200237)

本文以PEG磷酸酯/磷酸盐两水相系统, 经两次萃取从重组大肠杆菌匀浆液中提取干扰素 α_1 。最适萃取条件为22%PEG磷酸酯, 16%磷酸盐, 3%NaCl, pH6.9。IFN α_1 的分配系数达到155, 收率99.6%, 纯度提高25倍; 对反萃取条件作了初步研究, 较好的条件为20%PEG磷酸酯, 10%磷酸盐, pH6.0, 收率达到75.6%, 但浓度有所稀释。与传统的提取方法相比, 本法可省去高速离心去除细胞碎片的步骤, 操作简单, 能耗较低, 而且收率较高, 纯度也有所提高, 最后IFN α_1 存在于磷酸盐相中, 其中PEG含量仅为0.5%左右, 这对后继纯化操作很有利。

关键词 干扰素; 两水相系统; 聚乙二醇; 萃取; 反萃取

干扰素(IFN)是细胞在诱生剂存在下所产生的一类蛋白质, 具有抗病毒作用, 还能抑制细胞增殖(因而可能具有抗癌作用)和活化免疫系统等多种生物学功能, 为医药界所重视。但只是在基因重组技术的发展, 利用大肠杆菌为宿主, 实现大规模生产以后, 才进入正式临床应用阶段。IFN存在于细胞内, 目前常用的提取方法是先经细胞破碎, 得到的匀浆液经高速离心分离除去细胞碎片, 然后以盐析法进行初步分离。但此法收率低、能耗大。

本文采用PEG磷酸酯/磷酸盐两水相系统, 从大肠杆菌匀浆液经离心分离后得到的上清液作为试样, 研究其最适萃取条件。然后以匀浆液作为试样, 在上述最适条件下得到富含IFN的上相(PEG磷酸酯相)萃取液, 而细胞碎片、杂蛋白等则留在下相(磷酸盐)或集中在界面上。从分出的上相再选择适当条件将IFN反萃取到磷酸盐相。

材料和方 法

(一)材料

干扰素匀浆液(或其离心分离后上清

液)由卫生部上海生物制品研究所提供, 其活性也由该所采用人羊膜细胞(WISH)一滤泡性口腔炎病毒(VSV)系统, 以细胞病变抑制法测定^[1]; PEG6000为上海合成洗涤剂二厂产品。

(二)方法

1. PEG6000的磷酸酯按文献[2]或[3]方法合成。PEG先与 POCl_3 反应生成 $(\text{Cl})_2\text{P}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{O})\text{PCl}_2$, 然后水解得到 $(\text{HO})_2\text{P}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{O})\text{P}(\text{OH})_2$, 双磷酸聚乙二醇单酯。PEG的磷酸化程度(理论上1mol PEG可和2mol磷酸作用)可通过碱滴定求得, 为理论值的18—24%。

2. 蛋白质浓度用Bradford法^[4]测定, 以牛血清蛋白为基准。

3. 两水相系统系在室温下按重量配制。在10ml刻度离心试管中加入所需重

本文于1991年9月2日收到。

* 目前通讯地址: 南京中国药科大学抗生素研究室。
蒙上海生物制品研究所提供干扰素试液, 该所童英塘教授指导, 许兼萍同志协助测定干扰素活性, 谨致谢意。

量的NaCl和PEG磷酸酯,磷酸盐以 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 按一定比例配制的浓溶液形式加入,水浴加热使固体溶解,待系统冷却后,加入匀浆液或其离心后上清液1g(除特殊注明外),系统总重量为10g,不足部分以蒸馏水补充,各组分的浓度均用重量百分含量表示。在旋涡振荡器上振荡1—2min,然后于2000r/min离心分离,此时干扰素 α_1 分配到上相。读出上、下相体积。用注射器分别吸出一定量的上、下相溶液,测定其干扰素活性和总蛋白含量。

4.反萃取系在最适条件下从匀浆液获得的上相萃取液的基础上进行,其中所含PEG-磷酸酯和磷酸盐浓度按PEG6000-磷酸盐相图^[4]估计。取一定量的上相萃取液,加入所需量的磷酸盐缓冲液,加蒸馏水使总重为8g,按上述方法萃取分相,此时干扰素转入下相,分别测定上、下相中干扰素活性和蛋白质含量。

