文章编号: 1001－411X（2001）04－0071－04

鸡脾脏小分子活性物质的组分分析

江青艳, 黄军儿, 傅伟龙

（华南农业大学动物科学系, 广东 广州 510642）

摘要: 试验选用 30、60、90 日龄粤黄鸡各 30 只, 捕杀后取脾脏, 除去外周结缔组织及被膜, 用匀浆透析法提取脾脏小分子活性物质, 经 Sephadex G－25 凝胶柱层析系统进行柱层析, 采用氨基酸自动分析仪分析各组分的氨基酸组成, 并通过紫外光吸收光谱来进行扫描光谱分析. 结果表明: 鸡脾脏小分子活性物质提取液经 Sephadex G－25 柱层析可分离到 3 个峰, 各峰理化性质存在差异; 不同日龄鸡脾脏小分子活性物质的同一组分所含氨基酸种类基本相同, 但不同组分之间的氨基酸的含量和组成存在差异.

关键词: 鸡; 脾脏小分子活性物质; 柱层析

中图分类号: S831.1　　文献标识码: A

脾脏小分子活性物质又叫转移因子, 是从脾脏提取的一种可透析的小分子物质, 其分子组成中含有核苷酸和多种氨基酸[1]. 研究表明[2,3], 该物质能将供体的免疫信息传递给受体, 增强淋巴细胞对丝裂原的反应, 促进淋巴细胞转化; 提高淋巴细胞内环核苷酸水平; 促进 ^{3}H－TdR 掺入淋巴细胞 DNA; 促进淋巴细胞 RNA 的合成; 提高淋巴细胞 IL－2 诱生水平和外周血 TNF 活性, 因而可提高受体的免疫机能. 江青艳等[4,5] 的研究表明, 从鸡脾脏提取的小分子活性物质不仅能提高粤黄鸡的免疫机能, 而且可促进粤黄鸡生长. 迄今为止, 对鸡脾脏小分子活性物质的部分生化特性和免疫活性已有研究报道[6], 但其研究材料均为用透析法制备的透析外液, 而对透析外液的组分分析少见报道. 本试验采用匀浆透析法提取鸡脾脏小分子活性物质的透析外液, 并进一步采用 Sephadex G－25 柱层析对透析外液进行组分分析.

1　材料与方法

1.1　鸡脾脏小分子活性物质的制备

试验分别选用 30、60 和 90 日龄健康粤黄鸡各 30 只(由华南农业大学种鸡场提供), 捕杀取脾脏, 除去外周结缔组织和被膜, 称其质量后按 1 mL/g 加入灭菌 PBS, 匀浆, 反复冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清液于透析袋(Farco 公司产品, 排阻相对分子质量为 8 000), 4 ℃下对灭菌 PBS 透析 48 h, 收集透析外液, 经微孔滤膜滤菌后小批量分装, －20 ℃保存.

1.2　鸡脾脏小分子活性物质的柱层析

参照李建武[7] 的方法. 采用 2.5 cm×80 cm 柱床, 填充质为 Sephadex G－25(瑞典 Phamasia 产品), 柱床体积(V_t)为 378 mL, 内水体积(V_i)为 196 mL, 外水体积(V_o)为 132 mL; 洗脱液采用 pH 7.2, 0.067 mol/L PBS, 上样量为 15 mL, 流速为 0.65 mL/min, 检测波长为 254 nm, 采用自动馏分收集器收集样品, 每管 3.25 mL, 合并同一吸收峰的洗脱液为同一组分, 并计算其总体积(V_e), 按公式 $K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)$ 计算各吸收峰的分配系数(K_{av}).

1.3　鸡脾脏小分子活性物质各组分的常规分析

肉眼观察各组分的外观性状, 用数字酸度/离子计测定其 pH 值, 用 φ＝20%磺基水杨酸沉淀法作蛋白质定性分析. 将透析外液及层析所得的各个峰收集液进行紫外－可见光扫描光谱分析. 扫描波长 200～500 nm, 检测仪器为 HP－8453 紫外－可见分光光度计(惠普公司产品), 记录最大吸收峰值及对应的光密度值(D_λ)以及 $D_{250\ nm}$、$D_{280\ nm}$.

