

- [3] 胡兆庆等:《微生物学报》1978年,第18期,第239页。
- [4] Ikehara, M. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1019, 1969.
- [5] Anthony, E. E.: *Tritum and Its Compounds*, 2d, ed, Lond. 310, 1974.
- [6] 江善根等《生物化学与生物物理进展》1979年,第5期,第69页。

- [7] Koerner, J. F.: *Ann. Rev. Biochem.*, 29, 291, 1970.
- [8] Hurlbert, R. B. et al.: *Methods in Enzymology*, 12A, 193, 1967.
- [9] Rushitzky, G. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 217, 1962.

[本文于1981年6月8日收到]

人脐带透明质酸的简易制备法

张兆伟 邢蕊凝 樊绘曾

(天津市药物研究所)

一、引言

酸性粘多糖系存于结缔组织中的一类有特殊功能的胞外生物大分子^[1]。其中,透明质酸的组成、结构、聚合状态、体内合成与代谢皆有别于其他酸性粘多糖^[2]。组织中透明质酸质与量的改变与某些疾患(如动脉、关节、视网膜病变)发生有关。近年以透明质酸作为人工玻璃体已用于眼科临床^[3]。国内未见生产,而成品进口价格昂贵。因此寻找简便的制备方法,以满足国内生物医学基础研究和临床应用至为迫切。

生化分析表明,透明质酸在牛眼玻璃体、关节滑液和人脐带中含量较高^[2],其中人脐带是国际上供较大量制备的主要材料。国外从人脐带提纯透明质酸方法,手续冗长费时,需消耗大量试剂。我们则综合国外方法,去繁就简,设计了一种简易提取分离法。

二、方法与结果

1. 材料 实验所用人脐带系天津产院供给。新鲜脐带水份93.5%、采集后去血块及其他杂质,冷藏备用。

供制备用试剂 氯代十六烷基吡啶(E. Merck);助滤剂 Celite 545 (BHD 分装),胃蛋白酶(1:3000 上海产),胰蛋白酶(1:250 新疆伊

犁产)。

供分析用标准品 硫酸软骨素 A,为天津第三生化药厂提供(葡萄糖醛酸含量为30%),肝素为天津第二生化药厂提供(生物效价150 IU/mg)。

2. 制备方法 将新鲜人脐带绞碎后加入等量水,用组织捣碎机制成匀浆。加入0.5%甲苯做为防腐剂,在50℃保温自溶12小时。自溶液明显稀薄,此时调整pH至2.0,并加入胃蛋白酶(胃蛋白酶:脐带=2.5%),酶解2小时,组织块大部分液化。再调整pH至8.6,加入胰蛋白酶(胰蛋白酶:脐带=0.2%)酶解8小时后完全液化,仅存极少残渣。真空抽滤以助滤剂545,滤得澄明液体。将此溶液以水稀释一倍。在搅拌条件下加入氯代十六烷基吡啶(氯代十六烷基吡啶:脐带=1.5%),此时溶液出现絮状沉淀。真空抽滤,将分离得到的沉淀物以0.4 M 氯化钠溶液在恒温30℃搅拌条件下解离2小时。抽滤后之清液加入二倍量乙醇,冷处过夜。再以4000 R. P. M 离心分离。获透明质酸粗品。

将粗透明质酸制成0.5%水溶液。边搅拌、边缓缓加入二倍量乙醇,随后加入0.1%醋酸钠立即呈现大量而均匀沉淀。经放置后,离心收集沉淀。沉淀先后用乙醇和丙酮在组织捣碎机内粉碎脱水。再以五氧化二磷真空干燥后即为

透明质酸成品(钠盐)。

本实验使用 1.4 公斤新鲜人脐带得粗透明质酸 4.3 克。以 4 克粗透明质酸进行精制得纯品 3.7 克。

3. 分析结果 本品为白色无定形粉末。无臭、无味,有吸湿性,溶于水,为高粘稠液体,在 0.38 M 氯化钠溶液中测定特性粘度 $[\eta]^{30}$ 为 1010 ml/g, 比旋度 $[\alpha]_D^{19}$ 为 -65° 。

