

文章编号:1009-038X(2004)01-0094-05

鹅血中转铁蛋白质的分离纯化及其性质

冯敏杰, 周惠明, 钱海峰
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 以鹅血为原料, 利用醋酸纤维膜电泳, 分析鹅血中各球蛋白的质量浓度. 采用 DEAE-52 离子交换和 Sephdex G-100 凝胶层析等方法, 对转铁蛋白(Transferrin, Tf)进行了分离纯化及其性质的研究. 结果表明, 鹅血浆中含有较多的 β 球蛋白, 质量浓度为 34.89 mg/dL, 每毫升血浆可纯化得到 3.1 mg 转铁蛋白. 鹅血含铁转铁蛋白(holo-Tf)的特征吸收峰为 470 nm, 相对分子质量为 77 000. 鹅转铁蛋白对选用的革兰氏阴性菌-大肠杆菌有抑制作用, Fe^{3+} 能够改变转铁蛋白的结构, 并影响转铁蛋白的抑菌功能.

关键词: 鹅血; 球蛋白; 转铁蛋白

中图分类号: Q 512.2

文献标识码: A

Purification and Characterization of Transferrin from Goose Plasma

FENG Min-jie, ZHOU Hui-ming, QIAN Hai-feng

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The content of globins was determined by cellulose acetate film electrophoresis. The goose plasma transferrin was separated from goose blood by ion-exchange on DEAE-52 and sephadex gel on G-100. The ability of apo-Tf and holo-Tf to damage the selected Gram-negative bacteria and the influence of Fe^{3+} on antibacterial ability of transferrin were studied. It was found that β globulin was the major part of goose plasma globins and the content of β globulin was 34.809 mg/dL. The goose transferrin has antimicrobial activity against selected Gram-negative bacteria. The molecular weight of transferrin was determined as 77 000 by SDS-PAGE. The characteristic absorb peak of transferrin is 470nm. Experimental results predict that Fe^{3+} could change the structure of transferrin, and this change reduce the antibacterial ability of transferrin.

Key words: goose plasma; globulin; transferrin

我国的地理位置独特, 草地、湿地面积较多, 很适合养鹅. 由于鹅的养殖的数量很高, 每年产大量的鹅血, 除少部分加工成血粉和血豆腐外, 大部分鹅血都没得到很好的利用. 大量的鹅血直接排放到自然界中, 不仅浪费了宝贵的资源, 而且造成严重的环境问题.

鹅血含丰富的蛋白质, 有“液体肉”的美誉. 近年来的研究表明, 鹅血有增强机体的免疫力、抗癌^[1]等功能. 《本草纲目》载: “鹅血利五脏, 止消渴”. 鹅血中含有大量的球蛋白, 其中转铁蛋白的研究引起关注. 转铁蛋白是动物血清中一种传递铁的蛋白质, 每个蛋白质分子能可逆地结合 2 个铁离子

收稿日期: 2003-05-13; 修回日期: 2003-07-06.

作者简介: 冯敏杰(1978-), 男, 江苏金坛人, 粮食油脂与植物蛋白硕士研究生.
万方数据

(Fe^{3+})^[2]. 作者从鹅血中分离纯化出转铁蛋白,并对转铁蛋白的性质进行了研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

鹅血:扬州馋神食品公司提供;DEAE-52 纤维素:Pharmacia 进口分装;醋酸纤维膜:路桥四甲生化塑料厂生产;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺:Sigma 进口分装;蛋白胨:中国医药集团上海生化试剂公司生产;酵母浸膏:中国医药集团上海生化试剂公司产品;低相对分子量标样:上海生物化学研究所产品;Sephadex G-100 Pharmacia 进口分装;氨三乙酸(NTA):分析纯,上海金山化工厂产品.

DH5 α *Escherichia coli* 由作者所在学院微生物实验室提供.

1.2 实验仪器

ZOPR-52D 冷冻离心机:Hitashi KokiCo, Ltd Toyko Japan 制造;PYRIS-1 DSC:perkinElmer 产品;721-分光光度计:上海精密科学仪器有限公司生产;pHS-3C 精密 pH 计:上海雷磁仪器厂产品;透析带及透析夹:上海华美生物工程公司产品;UV-1100 紫外分光光度计:北京瑞利分析仪器厂制造;BSZ-100 自动部分收集器:上海沪西分析仪器厂生产;DHL-A 电脑恒流泵:上海沪西分析仪器厂生产;磁力搅拌器:上海司乐仪器厂制造;HP 1250:HP USA 产品.

