

doi:10.3969/j.issn.1004-2091.2012.01.004

黄鳝血清白蛋白的纯化及抗体制备

张英霞¹, 陆露¹, 陈聪伟¹, 迟婷婷¹, 安天琛¹, 关怀², 满初日嘎¹

(1.海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南大学海洋生物教学示范中心, 海南 海口 570228;
2.海口 VTI 生物研究院, 海南 海口 570228)

摘要 通过阴离子交换层析和凝胶过滤层析,从黄鳝血清中得到其血清白蛋白,命名为 MAA-serum,分子量为 67 kDa,为单链非糖蛋白,其 N 末端氨基酸序列为 GHKKW。用 0.5 mg/只 MAA-serum 作为免疫源免疫大白兔,经 3 次免疫后,抽取大白兔血液,分离血清,饱和硫酸铵沉淀,获得抗 MAA-serum 的多克隆抗体。经 ELISA 方法测定该抗体与黄鳝血清白蛋白的免疫反应,抗体滴度为 1:100 000。经初步研究发现黄鳝皮肤中也有大量血清白蛋白分布,该抗体为进一步研究 MAA-serum 在皮肤中的分布及生物学功能打下基础。

关键词 黄鳝;血清白蛋白;分离纯化;抗体

中图分类号 Q176 文献标识码 A 文章编号:1004-2091(2012)01-0012-05

血清白蛋白合成于肝脏,是脊椎动物血浆中含量最丰富的蛋白质,约占血浆总蛋白的一半。血清白蛋白的生理功能十分重要,主要为结合及运输多种内源及外源性组分,如脂肪酸、胆色素、氨基酸、类固醇激素、金属离子和许多治疗分子等^[1-3];另外还参与维持血浆胶体渗透压及物质交换,清除体内自由基,抗凝血作用,影响微血管渗透性等^[4-8]。

目前,已从几种两栖动物血清及皮肤中分离得到白蛋白,如非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 68 kDa 及 73 kDa 血清白蛋白,大蹼铃蟾 (*Bombina maxima*) 及黑眶蟾蜍 (*Duttaphrynus melanostictus*) 皮肤及血清白蛋白等^[9,10]。为研究黄鳝血清白蛋白的功能,实验对黄鳝血清白蛋白进行了分离纯化。在黄鳝皮肤中也发现有血清白蛋白类似物存在,为进一步研究其在皮肤中的分布及功能,利用纯化的黄鳝血清白蛋白为免疫源,免疫大白兔,获得了抗黄鳝血清白蛋白的多克隆抗血清,该血清能与黄鳝血清白蛋白发生免疫反应。抗体的获得为进一步研究黄鳝血清白蛋白在皮肤中的分布打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

阴离子交换层析介质 (DEAE-Sephadex A-50) 和凝胶过滤层析介质 (Sephadex G-75, superfine) 购自安瓿西亚 (Amersham-Pharmacia)。牛血清白蛋白 (BSA), 完全及不完全佛氏佐剂, β , β' -二氨基二苯胺

(DAB), 邻苯二胺二盐酸盐 (OPD), 正常羊血清, 胰蛋白酶及生色底物苯甲酰-L-精氨酸酰-4-硝基苯胺 (BAPNA) 为西格玛 (Sigma) 公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购自圣克鲁斯生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。实验中的蛋白质浓度均采用伯乐 (Bio-Rad) 蛋白定量试剂, 以 BSA 为标准测定。

