

牛乳骨桥蛋白的分离纯化及初步鉴定

孙 婕,尹国友

(平顶山工学院生物工程系,河南平顶山 467044)

摘 要:离心脱脂后的牛乳,采用离子交换层析、疏水层析、透析等生物化学技术进行分离纯化,然后对分离纯化得到的产物进行 SDS-PAGE 电泳、免疫印迹技术初步鉴定,得到相对分子量约为 60kDa 具有活性的骨桥蛋白。主要阐述牛乳中骨桥蛋白的分离纯化及初步鉴定的方法,为骨桥蛋白功能性质的研究奠定了基础。

关键词:牛乳,骨桥蛋白,分离纯化

Isolation, purification and primary characterization of osteopontin from bovine milk

SUN Jie YIN Guo-you

(Biological Engineering Department Pingdingshan Institute of Technology, Pingdingshan 467044, China)

Abstract The centrifugal defatted bovine milk was separated and purified by biochemical technique, including ion-exchange chromatography, hydrophobic chromatography and dialysis. The fractions containing osteopontin was identified by SDS-PAGE and Western Blot. Osteopontin with high purity was obtained and its molecular weight was 60kDa. This article mainly elaborate the method about isolation, purification and primary characterization of osteopontin from bovine milk, this provides basis for next step research about the functionality of osteopontin.

Key words bovine milk, osteopontin, isolation and purification

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)010-0130-03

牛乳几乎含有人体所需要全部营养物质,是唯一的全营养食物。牛乳容易消化吸收、物美价廉、食用方便,还含有许多生物活性物质,是人类食品中优质蛋白质极好的来源。骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)是一种富含唾液酸的高度磷酸化的糖蛋白,主要作为非胶原性的细胞外基质蛋白分布在矿物组织(如骨和牙骨质)中,促进破骨细胞的黏附和促进类骨质的生物矿化。一些研究工作表明,骨桥蛋白存在于骨细胞中,粘附到细胞外基质,可以作为骨形成早期阶段的化学诱导物^[1]。目前,关于骨桥蛋白与骨健康方面的研究越来越受到人们的关注。骨桥蛋白可以作为完整的蛋白质或者作为片段的形式从不同来源中获得,如在骨中^[2-4]、人的尿液中提取等^[5,6]。对乳中骨桥蛋白的阐述始于1987年母乳酪蛋白组

分^[7]。Sorensen等人采用交联葡聚糖凝胶色谱和Q-琼脂糖阴离子交换色谱的方法,从牛乳肌间质蛋白胨中提取了骨桥蛋白,并且指出分子量为60kDa^[8]。尽管用这种方法得到了骨桥蛋白,但是在提取的过程中存在变性步骤。本文研究直接利用生物技术来提纯骨桥蛋白,采用离子交换层析技术(Ion Exchange Chromatography, IEC)和疏水相互层析技术(Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)相结合进行骨桥蛋白的分离提纯^[9],并采用SDS-PAGE电泳和免疫印迹技术进行初步鉴定,为进一步研究骨桥蛋白的功能性质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜牛乳 由黑龙江省完达山乳业股份有限公司奶源基地提供,低温储藏,备用; DEAE-Sephacel, Phenyl-Sephacel, Sepharose 6FF 均购于 Amersham 公司; 兔抗牛 OPN 多隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔

收稿日期: 2008-03-03

作者简介: 孙婕(1976-),女,博士,从事乳品加工与营养的研究。

11s Protein Mixtures Coagulated by Glucono- δ -Lactone[J]. J Food Sci 2004(69): 139-143.

[5] Shun Tang Guo Tomotada Ono The Role of Composition and Content of Protein Particles in Soy milk on Tofu Curdling by Glucono- δ -lactone or Calcium Sulfate[J]. J Food Sci 2005(70): 258-261.

[6] 杨国龙,赵谋明,等.天然大豆蛋白的选择性酶解[J].食品与发酵工业,2006(2): 132-135.

[7] 汪秋安.蛋白水解物的生产与应用[J].食品工业科技,1999(4): 66-67.

