

白鲫鱼 C-反应蛋白提取条件的优化

毛月霞, 余 群*, 赵冠军

(厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 探讨了白鲫(*Carassius auratus cuvieri*) C 反应蛋白(CRP)亲和层析法提取过程中, 不同的硫酸铵饱和浓度、缓冲液 pH 值、缓冲液离子强度和配基浓度下对白鲫 CRP 的提取效率的影响。结果发现, 在硫酸铵饱和浓度 80%, 缓冲液 pH 值 8.5, 缓冲液离子强度为 0.05 mol/L Tris 以及配基浓度为 8 μ mol/mL 介质的条件下, 白鲫 CRP 的提取效率最高。

关键词: 白鲫; CRP; 提取条件; 优化

中图分类号: X 503

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)S1-0127-04

CRP(C-reactive protein)是一种生物自古保存来的分子, 在许多物种上都有, 属于一群独特的血清蛋白家族, 为 pentraxin 蛋白家族的一员, 发现于 1930 年, 有 5 个环状 pentameric 结构与放射对称状的特征, 由 5 个 24-ku 原聚体(含 206 氨基酸)以非共价连接在一起^[1]。它会结合许多受伤的组织, 发挥初步的保护功能。它是由肝脏分泌, 在健康人身上存在量非常少, 血清中的平均浓度大约 1 μ g/mL, 而鱼体内 CRP 含量比人体要高得多, 平均约 200 μ g/mL^[2]。

近年来, 水体环境的污染问题受到越来越多的关注。来源于水产业或工业排放中的有机化合物, 如农药和金属离子等富集于鱼体内, 从而引起各种生理紊乱, 但是它们对鱼类生理状况的影响人类还知之甚少, 水体污染对鱼类生理作用的影响已有越来越多的人进行研究, CRP 就是其中的一个研究重点。CRP 水平会因污染而发生变化, 将露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)^[3] 暴露于镉中, 其体内 CRP 含量水平增加了 2~3 倍, 还有欧鳊(*Pleuroctes platessa*), 淡水鳢(*Channa punctatus*)^[4-5] 和 虹 鳟 鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6-8] 等, 它们的 CRP 水平在急性期均发现有可测量的变化。在化学物质暴露期间, 特种蛋白合成含量上的变化已经成为对某生物体在日趋恶化的水体环境中发生的生化反应进行监测的十分有用的方法, 尤其在渔业中, 由于低等脊椎动物中有少量或几乎没有免疫球蛋白^[9], 抵抗病原菌是主要依靠先天免疫系统, 所以与高等脊椎动物相比, 它们体内的 CRP 在免疫反应前期具有更为重要的作用^[10]。鉴于这些

原因, 对水环境中污染物所引起的鱼体内 CRP 变化情况的探索, 建立污染前后鱼体内 CRP 水平之间的关系, 进一步了解水体污染对鱼类生理方面的影响有着重要的意义, 它将为水体环境的监测提供有用的生物标志物。

白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)是一种常见的经济淡水鱼类, 易于养殖, 因此常常被作为生态毒理学研究的实验材料。本实验以白鲫为实验材料, 探讨了亲和层析法提取白鲫体内 CRP 过程中硫酸铵浓度、缓冲液的 pH 值、离子强度、配基浓度对提取效率的影响以期为进一步研究白鲫 CRP 的性质以及免疫功能在毒理学上的应用提供前期条件。

1 实验材料

1.1 仪器与试剂

实验仪器采用 Pharmacia Ultrospec 2100 型紫外可见分光光度计, Beckman J2-MC 型高速冷冻离心机, 溴化氰活化的 Sepharose 4B 系瑞典 Pharmacia 公司产品, 磷酸胆碱(phosphocholine)系 Sigma 公司产品, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物

白鲫购于厦大西村菜市场, 选择体质量在 300~350 g 的健康成鱼, 暂养于淡水中, 以气泵连续充气, 定期换水, 隔天饲喂饲料, 采样前一天停止饲喂。

2 实验方法

2.1 取样与样品预处理

于每条鱼尾部静脉分别取 1.5 mL 血混在一起, 离心, 取血清, 平均分为 4 组, 每组 3 个平行样, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 福建省自然科学基金(D0310003)资助

* 通讯作者: yuq@xmu.edu.cn

2.2 凝胶的预处理

将 Sepharose 4B 溶解后与一定量的配基磷酸胆碱(PC)偶联, 储存备用.

