

Seperating Short Tandem Repeat DNA Fragments by High-resolution Electrophoresis.

GUO Da-Wei, LANG Ha-Li, XU Xiao-Li (*Department of Forensic Serology Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China*); J. C. J. EIKENBOOM, R. M. BERTINA (*Department of Hematology, Hemostasis and Throbosis Research Center, Unversity Hospital Leiden, 2300 RC, Leiden, The Netherlands*).

Abstract A multiphasic buffer system was used

to seperate the human short tandem repeat DNA fragments. In stacking gel the main content of buffer were bistris, sulfuric acid and bicine while tris, sulfuric acid and bistris play a major role in seperating gel. The DNA fragments, which can be stacked efficiently in stacking gel and destacked completely in seperating gel, were seperated according to their size. By this way the high-resolution results can be achieved.

Key words stacking gel, seperating gel, short tandem repeat DNA fragment

重组中国汉族人源 γ -干扰素的纯化和鉴定*

王清明 毕建进 范国才 陈惠鹏 蒋中华 魏汉东 贺福初

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 在 *E. coli* 中高表达的中国汉族人源 γ -干扰素是以包涵体的形式存在的, 包涵体经各种溶液洗涤后, 用 8 mol/L 尿素裂解, 裂解上清在 8 mol/L 尿素存在下, 经离子交换柱层析和凝胶过滤两步纯化, 得到纯度大于 95% 的 γ -干扰素, 稀释复性后, 其比活为 5.5×10^5 U/mg. 激光解析电离质谱分析表明, 中国汉族人源 γ -干扰素的分子质量为 17.32 ku, 其 N 端序列与 Gray 等报道的 γ -干扰素 N 端序列一致. 中国汉族人源 γ -干扰素的氨基酸组成分析结果也与其理论值相吻合.

关键词 γ -干扰素, 中国汉族人源 γ -干扰素, 包涵体, 尿素, 复性

学科分类号 Q78

干扰素 (interferon, IFN) 是由多种细胞因子组成的异源家族. 诱导细胞对病毒感染产生抗性是干扰素家族共有的生物学活性. 大多数的干扰素可归属于三个亚类, 即 α , β 和 γ 干扰素, 其中 γ -干扰素 (IFN- γ) 又称免疫干扰素, 与 α 、 β 亚类的干扰素相比, IFN- γ 具有更强的免疫调节功能和抗细胞增殖效应^[1,2]. 根据贺福初等^[3] 分子进化规律的预测, 东西方人群间 IFN- γ cDNA 存在序列多态性. 鱼咏涛等^[4] 的报道证实了这一预测, 即中国汉族人源 IFN- γ cDNA 与 Gray 等^[5] 报道的 IFN- γ cDNA 序列存在两个核苷酸位点的差异, 应该导致 IFN- γ 在蛋白质水平上存在一

个氨基酸位点的差别. 为进一步开发、利用中国汉族人源 IFN- γ , 我们对大肠杆菌中高表达的中国汉族人源 IFN- γ 进行了变性、复性、纯化和鉴定.

1 材料和方法

1.1 工程菌的发酵

参阅文献 [6].

1.2 包涵体的提取、洗涤和裂解

表达菌体用 50 mmol/L Tris-HCl

* 国家自然科学基金重点项目 (39730310) 和军事医学科学院开发基金资助项目.

收稿日期: 1997-07-31, 修回日期: 1997-11-10

1 mmol/L EDTA pH 8.0 的缓冲液洗涤三次, 超声破碎细菌, 10 000 r/min 离心 15 min, 回收沉淀即包涵体。包涵体用磷酸缓冲液、1 mol/L 的 NaCl、0.5% Triton X-100 和 6 mol/L 尿素依次洗涤后, 用含 8 mol/L 尿素的 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.0 溶液 (A 液) 溶解包涵体, 10 000 r/min 离心 15 min, 回收裂解上清。

1.3 凝胶过滤

Ultrogel AcA44 (Biosepra, France) 凝胶柱 (1.6 cm × 80 cm), 柱经 A 液平衡后, 将上述裂解上清直接上样, 上样体积为 3 ml, 样品蛋白浓度为 6 g/L。