[8] 范恒君.酶法水解植物蛋白[J].南宁职业技术学院学报,2000(3): 57-62.

IgG 购于北京博奥森生物技术有限公司; ECL Plus 超敏发光液 北京中杉生物技术有限公司; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、甲醇等 均为国产分析纯; 透析袋、SDS 溴酚蓝、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝 R-250 蛋白 Marker 硝化纤维素膜、丽春红 S 等 均购于北京索莱宝生物科技有限公司。

AKTA purifier100 层析系统 Amersham 公司; GE Healthcare Column C 16/20 Amersham; 层析柱 35/40 上海华美仪器厂; DYCZ-28A 型电泳槽、DYY-10 型电泳仪 北京六一仪器厂; Alpha 1-2/LD plus 冻干机 德国 CHRIST; GL-21M 高速冷冻离心机 上海离心机机械研究所; Model 680 型酶标仪 BD-RAD 公司; SL-2 型层析实验冷柜 北京博医康实验仪器有限公司; 转移电泳仪 Trans-Blot SD Cell BD-RAD 公司; X 射线摄影暗匣 AX-II, 汕头市粤华医疗器械厂; 凝胶成像系统 AlphaImager IS-220Q Alpha 公司。

1.2 骨桥蛋白的分离纯化

1.2.1 样品的制备 取 2L 牛乳, 1250 × g 离心 15min 去除脂肪, 取脱脂乳部分备用。

1.2.2 离子交换层析 脱脂乳与 200mL DEAE-Sephacel 树脂 4℃ 温和混合孵育过夜, 静置, 除去不结合蛋白, 将混合物灌入 3.5 × 40cm 色谱柱中, 然后用 0.01mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液进行平衡, 接着采用三步梯度式洗脱, 洗脱液浓度由 0.2~0.3mol/L NaCl 0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液变化, 流速为 3mL/min, 收集洗脱峰并对每一组分进行透析、冻干, 同时采用 SDS-PAGE 对各洗脱组分进行检测, 检测目的蛋白所在的组分。此步得到的是牛乳骨桥蛋白的粗分离组分。

1.2.3 一步疏水层析 将收集到含有目的蛋白的组分进行 Phenyl-Sephacel 6FF (25mL, 1.6 × 20cm) 柱层析分离纯化。平衡盐溶液: 4mol/L NaCl 0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液; 洗脱液: 2mol/L NaCl 0.01mol/L pH 7.4 溶液洗脱; 上样量: 5mL (用 NaCl 使含有目的蛋白组分的盐浓度增加至 4mol/L); 柱平衡: 3 倍柱体积平衡盐溶液洗脱不结合蛋白; 流速: 1mL/min, 合并收集洗脱峰部分, 并对组分透析、冻干, 同时采用 SDS-PAGE 对洗脱组分进行检测, 此步得到的是牛乳 OPN 粗纯化组分。

1.2.4 二步疏水层析 为了去除其他杂蛋白, 将一步疏水层析得到的组分再次进行 Phenyl-Sephacel 6FF (5mL, 1.6 × 20cm) 柱纯化。平衡盐溶液: 4mol/L NaCl 0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液; 洗脱液: 2mol/L NaCl 0.01mol/L pH 7.4 溶液洗脱; 上样量: 5mL (用 NaCl 使含有目的蛋白组分的盐浓度增加至 5mol/L); 流速: 1mL/min, 合并收集洗脱峰部分, 并对组分透析、冻干, 同时采用 SDS-PAGE 对洗脱组分进行检测, 此步得到的是牛乳 OPN 纯化组分。

1.2.5 透析 将每步收集的各蛋白质洗脱峰溶液进行透析, 48h, 每 4h 更换去离子水一次。

1.2.6 冻干 将透析处理后的各组分真空冷冻干

燥, 分别收集各组分的冻干粉末, 4℃ 冰箱保存。

1.3 骨桥蛋白的初步鉴定

1.3.1 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 透析后冻干的样品进行 SDS-PAGE 电泳^[9,10]。分离胶和浓缩胶的浓度分别为 12% 和 3%, 上样体积均为 10μL, 1% 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后拍照。

