

文章编号:2095-7386(2016)03-0029-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.03.005

猪源可溶性波形蛋白的提取纯化

陈卓¹,夏昶²,艾思²,余兰¹,方成^{1,2}

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023;2. 武汉轻工大学 医学技术与护理学院,湖北 武汉 430023)

摘要:建立从猪眼晶状体中提取和一次过柱分离纯化波形蛋白(Vim)的工艺方法。以精提液溶解猪眼晶状体粗提粉,使用单因素实验及响应面分析对精提温度、时间、料液比、pH值四个因素进行优化,利用DEAE Sepharose FF阴离子交换柱分离纯化目标蛋白,以免疫印迹法鉴定波形蛋白,10% SDS-PAGE检测纯化Vim的纯度和相对回收率。精提的最佳工艺条件为:温度13.16℃,时间26.01 min,料液比1:34(g:mL),pH7.03。使用DEAE Sepharose FF柱以不少于40倍柱体积的36 mmol/L NaH₂PO₄缓冲液洗脱后,以100倍柱体积的36—86 mmol/L NaH₂PO₄缓冲液一次线性洗脱分离Vim。经10% SDS-PAGE结合Image Lab 4.0分析软件检测纯化制得的冻干粉中Vim蛋白纯度达(80.66±1.30)%,相对回收率为(36.56±0.96)%。

关键词:猪;波形蛋白;提取;纯化

中图分类号:R 931.6

文献标识码:A

Extraction and purification of soluble vimentin from porcine lens

CHEN Zhuo¹, XIA Chang², AI Si², YU Lan¹, FANG Cheng^{1,2}

(1. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. School of Health Science and Nursing, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: This study is aimed to establish a purifying method of vimentin (Vim) extracted from porcine lens by once separation on column. The crude extracts of porcine lens were dissolved by refined extracting solution. The temperature, time, solid to liquid ratio and solution pH of refined extraction were optimized using single factor experiment and response surface analysis. Target protein was isolated and purified via DEAE Sepharose fast flow anion exchange column and Vim was identified by Western-Blot. The 10% SDS-PAGE was used to detect the purity and relative recovery rate. The optimized temperature, time, solid to liquid ratio and solution pH of refined extraction respectively were 13.16℃, 26.01 min, 1:34 (g:mL) and pH7.03. Followed elution with 36 mmol/L NaH₂PO₄ buffer of 40 times volume of the column, 36-86 mmol/L NaH₂PO₄ buffer of 100 times volume of the column was used to linear elution once for isolating and purifying Vim. Analyzing the electrophoretogram of 10% SDS-PAGE with Image Lab 4.0 software, the purity of Vim in purified lyophilized powder was (80.66 ± 1.30)% and the relative recovery rate was (36.56 ± 0.96)%.

Key words: pig; vimentin; extraction; purification

收稿日期:2016-06-01.

作者简介:陈卓(1990-),女,硕士研究生,Email:chenzhuoc@sina.com.

通信作者:方成(1972-),男,博士,副教授,Email:fang_cheng@foxmail.com.

基金项目:湖北省自然科学基金(2015CFC845);武汉轻工大学研究生创新项目(2013cx021).

1 引言

波形蛋白(Vimentin, Vim)为高度保守的真核细胞骨架Ⅲ型中间丝蛋白,主要表达于中胚层起源的间充质细胞中,以多聚体纤维稳定存在。Vim 仅溶于离子型表面活性剂如尿素、盐酸胍等溶液,单体分子量为 53 kDa,等电点 5.05,在 pH 值 7.2—7.4 最稳定^[1]。Vim 具有调节细胞迁移、粘附、信号传导、自身抗原^[2]和细胞因子特性^[3],在感染^[4]、肿瘤^[5]、自身免疫^[6]、固有免疫^[7]等方面显现多种功能,具有生物药品开发的广阔前景。

