



[12] 发明专利申请公开说明书

C12P 21 / 02

C07K 3 / 12

C07K 7 / 26

A61K 37 / 36

[11] CN 88 1 00645 A

CN 88 1 00645 A

[43] 公开日 1988年10月19日

[21] 申请号 88 1 00645

[22] 申请日 88.1.30

[30] 优先权

[32] 87.1.30 [33] US [31] 009,291

[71] 申请人 国际矿物和化学公司

地址 美国印第安纳州

[72] 发明人 阿尔文·M·赞斯基

杰罗姆·L·马丁

保罗·R·阿特金森

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 刘元金

[54] 发明名称 从稀水溶液中回收促生长素的方法

[57] 摘要

一种从稀水溶液中回收促生长素的方法,包括在水溶液中加入一种过渡金属盐,与促生长素形成一种不溶性的络合物。

不溶性络合物可通过离心或过滤从溶液中分离,并通过常规方法如冰冻干燥法或于低温下真空干燥。本方法可回收干燥的有生物活性的促生长素。

881A05949 / 02-311

权 利 要 求 书

1、一种从稀水溶液中回收促生长素的方法，包括在水溶液中加入足够量的一种过渡金属盐，与促生长素形成一种不溶性络合物，并从该溶液中分离出此络合物。

2、权利要求 1 的方法，其中的稀水溶液是来自 从垂体匀浆或发酵基质提纯促生长素过程。

3、权利要求 1 的方法，其中所回收的促生长素是一种重组促生长素。

4、权利要求 3 的方法，其中所回收的促生长素是重组的猪促生长素。

5、权利要求 4 的方法，其中所回收的促生长素是一种猪促生长素的有生物活性的片段，其中成熟蛋白的前 7 个氨基端氨基酸已缺失。

6、权利要求 3 的方法，其中所回收的促生长素是重组牛促生长素。

7、权利要求 4 的方法，其中所回收的促生长素是牛促生长素的有生物活性的片段，其中成熟蛋白氨基末端的前 4 个氨基酸已缺失。

8、权利要求 3 的方法，其中所回收的促生长素是重组的羊促生长素。

9、权利要求 3 的方法，其中所回收的促生长素是重组的家禽促生长素。

10、权利要求 3 的方法，其中所回收的促生长素是重组的鱼的促生长素。

11、权利要求 3 的方法，其中所回收的促生长素是重组的人促生长素。

1 2、权利要求 1 的方法，其中所回收的促生长素是一种天然促生长素。

1 3、权利要求 1 2 的方法，其中所回收的促生长素是天然的牛促生长素。

1 4、权利要求 1 2 的方法，其中所回收的促生长素是天然的猪促生长素。

1 5、权利要求 1 的方法，其中的金属包括锌、铜、锰、铁或钴。

1 6、权利要求 1 5 的方法，其中的金属为锌。

1 7 权利要求 1 的方法，其中过渡金属盐包括一种过渡金属的氯化物、硫酸盐、醋酸盐或酒石酸盐。

1 8、权利要求 1 的方法，其中过渡金属盐包括氯化锌、氯化铜、氯化锰、氯化亚铁、氯化铁或氯化钴。

1 9、权利要求 1 7 的方法，其中的盐为氯化锌。

2 0、权利要求 1 的方法，其中将不溶性络合物从水溶液中过滤出来并干燥。

2 1、权利要求 1 的方法，其中，通过离心将不溶性络合物从水溶液中分离出来并干燥。

2 2、权利要求 1、2 0 或 2 1 的方法，其中所分离的不溶性络合物在真空下或通过冰冻干燥法干燥。

2 3、权利要求 2 2 的方法，其中不溶性络合物在温度 0℃ 与 2 5℃ 之间的温度下干燥。

2 4、权利要求 1 的方法，其中稀水溶液的 pH 约在 6. 8 与 9. 8 之间，并且过渡金属盐的摩尔数超过促生长素的摩尔数。

2 5、权利要求 2 4 的方法，其中稀水溶液的 pH 范围约在

6.8与9.0之间。

26、权利要求24的方法，其中过渡金属盐的浓度为，在1.0升溶液中每0.025毫摩尔促生长素至少约为0.12毫摩尔。

27、权利要求1的方法，其中所产生的不溶性络合物中，每摩尔促生长素至少含有大约1至8摩尔金属。

28、权利要求1的方法，其中所产生的不溶性络合物含有过渡金属的重量百分比约为0.3—8%。

29、权利要求28的方法，其中所产生的不溶性络合物含有过渡金属的重量百分比约为0.4—7%。

30、权利要求1的方法，其中，稀水溶液含有一种缓冲液，包括碳酸盐缓冲液、50mM Tris-HCl 或 60mM 乙醇胺。

31、权利要求28的方法，其中所用缓冲液的pH值调在约7.4—9.8之间。

32、一种配方，含有一种过渡金属和促生长素具有生物活性的片段的络合物。

33、权利要求32的配方，其中具有生物活性的片段为“△”7—猪促生长素。

34、权利要求32的配方，其中具有生物活性的片段为“△”4—牛促生长素。

从稀水溶液中回收促生长素的方法

本发明涉及从稀水溶液中回收具有生物活性的蛋白质的方法。更具体地说，本发明涉及的是，通过向稀水溶液中加入过渡金属盐类而从该溶液中回收具有生物活性的促生长素的方法。

促生长素也称为生长激素，是由许多动物的脑下垂体分泌的多肽类激素。这类激素有许多医疗应用的价值，而且可用含促生长素的配方治疗人的垂体缺陷和胃肠出血，或促进骨折的愈合，并加速挫伤及其它创伤的愈合。当通过各种给药器具或注射，给动物施予促生长素时，促生长素还可用来促进动物肉、奶的生产。（见 E. J.

