

响应特性,寿命至少为40d以上。

2.7 合成样品测定和回收率

配制含一定浓度腺苷合成样品,其中加入在实际样品常见的干扰物质,如核苷酸类,碱基

物质和氨基酸等物质,检测结果满意,回收率在93.3—102%之间(表2)。

参 考 文 献

- 1 沈同,王镜岩,赵邦梯. 生物化学. 北京: 人民教育出版社,1980: 599—601
- 2 Camici M, Mura U, Corso A D *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 166(2): 253
- 3 Yoshioka M, Yamada K, Abu-Zeid M M *et al.* *J Chromatogr*, 1987; 400: 133
- 4 Deng I, Enke C. *Anal Chem*, 1980; 52: 1937
- 5 杭州大学化学系分析化学教研室. 分析化学手册, 第二分册. 北京: 化学工业出版社,1982: 16—30
- 6 Rechnitz G A, Arnold M A, Meyerhoff M E. *Nature*, 1979; 278: 466
- 7 Ronca-Teston S, Raggl A, Ronca G. *Biochim Biophys Acta*, 1970; 198: 101

表2 样品检测和回收率

| 腺苷加入量 mol/L | 测得电位值 (n = 7) | | 平均回收量 mol/L | 平均回收率 % |
|----------------------|------------------|-------------|-----------------------|------------|
| | 平均值 (mV) | 变异系数 (%) | | |
| 1×10 ⁻⁴ | -0.3 | 1.40 | 0.97×10 ⁻⁴ | 97.0 |
| 2.8×10 ⁻⁴ | +8.5 | 1.35 | 2.85×10 ⁻⁴ | 102 |
| 6.5×10 ⁻⁴ | +21.7 | 1.20 | 6.40×10 ⁻⁴ | 98.5 |
| 1.2×10 ⁻³ | +44.1 | 1.21 | 1.12×10 ⁻³ | 93.3 |

明胶亲和层析纯化人血浆纤维连接蛋白及其糖链结构的初探

查锡良 任常春* 陈惠黎

(上海医科大学生化教研室,上海 200032)

提 要

应用明胶亲和层析并结合凝胶过滤的方法,纯化人血浆纤维连接蛋白(Fn),此法仅二步层析,步骤简化且操作简便。纯化的Fn经凝胶电泳鉴定为一条蛋白条带,免疫鉴定仍保持原有的抗原性,得率为36%。用ConA亲和层析鉴定纯化的Fn分子中糖链结构为N-连接型复杂型糖链二天线,此均一糖链结果佐证了Fn的纯度。还对凝胶过滤分离得到的具有Fn抗原性的Fn片段进行了讨论。

关键词 纤维连接蛋白,明胶亲和层析,寡聚糖结构,ConA亲和层析

纤维连接蛋白是一个分子量为450000的糖蛋白,广泛存在于细胞间质,包括血浆、组织间液、关节腔滑液等体液,也存在于细胞表面膜^[1]。体内诸多细胞可分泌Fn,纤维母细胞的分泌量尤为突出。Fn分子中包括各特定结构域,其中有与胶原蛋白专一结合的结构域^[2,3]。近年来认为Fn含量及其蛋白结构与细胞增殖、分化有一定关系,甚至与恶性细胞的某些行为如接触抑制消失、易转移等有关^[4,5]。

为进一步研究Fn的生理作用及与疾病的关系等,测定、纯化组织Fn是基本而重要的一步。由于血浆Fn含量高达300mg/L,因此被视为最常用的Fn来源。以往常用的方法是盐析、离子交换层析等,其得率低且纯度也不令人满意,不符合分子结构及分子中糖链研究的要求。

* 川北医学院

收稿日期: 1991-04-27

修回日期: 1991-09-28

本实验使用明胶亲和层析结合凝胶过滤的方法纯化血浆 Fn, 得到聚丙烯酰胺凝胶电泳均一条带的 Fn, 可用作 Fn 酶解分析, 蛋白结构域及其糖链的比较研究, 也适用于其它组织 Fn 的纯化。

1 材料与方 法

1.1 材料 正常人体血浆在 -20°C 保存。Sephacrose 4B, Sephadex G-200、DEAE-Sephadex A-50 均为 pharmacia 产品; ConA (伴刀豆球蛋白) 为 Sigma 产品; 丙烯酰胺、甲撑双丙烯酰胺为 Fluka 产品; 辣根过氧化物酶为东风试剂厂产品; 兔抗人 Fn 抗血清、Fn 参考标准为上海生物制品所产品; 硝酸纤维薄膜为浙江黄岩产品; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMBZ)、3-氯萘酚为日本进口产品。苜蓿为 Sigma 产品。