Geisler 等^[8]依次用 SephadexG-25、CM-32 及 DE 52 层析柱从猪晶状体提纯 Vim。Nelson 等^[9]使用艾氏腹水肿瘤细胞,以 DNA-纤维素层析法得到 Vim。Bioemendal 等^[10]依次用 SephadexG-25 和 PBE94 聚焦层析法从牛晶状体纯化 Vim。Chou 等^[11]先用 SephadexG-25 柱,再用羟基磷灰石柱以 8—35 mM 磷酸钠线性洗脱分离牛晶状体中的 Vim。以上方法因程序复杂而致成本高昂。2012 年国内戴丽娟等^[12]从人宫颈癌细胞中克隆 Vim 基因并构建带有 GST 标签的 PGEX-4T-1-VIM 重组表达质粒,以 DH5 α 菌、BL21 菌进行质粒扩增和诱导表达 Vim,但未涉及纯化方法。

笔者研究以猪眼晶状体为原料,在单因素提取试验的基础上应用响应面法优化提取 Vim 的条件,并且创建用 DEAE Sepharose FF 阴离子交换柱一次层析分离纯化 Vim 的方法及参数,以提高 Vim 提纯的效率。

2 材料与方法

2.1 仪器

AKTA Prime Plus 快速低压液相色谱系统,GE 公司;GR21G Ⅲ 高速冷冻离心机,Hitachi 公司;SIM FD5-3 真空冻干机,Gold-SIM 公司;ChemiDoc XRS⁺ 凝胶成像系统,Bio-Rad 公司;Anke LXJ-IIB 水平离心机,上海安亭公司;酶标仪,Tecan sunrise 公司。

2.2 材料

新鲜猪眼,武汉双汇公司;Vim 抗体,圣克鲁斯公司;HRP-羊抗鼠二抗,武汉博士德公司;预染 Marker,Thermo 公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒,上海碧云天公司;DEAE Sepharose FF 预装柱(1 mL 柱载样量 50 mg),上海博格隆公司;SDS-PAGE 凝胶试剂盒,北京鼎国昌盛公司。

2.3 方法

2.3.1 粗提

取猪眼晶状体置于等体积粗提液(100 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L NaH₂PO₄、pH 6.8、4 ℃)中匀浆,然后 10 000 × g 冷冻离心 30 min。取沉淀以 10 倍体积粗提液复悬,振荡 30 min,离心弃上清。重复 3 次,取沉淀物冻干制得粗提粉,-80 ℃ 保存。

2.3.2 单因素精提实验

以含尿素缓冲液 Buffer A (10 mmol/L NaH₂PO₄、8 mol/L 尿素、0.5 mmol/L PMSF、1 mg/L Leupeptin、1 mg/L Aprotinin、1 mmol/L DTT、0.22 μ m 滤膜过滤,超声脱气 10 min)为提取液,分别按不同提取温度 5 ℃、10 ℃、15 ℃、20 ℃、25 ℃,不同提取时间 5 min、17.5 min、30 min、42.5 min、55 min,不同料液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 (g: mL)以及不同 pH 值 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 对 40 mg 粗提粉进行精提^[13]。10 000 × g 冷冻离心 30 min,取上清,检测蛋白浓度。

2.3.3 响应面分析(RSM)

使用 Design-Expert 8.0.6 软件的中心组合设计(CCD),对上述 4 个单因素进行优化组合^[14-15]。使用 30 mg 粗提粉,检测精提上清液中蛋白含量(mg)作为响应值,在 4 个因素的 5 个水平上分析最优的精提参数。

2.3.4 分离

液相色谱系统进样口 A 和 B 分别置于 Buffer A 和 Buffer B (210 mmol/L NaH₂PO₄,余同 Buffer A)中。将超滤浓缩后的精提物溶液注入预平衡 DEAE Sepharose FF 柱的上样环内。以 Buffer A 平衡后,待基线平稳,将洗脱液 NaH₂PO₄浓度设为 36 mmol/L,1 mL/min,洗脱 40 mL,5 mL/管收集。设置 NaH₂PO₄浓度为 36—86 mmol/L 的线性洗脱,1 mL/min,洗脱 100 mL,2 mL/管收集。

