



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 3/18

A61K 37/02

B01D 15/08

[11] CN 86 1 02829 A

CN 86 1 02829 A

[43] 公开日 1987年11月4日

[21] 申请号 86 1 02829

[22] 申请日 86.4.24

[71] 申请人 纽约大学

地址 美国纽约州 10012

[72] 发明人 里塔·怀特·马修斯

阿兰·J·约翰森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 顾析棣 辛敏忠

[54] 发明名称 抗血友病因子纯化方法

[57] 摘要

本发明提供了一种纯化蛋白质的方法,该方法是在选自糖,多羟基醇,氨基酸和盐的水合作用添加剂存在下,并且在添加剂的浓度足以使从柱上回收的上述蛋白质的回收率,纯度和分辨率中至少一项有显著增加的情况下,用柱层析使蛋白质纯化。

871A07936 / 20_736

1. 纯化蛋白质的方法，该方法是在选自糖、多羟基醇、氨基酸和盐的水合作用添加剂存在下，并且在添加剂的浓度是以使从柱上回收的上述蛋白质的回收率、纯度和分辨率中至少一项有显著增加的条件下，用柱层析使蛋白质纯化。

2. 按照权利要求1 所述的方法，其中所述柱层析法选自包括离子交换层析法，疏水性亲和层析法，疏水性/ 离子交换混合层析法，和它们的一系列混合方法。

3. 按照权利要求1 所述的方法，其中所述的蛋白质可选自抗血友病因子，血液凝聚因子 II、VII、IX 和 X，白蛋白和免疫球蛋白。

4. 按照权利要求1 所述的方法，其中所述水合作用添加剂是选自蔗糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、棉子糖、松三糖、葡聚糖、木糖、阿洛糖、6-脱氧甘露糖和6-脱氧半乳糖的糖。

5. 按照权利要求1 所述的方法，其中所述水合作用添加剂是选自山梨醇、甘露糖醇、肌醇、核糖醇、赤藓醇、乙二醇、丙三醇、丙二醇、木糖醇、2-甲基-2,4-戊二醇、聚蔗糖和核糖醇的多羟基醇。

6. 按照权利要求1 所述的方法，其中所述水合作用添加剂是选自甘氨酸、 β -丙氨酸和甜菜碱。

7. 按照权利要求1 所述的方法，其中所述水合作用添加剂是选自醋酸钠和醋酸钾、氯化钠、硫酸钠、氯化钠、氯化镁、硫酸镁、氯化铯和硫氰酸钾的盐。

8. 按照权利要求1 所述的方法，其中柱层析是离子交换柱层析。

9. 按照权利要求8 所述的方法，其中蛋白质是抗友病因子，并且所述柱层析是阴离子交换柱层析。

10. 按照权利要求9所述的方法，包括所述因子用阴离子交换层析法纯化后，还要用疏水性亲和柱层析法进行第二次纯化。

11. 按照权利要求8所述的方法，其中将水合作用添加剂用于柱层析，以增加所述蛋白质和离子交换材料在柱内的结合。

12. 按照权利要求11所述的方法，其中将水合作用添加剂用于样品缓冲液中，以便选择性地增加所述蛋白质和柱之间的结合，因而促进在柱的离子交换材料上的吸附。

13. 按照权利要求12所述的方法，其中水合作用添加剂在所述蛋白洗脱之前从柱上除去。

14. 按照权利要求13所述的方法，其中所述蛋白质是抗血友病因子。

15. 按照权利要求14所述的方法，其中所述添加剂是选自蔗糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、山梨醇和甘露糖醇。

16. 按照权利要求15所述的方法，其中所述添加剂是蔗糖，并且它的浓度范围在约0.5 和2.0 摩尔之间。

17. 按照权利要求15所述的方法，其中所述添加剂是麦芽糖，并且它的浓度范围在约0.2 和0.4 摩尔之间。

18. 按照权利要求15所述的方法，其中所述添加剂是葡萄糖，并且它的浓度范围在约0.5 和2.0 摩尔之间。

19. 按照权利要求15所述的方法，其中所述添加剂是山梨醇，并且它的浓度范围在约0.5 和2.0 摩尔之间。

20. 按照权利要求12所述的方法，其中在加入含有所述蛋白质的生物液体样品到柱上之前，所述水合作用调节剂被加到所述柱平衡缓冲液中。

21. 按照权利要求20所述的方法，其中所述树脂是四氨乙基阴离子交换树脂。

22. 从血浆冷沉淀中纯化抗血友病因子的方法，该方法包括：

在选自葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和山梨醇的添加剂存在下，在添

加剂的量足以明显增加 A H F 对所述柱的表面结合亲和力的条件下，将上述冷沉淀装到阴离子交换层析柱上；

洗涤该柱，以便除去杂质；

从柱上消除添加剂；并且

洗脱和回收因子。

23. 权利要求22的方法，其中阴离子交换柱是四氨乙基阴离子树脂柱。

24. 权利要求23所述的方法，其中洗脱一步包括应用生理上可以接受的洗涤剂，以提高上述因子从柱上的解吸。

25. 权利要求24所述的方法，其中所述添加剂是应用浓度范围在约0.5 和2.0 摩尔之间的山梨醇。

26. 权利要求25所述的方法，其中所述洗涤剂是浓度范围在约0.01% 和0.05% 之间的多乙氧基醚80。

27. 权利要求26所述的方法，其中添加剂是应用浓度在约1 摩尔的山梨醇。

28. ，按照权利要求1 所述的方法，其中柱层析是疏水性亲和柱层析。

29. 按照权利要求1 所述的方法，其中蛋白质是抗血友病因子。

30. 按照权利要求1 所述的方法，其中水合作用添加剂被加到柱上，以便选择性地减弱上述蛋白质和疏水性亲和材料之间在柱内的结合，因而促进上述蛋白质从柱上洗脱。

31. 按照权利要求29所述的方法，其中上述水合作用添加剂被加到该柱的洗脱缓冲液中，该洗脱缓冲液是用于洗脱上述蛋白质的。

32. 按照权利要求30所述的方法，其中上述添加剂选自山梨醇、蔗糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖和甘露糖醇。

33. 按照权利要求30所述的方法，其中疏水性亲和层析柱主要由氨基己基琼脂糖所组成。

34. 按照权利要求31所述的方法，其中洗脱步骤包括应用生理上可以

接受的洗涤剂，以便增加上述因子的解吸。

35. 按照权利要求34所述的方法，其中上述洗涤剂是浓度范围在约0.01%和0.8%之间的多乙氧基醚80。

36. 按照权利要求34所述的方法，其中上述添加剂是应用浓度范围在约0.5和2.0摩尔之间山梨醇。

37. 按照权利要求34所述的方法，其中上述添加剂是蔗糖，并且它的浓度范围在约0.5和2.0摩尔之间。

38. 按照权利要求34所述的方法，其中上述添加剂是麦芽糖，并且它的浓度范围在约0.2和0.4摩尔之间。

39. 按照权利要求34所述的方法，其中上述添加剂是葡萄糖，并且它的浓度范围在约0.5和2.0摩尔之间。

40. 权利要求34所述的方法，其中上述添加剂是应用浓度约为1摩尔的山梨醇。

41. 权利要求1所述的方法，其中上述的层析在混合的离子交换/疏水性亲和柱上进行。

42. 权利要求41所述的方法，其中上述柱是顺丁烯二酸酐聚电解质柱。

43. 按照权利要求34所述的方法，其中上述的洗涤剂是浓度范围在约0.5%和0.2%之间的多乙氧基醚80。

抗血友病因子纯化方法

鉴于本发明得到美国卫生和保健部 Rol H L 29688号和 R R 053-9 9 号拨款资助，美国政府对本发明享有权利。

本发明与蛋白纯化方法有关。更具体地说，本发明与糖、多元醇、氨基酸或盐的存在下，采用柱层析技术纯化抗血友病因子Ⅷ：C（以下简称 A H F）的高回收率和高分辨率的方法有关。用此法制备的 A H F 纯度高。

凝血促进剂蛋白因子Ⅷ（A H F）是一种在血友病病人血浆中具有纠正凝固缺陷的一种血浆蛋白。事实上，A H F 活性是以在血友病 A 血浆中其诱导凝固的能力来测量的。

一个单位 A H F 是指 1 毫升的正常男性成人血浆中所存在的 A H F 量。本文所采用的标准，即世界卫生组织标准，可以从英国伦敦汉普斯特（H ampstead），好莱·希尔（Holly Hill）的国立生物学标准和质量控制研究所得。

A H F 在临床治疗方面的主要应用一直是给血友病病人做静脉注射。起初，这种应用包括全血和新鲜的冷冻血浆做静脉滴注，这种方法需要长时间的滴注，而且常常会引起血容量过多。

血浆冷沉淀物（“Cryo”）的应用仍然需要很长的滴注时间。这种 Cryo 不能完全溶于滴注所用的溶剂中，因而需要过滤。它所含的 A H F 量低，且波动大。滴注所需要的 Cryo 体积大，而且在使用前为了解 A H F 含量而检查多层封闭的灭菌容器这一步骤是相当繁琐的，且常常被忽略。因此，治疗可得到的 Cryo 正确量可能是不确切的。而且，需要将 Cryo 装在大的塑料储血袋中，贮于 -20 °C，所以还需要有大型的冷冻设备。有

鉴于此，这种原始方法不可能应用于家庭治疗。

冷冻干燥的 A H F 浓缩物的应用解决了上面提及的许多问题。这种浓缩物一般可用下法制得：先将血浆作冷沉淀处理，然后用聚乙二醇作第二次沉淀。该浓缩物在冷冻条件下是稳定的，它们可以完全溶于重新溶解用的液体中，并可重新溶解于比 Cryo 更小的体积 (10-30ml) 中，因而可检出的 A H F 浓度比存在于血浆中的高 10-30 倍。

