

家兔皮肤中 I 型胶原的提取与纯化

刘 平 蒋冰冰 张礼邦 唐民主
洪嘉禾 阮望春 刘 成 俞广声
徐列明 薛惠明 赵佩珠 王玉润

(上海中医学院)

胶原纤维是结缔组织中最重要成分,其生物合成及分解过程正逐步被阐明^[1]。胶原的提取与纯化,是测定生理及病理情况下胶原代谢有关酶活性所不可缺少的重要步骤。本文参照国外有关文献,加以适当改进,成功地从家兔皮肤中提取 I 型胶原 (type-I-collagen),现将结果报告如下:

材 料 与 方 法

一、皮肤的制备及胶原的提取

取成年家兔,由耳静脉注入空气致死,迅速

剥下兔皮,去毛及皮下脂肪,称重,然后将皮肤放入冰中(下述各步骤除特殊说明外,均在 4℃ 条件下进行),切碎,用绞肉机将其绞成肉泥状,置入烧杯中,加入 2.5 倍量的中性盐提取液(0.1 M Tris, 0.2 M NaCl, 0.1 mM EDTA, pH7.6),搅拌 2—3 小时后,12,000g 离心 30 分钟;弃上清液,沉淀部分加入 2.5 倍量的 3% 冰醋酸 (HAc) 溶液,抽提搅拌过夜;20,000g 离心 90 分钟。保存上清液以备纯化。其沉淀部分可再加入 3% HAc 进行第二、第三次提取。

二、胶原的纯化 参照文献[2]的方法。

照试验组没有区别,这说明 SJAMP 对脾细胞、胸腺细胞和巨噬细胞有作用,而对人的红细胞和鞣酸化羊红细胞无影响,从而证明 SJAMP 对免疫活性细胞的作用具有一定的选择性。

4. 为了了解 SJAMP 对免疫活性细胞的作用机理和淋巴细胞在 SJAMP 的刺激下能否产生某些淋巴因子,作者用 SJAMP 与小鼠脾细胞一起温育的上清液进行 TEEM 和 MEM 试验。结果表明鞣酸化羊红细胞和巨噬细胞在加有经 SJAMP 刺激的脾细胞温育的上清液后,细胞电泳速度显著高于不加经 SJAMP 刺激的脾细胞温育的上清液组 (P 值 <0.05), TEEM 值分别为 1.16 ± 0.186 — 1.53 ± 0.271 和 1.04 ± 0.102 — 1.12 ± 0.074 。这说明上清液中脾细胞在 SJAMP 作用下可能产生了某些物质。同时也证明 SJAMP 对鞣酸化羊红细胞没有直接作用。用巨噬细胞株 (MMC-1) 的巨噬细胞作为指示细胞,进行巨噬细胞电泳试验, SJAMP

加脾细胞组和只用 SJAMP 组(其 EPM 值分别为: 0.94 ± 0.42 , 0.94 ± 0.35) 皆高于对照(无 SJAMP) 组 (EPM 值为 0.84 ± 0.302), 这一点似乎说明 SJAMP 对巨噬细胞有直接作用。

5. “654-2”, 黄芪和柴胡对脾细胞电泳速度没有影响(表 1)。

参 考 文 献

- [1] 李唯敏等: 天津市医药科学研究所, 内部资料, 1984, 2。
- [2] 王士贤等: 天津市医药科学研究所, 内部资料, 1984, 4。
- [3] 李德华等: 《中国药理学报》, 2(2), 131, 1981。
- [4] 王士贤等: 《天津医药》, 5, 300, 1981。
- [5] J. N. Mehrishi: *International Meeting on Cell Electrophoresis*, Rostock G. D. R., Sep. 1984。
- [6] De Groot C. et al.: *Eur. J. Cell Biol.*, 24, 9—15, 1981。
- [7] Sainis K. B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.* 643, 134—139, 1981。

[本文于 1985 年 10 月 10 日收到]

1. 盐析沉淀: 胶原溶于 3% 的 HAc 溶液中, 但不溶于 3% HAc-5% NaCl 溶液中。

在 3% HAc 提取的上清液中加入 15% NaCl 溶液, 直至最终浓度达 5%。搅拌过夜, 10,000g 离心 30 分钟。沉淀部分再用 3% HAc-5% NaCl 溶液洗三次, 将沉淀物溶于 3% HAc 中。对 3% HAc 反复透析, 以去除盐。

