

技术与方法

视黄醇结合蛋白的分离纯化及其抗血清的制备*

金 宏 高兰兴 王宗印 许志勤

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

提 要

建立了经硫酸铵分级、DEAE-Sephadex A25 柱、Sephadex G200 柱、Ultrogel ACA44 柱和 Sephadex G100 柱层析分离纯化人血浆视黄醇结合蛋白的方法。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 其纯度达到电泳纯。以此电泳纯的视黄醇结合蛋白免疫家兔得到了高效价的抗血清。

关键词 视黄醇结合蛋白, 分离纯化, 抗血清

视黄醇结合蛋白(RBP)是维生素A在机体转运的载体蛋白, 与维生素A的代谢有密切的关系, 而且RBP的半衰期只有半天^[1], 极易受蛋白质热能营养状况的影响, 是目前已知的最灵敏的反映蛋白质营养状况的评价指标。近年来, 随着维生素A防、治癌症研究的深入, 也使RBP的研究受到人们的进一步重视。

RBP为单一肽链蛋白质, 分子量约为21 000^[2]。正常情况下, 血液中大部分RBP与视黄醇和前白蛋白(TTR)结合成视黄醇-RBP-TTR蛋白复合物进行循环^[3]; 视黄醇-RBP复合物在330nm处有最大紫外吸收, 在330nm激发光下, 在460nm处有强荧光产生^[4]; 放射免疫测定正常人RBP水平约为40—50 μ g/ml^[5-7]。分离制备RBP的纯品是制备RBP抗血清, 建立RBP免疫测定方法的关键, 国内尚未见到分离纯化RBP的正式报道。我们通过DEAE-Sephadex A25, Sephadex G200, Ultrogel ACA44和Sephadex G100四步柱层析分离纯化了RBP, 得到了解离为单一蛋白质的RBP电泳纯产品, 并获得较高效价的抗血清。

1 材料与方法

1.1 材料

冷冻血浆: 天津市中心血站提供; DEAE-Sephadex A25, Sephadex G200及Sephadex G100均为日本进口上海分装; Ultrogel ACA44 LKB产品; 电泳用标准蛋白: 华美生物公司产品; 前白蛋白抗血清: 上海生物制品公司产品; 福氏完全佐剂: 军事医学科学院五所提供。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

蛋白浓度测定采用改进的Lowry法^[8], 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

以SDS-10%聚丙烯酰胺凝胶电泳检验提纯的RBP纯度^[9]。

以琼脂板双向免疫扩散试验检验分离的RBP是否与前白蛋白解离, 测定抗血清的效价^[10]。

2 结 果

2.1 RBP的分离纯化

2.1.1 硫酸铵沉淀法分离球蛋白 1 000ml血浆加入相同体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入过程中不断搅拌, 全部加完后, 再搅拌

*国家自然科学基金青年基金资助项目。

收稿日期: 1992-10-10 修回日期: 1993-01-27

5min, 4℃下 3000r/min 离心 15min, 弃去上清, 沉淀用半饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液洗两次、离心, 弃去上清, 沉淀用 0.02mol/L pH7.4 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 500ml 溶解, 并对其透析 48h, 得蛋白浓度约 600mg/ml 的血浆球蛋白溶液。

2.1.2 DEAE-Sephadex A25 柱层析

20ml 透析后的血浆球蛋白, 上至用 0.02mol/L pH7.4 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液平衡好的 DEAE-Sephadex A25 柱 (4cm×100cm), 用 0—0.5mol/L NaCl (含 0.02mol/L pH7.4 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液) 进行直线梯度洗脱, 洗脱速度 40ml/h, 洗脱时间 18h。分离后, 测定紫外监测仪记录的 280nm 处各蛋白峰在 330nm 激发光下, 460nm 处的荧光强度, 绘出荧光曲线图, 将紫外吸收与荧光峰对照, 找出产生最强荧光的蛋白峰, 收集强荧光蛋白峰 92—108 管, 每管 5ml, 浓缩得到粗分的 RBP, 蛋白浓度 10mg/ml (图 1)。

