

湖北钉螺凝集素分离纯化及相对分子质量的测定

周书林^{1*}, 彭怀明^{1,2}, 李朝品¹, 刘辉¹, 赵劲松¹, 操治国³

【摘要】 目的 分离、纯化湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)体内凝集素, 测定其相对分子质量。方法 用饱和度为 0~40% 的硫酸铵对钉螺腹足部软体组织匀浆液进行分离, 对其沉淀物先后采用 Sephadex G-75 凝胶过滤层析和 Sepharose 4B 亲和层析进行纯化。采用 Bradford 法测定纯化后凝集素的蛋白质含量, 红细胞凝集试验测定其凝集活性, 并计算比活力。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测凝集素的纯化效果, 并测定其亚基相对分子质量。利用 Sephadex G-75 凝胶层析测定钉螺凝集素的相对分子质量。结果 饱和度为 0~40% 硫酸铵对钉螺凝集素组织匀浆液进行分离, 比活力从组织匀浆液的 21.74 titer/mg 提高到了 61.93 titer/mg。经 Sephadex G-75 凝胶层析和 Sepharose 4B 亲和层析, 钉螺凝集素的比活力分别提高到 75.89 titer/mg 和 963.86 titer/mg。对凝胶过滤层析和亲和层析纯化后的凝集素进行 SDS-PAGE 分析, 可见单一清晰条带, 凝集素亚基的相对分子质量约为 M_r 53 000。凝胶层析测定钉螺凝集素的相对分子质量约为 M_r 78 000。结论 盐析法、凝胶层析和亲和层析联合应用可对湖北钉螺凝集素进行有效的分离纯化。湖北钉螺凝集素为单亚基蛋白。

【关键词】 湖北钉螺; 凝集素; 分离; 纯化; 相对分子质量

中图分类号: R383.241

文献标识码: A

Isolation and Purification of *Oncomelania hupensis* Agglutinin and Determination of its Molecular Weight

ZHOU Shu-lin^{1*}, PENG Huai-ming^{1,2}, LI Chao-pin¹, LIU Hui, ZHAO Jin-song¹, CAO Zhi-guo³

(1 Wannan Medical College, Wuhu 241000, China; 2 Taizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taizhou 225300, China; 3 Anhui Provincial Institute of Schistosomiasis Control, Hefei 230061, China)

【Abstract】 **Objective** To isolate and purify agglutinin from *Oncomelania hupensis* snail and determine its molecular weight. **Methods** Agglutinin was preliminarily isolated from snail tissue homogenate by 0%–40% saturated ammonium sulfate, and then successively purified with Sephadex G-75 gel filtration and Sepharose 4B affinity chromatography. Bradford assay was used to determine the protein content. The agglutination activity was determined by rabbit erythrocytes. The purity of agglutinin preparations was assessed by SDS-PAGE. The molecular weight of agglutinin subunit was determined by Sephadex G-75 gel filtration. **Results** The specific activity of snail tissue homogenate was 21.74 titer/mg. After ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-75 gel filtration and Sepharose 4B affinity chromatography, the specific activity of snail agglutinin from the homogenate solution increased to 61.93 titer/mg, 75.89 titer/mg and 963.86 titer/mg, respectively. SDS-PAGE analysis indicated that snail agglutinin (M_r 53 000) was purified by Sephadex G-75 gel filtration and Sepharose 4B chromatography. The molecular weight of the snail agglutinin produced by Sephadex G-75 gel filtration was M_r 78 000. **Conclusion** Combined use of salt fractionation, gel filtration and affinity chromatography can be efficient for extraction and purification of agglutinin from *Oncomelania hupensis* species. The snail agglutinin is characterized as monosubunit protein with a molecular weight of M_r 78 000.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Agglutinin; Extraction; Purification; Molecular weight

Supported by Anhui Provincial Natural Science Fund (No. 11040606M214) and Natural Science Fund of Anhui Provincial Education Department (No. kj2009B152)

* Corresponding author, E-mail: zhouslokk@yahoo.com.cn

基金项目: 安徽省自然科学基金 (No. 11040606M214); 安徽省教育厅自然科学基金 (No. kj2009B152)