Turman, "Some Effects of Pituitary Anterior Growth Factor" Thesis: Purdue University, April, 1953; L.J. Machlin J. Anim. Sci. 35: 794-800 (1972); T.R. Kasser et al., J. Anim. Sci. 53: 420-426 (1981); L.J. Machlin, J. Dairy Sci. 56: 575-580 (1973)).

虽然促生长素具有某种程度的种属特异性，但动物促生长素的氨基酸顺序之间却有相当大的同源性，这些激素已表明具有种属间的活性。此外，业已发现促生长素的各种活性片段。

传统的方法是从切除的垂体组织分离得到促生长素。随着 DNA 重组技术的出现，已有可能从经遗传工程改造的微生物获得促生长素，这些微生物含有用于生产促生长素的重组 DNA。例如可参见授与 Biogen N. V. 的欧洲专利申请 83304574.3 (公布号 0103 395)。不论促生长素的来源是动物还是微生物，都需要

纯化过程以除去杂质，如其它蛋白质、多肽以及细胞碎片，而且需要保持蛋白质的合适地折叠着的具有生物活性的形式。促生长素的纯化可以用一种或多种已知的蛋白纯化方法，包括凝胶层析、亲和层析、离子交换层析、超滤、透析、用盐如硫酸铵进行沉淀、用盐酸胍或十二烷基硫酸钠从含有促生长素的物体中提取，以及许多其它已知技术。促生长素纯化技术的某些实例可见于 Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Edition, Volume 11; 美国专利 No. 4, 371, 462, issued to Hecht; and Hart, et al., Biochem J. 218: 573 - 581 (1984)。

这些纯化方法中有许多方法都产生一种含促生长素的稀水溶液。因此，需要一种回收方法以从这些稀水溶液中回收纯化的促生长素。

现有的回收促生长素的方法涉及将该激素的稀溶液进行冰冻干燥，但由于产率低、设备成本高，并且在水性物质从冰冻状态升华的过程中需要保持很低的压力，所以冰冻干燥对回收干燥的具有生物活性的物质来说是一种昂贵的方法。大规模冰冻干燥则成本更高，因为所涉及的溶液体积巨大。

本领域中需要一种成本较低但并不影响促生长素生物活性的方法。

本发明的一个目的是提供一种从水溶液中回收促生长素而不降低其生物活性的廉价方法。

本发明的另一个目的是提供这样的一种方法，它与常规回收方法相比，可以降低设备成本。

本发明进一步的目的是，提供一种与常规回收方法相比可降低劳动成本的，从水溶液中回收促生长素的方法。

根据本发明，公开了一种从稀水溶液中回收促生长素的方法，包括将过渡金属盐加入水溶液中，从而与促生长素形成不溶性的络合物。

通过离心或过滤，接着利用冷冻干燥法在低温下真空去水或利用其它方法进行干燥，可从溶液中分离出不溶性的络合物。该方法能够回收干燥的具有生物活性的促生长素。

本发明涉及一种从稀水溶液中回收促生长素（此后也称作ST）的方法，该稀水溶液得自从脑垂体的匀浆或发酵基质纯化促生长素的过程。本发明的方法可用于从稀水溶液回收各种类型的促生长素，包括天然或重组的猪、牛、羊、人、家禽或鱼的促生长素。本文所用的术语促生长素应包括全长的天然的或重组促生长素及其具有促生长能力的衍生物。衍生物包括该多肽激素的具有生物活性的片段，如牛促生长素的 $\Delta 4$ 结构（一个在N-末端缺失4个氨基酸的多肽，如上述Biogen欧洲专利申请所述），及一个称为 $\Delta 7$ 猪促生长素的多肽，该多肽的氨基酸顺序相应于猪促生长素，但与成熟的、全长的激素相比缺失了前7个氨基酸（记述在授与Biogen N. V.的欧洲专利申请公告NO. 0 104 920中）。促生长素这个术语还包括含有一个额外的N-末端甲硫氨酸的该多肽的活性片段。本文所用的“生物活性”这个术语系指一种多肽，该多肽在施用于一个生物体之后，对该生物体的生物学过程有明显的影响。一个具有生物活性的促生长素在对生物体施用了增进生长的量以后，可增加该生物的生长速度。一个具有生物活性的促生长素在以适当的量施于一个生物体时，还能提高生物的饲养效率、营养物散布或肉质。

