

文章编号:1674-7054(2011)03-0226-04

黄鳍皮肤白蛋白的纯化及性质

张英霞¹, 韦双双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, 从黄鳍(*Monopterus albus*) 皮肤中得到其白蛋白, 命名为 MAA-skin。该蛋白为单链蛋白质, 相对分子质量为 67×10^3 , 经 Schiff's 试剂鉴定为非糖蛋白, 其 N-末端氨基酸序列为 GHVKW。用纯化的黄鳍血清白蛋白(MAA-serum) 为免疫原免疫大白兔, 制备抗 MAA-serum 的多克隆抗体。经 ELISA 检测, 该抗体与 MAA-skin 有强烈的免疫反应, 抗体滴度为 1:10 000。Western blot 检测, 该抗体与 MAA-skin 也发生阳性反应, 强度与 MAA-serum 相似。这说明黄鳍皮肤中分布有大量白蛋白, 推测其在黄鳍皮肤的水盐代谢、渗透压维持、吸收、转运外界环境的物质等方面具有重要作用。

关键词: 黄鳍; 血清白蛋白; 分离纯化

中图分类号: Q 959.53

文献标志码: A

黄鳍(*Monopterus albus*) 属合鳃鱼目, 合鳃鱼科, 黄鳍属。为热带及暖温带鱼类, 营底栖生活, 适应能力强, 在河道、湖泊、沟渠及稻田中都能生存。日间喜在多腐植质淤泥中钻洞或在堤岸有水的石隙中穴居。鳃不发达, 而借助口腔及喉腔的内壁表皮作为呼吸的辅助器官, 能直接呼吸空气; 在水中含氧量十分贫乏时, 也能生存。出水后, 只要保持皮肤潮湿, 数日内亦不会死亡。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 68×10^3 及 73×10^3 血清白蛋白, 大蹼铃蟾及黑眶蟾蜍皮肤及血清白蛋白等^[1-2]。血清白蛋白是脊椎动物血浆中含量最丰富的蛋白质, 通常由肝脏合成, 约占血浆总蛋白的一半。人血清白蛋白(human serum albumin, HSA) 是由 585 个氨基酸组成的单链蛋白质, 相对分子质量为 67×10^3 , 为非糖蛋白质。成熟的 HSA 是一个心形分子, 由 3 个结构相似的 α -螺旋结构域组成^[3-4]。不同来源的血清白蛋白氨基酸序列及空间结构非常保守。血清白蛋白具有重要的生理功能, 如结合许多内源及外源性组分, 维持血浆的胶体渗透压, 清除自由基, 抑制血小板聚集, 抗凝血, 影响动脉血管的渗透性等^[5-7]。为了进一步研究黄鳍血清白蛋白的功能, 笔者对黄鳍皮肤白蛋白进行了分离纯化。

1 材料与方方法

1.1 材料 DEAE-Sephadex A-50 和 Sephadex G-75 (superfine) 购自 Amersham-Pharmacia (Sweden)。Bovine serum albumin (BSA), 完全及不完全佛氏佐剂, 3,3'-diaminobenzidine (DAB), O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD), 正常羊血清, trypsin 及生色底物 L-Benzoyl-L-arginine-pNA (BAPNA) 为 Sigma 公司 (USA) 产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购自 Santa Cruz Biotechnology (USA)。其它试剂均为分析纯。本实验中的蛋白质浓度均采用 Bio-Rad 蛋白定量试剂, 以 BSA 为标准测定。

1.2 黄鳍血清白蛋白(MAA-skin)的分离纯化 将黄鳍皮肤清洗至无色, 于 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH 7.8, 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 缓冲液中 4°C 匀浆, $12\,000 \text{ g}$ 离心 20 min 收集上清。将上清液缓慢加入等体积饱和硫酸铵 (pH7.2) 溶液, 静置 30 min, 室温 $8\,000 \text{ g}$ 离心 20 min, 收集上清液, 缓慢加入固体硫酸铵粉末至饱和。静置 5 min, 室温 $8\,000 \text{ g}$ 离心 20 min, 弃上清, 沉淀溶于 $5 \text{ mL ddH}_2\text{O}$ 中, 于 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH 7.8, 含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 缓冲液中 4°C 透析 24 h。上样于用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris,

收稿日期: 2011-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700128)