1.4　鸡脾脏小分子活性物质各组分的氨基酸成分分析

分别取 30、60 和 90 日龄鸡脾脏小分子活性物质提取液经 Sephadex G－25 柱层析所得的各组分, 用氨

收稿日期: 2001－05－11　　作者简介: 江青艳(1966－), 男, 副教授, 博士.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39600108); 国家自然科学基金倾斜项目(30070557)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

基酸自动分析仪(日立835—50型)分析其氨基酸组成.

2 结果与分析

2.1 鸡脾脏小分子活性物质的柱层析分析

试验结果表明,鸡脾脏小分子活性物质的透析外液经Sephadex G—25柱层析可得到3个吸收峰,即可分离到3个组分,分别称为组分Ⅰ、组分Ⅱ和组分Ⅲ;各组分间具有较好的分离效果. 各吸收峰经5次层析后的分配系数均有较好的重复性(表1). 其中,组分Ⅰ的K_{av}值无日龄差异($P>0.05$),组分Ⅱ的K_{av}值日龄间差异显著($P<0.05$),组分Ⅲ的K_{av}值日龄间差异极显著($P<0.01$).

表1 不同日龄鸡脾脏小分子活性物质各吸收峰的分配系数1)($M\pm SD$)

Tab. 1 *Kav* values of the fractions of chicken spleen micromolecule active mass from different ages of birds

日龄 days of age	组分 fractions Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
30	0.837±0.003[a]	1.005±0.008[a]	1.152±0.064[A]
60	0.841±0.003[a]	1.019±0.006[b]	1.216±0.009[B]
90	0.839±0.030[a]	1.042±0.012[c]	1.280±0.011[C]

1):表中数据为5次重复平均数,右上角相同字母者日龄间差异不显著,不同小写字母者日龄间差异显著($P<0.05$),不同大写字母者日龄间差异极显著($P<0.01$)(SSR法)

2.2 鸡脾脏小分子活性物质的常规分析

鸡脾脏小分子活性物质透析外液及各层析组分的常规分析结果见表2. 其中,透析外液为略带膻味的淡黄色透明液体,经柱层析后,淡黄色部分主要集中在组分Ⅰ的前半部,而组分Ⅱ和组分Ⅲ呈无色透明状. 透析外液及各组分经冷冻干燥后为疏松结晶,其中透析外液及组分Ⅰ结晶呈淡黄色,而组分Ⅱ、组分Ⅲ呈白色. 透析外液及各组分蛋白反应均呈阴性,提示不含大分子蛋白. 透析外液pH值为7.0,组分Ⅰ和组分Ⅱ与空白对照相同(pH 7.21),而组分Ⅲ(pH 7.23)稍高于空白对照.

紫外—可见光扫描光谱分析表明,透析外液及各组分的最大吸收峰值各不相同. 与透析外液相比,组分Ⅰ和组分Ⅱ峰值右移,组分Ⅲ峰值左移. 透析外液及各组分的$D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$值也不相同,以组分Ⅲ最高,为10.05,组分Ⅱ次之,为5.25,透析外液为2.99,组分Ⅰ最低,为1.23,表明透析外液及各组分中核酸与多肽含量的比值:组分Ⅲ>组分Ⅱ>提取液>组分Ⅰ.

2.3 鸡脾脏小分子活性物质的氨基酸成分分析

从表3中可见,鸡脾脏小分子活性物质透析外液经柱层析后,所得到的3个组分之间在氨基酸种类与含量上均有不同. 在同一日龄不同组分间,组分Ⅰ的氨基酸总量高于组分Ⅱ和组分Ⅲ,提示鸡脾脏小分子活性物质的多肽成分主要在组分Ⅰ中;组分Ⅲ的氨基酸总量低于组分Ⅰ,但其Tyr、Lys和Cys的含量却高于组分Ⅰ和组分Ⅱ;另外,组分Ⅰ中Gly、Ala和Glu的含量较高,组分Ⅱ中Val、Met和Cys含量较高,提示不同组分的多肽结构可能存在差异. 不同日龄间,各组分的主要氨基酸种类相近,但总氨基酸含量存在差异.

