维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1992年第17卷第4期

272-275

从新生小牛血清分离提取胎球蛋白

生物化学教研室 王贤辅 左渝萍 何赐科

R513.203

提 要 本文用乙醇金属离子分级分离法，从新生小牛血清中分离提取胎球蛋白。将分离提取的胎球蛋白，聚丙烯酰胺凝胶电泳，在α-球蛋白位置，显示一条宽、着色深的区带，而另有一条移动率慢、窄的、着色极淡的带；Sephadex G-200凝脉过滤测得其分子量为117,489。去湿冻干的胎球蛋白粉，测得其唾液酸含量为8.65g/100g蛋白质；中性糖含量为8.07g/100g蛋白质。以新生小牛血清为原料，分离提取胎球蛋白之产品率为300mg/100ml血清

关键词 胎球蛋白；血清球蛋白；牛；新生儿
中图分类号 Q531.2

胎球蛋白（Fetuin）是牛胎儿血中的一种糖蛋白，Spiro(1960)[1]从屠宰怀孕的母牛获取牛胎儿血中，分离纯化胎球蛋白，并研究了理化性质。由于我国的饮食习惯，很少宰杀怀孕母牛，因而获取胎牛血较难。本文试从新生小牛血清中分离提取胎球蛋白，以供研究或临床诊断之用。

材料和方法

1、新生小牛血清 刚出生的小牛，从心脏抽血，立即分离血清，－20℃贮存。

2、胎球蛋白的分离提取 用乙醇-金属离子分级分离法[1]。小牛血清于－5℃加入2倍体积28.5%乙醇（含0.03M醋酸锌），调节pH至6.4，放置12—16h后，于0—4℃，4,500rpm离心20min，弃去沉淀，保留上清液。又于－5℃，向上清液中加入1.0M醋酸钡和95%乙醇，使混合后的溶液含0.02MBa^{2+}和25%乙醇，调节pH6.7，放置2h，于上述条件离心，弃去沉淀。再于－10℃加入95%乙醇于上清液中，使混合后含乙醇40%，放置12—16小时，于上述条件离心，弃去上清液，保留沉淀，即为纯化之胎球蛋白。用少量0.02M柠檬酸三钠溶解沉淀，再用蒸馏水透析数天，以除去Ba^{2+}和Zn^{2+}。最后冷冻干燥制成冻干蛋白粉。

3、聚丙烯酰胺凝胶电泳 垂直平板电泳。凝胶板100×110×1.5mm^3。浓缩胶，pH6.7，凝胶浓度2.5%。分离胶，pH8.9，凝胶浓度7%，电极缓冲液为pH8.3，Tris-甘氨酸缓冲液。直流电源，电压140—230v，电流7—10mA，功率稳定于1.5W。电泳时间5h。考马斯亮兰R250染色。

4、蛋白结合中性糖测定 按Shields法[2]测定。以蒸馏水溶解乙醇沉淀之蛋白质，加入0.2%蒽酮，92℃保温8min，波长585nm比色。标准糖溶液为半乳糖、甘露糖（1:1）混合液。变异系数

ertensive group than the control group($P<0.02$, <0.01, <0.01 respectively), while the peak velocity of E, and AC, DC were slightly but not significantly decreased. However, there were no difference between 22 elderly hypertensives and 20 age-matched controls. Multiple factors affectting LV diastolic function were diseussed briefly. The results suggested using the pulsed doppler MV flow spectrum to evaluated LV diastolic function in elderl hypertensives was limited

KEY WORDS pulsed-Doppler; Hypertention; Left-Ventricular diastolic function

维普资讯 http://www.cqvip.com

(c.v%) 为2.3%。

5. 蛋白结合唾液酸测定 改改良 Aminoff 法[3]测定。用过碘酸氧化，再用硫代巴比妥酸显色，波长549nm比色。变异系数 (c.v%) 为1%。

6. Sephadex G-200 凝胶过滤测定蛋白质分子量 Sephadex G-200 (Pharmacia, μ=40—120)，柱高 100cm、直径 15mm，洗脱液Tris—Hcl缓冲液，pH7.5含NaCl，μ=0.125。标准蛋白质：r-球蛋白、胃蛋白酶和牛血清白蛋白均系 Sigma产品。

结 果

1. 小牛血清收集5批，每批75—235 ml，分批进行分离提取胎球蛋白之产品率为每100ml血清获得胎球蛋白冻干粉约为300 mg。

2. 分离提取的胎球蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图1胎球蛋白在α-球蛋白位置显示一条宽、着色深的区带，而另有一条移动率慢、窄的着色极淡的带。

