

文章编号:1005-8737(2000)01-0025-06

鲤血清转铁蛋白的纯化及其与铁离子的结合特性

龙 华¹, 曾 勇¹, 刘曼西²

(1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 荆州 434000; 2. 华中理工大学 生物系, 湖北 430074)

摘 要:用硫酸铵分级沉淀法及制备性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法, 获得含有鲤(*Cyprinus carpio*)血清转铁蛋白(Tf)的 PAG 条带, 同时除去 SDS 及考马斯亮蓝, 分离纯化了转铁蛋白, 并做铁离子结合试验及光谱分析。结果表明, 转铁蛋白结合铁离子后的特异吸收峰为 467 nm, 说明, 去 SDS 后转铁蛋白仍有很强的铁离子结合能力。用普通 SDS-PAGE 法测得鲤血清 Tf 分子量约为 74 000 Dalton。

关键词:鲤; 血清; 转铁蛋白; 纯化; 铁离子

中图分类号:Q959.468

文献标识码:A

转铁蛋白(Tf)是血清中一种重要的含糖基 β -球蛋白, 每个分子可逆地结合 2 个铁离子(Fe^{3+}), 即结合 Fe^{3+} 量为 2 mol/mol Tf。其主要生理功能是将血液中的铁运输到机体的需铁部位^[1]。自 Laurell 等^[2]首先从猪的血清中发现 Tf 以来, 人们又先后发现了乳 Tf(哺乳类)和卵 Tf(鸟类)等多种形式的 Tf。Davis 等^[3]研究了这种铁链蛋白的铁结合特性, Fletcher 等^[4]研究了 Tf 传递铁的功能。80 年代以来, 人们对不同种属 Tf 的结构与功能做了大量研究, 从而证实了 Tf 结合铁、传递铁的生理功能^[5]。Tf 与铁和氧的运输关系密切, 是细胞生长和增殖所必需的生长和调节因子。

由于铁原子的电子结构特点, 它在氧化还原作用下能产生可逆变化, 以 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 形式存在, 并在细胞及组织中参与许多重要的生理生化过程, 包括从呼吸到核苷酸的合成等。在动物体内, 铁离子除了存在于载体糖蛋白(如血清 Tf、乳 Tf 等)结合成的复合物以外, 大部分存在于血红蛋白、肌红蛋白、铁蛋白、细胞色素、含铁血黄素及含铁酶类等色蛋白中^[6], 铁离子在机体内起到物质的量和能量双

重平衡作用。由于鱼类血清 Tf 与鱼类耐低氧的生理功能密切相关, 研究鱼类血清 Tf 的 Fe^{3+} 结合特性, 对了解鱼类在低溶氧条件下的行为和生理功能十分重要。本文通过纯化鲤血清 Tf, 研究 Tf 的 Fe^{3+} 结合特性, 并对 Tf 调节铁离子平衡和能量平衡的作用做了探讨。

1 材料与方法

1.1 血清样品

鲤自本所试验场获得。血清制备方法见龙华等^[7]的方法。硫酸铵分级沉淀及铁离子结合实验前, 血清样品需用 0.1 mol/L FeCl_3 饱和 Tf, 形成 $\text{Fe}^{3+} - \text{Tf} - \text{CO}_3^{2-}$ 红色三元配合物或称为复合物, 并保持 Tf 的生理活性和电泳行为。制备好的血清于冰箱 4℃ 保存备用。

1.2 化学试剂

牛血清白蛋白(BSA), 分子量 67000, 华美生物工程公司产; 标准分子量蛋白质混合样品及电泳所需试剂(Acr、Bis、TEMED、SDS、考马斯亮蓝 R250、甘氨酸及溴酚蓝等), 美国 BIO-RAD 公司产; 其它试剂均为国产分析纯(标准蛋白分子量为: 兔肌磷酸化酶 97 400, 牛血清白蛋白 66 200, 鸡卵清蛋白 42 699, 牛碳酸酐酶 31 000, 大豆胰蛋白酶抑制剂 21 500, 鸡卵清溶菌酶 14 400。单位: Dalton)。

收稿日期: 1999-04-16

基金项目: 农业部“948”资助项目(983094)

