

Academy of Sciences, Beijing 100093, China); Hiroshi Kadokura, Koji Yoda, Makari Yamasaki (Department of Biotechnology, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan).

Abstract A procedure was used to obtain peptide fragments for sequence analysis from proteins separated by gel electrophoresis. After separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), proteins were briefly stained with Coomassie blue, interested protein-containing bands were cut and loaded onto the wells of a new SDS-PAGE gel. The protein was digested by protease V8 during electrophoresis,

the resulting peptide fragments were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane, and then sequenced with protein sequencer. The method can be used not only to obtain amino acid sequences from N-terminal blocked proteins, but also to produce multiple and independent amino acid sequence information from normal proteins.

Key words limited proteolytic cleavage, N-terminal blocked proteins, SDS-PAGE, electroblotting, peptide fragment, amino acid sequences

重组组织型纤溶酶原激活剂的纯化和鉴定

吴本传 陈昭烈 刘 红 叶建新

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 介绍一种简便高效的两步纯化重组组织型纤溶酶原激活剂 (rt-PA) 的方法, 产 rt-PA 的 CHO 工程细胞 SGG 培养上清, 经微孔玻璃珠 (MPG) 吸附和赖氨酸-Sepharose 4B 柱亲和吸附色谱纯化, 纯化倍数平均达到 380 倍, 比活性为 390 000 U/mg 蛋白, rt-PA 活性回收率达到 140%, 经 SDS-PAGE 还原电泳分析主要为 t-PA 蛋白, 其中高分子 t-PA 占 80% 左右. 用纤维蛋白自显影法检测均有溶纤活性, 蛋白质印迹证实具有 t-PA 的抗原性.

关键词 组织型纤溶酶原激活剂, 微孔玻璃珠, 赖氨酸-Sepharose 4B

目前临床使用的溶血栓药物一类为非特异的如链激酶、尿激酶等, 另一类为特异性的如 t-PA 等. 前一类对纤维蛋白结合的纤溶酶原和循环系统中的纤溶酶原都有活化作用, 因而在临床使用时常有出血现象, 而后一类选择性作用于血栓部位的纤维蛋白, 很少有这样的副作用, 而且体内溶血栓效果也比前者的好^[1]. 因此, 自 80 年代初开始 rt-PA 的研究工作以来, rt-PA 的研究工作进展很快, 并有 rt-PA 产品进入临床应用. 在已报道的 t-PA 纯化文献中多采用抗 t-PA 抗体亲和色谱、离子交换

色谱和凝胶色谱^[2,3]. 我们采用国产 MPG 和赖氨酸-Sepharose 4B 两步亲和和色谱法纯化 rt-PA, 获得了较为满意的效果.

1 材料与方法

1.1 材料

CHO 工程细胞 SGG 由本所三室构建, 培养基采用 DMEM: F12 (1: 1), 培养基中加入 1% 小牛血清, SGG 细胞持续表达 rt-PA 分泌在细胞培养上清中, 每天收集培养上清作为粗

制 t-PA; MPG 购于浙江硅土研究所 (孔径 180~200 目), 使用前用去离子水漂洗, 可多次重复使用; 赖氨酸和精氨酸购于 GIBCO 公司; Sepharose 4B 购于 Pharmacia 公司; t-PA 标准品购于 NBSB (国际生物标准控制研究所); 人血纤维蛋白原 (F) 和人凝血酶 (T) 购于卫生部生物制品检定所; 标准蛋白分子质量为上海生物化学研究所生产; 抗 t-PA 抗体为本所三室制备; 赖氨酸-Sepharose 4B 柱自制; 其他常用试剂均为国产分析纯。

1.2 MPG 吸附色谱

收集的细胞培养上清用 0.8 μ m 滤膜过滤, 将过滤上清上 MPG 柱, MPG 量根据上清量现装, 按 100~120 ml 上清装 1 g MPG, 流速根据柱床体积定, (5 cm $\times$ 20 cm 柱为 1500 ml/h), 洗脱液分别为 (I) 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液含 0.01% Tween80 (以下均含 0.01% Tween80), (II) 0.3 mol/L Tris-HCl 和 (III) 0.5 mol/L NaCl 加 10% 乙二醇, 收集各洗脱峰。

1.3 赖氨酸-Sepharose 4B 柱层析

柱的制备参考文献 [3, 4], 用溴化氰活化 Sepharose 4B 珠后再与赖氨酸偶联制备成亲和柱。由 MPG 柱洗下的活性峰部分除盐后上预先用磷酸缓冲液平衡过的赖氨酸-Sepharose 4B 柱, 分别用磷酸缓冲液和 0.5 mol/L NaCl 洗去杂蛋白, 再用 0.5 mol/L 精氨酸含 0.5 mol/L NaCl 洗脱 t-PA 活性峰。所有步骤均在 4 $^{\circ}$ C 下操作。

