

双峰驼精清诱导排卵活性因子的 HPLC 分离纯化及生物活性测定

赵兴绪, 李喜龙, 陈北亨

(甘肃农业大学动物医学系, 兰州 730070)

摘要: 利用 C₈ 柱经 HPLC 对 Q Hyper D 柱分离的驼精清活性组分 F3 和 F5 进行分离纯化, 大鼠垂体组织培养, RIA 测定培养液中 LH 和 FSH 的浓度。实验结果表明, F3 和 F5 经过 HPLC 纯化后, 各得到 4 个组分, 分别以 F3-1~F3-4 和 F5-1~F5-4 表示。其中 F3-3 和 F5-3 可引起体外培养的大鼠垂体 LH 的释放显著增加, 但均未引起 FSH 发生明显变化。用 C₁₈ 柱经 HPLC 或毛细管电泳对 F3-3 进一步纯化, 无论在 HPLC 或毛细管电泳仪中, F3-3 均呈现两个波峰, 而且间隔非常靠近, 说明 F3-3 至少是由两种分子特征非常相似的物质组成。

关键词: 双峰驼; 精清; 诱导排卵活性因子; 生物活性; HPLC

中图分类号: S824.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2002)01-0028-04

双峰驼为诱导排卵型动物, 其精清中存在有某种或某组诱导排卵因子^[1,2]。精清中的诱导排卵成分可能是一组蛋白质, 它经胰蛋白酶处理后丧失活性, 但对酸、碱等不敏感, 利用阴离子交换层析柱 Q Hyper D 对精清进行初步分离, 获得了在体内外实验中可引起 LH 发生显著变化的生物活性组分 F3 和 F5, 其中 F3 还可引起成熟卵泡排卵, 但 F3 和 F5 均未引起 FSH 的释放发生明显变化。这说明 F3 可能就是驼精清诱导排卵因子或其成分之一, 而 F5 可能起协同作用^[3-7]。因此, 本实验对 Q Hyper D 分离的驼精清活性组分 F3 和 F5 进行进一步的纯化和生物活性鉴定, 以期阐明诱导排卵活性因子的分子特性, 为诱导排卵活性因子遗传密码的破译、克隆及进一步人工合成奠定基础。

1 材料和方法

1.1 驼精清活性组分 F3 和 F5 的 HPLC 取经 Q Hyper D 柱层析并经生物活性鉴定的 F3 和 F5 组分进行分离。将 C₈ 柱(5 μm, 4.6 mm × 7.5 cm, Beckman) 安装在 HPLC(Beckman) 上后, 用进样器进样, 进样量 10~15 μl, 缓冲液进行洗脱, 缓冲液为水和乙腈(乙腈梯度为 30%~60%, 内含 0.1% 的三氟乙酸)。166 Detector 280 nm 处紫外检测, 分部收集,

冻干, -20℃ 保存。

1.2 F3 和 F5 经 HPLC 后收集的各组分生物活性的体外检测

选择体重在 230~250 g 左右的雌性大鼠, 乙醚麻醉, 处死后取出垂体, 放入加有 TCM 199 培养液的组织培养孔中, 37℃, 5% CO₂ 条件下预培养 1 h。预培养结束后, 取出垂体, 将其放入加有 F3 或 F5 不同层析组分的 TCM 199 培养液的培养孔中, 按上述条件再培养 6 h, 培养结束后, 收集培养前后的培养液, 按北京北方免疫试剂研究所提供的放射免疫药盒测定说明测定培养液中的 LH 和 FSH 含量。

1.3 驼精清活性组分的纯化

1.3.1 毛细管电泳: 安装好毛细管电泳仪(中性毛细管, 50 μm × 27 cm, Beckman P/ACE system 5000) 后, 用进样器进样, 进样量约 10 μl, 正极进样, 负极检测, 磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH5.4) 冲洗, 10.8 KV(400 V/cm), 280 nm 处紫外检测, 分部收集, 冻干, -20℃ 保存。

1.3.2 C₁₈ 柱的 HPLC: 在 HPLC 上安装好 C₁₈ 柱(5 μm, 300A, 250 × 4.6 mm, Phenomenex 产品) 后, 进样器进样, 进样量约 10 μl, 连续浓度的乙腈(35%~70%) 进行洗脱, 166 Detector(Beckman) 280 nm 处进行检测, 分部收集, 冻干, -20℃ 保存。

