

蓖麻凝集素(毒蛋白)的纯化及测定

喻梅辉 吴小兵* 苑建青* 窦强

(新疆八一农学院生物化学教研室)

文献报道,用各种方法从蓖麻籽中纯化了多种具有不同毒性和凝集活性的蛋白质^[1,2],作为研究细胞膜表面受体的探针及细胞培养时促进细胞分裂。又曾报道在蓖麻籽中分离出一种低毒性的对肿瘤细胞具有抑制作用的蛋白质^[3]。本文对新疆蓖麻中凝集素的纯化及其性质进行了初步测定。

一、方法和结果

1. 材料 蓖麻种子由我院遗传育种室冯祖寿教授提供

2. 粗凝集素的制备 按 Nicolson 和 Blau-stein 方法进行^[1]。取去壳蓖麻籽 100 克,加 250 毫升 0.01M, pH7.2 的磷酸缓冲液,内含 0.15M NaCl (下简称 P. B. S.) 浸泡过夜,用高速捣碎机 (1200rpm) 捣碎 3 分钟,加 4 倍体积 P. B. S. 4℃ 下搅拌抽提 6 小时,3000rpm 离心 30 分钟,取上清液,加硫酸铵至 40% 饱和度,冰箱放置过夜,3000rpm 离心 30 分钟,取透明液,补加硫酸铵至 80% 饱和度,冰箱过夜,3000rpm 离心 30 分钟,沉淀物溶于 50 毫升 PBS 中,先对流动自来水透析 12 小时,再对 PBS 透析至无铵离子,离心除去沉淀物,上清液即为粗凝集素。

3. 凝集素的分离纯化及鉴定

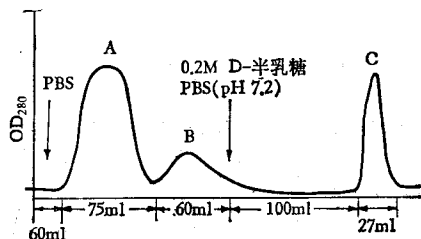


图1 粗凝集素的 Sepharose 4B 柱层析图

上柱量: 0.1 克蛋白 流速: 0.4 毫升/分

(1) 粗凝集素 10 毫升, 加入经 PBS 平衡好的 Sepharose 4B 柱 (3×30 厘米), 用 PBS 洗脱, 得 A, B 两峰, 后改用 0.2M 半乳糖 PBS 洗脱, 得 C 峰 (图 1)。

经动物毒性试验和血球凝集试验, 除 A 峰外, B、C 两峰均有毒性和凝集活性。

(2) 将 B、C 两峰分别用聚乙二醇 (分子量 12000) 浓缩 20 倍, 并对 PBS 透析平衡, 进行 Sephadex G-100 柱层析, 其洗脱曲线见图 2, 3。

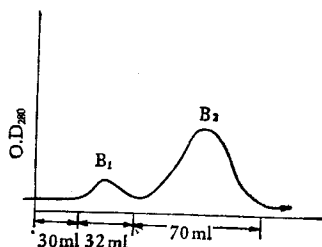


图2 B 峰的 Sephadex G-100 凝胶过滤图

柱: 2×60 厘米 流速: 0.3 毫升/分

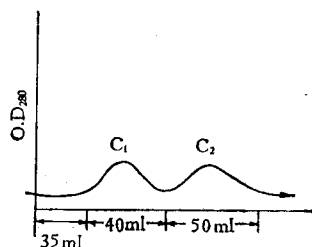


图3 C 峰的 Sephadex G-100 凝胶过滤图

柱: 2×60 厘米 流速: 0.3 毫升/分

(3) 将上述所得组份用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定均为一条带, 证明为均一的蛋白质 (图 4)。

* 我院生化师资班学员。

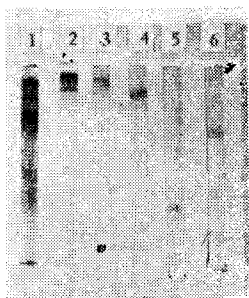


图4 不同组份的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

成层胶 3%, 分离胶 7%, 电极缓冲液为 pH 8.3 Tris-HCl 缓冲液, 1 为粗凝集素; 2 为 C₁ 峰; 3 为 C₂ 峰; 4 为 C₂ 峰; 5 为 B₁ 峰; 6 为 B₂ 峰。0.02 考马斯亮蓝 R-250 染色。