1.4 t-PA 活性测定

参考韩素文等^[5]介绍的溶圈法。每块琼脂板含 (F) 10 mg 和 (T) 5 U/ml 各孔分别加入 10 μ l 不同稀释度样品和 10 μ l t-PA 标准品, 放入湿饭盒中, 37 $^{\circ}$ C 16~20 h 测量溶解圈直径, 用 t-PA 标准校正样品活性为国际单位。

1.5 蛋白质浓度测定

参考文献 Lowry 改良法^[6], 用牛血清白蛋白 (BSA) 为参照蛋白, 在波长 650 nm 测

吸光度 (A), 按直线回归计算蛋白浓度。

1.6 t-PA 的纯度分析

按 Laemmli 方法^[7]作蛋白 SDS-PAGE, 浓缩胶和分离胶分别为 4% 和 10%, 胶厚度 1 mm, 以考马斯亮蓝和铬银染色^[8], 并对染色带进行扫描。

1.7 t-PA 鉴定

蛋白印迹参考文献 [4], 采用本院生产的 SDT-1 型半干燥转移仪, 将 SDS-PAGE 胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 再作蛋白印迹染色。纤维蛋白自显影参考文献 [9], rt-PA 样品作 SDS-PAGE 后, 用 Triton X-100 浸泡电泳胶 1~2 h, 铺上纤维蛋白琼脂板, 放入 37 $^{\circ}$ C 湿盒, 随时观察溶纤带。

2 结果

2.1 两步法纯化效果

SGG 细胞培养上清经过 MPG 柱后, 绝大部分 rt-PA 吸附于 MPG 上, 在穿过峰中只有 5% 左右的 t-PA 活性。吸附于 MPG 柱上 rt-PA 经洗脱后, 集中在 E₃ 洗脱液组分, rt-PA 的活性回收常在 100% 以上, 体积浓缩 100 倍左右, 有利于下一步的纯化。用赖氨酸-Sepharose 4B 亲和层析进一步纯化经 MPG 部分纯化的 rt-PA, 在穿过峰中测不出 t-PA 的活性, 在 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液和 0.5 mol/L NaCl 洗脱液洗脱杂蛋白时约有 15% 的 t-PA 活性, rt-PA 主要集中在 E₃ 洗脱液中。rt-PA 的活性回收率在 85% 以上。

经 MPG 吸附层析和赖氨酸-Sepharose 4B 亲和层析两步纯化可以把细胞培养上清中的 rt-PA 纯化 380 倍, 比活性提高到 390 000 IU/mg 蛋白, 总活性回收率 140% 左右 (表 1)。rt-PA 活性为 800 000 IU/ml, 蛋白浓度达到 2 g/L, 用 SDS-PAGE 结合铬银染色扫描分析纯化的 rt-PA 样品, rt-PA 蛋白达到 95% 以上, 其中分子质量为 65 ku 单链 rt-PA 占 80% 左右, 分子质量约为 33 ku 和 34 ku 的双链 rt-PA 占 17% 左右 (图 1、2)。

表 1 重组组织型纤溶酶原激活剂纯化结果

方法	体积/ml	总活性/U	比活性/U·mg ⁻¹	纯化倍数	回收率/%
上清液	59 500	80 870 000	1012		
MPG	538	131 447 600	43 091	42	163
赖氨酸	247	116 315 774	394 029	389	143

