维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol. 19 No. 4
1994 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

263—266
2

肌肉标志结蛋白的高效简便提纯

R392—33

病理生理教研室 邓华瑜 范维珂 韦 克

提 要 以鸡胗为材料提取结蛋白，使用高离子强度的氯化钾和碘化钾的盐酸—咪唑缓冲液除去大部份肌凝蛋白、肌动蛋白和其他可溶性蛋白，再以6M尿素—磷酸盐缓冲液溶解提取，透析处理后，经DE52纤维素柱层析纯化。纯化提取物经SDS—PAGE和负染电镜技术鉴定，其分子量为51，232D，可重聚成直径为8nm的丝状结构，符合结蛋白理化特性。CBG—250法测定其蛋白浓度达1.28mg/ml。

肿瘤特异抗 肌肉 免疫组化技术

关键词 结蛋白；鸡胗；蛋白质纯化
中图分类号 Q503；R392—33

结蛋白是肌肉型中间丝[1]，特异地存在于肌肉细胞和肌肉起源的肿瘤细胞中，是一种良好的肌源性肿瘤标志物[2]。提取和纯化结蛋白是制备结蛋白特异性抗体、进而利用免疫组化技术进行肿瘤细胞结蛋白定位工作的首要前题；同时，它对于深入研究结蛋白的生物学特性亦有重要意义。本文参照文献、予以改进，建立了一种高效简便的结蛋白提纯方法。

材料与方法

1. **提纯** 参照Geisler法[3]，并予以改进。除层析在室温下完成外，其余操作均在4℃下进行。其步骤为：(1)取40g鸡胗（新鲜或—70℃冻存品），尽量去除非肌肉组织、充分剪碎，在冰浴下以500ml缓冲液A（40mM盐酸—咪唑 pH6.9，0.6M氯化钾，1mMβ—巯基乙醇、0.5%曲拉通x—100）匀浆（2S83—1型内切式组织匀浆器，上海兴华电子仪器厂产）30min，充分粉碎细胞（镜检破碎效果）。然后高速离心12,000r/min×10min，去除上清。沉淀用缓冲液A（不加曲拉通x—100）洗涤两次；(2)收集的沉淀物重新溶解于600ml碘化钾萃取缓冲液中（10mM盐酸—咪唑 pH6.9，0.6M碘化钾，1mM乙二醇双[2—氨基乙基]四乙酸，0.5%曲拉通x—100，0.5mM二硫代苏糖醇，0.2mM三磷酸腺苷），搅拌6h后，离心5,000r/min×10min，去除上清，收获沉淀物，该过程再重复两次；(3)沉淀物溶解于150ml尿素—磷酸盐缓冲液中（6M尿素，100mM磷酸钠缓冲液 PH7.5，5mM乙二醇双[2—氨基乙基]四乙酸，0.1%β—巯基乙醇），于37℃下搅拌2h，离心4,000r/min×10min，去除不溶性沉淀物，保留上清液；(4)上清液分装于透析袋，置3,000ml重蒸馏水中，在4℃搅拌条件下透析48h脱盐，每4—6h换水一次，收集悬浮白色絮状物液，离心4,000r/min×15min，收集沉淀物，沉淀物溶解于约30ml尿素—磷酸盐缓冲液内，此为结蛋白粗提物；(5)粗提液经DEAE52（whatman）纤维素柱层析（2.5×10cm）纯化，以尿素—磷酸盐缓冲液平衡，用含0—0.2M氯化钾的尿素—磷酸盐缓冲液200ml进行线性梯度洗脱，分部收集（LKB2070 Ultro Rac I型分部收集

维普资讯 http://www.cqvip.com

器)，用 751 型分光光度计在波长 280nm 下检测各部光密度(O.D)值，DDS—11A 型电导仪测定电导率，描记层析分离图谱，分高、低浓度组收获结蛋白提纯品，分装后贮存于－20℃冰箱。

