

液相色谱法分离胃蛋白酶原*

周杏琴 肖志坚 杨希震 蒋孟军 钦晓锋

(江苏省原子医学研究所 核医学国家重点实验室 无锡 214063)

提 要 首次应用高压凝胶过滤色谱和中压阴离子交换色谱提纯胃蛋白酶原,得到抗原 PG_I 和 PG_{II},一次提纯仅需50min。与以往文献报道的胃蛋白酶原纯化方法相比,具有简易、快速、高效的特点。

关键词 高压凝胶过滤色谱法,中压阴离子交换色谱法,胃蛋白酶原

分类号 O658/Q55

1 前言

正常人胃粘膜中的胃蛋白酶原有多种,包括 PG₁~PG₇。其中 PG₁ 分子量较大, PG₂~PG₅ 称为 PG_I, PG₆~PG₇ 为 PG_{II}。从胃粘膜中提取 PG_I、PG_{II},制备多克隆抗体,再经放射免疫分析测定病人血清中 PG_I、PG_{II} 的含量,可以诊断早期胃癌。这种体外检测方法比胃活检更能提供有效的信息,减少病人的痛苦,具有临床价值^[1,2]。能否得到高纯度的抗原,在放射免疫分析中是极其关键的。Whitecross^[3]报道了常压下用 Bio-Gel A 等几个长柱子串联的分离方法^[3];Kageyama 等^[4]也报道了用 Sephadex G-100 等柱子的提纯方法。用文献的方法纯化一次均需几天时间,步骤多、效率低。本试验采用高压凝胶过滤色谱,首先得到 PG₁ 及 PG_I 和 PG_{II} 的混合物,混合物经中压阴离子交换色谱分离,一次提取仅需几十分钟。

2 实验部分

仪器 Bio-Rad 5000T 型高效液相色谱仪 (HPLC), 备有 AS-100T 自动进样器, Bio-Dimension 二极管阵列检测器; Bio-Rad 中压液相色谱仪 (MPLC), 备有 Bio-Rad 2128 型自动收集器。

试剂 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙酸、乙酸钠、盐酸、Tris 等试剂均为分析纯,水为超纯水。试剂和样品均用超纯水配制。0.45 μ m 过滤器过滤并脱气。

样品 胃蛋白酶原粗制品由本所免疫室提供。

3 结果与讨论

3.1 高压凝胶过滤色谱

(1) 根据胃蛋白酶原分子量的差异,选用凝胶过

滤色谱柱 Bio-Sil SEC-125 (12.5nm, 13 μ m, 600mm \times 21.5mm i.d., silica, 分子量范围 5 000 ~ 100 000) 分离胃蛋白酶原粗制品。配制不同离子强度的流动相进行试验,结果发现离子强度过高或过低都会影响分离结果,本文选择流动相为 0.05mol/L Na₂HPO₄-0.05mol/L NaH₂PO₄-0.05mol/L Na₂SO₄, pH 6.8。流速的试验范围为 2~6mL/min,在 3.2mL/min 时达到最佳分离效果(见图1)。整个色谱过程需 50min,每次可分离蛋白浓度约 15g/L 左右的胃蛋白酶原粗制品 1mL。

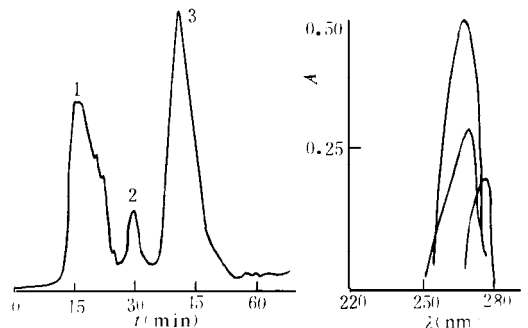


图1(左) 胃蛋白酶原粗制品在凝胶过滤柱上的色谱图

Fig. 1(L) Chromatogram of crude pepsinogen on gel filtration column

进样: 1.0mL, 压力: 1 179kPa,

检测: UV 280nm, 0.5AUFS, 温度: 25 $^{\circ}$ C。其余条件见正文。
column: Bio-Sil SEC-125, 600mm \times 21.5mm i.d.; injection: 1.0mL; pressure: 1 179kPa; eluent: mixture of 0.05mol/L Na₂HPO₄, 0.05mol/L NaH₂PO₄ and 0.05mol/L Na₂SO₄, pH 6.8; 3.2mL/min; 25 $^{\circ}$ C; detector: UV 280, 0.5AUFS.