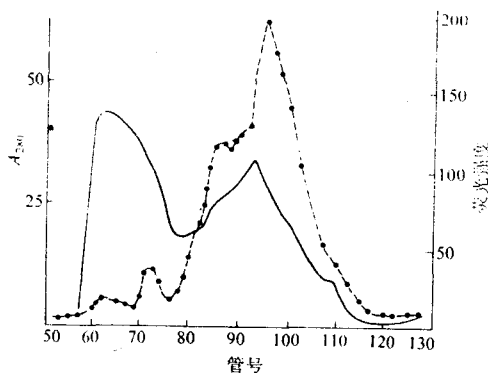


图 1 血浆球蛋白 DEAE-Sephadex A25 柱层析图谱

洗脱速度: 40ml/h

——紫外吸收曲线; ······荧光强度曲线

2.1.3 Sephadex G200 柱层析 5ml 粗分 RBP 蛋白溶液, 对 0.02mol/L pH7.4 内含 0.2mol/L NaCl 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液透析后, 上至经透析液平衡的 Sephadex G200 柱 (2.5cm×80cm), 用平衡透析缓冲液洗脱, 洗脱速度 20ml/h, 洗脱时间 30h, 分离后, 测定各

蛋白峰在 330nm 激发光下, 460nm 处的荧光强度, 绘出荧光曲线, 收集有强荧光的蛋白峰 110—130 管, 每管 2.5ml, 浓缩得到精制 RBP, 蛋白浓度 3mg/ml (图 2)。

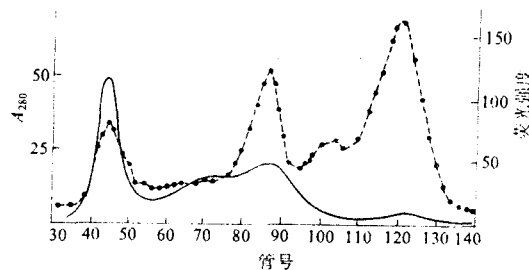


图 2 RBP 粗品 Sephadex G200 柱层析图谱

洗脱速度: 20ml/h

——紫外吸收曲线; ······荧光强度曲线

2.1.4 Ultrogel ACA44 柱层析 3ml 精制 RBP 蛋白溶液, 对 2mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液平衡透析除盐, 上至用透析缓冲液平衡的 Ultrogel ACA44 柱 (2cm×40cm), 用平衡透析缓冲液洗脱, 洗脱速度 15ml/h, 洗脱时间 12h, 分离后测荧光, 绘出荧光曲线图, 收集有强荧光的蛋白峰 19—26 管, 每管 2.5ml, 浓缩得到解离 RBP, 蛋白浓度 1.0mg/ml (图 3)。

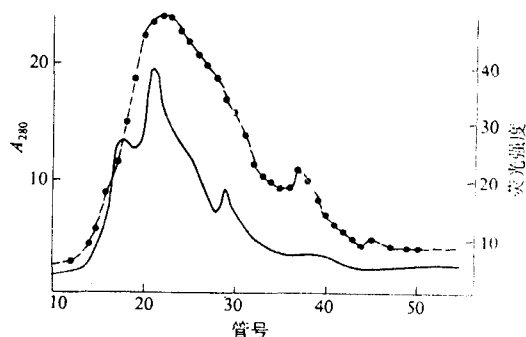


图 3 G200 分离后 RBP Ultrogel ACA44 柱层析图谱

洗脱速度: 15ml/h

——紫外吸收曲线; ······荧光强度曲线

2.1.5 Sephadex G100 柱层析 3ml 解离 RBP 蛋白溶液, 对 2mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液平衡透析, 上至经透析液平衡的

Sephadex G100 柱((2.5cm×50cm),用平衡透析液洗脱,洗脱速度 15ml/h,洗脱时间 12h,分离后测荧光,绘出荧光曲线图,得到一个紫外吸收与荧光基本重合的峰,收集浓缩得到的 RBP 产品,浓度约为 0.86mg/ml(图 4).