遗憾的是，用这个方法获得的产率 (该产品中的 A H F 活性 / 原血浆中的 A H F 活性) 只有约 20%，这就使得该因子的生产成本高。此外，其所需要的滴注体积仍较大 (30ml / 1000 单位 A H F)，这就又产生了贮存问题，并使家庭治疗难于开展，其结果是治疗费用增加。

而且，这些浓缩物中含有少于 0.1% 的 A H F 蛋白和 99.9% 的杂蛋白，其中包括 (1) 能够引起溶血的特异的血型抗体；(2) 可以引起 T 细胞比率 (辅助 / 抑制) 倒置在内的免疫异常的蛋白，这种蛋白类似爱滋病 (A I D S)，纤维蛋白元纤维结合素、维勒布兰德因子 (遗传性假血友病因子) 和其它蛋白。冷冻干燥的浓缩物常常受病毒 (如乙型肝炎病毒，非甲非乙病毒，可能还有引起爱滋病的病毒) 污染。将这些制品在液体状态作加热处理可以破坏大多数的微生物，但同时也会引起 A H F 的有活性的组分的变性。

层析技术 (离子交换层析法和疏水层析法) 一直在应用着，但仅限于实验室应用。用这种技术所得到的产率一直是低的 (最大 30~40%)，且分辨率极差。

显然，需要一种低成本和高产率的 A H F 制剂纯化技术。

满足这种要求的尝试包括用单克隆抗体进行的免疫亲和层析的应用。Zimmerman 等报道了，带有异种沉淀抗体的人凝血促进剂蛋白因子 VIII 的鉴定 [Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A) 79 : 1648 (1982) 和美国专利号 4,361,509 (1982 年 11 月 30 日颁发)]。虽然这些文献报告可从血浆获得

纯化164,000 倍的 A H F，但整个操作包括6 个步骤，且在沒有加热这一步骤的条件下，全部回收率约为12%。J. J. Morgenthaler 报道抗血友病因子可在二氨基烷和氨基烷衍生的琼脂糖凝胶上层析分离[*Thromb. Haemostas (stuttgart)* 47(2) : 124(1982)]。在这篇文章里，作者透露把醋酸- 赖氨酸缓冲液应用于改良的琼脂糖凝胶柱上，以从聚乙二醇沉淀的 A H F 纯化抗血友病因子Ⅷ：C，作者指出，是疏水力，不是离子力支配这些层析柱的性能，但这篇文献没有提及产品的产率和纯度。

Austen, D. E. G. 和 Smith, J. K. 报道可在乙型肝炎病毒抗原可能减少的情况下，从氨基己基- 琼脂糖凝胶上分离抗血友病因子Ⅷ[*Thromb. Haemostas (stuttgart)* 48(1) : 46(1982)]。这篇文献透露一种用氨基己基- 琼脂糖凝胶柱层析法(柱长9 × 150 毫米，醋酸- 赖氨酸洗涤液和生理盐水梯度洗脱液)处理血浆的方法。所报告的最大产率为46%，纯度约为血浆100 倍，据说该法的主要优点是其处理大量样品的能力。此外，作者还说明，该操作方法能使乙型肝炎病毒的污染略为减轻(约1.5 个数量级，取决于病毒颗粒的含量)。

A. Faure 等：报告了改进的因子Ⅷ凝血剂层析分离用缓冲液[*J. Chromatog.* 257 : 387(1983)]，这篇论文透露，血浆冷沉淀物在氨基己基- 琼脂糖凝胶上层析分离期间，醋酸- 赖氨酸缓冲液中加入1% 和10% 的蔗糖可以改善因子Ⅷ的产率。所报告的唯一能提高因子Ⅷ与蛋白的分离效果和增加回收率的缓冲液是含约1% (0.03 M) 蔗糖和1% 白蛋白的缓冲液。根据作者的见解，加入蔗糖的目的是为了抑制因子Ⅷ和活化了的因子Ⅸ和因子Ⅹ之间分子复合物的形成，加入白蛋白是为了减少非特异吸附。在一个实验中，这种缓冲液几乎能使因子Ⅷ凝血剂从血浆不是冷沉淀物的回收率比用不含蔗糖和白蛋白的醋酸赖氨酸缓冲液或含蔗糖的缓冲液获得的回收率提高一倍。但是，所报告的这种回收率增加是难以解释的，因为作者没有给出回收率绝对值数据，也没有给出纯度和分辨率的资料。

单独应用蔗糖并不能使产率稳定地增加。

Lundblad, R. L等报道过右旋糖对抗血友病因子(因子Ⅷ)层析分离的影响[*Thrombosis Research*, 1 : 197 (Pergamon Press .

Inc .1972)] 。本文透露, 在牛因子Ⅷ离子交换柱层析分离(邻-(三乙氨基乙基)-纤维素] 的洗脱缓冲液中加入0.05M左旋糖能稍微改善产品纯度, 并能使洗脱液峰部分的产率由15~45% 增加到60~70% , 但分辨率略微减低。

不管是 Lundblad 氏还是 Faure 氏, 他们都应用了高浓度的糖。lundblad 氏认为, 蔗糖可能与纤维素载体结合, 从而阻止蛋白的非特异吸附。Faure 氏则认为, 蔗糖糖的加入可能阻止 AH F和因子 IXa 和因子 X之间复合物的形成。但是这两种假设尚未得到证实。

Arakawa, T、和 Timasheff, S. N. 报告用糖可使蛋白质稳定化 [*Biochem* 21 : 6536 (1982)] 。本文透露, 许多糖类都可引起水溶液中蛋白质的优先水合作用, 所以糖在这样的系统中起稳定蛋白质的作用。这篇文章指出, 在糖溶液中, 其平衡点移向较牢固地折叠的构象。然而, 该文没有谈及因子Ⅷ, 也没有谈及蛋白纯化和柱层析法。参考资料收有这篇文章泄露的内容。

以下几篇文章也透露, 糖、多元醇、氨基酸或盐能起稳定水溶液系统蛋白的作用: (1) Arakawa, T、和 Timasheff, S. N. : 水溶性氨基端溶液中蛋白质与溶液成分的优先相互作用, *Arch. Biochem. Biophys.* 224(1) : 169 (1983); (2) Pittz, E. P. 和 Timasheff, S. N. , 核糖核酸酶 A在 PH5.8 条件下与水溶性2-甲基-2,4戊二醇的相互作用, *Biochem* 17(4) : 615(1978); (3) Kekko, k和 Timasheff, S. N. , 甘油稳定蛋白质的机制: 在甘油-水混合物中的优先水合作用, *Biochem.* 20 : 4667(1981); (4) Lee, J. C. 和 Timasheff, S. N. 蔗糖对蛋白的稳定作用, *J. Biol. Chem.* 256(14) : 7193(1981); (5) Gekko, k. 和

Morikawa, T. 牛血清白蛋白在多元醇-水混合物中的优先水合作用, J. Biochem 90 : 39-50(1981); (6) Arakawa, T和 Timasheff, S. N. 浓缩溶液中蛋白质与盐的优先互相作用, Biochem 21 : 6545-6552(1982)。上述6篇论文中也没有透露有关蛋白质或AHF纯化或柱层析法的任何信息。但是,因为这些论文含对本发明的实践有用的、测定蛋白质优先水合作用的技术和资料,这些文章所透露的内容被收进本申请一般参考资料中。

最后,糖和多元醇一直被用于保护酶和其活性,并在蛋白质从天然介质分离后稳定其结构。在纯化后加热处理和冷冻干燥期间这一操作一直应用。

下面的二个术语,按其在本发明中的应用,将具有如下意义:

“生物液”是指含有或可能含有蛋白质而不会引起永久性变性或失活的任何溶液或混悬介质,包括血浆、尿、培养基、缓冲液和生理溶液等等。

“水合作用调节剂”是指在层析法纯化蛋白质过程中,其单独应用或合并应用能提高所纯化的蛋白质的产率,纯度和分辨率的糖,多元醇,氨基酸,盐。应用这一术语是为了方便。虽然本发明的发明人已观察到,在本法的最适性与优先水合作用的特定水平之间的密切关系,并且已经把蛋白质水合作用的资料作为本发明中所用的水合作用调节剂量的标志,但是还不能认为,蛋白质的水合作用和层析法纯化效果的改善之间存在必然的因果关系。

本发明的目的之一是提供一种从生物体液中纯化AHF和其它蛋白质的方法。提供一种从原材料生产高纯度和高产率的AHF和其它蛋白质制剂的方法,也是本发明的目的之一。

本发明的另一目的是提供一种含有较高浓度的AHF或其它蛋白的AHF制剂和其它蛋白制剂的制备方法。

本发明还有另一个目的：提供一种含低浓度杂蛋白的 A H F（或其它蛋白）纯化制剂的制备方法。

本发明的另一目的：是要降低蛋白质尤其是 A H F 的纯化成本。

本发明还有一个目的是提供一种从原先含较低浓度污染病毒的受污染的生物体液中，得到纯化了的 A H F 制剂和其它蛋白制剂的方法。

本发明的进一步的目的是，为用柱层析技术从血浆成分中提取 A H F，更一般地说，为用柱层析技术从生物体液提取蛋白质提供一种方法。

由于下面所透露的内容，加上权利要求书以及附图，本发明的这样、那样的目的和特点，对本专业领域的技术人员来说是清楚的。

图1 是 A H F 产率对在各种糖存在下牛血清白蛋白（ B S A ）的优先水合作用作图。

图2 是血浆 A H F 的纯化程度对在各种糖存在下 B S A 的优先水合作用作图。

图3 是二乙氨基乙基-2- 羟丙基葡聚糖阳离子交换层析法和氨基己基-琼脂糖亲和层析法得到的 A H F 分辨率的关系图。

本发明的目的是提供在能使本法提纯的蛋白产率、分辨率和纯度中至少一项显著增加的足够浓度的糖、多元醇、氨基酸或盐的存在下，用柱层析法纯化蛋白的方法。

如上所述，业已发现糖、多元醇、氨基酸和盐（水合作用调节剂）能通过蛋白质的优先水合作用，稳定蛋白质结构。有人认为，蛋白质水溶液中，蛋白质的优先水合作用参数的最适增加（或它的优先互相作用参数的最适减少）能促进蛋白质凝聚，增加蛋白质分子的折叠。有人进一步认为，其结果是，蛋白质的疏水基比在水溶液中埋得更牢，其表面变得更亲水。

