

神经组织特异 S-100 蛋白的分离提纯

王 尧 杜子威 李 斌 谈琪云 奚为乎

(苏州医学院脑神经研究室)

1965 年 Moore^[1] 自牛脑分离出一种高度酸性蛋白质,可溶于中性饱和硫酸铵,命名为 S-100 蛋白(S 代表可溶的,100 指硫酸铵的饱和度)。它广泛分布于爬虫类到哺乳类各种动物脑和人脑中,特异地存在于神经组织中。具有高度神经组织特异性和无种属特异性,可能与神经系统的特异功能有某种联系。

S-100 蛋白主要定位于胶质细胞^[2],可看作是胶质细胞的一种标记蛋白。已应用于神经元细胞和胶质细胞实验分离的监测、脑肿瘤病理学的鉴别诊断以及脑肿瘤细胞体外培养系的鉴定等方面^[3];近来,更有人探索它在病理条件下的变化,以期建立一种实验诊断方法^[3]。S-100 蛋白的研究在国内尚未见报道。本文仅报道分离提纯 S-100 蛋白的方法。

一、分离提纯的方法及结果

整个提取过程均在 4℃ 左右进行。

取新鲜猪脑,用冷生理盐水淋洗后,剥去软脑膜及表面大血管,分成每 100 克一份,加 55% 饱和度硫酸铵-0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.1 含 1mM EDTA 和 1mM 巯基乙醇) 300 ml,用高速组织捣碎机制成匀浆,10,000×g 离心 30 分钟,取上清在搅拌下徐徐加入硫酸铵结晶至 88% 饱和度,继续搅拌 40 分钟,用磷酸和浓氨水将 pH 调至 4.3,4℃ 冰箱放置过夜,12,000×g 离心 30 分钟,弃去上清,沉淀用二倍容积的 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.1, 含 0.05 M NaCl, 1 mM EDTA 1mM 巯基乙醇)溶解,装透析袋中,用相同的缓冲液透析至无 NH_4^+ 为止。离心除去不溶物,得粗提物。

取 DEAE-葡聚糖 A-50 溶胀后装柱(300

× 17mm), 用含 0.1 M 氯化钠的 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH7.1, 含 1mM EDTA 和 1mM 巯基乙醇)平衡后,加粗提物 80ml 左右,用含有 0.1、0.17、0.22 和 0.35M NaCl 的同一磷酸缓冲液分段洗脱,收集 0.22M NaCl-磷酸缓冲液洗脱峰(图 1),装透析袋浓缩(对聚乙二醇或葡聚糖 G-50)后进行凝胶过滤。

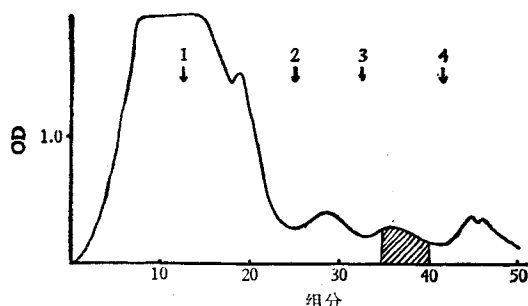


图 1 DEAE-葡聚糖 A-50 柱层析图

1, 0.1M NaCl-0.1M 磷酸缓冲液 2, 0.17 M NaCl-0.1M 磷酸缓冲液 3, 0.22M NaCl-0.1M 磷酸缓冲液 4, 0.35 M NaCl-0.1M 磷酸缓冲液。斜线区表示收集部分

凝胶过滤用葡聚糖凝胶 G-100(或G-200)层析柱 (1000 × 16mm), 以 0.1M 磷酸缓冲液平衡及洗脱,收集低分子量的主蛋白峰,即得 S-100 蛋白制品(图 2)。

