

繁茂膜海绵中具有促进细胞粘附成团作用蛋白质的分离纯化研究

周建旭, 孙黎明, 金美芳, 张卫, 虞星炬

(中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 用凝胶层析和离子交换层析方法从黄海的繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perleve*) 中分离得到一种蛋白质 D1, 相对分子质量为 2.3ku, pI 为 6.6。纯化的蛋白质富含疏水性氨基酸和酸性氨基酸。研究表明蛋白质 D1 对繁茂膜海绵细胞培养表现出很强的使海绵细胞贴壁且快速粘附成团的作用。凝集实验表明该蛋白对人的 A、B、O、AB 血, 兔和鼠的红细胞没有凝集活性。

关键词: 繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perleve*); 蛋白质; 分离纯化; 粘附; 凝集

中图分类号: Q 816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096-(2004)05-0015-06

海绵是最低等的多细胞多孔海洋动物, 它是海洋天然产物的重要来源之一, 目前海绵天然产物的研究主要集中于有机相中的小分子化合物, 水相中的蛋白质、多糖、氨基酸和其它大分子物质则较少引起人们的注意^[1,2]。蛋白质是水相中的主要成分, 随着人们对其生物活性和生物功能的不断发现和认识, 海绵中蛋白质的研究也越来越深入。研究表明从海绵中分离纯化得到的蛋白质具有溶解红血球、抑制酶活性、凝集红细胞、促进有丝分裂、细胞毒活性和抗 HIV-1 等多种生物活性^[3-9], 一些凝集素具有识别海绵细胞的能力, 一些蛋白质有促使海绵细胞粘附的生物功能^[10,11]。

海绵细胞粘附成团技术是目前海绵细胞培养中的关键技术。已发现促使海绵细胞相互粘附的物质有三类: 聚集因子、凝集素和胶原蛋白, 且粘附因子具有种属特异性。海绵细胞在无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 海水 (下称 CMFSW) 中以单个离散的状态存在, 在含 Ca^{2+} 和 (或) Mg^{2+} 的海水中会聚集成团。相关研究表明, 海绵细胞表面的聚集因子 (aggregation factor, AF) 及其受体 (aggregation receptor, AR) 是介导这种粘附成团作用的主要因子^[12,13]。繁茂膜海绵 *Hymeniacidon perleve* (寻常海绵纲) 是在黄海中发现的一种潮间带海绵, 它的蛋白质研究目前还未见报道^[14,15]。本实验对繁茂膜海绵水相中蛋白质进行分离纯化, 并对纯化的蛋白质在参与繁茂膜海绵细胞粘附成团和其凝集活性方面进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

电泳仪 EC135-90 和垂直板电泳槽 Hoefer SE600 (Amersham Biosciences 公司); DYY-III 36 型等电聚焦电泳槽 (北京六一仪器厂); 低温冷冻离心机 Biofuge PrimoR (Heraeus 公司); 紫外可见分光光度计 UV/VIS V-530 (Jasco 公司); 精密 pH 计 PHB-1; Xds-113 倒置显微镜 (重庆光学仪器厂)。

SephadexG-100 (Pharmacia 产品); DEAE-纤维素 (DE52, Whatman 产品); Centriplus YM-10 超滤管 (截留相对分子质量 10ku, Millipore 产品); 透析袋 $d36\text{mm}$ (截留相对分子质量为 8~10ku); 低分子量标准蛋白 (上海); 两性电解质 (北京); 丙烯酰胺、双丙烯酰胺和牛血清白蛋白 (Sigma 产品); SDS、超纯尿素、TEMED (Amresco 产品)。

收稿日期: 2003-03-25; 修回日期: 2003-06-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 项目 (2001AA620404); 中国科学院“百人计划”资助项目; 中国科学院大连化学物理研究所“创新基金”资助项目
作者简介: 周建旭 (1976-), 陕西周至人, 硕士, 研究方向, 海洋天然产物分离纯化研究, E-mail: zhoujx@dicp.ac.cn; 张卫, 通讯联系人, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