2. 低离子强度沉淀: 胶原在低离子强度的中性 pH 条件下可沉淀下来。

将胶原溶液对 0.1 M Tris pH 7.4 溶液透析, 更换透析液 5—6 次(直到平衡后溶液的 pH 仍保持中性)。再对 0.01 M Tris, pH 7.4 溶液透析, 直至所有胶原沉淀(更换透析液约 6—7 次), 12,000g 离心 30 分钟, 用 0.01 M Tris 溶液沉洗三次, 将沉淀物溶解于 3% HAc 中, 对 1% HAc 透析。然后将该过程重复一次。

3. 加热致凝胶化: 在 25℃、中性 pH 的条件下, 胶原可形成凝胶。

在上述提取液中加入固体 NaCl 至最终浓度为 0.15 M, 再用 1 N NaOH 缓慢调节 pH 至 7.4。置于 25℃ 水浴中加热 1 小时, 此时胶原呈乳光色凝胶状。25℃ 下, 8,000g 离心 30 分钟, 再用 0.1 M Tris-0.15 M NaCl, pH 7.4 溶液沉洗三次; 沉淀部分溶解于 1% HAc 中, 对 1% HAc 溶液反复透析, 直至胶原全部溶解。

4. 超速离心: 目的在于去除较难溶解的大得多聚体胶原。用日立 RP-50T 转子, 50,000 rpm 离心 3 小时, 使胶原溶液澄清, 弃沉淀。

5. 三氯醋酸-乙醇沉淀: 非胶原蛋白可被三氯醋酸 (TCA) 沉淀, 而胶原则可通过加入乙醇从上清液中沉淀下来。

用 2.5% 柠檬酸溶液配制 25% TCA 溶液, pH 3.0, 缓慢加入胶原溶液中, 至 TCA 最终浓度达 2.5%。20,000g 离心 30 分钟, 弃沉淀, 用 NaOH 将上清液 pH 调至 7.4, 缓慢加入冷的无水乙醇, 至最终浓度为 15%, 放置过夜。20,000g 离心 30 分钟, 用 15% 冷乙醇溶液沉洗三次, 沉淀部分溶解于 3% HAc 溶液中, 对 1% HAc 溶液透析, 至胶原全部溶解。

三、I 型胶原的纯化 参照文献 [3] 的方

法^[3]。各型胶原可被不同浓度的 NaCl 所沉淀。

将胶原溶液对 pH 7.3, 0.1 M Tris 缓冲液透析, 更换透析液直至平衡后液体的 pH 值仍维持中性; 加入 5.1 M NaCl 至最终浓度为 1.7 M, 搅拌过夜, 18,000g 离心 30 分钟, 弃沉淀(此部分为 III 型胶原)。上清液中加入 4.0 M NaCl 至最终浓度为 2.5 M, 搅拌过夜。22,000g 离心 30 分钟, 沉淀溶解于 1% HAc 溶液中, 对 1% HAc 透析, 然后重复此过程。最后所得到的胶原溶解于 1% HAc 溶液中。对 1% HAc 反复透析, 真空冷冻干燥, 称重, 保存于 -20℃ 冰箱中。

四、聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳鉴定胶原纯度 参照文献 [4] 的方法^[4]。

1. 样品的制备: 取 0.1% 胶原溶液(胶原溶解于 0.1 M Tris 0.2 M NaCl 溶液, pH 7.4) 300 μ l。样品共分为三管(空白胶原管, 胶原酶管及胰蛋白酶管), 每管均加入一定量的培养液 (0.1 M Tris, 0.4 M NaCl, 0.01 M CaCl_2), 胶原酶管加入精制细菌性胶原酶(上海医药工业研究院制) 30 单位, 胰蛋白酶管加入小牛胰蛋白酶(上海东风生化制药厂产) 3 μ g, 总反应体积为每管 0.9 ml, pH 7.4, 25℃ 水浴中保温反应 24 小时, 然后取出 300 μ l, 加入 12 μ l HAc (至 pH 3.4), 12,000g 离心 5 分钟, 上清液置 pH 4.8 HAc 溶液中反复透析, 然后在 45℃ 下加温 10 分钟, 使胶原变性。另外还设一未保温空白胶原管, 取 0.1% 胶原溶液 100 μ l, 加入 pH 4.8 HAc 溶液 200 μ l, 对 pH 4.8 HAc 溶液透析, 并经加温致变性后直接进行电泳。将电泳样品 300 μ l 加入 40% 甘油 100 μ l 混和后, 直接上样。

2. 聚丙烯酰胺凝胶制备: 分离胶含聚丙烯酰胺 7.5%, pH 4.2, 浓缩胶含聚丙烯酰胺 2.5%, pH 5.8。

电极缓冲液含 HAc 0.24%, 甘氨酸 1.725%, pH 4.0。电泳时每根凝胶管的电流量为 5 mA (上海产 722 M 型电子稳压型电泳仪), 电泳时间约 80 分钟。