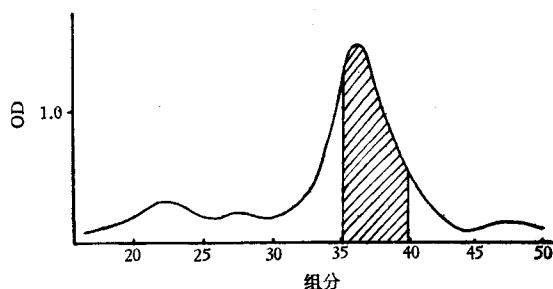


图 2 葡聚糖凝胶 G-100 柱层析图

斜线区表示收集部分

上述提取过程用板状聚丙烯酰胺凝胶电泳进行监测。使用 60 mM 甘氨酸-9.4 mM Tris-0.2mM EDTA 连续缓冲体系^[4],定电流 (6mA/16 × 9 × 0.1cm 胶板), 预电泳至电压不再升高后加样, 然后定电压 320V, 电泳至溴酚兰标记迁移 11cm 为止。Coomassie 兰 G-250/三氯乙酸液固定染色^[5], 7%乙酸漂洗。S-100 蛋白区带在溴酚兰位置。

蛋白定量采用 Bradford 的 Coomassie 兰染料结合法^[6]和 KaLlickar 法 (1.45 OD₂₈₀ — 0.74 OD₂₆₀ = mg/ml)^[7]。

二、S-100 蛋白制品的鉴定

1. 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Davis-Raymond 方法;分离胶 7.5%, 胶管 100×5mm, 用含有 10%蔗糖的样品液代替样品胶。Coomassie 兰 G-250 染色。电泳结果表明 S-100 制品仅显示一条区带 (图 3)。



图 3 S-100 蛋白的盘状电泳图

2. 醋纤膜等电聚焦电泳^[8] 用等电点电泳装置(日本常光株式会社)和 Separax-EF 醋纤膜(日本富士胶片公司)。两性电解质载体(Ampholine, LKB)的最终浓度为 4%, 按如下比例配制: pH 3.5—10, 1.4 ml; pH 4—6, 0.1ml; pH5—7, 0.1ml;pH9—11, 0.4ml 以及5%蔗糖 16ml。阳极液: 1% 磷酸;阴极液: 1% 乙烯双胺。电泳时逐步升高电压: 300V (30 分钟)、400V (30 分钟)、600V (30 分钟)、800V (60 分钟)。电泳后自一侧空白膜切下 2cm 宽的一条, 再切成 0.5cm 长小片, 分别用 0.5ml 双蒸水浸提后测 pH 值;其余电泳后醋纤膜用 Coomassie 兰 R-250 染色, 醋酸-酒精-水溶液脱色。电泳结果表明, S-100 蛋白制品呈现紧密相邻的两条区带, 在 pH 4.4 处(见封 2 图 4)。

3. 糖蛋白染色 S-100 蛋白制品经板状 PAGE 之后, 凝胶按 Mathieu 法^[9]行雪夫氏试

表 1 S-100 蛋白制品的氨基酸成分

氨基酸	本室	Uyemura	差 数
Ala	7.94	6.48	+1.46
Arg	1.46	0.63	+0.83
Asp	13.71	12.90	+0.81
Cys	/	0.90	/
Glu	19.92	16.42	+3.50
Gly	6.26	8.06	-2.04
His	3.02	4.34	-1.32
Ile	2.11	1.77	+0.34
Leu	9.94	12.15	-2.21
Lys	8.26	11.36	-3.10
Phe	5.72	6.18	-0.46
ro	0	0	0
Ser	6.05	6.72	-0.67
Thr	4.70	3.79	+0.91
Tyr	1.62	1.47	+0.15
Try	/	/	/
Val	6.80	5.80	+1.00
Met	2.50	1.58	+0.92

0 表示无 / 表示未测

剂糖染色, 结果阴性, 再置于 Coomassie 兰染液中复染, 仍可显示 S-100 蛋白区带。

4. 氨基酸分析 采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪。样品用 6N 盐酸(加巯基乙酸)于 110℃水解 24 小时。分析时实际取样 20μg/5μl。分析结果表明, 酸性氨基酸丰富、无脯氨酸为其特点(表 1)。

