

重组人甲状旁腺激素 (1-84)的质量研究

王子兰, 吕萍*

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 对重组人甲状旁腺激素 rh-PTH (1-84) 进行质量研究, 为其生产工艺的进一步优化提供依据。方法: 采用 RP-HPLC 和非还原型 SDS-PAGE 测定纯度; 还原型 SDS-PAGE 测定相对分子质量; Western blot 鉴定并进行 N-末端氨基酸序列测定; 考马斯亮兰法测定蛋白含量; ELISA 法测定效价。结果: rh-PTH (1-84) 经 RP-HPLC 和 SDS-PAGE 分析, 其纯度分别为 81%, 85%。其相对分子质量为 9480 N-末端 15 个氨基酸序列为 SVSEQLMHNLGKHL, 均与理论值一致。蛋白含量为标示量的 87%, 效价在标示量的 80% ~ 120%。结论: 重组人甲状旁腺激素 rh-PTH (1-84) 质量基本符合规定, 但其纯度偏低, 生产工艺有待进一步优化。

关键词: 重组人甲状旁腺激素 (1-84); 质量研究

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0269-03

Quality research of the recombinant human parathyroid hormone(1-84)

WANG Zi-lan, LÜ Ping*

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective The quality research of recombinant human parathyroid hormone rh-PTH (1-84) was conducted, which could help improve the manufacture process of rh-PTH (1-84). **Methods** The purity of rh-PTH (1-84) was determined by RP-HPLC and non-reduced SDS-PAGE methods. The relative molecular mass was determined by reduced SDS-PAGE. Western blot and N-terminal sequence of the rh-PTH (1-84) were analyzed. The protein content was assayed by Bradford method, and the potency was tested by ELISA. **Results** The purity of the rh-PTH (1-84) was 81% by RP-HPLC and 85% by SDS-PAGE, with the relative molecular mass 9480. The determined N-terminal sequence was SVSEQLMHNLGKHL, which was identical to the theoretical sequence. The protein content and potency were 87% and 80% - 120% respectively compared to the labeled content. **Conclusion** The quality of the rh-PTH (1-84) was consistent with the quality standard, but the purity was somewhat low, so the manufacture process was recommended improvement further.

Key words recombinant human parathyroid hormone [rh-PTH (1-84)]; quality research

甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 由人甲状旁腺主细胞分泌, 是由 84 个氨基酸残基连接的一条直链多肽 (PTH 1-84)。PTH 是目前最有前途的骨质吸收促进剂, 是维持机体血钙平衡的重要激素, 总的效应是升高血钙和降低血磷水平, 是骨质疏松治疗领域中又一新型药物^[1,2]。目前国内外公司申报的重组人甲状旁腺激素大多为 PTH (1-34), 对 rh-PTH (1-34) 研究较多, 而 rh-PTH (1-84) 研究较少。本文对国内某生物技术有限公司用基因工程研制开发的 rh-PTH (1-84) 进行了质量研究,

为其生产工艺的进一步优化提供依据。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-2010A 高效液相色谱系统: 包括四元低压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱和双波长紫外检测器, 岛津 Class-VP 化学工作站; 电泳装置、电转仪和 Power PAC 200 稳压稳流电源, 美国 Bio-Rad 公司; GDS-8000 凝胶图像处理系统, UVP 公司; Lambda 35 紫外可见分光光度计, PE 公司; SPECTRA Max 190 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司。

* 通讯作者 Tel: (010) 67095310 E-mail: luping123@stu.edu.cn

rh-PTH (1-84) 制剂由国内某生物技术有限公司提供。丙烯酰胺、 N,N' -亚甲叉丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (SDS)、 N,N,N',N' -四甲基乙二胺 (TEMED) 均购自 Sigma 公司; 过硫酸铵 (APS)、三氟醋酸 (TFA) 购自 Merck 公司; 兔抗人 PTH 抗体购自 Santa Cruz 公司; cAMP 试剂盒购自 R&D 公司。异丁基黄嘌呤 (IBMX) 购自 Sigma 公司; 蛋白相对分子质量标准 Mark12™ Unstained Standard 购自 Invitrogen 公司; 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 纯度