表2 鸡脾脏小分子活性物质常规分析结果

Tab. 2 Conventional analysis results of chicken spleen micromolecule active mass

项目 items	透析外液 liquid outside the dialysis membrane	组分 fractions Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
颜色 colour	淡黄色透明液体	淡黄色透明液体	无色透明液体	无色透明液体
气味 odor	略带膻味	略带膻味	略带膻味	略带膻味
蛋白质定性 protein	阴性	阴性	阴性	阴性
pH值1) pH value	6.90	7.21	7.21	7.23
最大吸收峰 maximum absorption/nm	256	269	259	249
D_{max}2)	14.69	2.65	2.21	2.02
$D_{260\,nm}$	14.38	2.32	2.20	1.52
$D_{280\,nm}$	4.81	1.94	0.420	0.51
$D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$	2.99	1.23	5.245	10.05

1)空白对照PBS的pH值为7.21;2)D_{max}值为最大吸收峰D值

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　鸡脾脏小分子活性物质各组分的氨基酸组成[1)]

Tab. 3　Composition of amino acids in chicken spleen micromolecule active mass　　mmol/L

氨基酸 amino acids	组分 I fraction I			组分 II fraction II			组分 III fraction III		
	30 日龄	60 日龄	90 日龄	30 日龄	60 日龄	90 日龄	30 日龄	60 日龄	90 日龄
天冬氨酸 ASP	11.31	25.29	10.74	1.60	1.50	1.01	1.36	3.46	3.86
苏氨酸 THR	2.69	32.59	18.90	0.94	0.87	0.55	0.73	1.85	2.20
丝氨酸 SER	0.71	35.23	9.59	1.37	1.13	1.07	1.04	2.12	3.20
谷氨酸 GLU	25.59	37.20	17.98	1.48	1.67	1.64	1.45	3.31	4.54
甘氨酸 GLY	51.60	116.08	95.68	1.63	1.42	1.35	1.61	4.72	3.72
丙氨酸 ALA	15.81	48.98	26.54	1.42	1.29	1.22	1.18	3.20	3.38
半胱氨酸 CYS	1.69	1.60	2.90	1.82	1.79	1.81	1.92	3.07	3.58
缬氨酸 VAL	5.66	19.47	9.92	2.66	2.62	2.66	1.90	4.82	5.82
蛋氨酸 MET	0.65	1.94	1.68	2.68	2.68	1.66	1.51	1.92	5.30
异亮氨酸 ILE	3.22	13.54	5.65	0.59	0.62	0.62	0.52	2.69	1.41
亮氨酸 LEU	6.25	27.54	6.75	0.55	0.56	0.49	0.51	1.93	1.55
酪氨酸 TYR	0.22	0.35	0.30	0.98	0.90	0.69	1.03	1.56	2.12
苯丙氨酸 PHE	0.68	0.36	0.49	1.97	0.71	1.19	0.85	1.16	2.32
赖氨酸 LYS	0.30	0.35	0.54	0.88	0.73	0.78	0.52	3.04	1.41
精氨酸 ARG	0.32	3.52	—	0.40	—	—	—	1.16	1.57
脯氨酸 PRO	5.82	20.87	5.96	—	—	—	—	—	—
组氨酸 HIS	1.29	0.49	—	—	—	—	—	—	—
合计 total	133.81	385.40	213.62	20.97	18.49	16.74	16.13	40.01	45.98