作者简介: 张英霞(1973-), 女, 吉林集安人, 海南大学海洋生物教学示范中心副教授, 博士。

pH 7.8,含有 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析柱(2.6 cm × 50 cm),用平衡缓冲液冲洗至穿透峰被完全洗脱,用 $400 \sim 400 \text{ mL } 0 \sim 0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 进行梯度洗脱,每管 5 mL。收集目的组分峰,冻干后溶于 ddH₂O 中 $4 \text{ } ^\circ\text{C } 5\ 000 \text{ g}$ 离心 10 min,取上清,上样于用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris (pH 7.8,含有 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 缓冲液平衡的 Sephadex G-75 凝胶过滤层析柱(2.6 cm × 100 cm),每管 3 mL,用上述缓冲液洗脱。收集目的组分峰, $-70 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3 MAA-skin 的 N-末端氨基酸序列测定 通过 Edman 降解法测定 MAA-skin 的 N-末端氨基酸序列 (Applied Biosystems pulsed liquid-phase sequencer, model 492C)。

1.4 MAA-skin 的胰蛋白酶抑制活性测定 在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, pH 7.8,含有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂ 的反应体系中,于 $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 测定纯化的 MAA-skin 对胰蛋白酶 trypsin 水解生色底物的抑制影响。将不同量的 MAA-skin ($0.05 \sim 5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与终浓度为 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ trypsin 于 $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保温 15 min,加入终浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BApNA 起始反应。连续 2 min 于 410 nm 处监测 p-nitroaniline 的释放。

1.5 辅基鉴定 在 0.5 mL 含 $\varphi = 40\%$ 吡啶的 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 中,加 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K₃Fe(CN)₆,再加入 0.5 mL ($7.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 MAA-skin 或 MAA-serum 混匀后扫描 $350 \sim 700 \text{ nm}$ 氧化态光谱。再加入 1.5 mg 连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄) 混匀后扫描还原态光谱。

1.6 ELISA 检测抗体效价及免疫交叉反应 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MAA-skin, MAA-serum, 黄鳍皮肤匀浆物,血清白蛋白及 BSA 分别溶于 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂CO₃ - NaHCO₃ 缓冲液(pH9.6),包被 96 孔酶标板,每一样品包被 3×8 孔,每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$ $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 过夜。用含 $w = 0.05\%$ 的 Tween-20 的 PBS(PBS-T) 洗板 5 次,每次 5 min。每孔加入 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 含 $w = 5\%$ 正常羊血清的 PBS-T $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保温 1 h,封闭非特异性结合位点。丢弃封闭液,将纯化的 MAA-serum 多克隆抗体用封闭液从 1:100 进行 10 倍梯度稀释到 $1:10^8$,每孔加 $100 \text{ } \mu\text{L}$,每一浓度每一样品包被孔加 3 孔, $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保温 1 h,另外,每一样品包被的 3 个孔分别加 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 1:100 稀释的免疫前兔血清为阴性对照。PBS-T 洗板 5 次,每次 5 min。每孔加 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保温 1 h, PBS-T 洗板 5 次,每次 5 min。每孔加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 含 $w = 0.03\%$ 的 H₂O₂ 溶于磷酸-柠檬酸缓冲液的 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ OPD (新鲜配制),室温放置 $5 \sim 15 \text{ min}$,再加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $w = 12\%$ 的 H₂SO₄ 终止反应。用 Bio-Tek 酶标仪,读取 490 nm 光吸收值。抗体滴度以产生最大反应信号一半的一抗稀释度计算。

1.7 Western Blot MAA-skin 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,以半干型电转仪 40 mA , 1.5 h 转移至 PVDF 膜,用 $w = 5\%$ 正常羊血清(稀释于 PBS-T),于室温封闭 PVDF 膜 2 h。弃封闭液,加入 $1:10^6$ 稀释(封闭液稀释)纯化抗体 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 过夜。PBS-T 洗膜 5 次,每次 5 min。加 $1:5\ 000$ 稀释(封闭液稀释)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,每次 5 min。膜以 TMB 显色,水洗终止反应。

2 结果

2.1 MAA-skin 分离纯化 通常在血清中加入硫酸铵,当饱和度为 $28\% \sim 33\%$ 时,优球蛋白析出; $33\% \sim 55\%$ 时,拟球蛋白析出;饱和度大于 50% 血清白蛋白析出^[8]。经硫酸铵沉淀的黄鳍血清白蛋白上 DEAE-Sephadex A-50 共得到 4 个峰,其中第 IV 峰为目的组分峰(图 1),收集该组分进行 Sephadex G-75 凝

