

## 技术与方法

## 鼠粒细胞集落刺激因子受体的纯化及鉴定\*

陈惠鹏 范国才 付 炜<sup>1)</sup> 陈吉中 蒋中华 张 强

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** 粒细胞集落刺激因子受体 (G-CSFR) 在鼠 NFS-60 细胞中有较高的含量, 通过对 NFS-60 细胞的大规模培养, 用 CHAPS 及超速离心抽提 G-CSFR, 经 G-CSF 亲和层析纯化获得 G-CSFR, 采用 ABC-ELISA 进行鉴定。

**关键词** NFS-60 细胞, 粒细胞集落刺激因子受体, G-CSF 亲和层析, ABC-ELISA

**学科分类号** Q51

粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, 简称 G-CSF) 是调节粒系造血的生长因子, 临床上主要用来治疗肿瘤放、化疗等原因引起的中性粒细胞减少症。其生物学作用是通过其受体 (G-CSF receptor, 简称 G-CSFR) 的介导完成的<sup>[1]</sup>。因此纯化获取 G-CSFR, 对于研究 G-CSFR 的结构与功能, 信号转导, 以及建立以 G-CSFR 为靶标, 从天然药物或肽库中筛选具有调节粒系造血活性的药物是一项有重要意义的工作。

G-CSFR 是分子质量为 100~130 ku 的糖蛋白, 其同型二聚体能以高亲和性与 G-CSF 结合, 将 G-CSF 引发的信号转导进细胞内。在依赖 G-CSF 生长的鼠髓白血病细胞系 NFS-60 表面 G-CSFR 的含量达每个细胞 2 000 个分子, 而其他细胞系中每个细胞仅含 30~800 个分子<sup>[2]</sup>。通过对 NFS-60 细胞的较大规模培养, 采用 CHAPS 及超速离心抽提 G-CSFR, 进一步用 G-CSF-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化获得 G-CSFR, 最后用 G-CSF ABC-ELISA 方法进行鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1** NFS-60 细胞, 由卫生部药品生物制品鉴定所惠赠, 重组人 G-CSF, 由本单位自行制备。

**1.1.2** 试剂: CHAPS, PMSF, EDC (碳二亚胺), DAE (1, 6-己二胺) 和 BNHS (生物素酰丁二酰亚胺酯) 均为 Sigma 产品; CNBr 活化 Sepharose 4B 为 Pharmacia 产品; Avidin-HRP 购自华美公司; OPD 为上海五联化工厂产品。

其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1** NFS-60 细胞的大规模培养: 15 ml 含 NFS-60 ( $2 \times 10^6$  个/ml) 的细胞培养液 (含 9% 小牛血清, 1% 马血清和 20 mg/L G-CSF 的 RPMI-1640) 转移至 225 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 加入 50 ml 培养液, 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 36~48 h, 培养期间保持 pH 6.8~7.3, 5% CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> 浓度为  $6.2 \times 10^{-6}$ ~ $6.7 \times 10^{-6}$ , 培养至细胞含量为  $2 \times 10^6$  个/ml, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞, -80℃ 冻存。每批用 32 个培养瓶计培养 2 000 ml, 共培养四批计 8 000 ml 培养液, 收细胞  $1.4 \times 10^{10}$  个。

**1.2.2** G-CSF 配基亲和层析柱的制备<sup>[3]</sup>:

a. 连接手臂 1, 6-己二胺: 0.25 g DAH 溶于少量 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4) 中, 加至用 0.001 mol/L HCl 处理好的 1 g CNBr 活化的 Sepharose 4B 中, 4℃ 搅拌反应 5~6 h, 然后用下列溶液分别洗涤, 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4), 1 mol/L NaCl 和 H<sub>2</sub>O。

b. 配基 G-CSF 的偶联: 15 ml G-CSF 溶液 (0.8 g/L) 用醋酸调 pH=4.5~6.0, 加至上述凝胶中, 摇匀; 加溶于少量 H<sub>2</sub>O 的 0.3 g EDC, 室温温和反应 24 h。吸去上清, 向凝胶加 10 ml 醋酸, 室温再搅拌 2 h。然后分别用 0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mol/L HAc 和 H<sub>2</sub>O 洗涤凝胶, 保存于 PBS 中待用。

**1.2.3** G-CSFR 的纯化

a. 细胞破碎: 向冻结的细胞 ( $1.4 \times 10^{10}$ ) 加

\* 国家自然科学基金资助项目 (39700183)。

<sup>1)</sup> 吉林大学生物系 97 届毕业生。

收稿日期: 1997-09-03, 修回日期: 1998-01-15

入 40 ml 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.2 (0.01% PMSF), 解冻, 用玻璃匀浆器匀浆破碎细胞.