1.4 离子交换柱层析

CM Sepharose Fast Flow (Pharmacia) 柱 (1.6 cm × 15 cm), 用 A 液平衡后, 将凝胶过滤得到的目的蛋白峰直接上样, 上样完毕, 经 A 液洗脱后继而用溶解于 A 液中不同浓度的 NaCl 溶液洗脱, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 鉴定其纯度。

1.5 复性和活性测定

采用考马斯亮蓝 G250 法^[7]测定蛋白质浓度。

纯化的中国汉族人源 IFN- γ , 经稀释方法复性。样品起始浓度为 0.5 g/L, 将样品用 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 的缓冲液作 10 倍稀释, 4℃ 冰箱过夜, 次日, 对同样缓冲液充分透析以去除变性剂, 然后用微量细胞病变抑制法^[8]测定其活性。肝癌细胞株 Hep-2 为测定细胞, 水泡口炎病毒为攻击病毒, 以人白细胞干扰素效价测定国家标准品校算为国际单位。

1.6 纯化后的中国汉族人源 IFN- γ 的鉴定

1.6.1 纯度鉴定: 采用 SDS-PAGE 方法。分离胶浓度为 12.5%。采用考马斯亮蓝染色法染色, 经紫外扫描仪 Ultrascan 测定其纯度。

1.6.2 分子质量测定: 采用飞行时间质谱仪 Tofspec (VG, England), 用电喷雾质谱分析法精确测量其分子质量。此方法的误差为万分之一。

1.6.3 N 端序列分析: 采用 Edmman 降解

法, 用氨基酸序列自动分析仪分析其 N 端的 16 个氨基酸残基。

1.6.4 氨基酸组成分析: 采用盐酸水解法水解 IFN- γ , 用 6300 高效氨基酸分析仪 (Beckman) 分析其氨基酸组成。

2 结 果

2.1 中国汉族人源 IFN- γ 分离纯化

在大肠杆菌中表达的中国汉族人源 IFN- γ 是以包涵体的形式存在的, 包涵体密度大, 经各种溶液洗涤后, 最后用高达 6 mol/L 尿素洗涤, 目的蛋白损失很少, 而包涵体的纯度由于 40% 升为 60%, 这可大大减轻以后柱层析压力。洗涤后的包涵体, 用 8 mol/L 尿素 (pH 7.0, 50 mmol/L Tris-HCl, 1% 巯基乙醇) 裂解, 裂解液离心后, 直接经 8 mol/L 尿素 (pH 7.0, 50 mmol/L Tris-HCl) 平衡的 AcA44 凝胶柱进行分离。此步分离可得到两个峰 (图 1), 经 SDS-PAGE 分析, 峰 1 主要为杂蛋白和少量的 IFN- γ , 峰 2 为目的蛋白峰。峰 2 的样品再经 CM Sepharose FF 离子交换层析柱进行分离。此柱亦用 8 mol/L 尿素 (pH 7.0, 50 mmol/L Tris-HCl) 平衡, 所以凝胶柱分离的峰 2 的样品可直接上样。然后, 在 8 mol/L 尿素 (pH 7.0, 50 mmol/L Tris-HCl) 存在下, 用 0.1 mol/L 和 0.3 mol/L

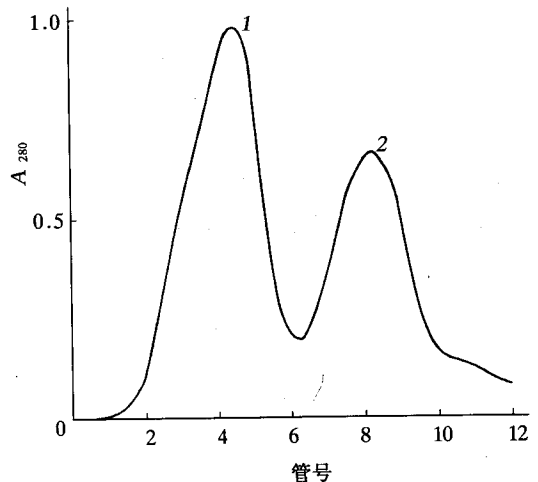


图 1 AcA44 凝胶过滤层析图谱

1: 杂蛋白峰; 2: IFN- γ 峰。

NaCl进行阶段洗脱, 得到两个峰 (图 2), 经 SDS-PAGE 鉴定 (图 3), 0.3 mol/L NaCl洗脱峰为 IFN- γ 峰, 紫外扫描其纯度为 96.87%.