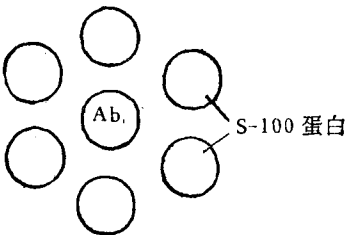
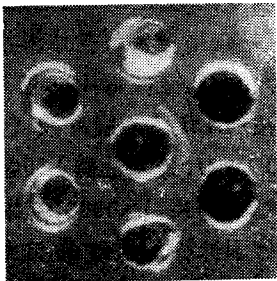


图 5 双向免疫扩散图
上: 实物 下: 示意图

5. 双向免疫扩散 用1%琼脂板, pH 8.6 巴比妥缓冲液(离子强度0.05)。上述猪脑 S-100 蛋白制品与抗牛脑 S-100 血清 (Uyemura)行双向免疫扩散,结果呈现单一沉淀带(图5)。

三、讨 论

分离提纯 S-100 蛋白,国外多用牛脑。根据文献报道,各种动物和人的 S-100 蛋白均有相同的抗原性,考虑我国实际情况,采用猪脑作原材料。双向免疫扩散中猪脑 S-100 蛋白与抗牛脑 S-100 血清产生免疫沉淀反应,证实猪脑和牛脑的 S-100 蛋白有相同的抗原性。

分离提纯 S-100 蛋白的方法,各家不同;本文基本参照 Isobe^[10] 的方法进行。有较为经济、易于控制、宜于大量制备等优点。

文献中监测 S-100 蛋白提取过程的方法很多,我们在预试验中比较了几种方法,认为淀粉胶电泳和聚丙烯酰胺-琼脂糖混合胶电泳灵敏性较差;不连续体系的盘状电泳在溴酚兰前沿易产生假阳性区带;SDS 电泳费时;双向免疫扩散则需要已知抗血清,均不够理想。我们参照 Erickson-Moore 的盘状 PAGE 的连续缓冲体系,改为板状 PAGE,作为监测工具,结果较满意。电泳后用 Coomassie 兰 G-250 染色,只染蛋白区带,胶不着色,区带清晰,勿需费时的脱色。据 Isobe 报道^[11], S-100 蛋白不是单一蛋白质,它包括 S-100_a 和 S-100_b (共占 85%)等。在某些电泳条件下,呈现一快泳成分和一慢泳成分^[12]。在本实验的板状 PAGE 条件下, S-100 蛋白在溴酚兰标记处亦呈现紧密相邻的两条区带;溴酚兰标记在染色过程中褪色消失,不影响对 S-100 蛋白区带的观察。

本制品的氨基酸分析结果,与 Uyemura^[12]

所报道的结果比较(见表1),除谷氨酸高3.5%,甘氨酸、赖氨酸及亮氨酸分别低2%、3%和2%以外,绝大多数氨基酸的测定结果均甚接近;富有酸性氨基酸和无脯氨酸为其共同特点。此外,我们未能测出胱氨酸,可能与未氧化有关。色氨酸及酰胺氮未测。

本制品在不连续体系的盘状电泳中呈单一区带,提示达到“电泳纯”;醋酸纤维素膜等电聚焦电泳测定其等电点为 4.4,与 Isobe 报道的结果接近;糖染色阴性,与文献报道结果吻合;此外,双向免疫扩散的结果提供了免疫学的支持。上述各点提示本文所述的自猪脑所提取的 S-100 蛋白制品基本提纯,可用于进一步研究。

对日本埼玉医科大学植村慶一 (Uyemura) 教授惠赠抗 S-100 蛋白血清,中国科学院生化所陈志明同志协助测定氨基酸成分,表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Moore B. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 739, 1965.
- [2] Ludwin S. K. et al.: *J. Neurochem.*, **165**, 197, 1976.
- [3] 王尧:《中国神经精神疾病杂志》, **8**(3), 186, 1982.
- [4] Erickson P. F. et al.: *J. Neurochem.*, **35**, 232, 1980.
- [5] 二军大附属长征医院《临床免疫学技术》 p. 112 上海 1980.
- [6] Bradford M. M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248, 1973.
- [7] Brewer J. M. et al.: *Experimental Techniques in Biochemistry* P. 328, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1974.
- [8] 朱凤清:待发表资料.
- [9] Mathieu J. M. et al.: *Anal. Biochem.*, **55**, 313, 1973.
- [10] Isobe T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 222, 1977.
- [11] 磯辺俊明:《神经研究の進歩》, **24**, 983, 1980.
- [12] Uyemura K. et al.: *J. Neurochem.*, **18**, 429, 1971.

