

Shuyi, Yao Ruhua, Zong Minhua (*Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*).

**Abstract** Enzymatic catalysis in organic solvent is one of the most interesting topics. Immobilized lipase from *Mucor miehei* catalysed esterification of organosilicon alcohol in organic solvent

was exposed and the effect of various factors on the reaction was studied. The different organosilicon alcohol substrates and fatty acid substrates, organic solvent polarity and water contents etc. were studied.

**Key words** immobilized lipase, organosilicon alcohol, esterification, organic solvent

## 胚胎骨 I 型胶原的提取与鉴定

李成章 樊明文

(湖北医科大学口腔医学院, 武汉 430070)

**摘要** 应用酸性、中性交互提取法从人胚骨中提取 I 型胶原, 经 SDS-PAGE 电泳, 氨基酸分析和免疫学方法鉴定。结果表明所提胶原电泳区带与 I 型标准品相同, 环状沉淀反应阳性, 氨基酸分析甘氨酸占 1000 个氨基酸总残基的 1/3, 羟脯氨酸与脯氨酸之比为 0.65, 符合 I 型胶原特征, 并显示有较高的纯度, 可用于胶原制品的制作。

**关键词** 胶原, 提取, 人胚骨

胶原 (collagen) 是人体重要的细胞外基质成分。胶原是一个大的蛋白家族, 至少有 15 个型别<sup>[1]</sup>, 各型胶原都具有一定的分子构型和组织分布特点, 其中以 I 型胶原分布最广, 含量最多。胶原不仅作为组织的支持物, 而且对细胞、组织乃至器官行使正常功能及伤口愈合都有重大影响。近 20 年来, 世界各国已将胶原制品广泛应用于临床修复软组织缺损, 覆盖烧伤创面、整形、牙周引导组织再生、口腔种植体、牙槽嵴再建及颌骨空腔修复等领域<sup>[2]</sup>。本研究参照国外文献, 适当加以改进, 拟从人胚骨中提取 I 型胶原, 用于胶原制品的制作。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本前处理

取引产死胎新鲜长管骨, 去骨膜, 冷生理盐水洗净骨髓, 碎成小块, 置于铜制钵中, 加液氮, 捣成 20 目左右的骨粉。用冷生理盐水或 20% NaCl-0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液

(pH 7.5) 洗 3 次 (10 000 × g, 15 min), 将骨粉悬浮于 0.5 mol/L EDTA-0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 再装入透析袋中透析脱钙。应用火焰法 (Varian Spectr AA-30 型原子吸收光谱仪) 测定脱钙完全, 用冷蒸馏水洗 3 次, 去除 EDTA, 作为待提标本。

#### 1.2 抽提胶原

将脱钙骨粉浸入 0.5 mol/L HAc 24 ~ 48 h, 取上清缓慢加入研磨精细的 NaCl (终浓度为 4 mol/L), 搅拌过夜。离心 35 000 × g, 20 min (下同), 去上清, 其沉淀物加入 0.5 mol/L HAc 透析溶解, 离心, 取上清依次加入 0.1 mol/L Tris-HCl (终浓度为 0.01 mol/L), 5 mol/L NaOH (调 pH 至 7.4), NaCl (终浓度为 4 mol/L), 搅拌过夜, 离心, 去上清。沉淀以 4 mol/L NaCl-0.05 mol/L Tris-HCl 洗一次, 再加 0.5 mol/L HAc 透析溶解, 离心去沉淀, 上清装入透析袋内, 对 NaCl 溶液透析 (平衡后 NaCl 浓度

为 10%)。离心去上清, 沉淀物用 0.5 mol/L HAc 透析去盐溶解, 离心去沉淀, 上清浓缩冻干。以上所有液体及操作温度均为 4℃。

**1.3 SDS-PAGE 电泳分析**

取 1 mg 胶原冻干品溶于 1 ml 0.05 mol/L HAc 过夜, 离心, 取上清 35 μl 加等量电泳样品液 (0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 1% SDS, 2% 巯基乙醇, 5% 甘油和微量溴酚蓝) 100℃, 5 min, 作 SDS-PAGE 垂直板电泳。浓缩胶 3%, 分离胶 7.5%, 电极缓冲液 SDS-Tris-甘氨酸系统, 30 mA 电泳, 至溴酚蓝跑完全程后 0.5 h 中止电泳, 0.2% 考马斯亮蓝 R-250 染色。以鼠 I 型胶原标准品 (Sigma 公司) 同法对照, 并设样品液经胶原酶 (Sigma 公司) 消化, 同时电泳。

**1.4 氨基酸分析**

取 2 mg 冻干胶原样品, 经 PITC 衍生处理, 用 Waters PICO TAG 氨基酸分析系统对其主要氨基酸组成进行分析。

**1.5 免疫学鉴定**

用 I 型胶原抗血清 (兔抗鼠) 与样品 (1 g/L) 作环状沉淀反应。

**2 结 果**

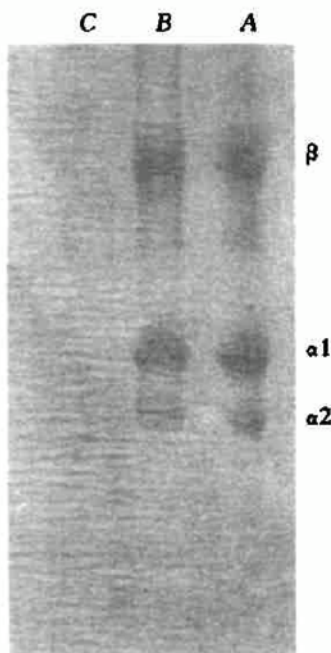


图 1 I 型胶原样品电泳图谱

A: I 型胶原样品; B: I 型胶原标准;  
C: 经胶原酶消化的 I 型胶原样品。

SDS-PAGE 电泳区带显示。提取的胶原样品与 I 型胶原标准品相同, 经胶原酶消化的样品无明显区带形成 (图 1)。

氨基酸分析显示, 所测 18 种氨基酸占样品的 95% (质量比), 在 1000 个总残基中, 甘氨酸为 340.9, 羟脯氨酸为 83.2。羟脯氨酸与脯氨酸之比为 0.65。这些氨基酸的构成比符合 I 型胶原的特征, 并显示有较高的纯度 (表 1)。