1.2 黄鳝血清白蛋白 (MAA-serum) 的分离纯化

黄鳝经剪尾收取血液, 血液室温保温 1 h, 4 °C 放置 4 h, 2 000 r/min 离心 5 min 收集血清。4.0 mL 血清置于 15.0 mL 离心管中, 加入等体积的 PBS 并逐滴加入等体积 pH 值 7.2 的饱和硫酸铵溶液, 边加边摇, 静置 30 min, 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液至另一离心管, 向其中缓慢加入固体硫酸铵粉末, 边加边摇动至饱和。静置 5 min, 8 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 沉淀溶于 5.0 mL H₂O 中, 于 50 mM Tris, pH 值 7.6, 含有 5 mM EDTA 的缓冲液中 4 °C 透析 24 h。上样于 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析柱 (2.6×50 cm), 预先用 50 mM Tris, pH 值 7.8, 含有 5 mM EDTA 的缓冲液平衡, 上样后用平衡缓冲液冲洗至穿透峰被完全洗脱, 再用 400~400 mL 0~0.8 M NaCl 进行梯度洗脱, 5 mL/管。收集目的组分峰, 冻干后溶于 H₂O 中, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清上 Sephadex G-75 凝胶过滤层析柱 (2.6×100 cm), 预先用 50 mM Tris, pH 值 7.8, 含

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30700128)

作者简介: 张英霞 (1973-) 女, 博士, 副教授, 研究方向动物毒素。E-mail: yingxiazhang@hotmail.com

有 5 mM EDTA, 0.1 M NaCl 缓冲液平衡, 3 mL/管, 用同样缓冲液洗脱。收集目的组分峰, -70°C 保存备用。

1.3 MAA-serum 的 N-末端氨基酸序列测定

通过埃德曼(Edman)降解法测定 MAA-serum 的 N-末端氨基酸序列 (Applied Biosystems pulsed liquid-phase sequencer model 492C)。

1.4 MAA-serum 的胰蛋白酶抑制剂活性测定

反应体系为 50 mM Tris, pH 值 7.8, 含有 1 mM CaCl_2 , 反应温度为 25°C 。将不同量的 MAA-serum (0.05~5.0 M) 与 30 nM 胰蛋白酶(终浓度)于 25°C 保温 15 min, 加入终浓度为 0.3 mM 的 BApNA 起始反应。连续 2 min 于 410 nm 处监测 p-硝基苯胺(p-nitroaniline)的释放。

1.5 兔抗 MAA-serum 多克隆抗体制备及纯化

大白兔(雄性, 2.5 kg)耳静脉采血, 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 收集血清为抗血清阴性对照。将 0.1 mg 纯化的 MAA-serum 与 0.5 mL 佛氏完全佐剂等体积充分混合乳化, 大白兔背部剪毛后, 实行皮下注射, 共注射 10 点。以后每隔 15 d 将与第一次相同剂量的 MAA-serum 与不完全佛氏佐剂乳化, 加强免疫, 共 2 次。最后 1 次免疫后 7 d 耳静脉取血, 分离血清, 以免疫酶联吸附实验(ELISA)测定抗体效价。当抗体效价达到 1:100 000 时, 将兔以乙醚麻醉, 心脏取血。血液 37°C 保温 1 h, 4°C 放置 4 h, 2 000 r/min 离心 5 min, 收集血清。生理盐水等体积稀释 5 mL 血清, 缓慢加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 不停搅拌, 至终浓度 50%, 室温放置 30 min, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 用 5.0 mL 生理盐水溶解沉淀, 再缓慢地加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 33%, 室温放置 30 min, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 用 1.0 mL 生理盐水溶解沉淀, 于 4°C PBS 透析 24 h, 测定抗体浓度, 分装, -20°C 保存。

1.6 ELISA 检测抗体效价及免疫交叉反应

将 MAA-serum, 黄鳍皮肤匀浆物及 BSA 分别溶于 0.05 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液 (pH 值 9.6) (终浓度 2.0 g/mL), 包被 96 孔酶标板, 每一样品包被 38 孔, 每孔 100 μL , 4°C 放置过夜。用 PBS, 含 0.05% Tween-20(PBS-T)洗板 5 次, 5 min/次。每孔加入 200 μL PBS-T(含 5% 正常羊血清)于 37°C 保温 1 h 进行封闭。弃封闭液, 用封闭液将纯化的 MAA-serum 多克隆抗体从 1:100 到 1:108 进行