1.2 方 法

1.2.1 明胶及 ConA 与 Sepharose 4B 交联 参照 Custrecasas 方法^[6], 交联率明胶为 83%, ConA 为 80%。

1.2.2 ELISA 测定 Fn a 抗 Fn IgG 提取参照郑榕岚方法^[7], 经硫酸铵盐析及 DEAE-Sephadex A-50 柱层析纯化 IgG, 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为均一条带; b. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗 Fn IgG 参照郭春祥方法^[8], 得到的 IgG-HRP, 其 A_{403}/A_{280} 为 0.57; c. ELISA 法采用直接夹心法, 即第一层为抗 Fn IgG, 第二层为标准 Fn 或待测 Fn, 第三层为 IgG-HRP。第一层包被所用缓冲液为 pH9.5 碳酸缓冲液, IgG 浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$, 96 孔板每孔加 $100\mu\text{l}$ (即含 $2\mu\text{g}$ IgG), 置 25°C 2h; 封闭溶液为 1% BSA (溶于 pH9.5, 碳酸缓冲液), 置 25°C 2h. 或 4°C 过夜; 用含 $0.2\text{ mol}/\text{L}$ NaCl, $10\text{ mmol}/\text{L}$ MgCl_2 的 pH7.0, 磷酸缓冲液 (PBS) 配制标准 Fn 液或待测样品液, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 作为第二层, 置 25°C 保温 2h. IgG-HRP 以上述 PBS 作 1:4000 稀释, 每孔加入 $100\mu\text{l}$, 置 25°C 保温 2h, 然后参照陈惠黎方法^[9], 进行显色及比色。上述各层溶液加入以前均用含

0.75% Tween-20 的上述 PBS 洗脱 3 次。图 1 为 ELISA 测定 Fn 标准曲线, 如以相当于空白 A 的 2 倍的 Fn 量作为最低可测界限, 其灵敏度达 5ng。

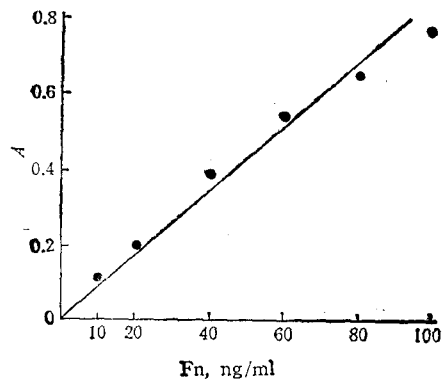


图1 纤维连接蛋白标准曲线

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 参照 Mitra 方法^[10], 凝胶为 $10\text{cm} \times 10\text{cm}$, 分离胶浓度为 7%, 成层胶浓度为 3%, 电泳采用稳流 30mA , 电泳 4h, 进行常规考马氏亮蓝染色。

1.2.4 免疫双扩散法 用 1% 琼脂糖凝胶, 在 20°C 下扩散 24h。

1.2.5 ConA-Sepharose 4B 亲和层析 柱体积及洗脱方法均参照查锡良方法^[11]。

1.2.6 硝酸纤维膜斑点印迹法 (dot blot) 将硝酸纤维薄膜 (NCP) 浸泡于含 0.9% NaCl, pH7.4 $10\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl 缓冲液 (TBS) 1h, 用滤纸将 NCP 轻轻吹干, 点样含 Fn $2-5\mu\text{l}$, 待干后浸于 3% 牛血清白蛋白 (BSA) (溶于 TBS) 进行封闭, 25°C 振荡 1h, 用 TBS 淋洗 3 次, 然后将 NCP 浸于抗人 Fn IgG-HRP 溶液, 25°C 振荡 1h, 用 TBS 淋洗 3 次后移入显色液, 通常 1min 左右显色, 用 TBS 淋洗 NCP 以中止反应。(显色液配制: 3-氯萘酚 3mg 溶于 3ml 冷甲醇为底物液, 5ml TBS 加入 1ml 底物液及 30% (W/V) H_2O_2 $3\mu\text{l}$)。

2 结果与讨论

2.1 人血浆 Fn 纯化 为简化操作步骤, 提高得率及纯度, 采用亲和层析和凝胶过滤二

步法纯化人血浆 Fn。将人血浆 100ml 上样于 Sepharose 4B 柱 (5.5cm × 15cm), 床体积通常约等于样品体积, 此柱平衡液及洗脱液为含 5mmol/L 苯脒的 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液 (TB)。上样后柱流出液直接引入明胶-Sepharose 4B (4cm × 4cm) 柱表面, 进行亲和吸附, 用 TB 洗去不吸附部分。随后用 6mol/L 尿素进行洗脱, 分部收集洗脱液, 合并 280nm 有吸收峰的部分, 对 TB 透析除去尿素, 再用考马氏亮蓝法测蛋白含量及 ELISA 方法测 Fn 量。亲和层析柱得到的 Fn 经浓缩至 1.5ml 后, 进行 Sephadex G-200 分离, 每 2ml 收集一管, 直至 280nm 监测 A 至零为止。ELISA 测定各管 Fn, 除去无 Fn 活性的蛋白