2.3.5 纯化

以 10% SDS-PAGE 分析各收集管馏分中蛋白成分,以免疫印迹法(Western- Blot, WB)作 Vim 蛋白鉴定。合并 Vim 电泳纯的馏分装入透析袋(8-14 MWCO),置于透析液(10 mmol/L NaH₂PO₄、0.5 mmol/L DTT)中充分透析后,冻干得纯化 Vim 蛋白粉。

2.3.6 纯度及相对回收率检测

用 PBS 溶解 Vim 冻干粉,将纯化 Vim 溶液(上

样量 5 μg , 3 个平行组) 和对应精提物溶液(上样量 20 μg) 以 10% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色。凝胶成像后用 Image Lab 4.0 软件作灰度值分析 Vim 蛋白的纯度。相对回收率 = (纯化蛋白质量 $\times$ 纯化蛋白 Vim 纯度) / (精提蛋白质量 $\times$ 精提蛋白 Vim 纯度)。

3 结果与分析

3.1 温度对提取液总蛋白含量的影响

改变提取温度, 料液比 1:30, pH7.0, 提取时间 20 min。由图 1 可见总蛋白含量在 5 $^{\circ}\text{C}$ 时最高, 此时的总蛋白含量为 $(25.46 \pm 0.15) \text{mg}$ 。之后随着温度的升高, 蛋白的含量呈下降趋势, 虽然最后有小幅上升但含量仍较低。

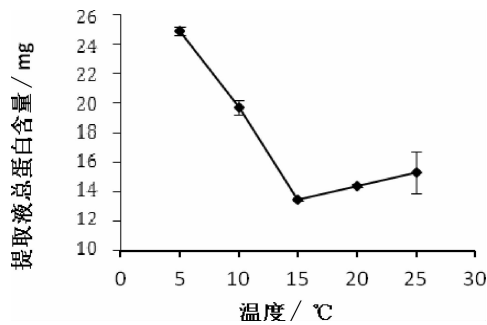


图 1 不同温度对提取液总蛋白溶出度的影响

3.2 时间对提取液总蛋白含量的影响

改变提取时间, 提取温度为 5 $^{\circ}\text{C}$, 其他条件不变。如图 2 从 5 min 起随着提取时间的增加, 总蛋白含量也在增加; 且在提取时间 30 min 时达到最高, 此时的总蛋白含量为 $(26.36 \pm 0.04) \text{mg}$ 。之后随着提取时间的延长蛋白含量呈下降趋势。

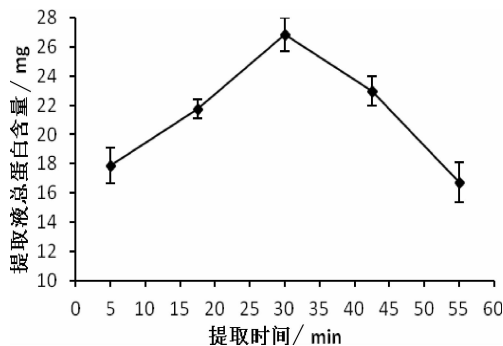


图 2 不同时间对提取液总蛋白溶出度的影响

3.3 料液比对提取液总蛋白含量的影响

改变提取料液比, 提取时间 30 min, 温度 5 $^{\circ}\text{C}$, 其他条件不变。由图 3 可见总蛋白含量在料液比 1:30 (g: mL) 时为 $(24.08 \pm 0.07) \text{mg}$; 之后随着料液