(1) 红外吸收光谱 以溴化钾,压片在 Perkin Elmer 577 型红外分光光度计扫描 4000—400 cm^{-1} 吸收光谱。3400 cm^{-1} , 1660—1620 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} 处有吸收带,证明多糖的羟基,乙酰胺基及羧酸基结构,与透明质酸重复单位中的乙酰氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸一致。1240 cm^{-1} , 850 cm^{-1} , 820 cm^{-1} 处皆无吸收,表明本品不含可能混杂的硫酸粘多糖,硫酸软骨素 c 和硫酸皮素。成品红外光谱和文献^[7]完全一致(见图 1)。

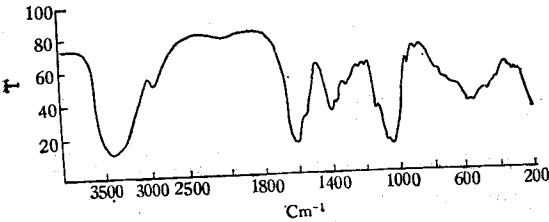


图 1

(2) 醋酸纤维素薄膜电泳: 以硫酸软骨素 A、肝素做参比。采用醋酸吡啶缓冲液,醋酸钙缓冲液,巴比妥缓冲液。以阿尔新兰染色,测量相对迁移率。

样品 \ 系统	醋酸吡啶缓冲液	醋酸钙缓冲液	巴比妥缓冲液
肝 素	1.02	1.05	1
硫酸软骨素 A	1	1	1
透明质酸	0.58	0.73	0.65

电泳后均呈清晰集中单一区带。其顺序与文献^[8,9]报道一致。

(3) 糖基鉴别 本品盐酸水解液 Elson-

Morgan 反应阳性^[10], 证明含氨基己糖, 而以 Ludowieg 法^[11]测定比值与对照氨基葡萄糖相一致。

本品与 84.5% 硫酸反应后表明, 在 299 nm 处呈最大吸收峰。对硫酸呋唑法呈阳性反应, 表明含己糖醛酸。采用呋唑法, 地衣酚法求 C/O 值为 1.03 与葡萄糖醛酸一致。

(4) 糖基定量 以氨基葡萄糖做标准, 测定氨基葡萄糖含量为 37%。

以葡萄糖醛酸做标准, 葡萄糖醛酸含量为 47%。

(5) 硫酸基检查 本品不含硫酸基。

(6) 总氮测定与 260 nm 检查: 以杜马氏定氮法测定, 总氮量为 3.56% (理论值为 3.48%)。本品 1 mg/ml 溶液在 258 nm 和 237 nm 呈最大吸收和最小吸收。260/280 近似值为 1.7。

三、讨 论

分布于结缔组织中的透明质酸, 通过与蛋白质和其他粘多糖分子的相互作用, 构成组织中主要大分子成份。这一点对于制定提取路线和选择方法十分重要。Jeanloz 采用胃蛋白酶和胰蛋白酶, Roden 用木瓜蛋白酶降解脐带组织与多糖结合的蛋白质, 以释出多糖链^[4,6]。而 Danishefsky 直接用盐水抽提透明质酸不仅工艺冗长并且提取后之残渣用酶法仍可获透明质酸^[5]。由此提示, 以蛋白酶处理, 对简化操作, 提高得率十分有利。本文设计的方法在酶解部分仅用十小时完成。较之 Jeanloz Roden 法时间明显缩短。