1.3 实验方法

1.3.1 鹅血中球蛋白的成分分析 按文献[3]方法进行.

1.3.2 鹅血中转铁蛋白的分离与纯化 实验在冯佑民等^[4]方法的基础上,建立了一个分离纯化转铁蛋白的方法.

新鲜鹅血中加入柠檬酸钠,防止其凝结. 鹅血经离心(8 000 r/min, 10 min)得到鹅血浆,在 40 mL 鹅血浆中先加入 10.7 mL 0.1 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 然后加入 1.07 mL 0.1 mol/L 的 NTA-Fe^{3+} (0.2 mol/L 的 FeCl_3 和 NTA 溶液等体积配制),使其被 Fe^{3+} 完全饱和,在 4 ℃ 下缓慢搅拌 4 h. 在用过量的铁饱和的鹅血浆中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使其饱和度达到 40%,然后离心(10 000 r/min, 20 min, 4 ℃),弃沉淀. 在上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使其饱和度达到 85%,然后离心(10 000 r/min, 20 min, 4 ℃),弃上清液. 沉淀溶于 1.54 mmol/L 的 NaCl 溶液,在 -20 ℃ 条件下存储备用.

所得沉淀先经蒸馏水透析去离子,然后用 20 mmol/L 的 Tri-HCl 缓冲液(pH = 7.8)彻底透析后上 DEAE-52 柱(2.0 cm × 50 cm)(柱预先用 20 mmol/L 的 Tri-HCl 缓冲液平衡). 用 NaCl (0 ~ 0.4 mol/L)/20 mmol/L pH 7.8 Tri-HCl 梯度洗脱. 分管收集并测定每管在波长 280 nm 和 465 nm 处的光吸收值.

上述所得分离物经 Sephadex G-100 凝胶层析进一步分离. Sephadex G-100 凝胶层析柱(1.6 cm × 80 cm)预先用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)平衡. 上样量为 2 mL. 体积流量为 3.7 mL/h,每 45 min 收集一管.

1.3.3 特征吸收峰的测定 配制约 5 mg/mL 的鹅转铁蛋白溶液,在 400 ~ 600 nm 波段内进行扫描,测定转铁蛋白的特征吸收峰.

1.3.4 鹅转铁蛋白纯度的鉴定及相对分子量测定 采用反相高压液相(RP-HPLC)法鉴定鹅转铁蛋白纯度. 将 Tf 配制成 10 mg/mL 的溶液进样. 采用 C18 柱,流通相为体积分数 0.05% 三氟醋酸,柱温 30 ℃,进样量为 20 μL ,用体积分数 3% ~ 80 % 的乙腈梯度洗脱.

鹅转铁蛋白相对分子质量的测定,采用 SDS-PAGE 电泳. 按 Wyckoff 等^[6]和 Barrett^[7]等方法. 实验用胶的体积分数为 12.5%.

1.3.5 脱铁转铁蛋白的制备 按参考文献[8]的方法制备.

1.3.6 抑菌实验

1) 培养条件 测试的菌在斜面培养基(10 g NaCl , 10 g 酵母浸膏和 5 g 蛋白胨/1 000 mL 双蒸水, 2 mg/dL 的琼脂)上 4 ℃ 保存. 从固体斜面培养基上取菌,接入液体培养基中,在 37 ℃ 培养 16 h,用作抑菌实验的菌种.

2) 分析方法 在每个 250 mL 锥形瓶中加入 25 mL 培养基(10 g NaCl , 10 g 酵母浸膏和 5 g 蛋白胨/1 000 mL 双蒸水),并加入不同质量浓度 Tf 溶液 40 mL,使锥形瓶中 Tf 质量浓度分别为 0, 0.5, 1.0 和 3.0 mg/mL. 在每个锥形瓶中加 5 mL 上述培养的菌. 菌培养和测定的 pH 值是 7.0. 分别在 0, 5, 2 和 12 h 时,测定锥形瓶中吸光度 A 的变化,每个样品均作 3 次平行实验. Apo-Tf(脱铁转铁蛋白)和 holo-Tf(含铁转铁蛋白)对菌的抑制实验皆采用上述方法.

