

猪 PDGF 的部分纯化

施产甫 许琳 肖祥华

(海军医专中心实验室, 南京)

提 要

对猪血小板衍生的生长因子 (PDGF) 进行了部分纯化。通过对提取的猪血小板进行冻融裂解、CM-Sephadex C-50 离子交换吸附、Blue-Sepharose 柱层析和羧甲基纤维素 CM-52 柱层析等较简单的纯化步骤将猪 PDGF 提纯到 6250 倍。

人血小板衍生的生长因子 (platelet derived growth factor, 简称 PDGF) 是贮存于血小板 α 颗粒中的一种碱性蛋白质^[1]。PDGF 能刺激停滞于 G_1/G_0 细胞周期的成纤维细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞等多种细胞进入分裂增殖周期。目前认为, PDGF 在伤口愈合、胆固醇与磷脂合成的调节、动脉粥样硬化等多种生理及病理过程中起重要作用。

血凝后人血清中的 PDGF 浓度为 15—20 ng/ml, 含量极微。国外都从过期的血库血或

血小板中提取^[2-4]。亦有从猪血中提取猪 PDGF 的报道^[5,6]。已知人 PDGF 由两种多肽链 A 和 B 组成异二聚体, 而猪 PDGF 则由 B-B 链组成的同二聚体, 但两者具有相似的生理和生化特性。

本文报道用较简单的方法初步提纯猪 PDGF 的结果。

材 料 与 方 法

1. 细胞 本实验所用活性检测细胞为小鼠

别。Aoyagi 等^[9]认为 LcA 与 AFP 相结合的糖基是岩藻糖基化的糖基。换言之, 肝癌时往往伴有岩藻糖基 AFP 的急剧增高。

本文通过各种纯度指标的鉴定以及血凝活力的测定, 研究了用国产兵豆制备的 LcA 的理化特性。在交叉免疫亲和电泳中, 证实此种凝集素对肝癌 AFP 糖基具有较高的亲和性, 是研究 AFP 糖基结构与癌变关系的一种有效工具。

本文承江苏省植物研究所副研究员方文哲鉴定豆种; 南京大学现代分析中心分析金属含量; 江苏省理化检测中心分析氨基酸组成均此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Breborowicz, A. et al.: *Scand. J. Immunol.*, 1981,

14, 15.

[2] Howard, I. K., Sage, H. J.: *Biochemistry*, 1969, 8, 2426.

[3] Tichá, M., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 221, 282.

[4] Toyoshima, S., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 221, 514.

[5] Fliegerová, A., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 351, 416.

[6] Dubois, M., et al.: *Anal. chem.*, 1956, 28, 350.

[7] Børg-Hansen, T. C.: *Anal. Biochem.*, 1973, 56, 480.

[8] Howard I. K., et al.: *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 1950.

[9] Aoyagi, Y., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 830, 217.

[本文于 1988 年 7 月 30 日收到]

成纤维细胞 L929 株,由南京中医学院王建陵老师惠赠。培养基组成: 含 10% 小牛血清的 MEM 和 199 混合培养基 (1:1V/V), L-谷氨酰胺 4mmol/L, pH7.2—7.4, 加卡那霉素、青霉素、链霉素抑菌 (浓度分别为 250U、200U、200U)。培养于 37℃, 含 5% CO₂ 的培养箱中, 每 2—3 天传代一次。以 0.25% 胰蛋白酶加 0.2% EDTA 为消化液, Hank's 平衡盐液为洗涤液。

2. 活性检测 将 L929 细胞接种于 40 孔平底克隆板 ($\phi 6 \times 10\text{mm}$, 容量 250 微升), 每孔接种约 5 万个细胞/100 微升含 10% 血清的培养基。培养 8 小时后倒去培养基, 用 Hank's 液洗涤两次, 然后换用不含血清的空白培养基继续培养 24 小时, 使细胞终止于 G₁/G₀ 期。样品用含 1% 牛白蛋白之 1mmol/L 乙酸稀释后加入, 5 微升/孔。随后加入用空白培养基稀释的 ³H-胸腺嘧啶核苷 (上海原子核研究所, 1mCi/毫升) 1 μ Ci/5 微升/孔。继续培养 16 小时后中止培养。倾去培养基, 用 Hank's 液洗涤两次后, 用棉签卷出细胞。棉签依次用 10% 三氯乙酸、95% 乙醇洗涤, 干燥后放入含 5 毫升液闪烁液的小瓶中, 在 FJ-2101 型液体闪烁计数仪上计数测定^[7]。液闪烁液组成: PPO 4g, POPOP 0.1g, 甲苯 1000 毫升。本文以加入 1% 小牛血清所致之 ³H-胸苷掺入值为 1 活性单位。细胞收获率在 95% 以上, 数据误差值为 10—15%。

