



人血浆中MBL-MASP复合物的纯化与分离

甘露聚糖结合凝集素(mannan-binding lectin, MBL)是天然免疫系统中的关键分子,可选择性识别多种病原体表面的糖结构,通过凝集素途径以不依赖抗体和C1q的方式激活补体系统从而发挥溶破和调理功能[1][2]。许多有关凝集素途径及其相关疾病的理论研究、临床疾病血清中MBL水平测定和抗MBL单克隆抗体的制备等实际工作中,都需要高度纯化的MBL制剂。然而,血浆中MBL浓度很低(约1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [3],且与2个MBL-相关丝氨酸蛋白酶(MBL-associated serine proteases, MASP)结合,以一种大分子复合物的形式存在[4],故分离纯化比较困难。本实验根据MBL可结合非活化Sepharose 4B的特点,在有蛋白酶抑制剂的条件下,先以Sepharose 4B纯化MBL-MASP复合物,然后以Sephacryl S-300凝胶过滤将复合物分离,同时得到纯化的MBL和MASP酶原。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人新鲜冰冻血浆购于南方医院输血科, Sephacryl S-300购于Fluka公司, Sepharose 4B、1,10-邻二氮杂菲(1,10-phenanthroline)和苯甲磺酰氟(phenyl-methylsulfonyl fluoride, PMSF)和甘露聚糖系Sigma公司产品, HRP-羊抗鼠IgG抗体购自大连宝生物公司, 健康豚鼠购自南方医科大学实验动物中心。原核表达的重组人MBL三聚体糖识别域(carbohydrate-recognition domain, CRD)、哺乳细胞表达的重组人MBL、鼠抗重组人MBL CRD血清、鼠抗重组人MBL血清和兔抗鸡红细胞抗体由本室制备。其它化学试剂为进口或国产分析纯产品。溶液配制: 100 mmol/L 1,10-phenanthroline储存液用甲醇配制; 100 mmol/L PMSF储存液用无水异丙醇或无水乙醇配制; A液: 50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L CaCl_2 、0.1 mmol/L PMSF、40 mmol/L 1,10-phenanthroline、0.5 ml/L Tween 20, pH7.8; B液: 无 CaCl_2 而含10 mmol/L EDTA的A液; C液: A液中加入200 mmol/L D-甘露糖; D液: 100 mmol/L 醋酸钠、200 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA, pH5.0; E液: 0.145 mol/L NaCl、2 mmol/L PB、0.4 mmol/L MgSO_4 、5 mmol/L CaCl_2 ; F液: 10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、15 mmol/L CaCl_2 、0.5 g/L NaN_3 、0.5 ml/L Tween 20, pH7.2; TBS: 50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl, pH7.8。

1.2 血浆的处理

新鲜冰冻人血浆(1 000 ml)从-20 $^{\circ}\text{C}$ 取出解冻,加入PEG-4000至终浓度70 g/L,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中搅拌2 h,离心(12 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$)15 min。弃上清,沉淀蛋白溶于400 ml 预冷的A液中,离心(12 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$)5 min,弃沉淀,上清用45 μm 滤膜过滤。

1.3 MBL-MASP复合物的提取纯化

将处理过的血浆与已用A液平衡的50 ml Sepharose 4B混合,于4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌2 h。离心(1 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$)5 min收集凝胶,用200 ml A液淋洗后装入层析柱中,以A液充分洗柱,然后用B液洗脱,分部收集洗脱液,含蛋白洗脱液记为组分B,以冷冻干燥浓缩至1 ml左右, TBS透析过夜,测蛋白含量, SDS-PAGE鉴定;向组分B中

加入CaCl₂至40 mmol/L, 负载于已用A液平衡的5 ml Sepharose 4B层析柱, 于4 °C反应2 h, 以A液充分淋洗, 然后用C液洗脱, 分部收集洗脱液, 含蛋白洗脱液记为组分C, 冷冻干燥浓缩至1 ml左右, TBS透析过夜, 测蛋白含量, SDS-PAGE鉴定。

