

褐云玛瑙螺蛋白腺中糖蛋白分离纯化方法初探

陈燕珍 李红艳

(广西师范大学生物系 桂林 541004)

摘要 :褐云玛瑙螺蛋白腺用 pH7.2 的 PBS 提取,50% 饱和度的过硫酸铵沉淀, Sephadex G-150 凝胶过滤, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。结果表明:1. 蛋白腺 50% 级分的蛋白质呈六条带,并证明其中五条为糖蛋白。2. 比较了两种葡聚糖凝胶的分离效果及四种洗脱液的洗脱效果,其中 Sephadex G-150,1 号洗脱液分离效果最佳。

关键词 :褐云玛瑙螺 糖蛋白 纯化

中图分类号 :Q513⁺.2 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2000)01-33-03

褐云玛瑙螺(*Achatina fulica*)属软体动物门,腹足纲,肺螺亚纲,大蜗牛科陆生动物,广西百色地区此螺产量丰富。其肉(即腹足)可食用,因腹足浅褐色,又称此螺为“黑肉蜗牛”。干蜗牛肉含蛋白质 60.42g,脂肪 3.85g,且含铜、铁、锌等微量元素^[1],是一种较好的营养品,近年来受到国内外客商的青睐。褐云玛瑙螺个体大,最重可达 390g,开发利用它已为人们关注。有报道腹足纲蛋白腺是凝集素的丰富来源,并已从其它一些螺中提取出了凝集素^[2],而褐云玛瑙螺蛋白腺的凝集素提取制备未见报道。本文用褐云玛瑙螺蛋白腺为材料,分离提纯其糖蛋白,为综合开发该螺提供一些参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料 褐云玛瑙螺采自广西百色地区树林中,野生。

1.2 方法

蛋白质提取 :参考江红方法^[2]。解剖活的正常褐云玛瑙螺,摘取蛋白腺,按 1:2(W/V)加入 PBS 液(0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 -0.15mol/L NaCl, pH7.2),冰浴中研磨,浸提 30min, -8℃ 离心(12000r/min)15min,收集上

清液备用。

盐析 :向蛋白质提取液中添加硫酸铵达 50% 饱和度,静置过夜,次日离心(15000 r/min)10min,沉淀溶于少量双蒸水中,透析去盐,得 50% 级分蛋白质。

纯化 :选用 Sephadex G-100, G-150 两种凝胶,四种不同离子强度及不同 pH 的洗脱液,经核酸蛋白检测仪(Wz-901 型)检测,收集不同的洗脱峰。

浓缩 :用聚乙二醇(PEG600), Sephadex G-25 浓缩。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) :参考何效忠方法^[3],采用垂直式板状电泳,分离胶浓度 T=10%,交联度 C=2.6%, pH=8.9,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸, pH=8.3。稳压 180V,电泳 2.5h。

蛋白质染色液 :将 0.25g 考马斯亮蓝 R-250 溶于 45.5ml 甲醇中,再加入 9.2ml 冰醋酸,定溶至 100ml。

第一作者介绍 陈燕珍,女,1953 年生,副教授,从事蛋白质酶学研究;

收稿日期 :1998-07-13,修回日期 :1998-12-01

糖蛋白染色液:用 12.5% 三氯乙酸固定 30min,水洗,用含有 7%的冰醋酸的 1%过碘酸钠氧化 50min,水洗,用 0.5%的偏重亚硫酸钠溶液还原 30min,水洗,用 5%阿尔新蓝(溶于 7%冰醋酸)染色 4h。

2 结果

2.1 50%级分的蛋白质主要是糖蛋白

褐云玛瑙螺蛋白腺中的蛋白质经 PBS 提取后,用硫酸铵盐析,收集 50%级分的蛋白质,

经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,分别用考马斯亮蓝,阿尔新蓝染色,结果见图 1(A,B)。用考马斯亮蓝染色呈六条蛋白带,见图 1:A,从负极端编号 a、b、c、d、e、f,d 带含量最少。阿尔新蓝染色呈五条带,见图 1:B,少了 d 带,其他各带的迁移率与考马斯亮蓝染的带相同,说明 50%级分的蛋白质中,共有 6 种蛋白质,其中 5 种是糖蛋白,占蛋白腺蛋白种类中的 84%。

