

人胎盘中 I、III、IV 型胶原的提取

朱明华 刘彦仿

(第四军医大学病理教研室,西安)

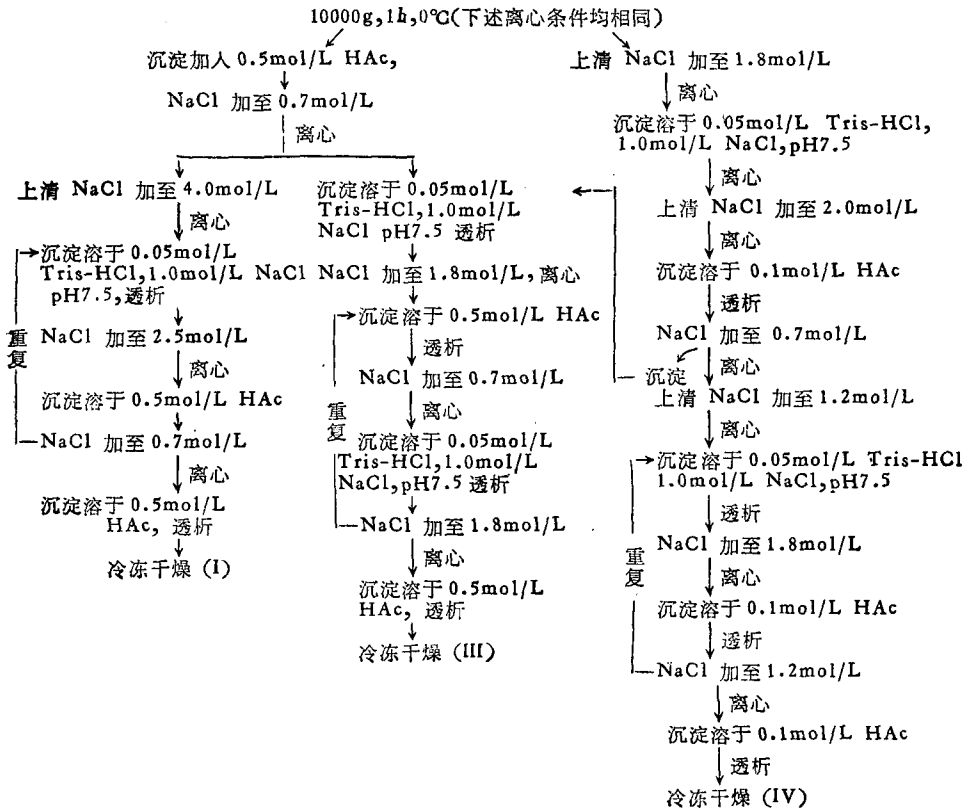
关键词 胶原,胎盘,提取, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

胶原蛋白是重要的细胞外基质成分,约占人体蛋白总量的 1/3,目前已确定的胶原至少有 12 种类型^[1],各型胶原都具有一定的分子构型、基因定位及组织分布特点。胶原的提取与纯化是进行胶原免疫组织化学研究的必要步骤。本文参照国外有关文献^[2-3]并作适当改进,成功地从人胎盘中提取了 I、III、IV 型胶原蛋白。

材料与方 法

取正常分娩的新鲜胎盘,去除胎膜及表层退变绒

毛,剪碎,浸洗除去血液后制备匀浆,溶于 5 倍量的中性盐提取液(0.05mol/L Tris-HCl, 1.0mmol/L PMSF, 10mmol/L Na-EDTA, 1.0mol/L NaCl, pH7.5), 4℃ 抽提 4 天,换液 4 次(以下步骤除注明者外,均为 4℃),沉淀溶于 0.5mol/L HAc,抽提 3 天,换液 3—5 次,抽滤,再溶于 0.5mol/L HAc,加入胃蛋白酶(上海生化研究所,酶:湿重组织为 1:400), 30℃ 搅拌 24h, 7000g 离心 1h, 0℃, 沉淀部分可进行二次胃酶消化。上清边搅拌边缓慢加入固体 NaCl 至 1.0mol/L, pH2.8, 继续搅拌 24h, 以后步骤按下述流程操作。



上述初步提纯的胶原进行离子交换层析,用 CM-Cellulose (CM-52, Whatman), 经常规碱、酸处理后起始缓冲液(0.04mol/L 醋酸钠, 2.0mol/L 尿素, pH 4.8)充分平衡,压力法装柱,线性梯度洗脱(NaCl 浓度为 0—0.4mol/L),收集各管对 0.1 mol/L HAc 透析,用 SP8-100 紫外分光光度计测蛋白量及最高吸收光峰(200—300nm 扫描)。经 CM-52 纯化的 I、III、IV 型胶原作 SDS-PAGE 垂直板电泳,另设胶原酶(Sigma)消化管,酶: 样品为 1:100 (W/W), 加入 5mmol/L CaCl₂, 22°C 水浴保温,离心取上清。电泳采用不连续缓冲系统,浓缩胶 3%, 分离胶 7.5%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸,含 0.1% SDS。

