

重组人 γ 干扰素复性过程中体外活性检测方法研究*

费峥峥 关怡新 姚善泾**

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘要: 结晶紫染色法由于具有客观、精确的特点, 适用于大量抗肿瘤药物的药敏测定。本实验对此方法进行了探讨和条件优化, 考察了结晶紫染液的用量及作用时间、溶媒提取时间、孔板效应及边缘效应等, 并将其应用于重组人 γ 干扰素包涵体初步复性的体外活性检测之中。

关键词: 结晶紫染色法, γ 干扰素, 活性检测, 复性

中图分类号: R73-35 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0065-05

A Colorimetric Method to Assay Biological Activity of Recombinant Human IFN- γ

FEI Zheng-Zheng GUAN Yi-Xin YAO Shan-Jing

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract: The colorimetric method has been well developed to detect the sensitivity of most antiproliferative drugs with the advantages of objectivity and accuracy. Many parameters including the dosage and the absorbance of crystalline violet, the extraction time of the solvent, plate effect and marginal effect were investigated, then the optimized method was applied further to measure the biological activity during the refolding of recombinant human IFN- γ inclusion bodies.

Key words: Colorimetric method, IFN- γ , Biological activity assay, Refolding

γ 干扰素 (Interferon γ , IFN- γ) 是干扰素家族中比较特殊的一类, 除了具有抗病毒作用以外, 它还是人体内一种双向免疫调节因子, 在抗肿瘤、治疗自身免疫性疾病方面有广阔的应用前景。天然人 γ 干扰素因来源不足, 含量低, 不易大量获得, 多年来影响了人 γ 干扰素的作用机理和临床应用的研究。1981 年 Goeddel^[1], 1982 年 Gray^[2] 等先后研制成重组人 γ 干扰素 (rhIFN- γ) 的方法, 并成功用于生产。但是, 由人 γ 干扰素 cDNA 转化的大肠杆菌往往不能直接分泌 γ 干扰素, 在高度表达时, 这种外源蛋白会聚集在菌体内, 并通过疏水作用相互连接形成不溶性聚合物即包涵体^[3]。包涵体由于其空间结构不正确, 须经体外折叠复性方可获得生物活性。

在重组人 γ 干扰素包涵体复性过程中, 除了其复性方法之外, 重要的一个环节就是生物活性的检测, 常用的方法有生物学、免疫学和化学测定等。采用生物学方法测定干扰素活性尽管误差较大, 但由于蛋白质分子在纯化过程中发生的损伤、断裂以及聚合等均会影响其活性, 因此一直不能被其他方法所取代。以细胞病变 (效应) (CPE) 效应为基础的结晶紫染色测定法是由 Gillies^[4] 等于 1989 年提出的一种单层细胞培养的体外药物敏

* 浙江省自然科学基金资助项目 (No. 201099)

教育部留学回国人员科研启动基金资助项目

** 联系人 Tel: 0571-87951982, E-mail: yaosj@che.zju.edu.cn

收稿日期: 2003-08-11, 修回日期: 2003-10-10

感性测定方法。由于该法具有快速、灵敏、准确性高、重复性好的特点,是目前广泛应用于测定干扰素活性的生物学方法之一。本实验将该法与常规测定法相对照,对实验条件进行了优化,并用于包涵体初步复性后的重组人 γ 干扰素体外活性检测。

1 材料与仪器

1.1 主要试剂

Eagle's 最低限度培养基(MEM): MEM 粉末(Gibco 公司产品)溶于 1L 双蒸水, 0.22 μ m 微孔膜过滤除菌,分装置于 4℃ 保存。使用前加入经 56℃ 水浴 30min 灭活的小牛血清(四季青生物工程材料有限公司产品),双抗(青霉素和链霉素各 250 单位/mL),用 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2~7.4。

细胞消化液: 1% 胰酶(Difco) 5mL, 1% 维尔烯(Versene) 2mL, 用不含钙和镁的 PBS (pH=7.2) 定容至 100mL。

结晶紫染液: 结晶紫 0.5% (w/v), NaCl 0.85% (w/v), 乙醇 50% (v/v), 甲醛 3% (v/v), 蒸馏水 47%。脱色液: 乙二醇甲醚 50%, 蒸馏水 50%。

