

• 实验研究 •

牛初乳免疫球蛋白 A 的纯化与原子力显微镜观测

傅骁勇¹, 谭璐¹, 徐敬², 朱国栋², 李杰², 王红阳^{1*}

(1. 第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作生物信号转导研究中心, 上海 200438; 2. 同济大学物理系波尔固体物理研究所)

[摘要] **目的:**纯化牛初乳免疫球蛋白 A(IgA)并在原子力显微镜(AFM)下进行观测。**方法:**应用逐级盐析、透析和离子交换层析等生化手段,从牛初乳中提取 IgA,SDS-PAGE 鉴定纯化结果。应用 AFM 对吸附在新剥离云母或多聚赖氨酸(PLL)处理云母片基上的 IgA 进行空气相的结构观测。**结果:**考马斯亮蓝染色鉴定纯化的蛋白含有重链、轻链和分泌片;正常生理条件下的 IgA 以寡聚体结构为主,单体大约 2.6 nm×18.0 nm×20.2 nm,与电镜结果基本吻合;IgA 在 PLL 处理云母片基上的吸附呈现树枝状聚集,随孵育时间的延长,聚集现象更趋明显。**结论:**结合生化方法和 AFM 观测,可对 IgA 等免疫球蛋白分子进行天然结构状态的微观探测,为研究其生理调控功能的结构基础提供有效的研究途径。

[关键词] 免疫球蛋白 A;原子力显微镜;牛初乳;纯化

[中图分类号] Q 512.2 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0108-03

Purification of secretory immunoglobulin A from bovine colostrum and detection by atomic force microscopy

FU Xiao-Yong¹, TAN Lu¹, XU Jing², ZHU Guo-Dong², LI Jie², WANG Hong-Yang^{1*} (1. International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Pohl Institute of Solid State Physics, Department of Physics, Tongji University, Shanghai 200092)

[ABSTRACT] **Objective:** To purify secretory immunoglobulin A(IgA) from bovine colostrums and to detect it by atomic force microscopy(AFM). **Methods:** IgA was purified by salt out, dialysis and ion-exchange chromatography, and identified by SDS-PAGE. Molecular structure of IgA was observed on freshly cleaved mica or PLL treated mica by AFM in air. **Results:** SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue staining revealed secretory piece, heavy and light chain constituted the purified IgA. Under AFM, IgA existed mainly in oligomer form in the physiological condition. The monomer's dimension with 2.6 nm×18.0 nm×20.2 nm coincided with the result discerned by electronmicroscopy. The attachment of IgA on PLL treated mica showed dendritic aggregation form. This aggregation phenomenon tended to be more obvious with prolonging incubation time. **Conclusion:** It is feasible to observe the microstructure of immunoglobulin in natural condition by combination of biochemistry and atomic force microscopy techniques, which may provide an effective pathway for the study of IgA structure, contributing to functional regulation of micromoleculars.

[KEY WORDS] immunoglobulin A; atomic force microscopy; bovine colostrums; purification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1):108-110]

免疫球蛋白 A (IgA)分为血清型和分泌型(sIgA),免疫电镜研究了 sIgA 体外转运入结肠癌细胞的过程^[1],晶体衍射结果显示 IgA 的 Fab 和 Fc 片段与 IgG 相比,有不同的排列结构^[2]。但上述两种方法都对 IgA 进行了理化固定,不能对其天然条件下的结构作出判断。原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)与电镜及其他分子水平研究系统的主要区别是能够在生理条件下成像,这使在分子水平上研究结构与功能关系的“实时”动力学过程成为可能^[3,4]。牛初乳是母牛产犊 7d 以内分泌的乳汁,含丰富 SIgA 等免疫活性物质。本研究以生化提纯牛初乳 IgA 为研究对象,应用 AFM 观测方法,对 IgA 在接近生理条件下的结构进行了研究,并探讨了其结构变化可能的生物学意义。

司,透析袋购自 Millipore 公司,离子交换层析填料购自 Waternan 公司。所有生化试剂均为分析纯。AFM 型号为 Nanoscope III (Digital Instruments, Santa Barbara, California),采用 Nanoscope III™ 软件进行图像分析。

1.2 IgA 的提纯和鉴定 采用逐级硫酸铵盐析、透析去铵等步骤获得 IgA 粗提液,过 DEAE 纤维素层析柱,先用 50 ml 浓度为 0.017 mol/L 的醋酸钠(pH 7.4)溶液冲洗柱床,去除粗提液中的 IgG,再用 10 ml 0.1 mol/L 的醋酸钠(pH 7.4)溶液分管洗脱 IgA。纯化液各取 10 μl 用于聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色鉴定。