1.4 MBL-MASP复合物的分离

向组分C中加入EDTA至终浓度为15 mmol/L, 上样于已用B液平衡的Sephacryl S-300柱(1 cm×45 cm), 以D液进行凝胶过滤, 流速0.3 ml/min, 分别收集含MBL和MASP峰(第2和第3峰)的洗脱液, 记为组分D和E, 冷冻干燥浓缩至1 ml左右, 用D液充分透析, 测蛋白含量, SDS-PAGE分析, 冻干, -70 °C保存。

1.5 SDS-PAGE和Western blotting

参照文献[5], 样品分别以含和不含2-巯基乙醇的上样缓冲液处理后, 进行12%SDS-PAGE, 考马斯亮兰R250染色。还原样品经SDS-PAGE分离后, 恒压60 V转移3 h。转移后的PVD膜浸入含3%脱脂奶粉的PBS-T(0.1 mol/L PBS、0.5 ml/L Tween 20, pH7.4)中封闭2 h, 再将膜浸入1:5 000稀释的鼠抗重组人MBL CRD抗体中, 室温反应60 min。洗膜5次, 加1:1 500稀释的HRP-羊抗鼠IgG, 室温反应60 min, 洗涤后以DAB显色试剂盒显色, 终止反应, 阴干后拍照。

1.6 ELISA

纯化MBL以20 µg/ml至0.01 µg/ml倍比稀释, 加入酶联板, 100 µl/孔, 37 °C包被4 h。用10 g/L BSA于37 °C封闭2 h, PBS-T洗涤; 分别加入1:1 000稀释的鼠抗重组人MBL CRD抗体、鼠抗重组人MBL抗体及正常鼠血清, 以重组人MBL CRD蛋白和重组人MBL为阳性对照, 稀释液为阴性对照, 37 °C反应1 h; 洗涤, 加1:4 000稀释的HRP-羊抗鼠IgG, 37 °C反应1 h; 洗涤后, OPD-H₂O₂底物液显色, 2 mol/L硫酸终止反应, 测D₄₉₀值。

1.7 酵母菌凝集试验

用生理盐水(含15 mmol/L CaCl₂)稀释纯化MBL为20 µg/ml, 加入血凝板, 100 µl/孔, 与热灭活酵母菌(1×10¹⁰/ml)等量混合, 室温反应1 h后观察结果。以生理盐水为阴性对照, 混合人血清为阳性对照。

1.8 配体结合试验

甘露聚糖以20 µg/ml至0.01 µg/ml倍比稀释, 加入酶联板, 100 µl/孔, 37 °C水浴4 h包被; 用1% BSA于37 °C封闭2 h, F液洗涤; 加入10 µg/ml纯化MBL, 37 °C反应1 h, 洗涤; 加入1:1 000稀释的鼠抗重组人MBL CRD血清, 37 °C反应1 h, 洗涤; 加1:4 000稀释的HRP-羊抗鼠IgG, 37 °C反应1 h, 洗涤; 加入OPD-H₂O₂底物液显色, 2 mol/L硫酸终止反应, 测D₄₉₀值。

1.9 激活补体活性测定

参照文献[6]进行。甘露聚糖0.4 mg溶于200 µl E液中, 分别取50 µl加100 µl纯化MBL(即组分D, 1.5 mg/ml)或MBL-MASP复合物(即组分B或C, 1.5 mg/ml), 37 °C反应30 min使之形成甘露聚糖-MBL复合物或甘露聚糖-MBL-MASP复合物; 然后分别取上述溶液100 µl, 加E液300 µl和补体(豚鼠新鲜混合血清, 1:100稀释)200 µl, 37 °C反应15 min, 再加1%致敏鸡红细胞400 µl, 37 °C反应30 min, 离心, 取上清测D₄₁₀值。设不加MBL的甘露聚糖对照管、50%溶血标准管和只加E液的0%溶血对照管。