作者单位: 1 皖南医学院, 芜湖 241000; 2 泰州市中国医药城医院, 泰州 225300; 3 安徽省血吸虫病防治研究所, 合肥 230061

* 通讯作者, E-mail: zhouslokk@yahoo.com.cn

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 的惟一中间宿主, 控制钉螺对日本血吸虫病防治具有非常重要的作用^[1]。湖北钉螺隶属于软体动物门腹足纲, 软体动物缺乏后天获得的特异性免疫功能, 不产生免疫球蛋白, 但有先天性的非特异性免疫系统, 能够识别和有效清除入侵的微生物和寄生虫等异物^[2]。起主要识别和清除异物作用的是模式识别分子 (pattern recognition molecule), 作为模式识别分子之一的凝集素在免疫应答早期阶段发挥着积极的作用, 构成了机体免疫防御的第一道防线^[3]。对钉螺凝集素的研究可以更进一步了解钉螺的免疫系统, 有助于灭螺药物开发或钉螺无害化研究。目前, 国内外对钉螺凝集素的研究报道较少。本文在前期对钉螺凝集素提取及其活性初步研究的基础上^[4], 对其进行分离纯化并测定相对分子质量。

材料与方法

1 材料

实验用钉螺采自安徽省芜湖市鲁港镇龙窝湖江滩, 系湖北钉螺, 肋壳钉螺, 壳高 5~8 mm, 未接触灭螺药, 逸蚴试验阴性。兔红细胞悬液参照文献^[4]方法制备。

2 主要试剂和仪器

葡聚糖凝胶 G-75 (Sephadex G-75) 和琼脂糖凝胶 4B (Sephacryl 4B) 购自美国 Pharmacia 公司, 硫酸铵购自安启生物科技有限公司, 聚乙二醇 20000 和蓝色葡聚糖-2000 购自德国 Merck 公司, 标准蛋白质混合液和蛋白质标志物购自上海佳伦生物科技有限公司。紫外分光光度计 (U-8000) 为日本 Hitachi 公司产品, 稳压稳流型电泳仪 (BG-Power 600i) 为北京百晶生物技术有限公司产品, 蛋白核酸检测仪 (HD-2000) 为上海嘉鹏科技有限公司产品, 层析谱数据分析系统 (DB-3) 为南京高校园生物技术研究所产品, 凝胶图像分析软件为珠海市黑马医学仪器有限公司产品。

3 方法

3.1 钉螺凝集素的初步分离 参照文献^[4]的方法制备钉螺腹足部软体的组织匀浆液, 采用饱和度为 0~40% 硫酸铵初步分离钉螺凝集素。按文献^[4]的方法检测组织匀浆液、硫酸铵沉淀分离液对兔红细胞的凝集活性, 采用 Brandford 法测定其蛋白浓度, 并计算比活力, 公式为比活力 = [(总体积/0.025) × 活性滴度] /

蛋白质含量。

3.2 Sephadex G-75 凝胶层析 参照文献^[5]的方法, 采用 Sephadex G-75 层析柱 (1.6 cm × 50 cm) 对上述凝集素分离液进行分离纯化。取 3 ml 凝集素分离液上样, 用自动收集器收集洗脱液。应用 DB-3 层析谱数据分析系统采集层析图谱, 测定各峰收集的蛋白质对兔红细胞的凝集活性。取具有凝集活性峰的洗脱液, 以聚乙二醇 20000 浓缩至 3 ml, -20 °C 保存备用。测定浓缩液的红细胞凝集活性和蛋白浓度。

3.3 Sepharose 4B 亲和层析 采用 Sepharose 4B 亲和层析柱 (3.5 cm × 20 cm) 对钉螺凝集素进行亲和层析纯化。取方法 3.2 获得的浓缩样品 2.5 ml 上样, 用 PBS 液洗脱杂质蛋白。用 0.3 mol/L D-半乳糖解吸附, 测定其吸光度 (A_{280} 值), 根据层析图谱收集蛋白峰的洗脱液。将所收集的洗脱液在超滤水中透析 12 h, 去除糖和盐, 以聚乙二醇 20000 在 4 °C 下浓缩, 测定红细胞凝集活性和蛋白浓度, -20 °C 保存备用。

3.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 参照文献^[6]的方法进行 SDS-PAGE 分析, 经考马斯亮蓝 R-250 和 Schiff's 试剂染色 2 h。用蛋白凝胶电泳图像分析软件测定相对迁移率, 以蛋白质标志物的对数为纵坐标, 相对迁移率为横坐标作图, 制作标准曲线回归方程, 测定样品的相对迁移率, 依据标准曲线的回归方程计算出钉螺凝集素亚基的相对分子质量。