2.3 CRP 的提取

采用亲和层析法分离白鲫 CRP, 方法参考 Indrani Paul 等^[2]的方法. 步骤如下: 在分离的血清中加入饱和硫酸铵进行沉淀, 以高速冷冻离心机在 9 000 g、4℃条件下离心 40 min, 沉淀物以缓冲液 A (0.05 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl 和 0.02% NaN₃, pH 8.0)溶解, 然后在 4℃下用缓冲液 B (0.05 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, 0.02% NaN₃ 和 0.01 mol/L CaCl₂, pH 8.0)透析过夜. 将透析后的蛋白质溶液应用于制好的并已用缓冲液 B 平衡过的亲和层析柱中, 用缓冲液 B (至少 10 倍柱床体积)在 4℃下洗掉柱上的非特异性蛋白. 结合后的蛋白用含有 25 mmol/L PC 的缓冲液 A 进行洗脱 (30℃), 并在 280 nm 的条件下测定洗脱蛋白的吸光值, 收集峰值部分的蛋白于缓冲液 A 中透析. 浓缩后的蛋白溶液 (约 3 mL)均用缓冲液定容为 5 mL, 于 405 nm 波长下测量吸光值, 求得其 CRP 蛋白含量. 在实验中, 根据提取实验需要, 改变配基浓度、硫酸铵饱和度、缓冲液的 pH 值和离子强度.

2.4 蛋白质含量的测定

以牛血清白蛋白 (1.2 mg/mL) 作为标准, 采用紫外吸收分光光度法于 280 nm 处测定蛋白质吸收值.

2.5 提取条件的探索

(1) 配基浓度的选择

在凝胶挂配基时, 分别将配基浓度设为 2, 5, 8 和 10 μmol PC/mL 介质来进行配基与凝胶的偶联, 将偶联好的凝胶装柱, 用于提取 CRP, 根据 CRP 的提取量选择配基浓度.

(2) 硫酸铵饱和度的选择

在配基浓度实验的基础上, 选定最佳的配基浓度, 硫酸铵分别设 60%, 70%, 80%, 90% 饱和度沉淀蛋白质, 然后提取 CRP, 最后测定蛋白质含量, 选定最适硫酸铵饱和度.

(3) 缓冲液 pH 值的选择

在上述实验的基础上, 将硫酸铵饱和度、配基浓度固定, 设实验中缓冲液 A、B 的 pH 值均分别为 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 提取白鲫 CRP, 测蛋白质含量, 找出最适缓冲液 pH 值.

(4) 缓冲液离子强度的选择

在配基浓度、硫酸铵饱和度、缓冲液 pH 值均固定的条件下, 缓冲液的 Tris 离子强度分别为 0.01,

0.03, 0.05, 0.07 mol/L 的条件下提取 CRP, 测蛋白质含量, 找出最佳缓冲液离子强度.

3 结果与讨论

3.1 最佳配基浓度

具体结果如图 1, 从图上可以明显地看出, 当配基浓度为 8 μmol PC/mL 介质时, 提取的 CRP 量最多, 白鲫血清中 CRP 浓度大约 250 mg/mL; 亲和层析法提取蛋白质时由于配基与目的蛋白的专一性结合, 提取效率高, 因此提取的 CRP 量越多, 说明配基的浓度越合适, 即 8 μmol PC/mL 介质为最适配基浓度.

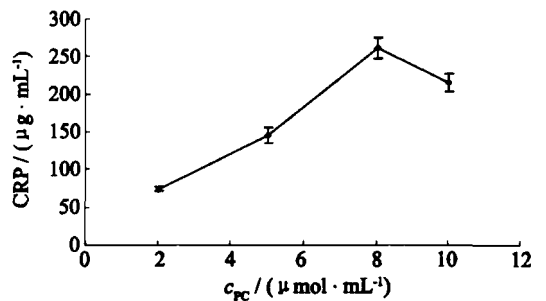


图 1 不同配基浓度对蛋白质提取量的影响

Fig. 1 Effect of different genin density on CRP quantity

3.2 最适硫酸铵饱和度

从图 2 可以看出, 单位血清中 CRP 的量随着硫酸铵饱和度的增加而增加, 在饱和度为 80% 时变化不大, 也就是说当硫酸铵饱和度为 80% 时, CRP 的提取效率是最高的, 所以选择 80% 硫酸铵饱和度作为最适饱和度.

