

表皮生长因子的提纯和鉴定

中国中医研究院骨伤科研究所(100700) 田绍成 周永生 丁建军

表皮生长因子(EGF)的生物学作用是激发皮肤、角膜、消化道、呼吸道和肝肾等许多组织和细胞的生长。目前,有关EGF及其受体的结构和功能关系以及它们在体内外作用机制的研究已取得积极的进展。现在已利用EGF取代小牛血清培养上皮细胞和成纤维细胞。在创伤修复、角膜烧伤、肠胃道溃疡和人及动物胎儿催熟等方面,即将达到实际应用的程度。目前,国外已从小鼠颌下腺和人尿等提取和制备出EGF,并已用DNA重组技术产生EGF。但从小鼠颌下腺和人尿提取EGF,工艺简单而且成本低,因此,将是今后EGF的主要来源。本文报告从小鼠颌下腺提纯EGF的简便方法。

材料和方法

40天龄雄性昆明小白鼠,隔日肌注20微克丙酸睾丸素。两周后取下颌下腺,并立即将颌下腺放入液氮中贮存,备用。若接着进行提取,则可将颌下腺放入干冰中冷冻。

提取:把从150支小鼠取出的湿重30克颌下腺,0.05M乙酸溶液加240ml,4℃,匀浆化3分钟。匀浆用Beckman SW-28转头,27000rpm,4℃,离心30分钟。沉淀物用5X10⁻⁴M乙酸溶液洗两次,并以上述离心条件离心分出上清液。合并三次离心上清液,并用XHP-05℃超滤膜(上海瑞丽分离仪器厂)或于蒸馏水中透析。残留液冷冻干燥。冻干残

复位力量也稍差。

小结

脊柱背伸练功的生理基础是符合生物力学原理的,骶棘肌是背伸练功的主要肌肉,经一段时间的练功后,患者的背伸肌力强于正常人,为椎体复位创造了有利的条件。

要求患者在2周左右达到一定的练功要求,使椎体有足够的膨胀复位条件,在第4—5周达到最大肌力的练功,以后的练功姿势主

物加7ml,1NHCl溶液进行酸化,继加23cm³,0.05NHCl溶液。混合液,在4℃,27000rpm,离心30分钟。取上清液做凝胶色谱分离。

生物凝胶P-10色谱分离:把生物凝胶p-10(Bio-Gel p-10, Bio-Rab)充分溶胀后,装入2.6×90cm柱,装好的色谱柱用0.05NHCl/0.15NaCl溶液平衡。在5℃,将上述提取液加入色谱柱中。平衡后,用0.05NHCl/0.15NaCl溶液洗提,流速约45ml/小时。使用LKB-ULTROSPEC II型紫外检测器。在280nm监测出液。用岛津C-RIB描记色谱图。收集第45~50小时部分洗出液,透析或超滤脱盐,并冷冻干燥。冻干残物用DE-纤维素-52离子交换谱纯化。

DE-纤维素-52离子交换色谱纯化:装填1.5×20cm DE-纤维素-52离子交换色谱柱。色谱柱用0.02M乙酸铵,PH5.6,缓冲液平衡。用0.02M到0.2M乙酸铵缓冲液,PH5.6,线性梯度洗提。流速为12ml/小时,280nm监测洗出液,并记录色谱图。取第1和第2峰面积部分洗出液,分别透析脱盐并冷冻干燥,放置-20℃保存。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分析:电泳使用7.5%凝胶,0.1M Tris-HCl缓冲液,PH8.7。每管胶约25mA。25℃,电泳3小时。ED-纤维素第1和第2部分加样10微克,pharmacia标