1.2 蛋白质检测和总糖的检测

用 Bradford 法^[6]检测样品中蛋白质含量,以牛血清白蛋白为标准蛋白。用酚-硫酸法检测样品中糖浓度^[7],以葡萄糖为标准。

1.3 生物活性检测

1.3.1 供试材料

人的 A, B, AB 和 O 型血从大连医科大学附属第二医院获得;大耳白公兔和 SD 大鼠、BALB/C 小鼠从大连医科大学动物中心购买。

采用本实验室自行设计的方法分离得到单个离散的繁茂膜海绵的海绵细胞,用 CMFSW 稀释,使细胞浓度为 1×10^{10} cell/L。

1.3.2 促进细胞粘附成团活性检测

将 50 g/L 待测蛋白样品用人工海水(下称 ASW)分别倍比稀释为 40, 30, 20, 10 和 5 g/L 6 个浓度,依次加入到 24 孔板中,每孔 2 mL 稀释液。每个浓度同时做 3 组平行对照实验。实验中做两个对照:对照一检测 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的影响,该对照孔加入用 CMFSW 稀释的蛋白溶液 2 mL;对照二检测待测蛋白的影响,对照孔只加 2 mL 的 ASW 溶液。每孔加入 1 mL 离散的海绵细胞悬液后放入恒温振荡培养箱(16℃, 振荡, 暗培养),监测细胞成团情况。

1.3.3 蛋白抗体对海绵细胞成团作用的抑制活性检测

1.3.3.1 动物免疫和待测蛋白抗体的制备

给 8 只小鼠腹腔注射 50 g/L 待测蛋白溶液,每只鼠注射 2 mL,隔 1 周免疫 1 次,总共免疫 3 次,采血前 3 天加强免疫 1 次。眼球静脉采血后,经处理得到免疫血清。

1.3.3.2 抑制海绵细胞成团活性检测

在 24 孔板中用 ASW 将血清按 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 稀释成 7 个梯度。依次加入到 24 孔板中,空白对照孔只加 ASW 溶液。每孔加入 1 mL 离散的海绵细胞悬液,每个梯度做 3 组平行对照实验。将 24 孔板放入恒温振荡培养箱(16℃, 振荡, 暗培养),监测细胞成团情况。

1.3.4 凝集活性检测

将红细胞加入少量 Alsever 溶液中,用 0.9% 生理盐水洗涤,离心(4 000 r/min, 5 min)后弃上清,重复洗涤 3 次。用 0.9% 生理盐水将其配制成 4% 的细胞悬液^[21]。采用玻片凝集方法进行凝集活性初筛。在 3 块(A, B, C)洁净玻片上分别滴加 50 μL 红细

胞悬液,分别给红细胞悬液中加入 50 μL 的 0.9% 生理盐水(A, 空白对照)、三蒸水(B, 提取液对照)和待测蛋白溶液(C),混合均匀后静置 20 min,显微镜下观察凝集情况。

1.4 氨基酸分析

在 835-50 型氨基酸自动分析仪上进行氨基酸分析。

1.5 电泳

SDS-PAGE 电泳采用 15% 分离胶, 5% 浓缩胶。凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色,低分子量标准蛋白与样品在同一条件下电泳^[22]。等电聚焦采用含 8 mol/L 尿素的薄层胶(凝胶浓度 $T = 5\%$, 胶面积为 230 mm \times 115 mm \times 0.4 mm)。采用 pH 为 3.5~9.5 的两性电解质,聚焦完毕后,用 1% 的三氯乙酸固定过夜后进行考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后确定等电点^[17,18]。

1.6 蛋白质分离纯化

1.6.1 海绵样品采集

繁茂膜海绵样品于 2001 年 9 月 23 日在辽宁省大连市黑石礁的潮间带礁石上采集,采集后用海水清洗干净,放入 -70℃ 超低温冰柜中保存直到使用。

1.6.2 蛋白质粗分离

从冰柜中取出湿质量为 212g 的海绵样品,用去离子水搅拌提取(350 mL \times 3, 370 r/min, 室温),离心(4 000 r/min, 30 min, 0℃)后的上清液冷冻干燥备用。