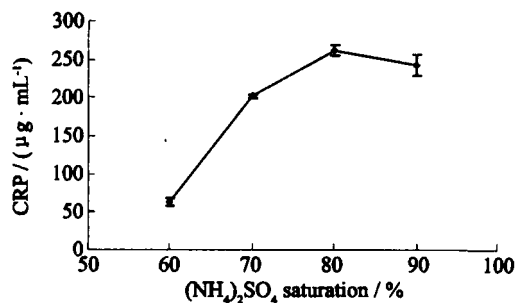


图 2 不同的硫酸铵饱和度下 CRP 提取情况

Fig. 2 Effect of different ammonium sulfate degree of saturation on CRP quantity

3.3 最适缓冲液 pH 值

一般而言, 多数种类的蛋白质均可溶于稀碱溶液, 所以我们选择偏碱的提取环境. 从图 3 可以明显地看出 pH 8.5 时, CRP 的提取量最多, 高于这个值时提取率下降, 表明当缓冲液 pH 值过高时, 可能会导

表 1 几种不同的鱼 CRP 提取条件比较

Tab. 1 Comparison of CRP separation condition from different fish

种类	缓冲液 pH 值	缓冲液离子强度	硫酸铵饱和度/ %
白鲫 <i>Carassius auratus cuvieri</i>	8.5	0.05	80
虹鳟 ^[1] <i>Oncorhynchus mykiss</i>	8.0	0.02	
露斯塔野鲮 ^[2] <i>Labeo rohita</i>	7.8	0.05	70
卡特拉鲮 ^[2] <i>Catla catla</i>	8.0	0.05	80

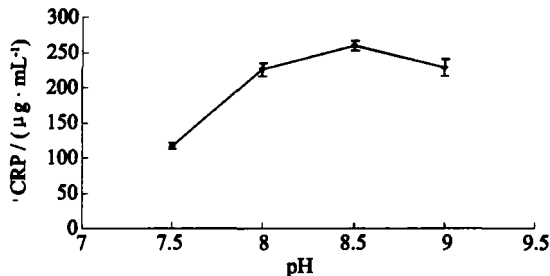


图 3 缓冲液 pH 值对 CRP 提取量的影响

Fig. 3 Effect of different buffer pH on CRP quantity

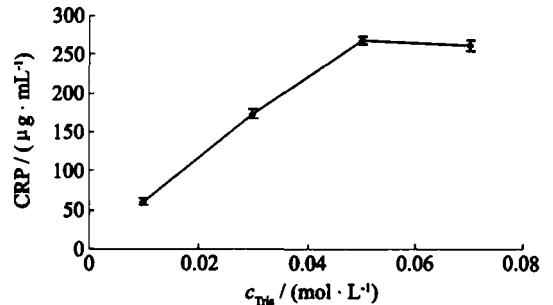


图 4 Tris 浓度与 CRP 提取量的关系

Fig. 4 Effect of different buffer ion intensity on CRP quantity

致蛋白质的变性, 不利于蛋白质的提取, 因此最适 pH 值为 8.5.

3.4 最适缓冲液离子强度

提取体系中采用无机盐, 目的在于增强提取体系的离子强度. 因为被提取的蛋白质均为有较大极性的物质, 离子强度越大, 越容易被提取出来. 但蛋白质又是一种胶体分子, 离子强度过大, 会破坏蛋白质分子表面的水化层, 使蛋白质发生沉降, 从而影响提取效率. 缓冲液离子强度与 CRP 提取量的关系如图 4. 从图上可以看出, 当 Tris 浓度为 0.05 mol/L 时, CRP 的提取量最多, 随后即下降, 因此缓冲液的离子强度为 0.05 mol/L 时为最适离子强度.

