

盐藻多糖复合物的提取及性质的研究*

赵永芳 谢 志 谢凤祥 徐 宁

(武汉大学生物系 430072)

曾 昭 睿 邱 红 心

(武汉大学化学系 430072)

舒德新 隋丽英 刘丽娟

(轻工部制盐工业科学研究所 300450)

关键词 多糖复合物, 层析, 免疫

盐藻多糖复合物是指从杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 中提取的糖类物质总称。杜氏盐藻是原生质裸露的一种海藻, 它具有繁殖快、生活力强、营养丰富等特点。从成熟盐藻中提取有较好抗癌性质的 β -胡萝卜素后, 剩余的大量藻渣中仍含很多有用的组分, 如多糖复合物、蛋白质、维生素和微量元素等, 其中多糖复合物的提取及性质研究未见报道。

我们将提取 β -胡萝卜素后的藻渣用 0.2% Na_2CO_3 的水溶液 (pH9) 抽提, 收集含多糖类物质的溶液, 经浓缩、有机溶剂沉淀和真空干燥处理, 即可得到疏松的略带微红色的多糖复合物粗品, 其得率为 7% 左右。

取 4% 浓度的粗品多糖复合物溶液 2.5ml 加到 Sepharose 4B 层析柱 (2cm $\times$ 77cm) 上, 用 NaCl 溶液洗脱, 得到一个主峰和两个次峰。主峰含糖量和蛋白质量是相互平行的。即含糖量高的级分含蛋白质量也高。同时取用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 配制的粗品多糖复合物溶液加到 DEAE-Sephadex A-25 层析柱 (2.5cm $\times$ 30cm) 上, NaCl 梯度溶液进行洗脱, 得到两个层析峰。其中与离子交换剂结合率高 (即带阴离子基团较高组分) 的第二个洗脱峰中含的糖量和蛋白质量也是相互平行的。分离后的多糖复合物, 经透析和浓缩处理, 即可得到纯度较高的盐藻多糖复合物。

盐藻多糖复合物粗品溶液与 CTAB (十六

烷基三甲基溴化铵) 和天青 A 染料以及肝素 (一种抗凝血粘多糖物质) 均可反应 (即结合), 但与天青 A 反应的结合率低于肝素。用吡啶法测得糖醛酸含量占粗品多糖复合物的 20% 左右。该粗品经 HCl 水解释放出的硫酸基与 potassium rhodizonate (进口) 试剂反应, 用比色法测得硫酸基含量小于 10%; 用凯氏定氮法测得蛋白质含量占 15% 以上; 经氨基酸自动分析仪测出氨基酸总重占 14.7%, 总数有 16 种 (除脯氨酸和色氨酸未测外)。

活性测定: 以牛血清白蛋白 (BSA) 为对照, 用 BSA 和盐藻多糖复合物分别免疫昆明小白鼠, 经 ELISA 法测定, 盐藻多糖复合物组产生抗体量是对照组的 3.1 倍。采用贴壁吞噬法, 测得多糖复合物的吞噬指数是对照的近 2 倍。这些数据表明, 盐藻多糖复合物具有提高免疫力和增强巨噬细胞的功能。

将纯的盐藻多糖复合物置醋酸纤维素薄膜上电泳、显色, 呈现一个斑点。经琼脂糖电泳后, 有拖尾现象。电泳后的斑点或谱带, 既可用阿尔山兰 (糖的染色剂), 也可用考马斯亮蓝染色。经 DEAE-Sephadex A_2 层析柱洗脱出的主峰最高点的蛋白质消光值 ($A_{280\text{nm}}$) 和糖消光值 ($A_{620\text{nm}}$) 之比为 1.3。它与离子交换剂结合力