[本文于 1982 年 11 月 3 日收到]

神经组织特异 S-100 蛋白的分离和提纯一文的图 4

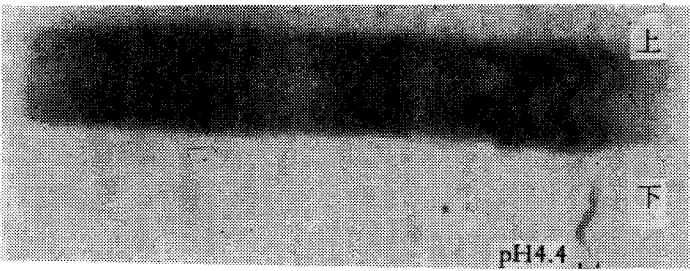


图 4 S-100 蛋白制品的醋纤膜等电聚焦电泳图
上: 血清(对照) 下: S-100 蛋白制品

低速离心法制备人红细胞影泡的
探讨一文的图 2—4

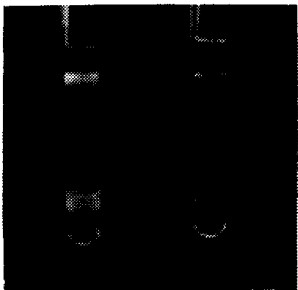


图 2 人红细胞影泡制剂经等密度离心的区带分布
左管为 10P7.4 高速离心法制得影泡
右管为 10P7.4 低速离心制得的影泡

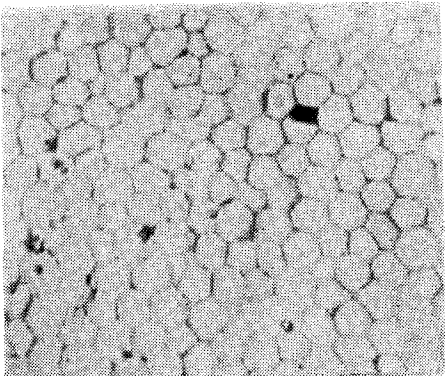
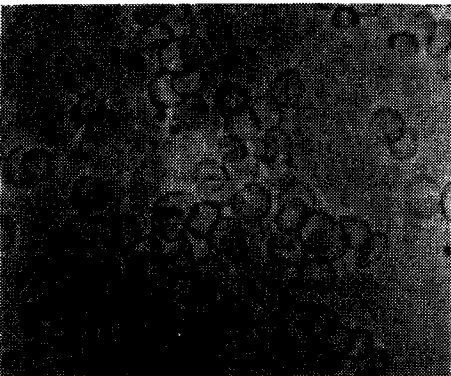


图 3 相差显微镜下人红细胞影泡的照片
甲: 分散时(800X) 乙: 密集时(1000X)

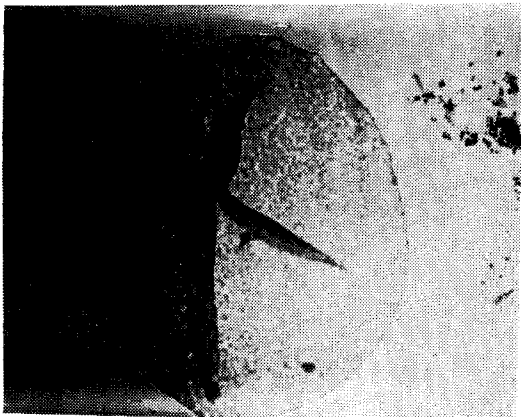


图 4 人红细胞影泡的电镜照片
甲: 10P7.4 制备的(7,900X) 乙: 重蒸水制备的影泡(6,100X)