作者简介: 龙华(1964-), 男, 湖北荆州人, 中国水产科学研究院长江水产研究所, 硕士, 从事鱼类分子生物学、鱼类种质资源研究。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

按沈志民及 Barrett、Wyckoff 等^[8~10]方法。电极缓冲液为 Tris(0.025 mol/L) - 甘氨酸(0.192 mol/L) - SDS 缓冲系统(pH 8.3)。PAGE 采用双层胶,分离胶质量分数为 10%,梯度凝胶质量分数为 7.5%~15%,浓缩胶质量分数为 3.75%,血清及 Tf 样品点样量分别为 5 μ l 和 10 μ l,电压为 100 V,时间为 5 h。样品缓冲液:10 ml 水溶液中含 0.15 g Tris、0.4 g SDS、0.02 g 溴酚蓝、1 ml β -巯基乙醇、2 ml 甘油, -20℃ 保存,使用时等体积加入。

1.4 制备性 SDS-PAGE 及蛋白质回收法

制备性 SDS-PAGE 方法与上述方法相同,凝胶厚度为 3 mm。SDS-PAGE 也采用双层胶,分离胶质量分数为 10%,浓缩胶质量分数为 3.75%,血清点样量为 800 μ l,同时加等体积溴酚蓝指示剂,电压 60 V,时间 5 h。电极缓冲液为 Tris(0.025 mol/L) - 甘氨酸(0.192 mol/L) - SDS 缓冲系统(pH 8.3)。其它溶液同上。蛋白质回收法按傅国平^[11]方法改进。将电泳洗脱液用 PEG-6 000 浓缩、20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.8) 缓冲液透析,置 4℃ 保存备用。

1.5 鲤血清硫酸铵分级沉淀

按邹福强等^[12]方法。将制备好的约 30 ml 鲤血清用 0.1 mol/L FeCl_3 溶液饱和^[13],再用硫酸铵分级沉淀法将鲤血清分别做成硫酸铵的饱和度为 40%、50%、60%、70% 和 80% 等 5 个组,操作均在 4℃ 下进行。每次沉淀后需用氨水调血清样品的 pH,使保持为 7.5。加入氨水及固体硫酸铵后,血清样品体积略有增加,在下一次加入固体硫酸铵之前,需重新量体积。每次用硫酸铵沉淀并调 pH 后,置于冰箱 4℃,时间分别是 10、20、30 min 和 1、12 h。然后,于 4℃、10 000 r/min 离心 20 min,取上清液进行下一步分级沉淀。SDS-PAGE 前用 20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.8) 缓冲液透析去除盐离子。离心所得到的沉淀,用 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8) 缓冲液溶解,缓冲液体积(V, ml)与样品重量(W, g) 比约为 2/1(V/W),再用 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8) 缓冲液透析去除盐离子。取分级沉淀组份各 5 μ l,用 7.5%~15% 的梯度 SDS-PAGE 分带分析,以 BSA 做蛋白分子量标准。

1.6 蛋白质样品铁离子结合试验及检测

将蛋白质样品用 0.1 mol/L FeCl_3 溶液饱和(提供 Fe^{3+}),检测样品的铁离子结合作用;加入 0.1

mol/L 柠檬酸溶液后(接受 Fe^{3+}),检测样品的铁离子释放作用。用 Beckman Du-7 紫外仪检测蛋白样品,并对纯化的蛋白样品进行 200~600 nm 波段扫描,打印扫描曲线。

1.7 鲤血清转铁蛋白的纯化及分子量测定

将硫酸铵分级沉淀处理后的血清 Tf 样品,分 3 次用 10% 制备性 SDS-PAGE 方法纯化,每次电泳点样量约 800 μ l。用电泳洗脱法除去 SDS 及考马斯亮蓝后,合并洗脱液(含 Tf 样品),经 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8) 缓冲液透析和 PEG-6 000 浓缩后(4℃),将最后浓缩样品(约 0.5 ml)仍以 0.1 mol/L FeCl_3 溶液饱和,用 10% SDS-PAGE 测 Tf 分子量,并用鲤血清样品和标准蛋白质作对照,测定鲤血清 Tf 分子量。