为避免酶解生成的蛋白质片段混杂于成品中, Jeanloz 以大体积有机溶剂变性, 界面分离的 Sevag 法除去残留蛋白质^[4]。此法耗费溶剂、使多糖丢失。而 Roden, Danishefsky 等所用季铵盐分级技术^[18]比较适用。透明质酸分子链中游离羧基密度远较蛋白质高, 且蛋白质已降解。所以透明质酸与季铵盐复合物解离的临界盐浓度高。相反, 透明质酸和与其共存的硫酸粘多糖相比, 因后者除羧基外还含有等量的硫

酸基,因此透明质酸与季铵盐形成的复合物的解离临界盐浓度,比硫酸粘多糖的低。据此,我们控制提取过程的氯化钠浓度在 0.18 M 左右。后加入季铵盐沉淀酸性多糖,然后用 0.4 M 氯化钠解离透明质酸,此时硫酸粘多糖仍以季铵盐复合物存在。这样我们将 Roden 的分离流程:透析→加盐→复合沉淀→离心→透析→透明质酸沉出,简化为:稀释→复合沉淀→解离析出透明质酸。

本品按葡萄糖醛酸含量计算纯度为 93%,和 Roden 法一致,略高于 Danishefsky 法。计算收率:本法为 0.3%,Roden 法为 0.16—0.23%,Danishefsky 法为 0.2%。成品含氮值比理论值和 Roden 法略高。根据本品水液的紫外吸收图形推测可能是成品中含微量核酸所致,有关此杂质的去除尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Comper, W. D. et al.: *Physiol. Rev.*, **56**, 255, 1978.
- [2] Brimacombe, J. S. et al.: *Mucopolysaccharides*, 43, Elsevier, Amsterdam.
- [3] Kanski, J. J.: *Brit. J. Ophthalmol.*, **59**, 255, 1975.
- [4] Jeanloz, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **186**, 495, 1950.
- [5] Danishefsky, I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 143, 1966.
- [6] Reden, L. et al.: *Methods in Enzymology*, **28**, 73, 1962.
- [7] 川合: ムコ多糖实验法 2-3 化学の领域,增刊 96 号 61, 1972.
- [8] 川合, 同上, 51, 1972.
- [9] Wessler, E.: *Anal. Biochem.*, **26**, 439, 1968.
- [10] Elson, L. A. et al.: *Biochem. J.*, **27**, 1824, 1933.
- [11] Ludowieg, J. et al.: *Anal. Biochem.*, **19**, 80, 1967.

[本文于 1981 年 3 月 11 日收到]

学术动态

欧洲分子生物学研究中心 1982 年学术活动内容

无脊椎动物呼吸蛋白结构与功能 (讨论地点: 美国利兹大学 7 月 19—22 日)

细胞表面及细胞骨架控制系统的功能 (意大利的里亚斯特 4 月 5—7 日)

动物细胞中的 RNA 的形成 (瑞士 Arolla 8 月 28 日—9 月 2 日)

HLA 克隆及 H₂ 主要组织配伍区 (美国牛津 3 月 21—24 日)

原核细胞 DNA 复制 (荷兰 Zuidelijk 5 月 10—15 日)

脑发育的分子机理 (法国 Bicetre 6 月 23—25 日)
膜机理包括突触传递 (意大利米兰 6 月或 9 月间,共五天)

分化与病理过程中间微丝 (西德 Günzburg 4 月 23—26 日)

蛋白、核酸、磷脂的相变与构象变化 (西德 Regensburg 3 月 29 日—4 月 1 日)

线粒体基因表达的调节机理 (意大利普里安 6 月)

发育及再生过程中突触传递 (以色列耶路撒冷 12 月,四天)

β -Lantam 抗体的作用规律 (西班牙马德里 7 月 4—10 日)

脊椎动物生殖腺分化中作用规律 (西德弗赖堡 11 月 5—8 日)

果蝇的分子生物学与发育遗传学 (美国克里特 6 月 20—26 日)

DNA 甲基化 (美国尼塞桥 6 月,四天)

上皮细胞膜极性的组成 (瑞士阿罗拉 8 月 23—27 日)