比的增加, 总蛋白含量略有下降。

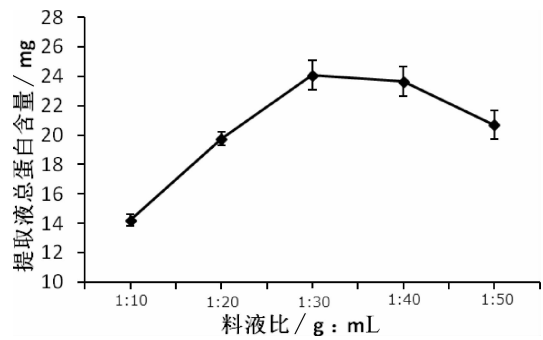


图 3 不同料液比对提取液总蛋白溶出度的影响

3.4 pH 值对提取液总蛋白含量的影响

改变提取液 pH 值, 提取温度为 5 $^{\circ}\text{C}$, 料液比 1:30, 提取时间 30 min。结果如图 4, 随着 pH 值的上升总蛋白含量增加, 且在 pH 值为 7.0 达到最高, 此时的总蛋白含量为 $(26.03 \pm 0.07) \text{mg}$; 之后随着 pH 值的继续升高蛋白的含量呈下降趋势。

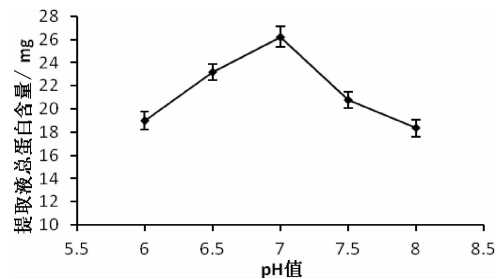


图 4 不同 pH 值对提取液总蛋白溶出度的影响

3.5 响应面分析

中心组合设计 (CCD) 及响应面分析检测结果如表 1 所示, 方差分析如表 2 所示。表 2 显示本设计模型各组合间具有显著性差异, 并且拟合有效; 4 因素中温度、时间及料液比对总蛋白的含量有显著的影响, 而 pH 值对总蛋白含量的影响不显著。经拟合得到精提液总蛋白含量的回归方程为: 总蛋白含量 = $25.80 - 0.75A - 1.28B + 1.24C - 0.15D - 0.52AB - 0.24AC + 0.13AD - 0.74BC - 0.35BD + 0.82CD - 0.92A^2 - 2.23B^2 - 1.97C^2 - 1.87D^2$ 。通过软件求解方程, 得出最优工艺条件为温度 13.16 $^{\circ}\text{C}$, 时间 26.01 min, 料液比 1:34 (g: mL), pH7.03。在此条件下精提液中总蛋白的含量为 26.387 mg。为检验模型的可靠性, 实际精提实验结果为 $(26.483 \pm 0.392) \text{mg}$, 与理论预测值基本吻合。

3.6 Vim 的分离

精提物溶液经 DEAE Sepharose FF 柱, 以梯度 NaH_2PO_4 缓冲液洗脱分离得到的 UV 检测线如图 5 所示。36—86 mmol/L 缓冲液线性洗脱 2 mL/管收

表 1 中心组合设计及检测结果

实验号	A	B	C	D	总蛋白含量/mg	实验号	A	B	C	D	总蛋白含量/mg
1	20	42.5	40	6.5	14.627	16	10	42.5	40	7.5	19.708
2	20	42.5	40	7.5	17.321	17	25	30.0	30	7.0	20.856
3	15	55.0	30	7.0	15.050	18	10	42.5	20	6.5	19.406
4	15	30.0	30	7.0	27.620	19	20	17.5	20	7.5	18.412
5	10	17.5	40	7.5	23.195	20	10	42.5	20	7.5	17.051
6	15	5.0	30	7.0	17.850	21	10	42.5	40	6.0	13.645
7	15	30.0	50	7.0	20.702	22	15	30.0	30	7.0	24.763
8	10	17.5	40	6.5	22.645	23	10	17.5	20	6.5	19.406
9	15	30.0	30	7.0	26.080	24	15	30.0	30	6.0	17.968
10	20	17.5	20	6.5	18.691	25	15	30.0	30	7.0	24.379
11	15	30.0	10	7.0	14.215	26	15	30.0	30	7.0	26.675
12	15	30.0	30	8.0	17.266	27	20	17.5	40	6.5	20.873
13	20	42.5	20	7.0	15.926	28	10	17.5	20	7.5	18.786
14	5	30.0	30	7.0	22.520	29	20	42.5	20	6.5	19.301
15	20	17.5	40	7.5	22.880						