本发明的方法包括将过渡金属盐加入一种含促生长素的稀水溶液中。溶液中的促生长素应处于其正确缠绕的具有生物活性的形式，过

过渡金属盐与促生长素形成不溶性的络合物，从而使促生长素从稀水溶液中沉淀出来。该络合物包括促生长素分子及金属离子如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 。这些络合物含有金属离子与促生长素分子中某些氨基酸残基的氮原子之间的配位键。促生长素-金属络合物沉淀后，沉淀物可以以一种浓缩的水浆的形式从大部分水介质中分离出来。然后，可将不溶性络合物干燥以除去残留的水。所得产物为一种干燥的促生长素过渡金属络合物。将该产物施用于生物体时，产物中存在的过渡金属对促生长素的生物活性没有明显的副作用。

如上所述，根据常规获得促生长素的方法，垂体匀浆中的天然促生长素或发酵介质中的重组促生长素溶液，与促生长素的量相比所含的水是大量的。例如，在这样的溶液中大约每克促生长素含 100 克水或更多。根据常规回收方法，全部水分进行冰冻干燥。然而，当使用本发明方法，将过渡金属盐加入溶液中以将促生长素作为一个促生长素-过渡金属络合物从溶液中沉淀出来时，大部分初始的、大量的水很易与沉淀物分离，只留下浓缩的水浆待干燥。以上述初始溶液中水与促生长素之比为 100 : 1 为例，在浓缩浆中水与促生长素之比一般可仅为 5 克 : 1 克。因此，要除去的水的量减少了 20 倍。

此外，具有生物活性的促生长素与过渡金属离子的络合物所结合的水，可用比用于冰冻干燥的设备成本更低的装置除去，而且速度快得多。本发明的方法在用于设备及厂房的资金以及进行干燥过程所需的劳力方面节约了大量的费用。

可用于本发明方法中的过渡金属包括锌、铜、锰、铁及钴。优选的金属包括锌、铜及锰；最优选的是锌。在本发明方法中，特别有效的这些金属的盐包括锌、铜、锰、铁及钴的氯化物，但其它盐，如硫

酸盐、醋酸盐或酒石酸盐，也可用于此方法中。

本发明的方法可用于从由各种纯化过程产生的稀水溶液中回收促生长素。可通过本发明方法回收的促生长素，可从切除的垂体组织或经遗传工程改造的微生物（这些微生物含有用来生产促生长素的重组DNA）中分离获得。

用于回收促生长素的稀水溶液可含不同量的促生长素。加入有效量的过渡金属以沉淀促生长素。一般来说，在实验室规模的反应中，可加入金属盐使其浓度范围为在1.0升溶液中对每0.025毫摩尔促生长素加大约0.12毫摩尔至大约1.2毫摩尔的金属盐。用于这类反应中的金属的量一般可为，在1.0升水溶液中对每0.025毫摩尔促生长素加约1.2毫摩尔的金属盐。然而，足以有效地沉淀出促生长素的过渡金属盐的量可以改变。例如，在本申请的实例X的大规模反应中，比率为大约10摩尔锌盐比1摩尔重组猪S_T就可有效地沉淀出S_T。有效的量可由本领域中的一般技术人员通过常规试验确定。通常用过量的金属盐使溶液中的促生长素完全沉淀出来。促生长素—过渡金属盐络合物的终产物一般至少含约1—8摩尔金属/1摩尔S_T。以重量百分比为基础，产物中过渡金属的重量一般在0.3%到8%之间。产物中金属的重量最好在约0.4%到约7%之间。

促生长素的沉淀最好在接近中性或碱性的溶液中进行。水溶液的pH要求在6.8到9.8之间。为有效地回收促生长素，促生长素的稀水溶液最好在pH约7.4与9.0之间。

各种缓冲液可用于含促生长素的水溶液中。加缓冲液有助于使溶液中的促生长素在过渡金属盐加入前维持在某个特定的pH。含有可

与金属离子 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、或 Fe^{3+} 形成不溶性盐的阴离子的缓冲液应慎用。可用于本方法的缓冲液包括碳酸盐缓冲液（ $0.42\text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ 、 0.50 mM NaHCO_3 ，调 pH 至 7.4 至 9.8 之间）； 50 mM Tris-HCl ，pH 约 7.4；及 60 mM 乙醇胺，pH 约 9.8。

将过渡金属盐加入到含促生长素的稀水溶液中，使金属-促生长素络合物沉淀。在金属-促生长素络合物从水溶液中沉淀时，应搅拌溶液。

在过渡金属盐加入到含促生长素的稀水溶液中，并且促生长素作为一个不溶性的促生长素-金属盐络合物沉淀出来后，可将不溶性络合物从水溶液中分离出来并干燥。分离步骤可根据常规方法，如离心或过滤或两种方法结合。沉淀的物质可于室温下离心沉降或通过过滤分离，然后通过常规方法干燥，如于低温真空除去水份或冰冻干燥。如果要把离心或过滤后的促生长素于低温进行真空干燥，温度可在 0°C 与 25°C 之间。