1.3.2 免疫印迹法 (Western blot) 取每步纯化后 OPN 组分经 SDS-PAGE 分离后, 通过电转移将蛋白印迹至硝酸纤维素膜上, 用 3% (质量分数) 脱脂奶粉封闭膜上的非特异性结合位点, 依次与兔抗牛 OPN 多抗 (1:100 每份抗体用 100 倍体积的 PBST 缓冲液稀释) 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:500 每份抗体用 500 倍体积的缓冲液稀释) 进行反应, 用增强化学发光显色液 ECL 显色 5~10min, 胶片曝光, 洗片。

2 结果与分析

2.1 离子交换层析结果

脱脂乳经 DEAE-Sephacel 柱分离得到三个组分, 分别为 OPN-1、OPN-2 和 OPN-3, 洗脱曲线如图 1 所示。

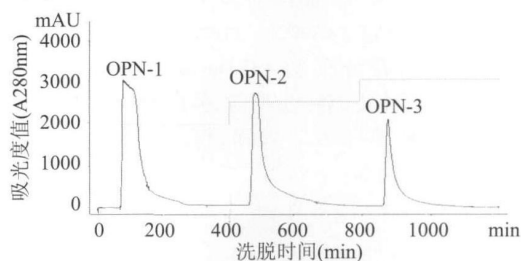


图 1 OPN 在 DEAE-Sephacel 柱上的洗脱曲线

2.2 一步疏水层析

通过 SDS-PAGE 分析, 见图 4 OPN-3 组分中含有目的蛋白, 因此将 OPN-3 处理后经疏水层析可得到组分 OPN-II, 如图 2 所示。

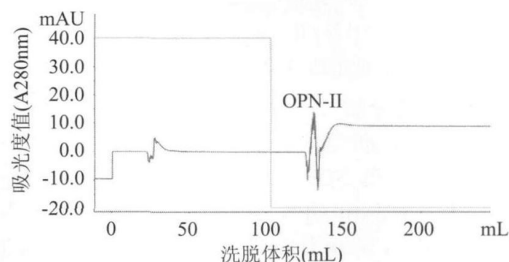


图 2 OPN-3 在 Phenyl-Sephacel 6FF 柱上的洗脱曲线

2.3 二步疏水作用层析

为了去除其他的杂蛋白, 将 OPN-II 组分处理后经二次疏水层析可得到 OPN-III, 洗脱曲线如图 3 所示。

3 骨桥蛋白的鉴定

3.1 电泳结果分析

将离子交换层析柱洗脱下来的蛋白组分 OPN-1、OPN-2 和 OPN-3 进行不连续的 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 4 所示。由于骨桥蛋白分子量约为 60kDa 因此初步判定组分 OPN-3 中含有目的蛋白。

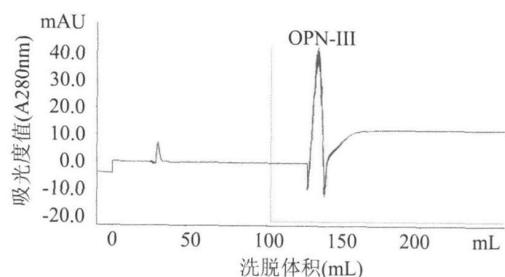


图3 OPN- II 在 Phenyl-Sepharose 6FF 柱上的洗脱曲线

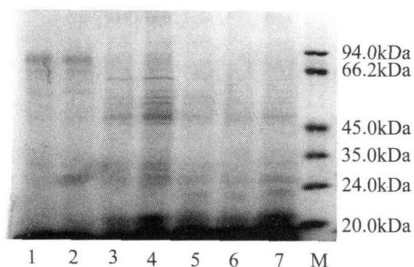


图4 OPN-1、OPN-2 和 OPN-3 的电泳图

M:标准分子量蛋白;1,2:OPN-1;3,4:OPN-3;5~7:OPN-2

将组分 OPN- II、OPN- III 蛋白峰溶液透析冻干后进行 SDS- PAGE 电泳,结果如图 5 所示。可以看出,OPN- II 和 OPN- III 均含有分子量大约为 60kDa 的条带,初步确定为 OPN。OPN- II 有明显的三条带,其中两条带在分子量 43kDa 以下,而 OPN- III 只含有一条带,因此,经二步疏水层析之后,可以将 OPN- II 中的其他杂蛋白去除,得到纯度较高的目的蛋白。

