

好, 对于不同的细胞因子, 反应条件基本不变. d. 标记实验中所需同位素及细胞因子数量少, 较节省. 不足之处是需自制实验器材. 标记实验器材规范化可能有助于该方法的推广应用.

**致谢** 北京放射医学研究所汤仲明研究员、刘秀文副研究员在同位素标记及检测中给予了指导和帮助, 特此感谢.

### 参 考 文 献

- 1 Butt W R. The iodination of follicle stimulating and other hormones for radioimmunoassay. *J Endocr*, 1972, **55** (1): 453~ 454
- 2 Tejedor F, Ballesta J P G. Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Analytical Biochemistry*, 1982, **127** (1): 143~ 149
- 3 Calvo J C, Radicella J P, Charreau F H. Measurement of specific radioactivities in labeled hormones by self-displacement analysis. *Biochem J*, 1983, **212** (2): 259~ 264
- 4 李前伟, 谭天秩 (Li Q W, Tan T Z).  $^{125}\text{I}$ -VIP 的制备及其与 SGC7901 人胃腺癌细胞受体体外结合特性研究. *中华核医学杂志 (Chin J Nucl Med)*, 1998, **18** (2): 73~ 76
- 5 安明榜, 吕宝璋 (An M B, Lu B Z). rIL-2 的  $^{125}\text{I}$  标记及淋巴细胞 IL-2 受体的鉴定. *中华核医学杂志 (Chin J Nucl Med)*, 1996, **16** (3): 157~ 158
- 6 Fraser J K, Lin F K, Berridge M V. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. *Blood*, 1988, **71** (1): 104~ 109
- 7 Nicola N, Metcalf D. Binding of the difference inducer, granulocyte colony-stimulating factor, to responsive but not

dependent leukemic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (12): 3765~ 3769

**Establishment of Methods for Two-phase Iodination of Chromine-T and Applying in Cytokine Receptor Studies.** CONG Yu-Wen, CHEN Jia-Pei, SHAO Yuan (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

**Abstract** The routine iodination methods are easy to lead to biological inactivation of cytokines, which is one of reasons for failure of ligand receptor binding assay. By using two-phase iodination of chromine-T, rhG-CSF and rhEPO were iodinated with  $\text{Na}^{125}\text{I}$  and the characteristic of EPO receptor in BET-2 cell and G-CSF receptor in NFS-60 cell were observed by receptor ligand binding assay. It was showed that the radioactivity of  $^{125}\text{I}$ -G-CSF and  $^{125}\text{I}$ -EPO were much higher than that obtained by other methods and it was found that there are high and low affinity EPO receptors in BET-2 cells and one high affinity G-CSF receptor in NFS-60 cells. These results are in accord with literature data. It suggests that the two-phase iodination of chromine-T is an ideal method to iodinate cytokines.

**Key words** cytokines, iodination method, receptor characteristic

## 牛眼透明质酸的分离及性质测定\*

罗 曼 蒋立科

(安徽农业大学生物工程系, 合肥 230036)

奚 俊

(合肥神鹿药业有限公司, 合肥 230036)

**摘要** 研究了牛眼透明质酸 (HA) 的提纯方法, 采用 0.125 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  取代 0.1 mol/L NaCl 溶解粗品, 发现前者溶液中有 2 个组分, 一个组分被十六烷基溴代吡啶 (CBP) 吸附回收, 产物呈纤维状, 另一组分保留在溶液中并能通过分级稀释而被沉淀回收. 产物呈粉末状; 而用 0.1 mol/ml NaCl 溶解粗品, 除了被 CBP 吸附回收外, 保留在溶液中的 HA 不能被回收; 与同类方法相比, 回收率提高 1.7 倍以上. 还分析了产物的性质, 与同类样品比较, 提高了纯度, 降低了提纯中有机溶剂的消耗.