凝胶用 0.2% Coomassie 亮蓝 R 250 溶液

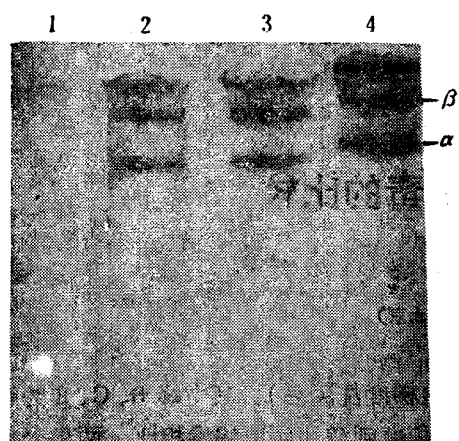


图1 提纯的I型胶原聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

1. 加入胶原酶反应管。
 2. 加入胰蛋白酶反应管。
 3. 经24小时保温空白胶原管。
 4. 未经保温的空白胶原管。
- α : I型胶原单聚体。
 β : I型胶原二聚体。

(甲醇: HAc: 水为5:1:4)染色3小时后,用含7.5% HAc和5%甲醇溶液脱色。电泳结果见图1。

讨 论

I型胶原广泛存在于真皮,肌腱,骨及齿等组织中,而以真皮中含量最高。未经共价交联的原胶原为可溶性胶原,它的提取与纯化,是检测在生理及病理情况下胶原代谢过程中有关酶活性的重要依据。如上所述,本文提取的I型胶原经圆盘电泳证实,其纯度较高,仅可见到 α 带(单聚体)及 β 带(二聚体),不混入其它杂区带,与国外有关文献报道的结果一致^[9]。经25℃、24小时保温后,仍能保持其特异性区带。胶原酶在中性条件下作用于原胶原分子,使其在离氨基端3/4处断裂成为两部分,然后在32℃以

(上接第50页)

和电刺激所取蝎毒的测定结果基本相似。

由此可见,两种方法所采集的蝎毒的主要有毒成份和毒素多肽的生化性质基本相同^[1],但两者的分离层析图谱,有效成分收率和毒性又存在着一定的差异。剪尾法所取的是蝎子毒腺中所储存的全部毒液,而电刺激法所取的是释放出的部分毒液,存在的差异可能是由于两

上条件下自动变性,丧失其螺旋构型。本实验证明,所提取的I型胶原单聚体,二聚体均可被细菌性胶原酶完全降解, α 、 β 带消失;而胰蛋白酶对该胶原无降解作用。

采用本实验方法从家兔皮肤中提取I型胶原,得率较高,250克湿重皮肤大约可提纯1克。

实验周期较长,约历时1个月,在此过程中始终保持4℃条件,是提取成功的重要保证,否则将会因温度过高而使提取物变性。在盐析过程中,应尽量避免加入固体盐,以防局部液体浓度过高而影响提取。改进的方法是先配制一定高浓度的盐溶液(预冷),然后在搅拌下缓慢加入。在纯化I型胶原之前,将提取液对pH 7.3的0.1M Tris缓冲液透析,直至平衡后的pH达7.3,这是必须的,不可用NaOH直接调pH,否则会降低得率。

聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳,由于本实验所用的缓冲系统是酸性的,在室温低于15℃的情况下,分离胶往往不能自动聚合,需在20℃以上的条件下进行。这在实验过程中也是应该加以注意的。

参 考 文 献

- [1] Gerlach, U., Pott, G. et al.: *Connective tissue of the normal and fibrotic human liver*, Georg Thieme, Stuttgart. New York, 1982.
- [2] Glimcher, M. J., Francois, C. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 93: 585, 1964.
- [3] Timpl, R., Glanville, R. W. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356: 1783, 1975.
- [4] Nagai, Y., Gross, J. et al.: *Ann. NY Acad. Sci.*, 121: 494, 1964.
- [5] Maruyama, K., Feinman, L. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 658: 124, 1981.

[本文于1986年1月20日收到]

者在组成成份、成份比例以及有毒组分分子结构等方面有一定差异。

与电刺激法相比,剪尾法简便、快速、收率高,适于大量采集蝎毒,缺点是活蝎只能供一次性采集。

参 考 文 献

- [1] 王锦兰等:《生物化学杂志》,1(3), 29—37, 1985.

[本文于1986年4月21日收到]