b.G-CSF 的抽提: 匀浆液中加入等体积含 0.5 mol/L 蔗糖, 0.1 mol/L KCl, 0.01 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.002 mol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.01% PMSF 的 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.2 缓冲液, 摇匀, 低温 2 500 r/min 离心 10 min, 收集上清; 进一步于 160 000 g 超速离心 90 min, 收集沉淀, 悬浮于 8 ml 含 0.1 mol/L 蔗糖, 0.15 mol/L NaCl 和 0.01% PMSF 的 0.010 mol/L Tris-HCl pH 7.2 溶液中, 加入 0.2 ml 的 0.32 mol/L CHAPS, 4℃ 搅拌 2 h 后, 160 000 g 超速离心 60 min, 收集上清即为含 G-CSFR 的抽提液, 4℃ 保存.

c.G-CSFR 的亲层析纯化: G-CSFR 的亲层析柱 (1 cm×4.5 cm), 用 100 ml 含 0.15 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.2 溶液平衡柱, 将 G-CSFR 的抽提液上柱, 再用平衡液洗至基线, 分别用下述三种溶液依次洗脱 (a) 含 0.2 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS 和 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L Gly-HCl pH 3.3; (b) 含 0.2 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS 和 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L Gly-HCl pH 2.0; (c) 含 0.008 mol/L CHAPS 和 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L 柠檬酸钠 pH 2.0. 洗脱蛋白峰收集后立即用 2 mol/L Tris 溶液调 pH 至 7.0, 然后 4℃ 保存.

1.2.4 生物素标记 G-CSF: 对 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 透析后的 G-CSF 6 ml (0.5 g/L) 加入 60 μl 溶于二甲基甲酰胺的 BNHS (10 g/L), 室温反应 5 h, 4℃ 对 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 透析 24 h.

1.2.5 ABC-ELISA 方法鉴定 G-CSFR<sup>[4]</sup>. 包被: Sepharose 4B 亲和层析柱洗脱下来的蛋白峰用 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9.6) 溶液稀释 10 倍后, 每孔加 50 μl, 4℃ 包被过夜. 封闭: PBST (0.01 mol/L PBS, 0.5% Tween-20, pH 7.4) 洗板后, 用含 0.5% BSA 的 PBS 37℃ 封闭 1 h. 加生物素 (Biotin) -G-CSF: 除空白和阴性孔之外, 各孔加 Biotin-G-CSF, 浓度为依次倍比稀释, 37℃ 反应 1 h. 显色: 洗板后, 依说明书将亲和素 (Avidin) -HRP 稀释 20 倍, 每孔加 100 μl, 37℃ 保温 30 min, 洗板后, 每孔加 100 μl OPD 显色液, 37℃ 显色 30 min, 每孔加 50 μl 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应; 酶联仪上测 A<sub>492</sub>.

1.2.6 蛋白质浓度测定: 采用双缩脲印 Folin-酚

法测定, 以 BSA 为标准蛋白.

2 结 果

2.1 G-CSFR 的纯化

制备 G-CSF-Sepharose 4B 亲和层析凝胶时, G-CSF 的偶联率为 68.7%, 每毫升湿凝胶含 2.35 mg 的 G-CSF.

1.4 × 10<sup>10</sup> 个 NFS-60 细胞, 经匀浆破碎, CHAPS 抽提, 超速离心和 G-CSF Sepharose 4B 亲和层析纯化获得 G-CSFR, 各纯化步骤的蛋白质回收率如表 1 所示. 用 G-CSF Sepharose 4B 亲和层析纯化 G-CSFR 时, 先将超速离心纯化后的 G-CSFR CHAPS 抽提液上柱 (1.0 cm×3.5 cm), 用平衡液洗至基线后, 用含 0.2 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L Gly-HCl pH 3.3 溶液洗脱的蛋白峰合并为峰 A, 用含 0.2 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L Gly-HCl pH 2.0 溶液洗脱的蛋白峰合并记为峰 B. 最后用含 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的柠檬酸缓冲液 pH 2.0 洗脱的峰记为峰 C. 洗脱图谱见图 1, 用 ABC-ELISA 进一步对各峰进行鉴定.

| 表 1 G-CSFR 各纯化步骤的蛋白质回收率 |                     |          |
|-------------------------|---------------------|----------|
| 纯化步骤                    | 蛋白量/mg              | 蛋白质回收率/% |
| 细胞破碎上清                  | 180                 | 100      |
| CHAPS 抽提液               | 78                  | 52       |
| G-CSF 亲和层析              | 0.015 <sup>1)</sup> | 0.008    |

<sup>1)</sup>以紫外吸收法测定蛋白质浓度.