本发明的发明者已经发现，蛋白质与水合作用添加剂的接触能引起蛋白质的离子相互作用的明显增加，和疏水相互作用的明显减少。这些水合

作用添加剂的作用是可逆的，并取决于其在蛋白质溶液中的浓度。本发明利用糖、多元醇、氨基酸和盐的这些性质，以有利于增强蛋白质选择性地结合到离子柱上，以及有利于增强蛋白质选择性地从疏水性亲和柱上洗脱。

首先，本发明参照一个优选的实施方案加以叙述，该方案包括先通过离子交换层析柱，然后通过疏水性亲和层析柱这样一种连续操作方法从冷沉淀物纯化 AHF。但是，本发明不限于这些层析分离法的一起应用，也不只限于纯化 AHF，如果愿意，可以只采用二种层析分离法中之一种，并可将本发明应用于不仅存在于血浆而且存在于其它生物体液或生理体液中的难纯化蛋白的纯化。

按照一个优选的实施方案，根据 P. R. Foster 等人 (Vox Sang 42:180(1982)) 改良的，众所周知的 J. Newman 等人的方法 (Brit. J. Haematol 21:1(1971)) 从血浆制备冷沉淀物。现特将这二篇文章透露的内容按参考文献综合如下：简单地说，用锤式粉碎机将冷冻血浆粉碎至“雪花”大小，并移至温度保持在 15-28 °C 搅拌速度保持在 55 转/分钟的解冻容器中，使其融化。融化了的液体和悬浮的冷沉淀物靠重力作用排出，并收集于冷冻离心机中，用离心法收集冷沉淀物。

将这种冷沉淀物以 1/10 的起始体积溶于含 0.02M 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) pH 7.4, 0.02M 枸橼酸钠和 0.02M 氯化钠的缓冲液 (缓冲液 I) 中。随意地加入氢氧化铝，以吸附凝固因子 II、VII、IX、X 和一些纤维素蛋白元，纤维结合素以及维勒布兰德 (遗传性假血友病) 蛋白。然后标本离心，除去氢氧化物，收集上清液。

加山梨醇到样品中，直到其浓度达 1 M。滴加 0.02M 盐酸 (HCl) 到该溶液中，使其呈酸性，pH 6.6。然后加入终浓度为 4% 的聚乙二醇 (PEG)，用以沉淀纤维蛋白元，纤维结合素和维勒布兰德 (遗传性假血友病) 蛋白。离心的上清液作柱层析。

二乙氨基乙基-2-羟丙基-葡聚糖 A-25 凝胶(QA E- Sephadex- A-25)和二乙氨基乙基-2-羟丙基-琼脂糖凝胶4 B Fast Flow(QA E- Sepharose 4 B Fast Flow) 购自(Pharmacia Chemicals Inc. Piscataway, 新泽西州)。在室温和慢速搅拌条件下, 将QA E- Sephadex A-25 浸泡于0.5 M Na Cl 过夜(或在接近沸腾的温度下浸泡1~2 小时)。然后将相当于样品滤液中所含2/3 总蛋白毫克数的膨胀了的树脂(以毫升计)装入层析柱(如果用QA E- Sepharose Fast Flow, 约用相当于1/4 蛋白量的凝胶就可能足够了)。

层析柱中凝胶宽/长比率约为2:1。然后分别用5 体积的1 M Na Cl/0.01M Tris(PH7.4)和5 体积的0.5 M- Na Cl/0.02M Tris(PH7.4)和5 体积的含0.02M Tris(PH7.4)0.15M Na Cl 和1 M山梨醇的缓冲液(缓冲液II)。

以每分钟约1% 柱床体积的流速把样品滤液装柱, 然后用2 体积的缓冲液II, 以每分钟3% 柱床体积的流速洗涤柱子。接着依次用5 体积的含0.02M Tris(PH7.4)、0.20M Na Cl 和1 M山梨醇的缓冲液(缓冲液III)和2 体积的含0.02M醋酸钠(Na Ac) PH6.0、0.035 M氯化钙(Ca Cl₂)和1 M山梨醇的缓冲液(缓冲液IV)进行洗涤。

AHF蛋白用2 体积的含0.1 M Na Ac(PH6.0)、0.25M Ca Cl、10% 甘油和0.01%~0.05% 吐温-80*(多聚山梨酸酯-80, 实验化学工业公司, 威尔明顿, 德拉韦)(吐温的应用对于用QA E-sepharose 4 B- Fast Flow 获得最高的AHF产率特别重要)的缓冲液(缓冲液V)洗涤。收集相当于柱床体积25% 的各部分洗脱液, 检查每一部分洗脱液的AHF活性。根据改良的Bradford法(参见M. M. Bradford: 一种快速、灵敏的利用蛋白-染料结合原理的微克量蛋白定量法, Anal. Biochem 72: 248-254(1976))检测相应各部分洗脱液的蛋白浓度。该文报告的内容被收进参考资料。

合并含 A H F 活性的各分部 Q A E 洗脱液，并用4 体积水稀释之。

氨基己基 (A H) ——琼脂糖树脂 (购自新泽西州 Piscataway 市 Pharmacia Chemicals Inc.) 以10体积0.5 M Na Cl 浸泡过夜。以1000单位的 A H F 用4ml 浸泡凝胶的比例，将膨胀的凝胶装入宽/长比率为1 : 1 的层析柱，并用5 体积的0.02M Na Ac (P H 6.0) 0.15M Na Cl 和0.02M Ca Cl₂ (缓冲液 VI) 淋洗。

将经过稀释的 Q A E 洗脱液样品上柱，并分别用10体积的缓冲液 VI ，5 体积的含0.02M Na Ac, P H 6.0 、0.35M Na Cl 和0.02M Ca Cl 的缓冲液 (缓冲液 VII) 和2 体积的含0.02M Tris P H 7.4, 0.35M Na Cl 和0.02M Ca Cl₂ 的缓冲液 (缓冲液 VIII) 淋洗。

A H F 用2 体积的含0.1 M Tris (P H 7.4) , 0.35M Ca Cl₂, 1 M 山梨醇和0.1 % 吐温-80 (多聚山梨酸酯80) 的缓冲液 (缓冲液 IX) 洗脱。测定各分部洗脱液的 A H F 活性，并将有 A H F 活性的各分部合并。

含 A H F 各分部洗脱液中的蛋白浓度用 Weissman 氏法测定。

[Schaffner, W. 和 Weissman, C: 一种快速、灵敏和特异的用于测定洗脱液中蛋白质的方法。Anal. Biochem 56 : 502-514 (1973) 。这篇文献报告的内容特地被收进参考资料。] 简短地说，样品用终浓度为15% (v / v) 的三氯醋酸沉淀，然后通过硝基纤维素滤膜 (马萨诸塞州梅德弗德市 Millipore 公司生产的微孔过膜 H A W P) 过滤，收集沉淀物。沉淀物用氨基黑进行染色，并用甲醇- 醋酸- 水混合液进行脱色，切下色斑，洗脱入1ml 氢氧化钠- E D T A (乙二胺四乙酸) ，读取 A₆₃₀ 值。

采用下法可使 Q A E 柱再生：先用最大浓度为2 M 的梯度 Na Cl 溶液进行洗涤，然后用0.1 N Na O H 洗，以除去蛋白，用乙酸或非离子型表面活性剂洗，以除去脂类，最后用缓冲液 II 洗，以重新建立平衡。

采用下法可使 A H 琼脂糖再生：分别用1 体积水，2 体积正丁醇，1 体积95% 乙醇，5 体积1 M Na Cl, 5 体积0.5 M Na Cl 0.02M

Na Ac, PH6.0 和5 体积缓冲液Ⅵ。

从这些连续的层析分离步骤得到的 A H F的产率、纯度和浓度是高的。本发明的主要特点是水合作用添加剂的应用，以及在 A H F其它蛋白纯化过程中这种水合作用添加剂浓度的控制，以促进 A H F和其它蛋白吸附到离子交换树脂上，并促进其从疏水性亲和树脂上的解离，并获得高产率回收，分辨力高、纯度高的蛋白。

本发明的发明者已经发现，水合作用添加剂的应用可以起这样的作用：

(a) 明显增强 A H F与阴离子交换树脂的亲合力，有选择性地使其停留在相当窄的柱段内；

(b) 明显地使 A H F与疏水性树脂的亲合力失去稳定，从而使其容易洗脱。

在阴离子交换层析法中选用这一系列特别的材料和步骤的理由如下：

(a) 用缓冲液Ⅱ把样品装上阴离子柱并用相同的缓冲液洗涤这种方法，可以使 A H F蛋白离子结合到树脂上，而让大多数其它蛋白洗脱掉。（一般说来，阴离子交换柱能获得的初次纯化程度比疏水性亲和柱高）。缓冲液Ⅱ含有一个浓度的水合作用添加剂，在该浓度下，A H F对阴离子交换柱的亲合力比许多其它蛋白对这种柱的亲合力强。

