

技术与方法

人 IV 型胶原的提纯及其抗血清制备

刘 预 李伟道 林 丁 刘兴明 卢 萍

(重庆市肿瘤研究所中心研究室, 重庆 630030)

摘要 采用胃蛋白酶限制性消化, NaCl 分级盐析, 还原和烷基化反应, 纤维素离子交换层析从人胎盘组织分离纯化 IV 型胶原. 经 SDS-PAGE 电泳鉴定符合 IV 型胶原 α 肽链电泳带. 用纯化的 IV 型胶原免疫兔制备出高效价的特异抗血清.

关键词 IV 型胶原, 分离纯化, 抗血清

IV 型胶原 (type IV collagen, C IV) 是基底膜的重要成分, 主要由 2 条 α_1 肽链和 1 条 α_2 肽链组成三股螺旋结构. 近年研究表明 C IV 在肝纤维化的病理过程中起重要作用, 血清 C IV 水平变化是反映慢性肝病肝纤维化的敏感指标^[1]. 因此纯化 C IV 并建立免疫学检测方法具有重要的临床应用价值. 我们从人胎盘中提纯 C IV 并制备出抗血清.

1 材料与方法

1.1 材料

正常妊娠足月分娩胎盘, 迅速 -30°C 冻存. 胃蛋白酶和 I 型胶原为 Sigma 产品. β -巯基乙醇和碘乙酸钠为 Fluka 产品. DE52 和 CM52 为 Whatman 产品. Na^{125}I 为中国原子能科学研究院产品. I 型和 III 型前胶原为本室纯化. 其余试剂为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 C IV 的提纯: 以下操作除注明外, 在 4°C 进行. 胎盘去除脐带、羊膜和绒毛膜, 洗净制备匀浆, 沉淀置于 0.5 mol/L 甲酸, 加入胃蛋白酶限制性消化. 离心, 上清液加 NaCl 至 6% , 沉淀复溶于 0.03 mol/L Tris-HCl pH 7.6 含 0.2 mol/L NaCl. 加入 NaCl 至 1.8 mol/L , $50\,000\times g$ 离心 1 h. 沉淀复溶于

0.5 mol/L Tris-HCl pH 8.0. 加 0.02 mol/L β -巯基乙醇 20°C 20 h, 随后加 0.018 mol/L 碘乙酸钠 20°C 1 h. 对 0.5 mol/L 甲酸充分透析后再次加入胃蛋白酶限制性消化. 用 6% NaCl 盐析, 沉淀溶于 0.03 mol/L Tris-HCl pH 8.6 含 2 mol/L 尿素和 0.2 mol/L NaCl, 透析平衡后上 DE52 层析柱 ($2.6\text{ cm}\times 15\text{ cm}$), 收集第 1 峰样品再过 CM52 层析, 用 0.04 mol/L 醋酸钠含 2 mol/L 尿素 pH 4.8, $0\sim 0.2\text{ mol/L}$ NaCl 梯度洗脱, 收集梯度洗脱后的第 1 峰样品, 透析浓缩后 -85°C 保存.

1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 采用 Furthmayr 的方法^[2].

1.2.3 抗血清制备及鉴定: 用纯化的 C IV (2 g/L) 与福氏完全佐剂乳化, 背部皮下多点注射免疫新西兰白兔, 4 周后同样剂量 C IV 与不完全福氏佐剂乳化加强免疫, 间隔 2 周后再加强 1 次, 颈动脉放血收集抗血清 -85°C 保存. 用氯胺 T 法进行 C IV 的 ^{125}I 标记, Sephadex G-25 层析分离纯化 ^{125}I -C IV 标记抗原. 采用放射免疫法和免疫双扩散法检测抗血清效价及特异性.