1.10 蛋白定量

紫外分光光度计(DU520, Beckman)测定样品D₂₆₀与D₂₈₀值, 按以下公式计算蛋白浓度: 蛋白质浓度(mg/ml) = (1.45 D₂₈₀ - 0.74 D₂₆₀) × 样品稀释倍数。

2 结果

2.1 MBL-MASP复合物的纯化及MBL与MASP的分离

经处理的人血浆蛋白溶液上样Sepharose 4B层析柱, 用B液洗脱, 获得含大量MBL-MASP复合物的单一峰(组分B)。将其负载于另一Sepharose 4B柱上, 用C液洗脱, 得到进一步纯化的MBL-MASP复合物单峰, 为组分C。组分C在Sephacryl S-300(pH 5.0)柱上进行凝胶过滤以D液洗脱出现3个峰(图1): 第1峰洗脱液经SDS-PAGE鉴定未见蛋白条带, 可能是更换不同缓冲液所致OD值变化, 第2峰和第3峰分别为MBL和MASP, 由此将MBL

与MASP酶原分开。通过上述方法，每升血浆可获得B、C、D、E组分的蛋白量(μg)分别为1 106、812、563和226。

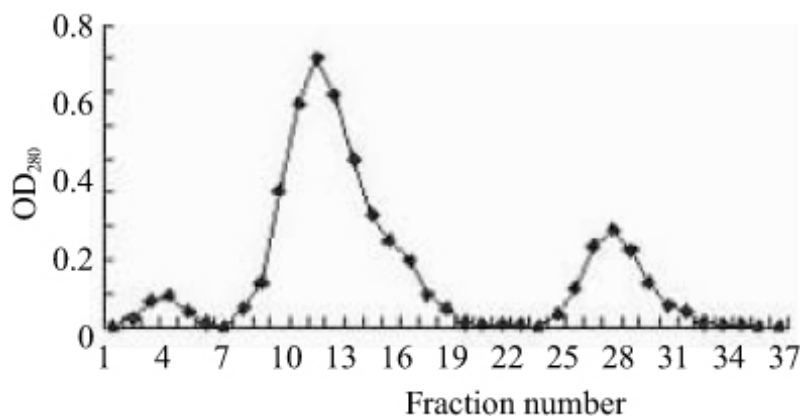


图1 Sephacryl S-300柱凝胶过滤分离MBL和MASPs
Fig.1 Gel filtration on Sephacryl S-300 column for separating MBL from MASPs
MBL: mannan-binding lectin; MASPs: MBL-associated serine proteases

2.2 产物的化学鉴定

将各蛋白样品分别在还原和非还原条件下进行SDS-PAGE，结果显示：在还原条件下，B、C、D组分均含有大量 M_r 为32 000和少量为28 000的MBL肽链(第3、4、5条带)；在 M_r 55 000以上也有明显的蛋白条带，为未完全还原的MBL寡聚体；E组分(第6条带)出现2条明显的蛋白条带，分别为 M_r 93 000的MASP1酶原和 M_r 70 000的MASP2酶原(图2)，与文献报道相符[7]。从非还原SDS-PAGE结果(图3)可判断，经第2个Sepharose 4B柱纯化后，目的蛋白无杂蛋白污染，MBL主要以活性多聚体形式存在。