(b) 缓冲液Ⅲ可以从这种树脂上洗掉吸附的杂蛋白。

(c) 缓冲液Ⅳ通过把这种洗脱液的 P H降低到接近 A H F的等电点，从而选择性地减弱 A H F与树脂的结合这种方法，为 A H F的洗脱作准备。但是为了防止这种缓冲液引起 A H F和树脂结合键的破坏（和 A H F的提前洗脱），溶剂的离子强度也同时降低。

(d) 缓冲液Ⅴ含有：(i) 一种高盐浓度的缓冲，以保证所有蛋白处于一个适当的 P H环境中；(ii) 钙离子，用于洗脱这种蛋白质，并破坏 A H F和混杂的维勒布兰德因子之间的非共价键；(iii) 甘油用于稳定

A H F蛋白(因为该缓冲液中去掉了糖,以促进A H F蛋白从树脂上的解吸附作用;(iv)吐温-80,用于帮助消除A H F蛋白与凝胶载体的非特异性结合。

氨基己基-琼脂糖树脂柱用于从混杂的亲水性蛋白中纯化A H F。通常这种树脂通过疏水性的相互作用与蛋白结合,而该树脂上的氨基则是通过静电相互作用,结合蛋白质。为这种层析柱选择实验步骤和材料的理由如下:

(a) 缓冲液VI含中等量的盐以洗脱结合弱的蛋白。

(b) 缓冲液VII含较高量的盐,以洗脱结合较紧的蛋白。

(c) 缓冲液VIII提供了洗脱的PH,以使许多蛋白离子化,从而将它们从这种柱上洗脱下来。虽然在这一PH下,A H F的电荷是增加的,但它仍保持与这种层析柱的结合,尽管这种结合较为松弛。

此缓冲液IX用于洗脱A H F蛋白。较高盐浓度的缓冲液使PH发生改变。钙提供了一种洗脱用的平衡离子,并破坏A H F与可能仍然存在的维勒布兰德因子之间的非共价键。山梨醇增加了A H F对这种层析柱的离子的相互作用,减少了A H F对这种层析柱的疏水性的相互作用。吐温-80有助于消除A H F蛋白对这种凝胶的疏水性和非特异性的结合,从而进一步提高产率。

如上所述,上面报告的方法只是本发明中的一个优选的实施方案。正如该方案所阐述的那样,单独用阴离子交换层析柱或单独用疏水的亲和层析柱均可获得高质量的纯化的A H F蛋白。像对这种纯化方法熟练程度一般的人容易领会的那样,可以对此技术作许多改进而不会影响分离的质量,现将许多这样的改良法透露如下:

(a) 可以用其它已知的方法,如可应用于Q A E柱的亲水性多聚物(例如聚乙二醇)(以每毫升蛋白用约4-10mg的量),制备A H F粗提物。

(b) 冷沉淀物能重新溶解在PH范围5.0~9.0(虽然6.4~7.8更好,

而7.0 为最适 PH) 的任何适当的缓冲液中, 氢氧化铝并不需要, 各种生理性盐类中之任一种可用于该缓冲液中。

(c) 1~6 % 的聚乙二醇(PEG) 能用于沉淀纤维蛋白元蛋白, 但只有当这种冷沉淀物浓度大于6mg 蛋白/ml 溶液时, 这一步骤才具有重要性。另一方面, 其它亲水性多聚物, 或肝素也可用作纤维蛋白元/ 纤维结合素沉淀剂。

(d) 从任何制造厂购得的阴离子交换树脂或疏水性亲和树脂均可使用。虽然某些具有与本发明所用的树脂不同电荷密度, 疏水性和基质的树脂需要稍微调正缓冲液, 但这种缓冲液的更换可以由一个对本技术熟悉的人员容易地完成。而且这种缓冲液的更改一般都包括在制造商的说明书中。顺丁烯二酸酐多聚电介质层析可以代替疏水性的亲和层析法。而且, 在阴离子交换层析柱后再用疏水性亲和层析柱进行分离纯化, 并不是必须的。其它的离子交换柱或其它部分地疏水的层析柱(包括但不是仅限于顺丁烯二酸酐多聚电介质) 都可以用来纯化 AHF 蛋白。此外, 如上所述, 如果愿意的话, 一个类型的层析柱(离子交换, 多聚电介质或疏水性亲和柱) 可以只使用一次。

(e) AHF 蛋白与膨胀了的 QAE 凝胶的比例可以 80 : 1 到 0.5 : 1, 虽然适宜的范围是 5 : 1 到 0.5 : 1 以及最适范围是 3 : 1 到 0.5 : 1。

(f) 各种不同直径的层析柱可以使用, 柱的宽 : 长比值可从 1 : 100 ~ 100 : 1, 虽然适宜的范围是 1 : 1 ~ 5 : 1, 以及最适范围是 2 : 1。对本技术熟练的人体会到, 不同管径大小的层析柱可以改变分辨率, 必须相应地调整缓冲浓度和洗脱液体积。

(g) 除层析柱容量外, 对流速并无限制。但是, 流速慢可以获得较大的分辨力。

(h) 缓冲液 II、III 和 IV 全都用来洗涤并不是绝对必要的。此外, 所用的每种缓冲液的量是可以改变的。对缓冲液 II 来说, 其工作范围是 0-10 倍

(或更多)于柱床体积, 优选范围为2-5倍于柱床体积, 最佳用量为柱床体积的2倍。对缓冲液Ⅲ来说, 其有效用量范围为0-10倍(或更多)于柱床体积。优选用量范围为柱床体积的3-6倍, 最佳用量为柱床体积的5倍; 对缓冲液Ⅳ来说, 其有效用量范围为柱床体积的0-10倍, 优选用量为柱床体积的2倍。

(i) 可以对缓冲液Ⅴ作许多改动而不会明显减弱它的洗脱效果。该缓冲液的有效PH范围是4-9, 优选范围为5.9-6.5, 最适PH为6.0(该PH对AHF蛋白的稳定性是可靠的, 但它较接近于AHF的等电点)。至于特定的缓冲液浓度并没有限定, 虽然其优选范围是0.02~2.0 M, 最佳浓度是0.35M。对平衡离子, 除了其浓度最好在0.02~2 M范围内, 以及二价离子的最佳浓度为0.35M, 单价离子的最佳浓度为1 M外, 其种类并无限制。任何水溶液醇, 或多元醇, 或水溶性有机溶剂都可使用, 虽然它们并不是绝对需要的, 用量为0.05~15%的乙醇为优选溶剂, 其最佳用量为1%, 任何离子型的和非离子型的洗涤剂或者表面活性剂都可以使用, 虽然它们并不是必要的。关于吐温-80, 其有效用量范围为0~50%, 其优选范围为0.001~0.2%, 其最佳用量为0.025%。

(j) 水合作用添加剂浓度随所用的添加剂不同而不同。

(k) 适合于非肠道给药的其它生理缓冲液, 也可在上面指定的PH和离子强度范围内应用(完全按照本纯化技术内规定的的应用)。

(l) 为了获得最佳的AHF产率, 纯度和分辨力, 确定糖、多元醇、氨基酸或盐(水合作用添加剂)的用量是必须的。尽管某些糖和醇在AHF纯化中的应用来说, 通过反复试验, 已经确定了其起始用量。

鉴于AHF纯品(确实是以能取得优选水合作用数据的AHF量)实际上未能得到, 根据Gekko, K. 和Morikawa, T.(见上面所引文献)提供的资料, 可以把在不同浓度的水合作用添加剂水溶液条件下得到的牛血清白蛋白(BSA)的优选水合作用相联系。现将Gekko和Morikawa的

资料复制如下:

表 I 在水溶性多元醇系统 (25 °C) 中牛血清白蛋白与溶剂的偏微分比
容积和优选相互作用参数

Alcohol %	ρ_2^a	ϕ_2^b (ml/g)	ϕ_2^{*c} (ml/g)	$\left(\frac{\partial \kappa_2}{\partial \rho_2}\right)_{T, \rho_1, \rho_2}$ (g/g)	$\left(\frac{\partial \kappa_1}{\partial \rho_2}\right)_{T, \rho_1, \rho_2}$ (g/g)	$\left(\frac{\partial n_1}{\partial n_2}\right)_{T, \rho_1, \rho_2}$ (mol, mol)	$\left(\frac{\partial \mu_1}{\partial n_2}\right)_{T, \rho_1, \rho_2}$
水—聚乙二醇							
0	0	0.734 ± 0.001	0.734 ± 0.001				
20 (v/v)	0.2768	0.733 ± 0.001	0.737 ± 0.001	-0.041 ± 0.020	0.148	560	6,000
40	0.7312	0.733 ± 0.001	0.740 ± 0.001	-0.097 ± 0.027	0.130	490	5,300
60	1.613	0.732 ± 0.001	0.744 ± 0.001	-0.222 ± 0.041	0.137	520	5,500
水—甘油							
10 (v/v)	0.1403	0.732 ± 0.001	0.736 ± 0.001	-0.020 ± 0.010	0.143	540	5,700
20	0.3146	0.731 ± 0.002	0.740 ± 0.002	-0.052 ± 0.023	0.165	620	6,600
30	0.5377	0.729 ± 0.001	0.744 ± 0.002	-0.101 ± 0.020	0.187	710	7,600
40	0.8332	0.727 ± 0.001	0.746 ± 0.002	-0.154 ± 0.024	0.185	700	7,400
水—木糖醇							
20 (w/v)	0.2320	0.734 ± 0.001	0.742 ± 0.002	-0.030 ± 0.021	0.129	490	5,200
30	0.3778	0.734 ± 0.001	0.747 ± 0.002	-0.055 ± 0.011	0.146	550	5,800
水—甘露糖醇							
10 (w/v)	0.1074	0.735 ± 0.001	0.742 ± 0.001	-0.022 ± 0.006	0.205	770	8,300
15	0.1669	0.736 ± 0.001	0.746 ± 0.001	-0.034 ± 0.007	0.204	770	8,200
水—山梨醇							
5 (w/v)	0.0518	0.736 ± 0.001	0.739 ± 0.002	-0.009 ± 0.004	0.174	660	7,000
10	0.1073	0.737 ± 0.001	0.744 ± 0.002	-0.022 ± 0.004	0.205	770	8,300
15	0.1669	0.738 ± 0.001	0.748 ± 0.002	-0.033 ± 0.010	0.198	760	8,000
20	0.2319	0.738 ± 0.001	0.753 ± 0.002	-0.054 ± 0.011	0.229	870	9,400
30	0.3752	0.738 ± 0.002	0.761 ± 0.002	-0.092 ± 0.016	0.245	930	9,400
40	0.5461	0.740 ± 0.002	0.768 ± 0.002	-0.128 ± 0.018	0.234	880	9,400
水—肌醇							
5 (w/v)	0.0516	0.732 ± 0.001	0.740 ± 0.001	-0.021 ± 0.003	0.407	1,540	16,400
10	0.1063	0.729 ± 0.001	0.745 ± 0.001	-0.041 ± 0.005	0.387	1,460	15,600