2.1.1 RP-HPLC 法 色谱条件: ZORBAX 300SB - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相 A 为水 - 乙腈 - 三氟乙酸 (95:5:0.1), 流动相 B 为水 - 乙腈 - 三氟乙酸 (5:95:0.1)。梯度洗脱程序: 0 ~ 40 min, 流动相 A 的浓度 100% ~ 0%, 流动相 B 的浓度 0% ~ 100%。流速: 0.75 mL · min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 柱温: 28 °C; 进样体积: 50 μL; 面积归一化法计算纯度。经分析 rh-PTH (1-84) 的色谱纯度为 81%, 见图 1。

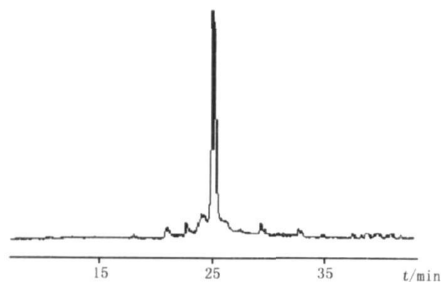


图 1 rh-PTH (1-84) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of the rh-PTH (1-84)

2.1.2 非还原型 SDS-PAGE 法 SDS-PAGE 电泳采用 Tris-Tricine 缓冲系统^[3], 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 4%。样品中加入等体积的 2 倍非还原型上样缓冲溶液, 混匀即得。电泳时, 初始电压 80 V, 保持 30 min, 当样品进入分离胶时, 电压升至 150 V, 保持 1.5 h。电泳后, 用考马斯亮兰染色, 然后脱色至背景清晰, 用凝胶图像处理系统记录结果。经分析 rh-PTH (1-84) 的电泳纯度为 85%, 见图 2。

2.2 相对分子质量 样品中加入等体积的 2 倍还原型上样缓冲溶液, 100 °C 加热 5 min, 冷却后上样。SDS-PAGE 电泳方法同“2.1.2”项下。经软件分析 rh-PTH (1-84) 的相对分子质量为 9480, 见图 3。

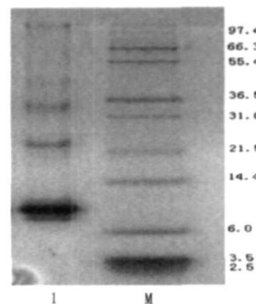


图 2 rh-PTH (1-84) 非还原型 SDS-PAGE 电泳图

Fig 2 Non-reduced SDS-PAGE electrophoresis of the rh-PTH (1-84)

M. 蛋白质相对分子质量标准 (protein marker)

1. rh-PTH (1-84)

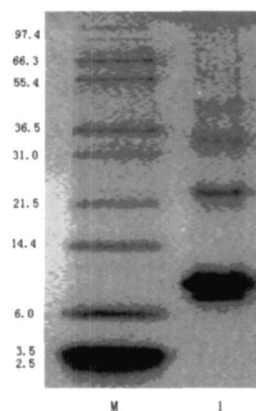


图 3 rh-PTH (1-84) 还原型 SDS-PAGE 电泳图

Fig 3 Reduced SDS-PAGE electrophoresis of the rh-PTH (1-84)

M. 蛋白质相对分子质量标准 (protein marker) 1. rh-PTH (1-84)

2.3 Western blot 鉴定 样品经 SDS-PAGE 电泳, 半干转移法将蛋白条带转移至硝酸纤维素薄膜上。一抗为兔抗人 PTH 抗体, 二抗为 AP-抗兔 IgG, 加入底物进行显色, 呈明显的阳性反应, 见图 4。

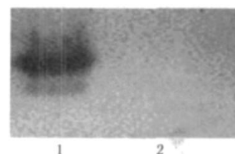


图 4 rh-PTH (1-84) 的 Western blot 鉴定图

Fig 4 Western blot of the rh-PTH (1-84)