2 结果与分析

2.1 鲤血清分级沉淀结果

鲤血清分级沉淀组份 SDS-PAGE 分带见图 1。由图 1 和资料^[7,14]得知,鲤血清 Tf 主要存在于 50%~70% 的组份中,而且 60% 组份的含量最多。将 3 个组份的样品原液合并,经 PEG-6 000 浓缩,20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8) 缓冲液透析(4℃),用 0.1 mol/L FeCl_3 溶液饱和后,样品溶液呈橙红色,此时体积约为 2.5 ml(置 4℃ 保存)。

2.2 鲤血清蛋白纯化结果

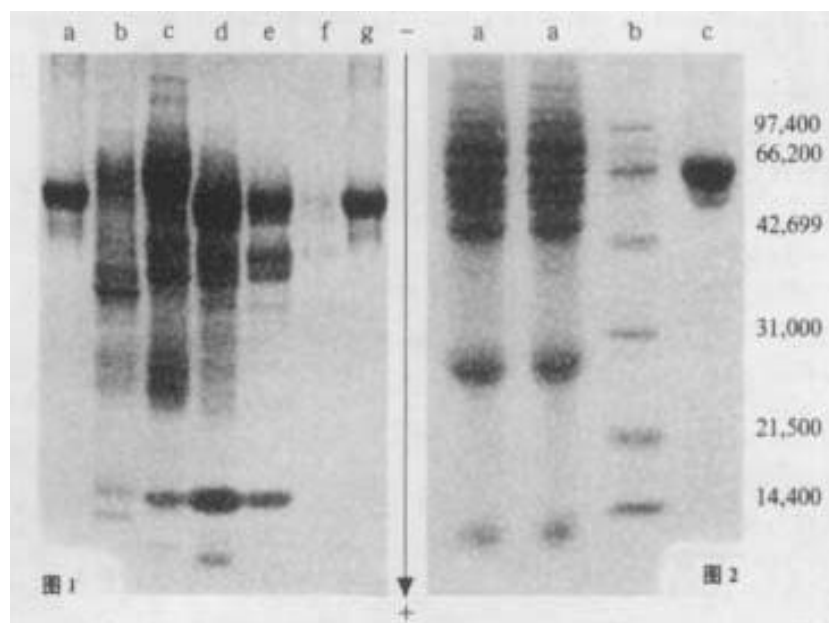
鲤血清蛋白纯化样品(Tf)的 SDS-PAGE 图及分子量见图 2 及表 1。结果测得鲤血清 Tf 分子量约为 74 000 Dalton。70 年代,Valenta 等用其它方法测出鲤血清 Tf 分子量是 70 000 Dalton^[15]。由于 SDS-PAGE 方法分离纯化蛋白质纯度高、分带清晰,故测出的分子量较其它方法可靠。

2.3 鲤血清转铁蛋白样品的光谱分析

Tf 的特异吸收光谱是 Tf 结合铁离子(Fe^{3+})后的反映^[28],脱铁 Tf 是无色的,含铁 Tf 呈橙红色。按侯宪玉等^[14]的方法 Tf 样品进行波段扫描时,有 280 nm 及 467 nm 2 个明显吸收峰。280 nm 吸收峰是蛋白质的吸收峰,加入柠檬酸溶液(接受 Fe^{3+})后,467 nm 吸收峰消失,而且橙红色不明显;再加入 FeCl_3 溶液(提供 Fe^{3+}),467 nm 峰再现,橙红色明显。这表明用电泳洗脱法纯化、并除去 SDS 及考马斯亮蓝的 Tf 样品有可逆结合 Fe^{3+} 的生理活性,结合 Fe^{3+} 后的特异吸收峰为 467 nm(图 3)。由表 2 可知,Tf 结合铁后的特异吸收峰在 400~500 nm,

这与 Fe^{3+} 吸收可见光的特性有关。因此, Tf 的特定吸收光谱可以作为 Tf 具有生理活性的特征之一。

而且, 鱼类血清 Tf 结合铁离子的特性与氧的传递及鱼类呼吸密切相关。



a, g. BSA, b, c, d, e, f 分别是 40%、50%、60%、70% 和 80% 的组份。

图 1 鲤血清分级沉淀组份 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE of the grade subsidence components of *C. carpio* serum

Standard protein molecular weight; c. 纯化的 Tf 样品, Purified Tf sample.