结果与讨论

(一)影响萃取操作的参数

1. PEG磷酸酯与PEG作为成相高聚物的比较:保持系统中普通PEG和PEG磷酸酯的总量不变而增大PEG磷酸酯含量,由图1可见干扰素的分配系数 K_{IFN} 随着增大,最高可增大15倍,而总蛋白的分配比 K_P 变化很小,这对提取IFN很有利。

K_{IFN} 按惯例定义为上相IFN浓度 C_1 (IU/ml)与下相浓度 C_2 (IU/ml)之比,即 $K_{IFN} = C_1/C_2$ 。总蛋白中包含各种蛋白质,故称为分配比,定义为 $K_P = C'_1/C'_2$, C'_1 、 C'_2 分别代表上、下相中蛋白质浓度(mg/ml)。PEG磷酸化以后极性增大,有利于IFN α_1 的分配,同样的

情况亦见于IFN- β 的场合^[6]。由于实验中所用的PEG磷酸酯的磷酸化程度不高(24%),若能提高,则 K_{IFN} 当能进一步提高。

根据上述,在实验中以PEG磷酸酯作为成相聚合物。

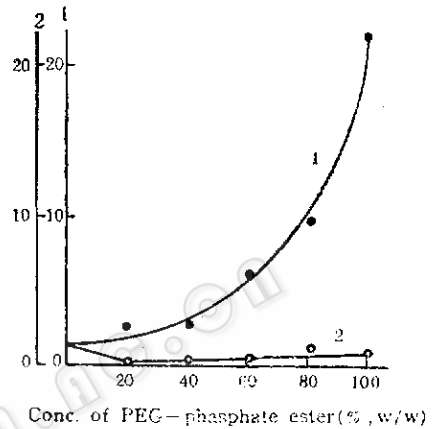


图1 PEG磷酸酯对分配的影响

Fig.1 Effect of PEG Phosphate ester on partition

1. K_{IFN} ; 2. K_P

phase system 17%(PEG + PEG-Phosphate ester*), 14% KP_1 , 3%NaCl, at pH7.0 and 10°C

*with 24% degree of phosphorylation

2. pH: 由图2可见, pH对分配的影响很大。当pH逐渐升高时, K_{IFN} 先时增大, pH6.9时达到极大值(82),然后急速减小,而 K_P 在研究的范围内(pH 5.5—7.3)一直急速上升,纯化因子 P_t 也在pH6.9出现极大值。据此,最适pH为6.9。作为参比,干扰素 α_1 的pI值经实测为6.1(系根据等电点聚焦法测定,数据未列入)。

3. PEG磷酸酯浓度:随着PEG磷酸酯浓度的增加,系统离开临界点愈远,上、下相组成相差也愈大,因而对分配系数有很大影响。当磷酸盐浓度保持在14%,而使PEG磷酸酯浓度自5%增大

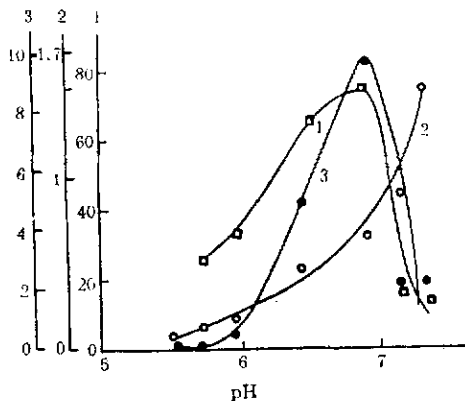


图2 pH对分配的影响

Fig.2 Effect of pH on partition

1. K_{IFN} ; 2. K_P ; 3. P_f (purification factor) phase System 17% PEG-phosphate ester (24% degree of phosphorylation), 14% KP_i , 3% NaCl at 20°C

