

胶原蛋白实验方法

(日)永井 裕 藤本大三郎 编著

刘 平 译 王惠康 赵伟康 审校

3-33

上海中医学院出版社

X113
73

Y112/16

胶原蛋白实验方法

〔日〕 永井 裕・藤本大三郎 编著

刘 平 译

王惠康 审核

赵伟康



上海中医学院出版社



A0011872

(沪)新登字206号

胶原蛋白实验方法

[日] 永井 裕·藤本大三郎 编著

刘 平 译

王惠康 审校
赵伟康

上海中医学院出版社出版发行

(上海零陵路530号 邮政编码 200032)

新华书店上海发行所经销

上海长鹰印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 8.75 字数 218千字

1992年10月第1版 1992年10月第1次印刷

印数: 1—3,000

ISBN 7-81010-162-5/R·161

定 价: 7.50元

執筆者一覧

(50 音順, *は編者, []内は執筆分担)

いせむら	まもる			
伊勢村	護	東北大学医学部	[2.6]	
くほき	よし	のり		
久保木	芳徳	東京医科歯科大学歯学部	[1.3, 2.7.1]	
この	み	ひろ	し	
許斐博史		国立武蔵療養所神経センター	[3.1]	
まかき	ばら	こう	こ	
榊原耕子		東京大学医科学研究所	[3.3]	
ま	の	じゆんじろう		
佐野順次郎		社会保険中央総合病院	[3.4]	
しん	かい	ひろし		
新海		滋	大分医科大学医学部	[4.3]
すな	だ	ひろ	のぶ	
砂田泰伸		University of California, Cancer Center	[1.4.1, 2.4, 4.5]	
たけ	だ		けん	
武田健		昭和大学医学部	[4.2]	
た	なか	しず	こ	
田中静子		University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Rutgers Medical School	[2.3]	
*なが	い	ゆたか		
*永井裕		東京医科歯科大学難治疾患研究所	[1.1, 1.4.3] [1.4.1, 1.4.2, 2.3, 2.4, 3.1, 4.5 共著]	
はた		りゆういちろう		
畑		隆一郎	東京医科歯科大学難治疾患研究所	[2.5, 4.1]
はや	かわ	た	ろう	
早川太郎		愛知学院大学歯学部	[4.4]	
はやし		とし	ひこ	
林利彦		資生堂研究所	[1.2]	
よか	え	まこと		
深江允		鶴見大学歯学部	[2.2]	
*ふじ	もと	だいさぶろう		
*藤本大三郎		浜松医科大学医学部	[2.1, 2.7.2]	
ふじ	わら	まく	へい	
藤原作平		神戸大学医学部	[1.4.2]	
ほり		ひさ	え	
掘		久枝	東京医科歯科大学難治疾患研究所	[3.2]

原 序

近二十年来，结缔组织的研究取得了惊人的进展。目前，关于其构成成分的分离、精制及性状的资料正以指数速率蓄积起来。这些研究极大地改变了我们以往将结缔组织仅仅看成是机体支持组织的认识，它作为细胞的微环境，作为控制细胞活动的细胞间质具有重要地位，对于维持细胞的形态特征也同样具有支配的作用。

就结缔组织中的主要蛋白成分——胶原蛋白来说，以往一直认为是构成机体各组织、器官的单一成分，而今的研究已推翻了这一概念。现代科学的进步使我们认识到，胶原蛋白和免疫球蛋白一样，富有多样性及组织分布的特异性，是与各组织、器官机能有关的功能性蛋白。胶原不单单在个体的发生、分化、形态形成过程中与其它结缔组织成分一样，起着重要的作用，而且在诸多病理变化时，随着胶原蛋白型别的变异而产生相应组织、器官机能的低下。这对于人类的健康已成为不容忽视的重要研究课题。目前，不仅在生物学、医学领域，而且在兽医学、衰老研究等方面，以胶原为研究对象的学科正在迅速发展。

本书正立足于上述学术背景，面向较多的关心结缔组织领域的研究人员、技师及学生等诸同道，在精确、可信的数据基础上，介绍胶原研究中通常最广泛应用的实验方法，以期对各专科领域的研究能有帮助。因此，本书邀请了位于本国胶原研究前沿的多位专家执笔。以1976年胶原研究会主办的“胶原生化学实验方法”讲义为蓝本，尽量就实验中可能会遇到的各种问题撰写了必要的注意事项。愿本书对今后的胶原研究进展能起到推动作用。