1. rh-PTH (1-84) 2. 阴性对照 (negative control)

2.4 N-末端氨基酸序列测定 采用 Edman 降解法测定 rh-PTH 的 N-末端氨基酸序列为 SV-SEIQIMHNLGKHL, 与理论值一致。

2.5 蛋白含量测定 考马斯亮兰法测定 rh-PTH 蛋白含量, 经计算 rh-PTH (1-84) 的蛋白含量为标示量的 87%。

2.6 效价测定 将生长状态良好的 UMR 细胞悬液,用含 10%胎牛血清的培养基稀释至 $1.2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,以 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入到 96孔培养板内,置 CO_2 培养箱于 37°C 培养 24 h。弃去培养基,洗板 1次,再加入培养基 $170 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 。样品分别稀释为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每孔先加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBMX $10 \mu\text{L}$,再加入稀释样品 $20 \mu\text{L}$,每种浓度作 3个平行孔,置 CO_2 培养箱于 37°C 培养 45 min。弃去培养基,以 $200 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸,继续置 CO_2 培养箱于 37°C 培养 30 min。小心吹打细胞,将每种样品的 3个平行孔收到 1个离心管中, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集上清液。按照 R&D cAMP 试剂盒说明进行 cAMP 含量测定。经计算 rh-PTH (1-84) 的效价在标示量的 80%~120%。

3 讨论

3.1 分别考察了考马斯亮兰法 (Bradford 法) 和 Lowry 法测定 rh-PTH (1-84) 蛋白含量。结果发现采用 Lowry 法测定时,样品中赋形剂的干扰很大,使得本底增高,测定结果不稳定。而 Bradford 法干

扰物质少,如干扰 Lowry 法的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} , Tris 缓冲液,糖类,甘油,巯基乙醇, EDTA 等均不干扰 Bradford 测定法,测定效果较好。

3.2 本实验采用了适合分离小分子多肽的 Tricine-SDS-PAGE 电泳。分别考察了分离胶浓度,尿素和甘油对分离效果的影响。本实验采用 15% 分离胶浓度,并在分离胶中加入 36% 尿素或 13% 的甘油,能够提高小分子多肽的分辨率,增加蛋白条带清晰度。

参考文献

- 1 Whitfield JF, Morley P. Small bone-building fragments of PTH: new therapeutic agent for osteoporosis *Trends Pharmacol Sci*, 1995 16 (11): 32
- 2 Fox J Developments in parathyroid hormone and related peptides as bone-formation agents *Curr Opin Pharmacol*, 2002 2(3): 338
- 3 Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa *Anal Biochem*, 1987 166(2): 368

(本文于 2008 年 8 月 14 日收到)

《人类疾病动物模型技术规范研究与应用》出版

由贺争鸣研究员和王钊教授主编的《人类疾病动物模型技术规范研究与应用》一书已由辽宁大学出版社于 2008 年 1 月出版。该书的出版旨在抛开每一种动物模型的特殊性,提炼共性,建立人类疾病动物模型共同描述规范,为科研工作者在创建新的动物模型或选择与使用动物模型过程中提供可行性路线和操作方案。

本书共分九章,23 万字,从常用的实验动物种类选择、动物模型的制作方法和比较医学的意义入手,总结分析了目前我国人类疾病动物模型的建立和使用现状及与国外发达国家的差距,提出了符合我国实际情况的人类疾病动物模型的选择和技术操作规范。从理论上较深入地研究了常用动物模型的选择原则、制作方法、技术规范及比较医学上的意义,提出研究报告,为国家行政管理部门、课题成果鉴定等提供决策参考,也从实践上为动物模型的使用者提供技术指导。

(来自 www.nicpbp.org.cn)