2 结果

2.1 F3 和 F5 的 HPLC

F3 在 HPLC 上经 C₈ 柱, 在连续浓度的水和乙

收稿日期: 2000-06-16

基金项目: 国家教育部“跨世纪优秀人才”计划资助项目

作者简介: 赵兴绪(1962-), 男, 教授, 博士, 主要从事动物生殖生理、动物临床医学等方面的研究。

腓洗脱后, 其结果见图 1。F3 洗脱后共得到 4 个组分(F3-1~ F3-4)。其中 F3-2 中蛋白含量相对较高, 而 F3-3 是由两种波峰非常相近的蛋白组成, 由于波峰非常小, 而且间隔很近, 不能将其进一步分开收集。

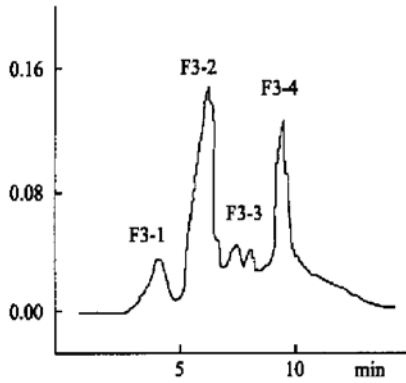


图 1 F3 经 C8 柱 HPLC 后的图谱
Fig. 1 Result of F3 chromatography by C8.

F5 洗脱后的结果见图 2, 共得到 4 个蛋白组分(F5-1~ F5-4), 其中 F5-4 中蛋白含量相对较高, 而其余各组分蛋白含量较少。

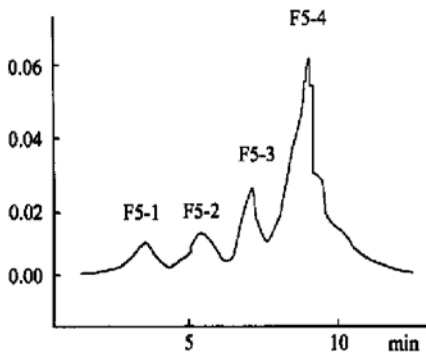


图 2 F5 经 C8 柱 HPLC 后的图谱
Fig. 2 Result of F5 chromatography by C8.

2.2 F3 及 F5 经 HPLC 后各组分的体外活性检测

F3-1~ F3-4 经大鼠垂体组织培养, 培养前后培养液中的 LH 及 FSH 含量变化分别见图 3 和图 4。从图中可以看出, F3-3 在垂体组织培养前后培养液中 LH 的浓度分别为 16.02 ± 2.40 和 32.14 ± 4.56 mIU/ml, 培养前后变化差异显著 ($P < 0.05$), 其余各组分培养前后培养液中 LH 的变化均不显著。培养前后培养液中 FSH 的变化则不明显。说明 F3-3 可以引起垂体释放 LH, 但不能引起 FSH 的释放(图中的 PS 指生理盐水)。

F5-1~ F5-4 经大鼠垂体组织培养, 培养前后

培养液中 LH 和 FSH 含量变化分别见图 5 和图 6。

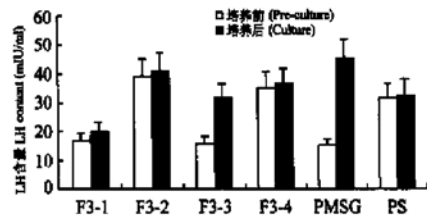


图 3 F3 经 HPLC 后各分离组分对大鼠垂体 LH 分泌的影响

Fig. 3 Effects of each fraction of F3 chromatography by C₈ column on the secretion of LH in the rat pituitary culture media.

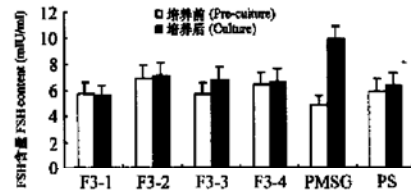


图 4 F3 经 HPLC 后各分离组分对大鼠垂体 FSH 分泌的影响

Fig. 4 Effects of each fraction of F3 chromatography by C₈ column on the secretion of FSH in the rat pituitary culture media.