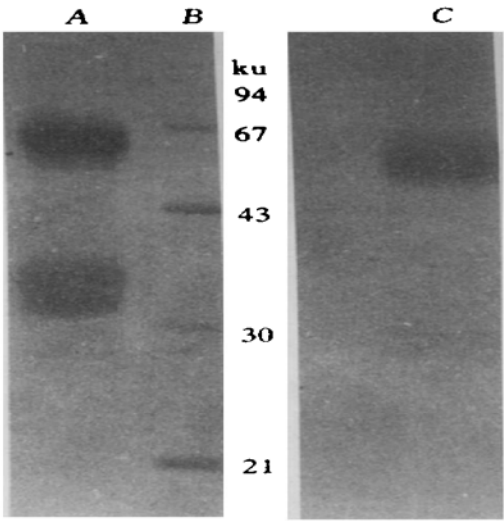


图 1 纯化后的 rt-PA 的 SDS PAGE
A：还原；B：标准分子量；C：非还原。

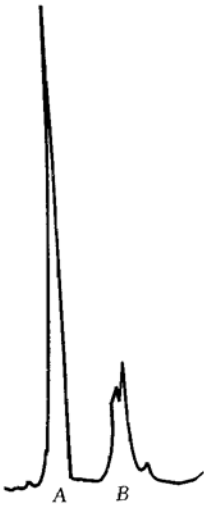


图 2 还原 rt-PA 的
SDS PAGE 扫描
A：高分子占 81%；
B：低分子占 17%。

2.2 t-PA 溶纤性质分析

PA 只在含有纤溶酶原的纤维蛋白板上形成溶解圈，用纤维蛋白自显影法证实纯化的 t-PA 在琼脂板上有二条溶纤活性带，与天然

PA 溶纤活性一致。（图 3）



图 3 纯化后的 rt-PA 纤维蛋白
自显影
A：单链；B：双链。

2.3 t-PA 的抗原性分析

标准 t-PA 和纯化 t-PA 样品均能被 t-PA 抗体中和，而不能被 UK 抗体中和。（图 4）蛋白印迹也证实所纯化的 t-PA 具有 t-PA 的抗原性。（图 5）

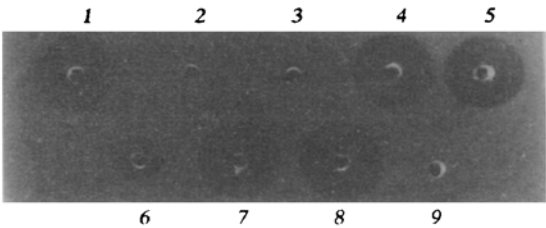


图 4 纯化后的 rt-PA 中和实验
1：标准 t-PA；2：标准 t-PA + t-PA 抗体；3：样品 + t-PA 抗体；4：样品；5：UK + t-PA 抗体；6：标准 UK；7：标准 t-PA + UK 抗体；8：样 4 品 + UK 抗体；9：标准 UK + UK 抗体。

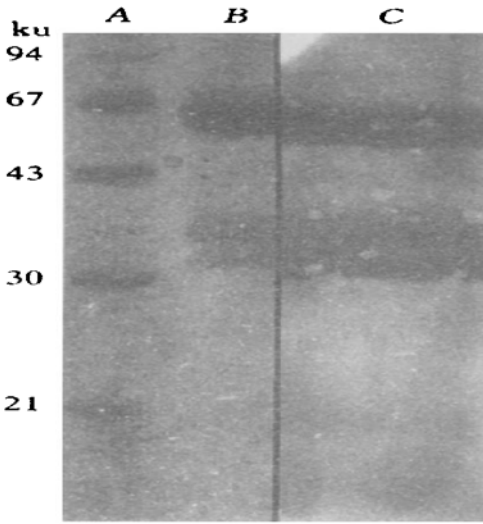


图 5 纯化后的 t-PA 的蛋白质印迹分析

A: 分子质量标准; B: SDS-PAGE;

C: 蛋白质印迹分析.

3 讨 论

有关 t-PA 的纯化方法也有很多, 较常用的有单克隆抗体亲和色谱、离子交换色谱或专一性基团凝胶亲和色谱等, 这些方法在纯化有血清培养上清时多为三步以上组合, 操作繁琐, 配基稳定性差, 回收率低. 我们用 MPG 吸附色谱与赖氨酸亲和色谱两步纯化法组合不但弥补了上述不足, 而且这套纯化方案还具有流速快、结合量大、浓缩倍数高、重复性好、设备材料简单易得和两步之间无需专门处理的特点, 比较适合 rt-PA 的大量制备. 我们采用这套纯化方案纯化了 CHO 工程细胞 SGG 分泌的 rt-PA, 获得了较为满意的效果, 最终纯化蛋白经高效液相分析, 基本为单一吸收峰 (未显示). 在 rt-PA 的纯化中, 第一步的活性回收率常常超过 100%, 这可能是由于我们在培养细胞时加入的血清中含有 PA 抑制因子, 抑制了粗制 t-PA 中 t-PA 活性, 经过纯化, 除去 t-PA 抑制剂, 使活性提高. t-PA 属丝氨酸蛋白水解酶类, 它是由 527 个氨基酸组成的单链分子, 其中 Arg275 与 Ile276 之间的肽链水解后形成两条肽链, 肽链之间由二硫键相连

接^[10, 11], 在 t-PA 的纯化中, 由于理化因素的影响, 有可能使单链 t-PA 水解成双链 t-PA. 由 CHO 工程细胞 SGG 表达的 t-PA 经还原电泳分析, 除有一条 65 ku 的 t-PA 单链外, 还在 33~ 35 ku 之间有两条不同分子质量的蛋白带, 与文献一致. 并用自显影法和蛋白质印迹证实以上蛋白带均有溶纤活性和 t-PA 的抗原性.

