

经验交流

浓缩蛋白聚糖方法的比较

丛祥凤 张英珊

(中国医学科学院心血管病研究所生化研究室, 北京)

蛋白聚糖 (PG) 单体是一个或多个氨基葡萄糖 (GAG) 链以共价键连接在核心蛋白上的复杂生物大分子, 在体内 PG 单体又是以非共价键与 HA (透明质酸) 结合为聚合体。PG 是动脉壁细胞间质的重要成分之一。它与胶原、弹性蛋白和细胞结合而将间质中的各个成份连结在一起, 对维持动脉壁结构的完整性、通透性有非常重要的作用。由于它与动脉粥样硬化病变形成有密切关系, 而日益受到重视。在 PG 的提取、分离过程中, 浓缩是必经步骤。国外报道常用 95% 乙醇沉淀法及冻干法^[1-3]。但不同浓缩方法对 PG 生物学性质的影响尚未引起重视。本室在研究人主动脉 PG 与外源 HA 再聚集作用中, 比较了浓缩 PG 的三种方法。发现 95% 乙醇沉淀法能改变 PG 的再聚集性能。

一、材料与方法

Sephadex G-200, Sepharose CL-2B (Pharmacia)

透明质酸 (人脐带, Sigma), 95% 乙醇 (北京化工厂, AR)

1. PG 样品的制备^[4]

用离子交换及凝胶过滤柱层析法从人主动脉 (内膜 + 中膜) 分离提纯 CS-PG (硫酸软骨素 PG) 及 DS-CS-PG (硫酸皮肤素-硫酸软骨素 PG)。

2. 浓缩方法

(1) 95% 乙醇沉淀法 将 CS-PG 及 DS-CS-PG 样品液, 分别置试管内, 在冰浴中边搅边滴加冷的 95% 乙醇 (样品: 95% 乙醇 = 1:3, V/V), 置冰浴中 1 小时, 离心 (3000r/min, 4℃, 30 分钟)。弃上清, 沉淀呈乳白色, 待残存的乙醇蒸发后, 呈透明粘稠状。

(2) 冻干法 将样品置透析袋中, 在搅拌下对预冷的蒸馏水透析 (4℃), 待透析外液的电导接近蒸馏水时, 将样品倾入试管内, -30℃ 冻成斜面, 然后冷冻干燥。

(3) Sephadex G-200 浓缩法 将样品置透析袋中, 放搪瓷盒内, 在透析袋表面撒 Sephadex G-200 干胶, 盖好, 置 4℃。待 Sephadex G-200 充分吸水后, 将

其去掉, 再重新撒 Sephadex G-200, 直到浓缩至所需体积。对 0.5mol/L NaAc 液 (pH5.8) 透析。

3. PG 自身及与 HA 的再聚集作用^[5]

将上述 (1), (2) 法浓缩得到的 PG 分别溶于 0.5 mol/L NaAc 液 (pH5.8) 中。将三种方法浓缩的 PG 溶液各分为二等份, 一份与外源 HA 混合, PG 与 HA 的重量比为 100:1.5 (按醛酸计算), 另一份不加 HA 做对照。两部分样品均置室温 (18℃ ± 2), 12 小时后用 Sepharose CL-2B 柱 (1.0 × 98cm) 分析, 用 0.5mol/L NaAc 液 (pH5.8) 洗脱, 部分收集, 测各管醛酸及 OD_{280nm}。

二、结果及讨论

CS-PG、DS-CS-PG 自身及与 HA 形成的聚合体大分子均在 Sepharose CL-2B 柱排阻位置洗脱。未聚集部分的 K_d 分别为 0.25—0.34 及 0.48—0.64。用 95% 乙醇浓缩的 PG 自身及其与 HA 形成的聚合体的百分数与另外两种浓缩方法的结果不同 (图 1, 2 及表 1, DS-CS-PG 的相应洗脱图谱类似, 故略)。

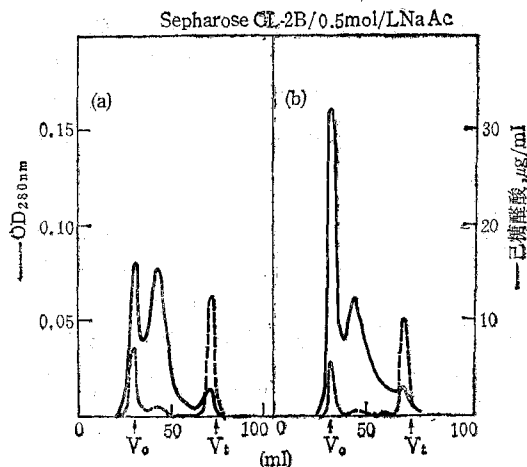


图 1 冻干法浓缩的 CS-PG, 未加 HA (a) 及与 HA 混合后 (b) 在结合条件下的 Sepharose CL-2B 柱层析谱 (Sephadex G-200 浓缩法所得 CS-PG 的结果与此类似, 图略)