2. 鉴定

(1)十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳(SDS—PAGE)测定分子量，参照 Tsang 氏法[4]。采用夹心垂直板式电泳仪，LKB 恒功率电源。以 5—18%分离胶、3%浓缩胶制成凝胶板。使用低分子量标准蛋白(上海生物制品研究所，组份及分子量见表 1)。结蛋白提取物与标准蛋白均分别加入二倍电泳样品缓冲液(含 20%蔗糖，4.6%SDS，1.5%三羟甲氨基甲烷，10%β—巯基乙醇，0.02%溴酚兰)沸水浴处理 3min。标准蛋白上样浓度为 0.5μg/μl。高、低浓度组结蛋白提取物、结蛋白粗提物及标准蛋白上样量均为 20μl/样品槽。电泳功率 5—10W，时间约 2h。常规固定染色。测量指示剂、标准蛋白及结蛋白提取物泳动距离，计算相对迁移率，根据蛋白质相对迁移率与分子量对数值间的函数关系推算结蛋白提取物分子量。

(2)负染电镜观察结蛋白重聚体的形态结构

参照 Geisler 法[3]。将结蛋白提取物置于 10mM 三羟甲基氨基甲烷—醋酸缓冲液(pH8.2，含 0.01Mβ—巯基乙醇)中透析，然后加入氯化钠到 0.3M 浓度，使结蛋白重聚成丝。采用悬滴法制标本，0.7%醋酸铀染色，H—600 超高分辨透射电镜观察并摄影。

(3)蛋白质浓度测定　采用考马斯亮兰 G—250 法[5]。以尿素—磷酸盐缓冲液配制 0.2—1mg/ml 系列浓度牛血清白蛋白(BSA)溶液，作为蛋白标准液。取蛋白标准液及高、低组结蛋白提取液各 0.1ml(高浓度组样品作对倍稀释)，加考马斯亮兰 G—250 蛋白染色剂 5ml，混匀后在 5—60min 内用 721 型分光光度计、波长 595nm 下比色，测定光密度值，采用试剂空白对照。根据光密度值与标准蛋白浓度间函数关系，计算结蛋白提取物的蛋白浓度。

结　果

1. **提纯**　结蛋白粗提物在透析脱盐过程中(除去了尿素)，显示出中间丝自行聚合成丝的特点，丝状物可再次溶于高浓度尿素溶液。粗提物经 DE52 阴离子纤维素交换层析，呈现二个洗脱峰，两峰完全分离、无交叉重叠。第 I 峰是尿素—磷酸盐缓冲液洗脱峰，为杂蛋白峰；第 I 峰是经氯化钾线性梯度洗脱峰，峰位于氯化钾浓度 5mM－60mM 段，峰形窄而高尖，此为结蛋白洗脱峰，收集该峰洗脱液获得纯度和浓度较高的结蛋白提取物。层析图谱见图 1。