3. 制备血小板裂解液 新鲜猪血 25000 毫升, 加 3000 毫升 ACD 液 (枸橼酸钠 1.33g, 枸橼酸 0.47g, 葡萄糖 3.0g, 加水至 100 毫升, pH5.03) 抗凝后取回, 800 × g 离心 8 分钟除去血细胞后, 用 1600 × g, 15 分钟沉下血小板。血小板用洗液 (1/10ACD + 0.15mol/L NaCl, pH6.5) 洗两次, 2500 × g, 20 分钟。将血小板溶于 150 毫升 TN₁ 液 (0.01mol/L Tris · HCl, pH8.0, 0.09mol/L NaCl) 中, 反复冻融五次, 1600 × g, 4℃, 1 小时离心分离出上清液。沉淀加 50 毫升 1mol/L NaCl, 10℃ 搅拌 8 小时, 离心提洗三次。合并上清, 加 0.01mol/L Tris ·

HCl, pH8.0 1500 毫升稀释。

4. 阳离子交换剂吸附 CM-Sephadex C-50 (Pharmacia) 100g, 预用 TN₁ 液平衡, 倒入血小板裂解液中, 10℃ 间断搅拌吸附 8 小时。分离出凝胶, 用 TN₁ 液淋洗至洗出液基本不含蛋白质。用 TN₂ 液 (0.01mol/L Tris · HCl, pH8.0, 1mol/L NaCl) 1 升洗脱。用同法对血小板裂解液再搅拌吸附一次, 合并洗脱液。

5. 热处理 将上一步洗脱液置沸水浴中 15 分钟, 离心 16000 × g, 4℃, 1 小时除去变性蛋白质。上清液用分子量截留值为 5000 之超滤膜浓缩。

6. 蓝色琼脂糖柱层析 将超滤浓缩液加样于 TN₂ 液平衡之 Blue-Sepharose 4B (Pharmacia 产品) 柱上 (1 × 14cm), 15 毫升/小时, 用 TN₂ 液 150 毫升淋洗柱子, 后用 50 毫升含 50% 乙二醇之 TN₂ 液洗脱。洗脱液对 1mol/L 乙酸透析后, 用 PEG 6000 浓缩。

7. 羧甲基纤维素 CM-52 柱层析 CM-52 柱 (2.6 × 49cm, Whatman 产品) 预用 1mol/L 乙酸平衡。上样后, 用 300 毫升含 1mol/L 乙酸之 0—1mol/L 乙酸铵溶液进行梯度洗脱, 4 毫升/6 分钟/管。

8. 其它方法 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmli 法进行^[8]。电泳胶上蛋白的洗脱处理及活性测定据 Antoniadou 的方法进行^[9]。蛋白质含量测定用双缩脲法或紫外吸收法。实验用玻璃器材预先用硅烷化处理以减少蛋白质的吸附损失。所用其它试剂均为分析纯级。

结果与讨论

新鲜猪血用 ACD 液抗凝后从肉联厂取回, 立即用分级分离法提洗出血小板。血小板经反复冻融裂解后, 用阳离子交换树脂 CM-Sephadex C-50 于 pH8.0 进行吸附, 虽然得率较低, 但除去了 98% 左右的杂蛋白, 纯化倍数较高。由于 PDGF 分子对热稳定, 所以经沸水浴 15 分钟后, 剔除了样品中的热不稳定蛋白