1.3.7 apo-Tf 和 holo-Tf 变性温度的测定 使用差示扫描量热仪(DSC)测定 apo-Tf 和 holo-Tf 变性温度. 测定温度的范围为 35 ~ 160 ℃,升温速度为

10 ℃/min. 每次样品用量 10 mg, 氮气的体积流量为 60 mL/min.

2 结果与讨论

2.1 鹅血中球蛋白的分析结果

图 1 为醋酸纤维薄膜电泳图扫描的结果. 对各种球蛋白质量浓度的分析结果表明, 鹅血中 β 球蛋白的质量浓度为 34.89 mg/dL, 明显高于一般动物血中 β 球蛋白的质量浓度(7.80~14.00 mg/dL).

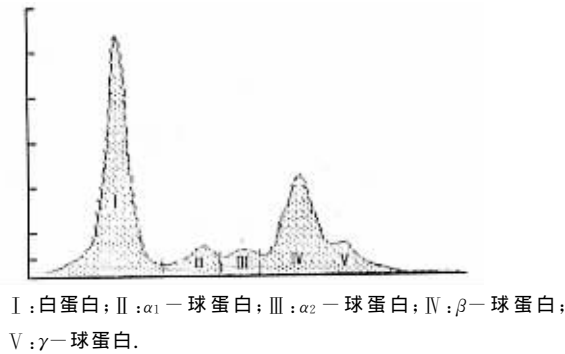


图 1 鹅血浆的醋酸电泳扫描图

Fig. 1 Scan figure of cellulose acetate film electrophoresis of goose plasma

2.2 鹅血转铁蛋白的分离纯化及鉴定

鹅血经 DEAE-52 离子交换后的洗脱曲线, 有 3 个大峰(图 2). 3 个峰在波长为 280 nm 与 465 nm 处的光吸收值的比分别为 23.65, 54.38 和 48.26 (见表 1). 转铁蛋白的特异比值在 23 处^[4]. 峰 I 的特异比值也在 23, 且其洗脱液呈红色, 说明峰 I 对应的应该就是 holo-Tf.

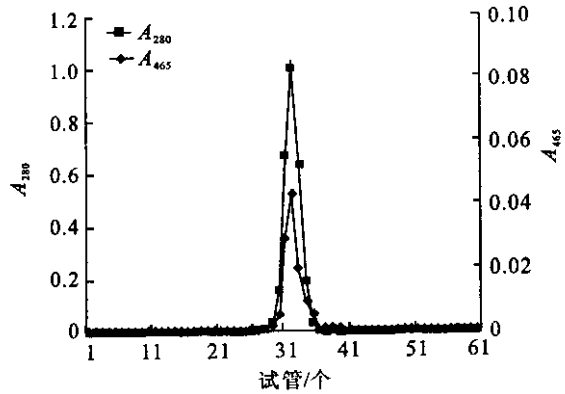


图 2 85%饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的沉淀物的 DEAE-52 离子交换

Fig. 2 Chromatography of precipitate from 85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on DEAE-52

表 1 样品分别在 280 nm 和 465 nm 下的吸收值
Tab.1 Optical density of peaks at 280 nm and 465 nm in Fig. 2

吸收值	吸 收 峰		
	I	II	III
A_{280}	1.947	3.750	1.916
A_{465}	0.0823	0.069	0.0397
A_{280}/A_{465}	23.65	54.38	48.26

图 3 是 Tf 经 Sephadex G-100 进一步纯化的洗脱曲线图. 图中只出现单一的洗脱峰, 收集 28~35 管洗脱液, 冻干, 得到 Tf 冻干粉.

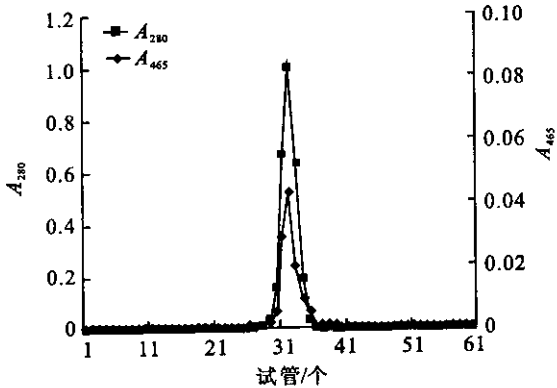


图 3 Tf 的 Sephadex G-100 柱层析

Fig. 3 Chromatography of Tf on Sephadex G-100

2.3 鹅转铁蛋白特征峰的测定

含铁蛋白在 465 nm 处有特征吸收峰^[2]. 上述纯化得到的样品经 400~600 nm 扫描, 发现在 470 nm 左右处有特征吸收峰(见图 4), 表明所得样品为 holo-Tf. 实验中每毫升血浆纯化得到的 Tf, 经冷冻干燥得到 3.1 mg Tf, 高于相关的报道^[8~10].