峰, 保留 Fn 活性峰。随后 Fn 活性峰各管作 PAGE 和斑点印迹鉴定。人血浆 Fn 纯化结果列于表 1。

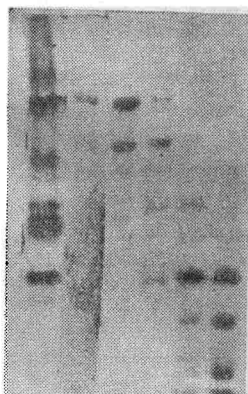
2.2 纯化 Fn 鉴定

2.2.1 SDS-PAGE 鉴定 图 2 所示为 Sepharose 4B、明胶-Sepharose 4B 和 Sephadex G-200 层析的 PAGE。经明胶 Sepharose 4B 亲和层析后, 绝大部分杂蛋白被除去。图 2 中 c 的主带为 Sephadex G-200 分离得到单个完整的 Fn 亚基, 另一条次带为其裂解的大片段。此外, Sephadex G-200 分离得到的具有 ELISA 检测活性的 3 个峰, 其电泳图谱为图 2 中 D, E, F 所示, 均为比 Fn 亚基分子量小的片段, 且随柱洗脱体积增大而片段减小, 说明分子筛效应良好。此 3 个峰还进一步作斑点印迹监测其抗原性。

2.2.2 免疫鉴定 纯化得到的 Fn (即图 2 c) 与兔抗人血浆 Fn 抗血清产生免疫沉淀线 (图 3)。上述 Sephadex G-200 分离得到的 3 个活性峰 (第 2, 3, 4 峰), 经用抗 Fn 的 IgG-HRP 显色的斑点印迹实验均出现阳性反应 (图

表 1 人血浆纤维连接蛋白纯化

| | 蛋白 (mg) | Fn (mg) | 产率 | 纯度 |
|-------------------------------|---------------------|---------|-----|-----|
| 血浆 | 7 × 10 ³ | 27.0 | 100 | |
| Sepharose 4B (5.5cm × 15cm) | 6 × 10 ³ | 23.4 | 86 | |
| 明胶-Sepharose 4B (4cm × 4cm) | 42.5 | 20.0 | 74 | 47 |
| Sephadex G-200 (1.5cm × 82cm) | 9.6 | 9.6 | 36 | 100 |



A B C D E F

图 2 纯化 Fn 的 PAGE 鉴定

A 为 Sepharose 4B 柱洗脱部分; B 为明胶-Sepharose 4B 柱洗脱部分 (6 mol/L 尿素); C 为 Sephadex G-200 柱具有 Fn 活性的第一峰; D 为 Sephadex G-200 柱具有 Fn 活性的第二峰; E 为 Sephadex G-200 柱具有 Fn 活性的第三峰; F 为 Sephadex G-200 柱具有 Fn 活性的第四峰

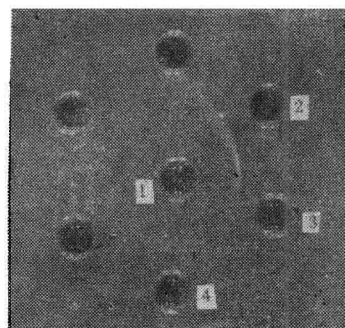


图 3 免疫双扩散鉴定

1 为纯化的人血浆 Fn; 2, 3, 4 分别为稀释 2, 4, 8 倍的抗 Fn 抗血清

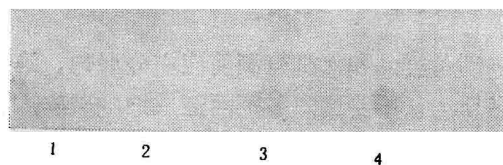


图 4 斑点印迹法鉴定 Fn 片段的抗原性

1 为空白 (2 μg 白蛋白); 2, 3, 4 分别为 Sephadex G-200 分离得到的第 2, 3, 4 峰

4).