**关键词** 牛眼, 透明质酸, 分级分离, 理化性质, 质量

**学科分类号** Q538

\* 安徽省重点科研项目资助. 收稿日期: 1998-11-09, 修回日期: 1999-03-22

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是由 Meyer 等<sup>[1]</sup>首先从牛眼玻璃体中分离出的, 是一种高粘性物质 (1934 年). 60 余年来, 对透明质酸的分布、化学结构、存在形式、理化特性、生理功能和临床应用进行了广泛的研究, 各种不同来源的透明质酸均统一命名为 HA. 近年来, 从羊眼<sup>[2]</sup>、鸡冠<sup>[3]</sup>、兔皮<sup>[4]</sup>及脐带<sup>[5]</sup>等动物材料中分离出的透明质酸已用于眼科、外科伤口“粘性手术”, 治疗关节炎等方面, 作为保湿因子也广泛应用于化妆品之中. 新的发酵法生产透明质酸<sup>[6]</sup>的技术已出现. 本文报道利用我国牛眼资源工业化制备 HA 的生产流程, 较 Meyer<sup>[1]</sup>、凌沛学等<sup>[7]</sup>的方法简便. 文章还对 HA 的相关理化特性进行了测定.

## 1 材料方法

### 1.1 材料

黄牛眼球; 对照品: HA-Na, 美国 Sigma 产品 (From Human Umbilical Cord); HA-Na, 国家医药局上海医药研究院; 其他试剂: 均为国产.

### 1.2 方法

冷冻牛眼经稍解冻即剥离玻璃体, 对溶冻后的玻璃体离心 (4000 r/min, 10 min), 留上清液, 沉淀物用原材料质量 1/3 的水洗涤 2 次, 与上清液合并, 量取总体积. 加总体积三倍量的丙酮静置过夜, 虹吸上清液, 其沉淀物以 3 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀称重. 离心清液与前虹吸清液合并留存, 待回收有机溶剂.

沉淀物用总重 7~8 倍的 1 mol/L NaCl 溶解, 以上述相同速度离心 10 min, 丢弃沉淀. 将上清液调整 pH 至中性后, 量取 5% 总体积容量的 5% 三氯醋酸加入其中, 静置 10 min. 以 4000 r/min 离心 10 min, 去沉淀, 再对清液调节 pH 至中性后, 以三倍量的 95% 乙醇沉淀, 静置过夜, 然后虹吸清液, 并将清液留待回收乙醇, 其沉淀物经乙醇、丙酮脱水干燥后称重, 即得粗品. 以 7~8 倍含 1% 十六烷基溴代吡啶 (CBP) 的 0.125 mol/L

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶解粗品, 静置 30 min, 过滤, 滤液按照文献 [8] 进行三次分级 (0.087、0.0775、0.03 mol/L) 分离, 即滤液用蒸馏水稀释, 分别收集各段 HA; 过滤后沉淀物用原体积量的 1 mol/L NaCl 解析 30 min, 过滤后在其清液中加入三倍总体积容量的 95% 乙醇, 即得到产物 HA. 用冰冷的 5.0% 三氯醋酸纯化, 再通过 DEAE-Sephadex G-150 柱, 用 0.5、1.25 和 2 mol/L NaCl 洗脱, 其收集液分别用乙醇、丙酮沉淀, 洗涤得高纯度牛眼透明质酸, 即有前峰相对分子质量为  $4 \times 10^5$ , 后峰相对分子质量为  $1.5 \times 10^5$  两种产品.

### 1.2 理化分析

1.2.1 参照 Elson-Morgaw 法测定氨基葡萄糖含量.

1.2.2 参照 Bitter-Muir 吡啶法测定葡萄糖醛酸含量.

1.2.3 参照 Lowry 法测定蛋白质含量.

1.2.4 采用分析超离心法测定分子质量.

1.2.5 采用 Erland Wessler 电泳方法进行纯度鉴定.

1.2.6 紫外吸收光谱: 样品配成 500 mg/L 水溶液, 用 UV-26S 型岛津紫外自动扫描分光光度计, 在波长 300~190 nm 范围扫描.

1.2.7 红外吸收光谱: 仪器, Perkin-Elmer 1730 型红外分光光度计, 分辨率为  $2.4 \text{ m}^{-1}$ , 样品采用溴化钾压片法, 在  $4\,000 \sim 1\,000 \text{ cm}^{-1}$  扫描.