1) "—"示未测出

3　讨论

3.1　鸡脾脏小分子活性物质的理化性质及组分分析

制备脾脏小分子活性物质提取物的方法有超速离心法、超滤法和匀浆透析法, 其中以匀浆透析法较为经典, 用该法制备的提取液, 一般为无色或淡黄色略带腥味(或膻味)的透明液体, 不含蛋白质, pH 值为 6.3～6.8[6]. 本试验所制备的鸡脾脏小分子活性物质提取液为淡黄色、略带膻味的透明液体, 蛋白质反应呈阴性, pH 值为 6.90, 略带酸性, 与上述报道一致. 为了进一步纯化脾脏小分子活性物质提取物, 研究者大多以 Sephadex G－25 进行柱层析. 一般哺乳动物脾脏小分子活性物质提取物可得到 3～6 个峰[1,8]. 本研究结果表明, 鸡脾脏小分子活性物质提取液层析后可得到 3 个组分, 并且各组分有很好的分离效果. 进一步分析不同日龄鸡脾脏小分子活性物质的层析图谱发现, 60 日龄和 90 日龄的样品可稳定得到 3 个峰; 而 30 日龄样品的峰 II 不稳定, 5 次层析仅 2 次出峰, 而且峰矮小, 这表明 30 日龄粤黄鸡的脾脏小分子活性物质提取液中, 组分 III 含量较低.

紫外吸收光谱能反映物质间化学成分上的异同. 本研究所制备的鸡脾脏小分子活性物质提取液及各柱层析后的各组分具有各自不同的最大紫外吸收峰值和 $D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$, 表明提取液与各组分间在化学成分上存在差异. 朱传福等[9] 认为, 脾脏小分子活性物质提取物的 $D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$ 值能反映其中多肽和核苷酸含量之间的比例关系, $D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$ 值高则核苷酸所占的比例大, 反之则多肽的比例大. 本研究所得鸡脾脏小分子活性物质提取液及各组分的 $D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$ 值各不相同: 组分 III> 组分 II> 提取液> 组分 I, 表明提取液及各组分中核苷酸与多肽含量的比值: 组分 III> 组分 II> 提取液> 组分 I, 即: 组分 I 中多肽的比例要高, 而组分 II、组分 III 中核苷酸的比例要高.

3.2　鸡脾脏小分子活性物质的氨基酸分析

已有的研究指出, 不同动物来源的脾脏转移因子的透析外液均含有各种常规氨基酸, 但氨基酸的组成存在差异[10]. 崔恒宓等[11] 的研究进一步表明, 不同日龄猪的脾脏转移因子透析外液的氨基酸构成也存在差异. 但上述研究均以透析外液为对象.

本研究测定了不同日龄粤黄鸡脾脏小分子活性物质各组分的氨基酸含量, 结果表明, 同一日龄间, 组分 I 的氨基酸总量远高于组分 II 和组分 III, 提示鸡脾脏小分子活性物质的多肽成分主要在组分 I 中, 组分 I 的 $D_{260\,nm}/D_{280\,nm}$ 较低也表明了这一结果. 组分 II 的氨基酸总量低于组分 I, 但其 Tyr, Lys 和 Cys 的含量却高于组分 I 和组分 II; 另外, 组分 II 中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Val, Met 和 Cys 含量较高,而组分Ⅰ中 Gly、Ala 和 Glu 的含量较高,且 Pro 和 His 只有组分Ⅰ中含有,这些结果均提示同一日龄鸡脾脏小分子活性物质各个组分的多肽结构可能互有差异.

不同日龄间,各组分的主要氨基酸种类相近,但总氨基酸含量存在日龄差异,30 日龄要低于 60 和 90 日龄,提示鸡脾脏小分子活性物质的氨基酸含量存在日龄差异. 本试验中,30 日龄样品的组分Ⅰ与组分Ⅲ、60 和 90 日龄样品的组分Ⅱ中未测出 Arg,30、60、90 日龄样品中的组分Ⅱ与组分Ⅲ中未测出 Pro,30 日龄样品的组分Ⅰ和 30、60、90 日龄样品中的组分Ⅱ与组分Ⅲ中未测出 His,其原因尚不清楚. 其中 3 个不同日龄样品的组分Ⅱ与组分Ⅲ中均未检测到 Pro 与 His,进一步提示鸡脾脏小分子活性物质提取液的 3 个组分可能在肽的结构上存在差异.

