

## 依赖雄激素的大鼠储精囊 分泌蛋白的离子交换层析纯化

王震熙 张 胜 陈枢青 林国庆

(浙江医科大学生物化学教研室, 杭州)

**摘要** 本文报道利用阳离子交换层析, 纯化了雄激素依赖的大鼠储精囊分泌蛋白(SVP II、SVP IV、SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub>及 SVP VI)。主要纯化步骤包括下列二步: 1. Sephadex G-100 凝胶过滤; 2. 上样后, 联合使用盐梯度和 pH 梯度, 洗脱快速蛋白液相层析(FPLC)系统的阳离子交换柱 Mono S。洗脱峰的纯度以变性条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和等电聚焦(IEF)鉴定, 借此, 还测定了已纯化的大鼠储精囊分泌蛋白的分子量和等电点。

**关键词:** 大鼠 储精囊 分泌蛋白 纯化 离子交换层析

储精囊是雄激素作用的靶器官, 是研究甾体类激素作用的分子机理及与基因表达调控之间关系的理想模式<sup>[1,2]</sup>。大鼠储精囊分泌蛋白的含量很高, 达 200—300mg/ml, 离子强度却非常低(33mmol/cm, 仅为血清的四分之一), 其中某些组分, 即便在分离凝固腺后收集仍极易发生凝固和沉淀<sup>[3]</sup>, 这给分离纯化带来很大的困难。1979年 Ostrowski 等<sup>[4]</sup>经变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定, 它由五个主要成分组成, 按其电泳迁移率顺序, 命名为 SVPI—V。迄今, 除 SVP IV 外, 其余几种分泌蛋白按常规方法很难被有效地分离。我们首次用快速蛋白液相层析(FPLC)仪, 经阳离子交换柱(Mono S)层析, 成功地纯化了 SVP II、SVP IV、SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub> 及以前尚未报道过的 SVP VI。本文报道这一简便而高效的纯化方法, 从而为储精囊分泌蛋白的生理功能及雄激素作用机理的研究提供了有效的实验材料。

### 材 料 与 方 法

#### 一、材料

1. 仪器: 快速蛋白液相层析仪、阳离子交换柱(Mono S, 50×5mmID)及电泳系统的 Flat Bed Apparatus 3000、Capillary Casting mould、ECPS 3000/150、VH-I 均系 Pharmacia 产品; 真空冰冻干燥机为美国 Labconco 公司的产品; 751 分光光度计为上海分析三厂产品。

2. 试剂: Sephadex G-100、pI marker Kit、Pharmalyte(3—10) 均为 Pharmacia 公司

产品, Acrylamide 为 fluka 公司产品; Bis、SDS 及 MW marker 系 Sigma 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

3. 动物: Wistar 大白鼠纯种, 由本校动物科提供。

## 二、方法

1. 储精囊分泌蛋白的纯化: 按王震熙等<sup>[5]</sup>法抽取储精囊液, 抽提液为 HAc-NaAc 缓冲液 (0.05mol/L HAc-NaAc, 0.15mol/L NaCl, 0.005mol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH4.4, 8°C)。抽取储精囊液后, 4000g 离心 10 分钟 (4°C); 取上清液上样于预先用 0.05mol/L HAc-NaAc, 0.075mol/L NaCl pH5.4 平衡的 Sephadex G-100 层析柱 (2.6×100cm), 用同样的缓冲液洗脱, 流速 12ml/h, 每管收集 4.5ml, 紫外光吸收检测各蛋白洗脱峰。各峰用 SDS-PAGE 确定其蛋白组分。洗脱峰 I (见 Fig. 1) 经  $\phi 0.45\mu$  滤膜过滤后, 上样于 FPLC 系统的 Mono S 柱上, 用 0.05mol/L 磷酸缓冲液线性梯度洗脱 (起始缓冲液 pH8.1, 极限缓冲液 0.5mol/L NaCl, pH11.0), 其洗脱峰 (见 Fig. 2) 对 0.005mol/L NH<sub>4</sub>Ac 透析, 冰冻干燥, 经 SDS-PAGE 及等电聚焦 (IEF) 鉴定其纯度, 即为 SVP II; Sephadex G-100 凝胶过滤后的洗脱峰 III、IV, 滤膜过滤后, 上样于 Mono S 柱, 用 0.05mol/L HAc-NaAc 缓冲液线性梯度洗脱 (起始缓冲液 pH 5.4, 极限缓冲液 0.5mol/L NaCl, pH6.0)。洗脱峰 a、b、c (见 Fig. 3、Fig. 4) 经透析、冰冻干燥及 SDS-PAGE 鉴定, 得 SVPIV、SVPV<sub>a</sub>、SVPV<sub>b</sub> 和 SVPVI 四种成分。