1.2.8 以葡萄糖为标准品, 采用苯酚硫酸法测定 (Dubis M, *et al.* Anal Chem. 1956, 28: 350) 糖含量.

## 2 结果

### 2.1 产品效率

采用了 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶解粗品后再分级分离, 所得粗品得率 3% 左右, 精品率为 1.9% 左右, 与报道一致 (表 1), 但与以 0.1 mol/L NaCl 溶解粗品, 再用相当于三倍溶解液的乙醇沉淀 (表 2) 相比, 其产物纯度高, 沉淀完全, 回收率高, 消耗有机溶剂少. 发现后者仅只获得 CBP 吸附的组分, 溶液中的 HA 组分消失.

表 1 产物回收率

玻璃体质量/g	粗品质量/g	粗品得率/%	精品质量/g	精品占粗品比例/%	精品得率/%
40.6	1.30	3.2	0.78	60.0	1.92
30.5	0.95	3.1	0.58	61.0	1.90
85.9	2.61	3.0	1.64	63.2	1.41
150.6	4.97	3.3	3.05	61.3	2.03

表 2 与 NaCl 溶解粗品所获产物比较

溶解粗品方法	HA 组分	每千克原料提取 HA 精品质量/g	含杂质/%	每千克原料消耗乙醇体积/ml
0.10 mol/L NaCl	1	0.7	0.7% ~ 1.3%	6
0.125 mol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	1.9	< 0.3%	3

2.2 理化分析

2.2.1 产物中含氮物质的紫外分析: 取 Sigma HA (500 mg/L) 与本样品 HA (1 g/L) 在 190 ~ 320 nm 波长范围内扫描 (图 1).

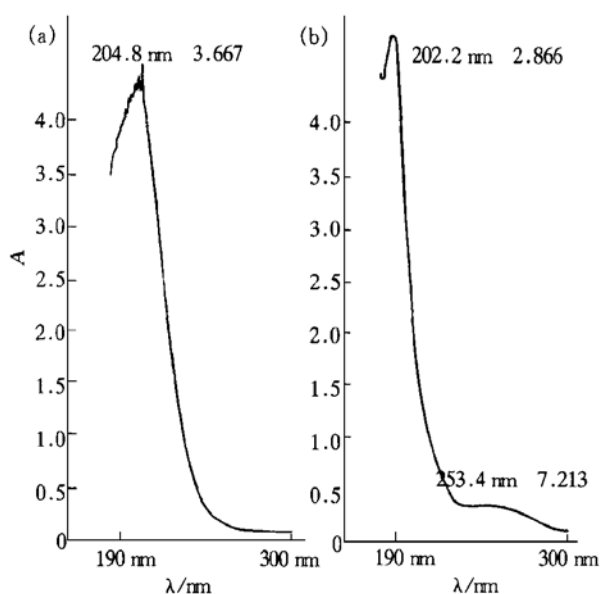


图 1 产物 HA 和进口脐带 HA(美)含氮物质紫外扫描比较 (a) 产物 HA; (b) 进口 HA.

图 1 表明, 与产物样品比较, 进口 HA 在 200 ~ 300 nm 处不仅有较强的多糖吸取峰, 而且在 260 nm、280 nm 附近有一定峰值. 产物 HA 曲线平坦, 说明实验产物几乎无蛋白质和核酸, 而进口样品含少量的蛋白质和核酸.

2.2.2 产物 HA 的典型红外吸收图谱: 本方法实验产物吸收图谱 (图 2) 在 3300 nm 附近有强的 O—H 伸缩振动的特征吸收; 在 2900 nm 附近有一 CH<sub>2</sub> 的伸缩振动, 1620 nm 及 1560 nm 处有 C—O、C—N 的伸缩振动, 表明存在着乙酰氨基结

构; 在 1400 nm 和 1320 nm 有一 O—C 的伸缩振动和 —OH 的弯曲振动偶合产生的两个吸收峰, 表明存在解离羧基结构. 故上述结果提示产品样呈较典型的 HA 红外吸收图谱.