另外，在本书出版过程中，得到了科学讲评社的吉田茂子、明恒次郎二位的大力协助，在此表示深切的感谢。

永井 裕
藤本大三郎

中译本序言

当今，国际上对结缔组织尤其是胶原蛋白的研究相当活跃，其进展亦相当迅速，已引起我国生物学及医学工作者的极大关注。

胶原蛋白是动物体内含量最多，分布最广的蛋白质，与机体的生长、衰老及疾病有着极其密切的关系。长期以来，中医对一些难治性结缔组织病（如肝、肺、肾等脏器的纤维化、动脉硬化、硬皮病、粘连包块、疤痕、类风湿性关节炎以及红斑狼疮等）的治疗有一定独到之处，全国中西医结合研究会活血化瘀专业委员会已将结缔组织增生性疾病作为血瘀研究的一个重要内容。因之深入开展胶原研究对发展中医学有一定帮助。近年来，随着胶原研究的进展，一些与胶原代谢有关的疑难杂症的病理现象正在逐步阐明，1985年日本对有关胶原研究的投资竟占全国年度总医疗经费的10%。

由于胶原性状的特殊性，所以有必要将国外有关胶原蛋白研究的实验方法介绍给我国众多的读者，以便使我国这一领域的研究尽快地赶上世界先进水平。

《コラーゲン実験法》一书是目前关于胶原蛋白实验方法学较全面的一部著作。著者永井裕教授为胶原酶研究的创始人之一，藤本大三郎教授有关胶原蛋白架桥的研究则处于世界领先地位；本书的其他执笔者也都是长期直接从事胶原蛋白研究的人员，因而得以使本书具有先进性及较高的实用价值。译者刘平博士将本书译成中文出版，对我国从事有关胶原蛋白研究的科技工作者定会 有所帮助，对我国的胶原研究亦将起一定的促进作用。

用。

上海中医学院生化学教研室教授 赵伟康
一九八八年十月

目 录

1章: 胶原蛋白的提取与精制

1.1 胶原的性状及提取过程中的注意事项	1
1.1.1 可溶性胶原和不溶性胶原	1
1.1.2 有关胶原的术语	3
1.1.3 胶原溶液的性质	3
1.1.4 沉淀溶液内胶原时的注意事项	5
1.1.5 胶原溶液制备过程中的注意事项	6
1.1.6 精制胶原的保存	8
1.1.7 制备胶原用原材料的前处理	8
1.1.8 试剂及器具	8
1.2 前胶原的制备	9
1.2.1 概述	9
1.2.2 实验方法	11
1.3 硬组织中胶原的制备方法	20
1.3.1 概述	20
1.3.2 实验方法	23
1.3.3 注意事项和存在的问题	28
1.4 各型胶原的制备	30
1.4.1 I型、II型、III型胶原	30
1.4.2 IV型、V型、VI型胶原	39
1.4.3 VII型 (LC:Long Chain) 胶原	47

2章: 胶原的分析

2.1 羟脯氨酸的定量	50
2.1.1 概述	50
2.1.2 Woessner的方法(第I法)	51
2.1.3 Kivirikko, Laitinen, Prockop等人的方法	52
2.1.4 Inayama, Shibata, Ohtsuki Saito 的方法	53
2.1.5 应用氨基酸分析仪的定量测定	54
2.2 离子交换及层析方法	55
2.2.1 概述	55
2.2.2 实验方法	56
2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	62
2.3.1 概述	62
2.3.2 一维SDS-PAGE	64
2.3.3 二维电泳	76
2.4 荧光自显影	86
2.4.1 概述	86
2.4.2 荧光自显影的原理	86
2.4.3 荧光自显影的实际操作	88
2.4.4 光密度检测的定量方法	92
2.4.5 荧光自显影时诸条件的探讨	93
2.4.6 PPO 的回收	99
2.5 CB 肽段的制备与分离	101
2.5.1 CB 肽段的制备	101
2.5.2 CB 肽段的分离	104
2.6 羟赖氨酸-糖化合物的分析	106
2.6.1 概述	106
2.6.2 实验方法	108