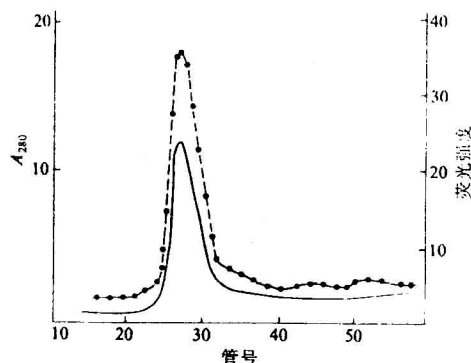


图 4 RBP Sephadex G100 柱层析图谱

洗脱速度:15ml/h

——紫外吸收曲线; · ---- · 荧光强度曲线

1000ml 冷冻血浆约得到 12mg RBP 纯化产品.

2.2 分离提纯的 RBP 的鉴定

分离提纯的 RBP 进行 SDS-10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝 R250 染色,显示为单一蛋白区带(图 5). 将标准蛋白分子量对电泳

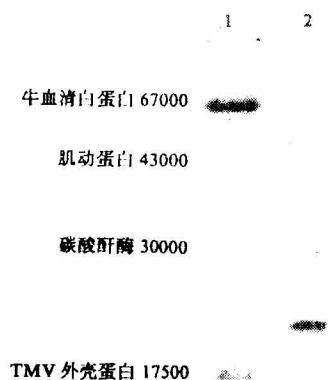


图 5 SDS-10%聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 标准蛋白质:自上而下,牛血清白蛋白,肌动蛋白,碳酸酐酶,TMV 外壳蛋白,另一标准蛋白磷酸化酶 b 的带太浅而不易看清. 2. 分离提纯的 RBP

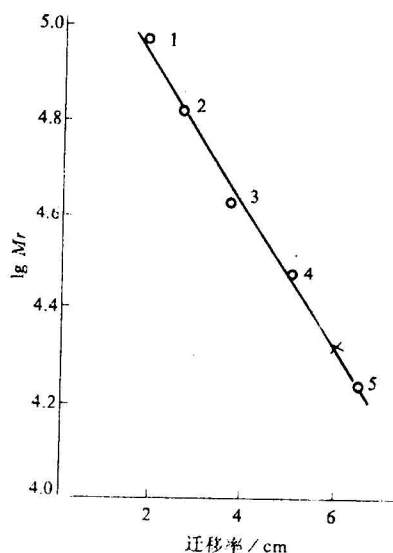


图 6 SDS-10%聚丙烯酰胺凝胶电泳测定

RBP 分子量

标准蛋白分子量:1. 磷酸化酶 b, 94 000;

2. 牛血清白蛋白, 67 000; 3. 肌动蛋白,

43 000; 4. 碳酸酐酶, 30 000; 5. TMV 外壳

蛋白, 17 500; (×) RBP 分子量, 约为 21 000

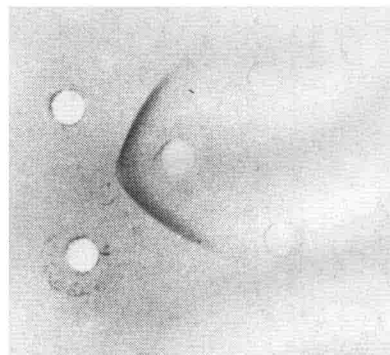


图 7 分离提纯的 RBP 及正常人血清与前白蛋白

抗血清 4 倍稀释液双向免疫扩散图谱

左面两孔为正常人血清, 右面两孔为分离提纯的

RBP, 中间孔为前白蛋白抗血清 4 倍稀释液

迁移率作图为一一直线, 对照 RBP 与标准蛋白的迁移率, 分离提纯的 RBP 分子量约为 21 000 (图 6). 与文献报道结果一致^[2].

测定分离提纯的 RBP 在 280nm 与 330nm 处的紫外吸收值, 其比值 A_{330}/A_{280} 为 0.97, 接近于文献报道的结果^[2,11].

前白蛋白抗血清(效价 60)用 0.1mol/L pH7.1 磷酸盐缓冲液稀释 4 倍, 与分离提纯的

RBP 进行琼脂双向免疫扩散试验(图 7),血清样品产生清晰的沉淀,表明抗血清是高效的;但其与分离提纯的 RBP 样品(含量 0.86mg/ml)却无沉淀生成,表明分离提纯的 RBP 不含前白蛋白,为解离的 RBP.