表 2 回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	368.985	14	26.35607	12.7038	< 0.0001	极显著
A-温度	12.97519	1	12.97519	6.254128	0.0254	显著
B-时间	38.70656	1	38.70656	18.65682	0.0007	高度显著
C-料液比	35.47133	1	35.47133	17.09742	0.0010	显著
D-pH	0.544739	1	0.544739	0.262568	0.6163	
AB	4.073417	1	4.073417	1.963415	0.1829	
AC	0.922227	1	0.922227	0.44452	0.5158	
AD	0.282025	1	0.282025	0.135938	0.7179	
BC	8.280776	1	8.280776	3.99139	0.0655	
BD	1.850105	1	1.850105	0.891763	0.3610	
CD	10.5761	1	10.5761	5.097752	0.0405	显著
A ²	21.89678	1	21.89678	10.5544	0.0058	显著
B ²	129.2994	1	129.2994	62.32318	< 0.0001	极显著
C ²	101.6593	1	101.6593	49.00045	< 0.0001	极显著
D ²	101.9368	1	101.9368	49.13421	< 0.0001	极显著
残差	29.04524	14	2.07466			
失拟	21.84766	10	2.184766	1.214167	0.4608	不显著
回归决定系数	7.197577	4	1.799394			
总离差	398.0303	28				

集的馏分为第 9—58 管,图 6 显示以 SDS-PAGE 分析的第 10—45 管蛋白成分。以 Western-Blot 验证 53 kD 成分为 Vim 蛋白(图 7)。第 26—37 馏分收集管 Vim 蛋白成分为电泳纯,合并予透析冻干获得纯化 Vim 蛋白干粉。

3.7 Vim 的纯度及纯化效率

用 10% SDS-PAGE 纯化 Vim 溶液和精提物溶液,分析 3 组平行分离纯化实验结果(图 8)。用 Image Lab 4.0 软件分析凝胶图像得到精提蛋白中 Vim 的纯度为 6.94 %,纯化 Vim 冻干粉的 Vim 纯度为 (80.66 ± 1.30) %。计算相对回收率为 (36.56 ± 0.