通过凝胶过滤和离子交换柱层析纯化 IFN- γ 的效果参见表 1.

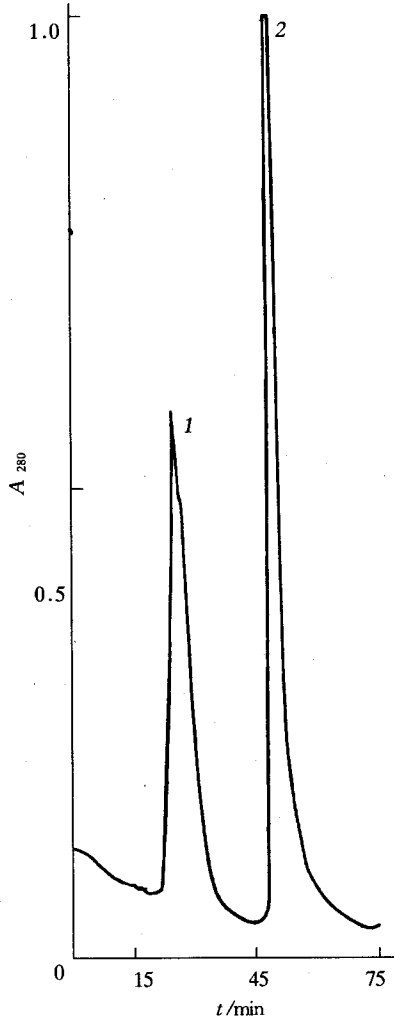


图 2 CM Sepharose FF 离子交换柱层析图谱
1: 0.1 mol/L NaCl 洗脱峰; 2: 0.3 mol/L NaCl 洗脱峰 (IFN- γ 峰).

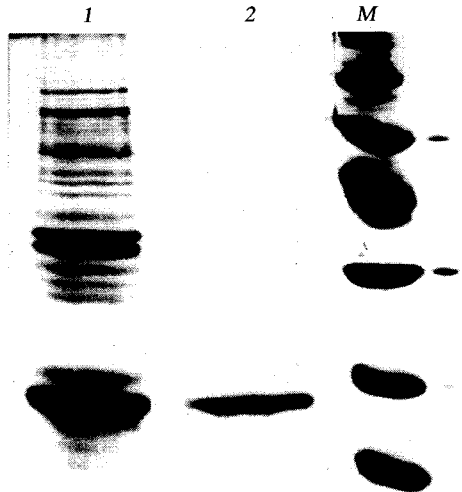


图 3 两步柱层析纯化的 IFN- γ 的 SDS-PAGE 图谱
1: 洗涤后的包涵体; 2: 纯化的 IFN- γ ; M: 标准分子质量蛋白.

表 1 中国汉族人源 IFN- γ 的纯化效果

步 骤	蛋白量
包涵体洗涤	18 mg
AcA44 柱层析	8 mg
CM Sepharose FF 柱层析	4.5 mg
目的蛋白回收率	41.7%

2.2 中国汉族人源 IFN- γ 的鉴定

经两步柱层析纯化的样品充分透析后, 冷冻干燥, 用于分子质量测定、N 端氨基酸序列分析和氨基酸组成分析. 结果如表 2.

从表 2 可以看到, 在 *E. coli* 中表达的中国汉族人源 IFN- γ 其 N 端没有甲硫氨酸, 除此之外, 其 N 端氨基酸序列与 cDNA 推导序列无差别, 即与 Gray 等报道的人 IFN- γ 的 N 端序列一致.

表 2 中国汉族人源 IFN- γ N 端氨基酸序列

测定序列	NH ₂ ·X-Y-X-Q-D-P-Y-V-K-E-A-E-N-L-K-K...COOH
cDNA 推导序列	NH ₂ ·M-C-Y-C-Q-D-P-Y-V-K-E-A-E-N-L-K-K...COOH

注: X 为半胱氨酸.