1.3 样品吸附衬底云母片基表面的处理 新剥离云母片基

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 牛初乳购自上海马发生物制品有限公

[基金项目] 国家自然科学基金(30170225)。

[作者简介] 傅骁勇(1975-),男(汉族),博士生,讲师。

* Corresponding author. E-mail:hywangk@online.sh.cn

为原子级超平整, 表面带负电荷用于吸附蛋白样品。云母表面用多聚赖氨酸(PLL)溶液处理后, 由荷负电变为荷正电。PLL 处理云母在 AFM 扫描下仍呈现原子级超平整, 排除了 PLL 对蛋白观测的干扰。

1.4 AFM 观测样品的准备 为防止样品吸附过程中的盐沉积对成像的影响, IgA 纯化原液用 20 mmol/L 的醋酸铵 (pH 7.4) 溶液稀释至 10、1 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 等不同浓度, 所用水均为去离子水 (MilliQ 制备)。将 IgA 稀释液 20 μl 滴于新剥离的云母或 PLL 处理云母片基上, 其上覆盖一层封口膜, 常温下孵育 5 min、30 min 和 1 h。孵育结束后, 用去离子水轻冲洗云母表面。经空气中充分干燥后, 云母底面用双面胶粘于圆形铁片上, 置于 AFM 观测室内。

1.5 IgA 的 AFM 观测 AFM 的扫描模式设为“轻敲模式”。扫描所用探头为 E-scanner (12 μm), 针尖为 TESP (Digital Instruments), 悬臂的弹性系数为 12 N/m。扫描速度为 0.5~2 $\mu\text{m/s}$ 。IgA 单体高度与直径的测量采用 Nanoscope IIITM 分析软件中的“cross-sections”功能, 直径以 IgA 单体宽高宽的测量为准。

2 结果

2.1 牛初乳 IgA 的提纯与鉴定 应用硫酸铵沉淀、透析和离子交换层析技术从 1 000 ml 牛初乳中提取 sIgA 溶于 0.1 mol/L 醋酸钠 (pH 7.4) 溶液共 10 ml。测得 IgA 浓度最高为 50~60 g/L。SDS-PAGE 鉴定所得的 IgA, 可见重链和轻链和

分泌片 (图 1)。

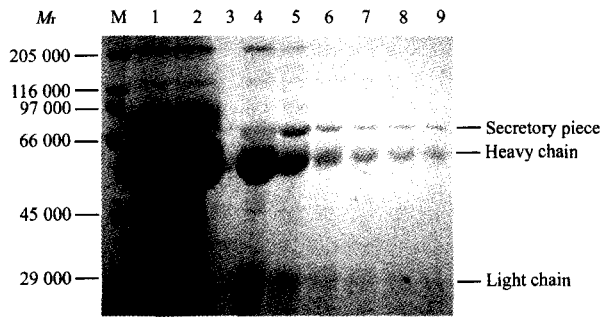


图 1 牛初乳中纯化的 IgA 10% SDS-PAGE 鉴定
Fig 1 Identification of immunoglobulin A purified from bovine colostrums by 10% SDS-PAGE

M: High range of protein marker; 1: Raw solution of immunoglobulin; 2: Wash flowing solution; 3-9: Eluted solution of IgA

2.2 新剥离云母表面 IgA 的 AFM 观测 空气相 AFM 以轻敲模式显示 IgA 在云母表面的结构如图 2 所示。IgA 在新剥离云母表面的吸附以寡聚体结构为主, 其中以二、三聚体为多, 少数区域可见五聚体。IgA 单体的三维尺度经收集数据正态分布拟合后约为 18.0 nm \times 20.2 nm \times 2.6 nm (图 3), 与晶体衍射结果基本一致。IgA 在云母表面吸附的数量随孵育时间的延长有明显的增加, 但寡聚体之间未形成聚集, 寡聚体内部的单体结构仍能较好地分辨。