2.7 架桥的分析	118
2.7.1 还原性架桥的分析方法	118
2.7.2 非还原性架桥的分析方法	132

3章: 免疫学的实验方法

3.1 抗胶原抗体的制备方法	142
3.1.1 概述	142
3.1.2 实验方法	142
3.2 抗体的检测方法	150
3.2.1 概述	150
3.2.2 实验方法	151
3.3 免疫组织化学的检测方法	164
3.3.1 概述	164
3.3.2 实验方法	165
3.4 免疫电镜的方法	180
3.4.1 概述	180
3.4.2 实验方法	180
3.5 迟发型过敏反应	188
3.5.1 概述	188
3.5.2 皮内试验	188
3.5.3 体外判断法: 细胞移动抑制试验	194

4章: 胶原代谢的研究方法

4.1 应用细胞培养的胶原合成实验	199
4.1.1 组织(器官)细胞的分离	200
4.1.2 生物合成实验时培养系统的选择	201
4.1.3 放射性羟脯氨酸的定量	208
4.1.4 用细菌性胶原酶检测胶原合成率的方法	212

4.2 脯氨酸羟化酶、赖氨酸羟化酶	219
4.2.1 概述	219
4.2.2 脯氨酸羟化酶的测定方法	221
4.2.3 脯氨酸3-羟化酶活性的测定方法	228
4.2.4 赖氨酸羟化酶活性的测定方法	229
4.3 前胶原肽酶活性的测定	230
4.3.1 概述	230
4.3.2 实验方法	231
4.4 赖氨酰氧化酶	242
4.4.1 概述	242
4.4.2 实验方法	242
4.4.3 注意和存在的问题	247
4.5 胶原酶及有关胶原分解酶活性的测定方法	248
4.5.1 间质型胶原分解酶活性的检测方法	250
4.5.2 膜型(IV型及V型)胶原分解酶活性的检测方法	263
4.5.3 明胶分解酶活性的测定方法	264
4.5.4 酶的活化	266

1. 胶原蛋白的提取与精制

1.1 胶原的性状及提取过程中的注意事项

1.1.1 可溶性胶原与不溶性胶原

胶原研究的历史，首先起始于组织中胶原纤维的可溶性。1940年，应用枸橼酸缓冲液(pH3~4.5)从大鼠皮肤中溶解出可与角蛋白、弹性蛋白一同被分类为不溶性蛋白的胶原。Orekhovich等人将此可溶性胶原作为胶原纤维的前驱体，命名为“前胶原”^[1]。但在此之后，Gross等人提出了只有形成胶原纤维的可溶性胶原才是真正的胶原，且命名为“原胶原”^[1]。也就是说，Orekhovich等人认为的前胶原(严格地说，是通过架桥联接生成的胶原分子的低聚体，包括多聚体胶原)与原胶原是同一含义。但要注意的是，与胶原分子相对应，Bellamy、Bornstem^[2]于1971年发现的前胶原则与此处的前胶原是不同的。

来自组织中的可溶性胶原，根据所用可溶溶剂的不同，大体上分为中性盐可溶性及酸性可溶性胶原。无论何种可溶性操作，胶原的变性温度于pH中性时为40~41°C，酸性时为38~39°C。因此，最好要在低于10°C的条件下进行。中性盐溶剂一般采用0.15M、0.45M及1M的NaCl溶液，酸性溶剂多采用pH3.5的0.05M~0.5M的醋酸(HAc)或0.15M的枸橼酸缓冲液。根据实践经验，组织中新合成的胶原易为0.15M~0.45M的NaCl溶液所提取；于组织内沉积时间较长的胶原可从酸提取中浓缩获得。另外，与枸橼酸抽提的部分相比，HAc抽提的胶原含多聚体成分较

多。但从经细切的组织中提取胶原时，一开始就用 0.15M 的 NaCl 溶液的话，由于以血清成分为主的大量非胶原性蛋白被提出，会给胶原的以后进一步纯化带来一定的困难。