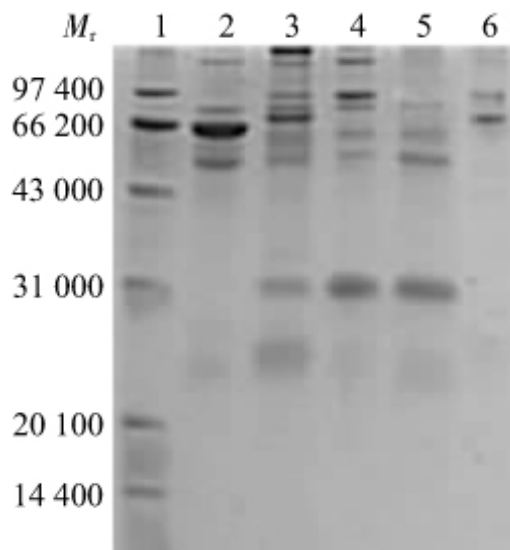


图2 还原条件下产物的SDS-PAGE鉴定
Fig.2 SDS-PAGE profile of proteins under reducing conditions
Lane 1: Molecular mass marker; Lane 2: Human plasma (untreated, 1:200); Lane 3: EDTA eluate (component B); Lane 4: Mannan eluate (component C); Lane 5: Acetate buffer eluate 1 (component D);
Lane 6: Acetate buffer eluate 2 (component E)

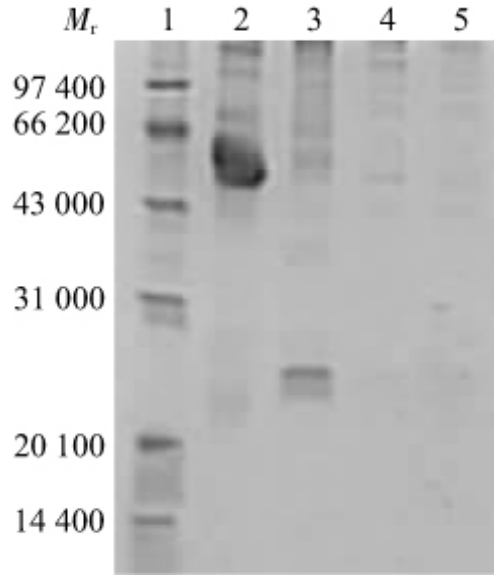


图3 非还原条件下产物的SDS-PAGE鉴定

Fig.3 SDS-PAGE profile of proteins under non-reducing conditions

Lane 1: Molecular mass marker; Lane 2: Human plasma (untreated, 1:200); Lane 3: EDTA eluate (component B); Lane 4: Mannan eluate (component C); Lane 5: Acetate buffer eluate 1 (component D)

2.3 产物的免疫学鉴定

Western blot分析发现，B、C、D组分在目的蛋白条带所在的位置即 M_r 32 000处显色强烈，另一目的蛋白条带所在的位置即 M_r 28 000处也有较明显的蛋白条带，且在 M_r 55 000以上的一些位置亦出现相应的蛋白条带(图4)，ELISA结果表明，纯化MBL可被鼠抗重组人MBL CRD抗体和鼠抗重组人MBL抗体识别(图5)。因此，确证目标蛋白是MBL。

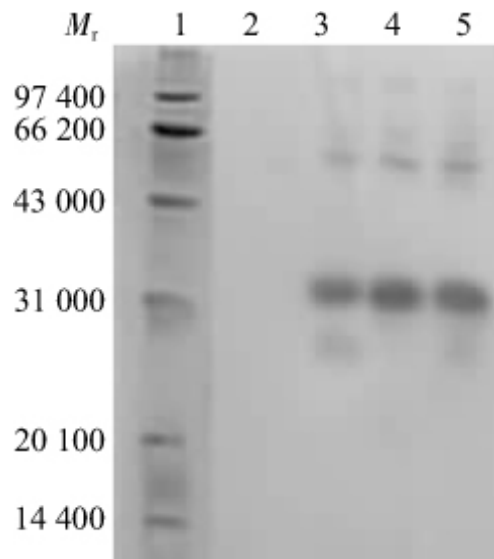


图4 Western blot 分析纯化人血浆MBL

Fig.4 Western blot analysis of the MBL purified from human plasma

Lane 1: Molecular mass marker; Lane 2: Human plasma (untreated, 1:200); Lane 3: EDTA eluate (component B); Lane 4: Mannan eluate (component C); Lane 5: Acetate buffer eluate 1 (component D)