* 武汉大学生物系 88 级学生谢亮, 程惠, 霍群, 孙鹰参加了部分试验。

收稿日期: 1992-11-30 修回日期: 1992-12-16

较强,并含较多的硫酸基团。由此初步证明,盐藻多糖复合物是一种酸性蛋白质聚糖。

盐藻多糖复合物经酸水解后,与醋酸酐盐酸羟胺作用生成糖腈乙酸酯衍生物置 OV-

1710 毛细管气相色谱柱中层析,可得到葡萄糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖和阿拉伯糖色谱峰。其中葡萄糖最多,半乳糖和甘露糖次之。

人 SCF 基因 cDNA 克隆及其在 COS7 细胞中的表达*

朱元晓 赖春宁 王建安 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

关键词 SCF,基因,克隆,表达

造血干细胞因子(SCF)是新近发现的一种影响造血干祖细胞生长和发育的细胞生长因子。它在造血系统原发性疾患和继发性损伤治疗方面具有潜在应用价值^[1]。本研究属首次在国内报道人 SCF 基因 cDNA 的克隆和表达。首先参照 F. H. Martin 等人发表的人 SCF 基因 cDNA 序列^[2],设计并合成用于扩增人 SCF 信号肽和膜外活性区域基因 cDNA 的一对引物,即:5' CGGAGATCTCCTTATGAAG-AAGACACAA 3' 和 5' GCATCGATTACTA-GGCTGCAACAGGGGGTAACAT 3' 从培养的人肝细胞株中提取总 RNA,取 1 μ g 总 RNA,以 oligo dT 为引物,在逆转录酶作用下合成 cDNA 第一条链^[3]。将反应产物用 Cetus 公司生产的 PCR 试剂盒进行扩增,引物为上述合成的特异性引物,反应条件和反应步骤按试剂盒说明书进行。反应体积为 100 μ l,引物浓度为 0.5 μ mol/L,反应温度和时间是:94 $^{\circ}$ C 80s, 55 $^{\circ}$ C 80s, 72 $^{\circ}$ C 100s, 共 40 个循环。循环结束后在 72 $^{\circ}$ C 保温 8min,取 5 μ l 扩增物于 2% 琼脂糖胶上检查扩增结果。用 Promega 公司生产的 PCR 产物回收试剂盒回收扩增片段。将扩增片段以平端方式插入 pUC18 质粒的 Sma I 位点,在正向和反向引物的引导下,用 Pharmacia 公司生产的 T₇DNA 测序试剂盒进行插入片段的核酸序列分析。将扩增片段插入穿梭载体 pCSV 的 Bgl II 和 Cla I 位

点,构建成 pCSV-SCF。用 DEAE-Dextran 方法将 pCSV-SCF 转入 COS7 细胞。收集转染后 48h 的培养上清,观察其对体外人骨髓粒-

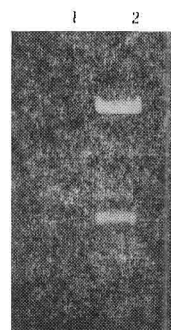


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖胶电泳图

1. PCR 2. PBR322/Hinf I

表 1 PCSV-SCF 转染 COS7 细胞培养上清对骨髓细胞形成克隆的影响¹⁾ n = 3

因子	CFU-GM	BFU-E
1640	0	0
HMCM ²⁾	78.5 $\pm$ 5.5	
HMCM + PCSV	74.6 $\pm$ 4.7	
HMCM + PCSV-SCF	185.5 $\pm$ 4.5	
EPO		23.1 $\pm$ 2.1
EPO + PCSV		20.3 $\pm$ 3.2
EPO + PCSV-SCF		44.0 $\pm$ 2.8

1) 转染细胞上清经 10⁻⁴ 稀释后加 100 μ l 至 1ml 体系中,表中数据为 2 $\times$ 10⁵ 细胞中所含克隆数(克隆数/个)。

2) HMCM: 人肌浸液。

* 本课题为国家 863 青年基金资助项目。

收稿日期: 1992-11-02 修回日期: 1992-12-29