从本发明方法获得的干燥的促生长素，实际上具有与通过冰冻干燥制备的促生长素或天然的促生长素等量的生物活性。另外，进行体外实验以模拟重组猪促生长素的体内施用，表明用本发明方法回收的促生长素与用常规冰冻干燥法回收的促生长素相比，能更好地维持溶解性（在 EDTA 存在下）。

以下实例仅为说明本发明，不应认为是限制其范围。

实例 I

重组猪促生长素的沉淀

使纯化的冰冻干燥的 $\Delta 7$ 重组猪促生长素 ($\Delta 7\text{ rpST}$)

International Minerals and Chemical · Co. 批号 CF008 - OBA . 94 . 1), 在去离子水 (d H₂O) 中重新形成浓度为每 ml 含 10mg $\Delta 7$ rpST 的溶液。将此物质对 > 100 倍体积的碳酸盐缓冲液 (0.42mM Na₂CO₃ ; 0.50mM NaHCO₃ , 用 HCl 调至 pH 7.4) 透析, 并将 1 份此透析后的物质稀释在 9 份的碳酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中。在所得的两种 $\Delta 7$ rpST 溶液 (10.0 与 1.0 mg $\Delta 7$ rpST / ml) 中添加 ¹²⁵I $\Delta 7$ rpST (同样的 IMC 批号) 至终浓度为每 ml 0.02 微居里以便通过离心后测定上清液部分中的放射性来测定沉淀百分率。

选作此沉淀试验的过渡金属盐包括氯化锌、氯化锰及氯化铜。配制每种盐的 2.4 mM、2.4 mM 及 0.24 mM 的溶液。用三氯乙酸 (20%) 作阳性沉淀对照。将金属盐或三氯乙酸溶液 (0.5 ml) 加入含 $\Delta 7$ rpST (0.5 ml) 促生长素的水溶液中, 室温下沉淀 1 小时。于室温下以 15,000 × g 离心 10 分钟, 沉降所沉淀出的物质。从二个平行管中各取一份 0.5 ml 的上清液, 置于聚丙烯管中计数。最低计数超过本底的 4 倍。目测判断沉淀的形成, 结果表明, 沉降物多少与所沉淀的 ¹²⁵I - $\Delta 7$ rpST 的百分比之间具有良好的相关性。这表明, ¹²⁵I - $\Delta 7$ rpST 与未标记的 $\Delta 7$ rpST 行为相似。

表 I 表明了试验结果。在 0.5 mg $\Delta 7$ rpST / ml 及 5mg $\Delta 7$ rpST / ml 浓度下, 在一种或几种试剂浓度下, 氯化锌及氯化铜都表现出良好的沉淀特性。除氯化铜外, 增加金属盐的量导致 $\Delta 7$ rpST 沉淀不变或增加。

表 I

| 沉淀剂 | 浓度 | 温度 | ¹²⁵ I 沉淀的百分率 ^a | |
|-------------|---------|-----|--------------------------------------|-------------------|
| | | | 5 mg/ml rpST | 0.5 mg/ml rpST |
| 5 <u>金属</u> | | | | |
| 氯化锌 | 12 mM | RT* | 76 ± 0.38 | 77 ± 0.96 |
| | 1.2 mM | RT | 76 ± 1.5 | 74 ± 0.56 |
| | 0.12 mM | RT | 55 ± 0.41 | 61 ± 0.21 |
| 10 氯化锰 | 12 mM | RT | 27 ± 1.2 | 21 ± 1.6 |
| | 1.2 mM | RT | 22 ± 0.31 | 19 ± 2.4 |
| | 0.12 mM | RT | 8.7 ± 0.64 | 15 ± 2.0 |
| 15 氯化铜 | 12 mM | RT | 23 ± 4.6 | 17 ± 2.9 |
| | 1.2 mM | RT | 64 ± 8.7 | 44 ± 6.7 |
| | 0.12 mM | RT | 42 ± 0.11 | 67 ± 0.12 |
| 对 照 | | | | |
| 空 白 | -- | RT | 4.3 ± 0.89 | 13 ± 1.2 |
| 20 | -- | 4°C | 7.2 ± 2.1 | 18 ± 0.80 |
| 三氯乙酸 | 10% 溶液 | RT | 98 ± 0.33 | 96 ± 0.59 |
| | 10% 溶液 | 4°C | 98 ± 0.24 | 97 ± 0.26 |

a 数据代表平均值 ± 标准误差，其中 $n = 2$ 。

* RT = 室温

实例 II

不同缓冲液及 pH 条件对 $\Delta 7$ rpST 沉淀的影响

使纯化的冰冻干燥的 $\Delta 7$ rpST (批号同实例 1) 在 $d H_2O$ 中重新形成浓度为 10 mg/ml 的溶液，取等份溶液分别对下列缓冲液之一透析：(1) 碳酸盐缓冲液，pH 7.4，(2) 40 mM Tris HCl ，

pH 7.4, 或 (3) 60mM 乙醇胺, pH 9.8。如实例 1, 在 3 种样品中加入 $^{125}\text{I} - \Delta 7 \text{ rpST}$ 。每份样品用 2.4 mM ZnCl_2 溶液按 1:1 稀释, 如实例 1 测定 $\Delta 7 \text{ rpST}$ 的沉淀百分率。表 II 显示了试验结果。数据表明, 锌能使 $\Delta 7 \text{ rpST}$ 从许多不同 pH 的缓冲液中有效地沉淀出来。