表 3 中国汉族人源 IFN- γ 的氨基酸组成		
氨基酸	测定相对残基数	每个分子残基数
G	5.28	5 (5) ¹⁾
A	8.00	8 (8)
V	8.90	8 (8)
L	10.03	10 (10)
I	6.51	7 (7)
F	9.81	10 (10)
S	9.36	11 (11)
T	4.98	5 (5)
Y	4.86	5 (5)
P	3.22	2 (2)
Z	19.57	18 (18)
B	18.79	20 (20)
R	8.49	9 (8) ²⁾
K	18.56	19 (20) ²⁾
H	2.10	2 (2)
M	3.38	4 (4)

¹⁾ () 内为 Gray 等报道的 IFN- γ 氨基酸组成的理论值; ²⁾ 为中国汉族人源 IFN- γ 与 Gray 报道的 IFN- γ 的差别氨基酸.

表 4 电喷雾质谱分析法测量的中国汉族人源 IFN- γ 分子质量		
	理论值/ku	测量值/ku
中国汉族人源 IFN- γ	17.324	17.323
Gray 等报道的 IFN- γ	17.296	

2.3 中国汉族人源 IFN- γ 的复性

纯化后的 IFN- γ , 经稀释方法复性, 然后用微量细胞病变抑制法测定其比活. 其比活为 5.5×10^5 U/mg.

3 讨 论

本文对在大肠杆菌中表达的中国汉族人源 IFN- γ 进行了分离、纯化、复性和鉴定. 经充分洗涤后的包涵体, 其纯度大为增加, 这为以后的色谱纯化减轻了压力. 裂解后的包涵体经离子交换柱层析和凝胶过滤, 在 8 mol/L 尿素存在下, 完成了对 IFN- γ 的纯化, IFN- γ 的纯度大于 95%. 稀释复性后 IFN- γ 的比活为

5.5×10^5 U/mg, 比文献报道的 IFN- γ 的比活低, 可能是由于其 N 端的前三个氨基酸 (CYC) 的存在有关, 去掉这三个氨基酸的重组产物, 用同样的方法纯化和复性, 其比活可达到 10^8 U/mg (另文报道).

根据贺福初等提出的分子进化规律预测, 东西方人群间 IFN- γ cDNA 存在序列多态性. 鱼咏涛等克隆了中国汉族人源 IFN- γ cDNA, 证明它与 Gray 等报道的 IFN- γ cDNA 存在两个核苷酸位点的差异, 应该导致蛋白质水平上一个氨基酸的差别, 即第 61 位的 Lys 被 Arg 所取代. 为此我们将纯化后的中国汉族人源 IFN- γ 进行了质谱分析、N 端序列和氨基酸组成分析. 经电喷雾质谱分析, 中国汉族人源 IFN- γ 的分子质量与理论值完全一致, 其 N 端序列与 Gray 等报道的 IFN- γ 无差别. 中国汉族人源 IFN- γ 的氨基酸组成分析表明, 其测量值与理论值基本吻合. 综合中国汉族人源 IFN- γ 分子质量测定结果和氨基酸组成分析结果, 基本可以断定中国汉族人源 IFN- γ 与 Gray 等报道的 IFN- γ 存在一个氨基酸位点的差别. 这一个氨基酸的改变是否导致其抗原性的改变及是否影响其生物学活性尚需进一步研究.

参 考 文 献

1 Rubin B Y, Gupta S L. Differential efficacies of human type I and type II: interferons as antiviral and antiproliferative agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** (10): 5928 ~ 5932

2 Pestka S, Langer J A, Zoon K C, *et al.* Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 727~ 777

3 贺福初, 吴祖泽 (He F C, Wu Z Z). 分子水平的达尔文选择-相互作用蛋白质间协同进化的规律. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 1993, **38** (14): 1323~ 1327

4 鱼咏涛, 贺福初 (Yu Y T, He F C). 人 γ -干扰素 (IFN- γ) cDNA 存在序列多态性. *高技术通讯 (High Technology Letters)*, 1993, **3** (11): 27~ 30