2. 大鼠 SVP 干粉制备: 按 Ostrowski 法<sup>[4]</sup>。

3. 样品蛋白检出及各组分蛋白纯度和其分子量测定: 用稍加改良的 Leammli<sup>[6]</sup>法进行电泳。

4. 等电聚焦电泳: 聚丙烯酰胺浓度采用 T<sub>5</sub>C<sub>3</sub> 系统<sup>[7]</sup>, 在 Capillary casting mould 中制胶, 置 Flat Bed Apparatus 3000 中电泳, 阳极溶液为 0.04mol/L 天冬氨酸, 阴极溶液为 1mol/L NaOH。预聚焦 500Vh (用 VH-I 控制), 通过 Sample applicator 加样, 聚焦 3000Vh, 经 10% 三氯醋酸、5% 磺酰水杨酸固定, 以 0.2% 考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 染色和 10% 醋酸、35% 乙醇脱色。利用切胶洗脱和标准 pI marker 决定凝胶的 pH 梯度和待测样品的 pI。

## 结 果

一、储精囊分泌蛋白经 Sephadex G-100 柱层析分离的洗脱曲线见 Fig. 1。电泳分析表明 (Fig. 5): 第 I 峰含 SVP I、SVP II、SVP III; 第 III 峰含 SVPIV、SVPV<sub>a</sub>、SVPV<sub>b</sub>; 第 IV 峰主要为 SVPVI; 第 II 峰为一些其它微量的分泌蛋白。

二、将经 Sephadex G-100 凝胶过滤分离的第 I 峰样品再过阳离子交换柱 Mono S 层析, 即获得了一个主峰见 Fig. 2, 经 SDS-PAGE 电泳 (Fig. 5) 及等电聚焦 (结果未列) 证实, 此峰即为纯化的 SVP II。

三、经 Sephadex G-100 分离后的第 III 峰样品, 再过 Mono S 柱层析, 得到三个峰见 Fig. 3。SDS-PAGE (Fig. 6) 鉴定, 分别为纯化的 SVPV<sub>a</sub>、SVPIV 和 SVPV<sub>b</sub>。

四、取 Sephadex G-100 分离的第 IV 峰样品, 过 Mono S 柱层析, 则获得三个峰见 Fig. 4。SDS-PAGE 证实其 a 峰为 SVPVI。

五、储精囊分泌液干粉及各样品纯度鉴定的 SDS-PAGE 图谱见 Fig. 5、Fig. 6。从图中

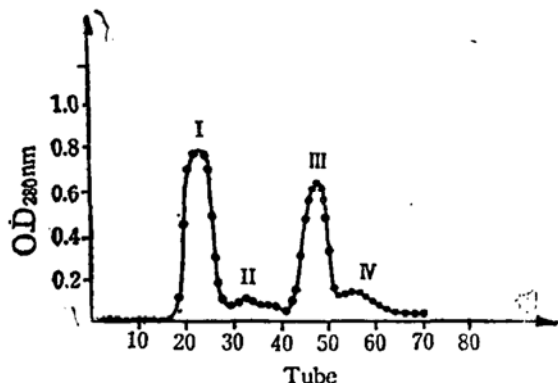


Fig. 1 Rat seminal vesical secretion proteins fraction profile on Sephadex G-100 chromatography. column,  $2.6 \times 100$  cm, flow rate, 12 mL/h, eluting solution, 0.05 mol/L NaAc-HAc 0.075 mol/L NaCl pH 5.4