图2(右) 图1中的峰3在半峰高和峰顶处的光谱图

Fig. 2(R) Spectra of No. 3 peak in Fig. 1 at half height and top

* 本工作是江苏省自然科学基金项目——胃癌相关性研究的一部分
本文收稿日期: 1995-12-11, 修回日期: 1996-03-24

(2)用二极管阵列检测器对图1的色谱峰进行纯度分析。峰1的最大吸收值为254nm,经活性测定为杂蛋白,峰2、峰3为活性组分。取半峰高处左右各1点和峰顶点进行分析,峰2各点的最大吸收值都是279nm,为纯组分;峰3在同样3点的最大吸收值有些偏移,估计为PG_I和PG_{II}的混合组分(见图2)。

(3)收集图1中的峰2和峰3组分,分别进行电泳试验,峰2显示出一条区带,分子量67 000,为纯PG_I;峰3显示两条区带,分子量分别为43 000和38 000,可判断为PG_I和PG_{II},与前述用二极管阵列检测器分析结果相同。

3.2 中压阴离子交换色谱

因PG_I、PG_{II}分子量相差较小,因而从凝胶过滤色谱柱上得到的是它们的混合组分。根据其等电点的差异,将收集的峰3经浓缩透析后上样至阴离子交换色谱柱Bio-Scale Q₂(7mm × 52mm),分离度的控制主要通过调节流动相的pH值和离子强度。

3.2.1 pH值的选择 在蛋白活性的适用范围内,配制不同pH值的缓冲液进行试验。如图3所示,随着pH值的降低,分离度逐步提高。选择pH 5.5进行分离纯化,结果较好。

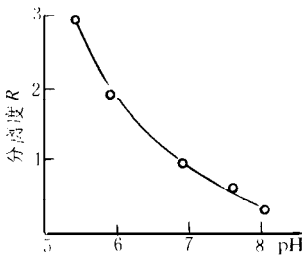


图3 分离度 R 与 pH 值的关系

Fig. 3 Relationship between resolution(R) and pH value

3.2.2 梯度程序的设计 在离子交换色谱中,梯度洗脱主要通过盐浓度的程序变化来控制流动相的强度。设计不同盐浓度的梯度程序,缓冲液A: 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠, pH 5.5; 缓冲液B: A + 0.5 mol/L NaCl, pH 5.5。经多次试验,发现当最后流动相中盐浓度小于80%时峰扩展较严重,经30min,峰仍未被完全冲洗出。本文选择30min 0~100% B 缓冲液线性梯度,在电导为306μS,缓冲液B浓度为55%时出第1个峰;在电导为402μS,缓冲液B浓度为82%时出第2个峰。PG_I和PG_{II}分离较好(见图4)。

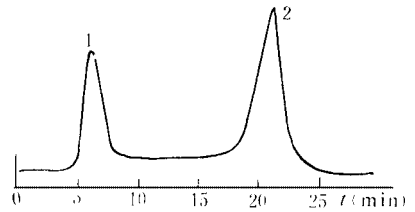


图4 混合组分在阴离子交换柱上的MPLC图

Fig. 4 MPLC chromatogram of mixed fraction on anion exchange column

进样: 1.0mL, 流速: 1.0mL/min,

280nm 检测, 0.5AUFS, 25℃。其余条件见正文。

injection: 1.0mL, flow rate: 1.0mL/min, detector: UV 280, 0.5AUFS, 25℃. buffer A: 0.1mol/L acetic acid-sodium acetate, pH 5.5; buffer B: A + 0.5mol/L NaCl, pH 5.5; linear gradient: 0-100% B in 30min.

1. PG_I, 2. PG_{II}.

参 考 文 献

- 1 Samloff I M. Gastroenterology, 1982; 82: 26
- 2 Samloff I M. Gastroenterology, 1971; 61: 185
- 3 Whitecross D P, Armstrong C, Clarke A D *et al.* Gut, 1973; 14: 850
- 4 Kageyama T, Takahashi K. J Biochem, 1980; 87: 725

Liquid Chromatographic Separation of Pepsinogens

Zhou Xingqin, Xiao Zhijian, Yang Xizhen, Jiang Mengjun and Qin Xiaofeng

(State Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi, 214063)

Abstract In this work, we reported a method for the purification of pepsinogens from human gastric mucosa with high pressure gel filtration chromatography(HPLC) and medium pressure anion exchange chromatography(MPLC). First, the two fractions of Pg_I and mixture of PG_I and PG_{II} were separated from pepsinogens with HPLC on a Bio-Sil SEC-125 column with in 50min. Then the mixture of fractions of PG_I and PG_{II} was further separated with MPLC on a Bio-Scale Q₂ column with in 30min.

Key words high pressure gel filtration chromatography, medium pressure anion exchange chromatography, pepsinogens