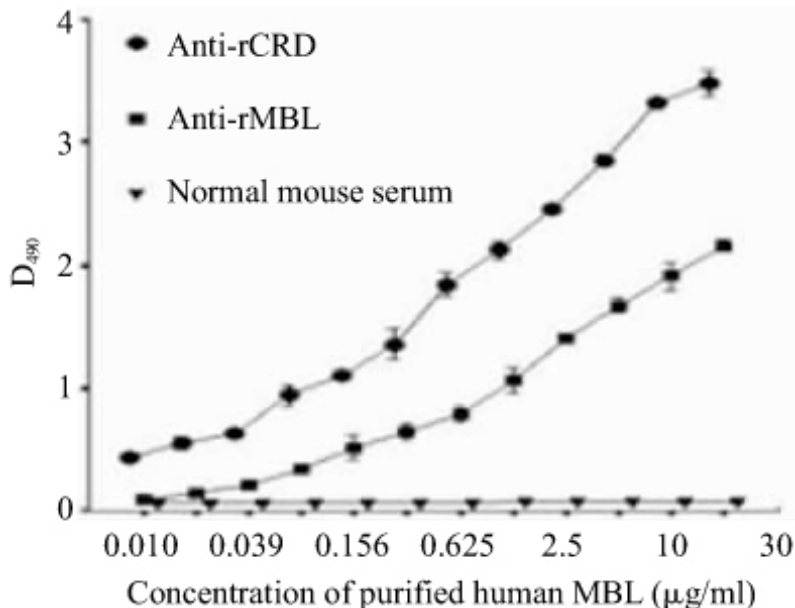


图5 ELISA鉴定纯化MBL与抗体的结合

Fig.5 Binding between purified MBL and anti-MBL antibodies

The graph denotes the binding of purified MBL from human plasma with mouse anti-recombinant MBL CRD serum and mouse anti-recombinant human MBL serum by ELISA. Each experiment was repeated for 3 times (n = 3).

2.4 产物的生物学活性鉴定

MBL能结合酵母菌细胞壁甘露聚糖，产生可见的凝集颗粒，其效价高低表明MBL活性的强弱。本实验用20 µg/ml纯化MBL进行分析，测得凝集效价为1:256，说明所纯化的MBL具有较高的活性。ELISA分析亦发现，纯化MBL可与其配体甘露聚糖有效结合(图6)。

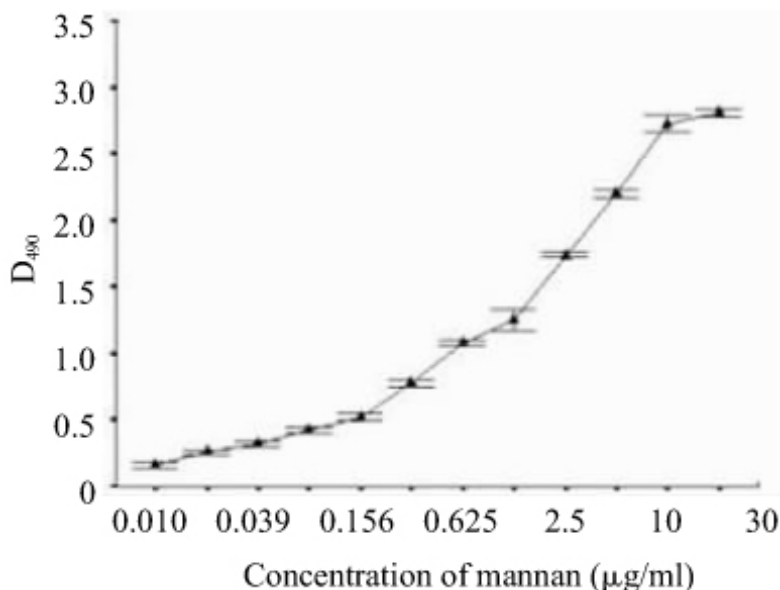


图6 ELISA分析纯化MBL与甘露聚糖的结合

Fig.6 Analysis of binding between purified MBL and mannan by ligand-binding ELISA
The graph denotes the binding efficiency of purified MBL from human plasma with mannan by ELISA. Each experiment was repeated for 3 times (n =3).