4. 凝集素的性质测定

(1) 半致死量 (LD₅₀) 的测定 按文献[4] 进行。取健康小白鼠 (体重为 20±1.5 克), 分四大组, 每组再分五小组 (每小组 4 只小白鼠) 分别注射 C₁、C₂、B₁、B₂。注射蛋白量按等比级数为 1.5 稀释, 注射量为 0.2±0.02 毫升/只小鼠, 观察 72 小时内小白鼠死亡情况, 求得, B₂ 的 LD₅₀ = 0.54 微克/20 克 (鼠重); C₁ 的 LD₅₀ = 59.3 微克/20 克 (鼠重), C₂ 的 LD₅₀ = 0.52 微克/20 克 (鼠重); B₁ 注射量增至 200 微克/20 克 (鼠重) 未见死亡。

(2) 凝集活性测定 取绵羊红血球, 用生理盐水洗三次, 配成 OD₅₂₀ (光程 1 厘米) 为 1.8 的红血球悬液, 作血球凝集试验。从图 5 可见 B₁ 不发生凝集, 其余均发生凝集。最低凝集浓度: C₁ 为 0.156 微克/毫升; C₂ 为 0.39 微克/毫升; B₂ 为 1.56 微克/毫升。

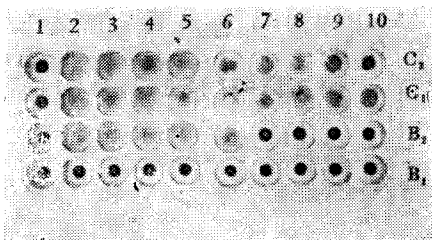


图5 B₁B₂C₁C₂ 对红血球凝集试验图

1. 空白对照 (0.5 毫升生理盐水); 2. 生理盐水及样品 B₁B₂C₁ 均为 0.025 微克/毫升; C₂ 为 0.02 微克/毫升, 3—10 均按 2 倍梯度稀释。各孔均加红血球悬液 0.5 毫升, 观察在室温下放置 3 小时后的结果。

(3) D-半乳糖对各凝集素的抑制凝集试验 由图 6 可见, D-半乳糖对 C₁、C₂ 的凝集活性均有抑制作用, 而对 B₂ 则无。

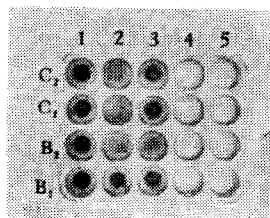


图6 D-半乳糖抑制试验图

1. 空白对照 (0.5 毫升生理盐水); 2. 生理盐水及样品 (蛋白量均为 0.025 毫克/毫升); 3. 同 2 再加入 D-半乳糖, 终浓度为 0.013M。各孔均加入 0.5 毫升红血球悬液, 观察 3 小时后的结果。4、5 为空孔。

(4) 分子量测定 按 T. G. Cooper 方法进行^[5], 得到标准曲线见图 7。

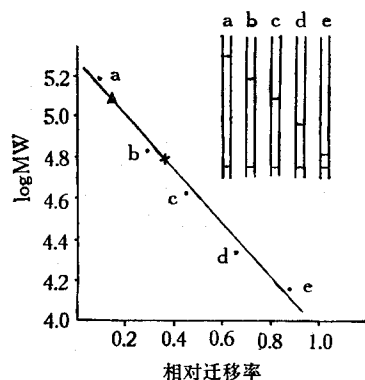


图7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳标准蛋白曲线图

凝胶 pH7.2 磷酸盐缓冲液, 内含 0.1% SDS 丙烯酰胺, 浓度为 10%。电极缓冲液为磷酸盐缓冲液。标准蛋白质用 1% 的 SDS 在沸水浴中处理 3 分钟。a 为 γ-球蛋白。b 为牛血清白蛋白、c 为卵清蛋白, d 为木瓜蛋白酶, e 为细胞色素 C; “△”: C₁, “×”: C₂ · B₂ (迁移率相同, 见图 8)。