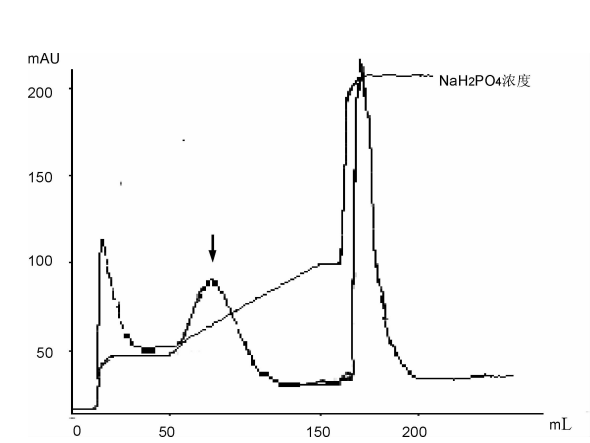


图5 36—86 mmol/L 缓冲液线性洗脱的 UV 检测线

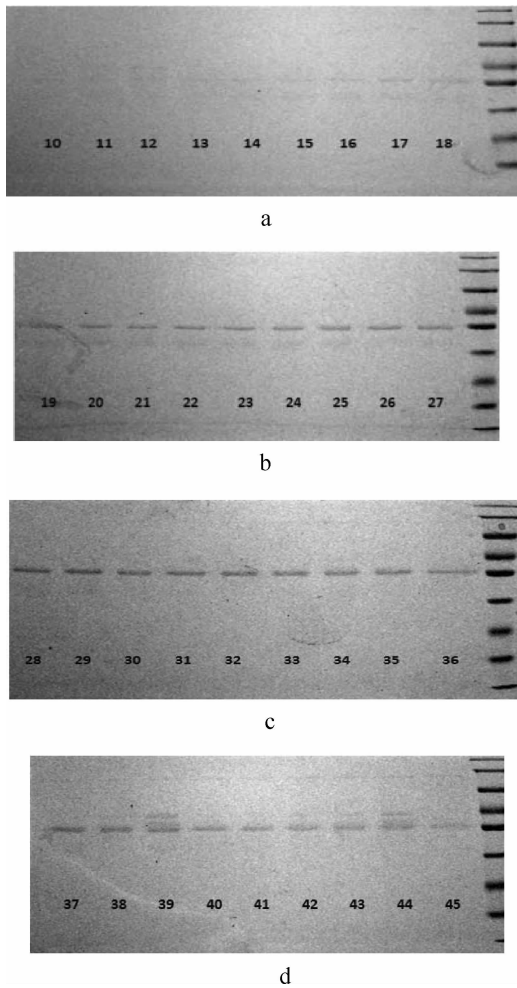


图6 线性洗脱第 10-45 管馏分电泳图

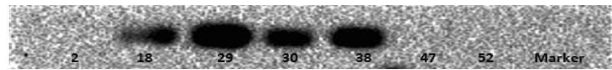
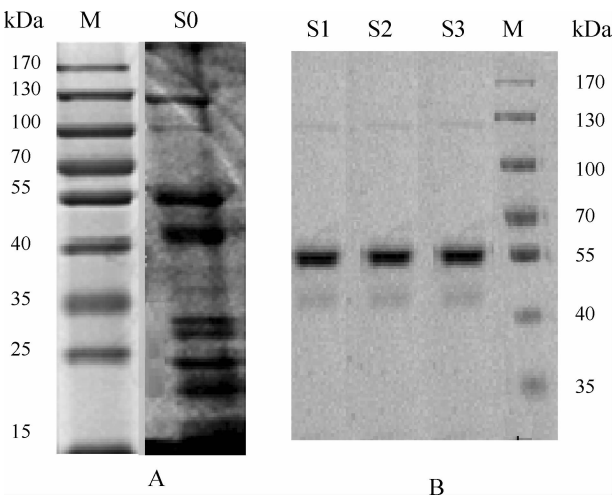


图7 第 2,18,29,30,38,47,52 管馏分的 WB 检测
96)% (表 3)。



M:Marker,S0:精提液,S1-3:纯化 Vim

图8 过柱前后样品电泳图

表3 相对回收率分析

精提液蛋白质量/mg	纯化蛋白质量/mg	相对回收率/%
42.50	1.375	37.602
42.38	1.326	36.369
41.03	1.260	35.701

4 结论与讨论

本研究对以尿素缓冲液提取猪晶状体可溶性蛋白进行条件优化,得到最佳工艺条件为温度 13.16℃,时间 26.01 min,料液比 1:34 (g: mL), pH 7.03。验证实验结果符合预期且优化条件容易实现。