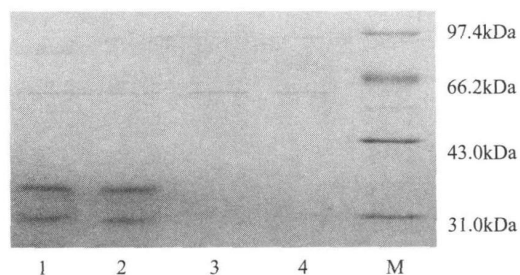


图5 OPN- II、OPN- III 的电泳图

M:标准分子量蛋白;1 2 OPN- II;3 4 OPN- III

3.2 免疫印迹分析

对三步纯化所得的 5 个组分进行 Western blot 检测,结果显示,与 SDS- PAGE 电泳相对应的组分 OPN- 3、OPN- II 和 OPN- III 的泳道均在分子量约 60kDa 处出现特异性蛋白条带,如图 6 所示,说明兔抗牛 OPN 抗体可以特异性识别牛乳骨桥蛋白,而且得到了组分单一、纯度较高的活性 OPN,并且在每步纯化的过程中 OPN 的蛋白表达也相对增强。

4 结论

本文主要研究了牛乳中骨桥蛋白的分离纯化及初步鉴定。采用一系列的色谱技术,经过三步简单的分离纯化过程后可以得到高纯度的蛋白质,这种蛋白质分离纯化方法的优越性在于整个分离过程中

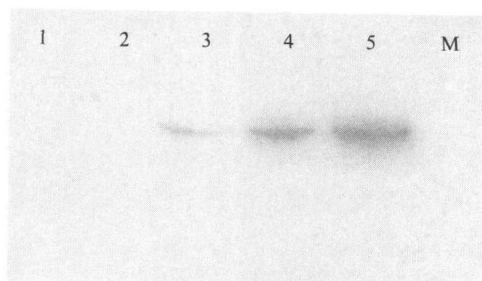


图6 Western blot 结果

1 OPN- 1; 2 OPN- 2; 3 OPN- 3;

4 OPN- II; 5 OPN- III; M: 标准分子量蛋白

没有使用剧烈或变性的条件,利于蛋白活性的保留,因此这种方法为进一步对骨桥蛋白功能性质的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Someman MJ, Prince CW, Butler WT, et al. Cell attachment activity of the 44 kildalton bone phosphoprotein is not restricted to bone cells[J]. *Matrix*, 1989, 9(1): 49-54.
- [2] Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, et al. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(7): 9702-9708.
- [3] Zhang Q, Domenicucci C, Goldberg HA, et al. Characterization of fetal porcine bone sialoproteins: secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein. Demonstration that the 23-kDa glycoprotein is derived from the carboxyl terminus of SPPI[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 7583-7589.
- [4] Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix[J]. *Biochem J* 1985, 232(3): 715-724.
- [5] Shiraga H, Min W, VanDusen W J et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin another member of the aspartic acid-rich protein superfamily[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(1): 426-430.
- [6] Sorensen S, Justesen SJ, Johnsen AH. Identification of a macromolecular crystal growth inhibitor in human urine as osteopontin[J]. *Urol Res*, 1995, 23(4): 327-334.
- [7] Azuma N, Yamachi K. A glyco-phosphoprotein in human milk[J]. *J Dairy Res*, 1987, 54(2): 199-205.
- [8] Sorensen ES, Petersen TE. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk[J]. *J Dairy Res*, 1993, 60(2): 189-197.
- [9] Bayless KJ, Davis GE, Meininger GA. Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk[J]. *Protein Exp Purif* 1997, 9(11): 309-314.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 77-98.