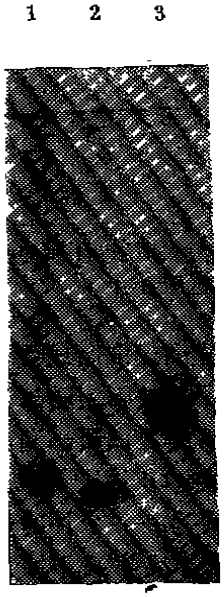


图1 胎球蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳
1. 正常人血清，上样7μg蛋白质
2. 新生小牛血清，上样20μg蛋白质
3. 胎球蛋白，上样30μg

3. 蛋白结合中性糖测定 将分离提取之胎球蛋白，透析去离子后冻干，再放置于五氧化二磷真空干燥器 9d (18℃)，即得去湿、去离子蛋白冻干粉。准确称取此去湿去离子胎球蛋白冻干粉，测定中性糖，其含糖量为8.07% (以去湿去离子蛋白质之百分数表示)。

4. 蛋白结合唾液酸测定 准确称取上述去湿去离子胎球蛋白冻干粉，测得其唾液酸含量为8.65%。

5. Sephadex G-200凝胶过滤测定分离提取胎球蛋白之分子量 上样r-球蛋白 (MW=160,000) 6.5mg、牛血清白蛋白 (MW=67,000) 4mg、胃蛋白酶 (MW=35,500)6.2mg.胎球蛋白7.4mg。兰葡聚糖 2000 (Pharmacia Fine Chemicals) 测定空床体积 (v_0)。流速：11.4ml/h，波长 280nm比色检测蛋白质，连续三次测定，求其平均值。以v/v_0对 lg 分子量作图，计算被测蛋白质的分子量 (见图2)，结果测得分离提取之胎球蛋白分子量为117,489。

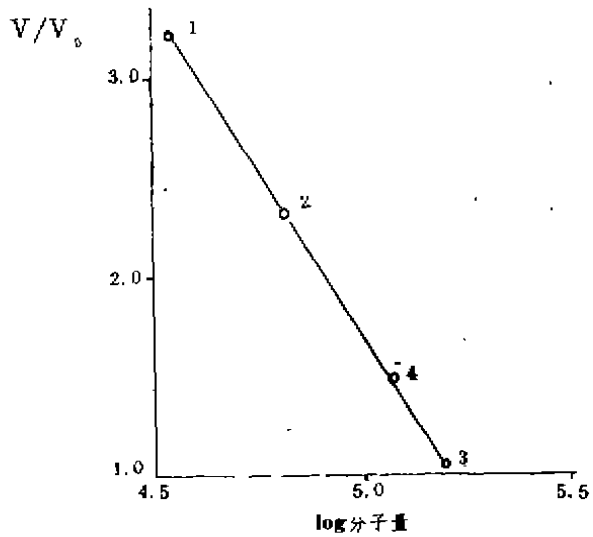


图2 Sephadex G-200凝胶过滤测定胎球蛋白分子量
1. 胃蛋白酶　2. 牛血清白蛋白
3. r-球蛋白　4. 胎球蛋白
v_0. 空床体积　v. 洗脱体积

讨 论

1. 胎球蛋白是存在于反刍动物及猪的

维普资讯 http://www.cqvip.com

胚胎血清中的α-糖蛋白，其生理功能尚不清楚。它的理化及免疫学性质已有较多的研究；氨基酸和糖的组成、部分氨基酸残基序列和寡糖链的部分糖基排列顺序已有报道[1、4、5、6]。

2. 分离纯化胎球蛋白的方法有：硫酸铵分级分离法、低温乙醇-金属离子分级分离法[1]和两步纯化法 (two-step procedure)[4] 即是先用CM-纤维素层析，再用Sephadex G-200凝胶过滤进行分离纯化。以往分离提取的胎球蛋白，均由孕期为4—9个月的牛胎血中提取制备而得[1、5、6]、Marti等[4]亦从胎龄为3—5个月的绵羊胎血中分离提取到与牛胎中的胎球蛋白性质相同的糖蛋白，并命为羔羊胎球蛋白(Lamb fetuin)。各种分离方法从牛胎儿血中制备的胎球蛋白和两步纯化法从羔羊血中所得的羔羊胎球蛋白的物理化学参数，氨基酸组成、己糖、半乳糖、甘露糖、氨基葡萄糖、氨基半乳糖、唾液酸和多肽的含量均相近似[1、4、5、6]。牛胎球蛋白的分子量，按Svedberg方程式计算为48,400[1、4]。Marti等[4]用Sephadex G-200凝胶过滤测定蛋白质分子量。层析柱高90cm、直径15mm、洗脱液为0.05M Tris-HCl缓冲液(pH7.5，含NaCl，μ=0.125)、标准蛋白质为r-球蛋白、胃蛋白酶和牛血清白蛋白。测定结果：牛胎球蛋白的分子量是112,000；羔羊胎球蛋白是107,000[4]。