表 II

在 (1) 碳酸盐缓冲液, pH 7.4, (2) 50mM Tris, pH 7.4 或 (3) 60mM 乙醇胺存在下, $^{125}\text{I} - \Delta 7 \text{ rpST}$ 从由等体积的每 ml 10mg $\Delta 7 \text{ rpST}$ 及 2.4 mM ZnCl_2 组成的溶液中沉淀出来的百分率。

| 缓冲液 | pH | 沉淀的 $^{125}\text{I} - \Delta 7 \text{ rpST}$ 的百分率 (a) |
|-----------|-----|---|
| 碳酸盐 | 7.4 | 76 + / - 0.38 |
| 50mM tris | 7.4 | 81 + / - 0.11 |
| 60mM 乙醇胺 | 9.8 | 90 + / - 0.52 |

(a) 数据代表平均值 \pm 标准误差, 其中 $n = 2$ 。

实例 III

沉淀的 $\Delta 7 \text{ rpST}$ 的溶解度及生物活性

在准备沉淀试验的过程中, 将 500mg $\Delta 7 \text{ rpST}$ (批号与实例 1 中相同) 加到 50 ml 去离子水 (dH_2O) 中, 由于残留的碳酸根离子使 pH 为 10.3。将该物质对 pH 约为 7.4 的碳酸盐缓冲液彻底透析, 直至透析液的 pH 为 7.6。在透析过程中, 体积增加 5 ml。用 3 mM HCl 使透析液的 pH 降至 7.4。于室温以 $1500 \times g$ 离心使溶液澄清。

使 1.0 毫升一份的中性 $\Delta 7$ rpST 溶液与等体积的 2.4mM $ZnCl_2$ 或 2.4mM $CuCl_2$ 混合，于室温搅拌 1 小时后，以 $15,000 \times g$ 离心 10 分钟使悬浮液沉淀。每种沉淀物于 $-80^\circ C$ 冻结并真空干燥，同时以 1 份 20 ml 的中性 pH 的 $\Delta 7$ rpST 用 20 ml 水稀释的样品进行同样的冰冻干燥做对照。

测定冰冻干燥样品的干重及蛋白质的百分纯度（利用 B C A Protein Assay, Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois），计算每种沉淀方法相对于非沉淀的冰冻干燥方法的效率。表 III 表明这些测定的结果。

表 III

| 沉淀方法 | $\Delta 7$ rpST 百分率 (w / w) | 干重 (m g) | $\Delta 7$ rpST 重量 (m g) | 相对沉淀 效率 |
|----------|----------------------------------|---------------|-------------------------------|------------|
| $ZnCl_2$ | 115 | 54.5 | 62.7 | 81 |
| $CuCl_2$ | 105 | 48.0 | 50.4 | 65 |
| 冰冻干燥法 | 118 | 65.7 | 77.5 | 100 |

用垂体切除的大鼠进行生长测定（测定体重的增量），以测定金属盐对 $\Delta 7$ rpST 生物活性的影响。见 Parlow, S.F., et al., Endocrinology 77:1126-1134 (1965)。通过测定根据本发明方法回收的 $\Delta 7$ rpST 的一个剂量在大鼠中的促生长活性进行试验以显示促生长素的生物活性。

将垂体切除的雌性幼年（在试验期开始时为日龄 36 天）大鼠以 10 只为一组分为若干组进行试验。大鼠以重量分组，对各组的重量及分布进行平衡，使每组的平均起始重量几乎相等。每组大鼠进行一

种处理。

用促生长素或对照溶液对大鼠进行皮下注射，每9天注射一次。在头下肩胛下区域附近进行注射。为溶解促生长素，采用以下 Parlow's 缓冲溶液。

I. NaHCO_3 (0.03M), NaCl (0.15M), 用 8 M NaOH 使 pH 增至 10.8。

II. NaHCO_3 (0.03M), NaCl (0.15M), 用 8 M NaOH 使 pH 增至 9.5。

将已知量的 $\Delta 7 \text{rpST}$ (见表 III) 溶于 pH 10.8 缓冲液中，用 2 N HCl 调至 pH 9.5，并加 pH 9.5 缓冲液至所需体积。

用 10 个大鼠的一组作为阴性对照，注射溶解促生长素所用的媒液。对第二组注射冰冻干燥的 $\Delta 7 \text{rpST}$ 的溶液。对其它组注射选定剂量的由本发明的过渡金属沉淀的 $\Delta 7 \text{rpST}$ 溶液。在第 1、2、9 和第 10 天称量大鼠的体重并记录下来。在试验期末 (第 10 天) 分析大鼠体重增加的数据。