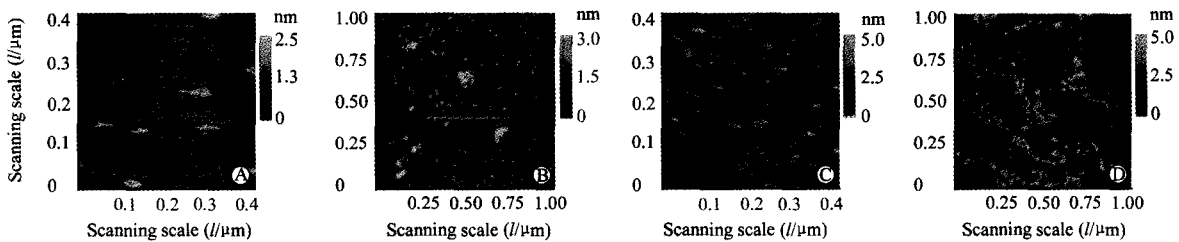


图 2 AFM 空气相轻敲模式观测吸附于新剥离云母上 IgA 的扫描图像

Fig 2 Images of immunoglobulin A absorbed on mica by tapping mode AFM in air

A: IgA absorbed for 5 min forms oligomers; B: Amount of IgA absorbed for 30 min increased, forming irregular aggregations; C: Dimension of each subunit of IgA was about 18.0 nm \times 20.2 nm \times 2.6 nm; D: More oligomers of IgA absorbed after incubated for longer time, three or five-subunit oligomers can be discerned

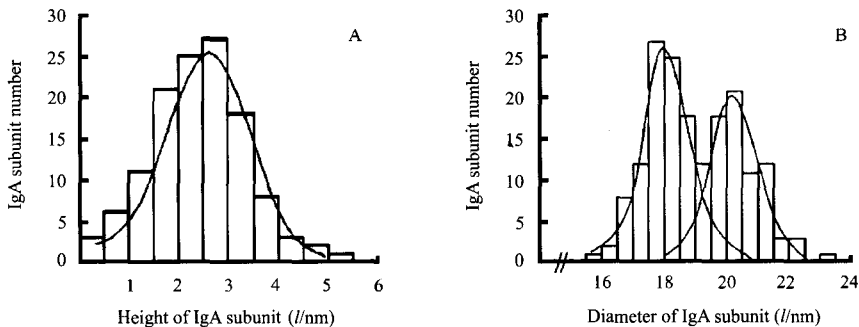


图 3 吸附于云母上的 IgA 单体高度与直径的测量结果

Fig 3 Heights and diameters of IgA subunit absorbed on mica

A: IgA height distribution fitted with Gaussian curves, peaked at 2.6 nm;
B: Diameter distribution fitted with Gaussian curves of 2 peak values as 18.0 nm and 20.2 nm

2.3 PLL 处理云母表面 IgA 的 AFM 观测 在 PLL 云母表面吸附 30 min 后, IgA 形成树枝状或纤维状聚集, 寡聚体之间彼此交联, 单体结构无法分辨。在 300 nm×300 nm 的扫描范围内, 可见 IgA 的聚集有以一处为中心向周围呈放射状

排列的趋势, 放射状结构的横径约为 20 nm, 相当于一个 IgA 单体的宽度。见图 4。随孵育时间的延长, 这种聚集趋势更为明显(结果未显示)。

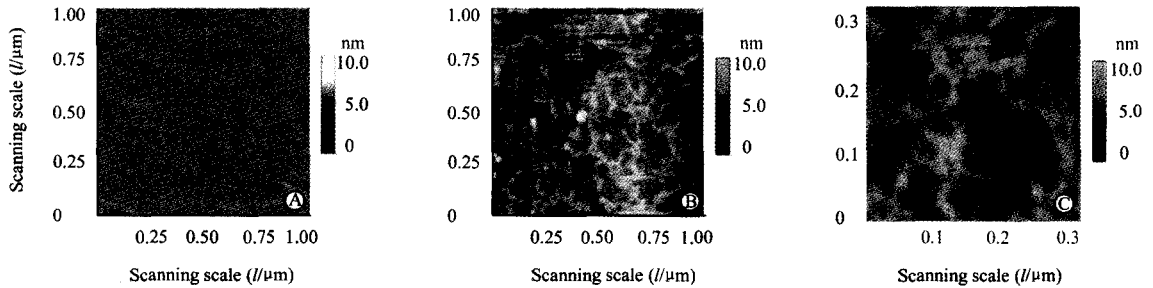


图 4 AFM 空气轻敲模式观测吸附于 PLL 处理云母上 IgA 的扫描图像

Fig 4 Images of immunoglobulin A absorbed on PLL-mica by tapping mode AFM in air

A: Clear surface in control PLL-mica incubated with a drop of buffer without IgA;

B: Prominent fibril or dendritic type of aggregated IgA formed on PLL-mica after incubated for 30 min; C: Detail image of B