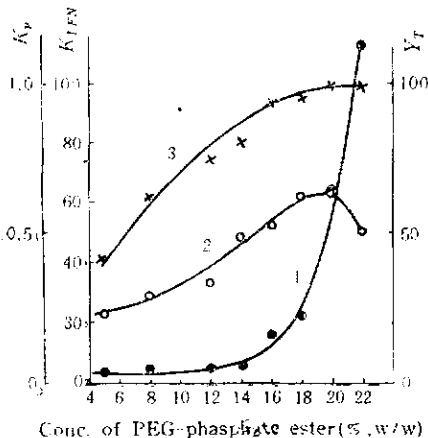


图3 PEG磷酸酯*浓度对分配的影响

Fig.3 Effect of concentration of PEG-phosphate ester on partition 1. K_{IFN} ; 2. K_P ; 3. Y_T Phase system 14% KP_i , 3% NaCl at pH6.9 and 25°C *with 24% degree of phosphorylation

至22%时, K_{IFN} 增大达35倍, 而 K_P 虽稍有增大, 但始终低于1.0, 且在20%时有极大值。同时相比 $R(=V_u/V_b, V_u, V_b$ 分别表示上、下相体积) 也逐渐增大(数据未列出), 故上相收率 $Y_T(\%) =$

$$\frac{100}{1 + \frac{1}{K_{IFN} \cdot R}}$$

3, 从收率和与杂蛋白分离完全等方面考虑, PER磷酸酯浓度以22%较好。

4. 磷酸盐浓度: 和PEG磷酸酯一样增大磷酸盐浓度, 也能增大 K_{IFN} , 但 K_P 也增大, 而增大速度不同。在15%磷酸盐时, K_{IFN} 增大较快, 而在16%浓度时分离因素 $K(=K_{IFN}/K_P)$ 出现极大值(图4), 表示IFN与杂蛋白分离较好。

相比 R 虽略有降低, 但上相收率 Y_T 仍逐渐增大, 在16%磷酸盐时达到最大值(94%), 见图5。据此, 可以认为磷酸盐浓度取16%较好。

5. NaCl的加入: 加入NaCl对分配的影响见图6。当NaCl浓度在1mol/L以上, 盐析作用很明显, K_{IFN} 和 K_P 都急速

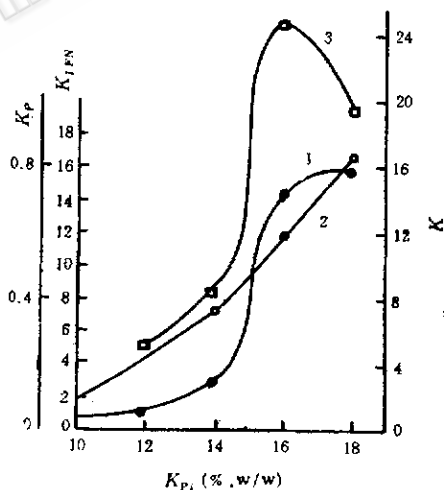


图4 磷酸盐浓度对分配系数的影响

Fig.4 Effect of concentration of phosphate on partition coefficient 1. K_{IFN} ; 2. K_P ; 3. K (Separation factor) Phase system: 17% PEG-phosphate ester (18% degree of phosphorylation), 3% NaCl at pH7.0 and 20°C homogenate supernatant added 0.5g

增大, 但纯化因子反而下降。在0—0.8mol/L NaCl范围内, K_{IFN} 略增大而

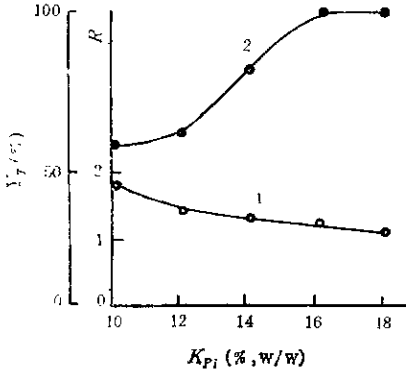


图5 磷酸盐浓度对相比和收率的影响

Fig.5 Effect of phosphate concentration on Phase ratio and yield
1, R phase ratio; 2, Y_T yield based on top phase system; the same as Fig.4