环状沉淀反应为立即反应阳性。

表 1 人胚骨胶原蛋白氨基酸组成<sup>1)</sup>

氨基酸	样品	I 型胶原
天冬氨酸	42.9	45.7
谷氨酸	80.7	74.5
羟脯氨酸	83.2	112.0
丝氨酸	30.6	33.0
甘氨酸	340.9	330.0
组氨酸	7.5	6.0
精氨酸	50.0	49.7
苏氨酸	17.4	18.0
丙氨酸	109.3	114.0
脯氨酸	128.7	116.0
酪氨酸	1.6	2.5
缬氨酸	23.8	24.3
蛋氨酸	6.4	5.1
胱氨酸	0.5	—
异亮氨酸	11.6	10.8
亮氨酸	24.5	24.3
苯丙氨酸	15.8	12.4
赖氨酸	24.7	24.7

<sup>1)</sup>1000 氨基酸总残基中所占残基数。

**3 讨 论**

胶原作为医用生物材料比以往应用的金属、陶瓷或化学材料具有更大的优越性, 因此近 20 年来已被广泛用于临床。胶原多从牛皮、肌腱、鼠尾等部位提取<sup>[3,4]</sup>。由于胶原是一个大的蛋白家族, 型别众多, 各型作用不一, 提

取时常将各型分别提取。I型胶原是结缔组织间质中最主要的成分，一般制品多以I型胶原为材料。目前从组织提取胶原多采用分级盐析的方法。在酸性条件下，I型和III型胶原沉淀的盐浓度临界点相近；在中性条件下，III型和IV型胶原沉淀的盐浓度临界点又很接近，因此提取时难度较大，程序复杂，需过柱纯化，而且花费时间长，易发生胶原变性。本研究采用胚胎骨组织来提取胶原。一般认为骨组织仅含有I型胶原<sup>[5,6]</sup>，选用骨组织作为提取原料可省去分型、过柱纯化等烦杂工序，简便经济，易获得纯度较高的I型胶原。

胶原的氨基酸组成有其特点<sup>[5,6]</sup>，甘氨酸约占氨基酸总量的1/3，羟脯氨酸约占氨基酸总量的10%。羟脯氨酸主要存在于胶原蛋白，而不存在于一般蛋白质中。各型胶原的氨基酸组成也各有特点，I型胶原中羟脯氨酸与脯氨酸之比约为0.7~0.8。本胶原提取物氨基酸分析符合I型胶原的组成特征，并与I型标准品测得值有良好的一致性。电泳分析其区带与I型胶原标准品区带相同，胶原酶消化后则无明显区带形成。结果提示，I型胶原提取物具有较高纯度。

胶原是由三条多肽链组成的大分子，成熟组织胶原的多肽链间形成许多共价键，交联呈三维网状结构，所以溶解性低，不易提取，骨组织则较软组织更难提取。选用胚胎骨则是利用新合成的组织多为非共价连接，其结合尚不牢固的特性，易于提取<sup>[4,5]</sup>。采用中性与酸性条件交互提取，可使更多的胶原成为可溶性。在酸提取液中加少许胃蛋白酶，能增加胶原的溶解性，提高产量<sup>[6]</sup>。

为提高抽提纯度，骨粉应越细越好，脱钙必须完全。采用EDTA脱钙，可使一些非胶原蛋白，如骨连接蛋白(osteonection)随之溶去<sup>[7]</sup>，有利于提高胶原的纯度。抽提的次数不应太少，否则纯度不够，抽提次数太多则易

发生胶原变性。本研究所用抽提次数为3~4次，结果表明，所提胶原具有较高纯度，可用于胶原制品的制作。

## 参 考 文 献

- 1 Lukinmaa P-L, Waltimo J. *J Dent Res*, 1992; 71: 391
- 2 黄小枫. 国外医学口腔医学分册, 1992; 19: 76
- 3 Hyder P R, Dowell P, Singh G *et al.* *J Periodontol*, 1992; 63: 182
- 4 Chandrakasan G, Torchia D A, Picz K A. *J Biol Chem*, 1976; 251: 6062
- 5 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 3~10
- 6 永井 裕 藤本大三郎. 刘 平译. 胶原蛋白实验方法. 上海: 上海中医学院出版社, 1992: 20~29
- 7 Termine J D, Kleinman H K, Whitson S M *et al.* *Cell*, 1981; 26: 99

**Extraction and Identification of Type I Collagen from Human Embryonal Bone.** Li Chengzhang, Fan Mingwen (*Stomatological College, Hubei Medical University, Wuhan 430070, China*).

**Abstract** Type I collagen was extracted from human embryonal bone by alternating acidic and neutral salt precipitation technique and was identified by SDS-PAGE, amino acid analysis and immunological method. The results showed that electrophoresis band of collagen extracted was the same as that of type I collagen standard, ring precipitation test was positive, glycine was 1/3 in total of 1000 amino acid residues, the ratio of hydroxyproline and proline was 0.65. These suggested that the extracted collagen accord with the characteristics of type I collagen and is highly purified. It could be used to prepare collagen products.

**Key words** collagen, extraction, embryonic bone