3 讨论

应用生化提纯方法得到的牛初乳 IgA 含有完整的轻链、重链和分泌片, 纯化过程始终保持 IgA 存在于非变性液体环境中, 可以保证对 IgA 进行正常生理条件下的功能研究。AFM 观测结果显示, 提纯的 IgA 可以满足 AFM 样品的要求, 即扫描区域内基本没有背景分子及晶体盐沉积的干扰。更为重要的是, AFM 下 IgA 的结构观测免去了结晶过程或电镜样品喷镀过程中可能对蛋白样品造成的破坏。而液相 AFM 的蛋白结构观测则可进一步实时动态跟踪蛋白分子结构的变化, 为功能变化的结构基础提供最直观的证据。

实验结果显示 IgA 单体分子在 AFM 下的高度为 2.6 nm, 横径为 18.0 nm×20.2 nm。Droz 等^[5]用 AFM 得到在石墨表面的 IgG 分子高度为 2.5 nm, 横径为 15 nm×30 nm, 在云母表面 IgG 分子的高度为 3.5 nm, 横径为 20 nm×35 nm。Silverton 等^[6]用晶体衍射方法得到的 IgG 分子大小为 14 nm×10 nm×4 nm。AFM 与晶体衍射观测结果的出入在于 AFM 下免疫球蛋白分子横径的增大, 这可能归因于 3 点: (1) AFM 受针尖和样品拓扑结构的影响较大; (2) 寡聚体的形成; (3) 样品缓冲体系中溶剂的影响, 如盐成分对蛋白与衬底间吸附力的影响等。

IgA 是亲水性蛋白, 等电点为 4.5~6.8, 在 pH 为 7.4 的醋酸铵溶液中所带净电荷为负。新剥离云母表面带负电荷, 对 IgA 的吸附以静电作用为主。但这种静电吸引只能发生在与 IgA 分子局部区域的相互作用, IgA 分子在这一区域的氨基侧链以正电荷相对集中, 这种电荷选择性的吸附可能决定了 IgA 分子在云母上的排列和走向。我们的实验提示, IgA 在云母表面孵育时间的延长可能有利于这种静电吸附的稳定性, 有更多的 IgA 分子在冲洗后的云母表面留下, AFM 下分子数目明显增多。

PLL 处理的云母表面荷正电, 这是由赖氨酸的荷正电氨基均匀分布在云母表面造成的。此时 IgA 分子与云母片基之间的

吸附发生在分子表面负电荷相对集中的区域。我们的实验显示, 这种吸附电性的相互转换造成了 IgA 分子在 PLL 云母表面的聚集。这说明吸附在云母表面 IgA 分子吸附部位的变化也影响了 IgA 分子之间的相互作用, 寡聚体之间相互聚集, 形成较为规则的树枝状或纤维状分布。临床上有一类 IgA 肾病(IgA N), 是我国最常见的原发性肾小球疾病, 它的病因和发病机制目前还不十分明了, 但免疫电镜显示其病理特征是肾小球系膜区有以 IgA 为主的颗粒样沉积, 同时伴有系膜细胞增殖、基质增生^[7]。本实验在单分子水平提示, IgA 的聚集状态与其表面荷电区域及吸附衬底的电荷性质有关, 可能为今后临床 IgA 肾病的发病机制研究提供结构上的相关信息。

[参考文献]

- [1] Nagura H, Nakane PK, Brown WR. Translocation of dimeric IgA through neoplastic colon cells *in vitro* [J]. *J Immunol*, 1979, 123(5): 2359-2368.
- [2] Boehm MK, Woof JM, Kerr MA, et al. The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG; a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling [J]. *J Mol Biol*, 1999, 286(5): 1421-1447.
- [3] Engel A, Muller DJ. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(9): 715-718.
- [4] Muller DJ, Schoenenberger CA, Schabert F, et al. Structural changes in native membrane proteins monitored at subnanometer resolution with the atomic force microscope: a review [J]. *J Struct Biol*, 1997, 119(2): 149-157.
- [5] Droz E, Taborelli M, Descouts P, et al. Influence of surface and protein modification on immunoglobulin G adsorption observed by scanning force microscopy [J]. *Biophys J*, 1994, 67(3): 1316-1323.
- [6] Silverton EW, Navia MA, Davies DR. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(11): 5140-5144.
- [7] 史跃先, 黎磊石, 周虹, 等. IgA 肾病肾小球内纤维连接蛋白分布的病理及临床意义 [J]. *中华肾脏病杂志*, 1997, 13(1): 50-51.

[收稿日期] 2003-05-12

[修回日期] 2003-11-20

[本文编辑] 余党会