图 2 鲤血清蛋白纯化样品(Tf)的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE of the purified sample (Tf) of *C. carpio* serum

a. 鲤血清样品, Serum sample of *C. carpio*; b. 标准蛋白分子量,

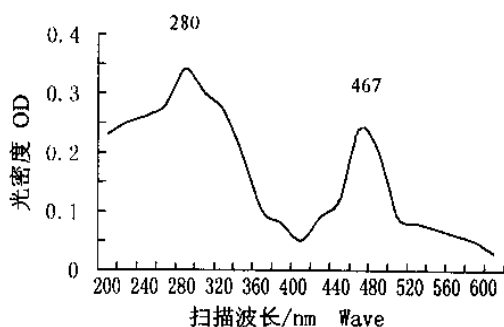


图 3 鲤血清 Tf 样品波段扫描图

Fig.3 Waveband scan drawing of purified sample (Tf) of *C. carpio* serum

3 讨论

3.1 转铁蛋白分子量及其分子的形成

Greene 等^[31]认为, 现代脊椎动物的 Tf 是由分子量约为 40 000 的含单个铁结合部位的原始祖先基因在进化过程中重复而成。Martin 等^[17]从头索类动物海鞘的血浆中分离纯化到分子量约为 41 000

的含单一铁结合部位的 Tf。Palmour 等^[18]从加利福尼亚盲鳗血清中分离到 1 种分子量为 45 000 的单一铁结合位点的 Tf 分子。它们都是原始的脊椎动物, 本实验结果支持这一观点。MacGillivray 等^[32]则假设, 现代 Tf 的最原始祖先基因可能表达分子量为 20 000 的蛋白质, 只有比较弱的铁结合能力。冯佑民等^[16]从青岛文昌鱼血清中分离出 1 种结合铁的“转铁蛋白”, 单体分子量为 25 300。它在溶液中以二聚体形式存在, 分子量为 52 000, 氨基酸组成分析发现其更接近两栖类和爬行类, 因而被认为可能是最原始祖先的 Tf。因此, 现代 Tf 在进化过程中, 由最原始祖先的 Tf(如文昌鱼的 Tf, 分子量 20 000 左右)基因经历第 1 次基因重复, 形成结合铁的部位尚不完善, 需要以二聚体(分子量 40 000 左右)的形式存在, 逐渐形成含 1 个完全的铁结合部位的 Tf(如海鞘 Tf), 后者再经历 1 次基因重复, 形成分子量约为 80 000 的、含 2 个铁结合部位的现代 Tf。这 2 种假设尚需得到更多的实验证明, 但至少表明脊椎动物 Tf 在进化初期有一共同的祖先 Tf 基

因。

表 1 不同种、属 Tf 分子量比较

Table 1 Comparison of transferrin molecular weights of different species and genus

种、属 Species, genus	分子量/Dalton Molecular weight	时间 Time	来源 Sources
文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri</i>	25 300(单体) 52 000(二聚体)	1990	[16]
海鞘 <i>Pyura stolonifera</i>	41 000	1984	[17]
盲鳗 <i>Myxine glutinosa</i>	45 000	1971	[18]
盲鳗 <i>M. glutinosa</i>	78 600	1972	[19]
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	70 000	1976	[15]
鲤 <i>C. carpio</i>	74 000	1999	本实验室
鲢 <i>Hypophthalmichthys moritrix</i>	72 300	1990	[8]
鲢 <i>H. moritrix</i>	77 600, 70 000	1991	[18]
河鲈 <i>Salmo trutta</i>	78 000	1970	[20]
黄鲈 <i>Fluta alba</i>	68 100	1991	[18]
鲃 <i>Barbus barbus</i>	74 000	1983	[21]
南鲃 <i>Barbus meridionalis petenya</i>	76 000	1983	[8]
人 Human	79 570	1983	[8]
人 Human	72 300	1990	[8]
猪 Swine	77 000	1987	[13]
猪 Swine	70 800	1990	[8]
牛 Cow	78 000, 72 000	1984	[8]
骆驼 Camel	73 000, 63 000	1988	[22]
大熊猫 <i>Ailuropoda melanleucus</i>	66 100	1990	[8]
鼠 Rat	74 000, 72 000	1982	[23]
水蛇 <i>Enhydris chinensis</i>	77 600	1990	[24]
水蛇 <i>E. chinensis</i>	70 800	1990	[8]
蟾蜍 <i>Bufo bufo asiaticus</i>	66 000	1991	[25]
蟾蜍 <i>T. orientalis</i>	71 000	1991	[25]
鸡 Hen (Otf, 卵转铁蛋白)	70 000	1982	[26]
鸭 Duck	69 500	1990	[8]
鸭 Duck	78 000	1988	[14]
螃蟹 Crab	150 000	1982	[27]