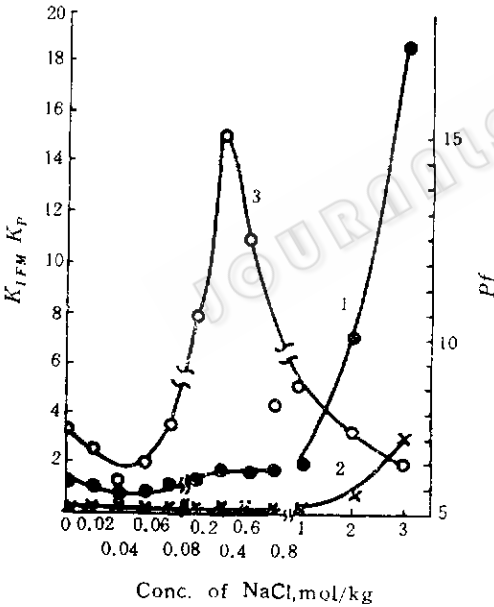


图6 NaCl浓度对分配的影响

Fig.6 Effect of NaCl concentration on partition

Phase system; 10% PEG-phosphate ester*, 10% KP_i , pH7.0 and 10°C
*with 18% degree of phosphorylation
1. K_{IFM} ; 2. K_p ; 3. P_f

K_p 几乎保持一定(0.20), 而在0.4mol/L NaCl时纯化因子有极大值, 故适宜的

NaCl加量为0.4mol/L, 现取3%(w/w)。

图6中相系统含10%PEG磷酸酯, 不是最适浓度, 故 K_{IFM} 值较低, 如增大磷酸酯浓度, K_{IFM} 值也会增大。

6. 匀浆液加量对分配的影响: 理论上IFN的分配系数应和其浓度无关, 但如图7所示, 实际上 K_{IFN} 随匀浆液加量

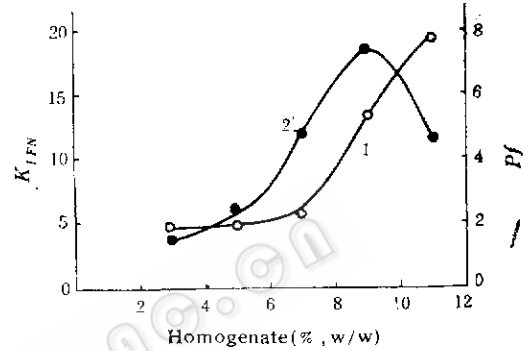


图7 匀浆液加量对分配的影响

Fig.7 Effect of amount of homogenate added on Partition
1. K_{IFN} ; 2. P_f purification factor
Phase system 22% PEG-phosphate ester*, 16% KP_i , 3% NaCl at pH6.89 and 11°C
*with 18% degree of phosphorylation

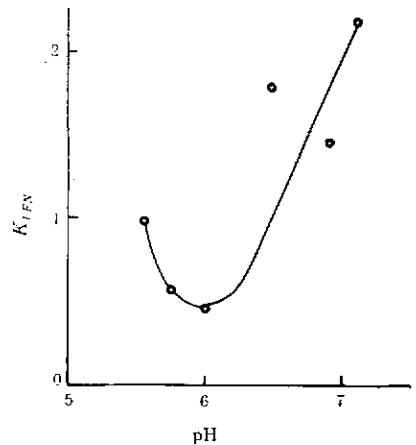


图8 pH对IFN α_1 反萃取的影响

Fig.8 Effect of pH on back-extraction of IFN α_1

phase system; 20% PEG-phosphate ester*, 10.4% KP_i , at 10°C
*with 18% degree of phosphorylation

而增加, 但纯化因子在 9% 有极大值, 故最适加量为 9%, 在实验中取 10%, 即 10g 系统处理 1g 匀浆液。

(二) 影响反萃取操作的参数

1. pH: pH 的变化影响 IFN 所带电荷, 故影响很显著。pH 对反萃取的影响见图 8。在 pH 6.0 时 K_{IFN} 有极小值, 约为 pH 7 时的 1/4。在实验时, 先按上述最适条件 (22% PEG 磷酸酯, 16% KPi ,