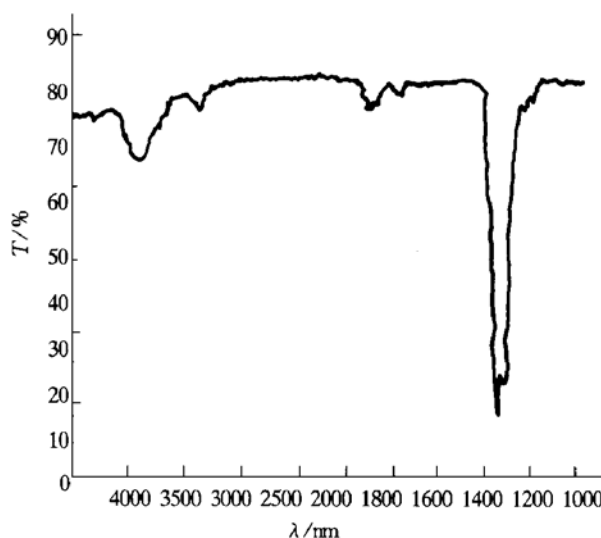


图 2 HA 的典型红外吸收图谱

λ 为波长, T 为透光率.

2.2.3 产物 HA 和进口脐带 HA 的 PAGE 电泳图谱比较: 电泳表明, 以 Sigma 的 HA 及上海产 HA 为参照, 均显示单一区带, 且在同一水平上, 产物样与参照样的迁移率相一致 (图 3), 不含其他的粘性多糖. 区带有拖尾现象, 可能与两性电解质、样品粘度及电泳时间有关.

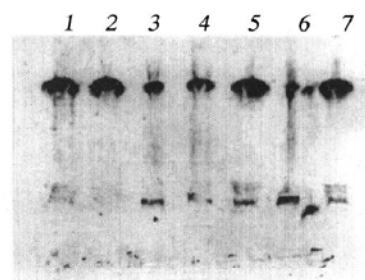


图 3 产物 HA、进口脐带 HA 和鸡冠 HA 的 PAGE 电泳图谱比较

1, 2, 5, 7: 脐带 HA 样品; 4: 上海国家医药工业研究院鸡冠 HA 研究样品; 3, 6: 试验样品.

2.2.4 定量分析: 对产物进行氨基葡萄糖含量、葡萄糖醛酸含量、蛋白质含量、总糖含量进行定量分析, 测定结果见表 3.

表3 产物相关成分测定结果

样品	氨基葡萄糖/ %	葡萄糖醛酸/ %	氨基葡萄糖/ 葡萄糖 醛酸 (mol/ mol)	蛋白质	总糖
产物 HA- I	31.9	33.2	1.05	0.93	61.6
产物 HA- II	30.0	34.8	0.94	1.27	69.6
产物 HA- III	29.1	32.4	0.98	1.15	66.4
标准样品	32.59	36.20	0.99	2.17	

上述结果表明, 所得产物的氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸的含量基本上与理论值相吻合, 两者的摩尔浓度比值在  $1.0 \pm 0.66$ , 亦与理论值一致. 产品的氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸的含量略偏低可能与样品仍有非糖成份有关. 产品总糖含量在 60% ~ 70% 之间, 若需得到更纯样品, 向原总提取液加入总体积 10% 的三氯醋酸 (浓度为 10%), 静置 30 min 过滤, 对清液调 pH 至 7.0, 然后再进行 Sephadex G-150 层析, 以 0.5、1.25 和 2 mol/L NaCl 洗脱, 再经脱盐, 乙醇沉淀, 干燥即可.

### 3 讨论

#### 3.1 分离提纯

**3.1.1** 牛眼透明质酸类似其他来源透明质酸, 有较长线性分子链, 链上等距离分布的葡萄糖醛酸基带有负电荷, 它们相互排斥使分子链呈伸展状态, 具有高粘度. 粘度高低与阳离子呈负相关性, 本提取方法一开始操作即采用 1 mol/L NaCl 高浓度溶液, 使牛眼 HA 从沉淀物中最大限度溶解出来.