1.2 主要仪器

酶标仪 MR550 型(美国 Bio-Rad 公司产品)。

1.3 测定细胞与攻击病毒

人羊膜细胞 Wish 株和水泡性口炎病毒(VSV) 株由上海第二军医大学惠赠。

1.4 标准品

干扰素 α 标准品 100 倍稀释分装后,效价 120 IU/mL, 由上海第二军医大学惠赠。

2 实验方法

2.1 Wish 细胞的培养

取出保存于-80℃ 的 Wish 细胞株, 37℃ 水浴解冻后, 1,000 r/min 离心 5min, 弃上清; 沉淀用含 10% 小牛血清的 MEM 培养液悬浮, 移至细胞培养瓶, 加入适量培养液置于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱内, 每 2~3d 传代一次, 实验时取对数生长期细胞。

2.2 VSV 的扩增与保存^[5]

用含 10% 小牛血清的 MEM 培养液按 1: 200 稀释 VSV, 接种于生长良好的单层 Wish 细胞中进行增殖, 孵育至细胞病变达到 75%~100% 时, 即可冻存于-20℃ 以下。次日取出, 反复冻融 2~3 次, 再用巴氏管吹打, 3,000 r/min 离心 20min, 收集上清。根据每次用量分装, 存于-80℃ 以下, 毒种应贮存于液氮中。

2.3 VSV 效价的滴定^[6]

以 24h 时微量板孔中半数出现细胞病变现象的稀释度为 1 个 TCID₅₀, 此稀释度的倒数乘以 10 倍作为病毒效价 (TCID₅₀/mL)。

2.4 微量 CPE 测定法^[7]

按《中国生物制品规程》(一部) 中要求采用 Wish 细胞/VSV 体系测定, 根据干扰素对 Wish 细胞的保护性, 即细胞的病变程度按 5 级打分法记录不同浓度时的保护性。用国家标准品 (Lot 03/94) 为参考标定其 IU 值。

2.5 结晶紫染色测定法^[8]

结晶紫染色测定法基于结晶紫染液可通过细胞的特定摄生法而选择性地被细胞核

吸收,死亡的细胞几乎不吸收,这样结晶紫染料的吸收量与活细胞数成正比,而被核(DNA)吸收的结晶紫又可为有机溶媒提取,所以可根据提取液颜色深浅来判断活细胞的多少,即通过测定提取液的光密度值(OD)来确定活细胞的数量^[4]。

将生长良好的单层 Wish 细胞用含 10% 小牛血清的 MEM 培养液配成细胞浓度约为 5×10^5 个/mL 的悬液,加到 96 孔细胞培养板上,75 μ L/孔。培养 2~4h 后,每孔加入 4 倍梯次稀释的干扰素样品 75 μ L,样品稀释用含 8% 小牛血清的 MEM 培养液,每个样品 4 个平行孔,阴性(即细胞对照)和阳性(即病毒对照)对照孔均不加干扰素,每孔加入 75 μ L 含 8% 小牛血清 MEM 培养基。培养 20~24h 后,弃上清,用含 4% 小牛血清 MEM 培养基稀释的 VSV 病毒攻击,100 μ L (200TCID₅₀)/孔,阴性对照孔加入 100 μ L 孔含 4% 小牛血清 MEM 培养基。然后于含 5% CO₂ 的 37℃ 孵箱中培养至所有阳性对照孔病变达到 3 级以上,弃上清,每孔加入 40 μ L 结晶紫染液,室温染色 20min,弃掉染液,用自来水冲洗残余的染液,吸干后,每孔加入 100 μ L 的脱色液脱色,测定每孔 A₅₅₀ 值。

2.6 干扰素效价的计算方法^[5]

本实验引进病毒滴度测定的 Reed-Muench 法计算干扰素效价(U/mL),再以干扰素标准品为参考,校正待测品的效价(IU/mL)。国际上最常采用的判定干扰素活性的方法是在标本的梯次稀释度中,仍能保护半数细胞免受攻击病毒损害的最高稀释度的倒数即为干扰素的效价。该方法的步骤为:

① 根据 ELISA 测定 550nm 吸收值进行计算

$$[OD]_{\text{保护}} = [OD]_{\text{实测}} - [OD]_{\text{病毒对照}}$$

$$[OD]_{\text{破坏}} = [OD]_{\text{细胞对照}} - [OD]_{\text{实测}};$$

② 累积和计算保护百分比;

③ 用插入公式计算 IFN 效价

$$\log_x (\text{样品 IFN 实测效价}) = \frac{\text{高于 50\% 的百分数} - 50\%}{\text{高于 50\% 的百分数} - \text{低于 50\% 的成分数}} + \log_x \frac{1}{\text{稀释度}} \quad (1)$$

式中 x 为 IFN 递次稀释的稀释倍数,稀释度为高于 50% 的百分数所对应的 IFN 稀释度。

④ 按平行操作和同法计算的标准 IFN 活性效价的标定值进行工作单位修正

$$\text{样品 IFN 效价 (IU/mL)} = \text{实测样品 IFN 效价 (U/mL)} \times \frac{\text{标准 IFN 效价 (IU/mL)}}{\text{实测标准 IFN 效价 (U/mL)}} \quad (2)$$

2.7 重组人 γ 干扰素的 SEC 复性

采用 Superdex G-75 凝胶柱复性 rhIFN- γ 包涵体,层析柱高 12cm,直径 16mm,上样量 0.5mL,流速 0.4mL/min,洗脱液(即复性缓冲液)为 50mmol/L Tris-HCl pH8.0 含 3mol/L Urea、0.15 mol/L NaCl、10mmol/L EDTA 和 3mmol/L GSH: 0.3mmol/L GSSG。将收集的目标蛋白活性峰在 6,000 r/min 下离心 15min,弃沉淀,上清液转移至透析袋内,50mmol/L Tris-HCl pH8.0 中 4℃ 透析 24h 后,样品经 8,000 r/min 离心 15min,收集上清,用 0.22 μ m 的无菌膜过滤除菌,测定最终蛋白浓度(mg/mL)、活性(IU/mL)以及比活(IU/mg)。

3 结果与讨论

3.1 结晶紫染液的用量及作用时间

设置不同的结晶紫染液用量组,分别加入 20、30、40、50 和 60 μ L 结晶紫染液,室

温下染色 30min, 弃染液, 洗涤干燥后, 在显微镜下观察, 30~50 μ L 比较合适。用量过少, 染色不完全; 用量过多, 染液容易残留在细胞间, 都会影响实验结果。通过与染色时间的正交实验结果表明, 30 μ L 染色 30min, 40 μ L 染色 20min 和 50 μ L 染色 10min 的效果基本相当, 因此可根据实际情况选取结晶紫染液用量及其作用时间。

3.2 结晶紫染料的提取时间

96 孔板每孔加入 100 μ L 脱色液, 在显微镜下观察细胞透明度, 每隔 10min 用酶标仪测定 A_{550} 值。显微观察结果显示, 10min 以后, 细胞已经呈无色透明状, 说明脱色液已经基本提取了与细胞核结合的结晶紫染料。随着时间的增加 A_{550} 值不断变化, 30min 前变化幅度较大 (± 0.2), 30min 后趋于平缓 (± 0.02), 并且各孔相对读数大小保持不变。60min 以后微量板读数开始整体下降, 说明结晶紫开始分解和转化。因此认为, 脱色 30~60min 后用酶标仪读板最佳。

3.3 边缘效应

所谓边缘效应是指由于微量板边缘的渗透压相对大于中部, 使边缘孔内溶液比中央孔挥发要略快, 造成边缘孔和中央孔内溶液体积的不同。实验发现, 如果微量板连续培养时间超过 48h, 边缘效应较明显, 接入 VSV 攻击的边缘孔比中央孔发生病变早且病变程度大 (24h 时 $[OD]_{\text{边缘孔}}$ 比 $[OD]_{\text{中央孔}}$ 小 0.3~0.5), 而作为细胞对照时影响可以忽略 ($[OD]_{\text{边缘孔}}$ 和 $[OD]_{\text{中央孔}}$ 之间的偏差 48h 内小于 0.05)。