粗提物溶解在水中后离心除去不溶物,冰水浴下向上清液中边搅拌边加入等体积乙醇使蛋白粗提物浓度为 50 g/L,悬浊液在 -20℃ 过夜,低温离心(3 000 r/min, 60 min, 0℃)后把所得沉淀保存,上清液真空减压浓缩备用。醇沉得到的蛋白粗提物继续溶解在 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,使其浓度为 50 g/L。冰水浴下缓慢向溶液中边搅拌边加入硫酸铵晶体,硫酸铵饱和度达到 30% 后,悬浊液继续搅拌 40 min,离心(3 000 r/min, 60 min, 0℃)后沉淀保存,上清液继续加硫酸铵至其饱和度为 50%,重复上述操作。将 50% 硫酸铵饱和度所得到的沉淀悬浮于 2 倍沉淀体积的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.5)中,离心除去不溶物,上清液保存备用。

1.6.3 Sephadex G-100 凝胶层析

用 YM10 超滤管对粗提液进行除盐,超滤管截留溶液收集浓缩。将 3 mL 浓缩样品加入到用 pH7.5、

25mmol/L 磷酸盐缓冲液预平衡过的 Sephadex G-100 凝胶柱 (1.7cm × 40cm), 用相同的缓冲液洗脱, 流速为 0.3mL/min。检测 A_{280nm} 值后收集不同组分, 浓缩透析备用。

1.6.4 DEAE-纤维素离子交换层析

将从凝胶层析获得的蛋白溶液加入用 pH 7.5、25mmol/L 磷酸盐缓冲液预平衡过的 DE52 柱 (1.7cm × 33cm) 中, 用阶跃梯度的离子强度洗脱, 洗脱液中 NaCl 浓度依次为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mol/L, 体积各为 50mL。流速为 1.5mL/min, 检测 A_{280nm} 和 A_{210nm} 后收集不同组分, 浓缩透析备用。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质的纯化

用50%乙醇沉淀除去水提液中的多糖和纤维质杂质, 醇沉后的上清液继续进行硫酸铵沉淀浓缩。研究表明 30% 的硫酸铵饱和度可以使溶液中大部分蛋白沉淀下来, 故先以 30% 的硫酸铵饱和度除去溶液中大量悬浮物, 再以 50% 的硫酸铵饱和度得到较纯的蛋白质沉淀。

上面得到的繁茂膜海绵蛋白质粗提物在 Sephadex G-100 层析柱中进行分离, 如图 1 所示, 得到两个独立的峰 S1 和 S2。S1 和 S2 收集后透析浓缩备用。

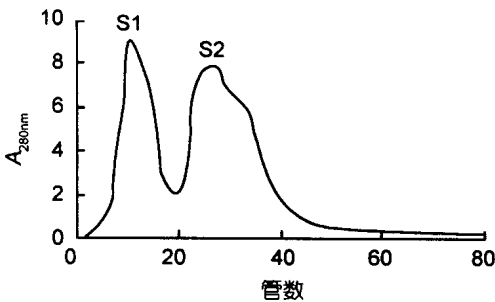


图1 Sephadex G-100 柱层析洗脱图

Fig.1 Elution curve of the gel chromatography

S2 进一步进行 DEAE-纤维素离子交换层析后, 其结果见图 2, 得到 4 个组分 D1, D2, D3 和 D4。SDS-PAGE 电泳结果见图 3, 多次电泳实验表明 D1 具有很好的重复性, 都为单一条带。与标准蛋白相对分子质量作比较, 测得该蛋白相对分子质量约为 2.3ku; 等电聚焦电泳采用考马斯亮蓝染色后测出其等电点为 6.6。而 D2, D3 和 D4 则重复性不

好, 目前仍在研究中。

D1 蛋白质的氨基酸分析见表 1, 可以看出 D1 蛋白富含酸性氨基酸 Asp 和 Glu, 而且非极性氨基酸的含量 (39.8%) 大于极性氨基酸的含量 (26.8%)。这与 D1 蛋白前面的分离缓冲液条件是相一致的。