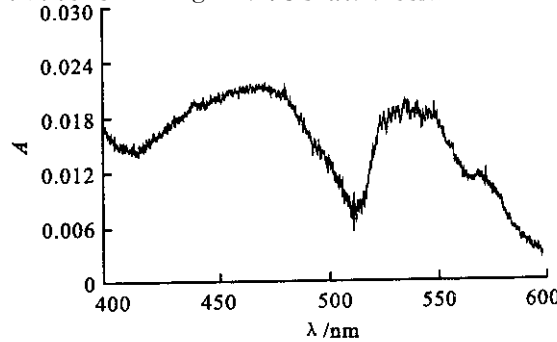


图 4 Holo-Tf 的 400~600 nm 扫描曲线

Fig. 4 Scan curve of holo-Tf from 400 nm to 600 nm

2.4 相对分子质量确定及纯度鉴定

预处理的鹅血经 DEAE-52 离子交换和 Sephadex G-100 层析纯化所得的样品, 经 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 5. 图中样品为单一带, 表明纯化所得样品纯度很高, 经计算 Tf 的相对分子质量约为 77 000.

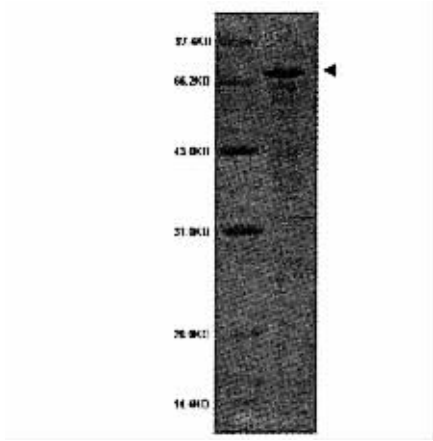


图 5 Tf 的电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of Tf

对纯化所得的 Tf 进行 RP-HPLC 纯度鉴定的结果见图 6. Tf 的纯度为 98.83%, 表明分离所得的样品是比较纯的 Tf.

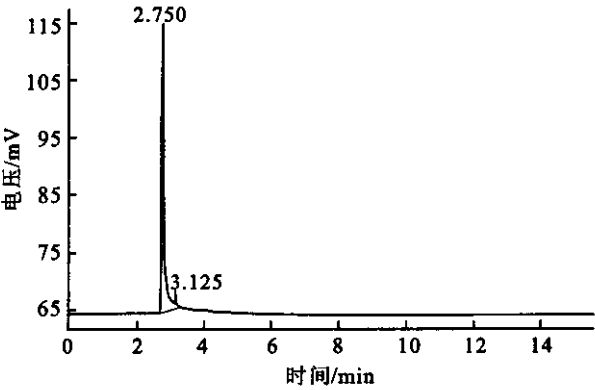


图 6 Apo-Tf 的 HPLC 图谱

Fig. 6 RP-HPLC chromatogram of apo-Tf

2.5 apo-Tf 和 holo-Tf 的抑菌性能以及 Fe³⁺ 的影响

实验采用 apo-Tf 和 holo-Tf 2 种转铁蛋白. 考察了随着 apo-Tf 和 holo-Tf 2 种转铁蛋白质量浓度的增加, 其对所选革兰氏阴性菌生长的影响, 结果见图 7. 从图中可以看出, 2 种转铁蛋白的质量浓度在 0~0.5 mg/mL 范围内时, 它对菌的抑制不是很明显; 当 2 种 Tf 质量浓度超过 0.5 mg/mL 时, 对菌的抑制作用明显增加; 而当 apo-Tf 和 holo-Tf 的质量浓度超过 1.0 mg/mL 时, 随着 2 种转铁蛋白质量浓度的增加对菌的抑制能力增加不明显.

