DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.029

人胎盘中Ⅴ型胶原的提取与纯化

邹 静 何凌汉 (第三军医大学大坪医院耳鼻喉科) 630042

Ⅴ型胶原蛋白广泛地分布于血管壁、基底膜及神经内膜等部位[1][2]，具有促进神经再生及抗凝血等重要生理功能[3]。据国外文献报道，从人胎盘中提取的Ⅴ型胶原有两种形式，即 AB_2 和 ABC[4][5]。国内由于缺乏Ⅴ型胶原纯品，对其研究受到了限制。本实验参照 Miller 等人介绍的文献[6]，从人胎盘中提取了Ⅴ型胶原蛋白(AB_2)。

1 材料与方法

选用新鲜人胎盘 3 个，去脐带，剪碎，用 20mmol/L EDTA 冲洗 3 遍(除非特殊声明，均为 4℃以下操作)。匀浆后，依次用 20mmol/L EDTA、0.05%(W/V)脱氧胆酸钠溶液(含 20mmol/L EDTA)和重蒸水洗涤离心，弃上清(留取少许各次离心的上清分析丢失胶原量)。

将上述沉淀在含 0.9g 猪胃蛋白酶的溶液中消化 72h(含 20mmol/L EDTA、0.5mmol/L 乙酸)，低温 21000×g 离心 15min，弃沉淀(上清和沉淀各留少许分析消化程度)。上清按图 1 顺序进行分段盐沉淀得Ⅳ、Ⅴ型胶原粗品。用羧甲基纤维素柱层析(CM_{52}，2.5cm×10cm)进一步纯化该产品(采用线性梯度洗脱，具体条件见图 2,3)。将纯化的Ⅳ、Ⅴ型胶原用紫外分光光度计(Beckman DU-70)在 200nm～250nm 波长范围内扫描。用浓缩棒将上述纯品浓缩、分装，深低温保存。

取Ⅴ型胶原纯品进行 SDS-PAGE(不连续板胶)。其丙烯酰胺浓度为分离胶含 5%(W/V)。成层胶含 3%(W/V)。取 0.5ml(0.39mg)样品对样品缓冲液[0.063mol/L Tris，2%(W/V) SDS，10%(W/V)甘油，0.01%(W/V)溴酚蓝，pH6.8]透析，加热 50℃，30min。每孔加样 20μl，稳流 30mA(电压约 280V)电泳 4h40min。用考马斯亮蓝(R250)染色，用岛津—930 型薄层扫描仪扫描。用双缩脲半微量法准确测定Ⅴ型胶原蛋白浓度，再按 Bexgman Loxley 法测定羟脯氨酸浓度[7]，据此计算Ⅴ型胶原蛋白中羟脯氨基酸含量。采用相似的方法测定前述留待分析胶原丢失量的各样品及胃蛋白酶对胶原的消化率。