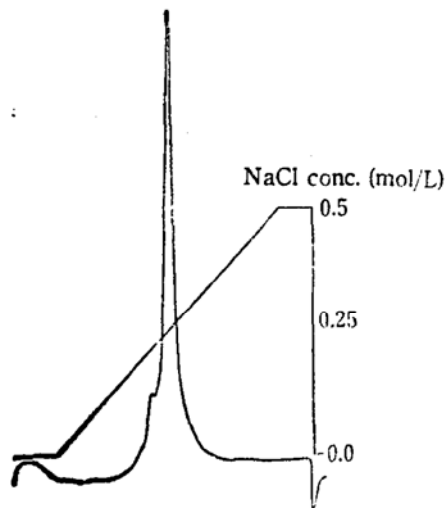


Fig. 2 Cation-exchange separation on Mono S HR5/5. chromatographic conditions, column Mono S prepacked HR5/5, buffer A 0.05 mol/L PB pH 8.1, buffer B 0.05 mol/L PB pH 11.0 plus 0.5 M NaCl, gradient 0-100% B in 18 ml, flow rate 1.0 ml/min, paper speed 0.5 cm/min, sample 2.0 ml of peak I fraction from Sephadex G-100 chromatography step, detection 280 nm, 0.2 AUFS.

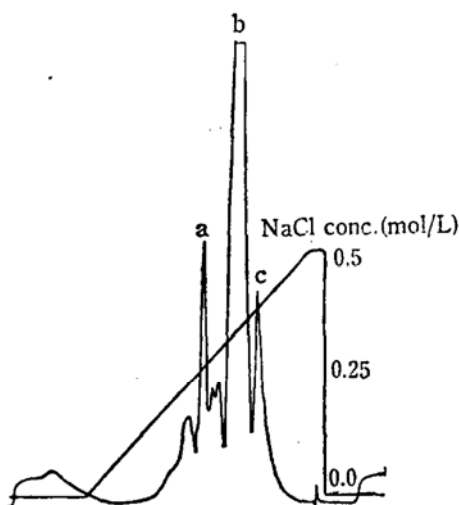


Fig. 3 Cation-exchange separation on Mono S HR5/5. peak No. correspond to the following proteins, a = SVP Va, b = SVP IV, c = SVP Vb. conditions, buffer A 0.05 mol/L NaAc-HAc pH 5.4, buffer B 0.05 mol/L NaAc-HAc pH 6.0 plus 0.5 mol/L NaCl, gradient 0-100% B in 27 ml, flow rate 1.5 ml/min, paper speed 0.5 cm/min, sample 4.0 ml of peak I fraction from Sephadex G-100 chromatography step, detection 280 nm, 0.2 AUFS.

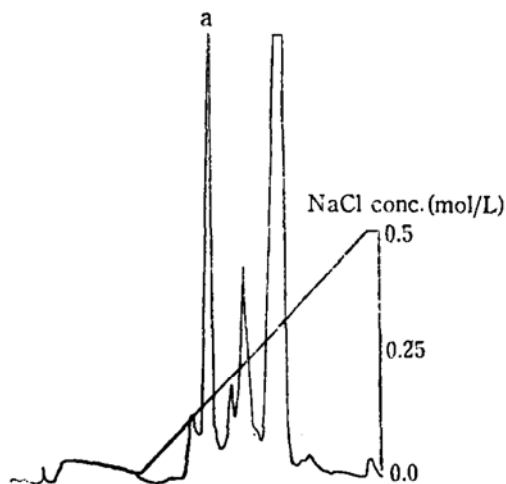


Fig. 4 Cation-exchange separation on Mono S HR5/5. conditions, buffer A 0.05 mol/L NaAc-HAc pH 5.4, buffer B 0.05 M NaAc-HAc pH 6.5 plus 0.5 mol/L NaCl, gradient 0-100% B in 27 ml, flow rate 1.5 ml/min, paper speed 0.5 cm/min, sample 5.0 ml of peak IV fraction from Sephadex G-100 chromatography step, detection 280 nm, 0.2 AUFS.