2.3 ConA-Sepharose 4B 吸附 Fn 是糖蛋白,主要含 N-连接型糖链,本实验用与糖基或糖链专一结合的 ConA 亲和层析柱来研究纯化的人血浆 Fn 糖链结构。结果列于表 2,提示 Fn 全部与 ConA 结合,且属于用 10 mmol/L α -甲基甘露糖即可洗脱的弱结合部分。

表 2 人血浆 Fn 的 ConA-Sepharose 4B 亲和层析

| | 实验 1 | | 实验 2 | |
|-----|--------|-----|--------|------|
| | Fn(ng) | % | Fn(ng) | % |
| 不吸附 | 0 | 0 | 156.0 | 7.8 |
| 弱吸附 | 2885.0 | 100 | 1730.0 | 87.6 |
| 强吸附 | 0 | 0 | 92.0 | 4.6 |

Fn 是存在于细胞膜及细胞间质的一类蛋白质,分子量为 450000 道尔顿左右。由二个基本相同的亚基通过近 C 端的二个二硫键相连而成,亚基中的若干结构域分别与肝素、肌动蛋白、明胶、DNA 乃至细菌、细胞结合^[1]。本方法就是基于 Fn 分子中 45kD 的结构域能与明胶特异结合的特点,进行亲和层析分离的。由于 Fn 与明胶结合较紧,很难用盐洗脱,只能采用尿素洗脱。除去尿素后 Fn 仍保持其原有的抗原性,所以此法纯化的 Fn 同样适用于免疫方面实验。

在亲和层析前,血浆先通过 Sepharose 4B 柱,与该柱吸附而除去一部分杂蛋白质,旨在使明胶亲和柱尿素洗脱所得仅为与明胶特异吸附的蛋白质,以提高亲和层析效果,此外可增加柱的使用次数。

由于明胶除能结合完整 Fn 亚基,同时也吸附含有明胶结合结构域的 Fn 片段,因此只有通过分子筛效应才可将完整亚基及各不同分子量的片段区分,此作用为其它亲和层析如抗体亲和层析所不及。所得不同分子量片段可作片段中糖链有否的分析及进行其它特异结合如肝素、DNA 等结合的实验之用,也可作片段蛋白质序列测定。

人体各组织来源 Fn 均含有糖链,主要为 N-连接型糖链,但糖链的结构有组织差异^[12]。本实验用 ConA-Sepharose 4B 亲和层析发现,所有血浆的 Fn 均处在 ConA 的弱结合部分,此部分糖链结构为不含分叉性 N-乙酰氨基葡萄糖的二天线,与文献报道相一致^[13,14]。也可用 ConA-Sepharose 4B 亲和层析分离仅含二天线 N-连接型糖链的 Fn,但不适用于其它组织来源的含有二天线以外结构的 Fn,否则会导致因糖链结构不同而引起的 Fn 丢失。

参 考 文 献

- 1 Akiyama S K. *Advances in Enzymology*, 1987; 59: 1
- 2 Hynes R. *Ann Rev Cell Biol*, 1985; 1: 67
- 3 Hayman E G *et al. Exp Cell Res*, 1985; 160: 245
- 4 Thiery T P. *Ann Rev Cell Biol*, 1985; 1: 91
- 5 Humphries M J *et al. Science*, 1986; 233: 467
- 6 Cuatrecasas P. *J Biol Chem*. 1970; 245: 3059
- 7 郑榕岚等. *生物化学与生物物理学报*, 1988; 20: 198
- 8 郭春祥,郭锡琼. *上海免疫学杂志*, 1983; 3: 97
- 9 陈惠黎等. *上海免疫学杂志*, 1985; 5: 100
- 10 Mitra R S *et al. Appl Environ Microbiol*, 1984; 4: 1012
- 11 查锡良等. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21: 431
- 12 Carsons S *et al. J Clin Invest*, 1987; 80: 1342
- 13 Takasaki S *et al. J Biochem*, 1980; 88: 1587
- 14 Takasaki S *et al. J Biol Chem*, 1979; 254: 8548

(上接第 310 页)

制备样品和上机检测前应充分混匀,同时也必须注意不要剧烈振荡而造成细胞破碎。

这个实验方法的建立,将为临床上提供一个可靠的网织红细胞计数的数据,有利于对患者的治疗和疗效观察作出正确的评价。

参 考 文 献

- 1 上海第二医学院主编. *小儿内科学*, (第 1 版)北京: 人民卫生出版社, 1981: 396
- 2 Tank H J *et al. Blood*, 1983; 61: 1091
- 3 Savage R A *et al. Blood Cells*, 1985; 11: 97
- 4 Peebles D A *et al. Am J Clin Pathol*, 1981; 75: 713
- 5 Koepke J F *et al. Clin Lab Haemat*, 1986; 8: 169