表 2 不同种、属 Tf 特异吸收峰比较

Table 2 Comparison on transferrin special absorbing peaks of different species and genus

种 属 Species, genus	特异吸收峰/nm Special absorbing peak	时间 Time	来源 Sources
人 Human	465	1991	[29]
猪 Swine	460	1991	[30]
大熊猫 <i>A. melanleucus</i>	408	1990	[8]
牛 Cow	414	1990	[8]
绵羊 Sheep	411	1991	[30]
骆驼 Camel	408	1991	[30]
鸭 Duck	465	1988	[14]
水蛇 <i>E. chinensis</i>	413	1990	[8]
家蛇 Common snake	405	1991	[30]
青蛇 Green snake	444	1991	[30]
蟾蜍 <i>B. bufo asiaticus</i>	411	1991	[25]
蟾蜍 <i>T. orientalis</i>	411	1991	[25]
鲢 <i>H. moritrix</i>	404.5	1990	[8]
黄鲈 <i>F. alba</i>	407.5	1991	[18]
文昌鱼 <i>B. belcheri</i>	500	1990	[16]
鲤 <i>C. carpio</i>	467	1999	本实验室

3.2 转铁蛋白的铁离子双重平衡作用

由于 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的理化特性差异,它们的最适配体不同, Tf 只能结合 Fe^{3+} , 且 Fe^{3+} (高能态) 和 Fe^{2+} (低能态) 在相互转化过程中, 有能量的释放和吸收。因此, Tf 在体内有调节铁离子平衡和能量平衡的作用^[6]。另一方面, Tf 作为铁离子的受体, 由于 Tf 表面的 Fe^{3+} 达到能量的最低限度^[33], Tf 结构域的能量可以转移到 Fe^{3+} 上。于是, Fe^{3+} 吸收可见光, 在可见光区 (400~500 nm) 发射, 是一种非放射性能量转移。因此, Tf 在体内有调节铁离子平衡和能量平衡的作用, 即 Tf 在机体中的铁离子交换的动力学不仅包括物质的量的变化, 也包括物质的能量转化。Tf 特异吸收峰的差异, 可能反映了 Tf 分子结合铁离子部位在结构上的差异。

在血液中, 铁通过铁离子 (Fe^{3+} 、 Fe^{2+}) 螯合剂, 形成 Fe^{3+} -Tf 复合物。同时, Tf 与细胞膜上的 Tf 受体结合, Fe^{3+} -Tf 复合物被吸附在细胞膜上。在氧化还原作用下, Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 相互转化, Fe^{2+} 进入细胞, 并与细胞中的 Fe^{2+} 受体——亚铁原卟啉结合, 继而生成血红蛋白。且 Fe^{3+} 的聚合趋势高, Fe^{2+} 的聚合趋势很低, 2 种铁离子在血清中的浓度需要不断地调节。由此可见, Tf 利用机体摄入的 Fe^{3+} , 并将 Fe^{3+} 传递到红细胞中, 与呼吸密切相关。在铁离子的传递与平衡以及能量的双重平衡过程中, 血清 Tf 起了重要作用, 因而 Tf 与鱼类耐低氧 (呼吸) 的生理功能关系密切。

3.3 鱼类血清转铁蛋白的应用前景

鱼类血清 Tf 的铁离子结合实验及光谱分析, 证明鱼类血清 Tf 具有传递铁离子的主要生理功能。在渔业生产中, 由于近年来鱼类生存环境不断受到破坏, 各种暴发性、传染性、大规模的鱼病不断出现, 运用这些分析数据, 不仅可以诊断鱼类血液生理功能缺陷的疾病, 也可以判断鱼类生存环境 (水体) 中影响鱼体吸收铁离子的因素, 对渔业生产及环境监测将会有很大帮助。