3.5 钉螺凝集素相对分子质量的测定 采用凝胶过滤法测定钉螺凝集素的相对分子质量。按照方法 3.2 进行凝胶过滤层析, 先将 0.5 ml 蓝色葡聚糖-2000 上柱, 用 PBS 溶液洗脱, 测定洗脱体积 (V_0)。将 1 ml 标准蛋白质混合液上柱, 用 PBS 溶液洗脱。根据洗脱峰位置, 测定每种蛋白质的洗脱体积 (V_e)。以蛋白质相对分子质量的对数 ($\lg M_r$) 为纵坐标, V_e 为横坐标, 制作标准曲线。将待测样品溶液上柱, 用 PBS 溶液洗脱, 测定洗脱体积, 代入标准曲线的回归方程计算钉螺凝集素的相对分子质量。

结 果

1 硫酸铵沉淀分离和红细胞凝集活性

结果显示, 组织匀浆液的凝集活性为 2^5 。经硫酸铵分离获得的凝集素分离液的总活力为组织匀浆液的 52%, 比活力是组织匀浆液的 2.85 倍 (表 1)。

2 各级分离纯化蛋白质的含量和活性变化

各级分离纯化蛋白质含量、总活力和比活力变化如表 1 所示。经 0~40% 饱和度硫酸铵沉淀的蛋白

质含量为组织匀浆液的 62%，总活力为组织匀浆液的 52%，比活力是其 2.85 倍。经 Sephadex G-75 凝胶层析纯化的蛋白质含量降至 12.7 mg，总活力为组织匀浆液的 30%，比活力为其 3.49 倍。Sephacrose 4B 亲和层析纯化的蛋白质含量仅为 0.8 mg，总活力为组织匀浆液的 25%，但比活力为其 44.33 倍。

3 Sephadex G-75 凝胶层析

钉螺凝集素 Sephadex G-75 层析图谱显示，共有 3 个蛋白质峰(图 1)。兔红细胞凝集试验测得第 2 个峰有红细胞凝集活性。

4 Sephacrose 4B 亲和层析

钉螺凝集素 Sephacrose 4B 层析图谱(图 2)显示，PBS 液、0.3 mol/L D-半乳糖洗脱的蛋白质吸光度

(A_{280} 值)峰值分别为 0.22 和 0.62。经兔红细胞凝集试验证实，上述两峰的洗脱液，前者无红细胞凝集活性，后者具有红细胞凝集活性。

5 钉螺凝集素的纯化效果和亚基相对分子质量测定

SDS-PAGE 结果显示，依纯化的次序，蛋白质条带数量逐渐减少，经 Sephacrose 4B 亲和层析的样品为单一清晰条带(图 3)。

应用凝胶图像分析软件对 SDS-PAGE 电泳图谱进行分析，绘制标准曲线，求得回归方程： $Y = -1.328X + 5.200$ 。钉螺凝集素亚基相对迁移率为 0.35，相对分子质量约为 M_r 53 000。

6 钉螺凝集素相对分子质量测定

采用凝胶过滤法测定钉螺凝集素的相对分子质

表 1 钉螺凝集素的纯化
Table 1 Purification of *Oncomelania* snail agglutinin

	体积/ml Volume/ml	蛋白含量/mg Protein content/mg	总活力/titer Total activity/titer	活力回收率/% Recovery rate/%	比活力/titer·mg ⁻¹ Specific activity/titer·mg ⁻¹	纯化倍数 Purification fold
组织匀浆液 Tissue homogenate	10	147.2	3 200	100	21.74	1
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate precipitate	5.2	91.6	1 664	52	61.93	2.85
凝胶层析 Sephadex G-75 gel filtration chromatography	3	12.7	960	30	75.89	3.49
亲和层析 Sephacrose 4B gel filtration chromatography	2.5	0.8	800	25	963.86	44.33