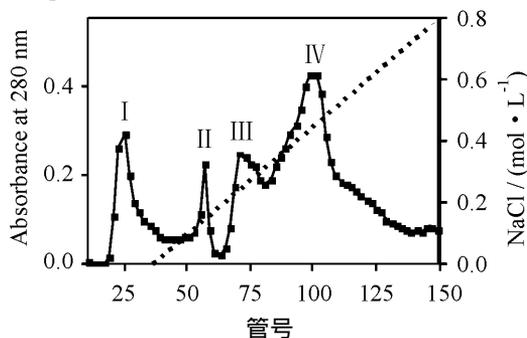


图1 黄鳍皮肤匀浆物的 DEAE-Sephadex A-50 层析图

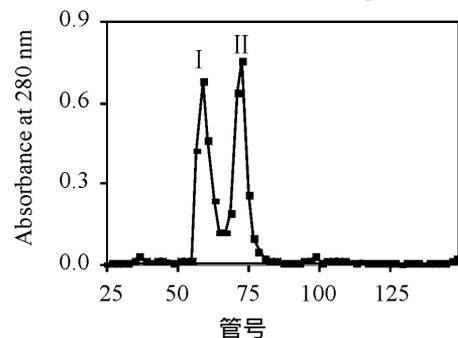


图2 黄鳍皮肤匀浆物 DEAE-Sephadex A-50 第 IV 峰的 Sephadex G-75 层析图

胶过滤层析,共得到2个峰,其中第Ⅱ峰为目的组分峰(图2),收集该峰,即为黄鳍皮肤白蛋白,命名为MAA-skin。对该组分进行SDS-PAGE,在还原状态下,显示为清晰的单一条带,相对分子质量约为 67×10^3 (图3)。在Native-PAGE上,也显示为单一条带。经Shiff's试剂检测,为非糖蛋白。经N-末端氨基酸序列测定为GHVKW。经辅基鉴定发现,黄鳍皮肤及血清白蛋白均含有少量的血红素b辅基,约为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白。

2.2 MAA-skin的胰蛋白酶抑制活性 MAA-skin具有较弱的抑制trypsin水解底物的活性。当抑制剂浓度在 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制约10%的 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的trypsin对BAPNA的水解活性。当 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MAA-skin与 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的trypsin保温15 min时,抑制的trypsin百分数无增高。这说明黄鳍血清白蛋白对trypsin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-skin与抗体的免疫交叉反应 纯化的兔抗MAA-serum抗体滴度较高,达到1:100 000。酶联免疫吸附实验结果表明,兔抗MAA-serum抗体能很好地识别MAA-skin,抗体滴度约1:10 000,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 MAA-skin在SDS-PAGE在还原及非还原状态下,将其电转移到PVDF膜,进行Western Blot,结果条带均显现出阳性着色。经SDS-PAGE鉴定,还原的黄鳍皮肤匀浆物在 67×10^3 处也有明显蛋白条带。将其转移至PVDF膜上,该条带也与兔抗MAA-serum抗体显现阳性反应,强度与MAA-serum接近。

3 讨论

血清白蛋白是血液中的重要组分,其主要功能是能结合及转运多种物质,如水、离子、脂肪酸、激素、代谢产物及多种药物,维持渗透压等。通过离子交换层析和凝胶过滤层析在黄鳍皮肤中分离得到其血清白蛋白。该蛋白质在SDS-PAGE还原及非还原状态下,相对分子质量为 67×10^3 。用抗黄鳍血清白蛋白的多克隆抗体进行ELISA,发现该抗体能很好地识别MAA-skin,同时也能与黄鳍皮肤匀浆物发生免疫交叉反应,但对BSA则无免疫交叉反应发生。推测MAA-skin与BSA虽然同为白蛋白,但两者的抗原决定簇及空间结构可能存在一定程度的差异,因此无免疫反应发生。而黄鳍皮肤中的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,MAA-skin条带和皮肤匀浆物中的MAA-skin条带均显现出阳性着色。由此判断黄鳍皮肤中分布有大量白蛋白。目前已研究发现,在多种两栖动物皮肤中发现白蛋白,并且皮肤白蛋白还含有血红素辅基,因此该蛋白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具有重要作用^[1-2]。黄鳍生存于水中,其皮肤在一定程度上与两栖动物皮肤功能相似。并据报导,鱼类皮肤也具有一定的呼吸功能^[9]。本研究发现黄鳍皮肤中存在有大量白蛋白,该蛋白也携带有少量的血红素辅基,因此,推测黄鳍皮肤白蛋白在黄鳍的呼吸及与外界环境间的水盐代谢过程中发挥重要作用。本研究为进一步研究白蛋白在黄鳍皮肤中的分布及功能打下基础,但对于白蛋白在黄鳍皮肤中的具体分布将通过免疫组化的方法进一步研究。

另外,MAA-skin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是一类单链蛋白质,广泛存在于动物、植物、微生物体中^[9-11]。在动物体中它们最基本的功能是防止不必要的蛋白水解,调节丝氨酸蛋白酶的水解平衡。参与机体的各种生理活动,如激活酶原、释放激素的前体物、参与机体免疫反应、血液凝固、蛋白质折叠、细胞迁移、细胞分化、血压调节、肿瘤抑制以及病毒或寄生虫致病性的形成等^[2-4]。在多种植物的种子中也含有大量的丝氨酸蛋白酶抑制剂,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^[15]。而黄鳍白蛋白也具有胰蛋白酶抑制活性,故推测其在黄鳍防御天敌捕食的过程中发挥一定作用。