在 37 °C 时, 质量浓度为 1.0 mg/mL 的 apo-Tf 和 holo-Tf 对 *Escherichia coli* 生长动力的影响见图 8. 由图 8 可以看出, 在 0~5 h 时, apo-Tf 和 holo-Tf 对菌生长的抑制较明显. 菌生长 5 h 后, 由于转铁蛋白的活力降低, 对菌的抑制没有开始那么明显, 所以 5 h 后菌的生长速度增加.

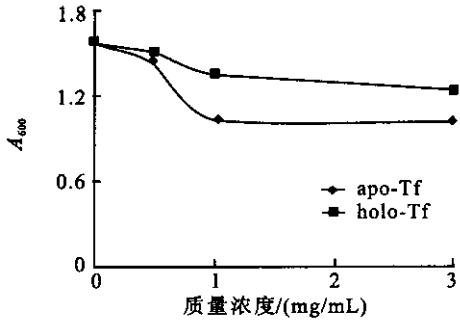


图 7 Apo-Tf 和 holo-Tf 质量浓度对 *Escherichia coli* 生长的影响

Fig. 7 Effect of apo-Tf and holo-Tf concentration on the growth of *Escherichia coli* strain

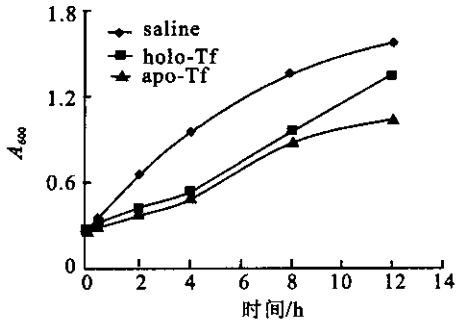


图 8 在 37 °C 时 1.0 mg/mL Tf 对 *Escherichia coli* 生长的影响

Fig. 8 Effect of 1.0 mg/mL Transferrin (Tf) on the growth of *Escherichia coli* strains at 37 °C

在转铁蛋白抑制菌的原理中, 有一种假设是转铁蛋白吸收环境的铁离子, 由此来抑制易感染菌的生长^[11]. 但是, 许多实验结果表明, 转铁蛋白的这种功能不能用此假设来解释. Ellisonet 的实验结果表明, 转铁蛋白能够直接作用革兰氏阴性菌的细胞壁, 导致脂多糖从细菌壁中释放出来, 其作用方式和 EDTA 相似^[12]. Ellison^[12] 和 Richard T^[13] 也研究了转铁蛋白破坏革兰氏阴性菌细胞壁的能力. 实验中的培养基不含铁, 根据 Richard T 和 Ellison 的实验结果, 可以解释实验鹅转铁蛋白抑制所选用的革兰氏阴性菌的生长.

转铁蛋白和乳铁蛋白是存在动物体内不同部位的转铁蛋白, 结构相似, 具有相似的功能. Bellamy 等^[14] 发现乳铁蛋白具有抗菌功能的部位在 N 端附近, 不同于结合铁的位点. 因此, 乳铁蛋白被铁饱和后仍有抑制菌的能力. 在实验中, holo-Tf 具抑菌的功能, 也表明了 Fe³⁺ 结合 Tf 的位置不同于 Tf 抑制菌的部位.

从图 7, 8 看出, apo-Tf 和 holo-Tf 对所选择的菌的生长有抑制功能, apo-Tf 对菌的抑制能力要高于 holo-Tf. 从实验的结果可以看出, Fe³⁺ 影响了

Tf 的抑菌功能.

图 9 是采用 DSC 测定 apo-Tf 和 holo-Tf 的变性温度.

图 9 中 A 为 apo-Tf DSC 差示扫描图,可以看出,apo-Tf 在 64.031℃ 处有吸热峰,在 94.410℃ 处有放热峰,B 为 holo-Tf DSC 差示扫描图,仅在 60.804℃ 处有一个放热峰. Bryan F. Anderson 等^[15]研究了乳铁蛋白的物理性质,发现乳铁蛋白结合铁后发生了构象的改变. 转铁蛋白与乳铁蛋白的结构相似. Apo-Tf 和 holo-Tf 的变性温度有显著的区别,可能是由于转铁蛋白结合铁后发生了构象的变化,这个改变可能也影响转铁蛋白抗菌的能力.