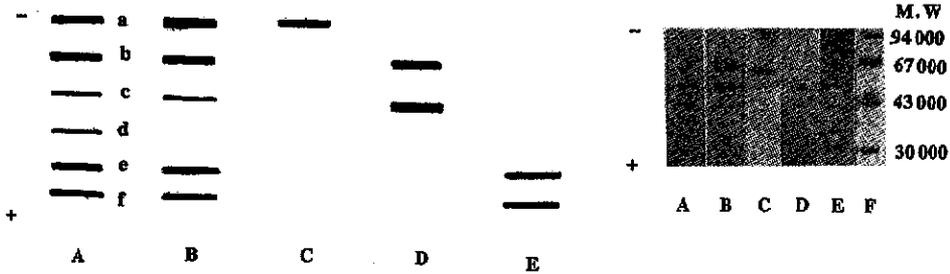


图 1 褐云玛瑙螺蛋白腺蛋白质的 PAGE 模式图及 PAGE 电泳图谱

A. 50%级分蛋白,考马斯亮蓝染色;B. 50%级分蛋白,阿尔新蓝染色;C. Sephadex G-150 第 I 峰;D. Sephadex G-150 第 II 峰;E. Sephadex G-100 平头峰;F. 标准蛋白(磷酸化酶 b, M. W 94000; 清蛋白, M. W 67000; 卵清蛋白, M. W 43000; 碳酸酐酶, M. W 30000)

2.2 不同交联度的葡聚糖凝胶对分离效果的影响

将预处理过的 Sephadex G-100 装柱,柱长 10cm,直径 1cm,连接核酸蛋白检测仪,上样 0.3ml,洗脱液为 0.05mol/L,磷酸盐缓冲液 - 0.15mol/L NaCl, pH7.2,洗脱液流速 0.4ml/min,结果出现一个很宽的平头峰,经 PAGE 检测,为分子量较小的 e, f 带蛋白,见图 1, E。在相同条件下(柱长,上样量,洗脱液,流速)改用 Sephadex G-150,结果分出三个洗脱峰,经 PAGE 检测,得知第 1 峰为分子量最大、迁移率最慢的 a 带、第 2 峰为 b, c 带蛋白,见图 1, C, D。推测第 3 峰为 d, e, f 带蛋白质。可见, Sephadex G-150 的分离效果优于 Sephadex G-100。

2.3 不同洗脱液对洗脱效果的影响

选用 Sephadex G-150,柱长、上样量及洗脱流速不变,用四种不同洗脱液洗脱,即:1 号液: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 - 0.15mol/L NaCl,

pH7.2; 2 号液: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 - 0.20mol/L NaCl, pH7.2; 3 号液: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 - 0.15mol/L NaCl, pH7.4; 4 号液: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 - 0.18mol/L NaCl, pH7.4(结果见图 2)。

从图 2A 中可见, 1 号洗脱液出现三个洗脱峰,第 1 峰收集洗脱液 4ml,第 2 峰 10ml,第 3 峰 5ml, PAGE 检测结果见图 1: C, D。2 号洗脱液仅改变了离子强度, pH 相同,就明显影响分离效果,仅出现 2 个峰。3 号洗脱液与 1 号洗脱液相比,离子强度相同, pH 不同,洗脱峰也出现 3 个,见图 2: B,与 1 号洗脱液的洗脱峰形相似,只是第 2 峰较平坦了一些。4 号洗脱液的 pH,离子强度都改变了,仅出现一个峰。可见,洗脱液中的离子强度对分离效果影响很大,在离子强度合适的条件下,稍微改变 pH 值,仍可达到分离效果。1 号洗脱液的洗脱效果最佳。