3. 硫酸铵分级分离法制备的牛胎球蛋白，其纯度较差，不适宜作分子结构的研究，而乙醇-金属离子分级分离法，可获得高纯度的胎球蛋白[1]。Marti等认为[4]：乙醇-金属离子分级分离所得的制品，仍含有杂质，两步纯化法可获得纯度更高的胎球蛋白。

用若干个pH值的电泳和超速离心检测发现，牛胎球蛋白是均一性的 (Homogeneity)[1]。Oshiro等[5]用淀粉胶电泳检测发现，乙醇-金属离子分离制备的牛胎球蛋白表现为微多相性 (Microheterogeneity)，在电泳谱上出现8个区带，并且指出：以往认为胎球蛋白是均一性，主要是未采用如淀粉胶电泳，聚丙烯酰胺凝胶电泳或DEAE层析等灵敏的检测方法。该作者的研究还发现，胎球蛋白分子表面唾液酸残基的数量和分布不同是导致微多相性的重要因素。

4. 我们用低温乙醇-金属离子分级分离法，从新生小牛血清中分离提取胎球蛋白。此蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶电泳谱上，显示一条宽而着色深的区带，其位置相当于α-球蛋白；另有一条移动率慢、窄的着色极淡的小区带。用Sephadex G-200凝胶过滤，测得其分子量为117,489，与Marti等报道的结果相似[4]。测得去湿去离子蛋白质之唾液酸和己糖的含量，与文献报道相符合(见表1)。由此可见，我们已从新生小牛血清中分离提取到纯的胎球蛋白。

表1 牛胎球蛋白分子中唾液酸和己糖含量*

作者	唾液酸	己糖
Spiro[1]	8.7	8.3
Oshiro[5]	8.4	7.7
Marti[4]⊗	8.5	
本文	8.65	8.07

* 以去湿去离子蛋白质重量百分数表示
⊗ 羔羊胎球蛋白

过去，分离提取胎球蛋白，是以牛或羊胎血为原料，这是因为胎球蛋白是牛或羊胎血中含量最高的蛋白质；而新生小牛血清中含量极少。Spiro等[1]用低温乙醇-金属离子法，从胎龄为4—9个月的胎牛血清分离提取胎球蛋白的产品率是，每100ml血清获得透析冻干的蛋白质平均为600mg。然而，我们用同样的方法，从新生小牛血清中分离提取到高纯度的胎球蛋白，其产品率为100ml血清获得300mg冻干的蛋白质。由此可见，在不易获取胎牛血清时，新生小牛血清亦为提取胎球蛋白较好的原料。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Spiro RG, et al. J Biol Chem 1960; 235:2860

[2] Shields R, et al. Anal Chem 1960; 32:885

[3] 中国医学科学院肿瘤防治研究所生化研究室. 肿瘤防治研究 1978; (1):27

[4] Marti J, et al, Biochem Biophys Acta 1973; 303:348

[5] Oshiro Y, et al. Arch Biochem Biophys 1968; 127:476

[6] Alcaraz G, et al. Biochem Biophys Res Commun 1981; 99:30

(收稿日期 1992-02-20)

ISOLATION OF THE FETUIN FROM SERA OF NEWBORN CALVES

Wang Xian fu, et al

Dept of Biochemistry

We have isolated the fetuin from sera of newborn calves by ethanol fractionation in the presence of zinc and barium ions. Prepared fetuin was examined with polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.3 in Tris-HCl buffer, a broad band stained strongly was observed corresponding to the α-globulin position, and another small narrow band was appeared, which migrate slowly and was stained very lightly. Estimated with sephadex G-200 gel filtration, the apparent molecular weight is 117,489. The hexose content of fetuin is 8.07%, and the sialic acids is 8.65% as expressed by percentage of deionized, moisture-free protein. All the parameters mentioned above were in good agreement with previous reports in the literatures. The yield of fetuin after dialysis and lyophilization was 300mg per 100ml of serum approximately. From this study it is concluded that the fetuin prepared by alcohol-metal ion fractionation from newborn calf serum is very pure; and the newborn calf serum is good source for the isolation of fetuin, when the fetal serum of calf is not available

KEY WORDS Fetuin; Serum globulins; Cattle; Newborns