10 倍梯度稀释, 每一浓度每一样品包被孔加 3 孔, 每孔 100 μL , 37°C 保温 1 h。另外将 100 μL 1:100 稀释的免疫前兔血清加入每一样品包被的 3 个孔作为阴性对照。PBS-T 洗板 5 次, 5 min/次。将 1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体加入各孔, 每孔 100 μL , 37°C 保温 1 h, PBS-T 洗板 5 次, 5 min/次。各孔均加入 100 μL 0.4 mg/mL OPD(新鲜配制, 溶于磷酸-柠檬酸缓冲液, 含 0.03% H_2O_2), 室温放置 5~15 min, 再加入 50 μL 12% H_2SO_4 终止反应。于 490 nm 读取数据(Bio-Tek 酶标仪)。抗体滴度以产生最大反应信号一半的 MAA-serum 多克隆抗体稀释度计算^[10]。

1.7 蛋白印迹(Western Blot)

将 MAA-serum 在还原及非还原状态, 黄鳍皮肤匀浆物在还原状态下进行 SDS-PAGE, 用半干型电转仪 40 mA, 1.5 h 转移至 PVDF 膜, 用稀释于 PBS-T 的 5% 正常羊血清室温封闭 PVDF 膜 2 h。弃封闭液, 加入封闭液稀释的 1:106 稀释的 MAA-serum 多克隆抗体, 4°C 过夜。PBS-T 洗膜 5 次, 5 min/次。加入封闭液稀释的 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体, 室温保温 1 h, PBS-T 洗膜 5 次, 5 min/次。将膜上加少量 TMB 显色, 水洗终止反应^[10]。

2 结果

2.1 MAA-serum 分离纯化

通常情况, 在血清中加入饱和硫酸铵至饱和度为 28%~33% 时, 球蛋白沉淀析出, 饱和度 33%~55% 时, 拟球蛋白沉淀析出。当饱和度大于 50% 后, 血清白蛋白沉淀析出^[11]。经硫酸铵沉淀的黄鳍血清白蛋白上 DEAE-Sephadex A-50 共得到三个峰, 其中第 III 峰为目的组分峰(图 1), 收集该组分进行 Sephadex G-75 凝胶过滤层析, 共得到两个峰, 其中第 II 峰为目的组分峰(图 2), 收集该峰, 即为黄鳍血清白蛋白, 命名为 MAA-serum。对该组分进行 SDS-PAGE, 在还原状态下, 显示为清晰的单一条带, 分子量约为 67 kDa(图 3)。在 Native-PAGE 上, 也显示为单一条带。经希夫试剂(Shiff's)检测, 该蛋白为非糖蛋白。经 N-末端氨基酸序列测定为 GHKKW。

2.2 MAA-serum 的胰蛋白酶抑制活性

MAA-serum 具有较弱的抑制胰蛋白酶(trypsin)水解底物的活性。当抑制剂浓度在 40 nM

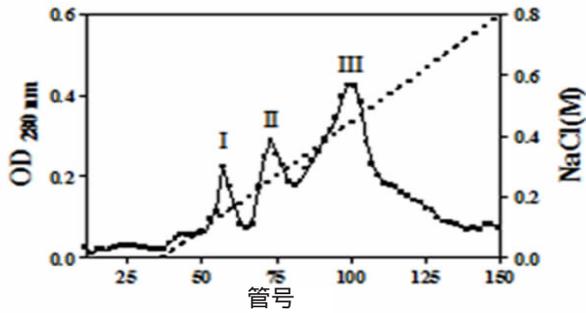


图1 黄鳍血清白蛋白的 DEAE-Sephadex A-50 层析图

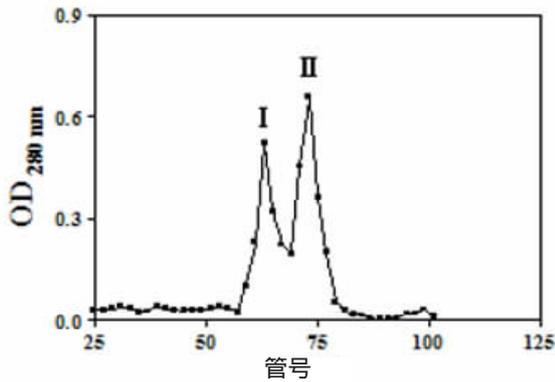
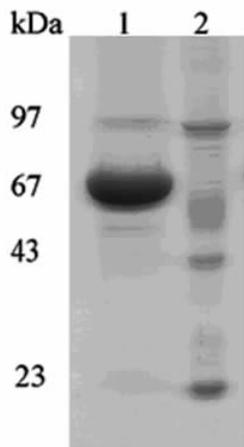