要是为维持椎体复位后的稳定性,所以肌力不再增强。

背伸练功对伴不全瘫患者仍是有效的治疗方法,但椎体复位效果较单纯脊柱压缩骨折略差。

患者练功8周后挺身站立下床,骶棘肌、斜方肌仍能保持一定的肌力,能防止椎体复位后的再次塌陷。

志蛋白Mr2500-17000为30微克。考马斯兰R250染色，乙酸—甲醇—水混合液脱色。

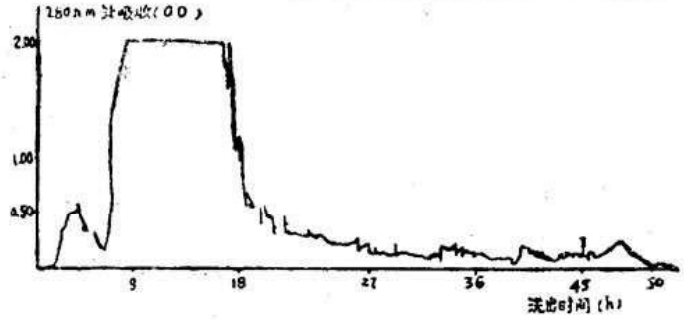
EGF生物活性鉴定：使用昆明初生小白鼠做牙齿早发和提前开眼观察。实验初生小白鼠于出生18小时内开始皮下注射所收集的Bio-Rad P-10部分，DE-纤维素第1和第2部分，对照初生小鼠皮下注射等量的双蒸馏水。每隔4小时观察一次出牙和睁眼的情况。

蛋白质浓度测定，使用Beckman DU8-紫外—可见分光光度外，1cm通径比色杯，分别于225nm和215nm测定蛋白质溶液的光密度(OD)并按蛋白质浓度(微克/毫升)等于144(DD₂₁₅-OD₂₂₅)公式计算之。

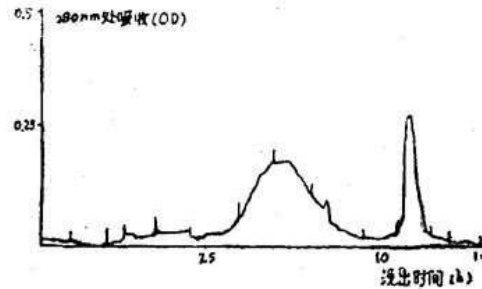
结果

小白鼠颌下腺酸性溶液提取生物凝胶P-10的凝胶色谱图(见图I)中，在280nm吸收的第45—50小时部分，经初生小鼠提前开眼实验证明具有EGF的生物学活性(见表I)。生物凝胶Pi-10 EGF活性部分经DE-纤维素52纯化的第1和第2部分(见图II)，经牙齿早发和提前开眼实验证明均具有EGF生物活性即相当于Savage等所谓的EGF-1和EGF-2(见表I)。总EGF产率：0.66mg/g湿重。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(电泳图照片：略)结果表明DE-纤维素-52离子交换色谱第1和第2部分均为单一的电泳带，它们的电泳移率均



图I.小鼠颌下腺酸性溶液提取物的Bio-G I P-10色谱图中45-50小时部分具有EGF生物活性



图II.小鼠颌下腺提取物P-10部分DE-纤维素-52，离子交换色谱图，图中两个峰分别代表EGF-1和EGF-1。

标志蛋白Mr6, 200相近约为6, 100和6, 00道尔顿，而与Savage等人的结果一致。

EGF生物活性鉴定采用Cohn等提前开眼和牙齿早发的实验。表为初生小鼠牙齿早发和提高开眼实验结果(初生小白鼠牙齿早发和提前开眼照片：略)。实验结果表明Bio-G-e1P-10、DE-纤维素部分1和2，均使初生小鼠牙齿早发和提前开眼。

表.初生小白鼠牙齿早发和提前开眼实验结果

注射EGF部分	剂量	小鼠数	出牙大数(平均)	开眼天数(平均)
Bio-GelP-10部分	2ug/g/天	8	—	11
DE-纤维素部分1	1ug/g/天	8	7	12
DE-纤维素部分2	1ug/g/天	8	7	12
双蒸馏水	1ug/g/天	12	10	14

讨论

Bio-Gelp-10凝胶色谱所获部分与Savage等使用家兔抗体亲和柱分离EGF的结果相似。我们的实验也证明EGF-2的羧基末端氨基酸残基虽然比EGF-1少两个，但其活性并不受影响。我们认为在实际应用中，没有必要再做EGF-1和EGF-2的分离，换言之使用

Bio-Gelp-10一步色谱分离就可以了。

利用基因工程产生像EGF这样的小肽虽然不太难，也较为合适。但毕竟比不上从尿和小鼠颌下腺等提取来得简便可行和低成本。我们相信，就EGF生产而言，尿罐子工程将再次战胜基因工程。何况提取法还可同时获得几种有用的副产品。所以生产EGF还是以提取法为宜。