4 结 论

本次实验是对 CRP 提取条件的探索, 是研究白鲫 CRP 的初步阶段, 从实验结果可知, 提取白鲫的 CRP 时, 凝胶上的配基浓度为 8 μmol PC/mL 介质, 80%硫酸铵饱和度以及缓冲液的 pH 值与 Tris 离子强度分别为 8.5 和 0.05 时, CRP 的提取效率最高, 在接下来的实验中可以以此为条件进行白鲫 CRP 的提取.

实验中, 将白鲫的 CRP 提取条件与其他几种鱼进行了比较, 如表 1. 从表上可以看出, 提取白鲫 CRP 的条件与其他鱼是有所差别的, 例如卡特拉鲮与虹鳟鱼的最适缓冲液 pH 是 8.0, 露斯塔野鲮的最适缓冲液 pH 是 7.8, 而白鲫的则是 8.5; 在缓冲液的离子强度上, 白鲫的是 0.05 mol/L Tris, 这与鲤鱼和露斯塔

野鲮的相同, 而虹鳟的是 0.02; 其原因尚不清楚, 可能与鱼的生活环境和鱼体内的不同的生理状况有关.

参考文献:

- [1] 武建国. 正确地解读 CRP[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(5): 321-323
- [2] Indrani P, Chhabinath M, Chitra M. Effect of environmental pollutants on the C-reactive protein of a freshwater major carp, *Catla catla*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1998, 11(5/6): 519-532.
- [3] Sinha S, Mandal C, Allen A K, et al. Acute phase response of C-reactive protein of *Labeo rohita* to aquatic pollutants is accompanied by the appearance of distinct molecular forms[J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 396: 139-150.
- [4] White A, Fletcher T C, Pepys M B, et al. The effect of inflammatory agents on CRP and SAP levels in plaice serum[J]. Comp Biochem Physiol, 1981, C69: 325-329.
- [5] Ghosh S, Bhattacharya S. Elevation of C-reactive protein in serum of *Channa punctatus* as an indicator of water pollution[J]. Indian J Exp Biol, 1992, 30: 736-737.
- [6] Nakanishi Y, Kodama H, Murai T, et al. Activation of rainbow trout complement by CRP[J]. Am J Vet Res, 1991, 52: 397-401.
- [7] Kodama H, Yamada F, Murai T, et al. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunisation with *Vibrio anguillarum*[J]. Dev Comp Immunol, 1989, 13: 123-132.

- [8] Winkelhake J L, Vodienik M J, Taylor J L. Induction in rainbow trout of an acute phase(C-reactive) protein by chemicals of environmental concern[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1983, C74: 55—58.
- [9] Robey F A, Tanaka T, Liu T Y. Isolation and characterization of two serum protein from the dogfish, *Mustelus canis*. C-reactive protein and Amyloid P component[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 3889—3894.
- [10] Karstena A H, Rice C D. C-reactive protein levels as a biomarker of inflammation and stress in the Atlantic sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*) from three southeastern USA estuaries[J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58: 747—751.
- [11] Hiroshi K, Yuji M, Yoshiaki T, et al. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16 : 589—597.
- [12] Sukanya S, Chhabinath M, Anthony K, et al. Acute phase response of C-reactive protein of *Labeo rohita* to aquatic pollutants is accompanied by the appearance of distinct molecular forms[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 392(2): 139—150.

Optimization for Separating Conditions of C-Reactive Protein(CRP) in *Carassius auratus cuvieri*

MAO Yue-xia, YU Qun^{*}, ZHAO Guan-jun

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science(Xiamen University),
Environmental Science Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: This study probes into the optimization for CRP separation condition. CRP was extracted by affinity chromatography from crucian(*Carassius auratus cuvieri*). The effects of ammonium sulfate degree of saturation, the buffer pH, ion intensity, the genin density on the yield of CRP were investigated. Results showed that the crudian CRP extraction efficiency was best when the condition was in 80% ammonium sulfate density, the buffer solution pH 8.5, 0.05mol/L Tris density in buffer solution as well as the 8^μmol/L genin in 1 mL medium.

Key words: Crucian(*Carassius auratus cuvieri*); CRP; extracting condition; optimization