图2 黄鳍血清白蛋白的 Sephadex G-75 层析图



注: 1.还原的 *MAA*-serum 2.蛋白质分子量标准。

图3 黄鳍血清白蛋白的 SDS-PAGE

时,抑制约 10%的 30 nM 的 trypsin 对 BApNA 的水解活性。当 100 nM 的 *MAA*-serum 与 30 nM 的 trypsin 保温 15 min 时,抑制的 trypsin 百分数无增高。说明黄鳍血清白蛋白对 trypsin 的具有一定的抑制活性,但活性不高。BSA 则完全不抑制 trypsin 对 BApNA 的水解活性。

2.3 *MAA*-serum 与抗体的免疫交叉反应

经 SDS-PAGE 检测,纯化的兔抗 *MAA*-serum

抗体纯度较高。经酶联免疫吸附实验检测抗 *MAA*-serum 抗体滴度达到 1 : 100 000。结果表明,兔抗 *MAA*-serum 抗体能很好地识别 *MAA*-serum, 同时也能与黄鳍皮肤匀浆物发生极强的免疫交叉反应,但对 BSA 则无免疫交叉反应发生。

2.4 Western Blot

在还原及非还原状态下对 *MAA*-serum 进行 SDS-PAGE 并将其电转移到 PVDF 膜,进行 Western Blot 结果条带均显现出阳性着色。黄鳍皮肤匀浆物在还原及非还原状态,经 SDS-PAGE 鉴定,在 67 kDa 处也有明显蛋白条带,电泳特征与 *MAA*-serum 极相似。将其转移至 PVDF 膜上,该蛋白条带也与兔抗 *MAA*-serum 抗体显现显著的阳性反应,强度与 *MAA*-serum 接近。

3 讨论

血清白蛋白是血液中十分重要的蛋白组分,其功能多样,重要的是结合及转运多种物质内源及外源物质,如水、离子、脂肪酸、激素、代谢产物及多种药物等^[1-3]。另外血清白蛋白还参与维持渗透压,抗凝血等^[4-6]。目前对人血清白蛋白、牛血清白蛋白的理化性质及功能等研究较为透彻,而对鱼血清白蛋白研究的相关文献十分稀少。为研究鱼类的血清白蛋白,本文通过离子交换层析和凝胶过滤层析在黄鳍血清中分离得到其血清白蛋白。该蛋白是鱼血清中的主要蛋白质,约占血清总蛋白的 50%,在鱼类血液中具有重要的功能。黄鳍血清白蛋白同人血清白蛋白的分子量相同,约为 67 kDa。研究发现在黄鳍皮肤中也存在有血清白蛋白类似物,为研究该蛋白分布在皮肤中的分布及功能,制备了其多克隆抗体。抗体与 *MAA*-serum 发生强烈的免疫反应,同时也能与黄鳍皮肤匀浆物发生免疫交叉反应,但对 BSA 无免疫交叉反应发生。经 N-端氨基酸序列比较发现, *MAA*-serum 与 BSA 无序列相似度,推测其全序列与 BSA 序列相似度可能也较低。结论也支持了 ELISA 的实验结果,说明 *MAA*-serum 与 BSA 虽同为血清白蛋白,但由于两物种亲缘关系较远,两者的抗原决定簇及空间结构存在较大差异,因此无免疫反应发生。将 *MAA*-serum 的 N-端氨基酸序列同 HAS、非洲爪蟾血清白蛋白、大蹼铃蟾血清白蛋白比较发现,该序列与上述序列均无相似性^[9]。ELISA 结果显示,黄鳍皮肤中的血清白蛋白类似组分与黄鳍血清白蛋白则具有极相似的抗原决定簇

