

肉牛早孕因子(EPF)的活性检测及分离纯化

贺加双¹,马卫明¹,邓立新²,宋移福¹,刘莲莲¹,曹永芝¹,谢冰¹

(1 山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018;2 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

[摘要] **【目的】**检测怀孕肉牛早孕因子(Early pregnancy factor,EPF)的活性,并对其进行分离纯化,以期为 EPF 快速检测方法的建立提供依据。**【方法】**采集妊娠 1~9 个月的肉牛血样,并进行妊娠诊断,通过玫瑰花环抑制试验(Rosette inhibition test,RIT)检测其早孕因子的活性。对有活性的血样依次进行 DEAE-52 离子交换层析、ConA Sepharose 4B 亲和层析和 Heparin Sepharose Cl 6B 亲和层析,分离纯化 EPF,对纯化产物进行 SDS-PAGE 检测,并测定其等电点。**【结果】**怀孕牛和未怀孕牛血清的玫瑰花环抑制滴度差异显著($P<0.05$)。玫瑰花环抑制试验显示,纯化出的 EPF 具有活性,其分子质量为 53.6 ku,等电点为 6.8。**【结论】**利用玫瑰花环抑制试验检测早孕因子活性,可以鉴定肉牛的妊娠状态;利用层析的方法可以分离出早孕因子的活性蛋白。

[关键词] 肉牛;早孕因子;妊娠状态;孕血清

[中图分类号] S823.9⁺21.3⁺5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)06-0044-05

Purification and characterization of early pregnancy factor(EPF) from beef cattle serum

HE Jia-shuang¹,MA Wei-ming¹,DENG Li-xin²,SONG Yi-fu¹,
LIU Lian-lian¹,CAO Yong-zhi¹,XIE Bing¹

(1 College of Animal Science and Technology,Shandong Agricultural University,Taian,Shandong 271018,China ;

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】**The study was done to detect the activity of EPF to and purify EPF from pregnant beef cattle serum using rosette inhibition test. **【Method】**Serum was obtained from pregnant beef cattle of 1—9 months. Rosette inhibition test was used to detect the activity of EPF in pregnant beef cattle, and then serum was purified by DEAE-Sepharose, ConA Sepharose 4B affinity chromatography and Heparin Sepharose Cl 6B affinity chromatography. The purified products were detected by SDS-PAGE and isoelectric points were detected. **【Result】**The results indicated that RIT significantly deviated ($P<0.05$) between pregnant and non-pregnant beef cattle. The EPF's activity of beef cattle was detected in the final purified products and its molecular weight was 53.6 ku, the isoelectric point 6.8. **【Conclusion】**The study indicates that RIT has the potential to distinguish pregnant status of beef cattle, and chromatography method can be used to isolate protein of early pregnancy factor.

Key words: beef cattle; early pregnancy factor; pregnant state; pregnancy serum

早孕因子(Early pregnancy factor, EPF)是存在于妊娠早期母体血清中的一种妊娠相关免疫抑制蛋白,于 1974 年由澳大利亚学者 Morton 等^[1]在孕

鼠血清中首次发现,随后在妊娠妇女^[2-3]及羊^[4]、猪^[5]、牛^[6]等妊娠哺乳动物体内相继检测到了 EPF 的存在^[7]。目前普遍认为,EPF 是热激蛋白家族成

* [收稿日期] 2010-11-19

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项

[作者简介] 贺加双(1984—),男,河南南召人,在读硕士,主要从事临床兽医学研究。E-mail:vethe@163.com

[通信作者] 马卫明(1970—),男,山东宁阳人,副教授,博士,主要从事临床兽医学研究。E-mail:mawm@sda. edu. cn

员——伴侣蛋白 10(Cpn-10)的同系物^[8-9],是最早确认妊娠的生化标志之一,是防止母体对胚胎乃至胎儿发生免疫排斥反应的必需物质^[9]。由于 EPF 能增强抗淋巴细胞血清抑制 T 淋巴细胞花环的形成,所以可以利用花环抑制试验对其进行生物学鉴定^[10-11]。近几年来,人们逐渐证实,EPF 是哺乳动物受精后最早出现的一种具有免疫抑制和生长调节作用的因子^[3,12],其由机体在一定的激素环境下分泌合成,从受精开始一直到妊娠中期,EPF 在哺乳动物体内都发挥着重要的作用,在胚胎死亡后 24~48 h 内,为 EPF 逐渐消失^[3,13]。