用垂体切除的大鼠测定生长 (每日单剂量 $14 \mu\text{g}$)，表明 ZnCl_2 沉淀的 $\Delta 7 \text{rpST}$ 具有比阴性对照组高得多 ($p < 0.01$) 的促生长活性，并且其活性与不含过渡金属盐的冰冻干燥的 $\Delta 7 \text{rpST}$ 对照无差别。用氯化铜沉淀也观察到相似的结果。

表IV

| 样品 | 剂 量 (μg) | 重量增加百分率 | |
|---|--------------------------|---------|------------|
| | | 平均值 | \pm 标准误差 |
| 阴性对照 | 0 | 4.0 | 4.2 |
| ZnCl ₂ 沉淀的 $\Delta 7\text{rpST}$ | 24 | 18.6* | 1.7 |
| CuCl ₂ 沉淀的 $\Delta 7\text{rpST}$ | 24 | 15.6* | 4.7 |
| 冰冻干燥的 $\Delta 7\text{rpST}$ | 24 | 17.1* | 2.4 |

* 方差分析后，用单侧 Dunnett's 检验，结果比阴性对照高得多 ($P < 0.01$)。

实 例 IV

$\Delta 4$ 重组牛促生长素的沉淀

使纯化的冰冻干燥的 $\Delta 4$ 重组牛促生长素($\Delta 4\text{rbST}$) 在去离子水(dH_2O) 中重新形成浓度为每 ml 含 10 mg $\Delta 4\text{rbST}$ 的溶液。将此物质对 > 100 倍体积的碳酸盐缓冲液(如实例 I 所定义) 透析，并将 1 份此物质稀释在 9 份 pH 7.4 的碳酸盐缓冲液中。然后，在所得的溶液中添加 $^{125}\text{I} - \Delta 4\text{rbST}$ 至终浓度为每 ml 0.02 微居里，以便通过离心后测定上清液部分中的放射性来测定沉淀的百分率。

所用的过渡金属盐包括氯化锌、氯化锰及氯化铜。配制每种盐的 2.4 mM、2.4 mM 及 0.24 mM 的溶液。用三氯乙酸(20%) 作阳性沉淀对照。将金属盐或三氯乙酸溶液(0.5 ml) 加入含 $\Delta 4\text{rbST}$ (0.5 ml) 的水溶液中，并于室温下搅拌 1 小时进行沉淀。于室温下以 $15,000 \times g$ 离心 10 分钟以沉降沉淀出的物质。

从二个平行管中各取一份 0.5 ml 的上清液，置聚丙烯管中计数。最低计数超过本底 4 倍。目测判断沉淀形成。试验结果与实例 I 相似。

实例 V

沉淀的 $\Delta 4$ rbST 的溶解度及生物活性

在准备沉淀试验的过程中，将 500 mg 如实例 III 制备的 $\Delta 4$ rbST 加入到 50 ml 去离子水 ($d H_2O$) 中。将该物质对碳酸盐缓冲液 (pH 7.4) 彻底透析，直至透析液的 pH 为 7.6。用 3 mM HCl 使透析液的 pH 降至 7.4，于室温以 $1500 \times g$ 离心使溶液澄清。

使 10 毫升一份的中性 $\Delta 4$ rbST 溶液与等体积的 2.4 mM $ZnCl_2$ 或 2.4 mM $CuCl_2$ 合并。于室温搅拌 1 小时后，以 $15,000 \times g$ 离心 30 分钟使悬浮液沉淀。每种沉淀物于 $-80^\circ C$ 冻结并真空干燥，同时以 1 份 20 ml 中性 pH $\Delta 4$ rbST 溶液用水稀释 50% 的样品进行同样的冰冻干燥做对照。

测定冰冻干燥样品的干重及纯化百分率，计算每种沉淀法相对于非沉淀的冰冻干燥法的效率。

如实例 III，用垂体切除的大鼠进行生长测定，以测定金属盐对 $\Delta 4$ rbST 生物活性的影响。将垂体切除的雌性幼年（在试验期开始时日龄为 36 天）大鼠以 10 只为一组分为若干组进行试验。大鼠按重量分组，使各组的重量及分布平衡而使每组的平均起始重量几乎相等。每组大鼠进行一种处理。

用促生长素或对照溶液对大鼠进行皮下注射，每 9 天注射一次。在头下肩胛下区域附近进行注射。采用以下 Parlow's 缓冲液以溶解促生长素。

I、 NaHCO_3 (0.03M), NaCl (0.15M), 用 8 M NaOH 使 pH 增至 10.8。

II、 NaHCO_3 (0.03M), NaCl (0.15M), 用 8 M NaOH 使 pH 增至 9.5。

将已知量的 $\Delta 4$ rbST 溶于 pH 10.8 缓冲液中, 用 2 N HCl 调至 pH 9.5, 加 pH 9.5 缓冲液至所需体积。

用 10 个大鼠的一组作阴性对照, 注射溶解促生长素所用的煤液。对第二组注射冰冻干燥的 $\Delta 4$ rbST 的溶液。对其它组注射选定剂量的本发明的过渡金属沉淀的 $\Delta 4$ rbST 溶液。在第 1、2、9 和第 10 天称量大鼠的体重并记录下来。在试验期末 (第 10 天) 分析大鼠体重增加数据。