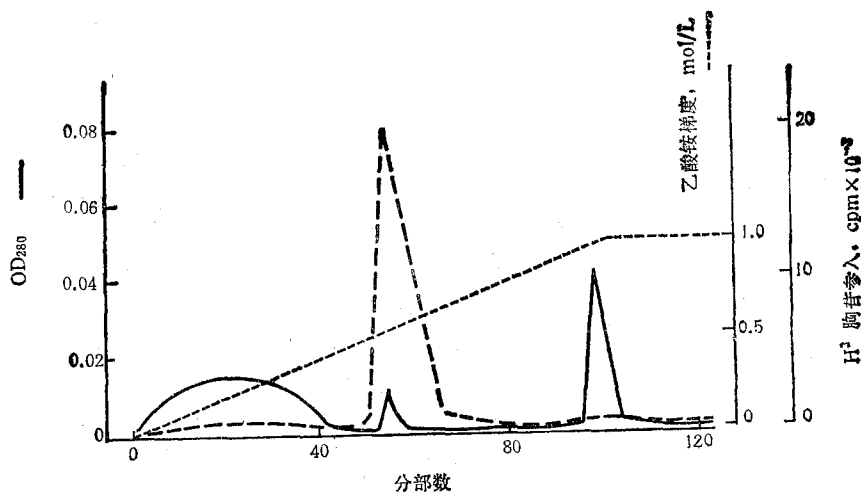


图1 羧甲基纤维素 CM-52 柱层析图谱

样品(4.16毫升)加于预用 1mol/L 乙酸平衡的 CM-52 柱后,用含 0—1mol/L 乙酸铵的 1mol/L 乙酸缓冲液共 300 毫升作连续梯度洗脱,分部收集 4 毫升/6 分钟/管。PDGF 活性峰位于 0.5—0.6mol/L 乙酸铵浓度洗脱区域。

表1 猪 PDGF 的纯化效果

纯化步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	PDGF (U)	比活 (U/mg)	收率	纯化 倍数
血小板裂解液	1950	17800	35000	2	100	1
CM-Sephadex C-50	2795	195	10800	55	31	27
热处理 (100°C, 15min)	200	13.6	5600	412	16	241
Blue-Sephrose	11	1.02	3050	3088	9	1544
Sephrose CM-52	4.16	0.14	1750	12500	5	6250

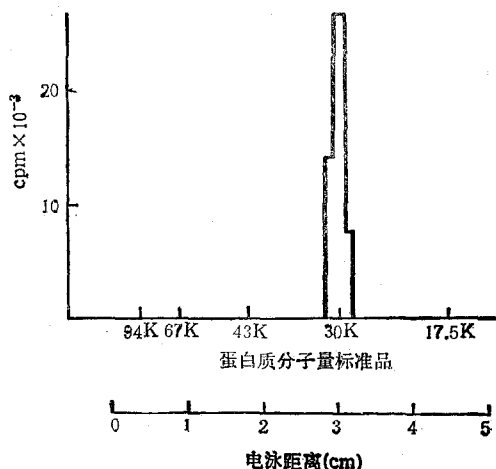


图2 未还原 PDGF 经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后的活性测定图

CM-52 柱的洗脱活性峰于电泳后按 Antoniades 所述的方法^[9]经分切、洗脱后作 PDGF 活性测定。与含 PDGF 活性电泳相对应蛋白质的分子量约为 3 万道尔顿。分子量标准为东风生化试剂厂产品。

纤维素 CM-52 在同样的溶剂条件下进行常压层析提纯猪 PDGF 的可能性。由图 1 可见, CM-52 柱的分离能力虽然逊色于高效液相离子交换色谱,但也达到了较理想的分离和纯化效果,使不具备相应精密设备的实验室也可开展类似的工作。

CM-52 柱的洗脱活性峰经透析浓缩后,用 12% SDS-PAGE 进行纯度分析。因样品蛋白
(下转第 404 页)

质,也使血清中存在的对热不稳定的有丝分裂原(约占血清中促细胞分裂活性的 50%^[1])得以除去。表 1 为各提纯步骤对猪 PDGF 的纯化效果和得率概况。

根据离子交换层析理论,使用阳离子交换纤维素如 CM (羧甲基)类,其缓冲液的 pH 应高于 CM 的 pK 值(3.6),如接近或低于此值,则 CM 的负电荷被中和,因而不能有效的吸附蛋白质。最近有报道指出^[10],使用 Bio-Sil TSK CM-2-SW 阳离子交换柱,以 1mol/L 乙酸加 0—1mol/L 乙酸铵进行高效液相梯度洗脱 (pH2.4—4.8),可使高度碱性的蛋白质得到良好的分离。为此,我们尝试用弱碱性的羧甲基