检测 EPT 可以了解母体的妊娠状态,但目前国内外仍然没有在早孕因子的快速检测上取得突破,而常规检测方法存在操作繁琐、准确度低等不足,因此建立准确、快速的早孕因子检测方法,具有重要的实际意义。本试验利用妊娠 1~9 个月的健康孕牛血清,尝试用改良玫瑰花环抑制试验检测 EPF 活性,并对其进行 EPF 的分离纯化和性质鉴定,以期 EPT 快速检测方法的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DEAE-Sepharos F. F、ConA Sepharose 4B、Heparin Sepharose Cl 6B,均购自 Whatman;a-D-甲基甘露糖苷,购自 Fluka 公司;等电点标准品和蛋白质质量标准品,购自 Sigma 公司。

1.2 血样的采集与处理

肉牛血样采自山东省鄄城县鲁西黄牛保种繁殖基地。颈静脉采集 11 头不同孕期孕牛(孕期 1~2 月 5 头,3~5 月 4 头,6~9 月 2 头)血样,2 500 r/min 离心 20 min,分离血清,并在 56 ℃ 下钝化 30 min,分装, -20 ℃ 保存备用。在对孕期 2~9 月牛进行采样时,结合配种日期、孕期和直肠检查确定妊娠情况,对孕期为 1 个月的牛,于 1 个月后进行妊娠诊断。同时采集 4 头未怀孕母牛血清作为对照样品。

1.3 牛外周血淋巴细胞悬液及绵羊红细胞(SRBC)的制备

采集健康肉牛血样,1 g/L 肝素钠抗凝。向抗凝血样中加入等体积 pH 7.4 的 PBS 液,混匀,按每管 4 mL 的剂量轻轻叠加于盛有等量牛淋巴细胞分离液($D=1.086$)的 10 mL 离心管中,2 000 r/min 离心 15 min,吸取分离液与血浆交界部位的灰白云雾层,加 3 倍体积的 PBS 液,2 500 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀洗涤 2 次,取 1 滴细胞悬液,用台

盼蓝拒染法镜检计数细胞,最后调整活细胞密度为 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,备用(3 h 内使用)。

颈静脉采集绵羊血,1 g/L 肝素钠抗凝,2 500 r/min 离心 15 min 分离红细胞,用 PBS 液洗 5 次,配成体积分数 1.5% 的 SRBC 悬液,4 ℃ 保存备用。

1.4 EPF 活性的检测

将孕牛血清进行 21,22,...,210 倍比稀释,各稀释度分别加等体积的淋巴细胞悬液,37 ℃ 孵育 60 min;加 100 μL 体积分数 1.5% 的 SRBC 悬液,37 ℃ 孵育 5 min,2 000 r/min 离心 2 min,室温孵育 40 min,轻轻重悬;用 20 μL 体积分数 10% 的戊二醛固定,涂片,瑞氏染色,镜检,统计淋巴细胞和红细胞形成的花环数,结合红细胞少于 3 个的不计入。花环抑制滴度(RIT 值)按花环数低于对照组 75% 的最高血清稀释倍数的对数计算,即 $\text{RIT 值} = \lg x$,其中 x 为血清最高稀释倍数。采用 SPSS 进行数据分析。

1.5 EPF 的分离与纯化

EPF 的分离纯化参考文献[1]的方法,并加以改进。

1.5.1 DEAE-52 阴离子交换层析 将 DEAE-52 通过常规方法处理后,用 pH 8.0 的 0.2 mol/L PBS 液(Buffer A)浸泡,装柱(16 mm $\times$ 600 mm),用 Buffer A 平衡,直到流出液 pH 为 8.0。血清经 MILLIPORE 过滤器除去小于 10 ku 的杂蛋白,用 Buffer A 透析 24 h 后加于 DEAE-52 柱上,用 Buffer A 洗脱层析柱,流速为 60 mL/h,收集透过峰 DE-1 和 DE-2,再用含 1 mol/L NaCl 的 Buffer A 洗柱,收集其余洗脱峰。将 DE-1 和 DE-2 合并,用过滤器离心浓缩。置于含 1 mol/L NaCl 和 0.001 mol/L MgCl_2 、 CaCl_2 、 MnCl_2 ,pH 为 6.0 的 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(Buffer B)中,4 ℃ 透析 24 h。