5 Gray P W, Goeddel D V. Structure of human immune interferon gene. *Nature*, 1982, **298**: 859~ 862

6 瞿成奎, 魏汉东, 鱼咏涛, 等 (Qu C K, Wei H D, Yu Y T, *et al.*). 中国人 γ -干扰素 cDNA 在大肠杆菌中的高效表达. *生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics)*, 1995, **22** (5): 433~ 436

7 鲁子贤 (Lu Z X). *蛋白质和酶学研究方法 (第一册)*. 北京: 科学出版社, 1989, 5

8 尚成祖, 李广善, 张吟庵, 等 (Shang C Z, Li G S, Zhang Y A, *et al*). 一种快速简便的人干扰素微量板染色测定法. 中华微生物学和免疫学杂志 (Chinese Journal of Microbiology and Immunology), 1985, 5 (3): 181~183

Purification and Characterization of Recombinant Human Interferon- γ from Chinese Han Nationality. WANG Qing-Ming, BI Jian-Jin, FAN Guo-Cai, CHEN Hui-Peng, JIANG Zhong-Hua, WEI Han-Dong, HE Fu-Chu (*Institute of Beijing Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Recombinant human IFN- γ from Chinese Han nationality, overexpressed in *E. Coli*, was found to accumulate in cytoplasmic inclusion bodies. After washing, the inclusion bodies were dissolved in 8 mol/L urea. Under the denatured states, the recombinant

human IFN- γ from Chinese Han nationality was purified by size-exclusion chromatography and ion-exchange chromatography. The final yielded product was of high purity (96.87%) and exhibited the mass of molecule 17.32 ku analyzed by mass spectrometry. The renatured IFN- γ , which was refolded by diluting, had specific antiviral activity of 5.5×10^5 U/mg. The sequence of 16 amino acid residues from NH₂-terminus of the protein was determined and was found to agree with that of hIFN- γ reported by Gray. The composition of amino acids of the protein was analyzed. The result had good agreement with that deduced from cDNA of IFN- γ from Chinese Han nationality.

Key words interferon- γ (IFN- γ), human IFN- γ from Chinese Han nationality, inclusion body, urea, renaturation

化学发光双抗夹心酶免法测定血清 IV 型胶原

王天成 姚敏捷¹⁾ 刘向²⁾ 寇丽筠
(北京医科大学第三临床教学医院, 北京 100083)

摘要 以免疫家兔制备的抗人 IV 型胶原多抗包板, 采用改良过碘酸钠法辣根过氧化物酶标记抗人 IV 胶原单抗, 建立了一种血清 IV 型胶原的增强化学发光双抗夹心酶免测定法. 实验结果表明方法较为灵敏、准确、稳定、特异, 其最低检测限为 30 $\mu\text{g/L}$, 平均回收率为 94.5%, 批内和批间变异系数分别 $\leq 6.0\%$ 和 11.6%. 测定 60 例健康人, 其参考值为 160 $\mu\text{g/L}$, 与进口的日本试剂盒相关性良好, 因此可以作为临床血清 IV 型胶原放免测定法的参考替代方法.

关键词 IV 型胶原, 化学发光酶免法, 肝纤维化
学科分类号 R392.33

抗和兔抗人 IV 型胶原 IgG, 以多抗包板, 单抗标酶, 过氧化氢 (H_2O_2) 和化学发光信号试剂 (含鲁米诺和发光信号增强剂) 为底物, 建立了一种化学发光双抗夹心酶免 (CLEIA) 血清 IV 型胶原测定方法.

¹⁾ 沈阳军区空军医学专科学校.
²⁾ 首都医科大学附属同仁医院检验科, 北京.
收稿日期: 1997-09-01, 修回日期: 1998-01-16

IV 型胶原 (C IV) 是基底膜的主要成分, 近来研究结果表明血清 IV 型胶原水平与肝纤维化程度密切相关^[1], 因此血清 IV 型胶原被认为是肝纤维化的早期诊断指标. 当前测定血清 IV 型胶原含量多为放免法, 但该法有放射污染等缺点. 1989 年以来国外相继建立了测定血清 IV 胶原含量的酶免检测法^[1~3], 我们使用自制的标记有辣根过氧化物酶抗人 IV 型胶原单