实例 VI

天然的牛促生长素的沉淀

使来源于垂体的纯化的冰冻干燥的牛促生长素 (bST) 在去离子水 ($d \text{H}_2\text{O}$) 中重新形成浓度为每 ml 10 mg bST 的溶液。将此物质对 > 100 倍体积的碳酸盐缓冲液 (如实例 1 所定义) 透析, 并将 1 份此透析后的物质稀释于 9 份 pH 7.4 的碳酸盐缓冲液中。然后在所得的溶液中添加 ^{125}I -bST 至终浓度为每毫升 0.02 微居里, 以便通过离心后测定上清液部分中的放射性来测定沉淀百分率。

所用的过渡金属盐包括氯化锌、氯化锰和氯化铜。配制每种盐的 2.4 mM、2.4 mM 及 0.24 mM 的溶液。用三氯乙酸 (20%) 作阳性沉淀对照。将金属盐或三氯乙酸溶液加入到含 bST 的水溶液中, 并于室温搅拌 1 小时进行沉淀。于室温以 $15,000 \times g$ 离心 10 分钟沉降沉淀出的物质。从二个平行管中各取一份 0.5 ml 的上清液, 置

聚丙烯管中计数。最低计数超过本底4倍。目测判断沉淀的形成。试验结果与实例I相似。

实例VII

沉淀的bST的溶解度及生物活性

在准备沉淀试验的过程中，将如实例VI制备的500 mg bST重新溶解在50 ml的去离子水(dH_2O)中。将该物质对pH 7.4的碳酸盐缓冲液彻底透析，于室温以 $1500 \times g$ 离心使溶液澄清。

将10毫升一份的中性bST溶液与等体积的2.4 mM $ZnCl_2$ 或2.4 mM $CuCl_2$ 混合。于室温搅拌1小时后，以 $15,000 \times g$ 离心30分钟使悬浮液沉淀。每种沉淀于 $-80^\circ C$ 冻结并真空干燥，同时以一份20 ml中性pH bST用 dH_2O 稀释50%的溶液进行同样的冰冻干燥做为对照。

测定冰冻干燥样品的干重及纯化百分率，计算每种沉淀法相对于非沉淀的冰冻干燥法的效率。

如实例III，用垂体切除的大鼠进行生长测定，以测定金属盐对bST生物活性的影响。

将垂体切除的雌性幼年(在试验期开始时日龄为36天)大鼠以10只为一组分为若干组进行试验。大鼠按重量分组，使各组的重量与分布平衡，让每组的平均起始重量几乎相等。对每组大鼠进行一种处理。

用促生长素或对照溶液对大鼠进行皮下注射，每9天注射一次。在头下肩胛下区域附近进行注射。为溶解促生长素，采用以下的Parlow's缓冲液。

I、 $NaHCO_3$ (0.03M), $NaCl$ (0.15M), 用8 M $NaOH$ 使pH

增至 10.8。

II、 NaHCO_3 (0.03M), NaCl (0.15M), 用 8 M NaOH 使 pH 增至 9.5。

将已知量的 bST 溶于 pH 10.8 的缓冲液中, 用 2 N HCl 调至 pH 9.5, 并加 pH 9.5 缓冲液至所需体积。

用 10 只大鼠的一组作为阴性对照, 注射溶解促生长素所用的煤液。对第二组注射冰冻干燥的牛促生长素的溶液, 对其它组注射选定剂量的本发明的过渡金属沉淀的 bST 溶液。在第 1、2、9 和第 10 天称量大鼠体重并记录下来。在试验期末 (第 10 天) 分析大鼠体重增加的数据。

实例 VIII

天然的猪促生长素的沉淀

使纯化的冰冻干燥的来源于垂体的猪促生长素 (pST) 在去离子水 (dH_2O) 中重新形成浓度为每 ml 含 10 mg pST 的溶液。将此物质对 > 100 倍体积的碳酸盐缓冲液 (如实例 I 所定义) 透析, 并将 1 份此透析后的物质稀释于 9 份 pH 7.4 的碳酸盐缓冲液中。然后在所得的 pST 溶液中添加 ^{125}I -pST 至终浓度为每 ml 0.02 微居里, 以便通过离心后测定上清液部分中的放射性来测定沉淀百分率。

所用的过渡金属盐包括氯化锌、氯化锰及氯化铜。配制每种盐的 2.4 mM、2.4 mM 及 0.24 mM 溶液。用三氯乙酸 (20%) 作阳性沉淀对照。将金属盐或三氯乙酸溶液加入到含 pST 的水溶液中, 于室温搅拌 1 小时进行沉淀。于室温以 $15,000 \times g$ 离心 10 分钟, 沉降沉淀出的物质。从二个平行管中各取出一份 0.5 ml