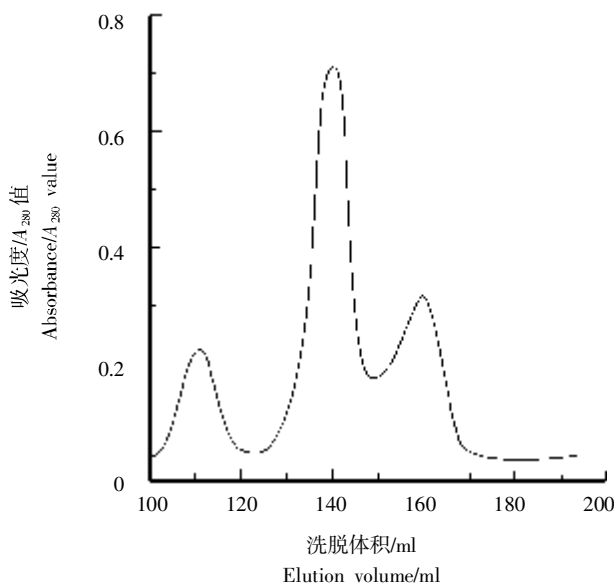


图 1 钉螺凝集素 Sephadex G-75 层析图谱

Fig.1 Sephadex G-75 chromatmap of *Oncomelania* snail agglutinin

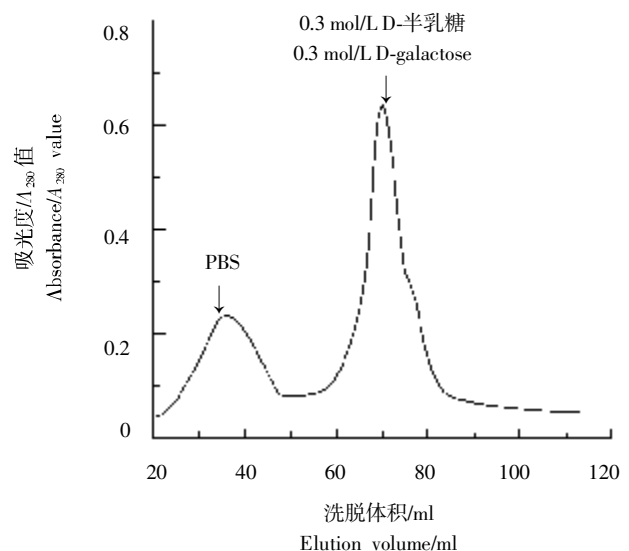
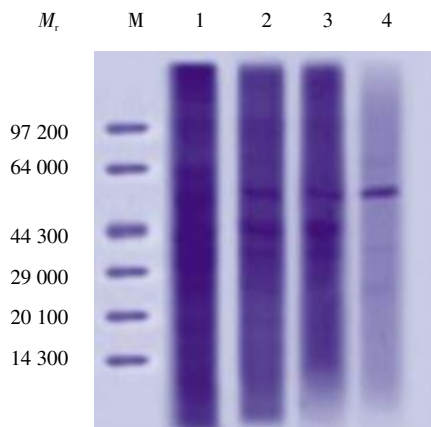


图 2 钉螺凝集素 Sephacrose 4B 层析图谱

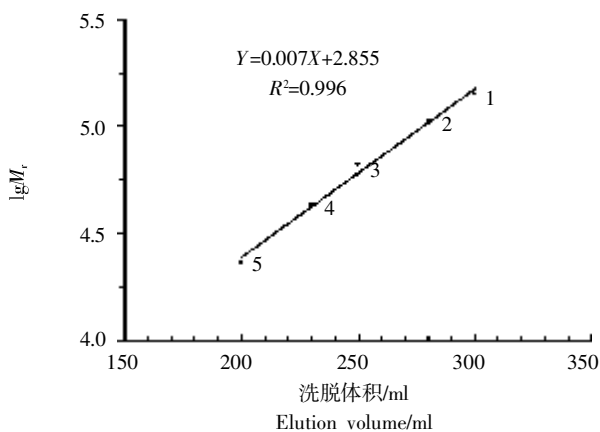
Fig.2 Sephacrose 4B chromatmap of *Oncomelania* snail agglutinin

量, 获得回归方程为: $Y=0.007X+2.885$ (图 4)。钉螺凝集素洗脱体积为 290 ml, 计算出钉螺凝集素的相对分子质量为 M_r 78 000。



M: 蛋白质标志物; 1: 钉螺软体组织匀浆液; 2: 0~40%饱和度硫酸铵作用下的沉淀物; 3: Sephadex G-75 凝胶层析获得的蛋白质; 4: Sepharose 4B 亲和层析获得的蛋白质。
M: Protein marker; 1: Homogenate from snail tissue; 2: 0~40% ammonium sulfate protein precipitate; 3: Protein purified by Sephadex G-75; 4: Protein purified by Sepharose 4B.

图 3 不同提取纯化阶段钉螺凝集素的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of *Oncomelania* snail agglutinin at different purification phase



1: 乙醇脱氢酶 (M_r 141 100); 2: 刀豆球蛋白 A (M_r 102 000); 3: 牛血清白蛋白 (M_r 67 000); 4: 卵清蛋白 (M_r 43 000); 5: 胰蛋白酶 (M_r 23 000)。
1: Alcohol dehydrogenase (M_r 141 100); 2: Concanavalin A (M_r 102 000); 3: Bovine serum albumin (M_r 67 000); 4: Ovalbumin (M_r 43 000); 5: Trypsin (M_r 23 000).