2 结果与讨论

2.1 C IV的纯化和鉴定

胎盘匀浆经胃蛋白酶消化, NaCl 分级盐析, 还原和烷基化反应提取的 C IV粗提物过 DE52 层析, 胶原蛋白不与 DE52 结合形成穿过峰 (第 1 峰), 其他酸性杂蛋白与 DE52 结合而达到分离, 用 1 mol/L NaCl 洗脱时形成第 2 峰. DE52 第 1 峰样品经 CM52 层析进一步纯化使 C IV与 III型胶原分离. C IV出现在梯度洗脱后的第 1 峰. SDS-PAGE 电泳显示纯化的 C IV为 2 条带, 前 1 条带迁移率略快于标准 I 型胶原 α_2 肽链; 后 1 条带迁移率与 α_1 肽链相同 (图 1) 符合人 IV型胶原 α_1 和 α_2 肽链的电泳图谱^[3]. 经考马斯亮蓝染色后, 纯化的 C IV呈胶原特有的粉红色而非胶原蛋白呈蓝色, 与文献结果相符^[4]. 纯化的 C IV样品紫外光谱最高吸收峰位于 230 nm, 而 280 nm 吸收较低, 符合胶原特征.

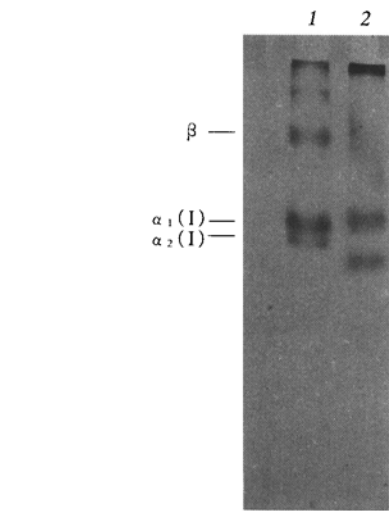


图 1 SDS-PAGE 电泳图谱

1: 标准 I 型胶原; 2: 纯化的 C IV.

2.2 抗血清鉴定

制备的抗血清与纯化的 C IV在免疫双扩散呈单一沉淀线, 与 I 型胶原和前胶原, III型前

胶原无沉淀线. 放射免疫测定抗血清效价为 1: 15 000. 放免分析表明抗血清与纯化的 C IV和标准 C IV有相同的反应曲线, 与 I 型前胶原和 III型前胶原无交叉反应.

我们应用纯化的 C IV及其特异抗血清建立了 C IV放射免疫测定法并初步应用于临床 (另文报道). 检测结果表明慢性肝炎, 肝硬化和原发性肝癌合并肝硬化患者血清 C IV水平显著升高, 是诊断肝纤维化及肝硬化的良好指标.

参 考 文 献

1 Ueno T, Inuzuka S, Torimura T *et al.* Significance of serum type IV collagen levels in various liver diseases. *Scand J Gastroenterol*, 1992, **27**: 513~ 520
2 Furthmayr H, Timpl R. Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate polyacrylamide electrophoresis. *Anal Biochem*, 1971, **41**: 510~ 516
3 Furthmayr H. *Immunochemistry of the Extracellular Matrix*. Florida: CRC Press, 1982, 62~ 70
4 McCormick P J, Chandrasekhar S, Millis A T. Direct Visualization of collagens and procollagens in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1979, **97**: 359~ 366

Purification of Human Type IV Collagen and Preparation of Its Antiserum. LIU Yu, LI Weidao, LIN Ding, LIU Xingming, LU Ping (*Chongqing Cancer Institute, Chongqing 630030, China*).

Abstract Native type IV collagen (C IV) was isolated and purified from human placenta by pepsin limited digestion, fractional salt precipitation, reduction and alkylation, and cellulose chromatography. The two constituent α peptide chains of the purified C IV were identified by SDS-PAGE. Antiserum was prepared by immunizing rabbits with the purified C IV. The obtained antiserum against human C IV showed high titer and specificity.

Key words Type IV collagen, purification, antiserum