参 考 文 献

- 1 Matsuo O. Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus. *Nature*, 1981, **291** (5816): 590~ 591
- 2 Bos R. One step purification of tissue type plasminogen activator using affinity chromatography with a special monoclonal antibody under mild conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1117** (2): 188~ 192
- 3 Dodd I. Large scale, rapid purification of recombinant tissue type plasminogen activator. *Federation of European Biochemical Societies*, 1986, **209** (1): 13~ 17
- 4 李成文. 现代免疫化学技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 36~ 39 和 83~ 86
- 5 韩素文. 培养细胞分泌的血纤维蛋白溶酶原激活物的研究. *军事医学科学院院刊*, 1987, **11** (2): 101~ 108
- 6 HarTree E F. Determination of protein. *Anal Biochem*, 1972, **48**: 422~ 427
- 7 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (5259): 680~ 685
- 8 张向明. 铬银染色法在 ng 量蛋白 PAGE 检测中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 1983, (3): 63~ 64
- 9 刘士辉. SDS-PAGE 纤维蛋白自显影法检测不同分子量的纤溶酶原激活剂. *生物技术通讯*, 1994, **5** (3): 141 ~ 142
- 10 Van De Werf F. Coronary thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology. *Circulation*, 1984, **69** (3): 605~ 610
- 11 Pohl G. Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry*, 1984, **23** (16): 3701~ 3707

Purification and Identification of Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator. WU Benchuan, CHEN Zhaolie, LIU Hong, YE

Jianxin (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*).

Abstract A simple and efficient method for the purification of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) from a genetically manipulated CHO cell line (SGG) has been developed. The conditioned medium containing about 1500 U/ml of rt-PA from cultures of SGG cell in DMEM: F12 (1: 1) supplemented with 1% NBS was purified by a combination of absorbtion chromatography on MPG and affinity chromatography on Lysine-Sepharose 4B. The final prod-

uct has a specific activity of 390 000 U/mg protein. The overall activity recovery was about 140% with 380 fold increase in specific activity. Analysis by SDS-PAGE in the presence of a reducing agent followed by silver staining showed one band with mass of molecular about 65 000 and two bands of 33 000 ~ 35 000. Reverse fibrin autography and Western blotting analysis showed that the product has natural t-PA characterization.

Key words recombinant tissue-type plasminogen activator, MPG, lysine-sepharose 4B

微型离心柱法快速分离纯化神经节苷脂

王江雁 张卫宁¹⁾ 王仁杰 许玉茹 王梦寅¹⁾

(解放军石家庄医学高等专科学校生化教研室, 石家庄 050081)

摘要 神经节苷脂的分离与纯化是研究组织细胞 Gls 组成、含量及代谢的基本手段。但是以往的方法周期长、溶剂用量大, 为此建立了一种新的微型离心柱快速分离 Gls 纯化法, 标准 Gls 的回收率为 97.64%, $n=7$, $CV<3\%$, HPTLC 图谱显示无拖带现象。纯化样品只需十几个小时, 操作简单, 溶剂用量小, 重复性好, 为微量样品组分的研究提供了一个有效的手段。

关键词 微型离心柱, 分离, 纯化, 神经节苷脂

神经节苷脂 (ganglioside, Gls) 是一类含有唾液酸的酸性鞘糖脂, 广布于脊椎动物细胞膜的外侧面, 是细胞膜的重要组成部分之一, 具有多种生物学功能, 已经引起人们的极大兴趣。神经节苷脂的分离与纯化是研究组织细胞 Gls 组成、含量及代谢的基本手段。1976 年, Cham 等^[1]建立了一种用异丙醚/正丁醇提取脂类的方法。Ladisch 等^[2,3]用异丙醚-正丁醇-50 mmol/L NaCl 水溶液分配法及 Sephadex G-50 凝胶过柱法提纯了 Gls。最近, 潘颖等^[4]报道采用离心液相色谱法快速分离纯化 Gls。但这些方法周期长, 溶剂用量大。在此基础上, 我们建立了一种新的微型离心柱快速分离 Gls

纯化法, 其特点是操作简单、溶剂用量小、省时、重复性好。

1 材 料

新鲜 Wistar 大鼠脑, Sephadex G-25 (Pharmacia 产品), 高效薄层层析板 Silica gel 60 (青岛海洋化工厂), 标准 N-乙酰神经氨酸 (Sigma 产品), 标准神经节苷脂 GM₁、GD₃、GD_{1a}、GD_{1b}、GT_{1b}, 薄层层析纯 (Fluka 产品), 系加拿大 MNI 生化实验室馈赠, CS-9000 薄层扫描仪 (岛津公司), UV-265FW 紫外分光

¹⁾解放军白求恩国际和平医院神经外科, 石家庄 050082.

收稿日期: 1996-02-08, 修回日期: 1996-07-17