2.3 RBP 抗血清的制备与效价测定

2.3.1 抗血清制备 分离提纯的 RBP 溶液(浓度 0.86mg/ml)与等体积的福氏佐剂研磨至油包水状.在新西兰白兔前肢双腋下皮下注射,以后每 10d 于背部,后肢等多点注射,加强免疫,于第 5 次免疫后 10d,进行颈动脉放血,分离血清,置-30℃冰箱备用.

2.3.2 抗血清效价的测定

抗血清用 0.1mol/L pH7.1 的磷酸盐缓冲液按 1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:28 稀释,加在用稀释液配成的 1%琼脂板上,与提纯的 RBP 进行免疫双扩散试验,显示 RBP 抗血清效价为 1:64.

3 讨 论

正常情况下,RBP 与前白蛋白(TTR)形成复合物存在于血液循环^[3],并且这种复合物是较稳定的,Sephadex G200 分离后得到的高荧光蛋白峰,主要是 RBP 与 TTR 的复合物,因此,RBP 分离提纯的难点就在于如何使其与 TTR 解离开,我们用低离子强度的 0.002 mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液为平衡透析液,使 RBP 与 TTR 解离开,用 Ultrogel ACA44 层析柱将它们分离开,得到电泳纯的 RBP.

1000ml 血浆分离提纯得到 12mg 的 RBP,按照国外文献^[5-7]的报道的正常人水平计算,收率为 30%左右,而按照中国人维生素 A 水平低于外国人水平来推测,中国人 RBP 水平也可能低于外国人水平,则本分离提纯的程序收率可能还要高些.说明本程序不但方法简单、可靠、得到电泳纯的 RBP,而且有较高的收率.

分离提纯的 RBP 的鉴定,由于没有商品的 RBP 作为标准对照来直接证明分离提纯的产品,但我们认为:分离提纯的产品,经 SDS-10%

聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一区带,与已知分子量的电泳标准蛋白比较分子量,从紫外吸收和荧光特征等方面间接地均可证明,分离提纯的产品为电泳纯的 RBP.

RBP 的分子量为 21 000^[2],分子量不大,按照一般免疫学原理,分子量小的物质,其抗原性相对较弱,因此,在制备抗血清的过程中,我们采用增加免疫次数,提高免疫密度及使用完全福氏佐剂等方法来提高免疫性,提高抗血清的效价,实践证明是行之有效的.

参 考 文 献

- 1 Smith F R, Suskind R, Thanangkal O *et al.* Plasma vitamin A, retinol-binding protein and prealbumin concentrations in protein-calorie malnutrition. III. Response to varying dietary treatments. *Am J Clin Nutr*, 1975; **28**: 732
- 2 Kanai M, Raz A, Goodman D S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*, 1968; **47**: 2025
- 3 Raz A, Shiratori T, Goodman D S. Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. *J Biol Chem*, 1970; **245**: 1903
- 4 Peterson P A, Rask L. Studies on the fluorescence of the human vitamin A-transporting protein complex and its individual components. *J Biol Chem*, 1971; **246**: 7544
- 5 Smith F R, Raz A, Goodman D S. Radioimmunoassay of human plasma retinol-binding protein. *J Clin Invest*, 1970; **49**: 1754
- 6 Smith F R, Goodman D S. The effects of diseases of the liver, thyroid and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*, 1971; **50**: 2426
- 7 Davila-Bloom M E, Blaner W S, Goodman D S. Monoclonal antibody studies of the antigenic determinants of human plasma retinol-binding protein. *J Nutr Biochem*, 1990; **1**: 262
- 8 张龙翔,张庭芳,李令媛主编.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1981:164—165
- 9 Hanes B D, Rickwood D 著,刘毓秀等译.蛋白质的凝胶电泳:实践方法.北京:科学出版社,1986:14—35
- 10 中山大学生化微生物教研室:生化技术导论.北京:人民教育出版社,1978:256
- 11 Peterson P A. Characteristics of a vitamin A transporting protein complex occurring in human serum. *J Biol Chem*, 1971; **246**: 34