**3.1.2** 采用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶解 HA 粗品, 然后用 CBP 吸附 HA, 发现牛眼 HA 2 个组分, 相对分子质量为  $1.5 \times 10^5$  的组分保留在溶解液中, 而相对分子质量为  $4.1 \times 10^5$  的组分被 CBP 吸附, 前者不被 CBP 吸附. 但 NaCl 溶解的粗品溶液中, 小分子质量的 HA 却不因稀释而沉淀, 表明小分子质量的 HA 在低离子强度下的析出与  $\text{SO}_4^{2-}$  相关.

**3.1.3** 牛眼 HA 类似其他多糖物质 (如肝素、软骨素等), 在低离子强度时不溶解, 本分离方法中, 结合牛眼 HA 可分成不同相对分子质量 ( $1.5 \times 10^5$  和  $4 \times 10^5$ ) 组分, 在 CBP 吸附沉淀去杂质时, 将 CBP 溶于 0.125 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液, 相当于 0.25 mol/L NaCl 的阳离子强度, 然后逐级稀释, 最后对其沉淀物用乙醇、丙酮脱水.

**3.1.4** 采用乙醇沉淀牛眼透明质酸, 亦是分离粘多糖的经典方法, 适合于肝素、软骨素等大规模工业化生产的工序. 结合乙醇沉淀粘多糖时需盐的存

在, 特别是二价金属离子, 故对逐级稀释获得的产品脱水时, 不但不设计过多的金属离子强度等级, 而且只采用溶解度较大的 NaCl 和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 使其与溶于钠盐的核酸类物质分离开来, 提高样品的纯度, 减少乙醇消耗, 降低生产成本.

#### 3.2 理化分析

**3.2.1** 测定氨基葡萄糖时, 所用的乙醇必须经过处理, 如果含有少量乙醛, 将对显色剂对-二氨基甲醛显色有影响. 由于与分子上 N-乙酰氨基葡萄糖连接的葡萄糖醛酸糖苷键对酸水解稳定, 在进行样品处理时, 若酸度偏低易造成 HA 水解不完全, 酸度过高, 则造成氨基葡萄糖部分破坏. 反复实验表明选用 6 mol/L HCl 作为水解 HA, 时间以 2 h 最宜.

**3.2.2** 由于 HA 具有直接与硫酸反应的生色原, 在测定葡萄糖醛酸时, 使用 Bitter 和 Muir 建立的改良咪唑法特异性高, 样品无需水解, HA 生色原与咪唑显色, 干扰较少. 关键在于硫酸钠纯度, 若有金属离子或其他氧化剂存在时, 易使显色异常产生误差.

**3.2.3** 测定粘多糖类化合物中总糖时, 以确定所分离样的纯度, 作标准曲线应采用相类似的粘性多糖作标准样品参照, 若无标准样品, 则选用葡萄糖, 但核算时需乘以校正系数 0.9, 才可达相同效果.

#### 3.3 提高牛眼 HA 回收率

目前 HA 来源广泛, 鉴于多糖类物质无抗原性, 通过化学修饰或生物学加工可以通用, 但从眼睛玻璃体来的 HA 更适用于临床用药, 无论是分子大小、均一性、流变性、渗透性、粘滞性、吸收性均具较好的性能, 有着自身的优越性, 尽管眼 HA 提取率较低<sup>[9]</sup>, 但作为一种特殊医药品种, 提高资源利用率仍有开发价值. 关键是缩短操作步骤, 控制提取过程中的 pH 值, 及防止来自机械力的剪切作用, 降低有机溶剂消耗量, 提高回收率.