及空间结构。进行 Western Blot 后,条带均显现出阳性着色。由此推测黄鳝皮肤中也分布有大量血清白蛋白。有文献报导,目前已在多种两栖动物皮肤中发现白蛋白,如大蹼铃蟾白皮肤白蛋白广泛分布于真皮的结缔组织及表皮的细胞膜上,并且该蛋白还含有血红素辅基^[9]。血红素辅基是血红蛋白携带氧的辅助因子,而血清白蛋白含有血红素辅基,故推测其在两栖动物皮肤的呼吸、水盐代谢、渗透压维持、吸收、转运外界环境中有利于其存活物质等有重要作用^[9,10]。黄鳝生存于水中,但在离水环境下,若保持皮肤湿润,能生存较长时间,因此其皮肤在一定程度上与两栖动物皮肤的功能相似。因此黄鳝皮肤中也可能存在有大量血清白蛋白。该研究为进一步研究白蛋白在黄鳝皮肤中的分布及功能打下基础。

另外,MAA-serum 具有一定的胰蛋白酶抑制活性,为丝氨酸蛋白酶抑制剂家族。丝氨酸蛋白酶抑制剂广泛存在于动物、植物、微生物体中^[12-15],具有重要的生理功能。在动物体中其基本功能是调节丝氨酸蛋白酶的水解平衡,即防止机体内不必要的蛋白水解。该过程涉及机体的各种生理活动,如酶原激活、激素前体的释放、参与机体免疫反应、凝血、蛋白质折叠、细胞的迁移与分化、抑制肿瘤及微生物致病性的形成等^[16-19]。丝氨酸蛋白酶抑制剂也大量地分布在多种植物的种子中,以防止昆虫吞食种子后对种子的消化作用,是植物防御害虫的重要手段之一^[20-21]。而黄鳝血清白蛋白也具胰蛋白酶抑制活性,推测在其防御天敌捕食的过程中也发挥一定作用。有关黄鳝白蛋白在皮肤中的分布及功能,将做进一步研究。

参考文献:

- [1] Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles[J]. *J Control Release*, 2008, 132(3): 171-183
- [2] Varshney A, Sen P, Ahmad E, et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be utilized[J]. *Chirality*, 2010, 22(1): 77-87
- [3] Cao H, Chen L, Xiao J. Binding Citrus flavanones to human serum albumin: effect of structure on affinity [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(4): 2257-2262
- [4] Peters T. all about albumin. *Biochemistry, Genetics and Medical Applications* [M]. NY: Academic Press, Inc., 1996.21-98
- [5] Kragh-Hansen U, Chuang V, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin[J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(6): 695-704
- [6] Varshney A, Rehan M, Subbarao N, et al. Elimination of endogenous toxin, creatinine from blood plasma depends on albumin conformation: site specific uremic toxicity & impaired drug binding[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e17230
- [7] Lejon S, Frick I, Björck L, et al. Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41): 42924-42928
- [8] Bae M, Ishii T, Minoda K, et al. Albumin stabilizes epigallocatechin gallate in human serum: binding capacity and antioxidant property [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53 (6): 709-715
- [9] Zhang Y, Lai R, Lee W, et al. Frog albumin is expressed in skin and characterized as a novel potent trypsin inhibitor[J]. *Protein Sci*, 2005, 14 (9): 2469-2477
- [10] Zhang Y, Chen C, Wang M, et al. Purification and Characterization of Albumin from Frog Skin of *Duttaphrynus melanostictus*[J]. *Protein J*, 2011, 30(7):464-470
- [11] 罗磊,朱雅东,丁霄霖.聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清白蛋白硫酸铵分级盐析[J]. *食品科学*, 2006, 27(2): 218-222.
- [12] Hibbetts K, Hines B, Williams D. An overview of proteinase inhibitors[J]. *J Vet Intern Med*, 1999, 13(4): 302-308
- [13] Janciauskiene S, Bals R, Koczulla R, et al. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease [J]. *Respir Med*, 2011, 105(8): 1129-1139
- [14] Carrillo L, Herrero I, Cambra I, et al. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(10): 1191-1200
- [15] Maro A, Farisei F, Panichi D, et al. WCI, a novel wheat chymotrypsin inhibitor: purification, primary structure, inhibitory properties and heterologous expression [J]. *Planta*, 2011, 234(4):723-35
- [16] Arolas J, Ventura S. Protease inhibitors as models for the study of oxidative folding [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14 (1): 97-112
- [17] Zhang Y, Wang M, Wei S. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the skin secretions of *Kaloula pulchra hainana*[J]. *Toxicon*, 2010, 56(4): 502-507
- [18] Song G, Zhou M, Chen W, et al. HV-BBI—a novel am-