图 4 Sephadex G-75 凝胶层析测定蛋白质分子量的标准曲线
Fig. 4 Standard curve for protein molecular weight determination by Sephadex G-75

讨 论

在同一种动物体内可能存在多种凝集素^[7]。王新生等^[8]对褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 凝集素的研究表

明, 其血清凝集素和肌肉凝集素是两种不同的凝集素, 其凝集活性存在明显的差异。钉螺的个体较小, 体内血淋巴液含量少, 按照文献 [9] 所述方法收集的血淋巴液, 不能达到蛋白提取量的要求。本研究提取的钉螺凝集素主要是钉螺腹足部软体组织匀浆后的沉淀, 应主要为钉螺肌肉凝集素。

蛋白质分离与纯化的方法在不断更新, 从较为简单的盐析法发展到较为先进的高效液相色谱, 目前可用的方法有数十种^[10]。不同凝集素间的性质差异很大, 因而分离纯化的方法也有很大的差别。但经典的蛋白分离纯化的方法仍是凝集素分离最基本的方法。目前大多数凝集素的分离纯化方法主要是盐析法与亲和层析法^[11,12]。为减少钉螺凝集素活性的改变, 本研究用饱和度为 0~40% 硫酸铵对钉螺组织匀浆液进行分离, 虽然总活力为钉螺组织匀浆液的 52%, 但比活力为其 2.85 倍, 说明硫酸铵盐析法适用于湖北钉螺凝集素的初步分离, Naganuma 等^[12]对企鹅珍珠贝 (*Pteria pen-guin*) 凝集素采用盐析法初步分离也获得较为满意的结果。本研究在硫酸铵盐析法的基础上, 先后采用 Sephadex G-75 凝胶层析和 Sepharose 4B 亲和层析对钉螺凝集素进行纯化, 钉螺凝集素的比活力分别提高到 75.89 和 963.86 titer/mg。该结果说明 Sepharose 4B 亲和层析的纯化效果优于 Sephadex G-75 凝胶层析, 对钉螺凝集素的纯化更具有特异性。SDS-PAGE 分析结果显示, Sepharose 4B 亲和层析后杂质蛋白明显减少, 再次验证了亲和层析对钉螺凝集素纯化的特异性。

已有研究者对其他软体动物体内凝集素相对分子质量和亚基组成进行了研究。Yoshino 等^[13]采用硫酸铵盐析和凝胶层析等技术研究光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 凝集素, 其相对分子质量为 M_r 32 000。Shigeru 等^[14]报道褐云玛瑙螺 (*Achatina fulica*) 肌肉凝集素的相对分子质量为 M_r 350 000, 由多个 M_r 76 000 亚基组成, 属于高分子凝集素。钉螺凝集素与其他动物的凝集素的相对分子质量和亚基相对分子质量大小不同, 这可能是不同的物种之间的凝集素存在差异或不同部位的凝集素不完全相同。

参 考 文 献

[1] Zhou XN. Science on *Oncomelania* Snail [M]. Beijing: Science Press, 2005; 1-2. (in Chinese)
(周晓农. 实用钉螺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005; 1-2.)
[2] William EP. Fundamental Immunology [M]. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008; 66-67.
[3] Jiang H, Sun C. Agglutinin of mollusks [J]. Chem Life, 1996, 16(5): 28-31. (in Chinese)
(江红, 孙册. 软体动物凝集素 [J]. 生命的化学, 1996, 16(5): 28-31.)
[4] Peng HM, Li CP, Liu H, et al. Extraction of agglutinin from *Oncomelania hupensis* and its haemagglutination activity [J]. Chin