纯化胶原样品透析除盐,酸水解后用 Beckman 121MB 型氨基酸分析仪对主要氨基酸组成作定量分析。同时取纯化样品对 0.4% ATP, pH 2.8 溶液透析 24h 后,滴于制膜的镍网或铜网,自然干燥,经铅、铀染色后 DXA₄-10 型透射电镜观察

结果与讨论

经不同盐浓度分别于酸和中性条件下沉淀的粗提胶原,经 CM-52 层析可获得较纯的样品,其电泳区带见图 1。最高吸光峰位于 232nm,符合胶原的特征。氨基酸分析各型胶原的羟脯氨酸与脯氨酸之比均大于 1,甘氨酸含量占 30—32%,III 型胶原分子含有半胱氨酸残基。

透射电镜显示胶原具有明暗交替的横纹,符合胶原的形态特征(图 2)。

人胎盘中含有多种胶原成分,其中主要有 I、III、IV、V、及 VI 等^[6],目前从组织中提取胶原仍采用胃酶消化、分级盐沉淀方法,但在酸性条件下 I、III 型沉淀的盐浓度临界点相近,而在中性条件下 III、IV 型盐浓度临界点很接近,所以采用同一 pH 条件增加了分离的困难。本文用酸性和中性 pH 交替进行,分步在同一流程中提取了 I、III、IV 和 V 型胶原,经离子交换层析后获得的样品较纯。

胶原蛋白的免疫原性较差,而本法提取费时较长,在提取过程中控制温度是保持提取物抗原活性的关键。本文提取的 III 型胶原与作者制备的抗 III 型胶原单克隆抗体作免疫印迹试验,证明其抗原性保存较好,可满足免疫学研究的要求。

在盐沉淀时, NaCl 加入速度要慢且充分搅拌过夜,过快则出现明显的共沉现象,同时,每次透析必须充分,以免影响离子强度,增加下一步纯化的困难。

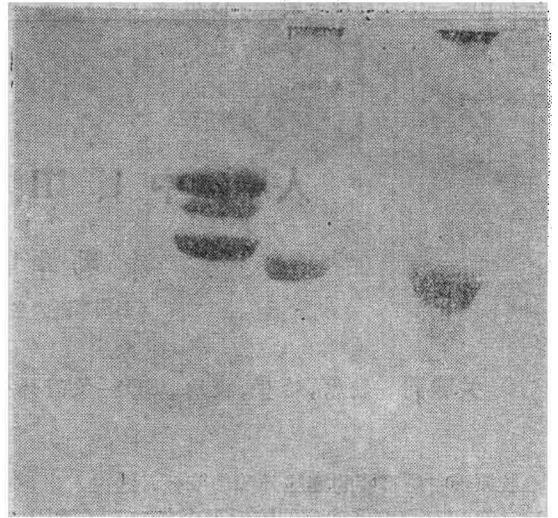


图 1 SDS-PAGE

1.III 型胶原经胶原酶消化, 2.IV 型, 3.III 型, 4.I 型经胶原酶消化, 5.I 型胶原。

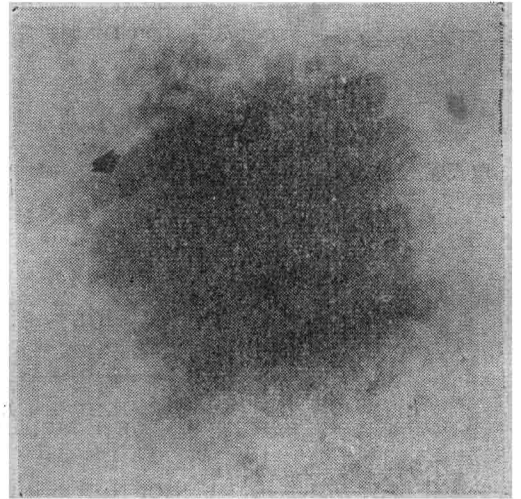


图 2 透射电镜下 III 型胶原形态
箭头示横纹

参 考 文 献

- 1 Dublet B *et al.* *J Biol Chem*, 1987; **262**:17724
- 2 Sage H *et al.* *J Biol Chem*, 1979; **254**:9893
- 3 Chung E *et al.* *Science*, 1974; **183**:1200
- 4 Glanville R W. *Immunochemistry of the extracellular matrix*, CRC Press, Vol 1, 1982:43—54
- 5 Miller E, Rfodes R K. *Methods in enzymology*, Vol 82, Part A, 1982:33—64
- 6 Havenith M G *et al.* *Histochemistry*, 1987; **87**:123

[本文于 1988 年 10 月 24 日收到]