本研究首次通过免疫学的方法证明在鱼类皮肤中分布有白蛋白,不足之处在于缺乏分子生物学的支持,在后续研究中将进行皮肤白蛋白基因的克隆,以进一步确证该蛋白为白蛋白,并通过免疫组化的方法研究白蛋白在皮肤中的具体分布。

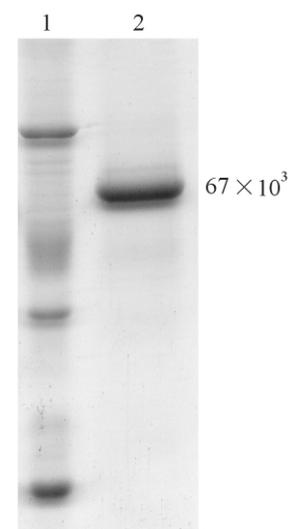


图3 黄鳍皮肤白蛋白的SDS-PAGE

1. 标准相对分子质量 Marker
2. 还原状态的MAA-skin

参考文献:

- [1] ZHANG Y X , LAI R , LEE W H , et al. Frog albumin is expressed in skin and characterized as a novel potent trypsin inhibitor [J]. *Protein Sci* 2005 ,14(9) : 2469 – 2477.
- [2] ZHANG Y X , CHEN C W , WANG M , et al. Purification and Characterization of Albumin from Frog Skin of *Duttaphrynus melanostictus* [J]. *Protein J* 2011 ,30(7) : 464 – 470.
- [3] LEJON S , FRICK I M , 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.
- [4] BAE M J , 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.
- [5] PETERS T JR. All About Albumin , Biochemistry , Genetics and Medical Applications [M]. San Diego: Academic Press , Inc. , 1996: 21 – 98.
- [6] KRAGH-HANSEN U , CHUANG V T , OTAGIRI M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin [J]. *Biol Pharm Bull* 2002 ,25(6) : 695 – 704.
- [7] 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]. *PlosOne* 2011 ,6(2) : e17230.
- [8] 罗磊 朱雅东 丁霄霖. 聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析 [J]. *食品科学* , 2006 ,27(2) : 218 – 222.
- [9] HIBBETTS K , HINES B , WILLIAMS D. An overview of proteinase inhibitors [J]. *J Vet Intern Med* ,1999 ,13(4) : 302 – 308.
- [10] JANCIAUSKIENE S M , 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.
- [11] AROLAS J L , VENTURA S. Protease inhibitors as models for the study of oxidative folding [J]. *Antioxid Redox Signal* , 2011 ,14(1) : 97 – 112.
- [12] ZHANG Y X , WANG Meng , WEI S S. Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the skin secretions of *Kaloula pulchra* hainana [J]. *Toxicon* 2010 ,56(4) : 502 – 507.
- [13] SONG G , ZHOU M , CHEN W , et al. HV-BBI-a novel amphibian skin Bowman-Birk-like trypsin inhibitor [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 ,372(1) : 191 – 196.
- [14] KROWARSCH D , CIERPICKI T , JELEN F , et al. Canonical protein inhibitors of serine proteases [J]. *Cell Mol Life Sci* , 2003 ,60(11) : 2427 – 2444.
- [15] KROWARSCH D , CIERPICKI T , JELEN F , et al. Canonical protein inhibitors of serine proteases [J]. *Cell Mol Life Sci* , 2003 ,60(11) : 2427 – 2444.

Purification and Characteristic of Albumin from *Monopterus albus* Skin

ZHANG Ying-xia¹ , WEI Shuang-shuang¹ , LU Lu¹ , CHEN Cong-wei¹ , CHI Ting-ting¹ ,
AN Tian-chen¹ , GUAN Huai² , MANCHU Ri-ga¹

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

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

Abstract: The anion exchange chromatography and gel filtration chromatography were performed and skin albumin of *Monopterus albus* was obtained. The protein is a single chain protein with molecular weigh of 67×10^3 , and named MAA-skin. MAA-skin was determined as a glycoprotein by Sciff's agent. The N-terminal amino acid sequence is GHVKW. The purified MAA-serum was used to immunize rabbits to prepare polyclonal antibody. ELISA data demonstrated that the antibody titer of the MAA-skin was up to 1: 10 000. Western blot results indicated that the polyclonal antibodies raised against MAA-serum strongly cross-reacted with both MAA-serum and MAA-skin with a compatible grade. The distribution of frog albumin in frog skin suggested that it plays important roles in skin physiological functions , such as water salt metabolism , osmotic pressure maintaining and substance transporting , etc.

Key words: *Monopterus albus*; albumin; skin