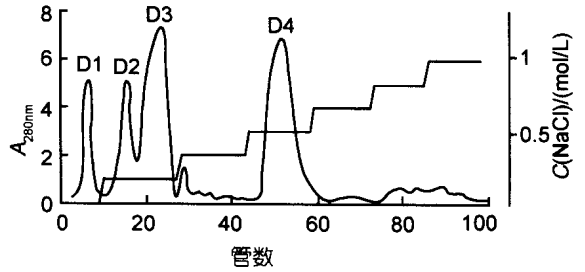


图2 离子交换柱洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of the anion exchange chromatography

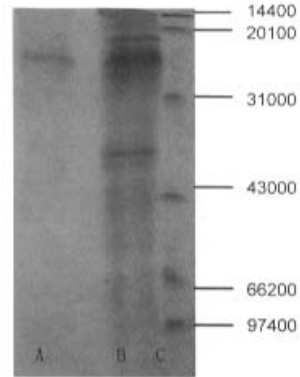


图3 蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the purified protein
A.待测蛋白质 D1; B.S2; C.低分子量标准蛋白

2.2 活性结果分析

D1 蛋白对繁茂膜海绵细胞成团活性检测结果如图 4 所示。本实验在给 CMFSW 中处于单个离散状态的海绵细胞中加入不同浓度的 D1 蛋白后, 细胞立即聚集, 30min 便发现海绵细胞发生了粘附、成团, 2h 后聚集成一个大的细胞团, 且细胞明显贴壁。最低蛋白浓度 5g/L 的溶液中也出现了明显的成团现

表 1 D1 蛋白质氨基酸分析

Tab.1 Amino acid analysis of D1 protein

氨基酸	残基个数	摩尔百分数 (%)
Asp	26	11.89
Thr	15	6.92
Ser	13	5.67
Glu	25	11.18
Pro	9	4.01
Gly	21	9.35
Ala	20	8.83
Cys	1	0.49
Val	19	8.41
Met	2	0.77
Ile	11	4.93
Leu	16	7.38
Tyr	8	3.46
Phe	9	3.86
Lys	11	4.84
His	3	1.44
Arg	7	3.23

象。而未加 D1 蛋白的 ASW 培养液中, 细胞立即聚集, 2h 后细胞才粘附、成团, 未发现明显贴壁现象。虽然海绵细胞在 ASW 和含 D1 蛋白的 CMFSW 培养液中都发生粘附成团现象, 但后者成团速度更快。另外, AF 和 AR 介导的促使海绵细胞粘附成团作用需有 Ca^{2+} 和 (或) Mg^{2+} 的参与, 在 CMFSW 稀释的 D1 蛋白溶液中海绵细胞仍然呈单个离散状态, 也证明海绵细胞的聚集成团作用是 Ca^{2+} 和 (或) Mg^{2+} 依赖性的。

这说明从繁茂膜海绵中提取出的 D1 蛋白参与了 AF 和 AR 所介导的细胞粘附作用, 具有促进繁茂膜海绵细胞粘附聚集的功能。

繁茂膜海绵 D1 蛋白抗体对海绵细胞成团的抑制作用如图 5 所示。研究发现在 ASW 对照孔中海绵细胞 2h 后粘附成团, 加入抗繁茂膜海绵 D1 蛋白抗体后, 这种粘附成团作用受到不同程度抑制, 以能够抑制细胞聚集的血清最高稀释度作为该抗体的效价, 由于动物个体差异性, 所得血清中抗体效价分别为 1:4, 1:8, 1:8, 1:4, 1:8, 1:4, 1:8, 1:16。繁茂膜海绵细胞粘附成团能力受抑制说明血清中的抗 D1 蛋白抗体可能竞争性地结合了海绵细胞表面的 AF, 抑制了这些 AF 与其它海绵细胞膜表面的 AR 相结合, 因而细胞成团被抑制。