因此，除了其目的在于选择性提取新生胶原（放射性标记胶原等）外，大多先用 0.15M NaCl 抽提以去除非胶原成分（实际上对此组分中所含的胶原并不进行回收），然后用 0.45M 或 1M NaCl 提取胶原再进行纯化。另外，还可采用胶原非溶解条件，即以 0.02M Na_2HPO_4 溶液或 20% NaCl 溶液，对组织进行反复匀浆，选择性地提取非胶原成分之后，再用 0.45M NaCl 抽提胶原（参见 1.4.1 项）。

一般来说，经上述中性盐及酸性反复抽提 2~3 次后的残渣，即为不溶性胶原。此“不溶性”的定义仍是相对的，仅表示“尚不溶解”之意。一般认为，其不溶性的原因与细胞间质成分的相互作用密切相关。在机体发生过程中构筑组织时，胶原由于与蛋白多糖及糖蛋白的特异亲和性（机制尚不十分清楚），而致其呈不溶解性。另外，随着年龄的增长，胶原分子间及与其它成分之间也会形成架桥，这些因素均给组织中胶原的提取造成了一定的困难。所以，人胎儿皮肤中中性盐溶性及酸溶性胶原的提取率也只有 5%^[3]；待进入少年期后，其提取率仅为 1% 左右。而软骨中的 II 型胶原，网状纤维中的 III 型胶原及基底膜中的 IV 型胶原之所以难以用化学的方法提取，可能主要与该类胶原与其它成分之间的密切相互作用有关。

A. 不溶性胶原的可溶化试验

a. 交互抽提^[4]

胶原纤维在酸性及非加盐的条件下呈膨润状态，示可溶化倾向；在中性 pH，0.9~1.0M NaCl 的条件下具有相同的趋势（见 1.4.1）。因而，与在一定条件下的反复抽提相比，采用中性与酸性条件作交互提取，则可望使更多的胶原变为可溶性。在中性

pH 条件下(加盐),若再加入葡萄糖或蔗糖(0.25~0.5M)以抑制胶原形成纤维,则效果更好。采用该方法可使约50%的小牛皮肤胶原变为可溶性。

b. 加酶以增加胶原的可溶性

如上所述,不溶性胶原中含有非胶原性间质成分,另外,随着年龄的增长,胶原分子间出现共价键架桥。这些架桥大多位于胶原分子N及C端的非胶原性肽(尾肽)部分,因而易被存在较多的蛋白酶切断。胶原对胶原酶以外的蛋白酶具有抵抗性(关于Ⅲ型胶原参照1.4.2项)。因而,在酸性条件下,以胃蛋白酶处理(底物:酶=20~100:1)或中性条件下经木瓜蛋白酶处理,被切除部分尾肽的胶原分子(无尾肽胶原)便变为可溶性。pH中性条件下,除NaCl外,加入0.5M葡萄糖(或蔗糖)也可使胶原纤维膨胀,增加蛋白酶的处理效果。

1.1.2 有关胶原的术语

胶原分子为分泌性糖蛋白,其分子内羟脯氨酸的 δ -OH部分结合有半乳糖(或葡萄糖)。首先在胶原合成细胞的多核糖体上合成带有信使肽的前 α 链,进而通过内质网形成3条链的前胶原,再经高尔基氏体由分泌小泡分泌至细胞外;在细胞外,在前胶原羧基内肽酶的作用下,C末端的球状蛋白部分被水解下来,形成 P_N 胶原,继而经前胶原氨基内肽酶作用,N末端的球状蛋白被水解下来,形成胶原。仅被切去N末端球状蛋白的胶原称为 P_C 胶原。另外,在温和的条件下,并不切断任何一条肽链但致其变性(pH4.8,45°C,15分钟)后所生成的自然盘绕状物为原始明胶,即表示该明胶乃是市售明胶之祖。

1.1.3 胶原溶液的性质

胶原分子为长290nm、直径1.5nm的棒状结构蛋白,其溶液

具有高粘度，一般可用的胶原溶液最高浓度为 4mg/ml。溶液在酸性条件下较为稳定，当其 $\text{pH} > 10$ 时，便不稳定，易被分解；在中性条件下也是不稳定的，即使在低温条件下保存，一周以后便逐渐被分解而生成多肽断片。因此，胶原溶液必须在酸性条件下 (5mM ~ 0.5M HAc) 低温保存。中性条件不稳定的原因可能与溶液中含有和胶原具有高度亲和性的蛋白酶(提取胶原时被带进)有关。