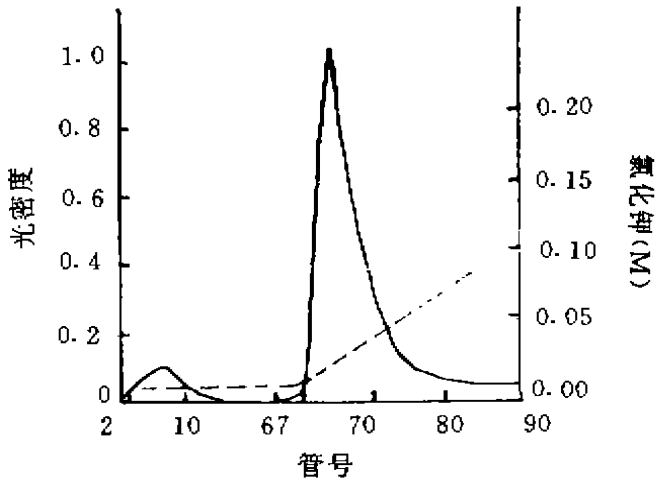


图 1　结蛋白粗提物的 DE52 纤维素柱层析图谱

2. 鉴定

(1)SDS—PAGE 结果　SDS—PAGE 图谱(图 2)可见粗提物有多条杂蛋白区带和

维普资讯 http://www.cqvip.com

一条主带，经柱层析纯化后提取物则呈现清晰的单一区带，与粗提物主带相平行，高组样品该区带较低组样品更粗浓。标准蛋白各组份和结蛋白提取物泳动距离及相对迁移率如表一。标准蛋白各组份相对迁移率(x)与其分子量对数值(y)间呈直线相关，相关系数 r＝－0.997，直线回归方程 Y＝5.46－1.57x，结蛋白提取物分子量为 51,232D。

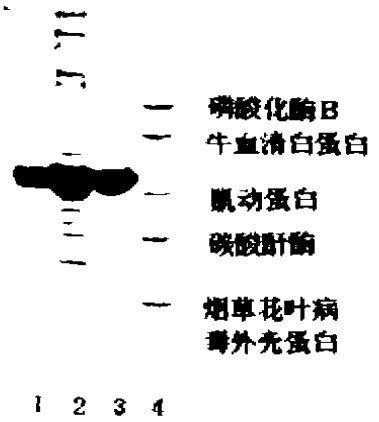


图 2　结蛋白提取物 SDS—PAGE 图谱

1　结蛋白提取物(低浓度组)；2　结蛋白粗提物；
3　结蛋白提取物(高浓度组)；4　标准蛋白

(2)负染电镜观察，可见直径 8nm 左右的丝状结构重聚体(图 3)。

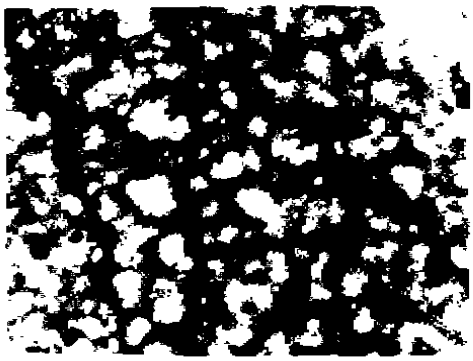


图 3　结蛋白提取物重聚体负染电镜图像

(丝直径 8nm)　12,000×

(3)蛋白质浓度测定　测得系列浓度标准蛋白液及高低浓度组结蛋白提取液 O.D 值，结果见表二。标准蛋白浓度(x)与其 O.D 值(y)间相关系数 r＝0.999，直线回归方程 y＝0.82x－0.017，结蛋白提取物高组浓度为 1.28mg/ml，低组浓度为 0.39mg/ml。总收获量约 45mg。

讨　论

由于中间丝种属特异性低而组织特异性高[1]，故可选用富含肌肉细胞的鸡胗为提取结蛋白的材料，所提结蛋白能够作为制备抗

表 1　标准蛋白，结蛋白提取物的分子量与 SDS—PAGE 泳动距离

蛋白名称	分子量(D)	分子量对数值(Y)	泳动距离(cm)	相对迁移率(X)
磷酸化酶 B	94,000	4.97	3.534	0.328
牛血清白蛋白	67,000	4.83	4.296	0.398
肌动蛋白	43,000	4.63	5.524	0.511
碳酸酐酶	30,000	4.48	6.864	0.636
烟草花叶病毒外壳	17,500	4.24	8.452	0.783
结蛋白	51,232	4.71	5.157	0.478

表 2　CBG－250 法测定蛋白质浓度

标本号	标准蛋白系列					结蛋白提取物	
	1	2	3	4	5	高组	低组
蛋白浓度(mg/ml)	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	0.64×2	0.39
O.D 值	0.14	0.30	0.47	0.63	0.82	0.54	0.30