超速离心分离血清脂蛋白简易法

孙雅贤 魏丽君 曹 军

王庭桂

(河北省医学科学院实验医学研究所 石家庄) (白求恩国际和平医院实验科 石家庄)

本方法介绍在没有 Abbe 折光仪调血清密度情况下,根据 $d = \frac{m}{V}$ 公式 (d = 密度, m = 质量, V = 体积)摸索出用称量法以溴化钾调血清密度,即在试管里加一定体积血清,然后由少至多逐步加 KBr,每加完一次搅匀,用微量加样器吸一定体积经 KBr 调过密度的血清于称量杯中,在万分之一天平上称量,直到算出 $d = 1.30$,以此时加的 KBr 总量换算出需超速离心的血清应加 KBr 量。调好密度的血清加到 12.5ml 离心管底部,每管 3ml,上层铺加生理盐水 ($d = 1.006$, 内含 0.05% EDTA),用 SCP 85H 固定角头,68000 转/分 4℃ 离心 5 小时即可分离出脂蛋白,效果良好。

离心结束后可见离心管中液体明显分为七层;乳白色上层液是乳糜微粒及极低密度脂蛋白 (VLDL),第三层及第五层血清为低密度脂蛋白 (LDL) 与高密度脂蛋白 (HDL),最低层为脱脂混杂血清,第二、四、六、层为透明生理盐水。

用免疫电泳^[1],免疫双扩散^[2],及聚丙烯酰胺凝胶电泳^[3]对所分离的 LDL, HDL 等进行了纯度鉴定,

表明脂蛋白分离效果甚佳,与 Lindgren^[4] 等报道结果一致。本方法超速时间短,操作简单,为设备不很齐全的单位研究脂蛋白的结构、功能、代谢及探讨动脉粥样硬化发病机理提供了简便易行的方法。

鉴定所用兔抗人全血清及兔抗人 LDL 血清为自制^[5],兔抗人 HDL 载脂蛋白 A 血清由中日友好医院提供。

参 考 文 献

- [1] Grabar, P.: *Methods of Biochemical Analysis*, Glick (ed), Interscience Publisher Inc., N. Y. 1959, 1.
- [2] 北京医学院微生物教研组:《免疫化学》,下册,1979.
- [3] Davis, B. J.: *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 404.
- [4] Shen, M. S. et al.: *Circulation*, 1978, 58 (suppl), 2, 142.
- [5] 孙雅贤等:《生物化学与生物物理进展》,1988,15(1), 59.

[本文于 1988 年 5 月 4 日收到]

(上接第 395 页)

质含量太低,不能形成单一的区带。遂将凝胶条分切、洗脱后复作 PDGF 活性测定(图 2),可见与活性区带相应的蛋白质分子量约为 30000 道尔顿,与文献报道值一致^[5,6]。另外,如将样品在电泳前的预处理中加入还原剂巯基乙醇,将蛋白质中的二硫键打开,则电泳条上相应区域中的 PDGF 活性即消失。这也与 PDGF 分子对还原剂敏感的生化特性相吻合。从耐热性,分子量大小和对还原剂敏感这三个参数可以得出结论,样品虽未能达到电泳纯的目标,但确为猪 PDGF。

本实验以较少和较简单的提取步骤,对猪 PDGF 达到了较高的纯化效果。国内对生长因子的研究工作起步较晚,提取出足够纯度的各种生长因子,则是工作的第一步。探索出适合

于国内条件的提纯工艺,将会推动我们对生长因子的生物学作用进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Ross, R. et al.: *Cell*, 1986, 46, 155.
- [2] Antoniadis, H. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 2635.
- [3] Heldin, C-H. et al.: *Biochem. J.*, 1981, 193, 907.
- [4] Raines, E. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 5154.
- [5] Poggi, A. et al.: *Exp. Cell Res.*, 1984, 150, 463.
- [6] Stroobant, P. et al.: *EMBO. J.*, 1984, 3, 2963.
- [7] Gospodarowicz, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, 3736.
- [8] Laemmli, U. K.: *Nature*, 1970, 227, 680.
- [9] Antoniadis, H. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 7314.
- [10] Van Den Eunden van Raau, A. J. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 1987, 163, 263.

[本文于 1988 年 7 月 26 日收到]