phibian skin Bowman-Birk-like trypsin inhibitor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(1): 191-196

[19] Eijk M, Noorden C, Groot C. Proteinases and their inhibitors in the immune system [J]. *Int Rev Cytol*, 2003, 222: 197-236

[20] Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, *et al.* Canonical protein inhibitors of serine proteases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60

(11): 2427-2444

[21] Gomes M, Oliva M, Lopes M, *et al.* Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2011, 12(5): 417-436

(收稿日期 2011-10-08)

Purification and antibody preparation of serum albumin from *Monopterus albus*

Zhang Yingxia¹, Lu Lu¹, Chen Congwei¹, Chi Tingting¹, An Tianchen¹,
Guan Huai², Manchu Riga¹

(1.Key Laboratory of Tropic Biological Resources, Minister of Education, Haikou 570228, China ;

2. Haikou VTI Biological Institute, Haikou 570228, China)

Abstract: Serum albumin of *Monopterus albus* was obtained through the steps of mixing ion-exchange and gel filtration chromatography, and named MAA-serum, which is a single chain protein with molecular weigh of 67 kDa. MAA-serum is not a glycoprotein. The N-terminal amino acid sequence is GHKKW. The purified MAA-serum was used to immunize rabbits to prepare polyclonal antibody with the dosage of 0.5 mg/per rabbit. After immunized three times, the rabbits were anesthetized with ether, then the blood was collected by a cardiac puncture, and precipitate with saturated ammonium sulfate to obtain polyclonal antibody. ELISA data demonstrated that the antibody titer of the serum was up to 1:100 000. The anti MAA-serum polyclonal antibody had a high quality of potency and specificity. The antibody provided an useful experimental tool to profoundly research the tissue expression profile and biological function of MAA-serum.

Key words: *Monopterus albus* albumin purification polyclonal antibody

水产养殖系统的生态经济研究新进展

珠江三角洲地区是我国重要的水产养殖和出口区,滨海湿地水产养殖业的快速发展也是红树林生态系统快速消失和难以恢复的重要原因,其生态经济效益与影响如何是关系区域可持续发展的重要问题。

中科院华南植物园环境退化与生态恢复领域植被与景观生态学研究组的博士生李林军在其导师任海研究员、陆宏芳研究员的指导下,开展的能值与经济学综合研究表明,区域水产养殖系统虽然在经济投入强度与效益上差异显著,但生态经济表现相近,区域水资源利用率还有较大的提升空间,高投入高产出的集约型水产养殖模式并不一定意味着高环境影响。区域自然湿地生态系统可持续性远高于水产养殖系统,但经济效益低下,如何通过生态工程手段实现红树林保育、恢复与水产养殖的协调发展是实现区域可持续发展的关键性问题。同时,案例研究表明,当前能值评价指标体系中两大效率指标(能值产出率 EYR 与能值转换率 Tr)侧重不同,有得出相左结论的可能,进而构建提出了新的系统综合效率能值评价指标,并通过验证,推动了能值指标体系的发展和完善。

(www.bioon.com)