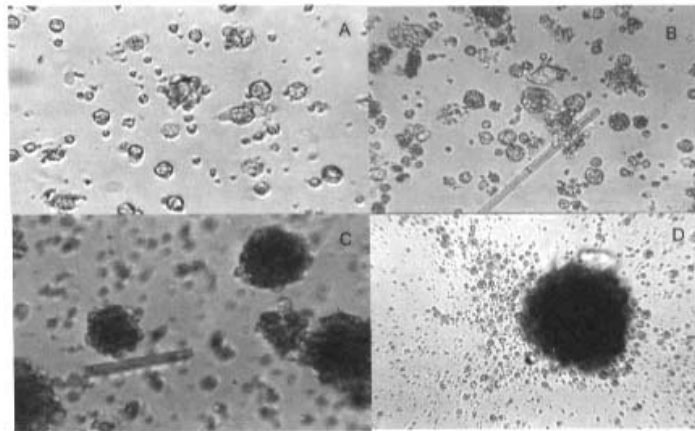


图 4 D1 蛋白对繁茂膜海绵细胞粘附成团的影响

Fig.4 Effects of D1 protein on the aggregation in the cell cultures of the sponge *Hymeniacidon perleve*

A. $\times 400$, 离散的海绵细胞, 未成团未贴壁; B. $\times 400$, 加入 CMFSW 稀释的蛋白溶液的对照, 2h, 未粘附, 未贴壁; C. $\times 40$, 只加入 ASW 的对照, 2h, 粘附成团, 未贴壁; D. $\times 250$, 加入浓度为 40 g/L 的 D1 蛋白溶液, 2h, 粘附成团, 贴壁。

抗 D1 蛋白抗体细胞成团的抑制作用也进一步证明了 D1 蛋白具有促进繁茂膜海绵细胞粘附聚集的功能。

对 A 型、B 型、AB 型、O 型血型的人红细胞和兔、大鼠、小鼠的红细胞的凝集活性结果表明，

D1 蛋白对上述红细胞均没有凝集活性。从表 1 看出，D1 蛋白没有显示出对人、兔和鼠红细胞的凝集作用。检测发现 D1 蛋白的糖含量甚微，这表明 D1 蛋白不属于凝集素。

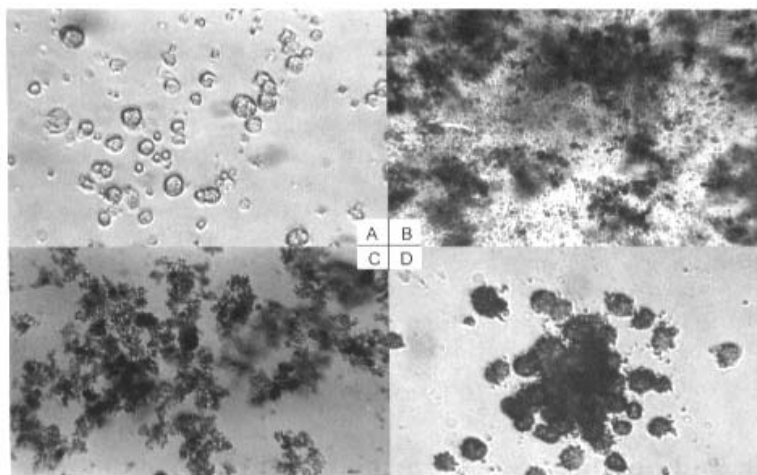


图 5 D1 蛋白抗体抑制繁茂膜海绵细胞粘附成团

Fig.5 Anti-D1 protein's inhibition of the cell aggregation in cell cultures of the sponge *Hymeniacidon perleve*

A. $\times 400$, 离散的海绵细胞, 未成团未贴壁; B. $\times 100$, 只加入 ASW 的对照, 2h, 粘附成团; C. $\times 100$, 加入 1:16 稀释度的血清, 2h, 弱粘附成团; D. $\times 400$, 加入稀释度为 1:8 的血清, 2h, 弱粘附成团

D1 蛋白既不是凝集素，也不属于胶原蛋白，而且 D1 蛋白还具有促使海绵细胞粘附成团的功能，这说明 D1 蛋白和其它蛋白一起构成凝集因子来调控繁茂膜海绵细胞粘附成团的生物功能，所以 D1 蛋白的分离纯化为深入研究繁茂膜海绵细胞培养的粘附成团提供了基础。由于粘附因子大都具有种属特异性，所以还需考察 D1 蛋白对其它种属海绵细胞粘附成团作用的影响以及确定 D1 蛋白和 AF, AR 的相互关系。