1.5.2 ConA Sepharose 4B 亲和层析 将 ConA Sepharose 4B 装柱(15 mm $\times$ 200 mm),用 Buffer B 充分平衡,直到流出液 pH 为 6.0。将透析过的样品浓缩后上样,用 Buffer B 洗脱,流速为 45 mL/h,收集透过峰 ConA-1;将 ConA-1 浓缩后,置于含 0.1 mol/L KCl 的 0.05 mol/L pH 7.0 的 Tris-HCL 缓冲液(Buffer C)中,4 ℃ 透析 24 h。柱材料用含质量分数 2% α -甲基甘露糖苷的 Buffer B 完全洗脱,保存。

1.5.3 Heparin Sepharose Cl 6B 亲和层析 将 Heparin Sepharose Cl 6B 装柱(15 mm $\times$ 200 mm),用 Buffer C 充分平衡。将透析过的 ConA-1 浓缩上

样,用 Buffer C 洗脱,流速为 30 mL/h,直到透过峰(HE-1)完全被洗脱。再用含 1.0 mol/L KCl 的 Buffer C 对其进行洗脱。收集 HE-2 峰。

经活性玫瑰花环抑制试验(Ea-RIT)检测,HE-2 有活性。将 HE-2 用过滤器进行浓缩,用去离子水于 4 ℃充分透析 24 h,分装,−20 ℃保存。

1.6 EPF 分离纯化结果的检测

对上述各步获得的目标产物进行 SDS-PA GE 电泳^[3],检测 EPF 的相对分子质量,分离胶和浓缩胶质量浓度分别为 150 和 50 g/L。

1.7 EPF 等电点的测定

采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法检测 EPF 的等电点,凝胶质量浓度为 50 g/L,载体两性

电解质的 pH 为 3.5~9.5 (Sigma),标准品为 Sigma 产品。

2 结果与分析

2.1 肉牛血清中 EPF 活性的检测

花环抑制滴度 RIT 值以玫瑰花环数低于对照组 75%的最高血清稀释倍数的对数计算,由 RIT 值评价 EPF 的活性。由表 1 可知,孕期为 1~2 月的 5 头肉牛 RIT 的平均值为 8.6,孕期为 3~5 月的 4 头肉牛 RIT 的平均值为 9.0,孕期为 6~9 月的 2 头肉牛 RIT 的平均值为 8.0,而对照组肉牛 RIT 的平均值为 3。怀孕肉牛与未怀孕肉牛 RIT 值差异显著($P<0.05$),表明怀孕肉牛的 EPF 具有活性。

表 1 不同孕期肉牛血清的 EPF 活性

Table 1 Activity of EPF in pregnant beef cattle serum

孕期/月 Pregnancy period	样本数 Simple number	不同稀释度花环抑制滴度 RIT of different dilution										RIT 平均值 Mean value
		2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	
1~2	5								2	3		8.6±0.55 a
3~5	4								1	2	1	9.0±0.82 a
6~9	2								2			8.0±0.00 a
对照 Control	4		1	2	1							3.0±0.82 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note:The same column marked with different lowercase letters indicates significant difference($P<0.05$).