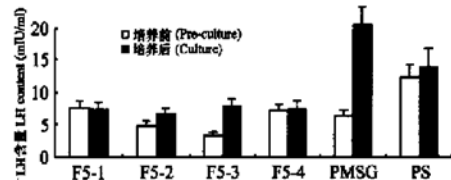


图 5 F5 经 HPLC 后各分离组分对大鼠垂体 LH 分泌的影响

Fig. 5 Effects of each fraction of F5 chromatography by C₈ column on the secretion of LH in the rat pituitary culture media.

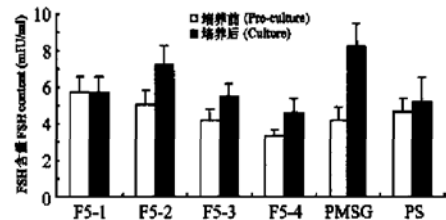


图 6 F5 经 HPLC 后各分离组分对大鼠垂体 FSH 分泌的影响

Fig. 6 Effects of each fraction of F5 chromatography by C₈ column on the secretion of FSH in the rat pituitary culture media.

从图中可以看出, 培养液中加入 F5-3, 培养前

后培养液中 LH 的浓度分别为 3.37 ± 0.51 和 7.76 ± 1.16 mIU/ml, 前后差异显著 ($P < 0.05$), 而其余各组分 LH 或 FSH 的变化均不明显。

2.3 F3-3 的纯化

F3-3 经毛细管电泳纯化后共含有 2 个组分 (图 7); 经 C_{18} 柱层析后还是由 2 个组分组成 (图 8), 与毛细管电泳结果相同。由于波峰间隔很近, 未能将其进一步分开。

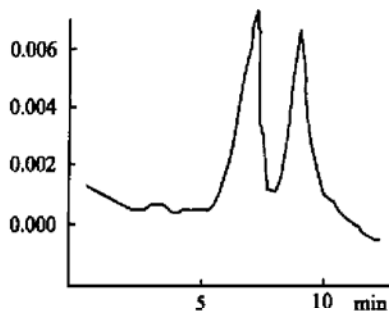


图 7 F3-3 经毛细管电泳后的图谱

Fig. 7 Result of F3-3 capillary electrophoresis.

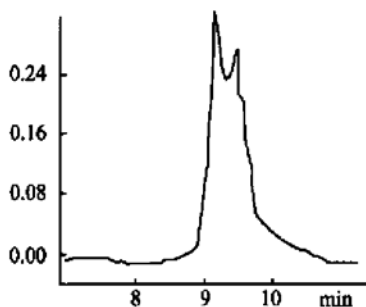


图 8 F3-3 经 C_{18} 柱 HPLC 后的图谱

Fig. 8 Result of F3-3 chromatography by C_{18} .

3 讨论

利用离子交换层析技术, 对驼精清诱导排卵活性因子进行分离, 获得了在体内外实验中均可引起 LH 发生明显变化的活性组分 F3 和 F5, 而且 F3 可使具有成熟卵泡的母驼发生排卵^[7]。在分离生物大分子物质时, 首先用凝胶过滤或离子交换层析技术进行初步分离, 然后用 HPLC 进一步分离和纯化。因此, 本实验在对驼精清活性组分 F3 和 F5 的分离中, 选用 C_8 反向柱经 HPLC 对其进行进一步分离, 获得的结果较为满意, F3 及 F5 层析后各得到 4 个组分, 其中 F3-3 和 F5-3 在体外垂体组织培养实验中均具有生物活性, 可引起垂体 LH 的明显释放, 但均未引起 FSH 的释放发生明显变化。

利用 C_{18} 反相柱经 HPLC 或毛细管电泳技术对 F3-3 进行纯化, 发现 F3-3 由 2 种蛋白成分组成, 但这 2 种蛋白组分的分子特征非常相近, 不能利用这两种技术将其进一步纯化。说明利用诱导排卵活性因子的离子特性、分子体积大小及其疏水性特征均不能将其分开, 因此还需要进一步探讨分离和纯化精清中诱导排卵活性因子的方法, 以得到诱导排卵因子的纯品而进行更进一步的研究。