致谢：感谢中国科学院海洋研究所李锦和教授对海绵进行生物分类，国家海洋局大连海洋环境保护研究所曲传宇教授对海绵采集提供的帮助。

参考文献：

[1] John F D. Marine natural products[J]. **Nat Prod Rep**, 2002, 19: 10-24.
 [2] Riguera R. Isolating bioactive compounds from marine

organisms[J]. **J Mar Biotechnol**, 1997, 5: 187-193.
 [3] Morel J L, Drobecy H, Sautieue P, *et al.* Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which specifically blocks a non-I-type calcium channel in mouse duodenal myocytes[J]. **Mol Pharmacol**, 1997, 51:1 042-1 052.
 [4] Swatschek D, Schatton W, Kellermann J, *et al.* Marine sponge collagen:isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH,moisture and sebum[J]. **European J Pharmaceut Biop**, 2002, 53:107-113.
 [5] Mohammad A R, Kirk R G, Jame L, *et al.* Haligramides A and B, two new cytotoxic hexapeptide from the marine sponge *Haliclona nigra*[J]. **J Nat Prod**, 2001, 6: 36-39.
 [6] Mohammad A R, Kirk R G, Laurak C, *et al.* Miocrospinamide, a new HIV-inhibitory cyclic depsipeptide from the marine sponge *Sidonops microspinosa*[J]. **J Nat Prod**, 2001, 64: 117-121.
 [7] Barry R O, Tolga E, John A B, *et al.* Isolation and characterization of adociavirin, a novel HIV-inhibitory protein from the sponge *Adocia* sp.[J]. **FEBS Letters**, 1998, 431:

- 85-90.
- [8] Nobuhiro K N, Minoru S, Eizoh N, *et al.* Purification and characterization of tauroxine dehydrogenase from the marine sponge *Halichondria japonicakadota*[J]. *Fish Sci*, 1997, 63(3): 414-420.
- [9] Patrice L P, Mohamed Z, Hiam A, *et al.* A glucoprotein isolated from the sponge *Pachymatisma johnstonii*, has anti-leishmanial activity[J]. *Cell Biol Int*, 2000, 24(1): 51-56.
- [10] Müller I M, Müller W E G. Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor[J]. *Glycobiology*, 2001, 11(1): 21-29.
- [11] Ivana P, Zoran K, Nikola D, *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation characterization and biological activity[J]. *Comp Biochem Phys C*, 2002, 132: 213-221.
- [12] Müller W E G. Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review[J]. *Cell Tissue Res*, 1997, 289: 383-395.
- [13] Tracy L S. *The Cell Biology of Sponge*[M]. New York: Springer-Verlag New York Inc, 1984. 562-570.
- [14] Goodfellow R M, Goad L J. The steryl sulfate content of echinoderms and some other marine invertebrates[J]. *Comp Biochem Phys B Comp Biochem*, 1983, 76(3): 575-578.
- [15] Frith D W. A preliminary analysis of the associations of amphipods *Microdeutopus damnoniensis*, *Microdeutopus anomalous* and *Corophium sextoni* with sponges *Halichondria panicea* and *Hymeniacidon perlevei*[J]. *Crustaceana*(Leiden), 1977, 32(2): 113-118.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 42-100.
- [18] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1999. 59-161.

Isolation and purification of a protein from the sponge *Hymeniacidon perlevei* as a role of aggregation effect on the cells of the sponge *Hymeniacidon perlevei* in cell cultures in

ZHOU Jian-xu, SUN Li-ming, JIN Mei-fang, ZHANG Wei, YU Xing-ju
(Marine Bioproducts Engineering Group, Laboratory of the Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Received: Mar., 25, 2003

Key words: *Hymeniacidon perlevei*; protein; isolation and purification; adhesion; hemagglutination

Abstract: A number of bioactive proteins are metabolized in the marine sponge. Protein D1 was purified by ion-exchange and gel chromatography, the molecular mass of the protein is approximately 2.3ku, and its isoelectric point is a pH6.6. Purified protein is rich in hydrophobic and acidic amino acids. It was found the protein D1 displays strong attachment and aggregation effect on the cells of the sponge *Hymeniacidon perlevei*. It has no hemagglutinating activities on human A, B, O, AB, rabbit and rat erythrocytes.

(本文编辑: 张培新)