鱼类血清 Tf 基因是我国目前养殖鱼类中与渔业生产和鱼类育种关系最密切、最重要的基因之一。转铁蛋白除运输铁的功能外, 还具有热稳定性, 有调节细胞生长和抑制细菌生长等功能^[5]。将含有 Tf 基因的基因工程菌送入鱼肠道, 使其成为鱼肠道的固定菌群, 可不断给鱼类提供所需的 Tf, 促进鱼类生长、调节鱼类机体中铁离子平衡和能量平衡, 促进和调节鱼类生长, 有较强的应用潜力。由于 Tf 的抗菌

性, 转基因 (如 Tf 基因) 鱼中与抗菌性和保护性有关的基因分离将为抗病鱼的选育提供更强的优势。充分利用鱼类血清 Tf 的抗逆性能和基因工程技术, 增加池塘养殖密度, 提高水产养殖产量, 提高鱼类抗病性能, 选育出具有高产、优质和抗逆性能优良的品种, 为鱼类育种和渔业生产提供大量的基础材料和优良品种, 将开拓我国水产养殖业高产低耗、生物防治的新领域。同时, 对我国的养殖鱼类种质进行鉴定、筛选和保存, 建立鱼类优良基因的种质资源库, 会促进鱼类种质资源的开发与利用, 这对渔业生产有重要意义。

参考文献:

- [1] Aisen P. Iron transport and storage proteins[J]. Ann Rev Biochem, 1980, 49:357.
- [2] Laurell G B, Ingelman B. The iron-binding protein of swine serum[J]. Acta Chem Scand, 1947, 1:770.
- [3] Davis B, Saltman P, Benson. The stability constants of the iron-transferrin complex[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1962, 8:56.
- [4] Fletcher J, Huehns E R. Function of transferrin[J]. Nature, 1968, 218:1 211.
- [5] Saltman P, Hegenauer J. The Biochemistry and physiology of iron [M]. Section I: Structure and function of transferrins. New York: Elsevier Science Publishing Co, Inc, 1982. 3-97.
- [6] Scott T, Brewer M. Concise encyclopedia of biochemistry[M]. In: Jakubke H D, et al, eds. New York: Walter de Gruyter & Co. Berlin 30, 1983. 199-430.
- [7] 龙 华, 汤伏生, 曾 勇, 等. 淡水鱼类血清转铁蛋白遗传多态性研究[J]. 水产学报, 1996, 20(2):168-174.
- [8] 沈志民, 冯佑民, 吕鹤娟. 大熊猫血清转铁蛋白的分离纯化及性质[J]. 自然科学进展——国家重点实验室通讯, 1990, 1:62-67.
- [9] Barrett A J, et al. The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the $\alpha 2$ -macroglobulin molecule[J]. J Biochem, 1979, 181:401.
- [10] Wyckoff M, et al. Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate - containing buffer using multiphasic buffer system: Properties of the stack[J]. In: Valid Rf - measurement and optimized procedure. Anal Biochem, 1977, 73:459.
- [11] 傅国平. SDS-PAGE 中蛋白质回收方法[J]. 生命的化学, 1995, 15(3):41.
- [12] 邹福强, 梁意昭, 周桢林, 等. 基因操作技术[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1986. 1-5.
- [13] 冯佑民, 孙嘉琳, 董春香, 等. 转铁蛋白结构与功能的研究 I. 猪转铁蛋白的分离纯化及在无血清细胞培养中的应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1987, 19(4):322-327.
- [14] 侯宪玉, 冯佑民, 张友尚. 转铁蛋白结构与功能的研究——鸭血清转铁蛋白含单一铁结合部位的结构域的制备和鉴定[J]. 生物化学杂志, 1988, 4(3):244-251.
- [15] Valenta M, Stratil A, Slechtova V, et al. Polymorphism of