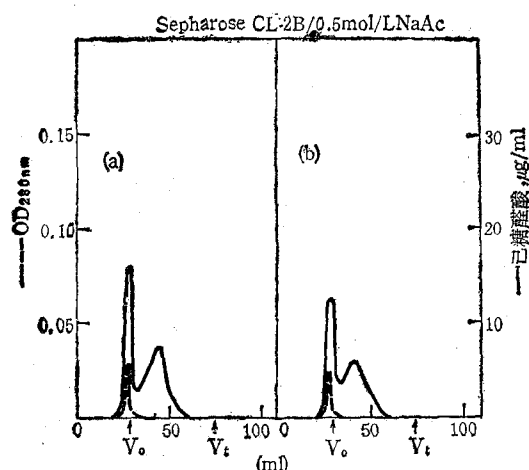


图2 95%乙醇沉淀浓缩的CS-PG未加HA(a)及与HA混合后(b)在结合条件下的Sephacrose CL-2B柱层析谱

表1 正常人主动脉PG的再聚集作用

PG	浓缩方法	再聚集作用(%)	
		自身聚集	与HA聚集
CS-PG	1.冻干	21.2	38.6
	2.Sephadex G-200吸水	12.0	32.6
	3.95%乙醇沉淀	32.3	35.1
DS-CS-PG	1.冻干	0.7	12.2
	2.Sephadex G-200吸水	0	13.2
	3.95%乙醇沉淀	5.2	4.3

用Sephadex G-200浓缩,因时间较长,PG降解明显(即在Sephacrose CL-2B柱 V_t 处有较大的醛酸及 OD_{280nm} 峰),用95%乙醇浓缩的PG的自身聚集及其与HA形成的聚合体的百分数基本相同。冻干及Sephadex G-200浓缩法得到的PG与HA再聚集形成聚合体的百分数明显高于自身聚集。可能是由于

乙醇改变了PG分子的构象。

在巩膜PG的自身聚集, GAG链起决定性作用^[6,7], PG中含GAG链越多其自身聚集能力越大, PG分子中核心蛋白的构象也重要,但详细机理尚不清楚。PG与透明质酸的结合区是核心蛋白N-末端的球形结构^[8],由5—7个二硫键维持空间构象,如还原或烷基化,PG与HA的再聚集能力消失。

Hardingham^[1]用乙醇沉淀猪软骨PG(PG单体的混合物)研究其再聚集性能。52%PG能与内源HA形成聚合体。因未做对照,故未提出自身聚集的问题。我们发现用95%乙醇及用Sephadex G-200浓缩的PG,它们与血清的相互作用也不同。

用95%乙醇沉淀浓缩PG,方法简单、快速,可防止大分子的降解,适用于PG样品的某些分析,但不适于PG生物学性质的研究。用Sephadex G-200浓缩价格贵,时间长,PG分子易降解。冻干法是最可取的方法。

参 考 文 献

- [1] Hardingham, T. E. et al.: *Biochem. J.*, 1974, **139**, 565.
- [2] Kapoor, R. et al.: *Biochem. J.*, 1986, **240**, 575.
- [3] Heinegard, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 1985, **151**, 41.
- [4] 张英珊等:《生物化学与生物物理学报》, 1987, **19**, 253.
- [5] Wagner, W. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 11136.
- [6] Cöster, L. et al.: *Biochem. J.*, 1981, **197**, 483.
- [7] Fransson, L. -Å. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 6333.
- [8] Hardingham, T. E. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, 1983, **11**, 128.

[本文于1988年3月21日收到]

(上接第244页)

提要也是从1987年始增设的。显然, C.A. 在选摘《进展》这类中英文摘要皆无的文章时,不但需摘其要,还要译其文;既要精通中、英文,更需具相当高的学术水平。最令人惊奇的是, C.A. 的这种摘译工作,决非如想像的那样是一类通

读原文一遍草草数语了事之作,而是深解原意经深思熟虑后编摘而成。君不信,试看登于《进展》1982年第4期第59—62页之拙作,它被选摘于C.A. **97**(19), p366, 1982。此摘要仅正文就长达150个英文词。若摘译者不是悉心研究过该中文原文,是难以表达得如此完美的。