可见，储精囊分泌蛋白的6条主要区带，并可见经过 Mono S 柱分离的上述五个组分 SVP II、SVP IV、SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub>、SVP VI，在此条件下分别呈一条区带。又利用 SDS-PAGE 法，测得已纯化的储精囊分泌蛋白的分子量为：SVP II 47,000 (Rf = 0.26)、SVP IV 15,000 (Rf 0.77)、SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub> 13,000 (Rf 0.85)、SVP VI 11,500 (Rf 0.90) (见 Fig. 7)。

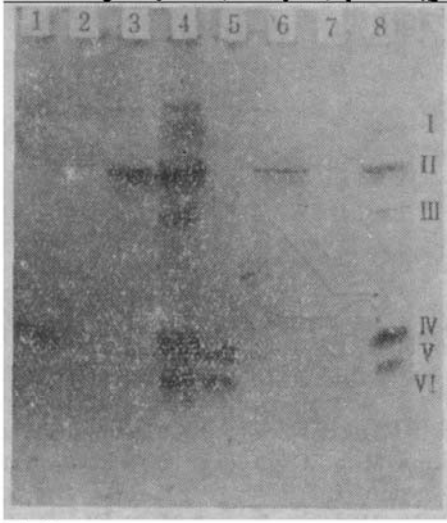


Fig. 5 Pattern of SVP on slab SDS-PAGE. major stained bands were labeled I to VI. lane No. correspond to the following samples, 1 = purified SVP IV, 2 = peak I from Sephadex G-100 chromatography, 3 = peak I from Sephadex G-100 chromatography, 4 and 8 = SVP powder, 5 = peak I from Sephadex G-100 chromatography, 6 = purified SVP I, 7 = peak IV from Sephadex G-100 chromatography.

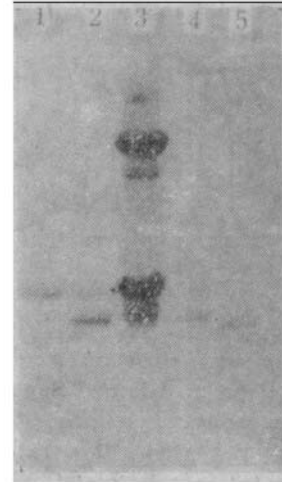


Fig. 6 Electrophoresis profile of purified SVP. lane 1 represents SVP IV from peak b in Fig. 3, lane 2, SVP Va from peak a in Fig. 3, lane 3, SVP powder, lane 4, SVP Vb from peak c in Fig. 3, lane 5, SVP VI from peak a in Fig. 4.

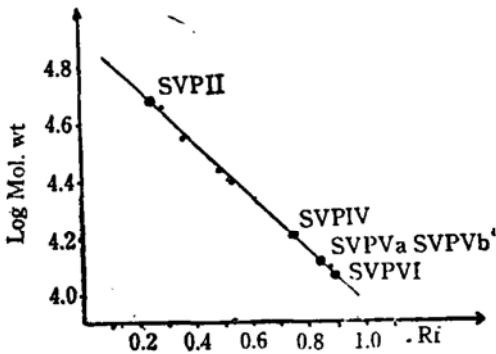


Fig. 7 Determination of the molecular weight of the purified SVP by SDS-PAGE. The marker proteins used were ovalbumin (45,000), pepsin (35,000), carbonic anhydrase (29,000), chymotrypsinogen (25,000), and cytochrome c (12,500). The molecular weight of tested samples was extrapolated from the plot of Log MW of marker proteins against their electrophoretic mobilities.

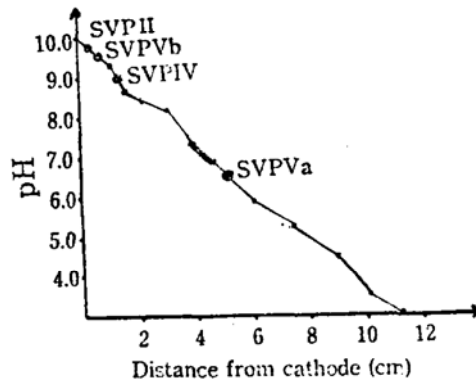


Fig. 8 Measurement of pH gradient profile using the broad pI calibration kit (pI 3.50 to 9.30) which consists of trypsinogen (9.30), lentil lectin (8.65), lentil lectin (8.45), lentil lectin (8.15), horse myoglobin (7.35), horse myoglobin (6.85), human carbonic anhydrase B (6.55), bovine carbonic anhydrase B (5.85),  $\beta$ -lactoglobulin A (5.2), soybean trypsin inhibitor (4.55), amyloglucosidase (3.5). condition, T,C, polyacrylamide gel containing Pharmalyte 3-10.