a. 每克水中乙醇克数。

b. 1千克水中每摩尔蛋白每摩尔乙醇的热卡值。

表 III 在葡萄糖水溶液中蛋白质与溶剂的优选相互作用参数

[葡萄糖] (M)	ϕ_2^0 (ml/g)	ϕ_2^{10} (ml/g)	$-\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{T, P, M_3}$ (g/g)	$-\left(\frac{\partial g_1}{\partial g_2} \right)_{T, P, M_3}$ (g/g)	$-\left(\frac{\partial m_2}{\partial m_3} \right)_{T, P, M_3}$ (mol/mol)	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, P, M_3}^{exp}$ (cal/mol of protein) ⁻¹	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, P, M_3}^{cal}$ (mol of sugar) ⁻¹	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, P, M_3}^{exp}$ (cal/mol of protein) ⁻¹	$\left(\frac{\partial \mu_2}{\partial m_3} \right)_{T, P, M_3}^{cal}$ (mol of sugar) ⁻¹
胰凝乳蛋白酶 A, pH 2.0									
0.5	0.725	0.737	0.0353	0.370	5.03	5600	10500	0.536	0.536
1.0	0.727	0.752	0.0802	0.394	11.4	6200	9300	0.688	0.688
1.5	0.729	0.758	0.103	0.317	14.5	5200	7900	0.657	0.657
2.0	0.726	0.760	0.138	0.297	19.7	5100	7000	0.725	0.725
3.0	0.727	0.760	0.168	0.205	24.0	3700	5700	0.656	0.656
溶菌酶, pH 3.0									
0.5	0.698	0.714	0.0456	0.458	3.69	4100	6900	0.599	0.599
1.0	0.699	0.720	0.0704	0.346	5.59	3000	5900	0.515	0.515
1.5	0.700	0.726	0.0958	0.294	7.60	2700	5200	0.515	0.515
2.0	0.703	0.728	0.101	0.215	8.01	2100	4600	0.450	0.450
核糖核酸酶 A, pH 8.8									
0.5	0.695	0.700	0.0157	0.164	1.19	1300	6600	0.202	0.202
1.0	0.695	0.707	0.0406	0.199	3.09	1700	5700	0.295	0.295
1.5	0.694	0.711	0.0580	0.178	4.41	1600	5000	0.312	0.312
2.0	0.700	0.716	0.0610	0.131	4.64	1200	4400	0.273	0.273
牛血清白蛋白, pH 6.0									
0.5	0.726	0.736	0.0295	0.308	11.1	12400	20100	0.618	0.618
1.0	0.726	0.741	0.0509	0.250	19.2	10400	17200	0.606	0.606
1.5	0.726	0.747	0.0737	0.226	27.8	9800	15100	0.649	0.649
2.0	0.727	0.750	0.0990	0.212	37.4	9600	13400	0.718	0.718
牛血清白蛋白, pH 3.0									
0.5	0.721	0.734	0.0377	0.394	14.2	15900	21000	0.618	0.618
1.0	0.722	0.745	0.0755	0.371	28.5	15500	17200	0.606	0.606
1.5	0.723	0.754	0.113	0.346	42.6	15000	15100	0.649	0.649
2.0	0.728	0.759	0.137	0.294	51.7	13300	13400	0.718	0.718

表 III BSA 与氨基酸的优选相互作用参数

蛋白质与氨基酸的作用

浓度 (M)	g_3 (g/g)	ϕ_2^a (ml/g)	ϕ_2' (ml/g)	+ = excess OD - = hydration ($\partial g_3/\partial g_2$) _{T,P,M,S} (g/g)	hydration ($\partial g_1/\partial g_2$) _{T,P,M,S} (g/g)	($\partial m_3/\partial m_2$) _{T,P,M,S} (mol/mol)	($\partial \mu_3/\partial \mu_2$) _{T,P,M,S} (cal/mol protein) mol amino acid	($\partial \mu_2/\partial m_3$) _{T,P,M,S} (cal/mol protein) mol amino acid	($\partial \mu_2/\partial m_3$) _{exp} ($\partial \mu_2/\partial m_3$) _{cal}
0.7	0.0546	0.737	0.747±0.001	-0.0245±0.0026	0.450±0.0047	-22.2±2.3	17,800±1900	18,800	0.95
1.4	0.112	0.736	0.752±0.001	-0.0463±0.0028	0.412±0.025	-41.9±2.5	16,300±1000	18,800	0.87
2.0	0.1656	0.735	0.758±0.001	-0.0687±0.0030	0.416±0.018	-62.2±2.7	16,500±700	18,000	0.88
甘氨酸									
0.7	0.0653	0.736	0.744±0.001	-0.0238±0.0032	0.365±0.049	-18.2±2.4	14,500±1900		
1.0	0.0949	0.736±0.001	0.744±0.001	-0.0250±0.0066	0.263±0.069	-19.1±5.0	10,400±2700		
1.4	0.137	0.738	0.749±0.001	-0.0384±0.0034	0.281±0.025	-29.3±2.6	11,100±1000		
丙氨酸									
0.7	0.0653	0.735	0.740±0.001	-0.0184±0.0034	0.282±0.052	-14.0±2.6	11,100±2100	16,000	0.69
1.0	0.0951	0.738	0.748	-0.0364	0.383	-27.9	15,200	16,000	0.95
1.4	0.137	0.737±0.001	0.749±0.001	-0.0451±0.0075	0.329±0.055	-34.4±5.7	13,000±2200	16,000	0.81
甘氨酸三甲内盐									
0.7	0.0882	0.737	0.744	-0.0463	0.525	-26.9	20,800		
1.0	0.191	0.738±0.001	0.751±0.001	-0.0948±0.0144	0.497±0.076	-55.0±8.4	20,000±3100		
2.0	0.292	0.736	0.752	-0.0125	0.428	-72.5	17,000		

a $v_2 = 0.734$ 在 0.2 M NaCl (36)
b 标准差小于 0.0005 ml/g

表 I 相互作用参数

Table I: Interaction Parameters							
condition	$\kappa, (g/g)$	$\bar{v}_2, (mL/g)$	$\phi_1^0, (mL/g)$	$\phi_1^s, (mL/g)$	$\left(\frac{\partial \epsilon_1}{\partial \kappa_1}\right)_{T, \mu_1, \mu_2}$	$A_1, (g/g)$	$\left(\frac{\partial \kappa_1}{\partial \kappa_1}\right)_{T, \mu_1, \mu_2}$
Lysozyme							
0.02 M acetate, pH 4.5			0.714 ± 0.002	0.712 ± 0.001			
0.5 M acetate, pH 4.68	0.0431	0.502	0.712 ± 0.002	0.726 ± 0.001	-0.0295 ± 0.0063		0.684 ± 0.147
1 M acetate, pH 4.71	0.0906	0.516	0.712 ± 0.002	0.731 ± 0.001	-0.0433 ± 0.0068		0.478 ± 0.075
1 M NaCl, pH 4.5	0.0597	0.331	0.707 ± 0.002	0.723 ± 0.002	-0.0253 ± 0.0063		0.424 ± 0.106
Bovine Serum Albumin							
0.02 M acetate, pH 4.5			0.735 ± 0.001	0.736 ± 0.001			
0.5 M Na ₂ SO ₄ , pH 4.5	0.0718	0.165	0.734 ± 0.001	0.750 ± 0.001	-0.0206 ± 0.0026		0.287 ± 0.036
0.5 M Na ₂ SO ₄ , pH 7.0	0.719	0.165	0.735 ± 0.002	0.758 ± 0.001	-0.0298 ± 0.0039		0.414 ± 0.054
1 M Na ₂ SO ₄ , pH 4.5	0.145	0.208	0.735 ± 0.002	0.781 ± 0.001	-0.0669 ± 0.0044		0.459 ± 0.030
1 M Na ₂ SO ₄ , pH 5.6	0.141	0.208	0.735 ± 0.001	0.788 ± 0.001	-0.0739 ± 0.0028		0.524 ± 0.020
1 M NaCl, pH 4.5	0.0596	0.331	0.734 ± 0.001	0.744 ± 0.001	-0.0158 ± 0.0032		0.265 ± 0.053
1 M NaCl, pH 5.6	0.0597	0.331	0.735 ± 0.001	0.744 ± 0.001	-0.0145 ± 0.0032		0.243 ± 0.054
1 M CaCl ₂ , pH 5.6	0.114	0.216	0.734 ± 0.001	0.731 ± 0.001	0.00367 ± 0.00245	0.0380	-0.0321 ± 0.0214
1 M KSCN, pH 5.6	0.102	0.530	0.738 ± 0.001	0.735 ± 0.001	0.00706 ± 0.00471	0.0378	-0.0689 ± 0.0459
0.5 M MgCl ₂ , pH 4.5	0.0479	0.150	0.733 ± 0.001	0.737 ± 0.001	-0.00491 ± 0.00245	0.0095	0.102 ± 0.051
1 M MgCl ₂ , pH 5.6	0.0975	0.176	0.737 ± 0.001	0.740 ± 0.001	-0.00416 ± 0.00277	0.0251	0.0427 ± 0.0285
1 M MgSO ₄ , pH 4.5	0.121	0.138	0.734 ± 0.001	0.769 ± 0.001	-0.0469 ± 0.0027		0.388 ± 0.0222

* Dunn (1966).