分析产物的激活补体活性，发现甘露聚糖与提取的MBL-MASP复合物作用后形成的复合物可通过凝集素途径激活补体，加入指示系统致敏鸡红细胞之前补体即消耗殆尽，因而具明显的抗补体效应即抑制致敏鸡红细胞

溶血, 与0%溶血对照管无显著差异($P>0.05$), 而加入纯化MBL即组分D的测定管和不加MBL的对照管100%溶血, 与50%溶血标准管无显著差异($P>0.05$), 说明所获MBL-MASP复合物具生物学活性, 而通过Sephacryl S-300凝胶过滤后, MBL与MASP得以分离。

3 讨论

MBL是肝细胞分泌的血浆蛋白, 为C型凝集素超家族中胶凝素家族成员。MBL肽链 M_r 为28 000~32 000, 3条相同肽链构成结构单位, 结构单位又藉二硫键和非共价键连接成二至六聚体[8]。六聚体形式的MBL约占血清MBL总含量的20%, 具有高生物学活性[9]。MBL与微生物之间的相互作用, 一方面依赖于微生物表面的糖配体密度, 另一方面取决于MBL的寡聚化程度[10]。本研究从混合人血浆中提取纯化了MBL-MASP复合物并进行分离和鉴定, 发现所获得MBL制剂在还原条件下含有 M_r 为28 000和32 000两种肽链; 在非还原条件下, B、C、D组分中均无MBL肽链或结构单位存在; 而且, 它们能被鼠抗重组人MBL CRD抗体和鼠抗重组人MBL抗体所识别。这些, 均充分证明所纯化的目标蛋白为MBL分子, 而且是多聚体, 可能具有功能活性。

MBL分子的生物学功能主要有二, 即识别功能(识别并结合配体)和效应功能(激活补体系统)。本实验发现, 纯化MBL可结合酵母菌细胞产生可见的凝集颗粒, 亦能与其配体甘露聚糖有效结合, 表明所纯化的MBL具有较高的识别活性, 亦提供了所纯化MBL存在功能性多聚体的直接信息。MBL是目前发现的惟一能活化补体的胶凝素, 其启动补体活化与2种丝氨酸蛋白酶(MASP1和MASP2)有关[11]。MBL肽链、结构单位或其二聚体和三聚体均无激活补体能力, 至少要四聚体或更大的多聚体才能充分激活补体系统[12]。MBL结合相应配体后, 激活MASP-1, 继之激活MASP-2, 后者水解C4和C2, 产生C3转化酶C4b2b[1], 因此MBL只有通过MASP才能启动补体活化。鉴定分离产物的激活补体活性, 发现甘露聚糖-MBL-MASP复合物能激活补体系统, 而甘露聚糖-MBL复合物则否, 表明所纯化的MBL-MASP是活性复合物, 而通过Sephacryl S-300凝胶过滤后, MBL与MASP酶原被完全分离。

MBL的纯化取决于其对糖类的 Ca^{2+} 依赖性亲和力。提取MBL一般是采用甘露聚糖偶联的琼脂糖凝胶进行亲和层析, 但该方法对抗糖类抗体(主要为抗甘露糖抗体)污染十分敏感, 因为人体内结合甘露糖的蛋白除了结合活性依赖 Ca^{2+} 的MBL外, 还有不依赖 Ca^{2+} 的能与甘露糖特异性结合的IgA、IgM和IgG类抗体[13][14]。本实验利用非活化Sephacryl 4B能直接结合MBL的特点建立一种连续糖洗脱方法, 通过两步层析提取了很纯的MBL及酶原形式的MASP, 从1升血浆中获得约812 μg MBL-MASP复合物, 再经凝胶过滤分离, 得到约563 μg 纯的MBL、226 μg MASP1和MASP2酶原, 既解决了配体亲和纯化MBL被抗糖类抗体污染的问题, 又降低了分离纯化MBL的成本。