2.2 孕牛血清中 EPF 的分离与纯化

2.2.1 DEAE-52 离子交换层析 由图 1 可见,孕牛血清通过 DEAE-52 离子交换层析后,共出现 DE-

1、DE-2、DE-3、DE-4 4 个峰。Ea-RIT 检测发现,DE-1 和 DE-2 合并峰有 EPF 活性。

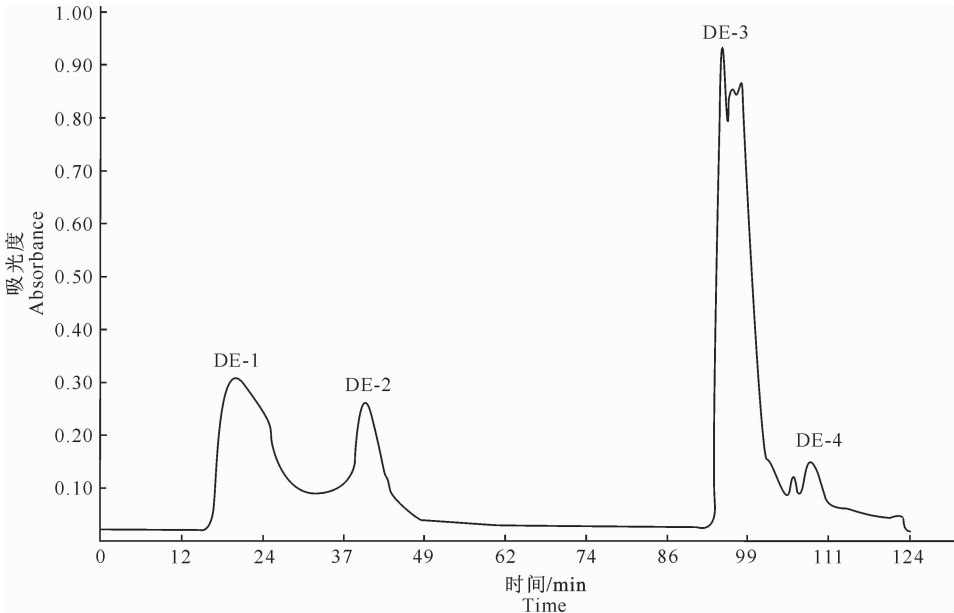


图 1 孕牛血清 EPF 的 DEAE-52 离子交换层析分析

Fig.1 Results of EPF ion-exchange chromatography of pregnant bovine serum at DEAE-52

2.2.2 ConA Sepharose 4B 亲和层析 DE-1 和 DE-2 合并后,经 ConA Sepharose 4B 亲和层析分

析,共出现了 2 个峰。Ea-RIT 检测表明,第 1 个峰即 ConA-1 峰是活性峰(图 2)。

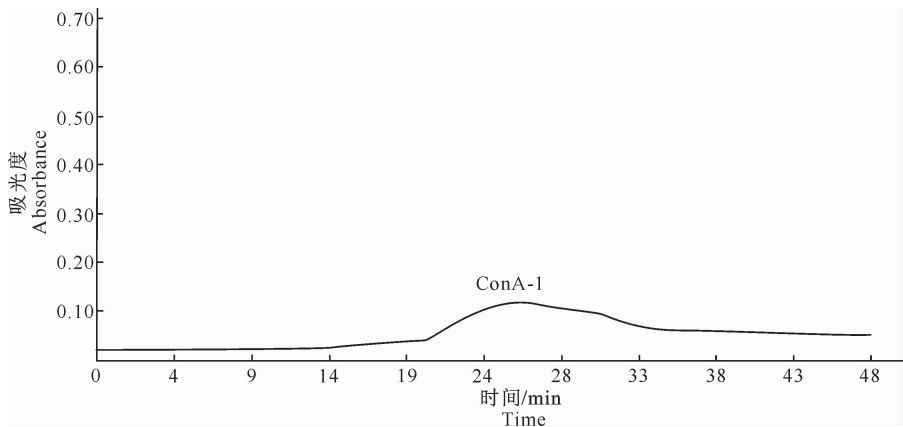


图 2 DE-1、DE-2 峰液的 ConA Sepharose 4B 亲和层析分析

Fig. 2 Results of affinity chromatography of DE-1 and DE-2 at ConA Sepharose 4B

2.2.3 Heparin Sepharose Cl 6B 亲和层析 如图 3 所示,ConA-1 峰液通过 Heparin Sepharose Cl 6B 亲和层析后,出现了 HE-1 和 HE-2 2 个峰。RIT 检测表明,HE-2 有 EPF 活性。