维普资讯 http://www.cqvip.com

人结蛋白抗体的良好抗原。根据中间丝不溶于中性生理盐水而溶于6—8M尿素溶液的特性[6]，使用含有高离子强度的氯化钾和碘化钾的缓冲液，除去肌凝蛋白(myosin)、肌动蛋白(actin)和其它可溶性蛋白，不溶于上述缓冲液的结蛋白提取物溶于6M尿素—巯基乙醇中萃取，利用结蛋白具有较强的重聚成丝能力的特点[6]，以透析方式脱盐后，收集到结蛋白粗提物。在萃取过程中，注重保证材料破碎效果，采取反复提取、不断更换新鲜溶剂以及适当延长提取时间的方法，以加速扩散、减少溶液粘度，从而提高萃取效果。粗提物采用DE52纤维素柱层析、氯化钾—尿素—磷酸盐缓冲液线性梯度洗脱纯化。通过适当提高氯化钾线性梯度洗脱的上限和斜率，使结蛋白充分洗脱且峰形窄而高尖。这种提纯方法较之用1M醋酸或其它一些用不同pH值酸性溶液反复溶解、沉淀的方法[7,8]提高了效率和纯度，解决了通常难以解决的去除肌动蛋白污染的问题[6]。本实验所获结蛋白提取物，其层析图谱、SDS—PAGE表现均符合结蛋白的理化性质，并显示有较高的纯度和浓度。负染电镜从形态学证实其中间丝结构特点。分子量测定为51,232D，与文献报导一致。据此，可以确认得到较高浓度的结蛋白纯化物。在提取过程中，我们利用溶于尿素溶液中的中间丝多肽链单体经去除尿素后可重聚成丝状不溶物的特点，对溶于尿素溶液中的粗提物改用透析、离心收集代替过去文献中的乙醇沉淀、凝胶层析，简化了提取步骤，减少了蛋白质的破坏和丢失。

结蛋白作为脊椎动物肌细胞骨架中的第三种细丝成份，在肌细胞中不仅起到细胞骨架的结构作用，更主要的功能与调节钙离子内流入细胞及核酸的转录和翻译有关[9,10]。目前，对其结构、功能、遗传特点和理化性质的探讨正不断深入。结蛋白作为鉴定肌组织和肌源性肿瘤组织的一种良好标志物，已经得到充分证实和广泛研究。制备结蛋白特异性抗体，结合高敏感的免疫组化技术，以建立中间丝分类系统，对在常规病理诊断中难以确定组织来源的肿瘤提供组织发生学上的依据，是现代肿瘤病理诊断和鉴别诊断的有力手段。高效简便的结蛋白提纯方法无疑为此奠定了必备的基础。

参 考 文 献

1 Geisler N. Weber K Structal aspects of intermediate filaments.
In: Shay Jw (ed): Cell and molecular biology of the Cytoskeleton.
New York: Plenum Press, 1986: pp41

2 Wick MR Antibodies to desmin in diagnostic pathology. In: wick MR.
Sidgal GP (ed): Monoclonal antibodies in diagnostic immunohistochemistry.
NewYork, Basel: Marcel Dekker Inc. 1988; 93

3 Geisler N. et al. Eur J Biochem 1980; 111: 425

4 Tsang U C W. et al. Meth Enzymol 1983; 92: 377

5 Braford M. Anal Biochem 1976; 72: 248

6 Ip W. et al. Ann NY Acad Scl 1985; 455: 185

7 Small JV. Sobieszek A. J Cell Sci 1977; 23: 243

8 Hubbard B D, et al. J Cell Biol 1979; 80: 166

9 Traub P. Ann NY Acad Sci 1985; 455: 68

10 Vassy J. et al. Hepatology 1993; 17(2): 293

(收稿日期 1994—02—06)

EFFECTIVE AND CONVENIENT PURIFICATION OF DESMIN (A MUSCIE MARKER)

(下转第281页)