- J Parasitol Parasit Dis, 2011, 29(2): 130-133. (in Chinese)
(彭怀明, 李朝品, 刘辉, 等. 湖北钉螺凝集素的提取及其活性研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(2): 130-133.)
- [5] Cutler P. Protein Purification Protocols [M]. 2nd ed. Totowa; Humana Press, 2004: 239-249.
- [6] Guo XJ. Experimental Technique of Protein Electrophoresis [M]. Beijing: Science Press, 1999: 132-138. (in Chinese)
(郭晓君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 132-138.)
- [7] Mansour M, Abdul-Salam F. Characterization of fucose-binding lectins in rock- and mud-dwelling snails inhabiting Kuwait Bay [J]. Immunobiology, 2009, 214(1): 77-85.
- [8] Wang XS, Hu BQ, Wen CG. Study on activity of lectins in serum and muscular extraction from *Cristaria plicata* [J]. J Hydroecol, 2008, 1(6): 95-100. (in Chinese)
(王新生, 胡宝庆, 文春根. 褶纹冠蚌血清和肌肉凝集素的活性研究 [J]. 水生生态学杂志, 2008, 1(6): 95-100.)
- [9] Wang XQ, Qiu LS, He YX, et al. Morphology and phagocytic activity of hemocytes of *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1994, 12(4): 100-103. (in Chinese)
(王晓勤, 裘丽妹, 何毅勋, 等. 湖北钉螺血淋巴细胞的形态及其吞噬功能 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1994, 12(4): 100-103.)
- [10] Zhu HC. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual [M]. Beijing: Science Press, 2002: 6. (in Chinese)
(朱厚础. 蛋白质纯化与鉴定实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 6.)
- [11] Adhya M, Singha B, Chatterjee B. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine specific lectin from marine bivalve *Macoma birmanica* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(1): 1-8.
- [12] Naganuma T, Ogawa T, Hirabayashi J, et al. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve *Pteria penguin* [J]. Mol Divers, 2006, 10(4): 607-618.
- [13] Yoshino TP, Dinguirard N, Kunert J, et al. Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* [J]. Gene, 2008, 411(1/2): 46-58.
- [14] Shigeru I, Masahiro S, Maki N, et al. High molecular weight lectin isolated from the mucus of the giant African snail *Achatina fulica* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(1): 20-25.
(收稿日期: 2011-08-11 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2011)-06-0457-04

【研究简报】

N-乙酰半胱氨酸对日本血吸虫病小鼠肝组织中丙二醛和超氧化物歧化酶的影响

范志刚¹, 李凯杰², 张玲敏^{3*}

【提要】 将 90 只小鼠随机分为健康对照组 (18 只)、感染对照组 (18 只)、长期服药组 1 (18 只)、长期服药组 2 (18 只)、短期服药组 1 (9 只) 和短期服药组 2 (9 只), 共 6 组。除正常对照组外, 余各组小鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 30 条。于感染的同时给长期服药组 1 和长期服药组 2 小鼠分别灌胃 200 mg/kg、400 mg/kg N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)(溶于 0.2 ml 蒸馏水), 2 次/d, 共 56 d; 短期服药组 1 和短期服药组 2 小鼠在感染的第 42 天开始分别灌胃 200 mg/kg、400 mg/kg NAC (溶于 0.2 ml 蒸馏水), 2 次/d, 共 14 d。正常对照组和感染对照组小鼠于感染同时灌胃 0.2 ml 生理盐水, 2 次/d, 共 56 d。正常对照组、感染对照组、长期服药组 1 和长期服药组 2 小鼠分别在感染后第 42 天和 56 天各处死 9 只; 短期服药组 1 和短期服药组 2 于感染后第 56 天全部处死。观察各组小鼠肝组织中日本血吸虫单个虫卵肉芽肿个数和面积、血清和肝组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果表明, 小鼠肝组织中炎症细胞浸润程度为“+”级单个虫卵肉芽肿个数以长期服药组 1 最少, 平均为 3.04±0.25 个, 其次为短期服药组 1, 平均为 4.87±0.19 个。长期服药组 2 小鼠肝组织中 MDA 的水平(9.2~9.3 nmol/mg)显著低于长期服药组 1 (12.15~12.20 nmol/mg)($P<0.05$)。长期服药组 1 和短期服药组 1 小鼠肝组织 SOD 活性处在同一水平 [170.00~190.00 U/(g·pro)]($P>0.05$), 长期服药组 2 小鼠第 42 天也处于这一水平 ($P>0.05$), 但第 56 天与短期服药组 2 在同一水平 ($P>0.05$)。因此, NAC 可减缓日本血吸虫病小鼠肝组织中单个虫卵肉芽肿形成, 调节日本血吸虫病小鼠肝组织内 MDA 含量和 SOD 活性。

【关键词】 N-乙酰半胱氨酸; 日本血吸虫; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R532.21

文献标识码: B

作者单位: 1 海南医学院病原生物学教研室, 海口 571101; 2 湖北省疾病预防控制中心, 武汉 430079;

3 暨南大学医学院寄生虫学教研室, 广州 510632

* 通讯作者, E-mail: tzhanglm@jnu.edu.cn