从本次实验结果来看, 诱导排卵活性因子可能是由一组分子特征非常相似的物质组成, 而且由于在活性组分引起 LH 发生明显变化的同时, FSH 均未发生明显变化, 说明在分离诱导排卵活性因子的过程中, 一些协同因子因分子特征的差异而与诱导排卵因子分离开来, 因而未引起 FSH 的变化。另外, 精清中各种物质的不同凝聚状态也可以影响这些物质功能的发挥。一般来说, 精清蛋白以高分子量的凝聚状态存在而发挥作用, 如果破坏了这种凝聚状态, 则影响其功能的发挥, 进而影响精子的某些生理过程^[8,9], 分离后的精清诱导排卵活性因子在体外实验中的结果与整个精清的反应有所不同, 这也可能是分离过程破坏了精清中诱导排卵活性因子的整体结构, 进而造成实验结果的差异。因此, 还需要进一步改进分离诱导排卵活性因子的方法, 以免破坏诱导排卵因子的整体结构, 或者对分离过程中收集的各个组分进行不同组合, 然后检测其生物活性, 以确定这些协同因子。

参考文献:

- [1] 陈北亨, 康承伦, 员志贤, 葛荣欣. 骆驼的繁殖生理(第二报): 骆驼的性活动[J]. 畜牧兽医学报, 1980, 11(2): 65~76.
- [2] 潘光武, 赵兴绪, 陈北亨, 蒋寿, 黄永明. 双峰驼肌注精清的诱导排卵作用[J]. 中国农业科学, 1986, 2, 78-84.
- [3] Zhao XX, Pan GW, Huang YM, Gao YH, Chen BX. Studies on the ovulation-inducing factors in the seminal plasma of bactrian camel, "Is it possible to improve the reproduction performance of the camel" [J]. CIRAD-EMVT, 1993, p197~208.
- [4] Zhao XX, Huang YM, Chen BX. Biological activity of gonadotrophin-releasing hormone-like factors in the seminal plasma of the bactrian camel [A]. Proc 1st Int Camel Conf [C], 1992, 163~168.
- [5] 刘湘涛, 潘光武, 李东, 陈志田, 薛景云, 赵启祖, 刘石, 常慧云, 谢庆阁. 双峰驼精清诱导排卵因子活性肽的分

- 离[J]. 中国兽医科技, 1995, 24(7): 9~ 12.
- [6] 潘光武, 陈志田, 李东, 刘湘涛, 赵启祖, 谢庆阁, 凌凤香, 樊立民, 李三田, 杨金田. 双峰驼诱导排卵因子生物活性的测定[J]. 中国兽医科技, 1995, 25(11): 23~ 26.
- [7] 李喜龙. 双峰驼精清理化特性及诱导排卵因子的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 1999.
- [8] Al Somai N, Vishwanath R, Molan PC and Shannon P. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility[J]. Mol Reprod Dev, 1994, 39(3): 328~ 336.
- [9] Somai N, Vishwanath R, Shannon P and Molan PC. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm [J]. Reprod Fertil Dev, 1994, 6: 165~ 171.

Purification of Ovulation-inducing Factors in the Seminal Plasma of Camel (*Camelus Bactrianus*) by HPLC and Capillary Electrophoresis and Analysis of their Biological Activity

ZHAO Xing-xu, LI Xi-long, CHEN Bei-heng

(Department of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract: The ovulation-inducing factors were isolated from the biological fractions F3 and F5 by HPLC using C₈ column. F3 and F5 were separated into 4 fractions respectively, both the third fractions (F3-3 and F5-3) had the biological potential to stimulate the release of LH in the rat pituitary tissue culture media *in vitro*. F3-3 and F5-3 could increase the concentration of LH in the culture media significantly, and LH concentrations before and after addition of fraction were 16.02 ± 2.40 and 32.14 ± 4.56 mIU/ml, and for F3-3 3.37 ± 0.51 and 7.76 ± 1.16 mIU/ml for F3-3, respectively, however F3-3 and F5-3 could not stimulate the secretion of FSH *in vitro*. Finally, we tried to purify the ovulation-inducing factors from F3-3 by HPLC using C₁₈ and capillary electrophoresis but could not success due to the similarity of molecular characters. From the above results, it can be concluded that the ovulation-inducing factors of seminal plasma of camel is composed of several parts which have very similar molecular characters.

Key words: *Camelus Bactrianus*; Seminal Plasma; Ovulation-Inducing Factors; Biological Activity; High Performance Liquid Chromatography