表 II 在乳糖水溶液中几种蛋白质的
偏微分比容和优选相互作用参数

Table II: Partial Specific Volumes and Preferential Interaction Parameters of Proteins in Aqueous Lactose Solutions							
[lactose] (M)	$\phi_1^0, (mL/g)$	$\phi_1^s, (mL/g)$	$-\left(\frac{\partial \kappa_1}{\partial \kappa_1}\right)_{T, \mu_1, \mu_2}$ (g/g)	$-\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_1}\right)_{T, \mu_1, \mu_2}$ (mol/mol)	$\kappa_1, (g/g)$	$\left(\frac{\partial \kappa_1}{\partial \kappa_1}\right)_{T, \mu_1, \mu_2}$ (g/g)	$\left(\frac{\partial \mu_1}{\partial m_1}\right)_{T, P, m_1}$ (cal (mol of protein) ⁻¹ (mol of sugar) ⁻¹)
Ribonuclease A, pH 8.8							
0	0.691	0.692					
0.2	0.692 ± 0.002	0.696 ± 0.001	0.0115 ± 0.0082	0.460 ± 0.329	0.072	0.160 ± 0.115	1300 ± 900
0.3	0.692	0.701 ± 0.001	0.0241 ± 0.0028	0.967 ± 0.112	0.110	0.220 ± 0.026	1800 ± 200
0.4	0.693 ± 0.002	0.704 ± 0.002	0.0343 ± 0.0118	1.37 ± 0.47	0.150	0.229 ± 0.079	1800 ± 650
Chymotrypsinogen A, pH 2.0							
0	0.730	0.731					
0.1	0.729 ± 0.001	0.736 ± 0.001	0.0191 ± 0.0052	1.43 ± 0.39	0.035	0.545 ± 0.149	8700 ± 2000
0.2	0.727 ± 0.002	0.740 ± 0.002	0.0354 ± 0.0109	2.66 ± 0.82	0.072	0.495 ± 0.152	7400 ± 2300
0.3	0.727 ± 0.001	0.744 ± 0.002	0.0483 ± 0.0085	3.63 ± 0.64	0.110	0.440 ± 0.007	6600 ± 1200
0.4	0.728	0.753 ± 0.002	0.0743 ± 0.0059	5.58 ± 0.44	0.149	0.499 ± 0.040	7500 ± 600
0.47	0.729 ± 0.001	0.756 ± 0.002	0.0818 ± 0.0091	6.14 ± 0.68	0.179	0.457 ± 0.051	5900 ± 800
Bovine Serum Albumin, pH 6.0							
0	0.729	0.728					
0.1	0.729 ± 0.001	0.733 ± 0.001	0.0109 ± 0.0053	2.17 ± 1.03	0.035	0.311 ± 0.151	12300 ± 6000
0.3	0.725 ± 0.001	0.736 ± 0.001	0.0300 ± 0.0057	5.97 ± 1.14	0.110	0.273 ± 0.052	10800 ± 2100
0.4	0.725 ± 0.002	0.742 ± 0.003	0.0482 ± 0.0149	9.63 ± 2.96	0.150	0.321 ± 0.099	12700 ± 4000

一个对本技术一般熟练的人，通过使用能使牛血清白蛋白产生0.23优选水合作用值的若干浓度的各种水合作用添加剂，就能获得希望纯化的蛋白（在本文情况下，是A H F蛋白）的产率和纯度的层析分析数据。

利用B S A在含各种糖的溶液中的水合作用数据，作了如下观察：

当B S A的优先水合作用值对在不同浓度的各种糖、多元醇存在下的冷沉淀物层析分离得到的A H F产率和纯度作图时，可以发现，在能产生0.22~0.24g H₂O/g B S A的B S A优选水合作用的相当窄的糖浓度范围内，A H F的产率（图1）和纯度（图2）为最大。在能产生高于或低于此值的B S A优选水合作用的糖浓度下，所纯化的A H F的纯度都是比较低的。1 M山梨醇选为纯化A H F的最佳浓度。

任何能优选水合A H F的水合作用添加物量都可使用，虽然已经发现能使B S A水合达0.23克水/克B S A的水合作用添加物用量为最佳用量。所用的水合作用添加剂不必是山梨醇，虽然它是优选的。

能应用的糖（不仅用于A H F，而且也可用于其它蛋白）有蔗糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、松三糖、葡聚糖、木糖、阿洛糖、6-脱氧甘露糖、6-脱氧半乳糖等。最好用人工方法使糖降解，以省去进一步的纯化步骤，这应该是可能的。A H F纯化用的优选糖是葡萄糖和麦芽糖。用于A H F纯化的优选的糖浓度范围是：

蔗糖 0.5-2.0 M，以1.0 M为最好；

乳糖 0.0-0.4 ，以0.25M为最好；

麦芽糖0.2-0.4 ，以0.3 M为最好；

葡萄糖0.5-2.0 M，以1.0 M为最好。

另一方面，多元醇、氨基酸或盐也能用。

一般而言，合适的多元醇是：山梨醇、甘露醇、肌醇、核糖醇、赤藓醇、乙二醇、木糖醇、丙二醇、2-甲基-2,4-戊二醇、聚蔗糖（一种合成

的蔗糖多聚物)和核糖醇,其中以山梨醇为最好。A H F层析分离中山梨醇的优选浓度范围是0.5 ~2.0 M,以1.0 M为最好。

适宜的氨基酸有甘氨酸, β -丙氨酸、 β -丙氨酸,以及更好的甜菜碱。

适宜的盐有醋酸钠、醋酸钾、氯化钠、硫酸钠、氯化钙、氯化镁、硫酸镁、硫氰酸钾等。各种糖、醇、氨基酸和盐的优先水合作用参数可以从上面引用的 Timasheff 等的几篇论文中得到,或根据他们的方法经验地加以测定。

前面的参考文献透露了使用多种溶剂的各种蛋白质的优选相互作用或优选水合作用(下面给出这两个术语的定义)值和测定优选水合作用的方法。这些论文所透露的水合作用值和水合作用添加剂的浓度复制如下:

由于 Lee 等和 Arakawa 等(文献见前面)所报告的方法是一种复杂的操作,而且需要一名高级的生理化学专家,因此,也许可以通过查明过去这些研究在牛白蛋白系统或其它蛋白系统中,是否已用过这种添加剂,确定达到希望的优选相互作用或优选水合作用所需要的该添加剂的大约浓度。

正如上面指出的那样,对 A H F 纯化来说, B S A 可作为样板。有人发现,能优选地使蛋白水合到约 0.22-0.24(克水)/(克 B S A) 水平的添加剂的量是用于 A H F 层析的最佳添加剂用量。

在从上面的表列数据查得水合作用值后,还有一点是重要的,即通过改变层析分离期间所用的添加剂的量(在由白蛋白的优选水合作用所指示的那个浓度的适中范围内)确定对所用的某一特定蛋白最适宜的添加剂浓度,因为每种蛋白与每种添加剂的相互作用是不同的。

另一方面, Lee 等的方法可用于测定所挑选的蛋白的优选水合作用参数,也可用于糖、多元醇、或氨基酸的层析系统中,其浓度必须是最适宜。

Lee等的方法是研究在水-糖(多元醇、氨基酸等等)混合系统中,溶剂成分与蛋白质的优选结合作用。这里,水为成分1,蛋白质为成分2,糖(或其他水合作用添加剂)为成分3。这些相互作用可借助追踪作为水合作用添加剂浓度的一个功能的蛋白质偏微分比容的变化,加以测量。偏微分比容可用一只精密的MDA-02型密度计(Anton Paar公司, Grats),由式1算出:

$$\varphi = 1/0 \left(1 - \frac{\rho - \rho_0}{C} \right) \quad (1)$$

式中, φ = 表观偏微分比容

$\rho + \rho_0$ = 分别为溶液+溶剂的密度

C = 蛋白浓度(g/ml)

由于蛋白质的密度是在恒定的化学势和恒定的溶剂成分的重量克分子浓度下加以测量,因而就有可能测定成分3,2和1之间优选相互作用的程度。

$$\left(\frac{\partial \rho_3}{\partial \rho_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} \equiv \xi_3 \quad (\text{优先相互作用参数})$$

与该系统密度(P)的变化有关:

$$\xi_3 = \left(\frac{\partial \rho_3}{\partial \rho_2} \right)_{T, \mu_1, P_3} = \frac{\left(\frac{\partial \rho}{\partial \rho_2} \right)_{T, \mu_1, \mu_3} - \left(\frac{\partial \rho}{\partial \rho_2} \right)_{T, P, m_3}}{\left(\frac{\partial \rho}{\partial \rho_3} \right)_{T, P, m_2}}$$