的上清液，置聚丙烯管中计数。最低计数超过本底4倍。目测判断沉淀形成。试验结果与实例I相似。

实例IX

沉淀出的pST的溶解度及生物活性

在准备沉淀试验的过程中，将如实例VIII制备的50mg pST再溶解于50ml去离子水(dH_2O)中。将该物质对pH7.4的碳酸盐缓冲液彻底透析，于室温下以 $1500 \times g$ 离心使溶液澄清。

将10毫升一份的中性pST溶液与等体积的2.4mM $ZnCl_2$ 或2.4mM $CuCl_2$ 混合。于室温搅拌1小时后，以 $15,000 \times g$ 离心30分钟使悬浮液沉淀，将每个沉淀物于 $-80^\circ C$ 冻结并真空干燥，同时以一份20ml中性pH bST用 dH_2O 稀释50%的溶液进行同样的冰冻干燥做为对照。

测定冰冻干燥样品的干重及纯化百分率以便计算每种沉淀法相对于非沉淀的冰冻干燥方法的效率。

如实例III，用垂体切除的大鼠进行生长测定，以测定金属盐对pST生物活性的影响。

将垂体切除的雌性幼年(在试验期开始时日龄为36天)大鼠以10只为一组分为若干组进行试验。大鼠按重量分组，使各组的重量与分布，从而使每组的平均起始重量几乎相等。对每组大鼠进行一种处理。

用促生长素或对照溶液对大鼠进行皮下注射，每9天注射一次。在头下肩胛下区域附近进行注射。为溶解促生长素，采用以下Parlow's缓冲液。

I、 $NaHCO_3$ (0.03M), $NaCl$ (0.15M), 用8M $NaOH$ 使pH

增至 10.8。

II、 NaHCO_3 (0.03M), NaCl (0.15M), 用 8 M NaOH 使 pH 增至 9.5。

将已知量的 PST 溶于 pH 10.8 缓冲液中, 用 2 N HCl 调至 pH 9.5, 并加 pH 9.5 缓冲液至所需体积。

用 10 个大鼠的一组作为阴性对照, 注射溶解促生长素所用的媒液。对第二组注射冰冻干燥的猪促生长素的溶液, 对其它组注射选定剂量的本发明的过渡金属沉淀的 PST 溶液。在第 1、2、9 和第 10 天称量大鼠体重并记录下来。在试验期末 (第 10 天) 分析大鼠体重增加的数据。

实例 X

从培养于发酵培养基中的大肠杆菌 HB 101 获得 4.3 升于 60 mM 乙醇胺缓冲液 (pH 9.0) 中, 浓度为 590 mg/l 的纯化的 $\Delta 7$ rpST。将该溶液在横流超滤装置中浓缩至约 810 mg/l, 该装置为配有一个 2.6 英尺³ 的膜性滤筒的 Romicon HF, 其额定拦截分子量约为 5,000 道尔顿。将所得的在 pH 9.0 的乙醇胺缓冲液中的浓缩产物溶液在同一 UF 装置中对 6 倍体积的 pH 为 8.0 - 10.0 的 50% 碳酸盐缓冲液 (0.21 mM Na_2CO_3 ; 0.25 mM NaHCO_3) 进行透滤。所得的产物保留物 (在 pH 大于 8.0 的 50% 碳酸盐缓冲液中) 至此变得稍混浊 ($\text{OD}_{595} = 0.01$), 故在一个横流微孔过滤装置 Amicon DC-10 中澄清, Amicon DC-10 配有一个 5 英尺² 的具有 0.1 μm 膜的膜性滤筒。

在 2.6 升浓度为 800 mg/l、pH 9.0 的以上澄清的溶液中, 以在 5 - 30 分钟内加完的速度加入 3.7 升经 0.2 μ 过滤的

2.4 mM ZnCl₂ 溶液并缓慢混合。在本试验中加入 Zn⁺⁺ 的量导致 Zn / ST 摩尔比约为 10。在进一步回收 Zn-△7 rpST 沉淀物之前，使溶液再混合 20 分钟。

将所得的 Zn-△7 rpST 悬浮液（此刻浓度为 0.08%，颗粒大小为 2-5 μm）在一个具有 0.1 μm 膜截流器的横流微孔过滤装置中浓缩至约 2-5%。

将所得的悬浮液通过连续的大容量离心进一步浓缩至约 250,000 mg/l。所得的悬浮液也可直接喷雾干燥，或通过横流微孔过滤或圆盘沉积离心（disc-stack centrifugation）进一步浓缩至约 100,000 mg/l。将所得的胶状液铺开至厚度约 2 cm 并冰冻干燥 2 天，产物的最大温度限制在 25℃。通常，此冰冻干燥的物质颗粒大小为 10-200 μm，整体密度约 0.5，适于直接配成投药系统。

实例 XI

重复实例 X，只是用 pH 7.4 的 2 mM Tris 缓冲液代替 50% 的碳酸盐缓冲液。终产物的特性及沉淀效率在用 Tris 或 50% 碳酸盐缓冲液时是相似的。