参考文献:

- [1] 陈政良. 补体激活第三途径-凝集素途径[J]. 国外医学·分子生物学分册 (Foreign Med Sci·Mol Biol Section), 1999, 21(5): 295-9.
- [2] Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response[J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(1): 74-8.
- [3] Kuipers S, Aerts PC, Anders G, et al. A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin levels in human serum [J]. J Immunol Methods, 2002, 268(2): 149-57.
- [4] Thiel S, Moller-Kristensen M, Jensen L, et al. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation[J]. Immunobiology, 2002, 205(4-5): 446-54.
- [5] 郭尧君. 蛋白质电泳技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 132-4.
- [6] Kuipers S, Aerts PC, Harmsen M. et al. The ancient complement system. IV. A novel strategy to quantify mannose-binding lectin (MBL) levels in serum and other body fluids. Abstract at the Vth International Workshop on C1, the first component of

complement, and collectins, Seeheim, 2001. 26-28.

[7] Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, et al. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease[J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2637-42.

[8] 陈政良. 哺乳类C型凝集素超级家族[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24(6): 491-4.

Chen ZL. Mammalian C-type lectin superfamily[J]. *Prog Biochem Biophys*, 1997, 24(6): 491-4.

[9] Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system[J]. *Immunol Today*, 1996, 17(11): 532-40.

[10] van de Wetering JK, van Golde LM, Batenburg JJ. Collectins: players of the innate immune system[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(7): 1229-49.

[11] Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response[J]. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(1): 74-8.

[12] Yokota Y, Arai T, Kawasaki T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins[J]. *J Biochem (Tokyo)*, 1995, 117(2): 414-9.

[13] Jones JM. Quantitation of antibody against cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of *Candida* in rabbits, mice, and humans[J]. *Infect Immun*, 1980, 30(1): 78-89.

[14] Lindberg E, Magnusson KE, Tysk C, et al. Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 1992, 33(7): 909-13.

参考文献:

[1] 陈政良. 补体激活第三途径-凝集素途径[J]. *国外医学·分子生物学分册 (Foreign Med Sci·Mol Biol Section)*, 1999, 21(5): 295-9.

[2] Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response[J]. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(1): 74-8.

[3] Kuipers S, Aerts PC, Anders G, et al. A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin levels in human serum [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 268(2): 149-57.

[4] Thiel S, Moller-Kristensen M, Jensen L, et al. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation[J]. *Immunobiology*, 2002, 205(4-5): 446-54.

[5] 郭尧君. 蛋白质电泳技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 132-4.

[6] Kuipers S, Aerts PC, Harmsen M. et al. The ancient complement system. IV. A novel strategy to quantify mannose-binding lectin (MBL) levels in serum and other body fluids. Abstract at the Vth International Workshop on C1, the first component of complement, and collectins, Seeheim, 2001. 26-28.

[7] Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, et al. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease[J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2637-42.

[8] 陈政良. 哺乳类C型凝集素超级家族[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24(6): 491-4.

Chen ZL. Mammalian C-type lectin superfamily[J]. *Prog Biochem Biophys*, 1997, 24(6): 491-4.

[9] Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system[J]. *Immunol Today*, 1996, 17(11): 532-40.

- [10] van de Wetering JK, van Golde LM, Batenburg JJ. Collectins: players of the innate immune system[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(7): 1229-49.
- [11] Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response[J]. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(1): 74-8.
- [12] Yokota Y, Arai T, Kawasaki T. Oligomeric structures required for complement activation of serum mannan-binding proteins[J]. *J Biochem (Tokyo)*, 1995, 117(2): 414-9.
- [13] Jones JM. Quantitation of antibody against cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of *Candida* in rabbits, mice, and humans[J]. *Infect Immun*, 1980, 30(1): 78-89.
- [14] Lindberg E, Magnusson KE, Tysk C, et al. Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 1992, 33(7): 909-13.
-

[回结果列表](#)