溶液态胶原的变性温度为 $38 \sim 40^\circ\text{C}$ 。一旦变性，便形成明胶，粘度下降，并可溶于广范围 (1~13) pH 的溶液中，这与普通蛋白质变性后凝固的性质正好相反。溶液态下的胶原可由于 5M 胍、6~8M 尿素及 10% SDS (室温) 而变性。另外，溶液内若含有 1M CaCl_2 ，即使在 37°C 下也不会形成胶原纤维，所以实验中经常被采用。但要注意的是，在该条件下，胶原会逐渐发生变性。在下述条件下，可基本上将溶液中胶原全部沉淀、回收。

1) 对 0.02M Na_2HPO_4 溶液透析

透析外液 (Na_2HPO_4) 的量及更换的次数，因胶原容量的多寡而不同。透析开始时，一日更换二次(数小时后达到平衡)，如内液内产生了一定量的白色纤维状的胶原沉淀时，要测定外液的 pH，确认其 pH 值已达 8 以上(需要 2~3 日)。

2) 醋酸酸性胶原溶液时，加入固体 NaCl 至最终浓度达 10%。将研细后的 NaCl 在搅拌下加入。因为若加入块状结晶 NaCl，会使胶原包绕着 NaCl 结晶块而沉淀下来，致块状 NaCl 难以溶解。同时，搅拌不要过于剧烈，以免产生气泡而使部分胶原变性。添加 NaCl 过程中混入的气泡，往往混存于沉淀的胶原中，此时可经抽真空脱气后再离心，或离心后用药匙收集浮于液体表面的膜状胶原，再与沉淀部分混合。

3) 在中性 pH 条件下(如 0.05M Tris-HCl 缓冲液， $\text{pH} 7.4 \sim 8.0$) 可加入固体 NaCl (方法与 2 同)，至最终浓度为 20%。由于该溶液的比重大，混入气泡的胶原沉淀的浮游现象更为显著。

4) 加入冷却 (-10°C) 的乙醇至最终浓度为 $30\sim 35\%$ 。在冰浴下缓慢加入, 以免乙醇溶解过程中产热而致部分胶原变性。

5) 形成 SLS (长节段) 纤维

在低温(冰水浴)、醋酸酸性($\text{pH}3.5$)条件下, 缓慢加入 ATP (以离子交换树脂脱盐后) 溶液直至整个液体变为乳白色。因快速添加 ATP 而出现不均匀沉淀时, 可通过手掌温度加温至沉淀溶解后, 再次冷却, 使之缓慢形成均质性 SLS 纤维。

1.1.4 沉淀溶液内胶原时的注意事项

1) 添加 NaCl (酸性条件下为 10% , 中性条件下为 20%) 沉淀胶原的具体方法有: i) 直接加入固体 NaCl; ii) 加入预先配制的高浓度 NaCl 溶液; iii) 以浓 NaCl 溶液作为透析外液, 透析外液的配制要根据内液体积及平衡后要达到的 NaCl 浓度进行计算。

i) 的方法简便而实际, 其应用也较广泛, 但由于急速地改变了 NaCl 的浓度, 故不能排除其它型胶原以及非胶原成分一同被沉淀的可能性。因此, 要想获得高纯度的胶原, 最好是在反复沉淀、溶解的最后步骤结合加用 iii) 的方法。方法 ii) 的后果会导致液体总量增加, 胶原浓度降低。因此, 除特殊情况 (提取的胶原浓度过高, 过于粘稠而难以处置等) 外, 不要采用。

2) 溶液内胶原的完全沉淀通常需要数小时。要确认溶液中的胶原是否完全沉淀, 可以于离心后的上清液中加入固体 NaCl, 若并不出现混浊, 便可确认其中的胶原已被完全沉淀。

3) 根据笔者的经验, 无论采用目前所用的何种沉淀胶原的方法作反复纯化, 其得率会因反复纯化的频度而有所不同。而且所获取的胶原中还含有微量的硫酸软骨素(糖蛋白)。因而, 在制备抗胶原抗体的抗原时, 必须进一步用 DEAE 纤维素柱层析, 以去除蛋白多糖(酸性糖蛋白也同时被去除)。

4) 在进行组织粗提液内的胶原沉淀, 回收及纯化过程中, 可