- transferrin in carp (*Cyprinus carpio* L.); Genetic determination, isolation, and partial characterization [J]. *Biochemical Genetics*, 1976, 14(1/2): 27-45.
- [16] 冯佑民, 张新堂, 冯敏绮. 青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) “转铁蛋白”的分离纯化和鉴定——一种最原始祖先转铁蛋白的可能形式[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22(2): 177-183.
- [17] Martin A W, et al. A mono-sited transferrin from a representative deuterostome: The Ascidian *pyura stolonifera* (subphylum urochordata)[J]. *Blood*, 1984, 64: 1 047.
- [18] 沈志民, 冷晓化, 冯佑民. 白鲢鱼与黄鳝血清转铁蛋白的分离纯化及其结构和性质的比较[J]. *生物化学杂志*, 1991, 7(3): 269-274.
- [19] Aisen P, Leibamn A, Sia Cho-Lu. Molecular weight and subunit structure of hagfish transferrin[J]. *Biochemistry*, 1972, 11(18): 3 461-3 464.
- [20] William K. Some physicochemical properties of transferrin in brook trout[J]. *Trans Amer Fish Soc*, 1970, 1: 207-218.
- [21] MacGillivray R T A, Mendezo E, Shewale J G, et al. The primary structure of human serum transferrin, The structure of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(6): 3 543.
- [22] 侯尧玉, 冯佑民, 张友尚. 转铁蛋白结构与功能的研究——骆驼血清转铁蛋白的分离纯化及其单一铁结合部位的结构域的制备和鉴定[J]. *生物化学杂志*, 1988, 4(4): 289-295.
- [23] Yoshikazu K, Kazuhito Y, Miho M, et al. The Biochemistry and physiology of iron[A]. In: Saltman P, et al. ed. Section I: Structure and function of transferrins[M]. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1982. 81-82.
- [24] 冯佑民, 冯敏绮, 张新堂, 等. 转铁蛋白结构与功能的研究 V. 水蛇血清转铁蛋白半分子的制备和鉴定[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22(3): 257-262.
- [25] 季瑞华, 冯佑民. 两栖类动物血清转铁蛋白的分离纯化和性质[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1991, 23(2): 146-149.
- [26] Robert C W, Anne B M, Christian R, et al. The Biochemistry and physiology of iron[A]. In: Saltman P, et al. ed. Section I: Structure and function of transferrins[M]. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1982. 43-48.
- [27] Martin A W, Heubers H A, Heubers E, et al. The Biochemistry and physiology of iron[A]. In: Saltman P, et al. ed. Section I: Structure and function of transferrins[M]. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1982. 79-80.
- [28] Brock J H. Transferrins, Metalloproteins [M]. HongKong: Macmillan Press, 1985. 183.
- [29] 王革新, 孙南翔, 王者鹏, 等. 人血浆转铁蛋白的分离与纯制[J]. *化学试剂*, 1991, 13(4): 244-247.
- [30] 张新堂, 季瑞华, 沈志民, 等. 转铁蛋白结构与功能的研究 VI. 不同种属动物血清转铁蛋白与人转铁蛋白受体和抗体结合能力以及其特异吸光谱的比较研究[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1991, 23(2): 134-139.
- [31] Greene F C, Freen R E. Physical evidence for transferrin as single polypeptide chains[J]. *Biochemistry*, 1968, 7: 1 366.
- [32] MacGillivray R T A, Brew K. Structure and evolution of serum transferrin[A]. In: Brown E B, et al. ed. Protein of Iron Metabolism[M]. New York, San Francisco, London: Grune and Stratton, 1977. 133.
- [33] George W B. The Biochemistry and physiology of iron[A]. In: Saltman P, et al. ed. Section I: Structure of transferrins[M]. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1982. 43-48.

Purification of transferrin in *Cyprinus carpio* serum and its iron-binding properties

LONG Hua¹, ZENG Yong¹, LIU Man-xi²

(1. Changjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. Department of Biology, Science & Industry University of Huazhong, Wuhan 430074, China)

Abstract: With the methods of ammonium sulfate grade subsidence and producing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the stripped polyacrylamide gel (PAG) of transferrin in *C. carpio* serum was obtained. Then SDS and Coomassie blue were eliminated from the serum and the transferrin in *C. carpio* serum was purified and the ferric iron binding test was performed. The SDS-PAGE spectrums of grade subsidence components and purified sample of *C. carpio* serum were analysed. The results show that the special absorbing peak of transferrin is at 467 nm for iron binding; the transferrin still has a stronger capability to bind iron ions after SDS was eliminated; the molecular weight of *C. carpio* serum transferrin is about 74 000 Dalton tested with normal SDS-PAGE method.

Key words: *Cyprinus carpio*; serum; transferrin; purification; ferric iron