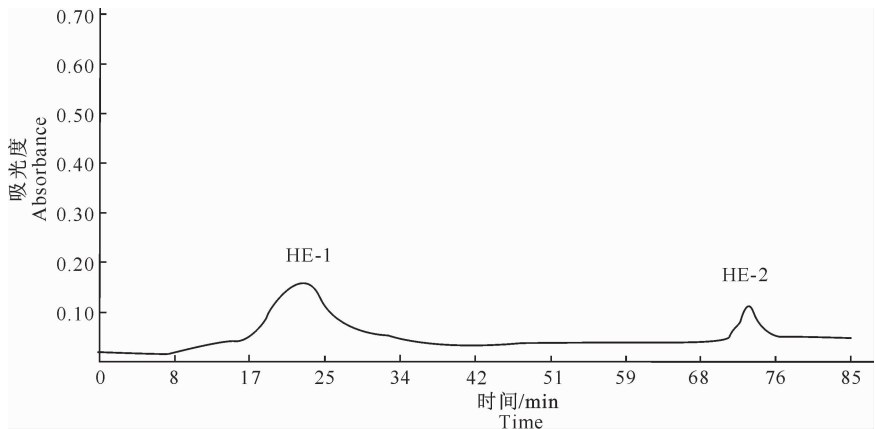


图 3 ConA-1 峰液的 Heparin Sepharose CL 6B 亲和层析分析

Fig. 3 Results of affinity chromatography of ConA-1 at Heparin Sepharose CL 6B

2.3 EPF 分离纯化结果的检测

SDS-PAGE 电泳结果(图 4)显示,孕牛 EPF 分离纯化效果较好,其分子质量为 53.6 ku。

2.4 EPF 等电点的测定

通过聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法,测得分离纯化后的 EPF 的等电点为 6.8。

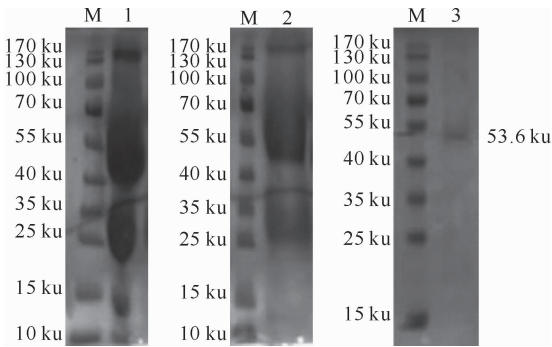


图 4 EPF 分离纯化产物的 SDS-PAGE 电泳分析
M. 蛋白 Marker;1. DE-1、DE-2 峰液合并物;
2. ConA-1 峰液;3. HE-2 峰液

Fig. 4 Purified EPF analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
M. Maker;1. Mixture of DE-1 and DE-2;
2. Mixture of ConA-1;3. Mixture of HE-2

3 讨 论

随着生物技术在畜牧业生产中的应用,超早期妊娠诊断、胚胎的存活及其活力评价、早期胚胎丢失原因分析等显得尤为重要,早孕因子 EPF 的发现为其提供了可能。EPF 作为妊娠诊断的超早期生化指标,可以更早地明确妊娠状态。早孕因子的活性与胚胎状态密切相关,通过监测血清中 EPF 的变化,可以发现极早期的胚胎丢失,并可预测流产。另外,由于 EPF 具有生长调节作用,发生恶性肿瘤的时候血清中的 EPF 含量增加,因此还可以用来鉴别良、恶性滋养细胞肿瘤。

目前,通过 Ea 玫瑰花环形成抑制试验,测定 RIT 值判别 EPF 是否存在,是 EPF 检测的惟一方

法。但该方法繁琐,且灵敏度差,一般需要制备抗淋巴细胞白蛋白(ALS),检测 ALS 的最大稀释倍数^[14-15],用以计算 RIT 值。本试验通过检测抗淋巴血清的最大稀释倍数来计算 RIT 值,对传统的试验步骤进行了简化,使实验操作简单可行。

本试验结果显示,妊娠牛玫瑰花环抑制滴度显著高于对照组未妊娠牛。研究结果表明,玫瑰花环抑制滴度高于 8.0 即可确认肉牛已经怀孕,低于 4.0 可以认为未怀孕。因此使用此法早期确认牛是否怀孕是可行的。由于牛胚胎死亡以后,EPF 含量迅速减少,所以也可以用来检测胚胎的存活状态。

本试验对 EPF 的分离纯化方法进行了一定程度的改良,使操作更简便,效果更确实。DEAE-52 层析柱为阴离子交换层析柱,DEAE-52 为弱阴离子交换柱,柱材料本身带正电荷,可与血清中的阴离子结合。EPF 等电点约为 6.8,在 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液环境中,带弱负电荷,其随起始缓冲液首先被洗脱,因此 EPF 主要存在于透过峰中。而血清中含量最多的清蛋白的等电点约为 4.0,带负电荷较多,与柱材料结合紧密,因此在洗脱液中增加 NaCl 浓度时才能被洗脱下来,其主要存在于结合峰中,通过 DEAE52 层析柱能除去约 80% 的血清杂蛋白^[16]。ConA sepharose 4B 和 Heparin sepharose Cl 6B 均为亲和层析柱材料,亲和层析是以偶联亲和配基的亲吸附介质为固定相,对目标产物进行亲和吸附,使目标产物得到分离纯化的液相层析法^[16]。ConA 是一种植物凝集素,能识别细胞膜中的糖蛋白和糖肽并与其特异性结合,故常用于分离糖蛋白、糖脂、多糖等。在孕血清中存在许多种妊娠相关蛋白和激素,其中很多为糖蛋白,如绒毛膜促性腺激素(hCG)、 α_2 -巨球蛋白等,其在经过 ConA sepharose 4B 柱时被吸附,即使这些糖蛋白得以去除,含有 EPF 的蛋白质混合液被洗脱下来,因此 ConA-1 应该具有 EPF 活性^[16]。Heparin Sepharose Cl 6B 亲和柱常用于分离纯化凝血因子、激素、干扰素等。经过 Heparin Sepharose Cl 6B 柱后,EPF 可与 Heparin 结合而存在于结合峰中,因此需提高离子浓度才可被洗脱下来^[16]。