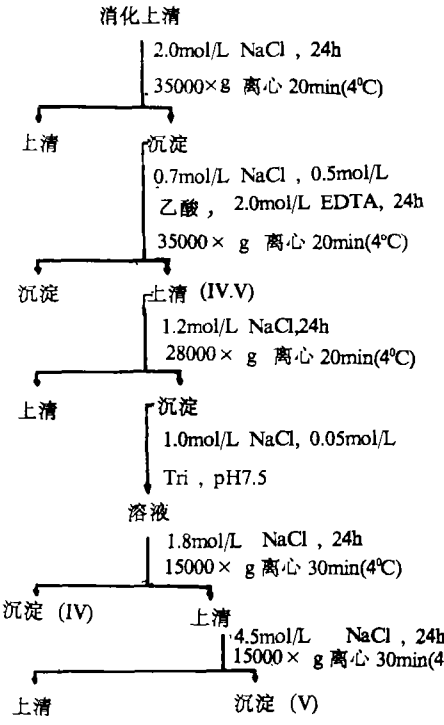


图 1 Ⅳ、Ⅴ型胶原的分段盐沉淀程序图

图注：Ⅳ：Ⅳ型胶原，Ⅴ：Ⅴ型胶原。氯化钠的浓度为最终浓度。

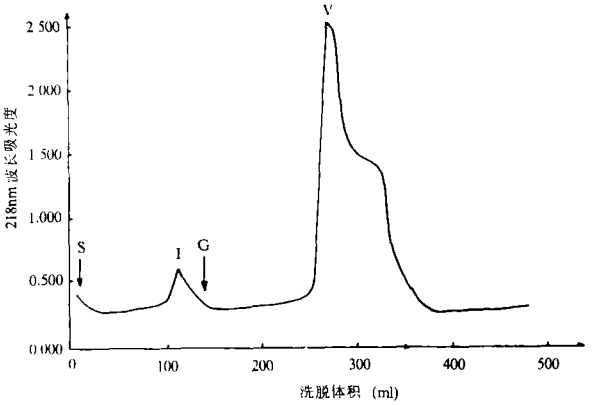


图 2 胃蛋白酶溶解的人胎盘Ⅴ型胶原蛋白的羧甲基纤维素柱层析图

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图注：S：加样点，G：梯度液洗脱起始点；I：I 型胶原；V：V 型胶原。用 2.0mol/L 尿素、0.02mol/L Tris，pH8.0 的起始缓冲液平衡羧甲基纤维素柱（2.5cm×10cm）。将 50mg V 型胶原溶于 50ml 起始缓冲液并上柱。先用 140ml 起始缓冲液以 30ml/h 的速度洗脱，再用 300ml 线性梯度液以 150ml/h 速度洗脱（氯化钠浓度为 0 至 0.25mol/L）。

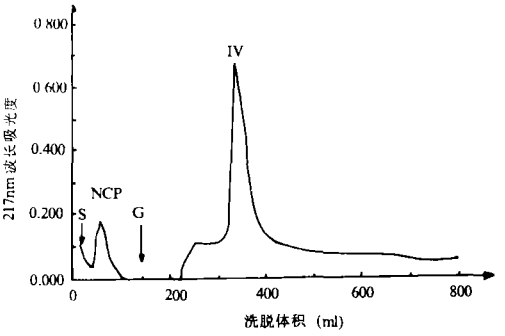


图 3 胃蛋白酶溶解的人胎盘Ⅳ型胶原蛋白的羧甲基纤维素柱层析图

图注：S：加样点，G：梯度液洗脱起始点，NCP：非胶原蛋白，Ⅳ：Ⅳ型胶原蛋白。用 2.0mol/L 尿素，0.04mol/L 乙酸钠，pH4.8 的起始缓冲液平衡羧甲基纤维素柱（2.5cm×10cm）。将 50mg Ⅳ型胶原溶于 50ml 起始缓冲液并上柱。先用 140ml 起始缓冲液以 100ml/h 流速洗脱，再用 860ml 线性梯度液以相同的流速洗脱（氯化钠浓度为 0 至 0.4mol/L）。

选健康雄性家兔 3 只，体重 2.5～3.0kg。2 只注射 V 型胶原（含弗氏完全佐剂），另一只注射弗氏佐剂作对照。每周追加注射一次，注射 4 次后分别于兔耳缘静脉采血，离心得血清，用 1.5%(W/V)琼脂分别同Ⅳ、V 型胶原行双向扩散。

2 结果

2.1 胶原的丢失量与消化率

用不同溶液对组织预处理时，胶原丢失量微（<0.363μg/ml），见表 1。胃蛋白酶对胶原蛋白的消化率为 85.15%。

表 1 用不同溶液对组织进行预处理时，洗涤离心上清液中胶原的浓度

洗涤剂	胶原浓度(μg/ml)
20mmol/L EDTA	0.106
20mmol/L EDTA，0.05%(W/V)脱氧胆酸钠	0
双蒸馏水	0.363

2.2 羧甲基纤维素柱层析结果

V 型胶原粗品中 I 型胶原残余及Ⅳ型胶原中非胶原蛋白的污染均很少，各自的主峰很高，见图 2、3，说明前期初步纯化效果好。

2.3 紫外波长扫描结果

V 型胶原的吸收峰为 218nm（图 4），与文献报道的 CD 谱吻合[4]。Ⅳ型胶原的吸收峰为 217nm。

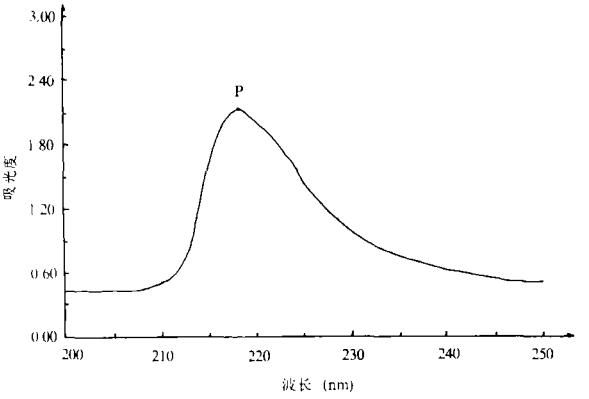


图 4 人胎盘 V 型胶原蛋白的紫外波长扫描（λ=200～250nm）

图注：吸收峰、波长为 218nm

2.4 SDS-PAGE 结果

V 型胶原在 SDS-PAGE 时出现 2 条带（由 A、B 链产生），经面积扫描得出二者含量之比为：B：A＝2：1（图 5），与 Bentz 等人的结果一致[4]。