六、经  $T_5C_3$  系统的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦分析 (电泳图谱未列示), 以等电点范围 3.5~9.3 的 pI 标准品校正药盒作标记, 从其离阴极距离与 pH 值的关系, 确立了凝胶中的 pH 梯度曲线 (Fig. 8), 从而测得纯化的样品等电点: SVP II 9.7 (离阴极距离 0.3cm)、SVP IV 8.9 (1.3cm)、SVP V<sub>a</sub> 9.5 (0.7cm)、SVP V<sub>b</sub> 6.55 (5.3cm)。

## 讨 论

一、含有 5 种主要蛋白成分的大鼠储精囊分泌液的电泳图谱是在碱性及低浓度尿素存在下的 SDS-PAGE 中获得的, 这已得到公认<sup>[4,8]</sup>。我们在 3mol/L 尿素、0.1% SDS、15% 丙烯酰胺的条件下电泳, 也得到了类似的结果; 同时, 我们还发现并分析了以往尚未报道的第 6 条蛋白区带: 其在碱性条件下电泳, 泳动速度较其它快, 我们称之为 SVP VI。此带虽然含量较另外 5 种成分低, 但也是雄激素依赖的, 这可以从我们已往工作比较阉割前后大鼠储精囊 mRNA 的翻译产物的电泳扫描图<sup>[9]</sup>得到证实。因此, 我们认为 SVP VI 也可作为雄激素作用的标志蛋白来研究甾体类激素与基因调控之间的关系, 对 SVP VI 的纯化及其研究有待进一步深入。本实验使用 NaAc-HAc 缓冲液取代 Tris 缓冲液<sup>[5]</sup>抽取储精囊分泌液, SVP I 和 SVP III 极大部分被沉淀, SVP II 沉淀则明显比用 Tris 缓冲液抽取少, SVP IV、SVP V、SVP VI 则几乎不受影响。在此条件下, 对分离 SVP II 较佳。目前仍尚无一个方法能使这几种分泌蛋白同时抽取而不发生沉淀。

二、除 SVP IV 外, 用常规纯化方法很难分离其它几种分泌蛋白。最近 Stephen 等<sup>[10]</sup>利用 SVP 液在 SDS-PAGE 电泳后的电洗脱 (Electroelution) 法, 分离了所有 5 种主要成分, 但由于在变性条件下分离, 影响了对其生理功能的研究。我们采用凝胶过滤层析结合阳离子交换柱 (Mono S) 层析, 成功地纯化了 SVP II、SVP IV、SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub> 和 SVP VI。Mono S 是一种强阳离子交换剂, 本身无缓冲能力, 因此, 联合使用盐梯度和 pH 梯度获得了较佳的分离效果。收集经 Mono S 柱脱洗的每一峰, 经 SDS-PAGE 分析证实, 得到的每一峰均为单一区带。意外的是, 我们在 Mono S 柱分离时发现, SVP V 是由 SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub> 二个成分组成: 当将 Sephadex G-100 分离后的第三峰样品过 Mono S 柱后, 便能得三个洗脱峰 (Fig. 3), 其中 a 峰和 c 峰的样品经 17cm 长的平板 SDS-PAGE, 两者与 SVP V 区带相一致 (Fig. 6), 合并 a、c 峰样品电泳仍表现为一条区带; 经等电聚焦分析发现, a 峰样品 (称之为 V<sub>a</sub>) 的 pI 为 6.55, 而 c 峰样品 (V<sub>b</sub>) 则是 9.5; 作者又将 SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub> 抗原及其相应抗血清互相进行免疫交叉分析<sup>[11]</sup>, 发现两者无免疫交叉反应。这些均表明尽管 SVP V<sub>a</sub>、SVP V<sub>b</sub> 分子量相等或极相近 (约 13,000), 但仍是二个独立成分, 这一结果与 Stephen<sup>[10]</sup> 利用加长 (32cm) 的 SDS-PAGE 电泳发现 SVP V 由二个组分 (F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>) 组成完全一致。