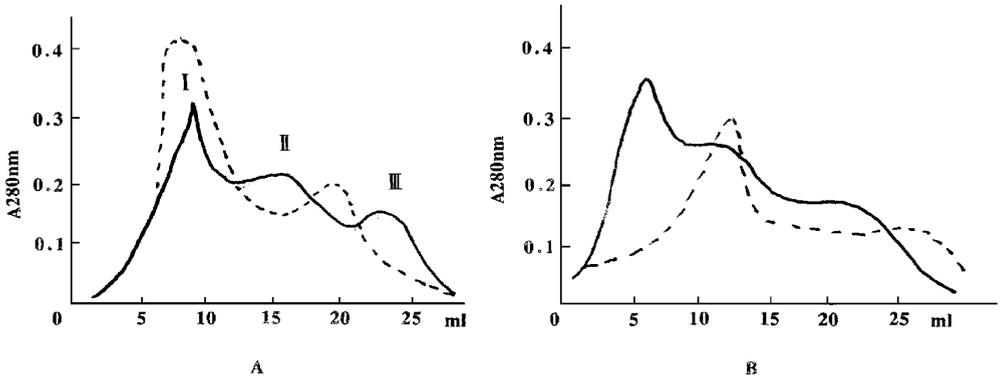


图2 不同洗脱液对洗脱效果的影响

— 1,3号洗脱液 2,4号洗脱液

2.4 两种浓缩方法的比较

将聚乙二醇(PEG600)装入烧杯内^[4],样液用透析袋装好,夹紧,埋入PEG内,约3h,可达到浓缩效果。缺点是花时间较长,浓缩液粘在透析袋上,不易完全收集。

用Sephadex G-25浓缩,可直接将G-25加入洗脱液中^[5],约30min后,离心(12000r/min)5min,上清液即为浓缩液。此法省时、方便,Sephadex G-25可烘干,重复使用。

3 讨论

选择合适型号的凝胶对分离纯化蛋白质至关重要。Sephadex是具有三维网状结构的高分子聚合物。混合物的分离程度主要取决于凝胶颗粒内部微孔的孔径和混合物分子质量的分布范围。样品有几种组分时,选择既有全排除,又有全进孔的凝胶较理想。但在不知道分子量范围时,只能试用某种交联度的凝胶,观察每个洗脱峰中蛋白质分离情况,从而知道凝胶选择是否合适。进行PAGE时,加一个标准蛋白作参照,则更有利于判断。洗脱液的pH,离子强度特别是后者对洗脱效果的影响较大,可设计几种不同的洗脱液配方,观察洗脱效果,从而筛选出洗脱效果最佳的一种。Sephadex不仅可用于分离高分子物质,也可用于浓缩,还可用于脱盐^[6],要注意的是须选择合适的型号。

褐云玛瑙螺蛋白腺含有丰富的糖蛋白,作者做血凝试验观察到蛋白腺的粗提物有血凝活

性,它与哪一种糖专一结合,理化性质如何,有待深入研究。

随着凝集素纯化方法的发展,凝集素应用的范围越来越广阔,成为生物化学、生物学、免疫学及医学等各个领域中的有用研究工具^[7],也被用于临床诊断和治疗^[8,9]。

褐云玛瑙螺综合开发利用前景广阔。

参 考 文 献

- [1] 高本刚,高松.高效益药用动物养殖与药材加工(第二版).北京:中国林业出版社,1994.45.
- [2] 江红,李清漪.大瓶螺凝集素的分离纯化及部分性质研究.生物化学杂志,1996,12(3):352~356.
- [3] 何忠效,张树政.电泳.北京:科学出版社,1990.35.
- [4] 张树政,孟广震,何忠效.酶学研究技术(第二版).北京:科学出版社,1987.23.
- [5] 赵永芳.生物化学技术和原理及应用(第二版).武汉:武汉大学出版社,1995.4.
- [6] 李建武,袁明秀.生物化学实验原理和方法.北京:北京大学出版社,1994.47.
- [7] Ikehara, Y., Kimimitsu ODA, Keitaro KATO. An Improved Method for the purification of Rat Serum Albumin: Removal of Contaminants by Concanavalin A-Sepharose. *J. Biochem.*, 1977, **81**:1293~1297.
- [8] Murphy L. A., Goldstein I. J. Five α -D-Galactopyranosyl-binding Isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* Seeds. *J. Biochem.*, 1977, **252**:4739~4742.
- [9] Furbish F. S., C. J. Steer., N. L. Krett. *et al.* Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosylation. *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, **673**:425~434.