再将 C₁、C₂、B₂ 各分两组, 一组加 1% SDS, 另一组加 1% SDS 及 1% 巯基乙醇, 在沸水中处理 3 分钟, 所得电泳图谱见图 8。

根据凝集素完整分子的相对迁移率, 从标准曲线求得 C₁ 分子量为 115,000, C₂ 分子量为 59,000, B₂ 分子量为 61,000。被巯基乙醇解链后, C₁ 的 A、B 链分子量为 27,000 和 34,000, 两者之和约等于 C₁ 完整分子的一半, C₂、B₂ 的 A、B 链分子量为 27,000 和 33,000。

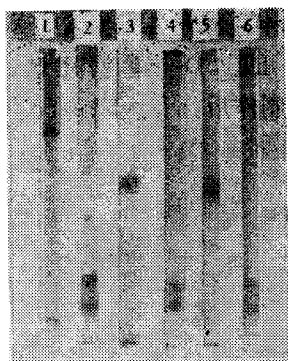


图8 样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图
条件同图7, 1、3、5 经 1% SDS 处理, 为完整的分子。2、4、6 经 1% SDS 及 1% 巯基乙醇处理为两种肽链。

(5) 分子组成特征 将 C_1 、 C_2 、 B_2 用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 分别按 Köiw E & Crömwall A 法^[6]和考马斯亮蓝 R-250 染色得

图9。

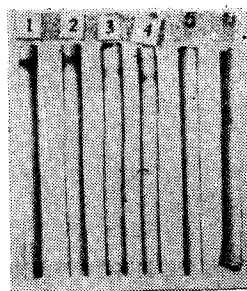


图9 样品经糖蛋白、考马斯亮蓝 R-250 染色图
电泳条件同图4。1、3、5 糖蛋白染色; B_2 (5)不着色; 2、4、6 考马斯亮蓝 R-250 染色。

(6) 氨基酸组成分析 纯化的凝集素, 用 5.7N HCl, 于 110°C 水解 24 小时, 用氨基酸自动分析仪测定, 结果如表 1。

表1 凝集素中氨基酸的组成及其含量(%)

凝集素 名称	氨基酸 种类																
	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Trp	Phe	Met	Pro	Cys*
C_1	5.88	1.47	7.35	13.24	5.58	2.94	13.24	10.29	10.29	4.41	10.29	14.71	—	—	—	—	—
C_2	2.24	1.04	6.72	13.93	5.86	4.48	11.90	7.93	7.59	7.01	7.93	11.55	4.31	4.13	1.72	2.41	0.17
B_2	2.33	1.09	1.40	13.91	5.91	3.89	10.73	7.78	9.02	7.00	7.62	11.20	9.64	—	—	1.87	—

* 由于水解时未对胱氨酸保护, 故半胱氨酸破坏。

二、小 结

本文用硫酸铵分级沉淀, Sepharose 4B 柱层析, Sephadex G-100 凝胶过滤等方法, 从新疆蓖麻籽中分离纯化出了三种具有不同毒性和血凝活性的蛋白质 (C_1 、 C_2 、和 B_2), 其分子量分别为 115,000、59,000、61,000, C_1 由四条肽链组成, C_2 和 B_2 均由 2 条肽链组成。毒性 $C_2 > B_2 > C_1$, 血凝活性 $C_1 > C_2 > B_2$ 且 D-半乳糖对 C_1 、 C_2 的血凝活性有抑制作用。

参 考 文 献

[1] Nicolson, G. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 266,

543, 1972.

- [2] 李士云等《生物化学与生物物理学报》13, 545, 1981。
[3] 陈海芳《第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》15, 1981。
[4] 《工业毒理学试验方法》, 上海科技出版社 1979 年 6 月。
[5] T. G. Cooper, *The tools of Biochemistry*, 1977.
[6] Köiw, E. et al.: *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, 4, 244, 1952.

[本文于 1982 年 8 月 17 日收到]

本文承何国协、郑世昌副教授提出宝贵意见, 胡冰、张建国同志参加部分工作, 李永超同志帮助照像, 一并致谢。