## 参 考 文 献

- 1 Meyer K, Palmer J W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*, 1934, **107**: 629~ 633
- 2 凌沛学, 张天民 (Ling P X, Zhang T M). 羊眼玻璃体透明质酸钠的制备与分析. *山东医科大学学报 (Acta of Shandong Medical University)*, 1986, **24** (3): 50~ 57
- 3 沈渤江, 张天民, 张子纲 (Shen B J, Zhang T M, Zhang Z G). 鸡冠透明质酸的制备及理化性质. *医药工业 (Pharceutical Industry)*, 1987, (7): 295~ 299
- 4 李良涛, 由永金, 卢盛华. 生化制药学. 北京: 中国医药科技出版社, (Li L T, You Y J, Lu S H. *Biochemistrical Pharceutic*. Beijing: Pharceutic Science and Technology Press), 1991. 286
- 5 沈渤江, 张天民 (Shen B J, Zhang T M). 人脐带眼科透明质酸的制备和分析检验. *山东医学院学报 (Acta of Shandong Medical College)*, 1985, **23** (4): 15~ 19
- 6 郭子平, 王春喜, 崔大鹏 (Guo Z P, Wang C X, Cui D P). 发酵法制备透明质酸. *日用化学工业 (J Chem Indus Everyday Use)*, 1994, (2): 47~ 49
- 7 凌沛学, 张天民, 张子纲 (Ling P X, Zhang T M, Zhang Z G). 牛眼玻璃体透明质酸的研究及应用. *医药工业 (Pharceutical Industry)*, 1987, (7): 295~ 299
- 8 罗 曼 (Luo M). 牛眼透明质酸分级制备. *天然产物研究与开发 (Natur Prud Resear Devel)*, 1998, **10** (2): 86~ 89
- 9 郭学平 (Guo X P). 透明质酸及其发酵生产概述. *中国生物药物杂志 (Chin J Biochem Pharmaceutics)*, 1998, **19** (4): 209~ 211

**A Study on the Separation and Character of Hyaluronic Acid from Ox Eyes.** LUO Man, JIANG Li Ke (*Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China*); XI Jun (*Hefei Shenlu Medicines-limited Company, Hefei 230036, China*).

**Abstract** A method for purifying HA from ox eyes was studied. Using 0.125 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> other than 0.1 mol/L NaCl to dissolve the semifinished product, Two HA forms in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'s solution were found. One in staple could be absorbed by CBP, and the other in powder could be returned by fractional dilution afterwards. In 0.1 mol/L NaCl solution, HA could only be recovered by CBP absorption. It displayed staple. The recoverable rate of the method was 1.7 times than others. The physical and chemical characters of the product were analysed. It was proved that higher purity recovery and lower cost than other methods were gained.

**Key words** ox eye, hyaluronic acid, fractionation physical and chemical character, quality

## 改进的反向 PCR 技术克隆转移基因的旁侧序列\*

李竹红 刘德培<sup>1)</sup> 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)  
中国协和医科大学基础医学院

**摘要** 对传统的反向 PCR 技术作了一些改进: 用巢式 PCR 扩增含量极少的靶序列; PCR 反应体系中加入 5% 的甲酰胺以减少非特异性扩增. 结果表明, 改进的反向 PCR 体系是克隆人基因组已知片段旁侧序列的高度灵敏、高度特异的方法.

**关键词** 反向 PCR, 旁侧序列, 克隆

**学科分类号** Q78

反向 PCR 技术可以对一个已知序列 DNA 的两侧未知序列进行扩增和研究, 又称染色体缓移 (chromosome walking). 其程序是: 选择已知序列内部没有切点的限制性内切酶对此段 DNA 进行酶切, 然后在 DNA 连接酶作用下自连形成环状 DNA 分子. 设计合适方向并与已知序列两端互补的引物, 以连接成环的 DNA 为模板, 经 PCR 扩增后, 可以得到已知序列的旁侧 DNA 片段<sup>[1]</sup>. 此方法常用于检测病毒、转座子等在基因组中的整合位点,

建立基因组步移文库及研究基因的上游调控元件, 在分子生物学研究中有广泛应用.

用反向 PCR 技术克隆质粒及细菌基因组的旁侧序列较为简单, 因为靶序列在质粒、细菌基因组中丰度较高, 易扩增. 但当用反向 PCR 克隆人及其他哺乳动物细胞基因组已知序列的旁侧片段时,

\* 国家“863”计划 (BH-03-02-02) 资助课题.

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-10-23, 修回日期: 1999-01-08