3.4 孔板效应

即使在加样时排除了边缘孔, 事实上微量板上剩余的 60 个孔仍存在由于相对位置不同致使微环境 pH 和温度有差异, 称之为孔板效应。实验发现, 细胞对药物的敏感性, 中间两列 (即第 6 和第 7 列) 最高, 依次向两边递减, 第 2 列和第 11 列最差。在尝试不同的排板方式后, 当中两列作为病毒对照, 样品稀释度从两侧向中央递增, 每个稀释度作 3~4 个平行, 重复性最好。

3.5 结晶紫染色法检测初步复性的 $\text{rhIFN-}\gamma$ 活性

将 $\text{rhIFN-}\gamma$ 包涵体变性溶解液进行复性, 上样浓度 15.6mg/mL, 最终蛋白回收浓度 0.191mg/mL, 测得 $[OD]_{\text{细胞对照}} = 1.076$, $[OD]_{\text{病毒对照}} = 0.716$, 4 倍递次稀释后的 $\text{rhIFN-}\gamma$ $[OD]_{\text{实测}}$ 如表 1, 计算各相应值后, 代入公式 (1) 即可计算出该 $\text{rhIFN-}\gamma$ 样品活性为 1449.6IU/mL, 按同法测得标准品 IFN- α 效价测定值为 83.0IU/mL, 插入公式 (2) 换算为国际标准单位的值为 2095.8 IU/mL, 比活 10972.8 IU/mg。

表 1 Reed-Muench 计算 IFN- γ 的保护百分比

稀释度	$[OD]_{\text{实测}}$	$[OD]_{\text{保护}}$	$[OD]_{\text{破坏}}$	$[OD]_{\text{保护累积}}$	$[OD]_{\text{破坏累积}}$	百分比/%
4	1.614	0.898	0	2.416	0	100
4 ²	1.256	0.540	0	1.518	0	100
4 ³	1.040	0.324	0.036	0.978	0.036	96.4
4 ⁴	1.022	0.306	0.054	0.654	0.090	87.9
4 ⁵	0.923	0.207	0.153	0.348	0.243	58.9
4 ⁶	0.857	0.141	0.219	0.141	0.462	23.4

4 结论

本文对实验条件进行了探讨,使其在检测 rhIFN- γ 的抗病毒活性中更为准确。实验结果表明:①结晶紫染液的加入量在 30 ~ 50 μ L 之间较适宜,同时与染液作用时间有关,用量大时作用时间相对减少。②有机溶液脱色 30min 后测定较好,此时细胞核中的结晶紫已被提取完全,而结晶紫在脱色液中尚能稳定存在。③为了最大程度利用微量板,同时考虑到边缘效应和孔板效应的存在,第 1 和第 12 列加细胞对照,第 6 和第 7 列加病毒对照。

结晶紫染色测定法通过 OD 值来反映细胞的病变程度,相对于常规法中采用 5 个级别来表示更加精确、客观,减少了人为因素对测定结果的影响。但该法假定 96 孔板中每孔细胞基数和生长量一致,而实际操作中除了边缘效应和孔板效应的影响仍会存在有的孔细胞较多,有的孔较少,因此有必要以常规测定法作为对照,减少数据偏差。

参 考 文 献

- [1] Goeddel D V, Leung D W, Dull T J, *et al.* Nature, 1981, **290**: 20 ~ 26.
- [2] Gray P W, Leung D W, Pennica D, *et al.* Nature, 1982, **295**: 503 ~ 508.
- [3] 刘沪丽. 国外医学: 预防诊断. 治疗用生物制品分册. 1990, **13** (2): 61 ~ 64.
- [4] Gillies R J, Didier N, Denton M. Anal Biochem, 1989, **159**: 109 ~ 113.
- [5] 邱淑华, 欧泽惠, 孙 明. 广西药学, 1999, **21** (5): 974 ~ 975.
- [6] 杜 平. 医用干扰素 (第一版). 济南: 解放军出版社, 1985.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 中国生物制品规程 (一部). 北京: 中国人口出版社, 1995.
- [8] 刘长暖, 刘 兰, 王志军, 等. 中国生物制品学杂志, 1999, **12** (1): 36 ~ 38.