3 结 论

实验结果表明,鹅血中含有较多的 β 球蛋白,每毫升血浆可纯化得到 3.1 mg Tf. 鹅含铁转铁蛋白(holo-Tf)的特征吸收峰为 470 nm,相对分子质量为 77 000. 鹅转铁蛋白对选用的革兰氏阴性菌——大肠杆菌有抑制作用. Fe^{3+} 能够改变转铁蛋白的结构,并影响转铁蛋白的抑菌功能.

参考文献:

- [1] 余萍. 鹅血对移植肝癌小鼠红细胞免疫功能的影响[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(6): 361.
- [2] Masson P L, Heremans J F, Dive C. An iron-binding protein common to many external secretions[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1966, 13: 735—739.
- [3] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1996. 72—73.
- [4] 冯佑民. 转铁蛋白结构与功能的研究 I. 猪转铁蛋白的分离纯化及在无血清细胞培养中的应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1987, 19(4): 322—327.
- [5] Wyckoff M. Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffer using multiphasic buffer system: Properties of the stack, valid Rf-measurement, and optimized procedure[J]. *Anal Biochem*, 1977, 78: 459.
- [6] Barrett A J. The electrophoretically show ans fast forms of the $\alpha 2$ -macroglobulin molecule[J]. *Biochem J*, 1979, 181, 401.
- [7] 王革新. 人血浆转铁蛋白的分离与纯制[J]. 化学试剂, 1991, 13(4): 244—247.
- [8] Aisen P. Iron transport and storage proteins[J]. *Ann Rev Biochem*, 1980, 49: 357.
- [9] 李倬. 牦牛血清转铁蛋白的制备及应用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2001, 5: 8—9.
- [10] 张勤. 无血清细胞培养基添加蛋白—白蛋白和转铁蛋白的制备和纯化[J]. 华东理工大学报, 1995, 21(6): 696—700.
- [11] Finkelstein R A, Sciortino C V, McIntosh M A. Role of iron in microbe-host interaction[J]. *Reviews of Infections Diseases*, 1983, 5: 759—777.
- [12] Ellison R T, Gieh T J, Laforce F M. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin[J]. *Infection and Immunity*, 1988, 56: 2774—2781.
- [13] Richard T E. Lactoferrin and transferring damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{+} and Mg^{+} [J]. *Journal of General Microbiology*, 1990, 136: 1437—1446.
- [14] Wayne Bellamy. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1121: 130—136.
- [15] Bryan F Anderson. Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins[J]. *Nature*, 1974, 251: 784—787.

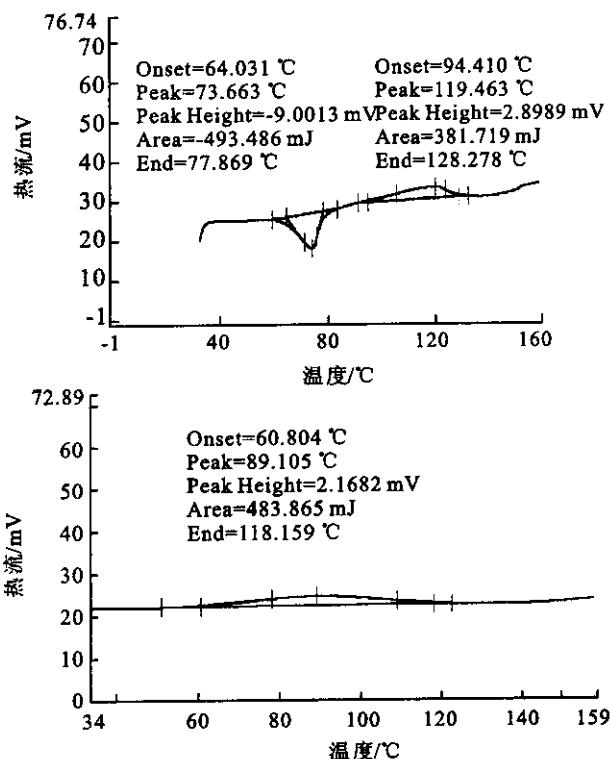


图 9 Apo-Tf 和 holo-Tf 的 DSC 扫描图

Fig. 9 A: DSC curves of apo-Tf B: DSC curves of holo-Tf