本研究使用 DEAE Sepharose FF 柱一次过柱纯化 Vim。实验初期曾以 10—500 mmol/L NaH₂PO₄ 缓冲液以 500 倍柱体积洗脱分离 Vim,结果显示 Vim 与 2 个主要杂蛋白被连续洗脱下来,42 kDa 杂蛋白在 36 mmol/L 左右被洗脱,128 kDa 杂蛋白在 60 mmol/L 左右被洗脱。从而确立以 40 倍以上柱体积的 36 mmol/L NaH₂PO₄ 缓冲液洗脱大部分 42 kDa 杂蛋白。在线性洗脱阶段尝试仅用单一浓度缓冲液(58 mmol/L NaH₂PO₄,其余同 BufferA)以 100 倍柱体积洗脱,其余步骤相同;结果显示馏分中仍含有大量杂蛋白,检测 Vim 纯度仅约为 43%,分离纯化效果差。尝试线性洗脱更改为 50 倍柱体积,其余步骤相同;检测 Vim 纯度约为 75%,用 Buffer B 继续洗脱仍见 Vim 和杂蛋白,此方法相对回收率低,蛋白提纯效率差。而以 100 倍柱体积用 36—86 mmol/L NaH₂PO₄ 缓冲液线性洗脱能够将 Vim 与 42 kDa 和 128 kDa 杂蛋白较好地分离,Vim 纯度达 80% 以上,相对回收率达 36% 以上,纯度达到市售

进口 Vim 蛋白纯度水平。本研究提纯 Vim 的方法具有程序简捷、纯度高、相对回收率高的特点,可改变目前 Vim 蛋白稀缺的状况。

参考文献:

- [1] Herrmann H, Häner M, Brettel M, et al. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins [J]. *J Mol Biol*, 1999, 286 (5): 1403-1420.
- [2] 陈卓, 方成, 夏昶, 等. 慢性移植肾肾病大鼠体内自身蛋白 vimentin 与 megalin 的免疫原性迥异[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31 (10): 1570-1573.
- [3] Bargagna-Mohan P, Deokule SP, Thompson K, et al. Withaferin A effectively targets soluble vimentin in the glaucoma filtration surgical model of fibrosis. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e63881.
- [4] 马晓春, 孔宁, 高继明, 等. 猪波形蛋白对 PRRSV 感染 Marc-145 的抑制作用[J]. *山东农业科学*, 2012, 44 (10): 1-6.
- [5] Rodriguez MI, Peralta-Leal A, O Valle F, et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9 (6): e1003531.
- [6] Delunardo F, Scalzi V, Capozzi A, et al. Streptococcal-vimentin cross-reactive antibodies induce microvascular cardiac endothelial proinflammatory phenotype in rheumatic heart disease. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173 (3): 419-429.
- [7] Thiagarajan PS, Yakubenko VP, Elson DH, et al. Vimentin is an endogenous ligand for the pattern recognition receptor Dectin-1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99 (3): 494-504.
- [8] Geisler N, Weber K. Isolation of polymerization-competent vimentin from porcine eye lens tissue [J]. *FEBS Lett*, 1981, 125 (2): 253-256.
- [9] Nelson WJ, Vorgias CE, Traub P. A rapid method for the large scale purification of the intermediate filament protein vimentin by single-stranded DNA-cellulose affinity chromatography [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 106 (4): 1141-1147.
- [10] Bloemendal H, Willemsen M, Groenewoud G, et al. Isolation of the intermediate filament protein vimentin by chromatofocusing [J]. *FEBS Lett*, 1985, 180 (2): 181-184.
- [11] Chou YH, Opal P, Quinlan RA, et al. The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109 (4): 817-826.
- [12] 戴丽娟, 李新禹, 陈莉, 等. 波形蛋白基因的构建、表达及鉴定[J]. *药物生物技术*, 2012, 19 (1): 27-30.
- [13] 巩子路, 田童童, 张建, 等. 白斑狗鱼鱼肉中抗冻蛋白的分离纯化[J]. *中国酿造*, 2015, 34 (2): 120-125.
- [14] 廖红丹. 响应面法优化茯苓苦瓜胶囊粗多糖和总皂苷的综合提取工艺[J]. *中国药房*, 2016, 27 (1): 92-95.
- [15] 熊小晶, 王敏, 朱伟, 等. 响应面法优化卫矛多酚的提取工艺[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31 (1): 251-254.