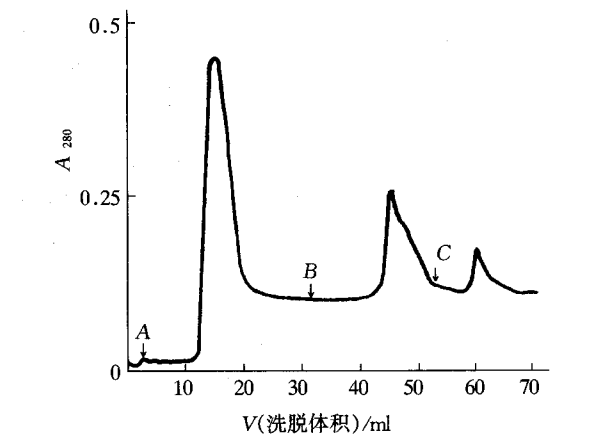


图 1 纯化受体的亲和层析图谱  
流速 10 ml/h, 洗脱液 A: 含 0.2 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L Gly-HCl, pH 3.3; 洗脱液 B: 含 0.2 mol/L NaCl, 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的 0.1 mol/L Gly-HCl, pH 2.0; 洗脱液 C: 含 0.008 mol/L CHAPS, 0.01% PMSF 的柠檬酸缓冲液, pH 2.0.

## 2.2 G-CSFR 的鉴定

用生物素标记 G-CSF, 采用 ABC-ELISA 方法对 G-CSFR 进行鉴定, 分别取亲和层析柱洗脱峰 A 和 B, 用 pH 9.6, 0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  稀释 10 倍后包被. 加 Biotin-G-CSF 的量及酶联测定结果见图 2. 结果表明 G-CSFR 与 G-CSF 的结合显示良好的剂量相关, 从 NFS-60 细胞纯化获得可以供药物筛选用的 G-CSFR.

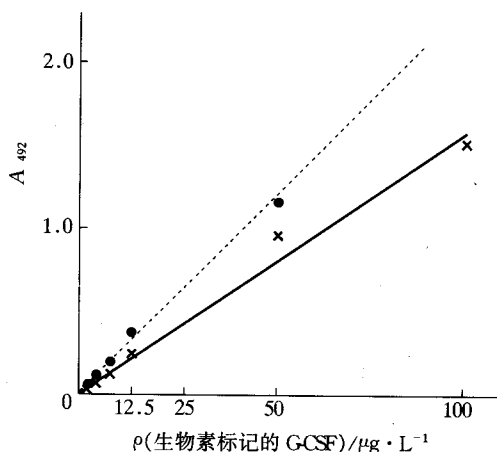


图 2 ABC-ELISA 方法鉴定受体的剂量相关曲线  
×——×: A 峰, ●——●: B 峰.

## 3 讨 论

本研究中建立了从鼠 NFS-60 细胞中纯化膜蛋白 G-CSFR 的方法, 并采用 Biotin 标记 G-CSF, 建立分析鉴定 G-CSFR 的 ABC-ELISA 方法. 由于每个 NFS-60 细胞仅含 2 000 个 G-CSFR 分子, 从理论上讲 8 000 ml 细胞培养液即  $1.4 \times 10^{10}$  个 NFS-60 细胞中, 仅含有 6  $\mu\text{g}$  的 G-CSFR. 因此纯化和鉴定难度较大, 我们采取较温和的方法, 以 CHAPS 为受体提取去污剂及超速离心技术从细胞膜中提取 G-CSFR; 以 G-CSF 亲和层析柱一步高效率地回收 G-CSFR. 由于其含量极低, 建立灵敏度高的 ABC-ELISA 方法分析鉴定 G-CSFR. 本文所建立的纯化方法较文献[2]报道的简单. 尽管由于 G-CSFR

的含量较低, 最后未对其纯度进行评价, 但是其纯度及活性可以满足建立以 G-CSFR 为靶标, 从天然药物或肽库中筛选具有调节粒系造血活性药物的要求, 为药物筛选工作的开展提供了保证.

## 参 考 文 献

- 1 Nagata S, Fukunaga R. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Progress in Growth Factor Research*, 1991, 3 (1): 131~141
- 2 Fukunaga R, *et al.* Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem*, 1990, 265 (23): 14008~14012
- 3 Hjelmeland L H. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1980, 77 (11): 6368~6370
- 4 陈惠鹏, 孙志贤, 张 强 (Chen H P, Sun Z X, Zhang Q). 神经元特异性烯醇化酶 ABC-ELISA 方法的建立和应用. *中国免疫学杂志 (Chinese Journal of Immunology)*, 1991, 7 (2): 100~103

**Purification and Identification of the Receptor of Murine Granulocyte Colony-Stimulating Factor.**  
CHEN Hui-Peng, FAN Guo-Cai, FU Wei, CHEN Ji-Zhong, JIANG Zhong-Hua, ZHANG Qiang  
(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China).

**Abstract** A receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has been found on the cell surface of mouse myeloid leukemia cell line NFS-60. By large scale culture of NFS-60, The receptor in the membrane fraction of NFS-60 cells were solubilized in an active form with CHAPS, The receptor was obtained by centrifugation at 150 000 g for 90 min, The solubilized receptor was purified nearly to homogeneity by a G-CSF affinity gel. The purified receptor has been identified with the method of ABC-ELISA.

**Key words** NFS-60, granulocyte colony-stimulating factor receptor, affinity gel, ABC-ELISA