三、储精囊分泌蛋白以碱性蛋白为主, 约占蛋白总量的 80~90%<sup>[12]</sup>。本实验以纯化的分泌蛋白经等电聚焦测定, 揭示占整个 SVP 主要成分的 SVP II、SVP IV、SVP V<sub>b</sub> 的 pI 分别为 9.7、8.9、9.5, 也证明了 SVP 的碱性特征。迄今, 除了利用 SVP 受雄激素调控这一特性在甾体类激素作用机理的研究中充当标记蛋白外, 对 SVP 的其它生理功能尚不明确。有实验表明<sup>[5,13]</sup> 储精囊分泌液与精子受精有关, 其中 SVP 在受精过程中可能有着特殊的作用: ① SVP 的某(些)组分作为精子外套抗原 (Sperm Coating Antigen) 的来源<sup>[11,14]</sup>, 直接影响精子本身的生理生化活性; ②、在啮齿类动物, SVP 是排精后阴道栓形成的主要底物<sup>[10]</sup>,

这种栓子既可防止一部分精子倒流,又可通过阴道粘膜缓慢地释放栓内物质,有利于受精;  
③、分泌蛋白中的碱性蛋白可能与雌性生殖道内一些酸性的血清蛋白形成复合物,从而改变雌性生殖道内的微环境,利于精子的活动<sup>[9]</sup>。

无疑,储精囊分泌蛋白的纯化,将是进一步揭示其生理功能、阐明其对生殖过程的影响的开端。由于SVP I和SVP III在原位抽提时,即几乎完全被沉淀,因此,目前尚无法纯化之。对此还有待于进一步深入研究和摸索。

### 参 考 文 献

- [1] Williams-Ashaman, H.G., *Current Topics in Cellular Regulation*, (1983), 22, 202.
- [2] Veneziale, C.M., *Adv. Sex. Horm. Res.*, (1977), 3, 1.
- [3] Geiger, B., et al., *Immunology*, (1974), 27, 729.
- [4] Ostrowski, M., et al., *J. Biol. Chem.*, (1979), 254, 383.
- [5] 王震熙, 《浙江医科大学学报》, (1985), 1, 11.
- [6] Laemmli, L.K., *Nature*, (1970), 227, 680.
- [7] Pharmacia, 《Isoelectric Focusing, principles & methods pharmacia uppsala》, (1982), 45.
- [8] Higgins, S.J., et al., *Mol. Cell. Endocrinol.*, (1981), 21, 255.
- [9] 王震熙等, 《生物化学杂志》, (1986), 2(6), 11.
- [10] Stephen, E. et al., *Mol. Cell. Endocrinol.*, (1986), 45, 205.
- [11] 张胜, 王震熙, 《生殖与避孕》, (1989), 待发表.
- [12] Lavon, U. et al., *J. Reprod. Fert.* (1971), 27, 227.
- [13] Clavert, O. et al., *Prog. Reprod. Biol. Med.*, (1985), 12, 80.
- [14] Dravland, E. et al., *Biology of Reprod.*, (1981), 25, 649.

## Androgen-regulated Proteins of Rat Seminal Vesical Secretion Isolation by High-performance Ion-exchange Chromatography

Wang, Zhen-xi Zhang, Sheng Chen, Su-qing Lin, Guo-qing  
(Dept. of Biochemistry, Zhejiang Medical University, Hangzhou)

**Abstract** The major androgen-regulated secretory proteins of rat seminal vesicles (SVP II, SVP IV, SVP V<sub>a</sub>, SVP<sub>b</sub>, SVP VI) have been purified by high-performance cation-exchange chromatography. The purification procedure involved two steps, 1. gel chromatography on Sephadex G-100 and 2. cation exchange on Mono S column in FPLC system by using combined salt and pH gradients. The purity of selected peaks was evaluated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. The molecular weight and pI of purified SVP were determined by using SDS-PAGE and IEF.

**Key words:** Rat Seminal Vesicle Secretion protein Isolation Ion-exchange chromatography