经过 Heparin Sepharose Cl 6B 柱后,活性峰 HE-2 经 SDS-PAGE 出现 1 条条带,相对分子质量为 53.6 ku。不同动物的 EPF 样品,其分子大小亦不相同。Wilosn 等^[17]从妊娠 3~8 周的母羊血清中,通过离子交换层析和 HPLC 得到了 2 种具有 EPF 活性的多肽,其分子质量分别为 20 和 67 ku,

其中前者玫瑰花环抑制活性高于后者。Cavanagh^[18]体外培养小鼠发情期卵巢和输卵管并用激素诱导,通过免疫吸附、制备等电聚焦电泳和凝胶过滤的方法,从培养物中纯化到 21 ku 的多肽。Mehra 等^[19]从妊娠 5~12 周的孕妇血清中提取到有 EPF 活性的多肽成分,其分子质量为 21.5 ku。1996 年,Cavanagh^[20]报道,孕妇 EPF 的分子质量约为 10.84 ku。本研究参考文献[1]的方法,通过离子交换层析和亲和层析对牛 EPF 进行了分离纯化,获得的 EPF 分子质量为 53.6 ku,等电点为 6.8。

[参考文献]

- [1] Morton H, Hegh V, Chunie G J A. Immunosuppression detected in pregnant mice by the rosette inhibition test [J]. *Nature*, 1974, 249(456): 459-460.
- [2] Morton H, Rolfe B E, Cavanagh A C. Early pregnancy factor [J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1992, 10: 72-82.
- [3] Ito K, Takahashi M, Kawahata K, et al. Supplementation effect of early pregnancy factor positive serum into bovine *in vitro* fertilization culture medium [J]. *Rrod mmunol*, 1998, 39(6): 356-361.
- [4] Athanasas-Platsis S, Morton H, Dunglison G F, et al. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice *in vivo* [J]. *J Reprod Fertil*, 1991, 92: 443-451.
- [5] Athanasas-Platsis S, Corcoran C M, Kaye P L, et al. Early pregnancy factor is required at two important stages of embryonic development in the mouse [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2000, 43: 223-235.
- [6] Noonan F P, Halliday W, Morton Clunnie G I A. Early pregnancy factor is immunosuppressive [J]. *Nature*, 1979, 278: 649-651.
- [7] Cheng S J, Zheng Z Q. Early pregnancy factor in cervical mucus of pregnant women [J]. *Reprod Immunol*, 2000, 51(2): 102-105.
- [8] Esnglebreetsen D R, Gamham B, Alewood P F. A cassette ligation strategy with thioether replacenebt of three Gly-Gly peptide bonds: Total chemical synthesis of the 101 residue protein early pregnancy factor [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2002, 67(17): 5883.
- [9] Fetcher B H, Cassad A I, Summers K M, et al. The murine chaperonin 10 gene family contains an intronless, putative gene for early pregnancy factor, Cpn10-rsl [J]. *Mamm Genome*, 2001, 12(2): 133.
- [10] Morton H, Tinneberg H R, Rolfe B E, et al. Rosette inhibition test: A multicentre investigation of early pregnancy factor in humans [J]. *J Reprod Immunol*, 1982, 4: 251-261.
- [11] Zhang B, Harness J, Somodevilla-Torres M J, et al. Early pregnancy factor suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats with myelin basic protein and in SJL/J mice with myelin proteolipid protein peptide [J]. *Neuro Sci*, 2000, 182(1): 5-15.

(下转第 54 页)