2.5 羟脯氨酸含量分析结果

该 V 型胶原蛋白羟脯氨酸含量为 11.83%。

2.6 V 型胶原蛋白免疫原性测定结果

注射 V 型胶原的动物产生了特异的抗-V 型胶原抗体，与Ⅳ型胶原无交叉反应，对照动物未产生抗体（表 2）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 免血清与Ⅴ型胶原或Ⅳ型胶原间的免疫反应

免疫血清	抗原	
	Ⅴ型抗原	Ⅳ型胶原
抗-Ⅴ型胶原血清	+	−
对照血清(注射弗氏佐剂)	−	+

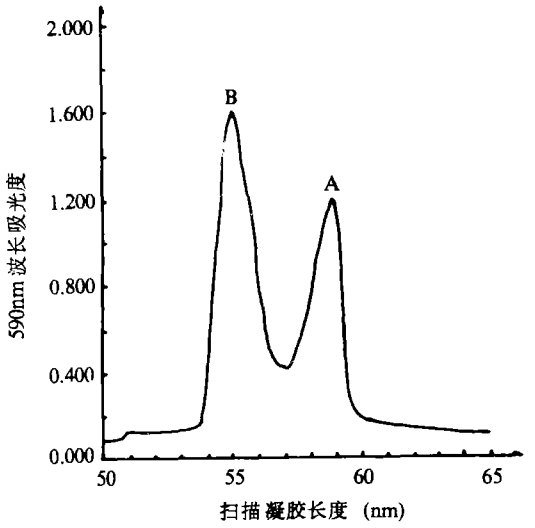


图 5 人胎盘Ⅴ型胶原蛋白的 SDS-PAGE 的薄层扫描图

图注：A：A 链，B：B 链；A 链的面积为 110933.8(33.0%)，B 链的面积为 224656.3(67%)。总面积为 335590.1

3 讨论

由于存在分子内交联，胶原蛋白的溶解性差。一般都用胃蛋白酶降解其交联部分而增加溶解性。本实验也采用同法，效果理想。胃蛋白酶不影响胶原蛋白的螺旋决定簇及中心决定簇，因此，其抗原性仍较好，本实验通过接种家兔证实了此点。

Ⅴ型胶原蛋白在组织中分布广泛但含量低，溶解性差，提取有一定困难。本实验以 Miller 等人提供的方法为基础[6]，稍有改进：(1)基于组织中所有胶原溶解性差，本实验洗涤液无 NaCl，避免了组织中积蓄 NaCl，经分析洗涤离心后上清，发现胶原丢失甚微。(2)用脱氧胆酸钠予先除去组织中脂肪，使后面的提取和纯化更为方便。(3)在羧甲基纤维素柱层析时，为了减少Ⅴ型胶原的破坏，将 Miller 原法中洗脱液尿素含量 6.0mol/L 改为 2.0mol/L，对结果无影响。

关键词 胶原分离/和提纯；胎盘提取物

参考文献

1. Shellswell GB, Restall DJ, Duance VC, et al. Identification and differential distribution of collagen types in the central and peripheral nervous systems. FEBS Lett 1979;106(2):305
2. Roll FJ, Madri JA, Albert J, et al. Codistribution of collagen types Ⅳ and AB_2 in basement membranes and mesangium of the kidney. The Journal of Cell Biology 1980;85:597
3. Madri JA, Dreyer B, pitlic FA, et al. The collagenous components of the subendothelium. Laboratory Investigation 1980;43(4):303
4. Bentz H, Bächinger HP, Glanville R, et al. Physical evidence for the assembly of A and B chains of human placental collagen in a single triple helix. Eur J Biochem 1978;92:563
5. Niyibizi C, Fietzek PP, Rest MVD. Human placenta type Ⅴ collagens. The Journal of Biological Chemistry 1984;259(22):14170
6. Miller EJ, Rhodes RK. Preparation and characterization of the different types of collagen. Methods in Enzymology 1982;82:33
7. BH 奥列霍维奇：现代生物化学方法。袁厚积译。人民教育出版社 1981:246

(收稿：1991-11-27；修回：1992-02-10)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net