3% NaCl pH 6.98) 制备萃取液, 根据相图^[4]估计其中含 40% PEG 磷酸酯和 2% KPi , 然后取一定量的萃取液, 加入一定量的磷酸盐浓溶液, 即可得到所需的反萃取相系统, 以后操作均按此。

2. PEG 磷酸酯和磷酸盐的浓度: 选择几种 PEG 磷酸酯和磷酸盐浓度的配比进行比较, 其结果示于表 1 中。从 K_{IFN} 和 Y_B (下相收率) 之值来看, 以

表 1 PEG 磷酸酯和磷酸盐浓度对 IFN α_1 反萃取的影响*

Table 1 Effect of PEG-phosphate ester and phosphate concentration on back-extraction of IFN α_1

No.	1	2	3	4	5	6	7
Concentration of PEG-phosphate ester % (w/w)	20	19	18	18	14	12	10
Concentration of Phosphate % (w/w)	10	8	8	10	12	12	14
K_{IFN}	0.27	0.41	0.73	1.14	1.25	0.61	0.44
Yield based on bottom phase Y_B , %	75.9	30.1	16.0	≤27.3	35.9	60.3	75.7

*Experimental condition: pH 6.0, 16°C

No. 1 实验较好, 而且从系统处理能力来看, 也以 No. 1 为好 (20% PEG 磷酸酯、10% 磷酸盐)。

3. NaCl 的加入: 从影响萃取操作的参数 (5) 中可见, 加入 3% NaCl 对萃取操作有利, 因而可以预计在反萃取时不应加入 NaCl。比较加入 0.04 mol/L NaCl 与不加 NaCl 的场合相比较, 前者下相收率 Y_B 为 65%, 而后者为 76% (若 NaCl 浓度增大差别会更大), 证实了这一点。

最后按最适萃取条件和所选反萃取条件进行两次试验。原料液活性为 99 334 IU/ml, 纯度为 8 043 IU/mg, 萃取时 K_{IFN} 平均值为 155 (由于所用的 PEG 磷酸酯的磷酸化程度较高, 为 55%, 故 K_{INF} 较大), 平均收率 99.6%, 纯化因子 25; 反萃取平均收率为 75.6%, 纯度没有提高, 而浓度稀释 4 倍, 故反萃取条件尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 侯云德编著: 干扰素及其临床应用, 江西科学技术出版社, 1981。
- [2] Schliebs, R., DE 2302843, 1974.
- [3] Morr, M. and Kula M.-R., DE 2935134, 1981.
- [4] Bradford, M. M., *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- [5] Albertsson, P.-A., *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 3rd. eds, John Wiley and Sons, New York, p. 319, 1986.
- [6] Menge, U. et al., *J. Appl. Biochem.*, 5:75-90, 1983.

Study on the Extraction of Interferon α_1 from Recombinant *Escherichia coli* Homogenate by Aqueous Two-phase Partitioning

Zhou Changlin Guan Yue Wu Xingyan

(Department of Biochemical Engineering, East China University of Chemical Technology, Shanghai 200237)

In this paper, aqueous two-phase system composed of PEG-phosphate ester/phosphate was used twice to isolate IFN α_1 from recombinant *E. coli* homogenate. The optimum extraction conditions were: 22% PEG-phosphate ester, 16% phosphate and 3% NaCl at pH6.9. The partition coefficient of K_{IFN} was as high as 155 with a yield of 99.6% and 25 folds increase of purity. Preliminary study on back-extraction showed 20% PEG-phosphate ester/10% phosphate system at pH6.0 was suitable with 75.6% yield and IFN concentration diluted by a factor of 4, however. In comparison with the conventional method the removal of cell debris by high-speed centrifugation was no longer needed. This would ease operation and lower energy consumption. In addition, the yield was much higher and purity somewhat higher. Finally, IFN α_1 was transferred to the phosphate phase with no more than 0.5% PEG which will facilitate the subsequent purification step.

Key words Interferon; aqueous two-phase system; polyethylene glycol, extraction back-extraction