在氨基酸种类上,20 种常规氨基酸中,除 Trp、Gln 和 Asn 外,其余 17 种氨基酸均可在鸡脾脏小分子活性物质中检测到,其中组分Ⅰ和组分Ⅲ中 Gly 均有较高含量. Wilson 等[12] 曾报道,脾脏小分子活性物质提取液的活性组分中含有较高的 Gly, Ser 和 Glu;而 Borvak[13] 则进一步指出,G－25 柱层析各组分均含有 Gly 和 Ser,且各组分免疫活性的强弱与这两种氨基酸的浓度呈正相关. 本试验所得到的组分Ⅰ和组分Ⅲ中亦以 Gly 含量最高,对其生理意义尚有待于进一步研究.

参考文献:

[1] ROZZO S J, KIRKPATRIK C H. Purification of transfer factor [J]. Molecular Immunology, 1992, 29: 167－182.

[2] HAMBLIN A S, DUMONDE D C, DUMOUDE R N. Human transfer factor *in vitro* II. Augmentation of lymphocyte transformation to phytohomagglutinin[J]. Clinical and Experimental Immunology, 1976, 23: 303－313.

[3] 马 炎,姜 训,严 杰. 胎盘转移因子对荷瘤小鼠脾脏 IL－2 诱生水平和外周血 TNF 活性的调节作用[J]. 上海免役学杂志, 1994, 14(3): 148－150.

[4] 江青艳,戴远威,傅伟龙,等. 脾脏转移因子对粤黄鸡免疫机能的影响[J]. 畜牧兽医杂志, 1996, 15(3): 6－8.

[5] 江青艳,傅伟龙,戴远威,等. 脾脏转移因子对粤黄鸡生长发育以及血液 T_4, T_3, GH 水平的影响[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(增刊): 1－5.

[6] 李富桂,张文生. 鸡转移因子的制备及其应用研究: Ⅰ 制备及理化、生物特性检测[J]. 中国畜禽传染病, 1994. (5): 47－48.

[7] 李建武,肖能赓,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 47－56.

[8] BURGER D R, VANDENBACK J A, DAVES D, et al. Human transfer: fractionation and biologic activity[J]. The Journal of Immunology, 1976, 117: 789－796.

[9] 朱传福,赵翠云,钟淑琴. 转移因子质控标准的实验研究[J]. 中国生化药物杂志, 1995, 16 (6): 267－268.

[10] 佟世德,蒋忠军,宋 炀. 不同动物脾转移因子的成分分析. 中国兽医科技, 1995, 25(9): 6－8.

[11] 崔恒宓,金韶华,毛九德,等. 猪脾转移因子的部分生化和免疫活性及其应用[J]. 畜牧兽医学报, 1994, 25 (4): 317－322.

[12] WILSON G B, WELCH T M, KNAPP D R, et al. Characterization of Tx, an active subfraction of human dialyzable transfer factor[J]. Clinical Immunology and Immunopathology, 1977, 8: 551－568.

[13] BORVAK J. Chromatography of human leukocytic ultrafiltrate [A]. HUO B L, ZOU Z, WAN R Z. Proceedings of the fifth international symposium on transfer factor[C]. Beijing: Academic Periodical Press, 1988. 33－37.

Proximate Analysis of Chicken Spleen Micromolecule Active Mass

JIANG Qing-yan, HUANG Jun-er, FU Wei-long

(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Thirty Yuehuang broilers aged 30, 60, 90 days respectively were slaughtered and the decapsulated spleen collected. The spleen micromolecule active mass was extracted by homogenation-dialysis. After sterile filtration, the extract was dispensed in small batches and stored at －20 ℃. The proximate analysis was conducted with Sephadex G－25 size-exclusion chromatography system, automatic amino acid analyzer and untraviolet spectrophotometer. The results showed that three fractions were isolated from the extract of chicken spleen micromolecule active mass by Sephadex G－25 size-exclusion chromatography, the physiochemical properties among the fractions were different. The amino acid species in the extracts of chicken spleen micromolecule active mass at different ages of birds were similar, while the composition and the amount of amino acids among the fractions were different.

Key words: chicken; spleen micromolecule active mass; chromatogaphy

【责任编辑 柴 焰】

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net