式中, m_i 是成分*i*的重量克分子浓度,

μ_i 是它的化学势

T = 热力学温度

P= 压力

g_i = 以克/克水表示的成分 i 的浓度。

根据一定的稀释倍数下偏微分比容的定义，我们可以写成下式：

$$(1 - \phi'_2 \rho_0)^0 = (1 - \phi_2^* \rho_0)^0 + \xi_3 (1 - \bar{V}_3 \rho_0) \quad (2)$$

式中，标在右上角的符号 0 表示大分子类的一定稀释倍数。

\bar{V} = 成分 3 的偏微分比容；

ρ_0 = 溶剂的密度；

ϕ_2^* = 蛋白质的近似偏微分比容；在恒定的容积克分子浓度条件下进行测定；

ϕ'_2 = 在恒定的化学势条件下测定的蛋白质近似偏微分比容。

$(\partial g_3 / \partial g_2)_{T, \mu_1, \mu_3}$ 的符号可以是正的，这表示成分 3 与蛋白质的

的优选结合，或也可以是负的，这表示蛋白质周围成分 3 的不足，结果造成与水的优选相互作用。当此符号为负时，可用下式表示优选水合作用参数：

$$(\partial g_1 / \partial g_2)_{T, \mu_1, \mu_3} = -1/g_3 (\partial g_3 / \partial g_2)_{T, \mu_1, \mu_3} \quad (3)$$

这些测量用精密的密度计进行，并用方程式 1 计算近似偏微分比密 (ϕ)，然后将此所观察到的外推 ϕ 值和无限大稀释度下外推的 ϕ 值绘制成图，作为蛋白质浓度的一种功能，并将这些数值应用于方法式 2 中，以便计算优选相互作用的程度。这样便可以用方程式 3 计算优选水合作用参数。

应用本文报导的发明技术，可以获得纯化程度比以前的方法高100-150 倍的 A H F 蛋白，和产率比以前方法高的 A H F 回收率。用下面的一些例子对本发明作进一步说明。这些例子想试图说明本发明，但并没有限制其应用范围。

例1:3 升冰冻人血浆使呈部分软化状态后，用一橡皮锤碾碎，然后将其置37℃融化，而使血浆温度保持在0-2℃，接着立即移至冰浴，然后在4℃以2500×g 速度离心半小时。沉淀物重新溶解于300ml 缓冲液Ⅱ中，并加入1.3% 氢氧化铝悬液(每立升血浆加30ml),然后将上述混合物在10℃以2500×g 速度离心15分钟。根据上清液的检测结果，其蛋白和 A H F 浓度分别约为4 毫克/毫升和2.8 单位/毫升，按此值计算，总蛋白量和总 A H F 量分别为1200毫克和840 单位。

制备宽/长比例为2 :1 的含800ml Q A E- Sephadex A-25 膨胀凝胶的层析柱。以12毫升/分钟的流速把300 毫升样品上清液装上柱，然后分别用2 体积缓冲液Ⅱ,5体积缓冲液Ⅲ, 2 体积缓冲液Ⅳ和2 体积缓冲液Ⅴ，以24毫升/分钟的流速洗柱(用 Q A E- Sepharose4 B-fast flow凝胶时，为了获得最大的纯度和产率，需要较高的盐浓度)。用缓冲液Ⅴ收集的抽提物如下：

分部号	因子Ⅷ：C (单位/毫升)	因子Ⅷ：C (单位/管)	总蛋白 (毫克/毫升)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0.09	10.8	—
4	0.74	88.8	—
5	1.80	252.0	0.075
6	1.30	169.0	0.045
7	1.40	168.0	0.004
8	0.75	90.0	—
9	0.41	49.0	—

产品中的 A H F 总量：每毫升含 827 单位 A H F , 0.124 毫克总蛋白。

纯化倍数：3200 倍于冷沉淀物

回收率：98%

合并代表 70% 回收率和纯化 2600 倍的 5-7 分部，其总量为 390 毫升，并用 4 倍体积的缓冲液 VI 稀释，使其总量为 1950 毫升。

4 毫升膨胀了的 A H- 琼脂糖凝胶填装入宽/长比例为 1 : 1 的小层析柱中。把通过 Q A E- Sephadex A-25 柱纯化的含因子Ⅷ：C 的溶液，以 24 毫升/分钟的流速装上柱，然后分别用 10 倍体积的缓冲液 VI , 5 倍体积的缓冲液 VII , 2 倍体积的缓冲液 VIII 和 2 倍体积的缓冲液 IX 洗涤柱。用缓冲液 IX 洗脱期间分部收集，每管 1 毫升，结果如下：

管号	单位/ 毫升	毫克/ 毫升
1	0	—
2	194	0.434
3	239	0.406
4	84	0.196
5	46	0.182
6	15	0.168
7	5	0.056
8	0	0.028

总 A H F 量和总蛋白量(此步骤):分别为577 单位, 1.47毫克

纯化倍数(此步骤): 11倍

总纯化倍数: 28,000倍于血浆

回收率(此步骤): 98%

总回收率: 70%

在上面的例子中, 只有三个分部收集物用于疏水性亲和层析, 这样做是为了获得最大的分辨率和纯度。如要获得最大产率, 所有从 Q A E 层析柱收集的有 A H F 活性的各分部均可用于疏水性亲和层析分离。以这样和那样的数据为基础, 其总回收率将会达到96%。

例2-6

如例1 所述，从 Q A E 柱上洗下冷沉淀物，其纯化倍数和回收率如下：

例号	纯化倍数 (自血浆)	回收率 (%)
2	3500	100
3	6200	100
4	5300	99
5	4500	79
6	3700	100
平均	4640	95.6

例7-9

除山梨醇省去不同外，按例1 所述，从 Q A E 柱洗脱下冷沉淀物，结果列于下面：

例号	纯化倍数 (自血浆)	回收率 (%)
7	1400	69
8	2500	49
9	2900	59
平均	2300	59

例14-22

除使用不同的糖外，其余按例1所述方法将冷沉淀物从Q A E柱上洗脱下来。如上所述，用因子Ⅷ无法进行优选水合作用实验，故采用 Arakawa、Gekko和Morikawa 等人用 B S A得到的优选水合作用数据代替之（见前面的优选水合作用表），结果列表如下：

牛血清白蛋白(B S A)			因子Ⅷ		
例号	糖	克分子浓度	优先水合作用值	回收率 (%)	纯化倍数 (自血浆)
14	乳糖	0.25	0.300	85	4400
15	乳糖	0.20	0.300	70	2700
16	葡萄糖	1.0	0.250	83	5100
17	山梨醇	1.6	0.235	88	2700
18	山梨醇	1.1	0.229	100	5500
19	葡萄糖	1.5	0.226	100	6100
20	葡萄糖	2.0	0.212	76	4900
21	山梨醇	0.55	0.205	62	1700
22	山梨醇	0.82	0.198	72	1900

当这些 A H F纯度和产率数据对在等量的糖用量下 B S A的优选水合作用数据作图时，观察每种糖的最佳峰（图1 和2）

例23

在用或不用山梨醇的条件下，按例1 所述的方法用 Q A E层析柱纯化沉淀物。结果如下：

山梨醇克分子浓度	回收率(%)	纯化倍数
1	77	4200
1	82	3700
1	100	5600
1	92	4000
1	98	9000
1	94	3900
1	91	3400
0	35	560
0	48	535
0	59	683
0	59	1800
0	71	700

例24

除使用不同浓度的麦芽糖外，其余按例1 所述的方法，用 Q A E层析柱纯化冷沉淀物，其结果如下：

麦芽糖 (M) 回收率 (%) 自起始血浆的最终纯化倍数

0.3 100 2100

0.3 81 1420

0.3 100 2200

0.3 100 3400

0.0 64

洗涤缓冲液: 0.05M Ca Cl₂, 0.02M Na Ac

0.3 100 3600

0.3 88 8000

0.3 100 3000

洗涤缓冲液: 0.02M Na Ac, 0.035 M Ca Cl₂

0.3 92 4000

0.3 91 18000

0.3 98 9000

0.0 71 700

0.0 78 560

0.3 94 3900

例25

除山梨醇省去不用外，按例1 所介绍的氨基己基琼脂糖层析法所获得 Q A E 抽提物，其结果如下：

Q A E 洗脱液

洗脱液中山梨醇克分子浓度	纯化倍数 (自血浆)	回收率 (%)	最终纯化倍数 (自血浆)
0	2000	13	1,800
0	2100	48	2,300
1	4400	100	38,100
1	4500	96	38,100
1	5700	39	25,000
1	2100	100	20,700
1	5500	94	80,000
1	5700	60	17,000

例26按例1 方法，用顺丁烯二酸酐聚电介质层析法处理根据例1 方制备的冷沉淀物。顺丁烯二酸酐聚电介质可从英国威尔士，雷克塞姆的 Speywood 公司得到(以“SPEYLITE”商标销售)。在 Johnson. A. J 等人的论文(J. Lab. Clin Med. 92(2) : 194-210 (1978年8月)] 中已报告顺丁烯二酸酐聚电介质在 A H F 纯化中的应用。

聚电聚介质树脂按下法制备：将干树脂浸泡在 0.15M Na Cl 中, 30

分钟后用枸橼酸把 PH 调低到 4.0, 维持此 PH 值 20 分钟, 然后用 Na OH 调高到 PH 6.6。

层析分离按如下步骤进行: 用 5 倍于柱床体积的 0.15M Na Cl, 0.02M 枸橼酸钠溶液 (PH 6.6) 平衡柱, 用枸橼酸调节 AHF 浓缩物的 PH 至 6.6, 并以 1 毫升/ 分钟的流速上样。其结果如下:

洗脱液中山梨醇克分子浓度	冷沉淀物纯化倍数 (自血浆)	回收率 (%)	最终纯化倍数 (自血浆)
0	60	42	2600
0	60	55	2000
0	60	35	1800
0	60	31	1810
1	60	71	3870
1	60	85	4100
1	60	72	2700
1	60	71	3500

上面的结果表明, 用顺丁烯二酸酐聚电介质树脂代替氨基己基琼脂糖是可行的。

如上面报告的那样, 氨基己基- 琼脂糖层析分离的结果, 并不总是令人满意的。本发明的发明者已把这种情况与不同批号琼脂糖质量的差异相联系。

虽然为了说明的目的, 本发明的具体操作方法已经透露, 但是, 还有

待对本技术熟悉的人来评价；在不离开本发明的应用范围和原则的情况下，本发明的许多附加法、替代法和改良是可行的。

例如，虽然本文阐述的是 A H F 蛋白的纯化，但本纯化方法也可以应用于所有能被糖、醇、氨基酸或盐类稳定和（或）被优选水合的各种蛋白。

本发明最适用于以少量存在于生物体液或希望获高产率回收的那些蛋白的纯化。这样的蛋白包括其它血液凝固因子，如因子 II、VII、IX 和 X，但不是仅限于这些。白蛋白和免疫球蛋白也可以用这一方法加以纯化，虽然这仅限于着重高回收率时，因为据说在通常情况下（例如当必须纯化相当大的蛋白量和较低的回收率能允许时），用本法纯化白蛋白和免疫球蛋白并不是低成本的。对于每一种蛋白来说，层析分离用的水合作用添加剂的最佳浓度均须加以确定。按上面所讨论的方法就能做到这一点。

图.1

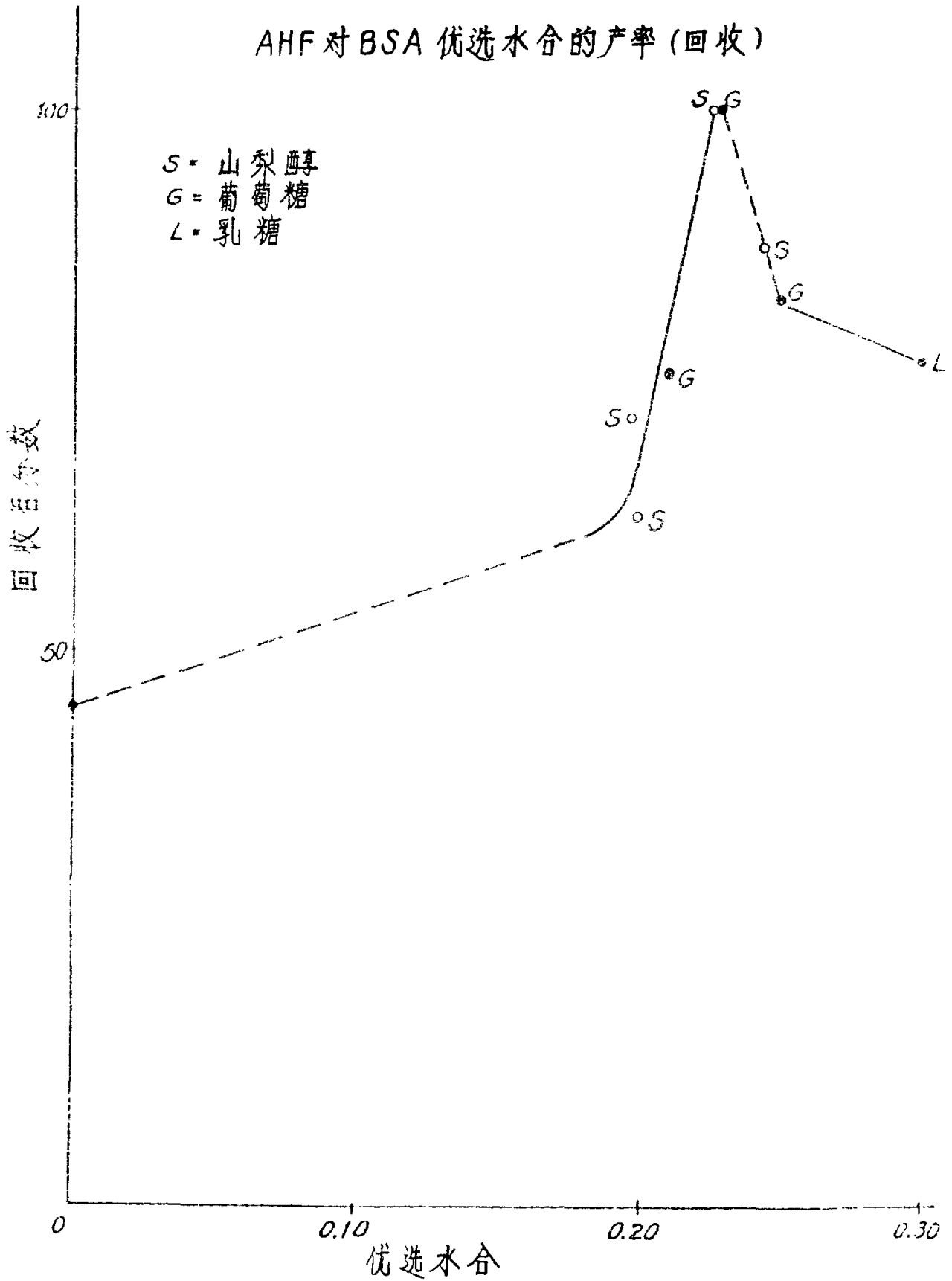


图.2

自血浆的因子纯化度对BSA的优选水合作用的曲线图

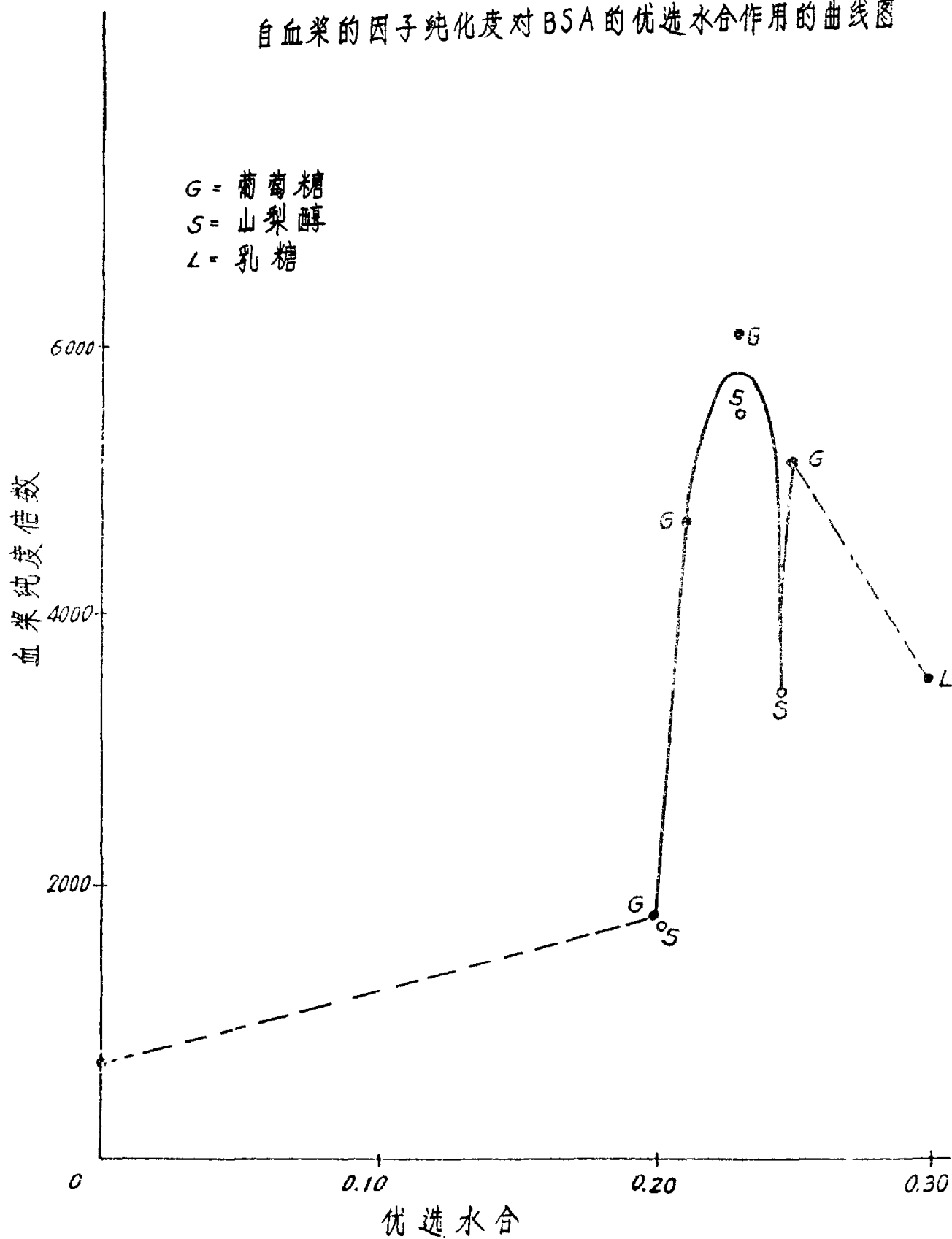


图. 3

