

简便快速纯化人血清 α_1 -酸性糖蛋白的方法

陈志毅 薛 侃 吴亦英 赵学海

(蚌埠医学院生化教研室)

提 要

本文采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CCl_3COOH 沉淀, 及 Cibacron blue F3G-A-Sephadex G-100 凝胶柱层析, 经二步提纯了人血清 α_1 -酸性糖蛋白。PAGE 鉴定, 在阳极端仅显示一条蛋白带。Schiff 氏试剂染色阳性, 证实为糖蛋白。SDS-PAGE 测得其分子量为 45000。免疫电泳结果表明, 纯化的 α_1 -酸性糖蛋白与兔抗人全血清及兔抗人 α_1 -酸性糖蛋白均呈现单一沉淀弧。氨基酸组成测定亦与文献报告的结果基本一致。本方法简便、省时。

人血清 α_1 -酸性糖蛋白 (简称 α_1 -AGP) 是由肝脏合成的一种急性相反应蛋白。恶性肿瘤或急性炎症时, α_1 -AGP 在血液中的浓度常有明显增高^[1-3]。已表明 α_1 -AGP 能明显抑制人外周血淋巴细胞促进有丝分裂原的增生反应及混合淋巴细胞反应^[4], 但其免疫学作用机理仍不清楚。

血清 α_1 -AGP 的制备一般多采用乙醇或硫酸铵沉淀后, 用离子交换层析等进一步纯化^[5,6]。但由于血清中大量存在的白蛋白的干扰, 往往给纯化工作带来一定的困难。本文报告利用自己制备的 Cibacron blue F3G-A 染料偶联的 Sephadex G-100 凝胶, 经二步纯化得到免疫电泳纯的人血清 α_1 -AGP。本方法简便、快速。

结合力比 apoA1 大, apoA1 在 HDL 中结合不稳定这一性质, 用盐酸胍处理 HDL, 使 apoA1 从 HDL 中游离出来, 再经过一次 DEAE-Sephacrose CL-6B 柱就可得到 apoAII。经等电聚焦电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫电泳等鉴定, apoAII 制品的纯度达到电泳纯和免疫纯。另外, 此法便于同时制备 apoA1 和 apoAII。

根据 apoAII 分子量较小, 抗原性弱等特点, 我们通过调整免疫佐剂中石蜡油和羊毛脂的比例, 以及适当加大抗原量, 得到效价较高的抗血清。此外, 用火箭电泳法对自制 apoAII 抗血清和 Boehringer 的 apoAII 抗血清进行比较, 结果表明, 用本室自制 apoAII 抗血清, 抗血清用量少, 火箭峰清晰, 背景干净, 而 Boehr-

inger 的 apoAII 抗血清用量大, 形成的火箭峰从加样孔处开始呈烟囱状, 不形成峰尖, 琼脂糖板的背景深, 说明自制的抗血清优于 Boehringer 的抗血清。

参 考 文 献

- [1] Fager, G. et al.: *Arteriosclerosis*, 1981, 1, 273.
- [2] Miller, NE. et al.: *Amer. Heart J.*, 1987, 113, 589.
- [3] Kottke, BA. et al.: *Mayo Clinic Proc.*, 1986, 61, 313.
- [4] 胡师学等:《中华医学检验杂志》, 1986, 9, 143.
- [5] 黎 健等:《中华医学检验杂志》, 1987, 10, 198.
- [6] Lackner, KJ. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 703.
- [7] Schmitz, G. et al.: *J. Lip. Res.*, 1983, 24, 1021.
- [8] Mills, GL. et al.: *A guidebook to lipoprotein technique*, Amsterdam: Elsevier, 1984, 384.

[本文于 1988 年 6 月 6 日收到]

材料和方法

一、材料

1. 试剂 Cibacron blue F3G-A (Serva), Sephadex G-100 (Pharmacia), 蛋白质分子量标准品 (MW : 20 000—200 000, Boehringer Mannheim), 琼脂糖 (Serva), 双丙烯酰胺 (Sigma), 考马斯亮蓝 R-250 (B. D. H), 兔抗人 α_1 -AGP 抗血清 (Denmark), 其它试剂均为国内产品。

2. 血清(血浆) 取自正常献血员。

二、方法

1. Cibacron blue F3G-A-Sephadex G-100 凝胶制备 基本按 Böhme 方法^[7]。10 克 Sephadex G-100 于 350ml 蒸馏水中溶胀 24 小时后, 置 60℃ 水浴中, 搅拌下滴加 60ml 含 2 克 Cibacron blue F3G-A 的水溶液, 30 分钟后加 NaCl 45 克, 继续置 60℃ 水浴 1 小时后将水浴加热至 80℃, 投 4 克无水 Na_2CO_3 , 再继续放置 2 小时。完毕, 冷至室温, 用蒸馏水洗至流出液无色。以差数法计算染料的偶联率。

2. α_1 -AGP 的分离纯化 50—100ml 血清(血浆)置冰浴中, 搅拌下滴加等体积的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (420g/L) 和 CCl_3COOH (24.75g/L) 混合溶液, 搅拌 10 分钟后, $18000 \times g$ 离心 30 分钟, 取上清液浓缩后, 用 pH5.8 0.01mol/L 磷酸缓冲液充分平衡, 加于 Cibacron blue F3G-A-Sephadex G-100 凝胶柱 ($4 \times 16\text{cm}$) 上, 用平衡缓冲液流洗, 收集洗脱峰, 浓缩, 蒸馏水透析, 冷冻干燥, 即为纯化的 α_1 -AGP。

3. 纯度鉴定

(1) 免疫电泳 采用低电渗琼脂糖, 以巴比妥缓冲液 (0.05mol/L, pH8.6) 配成 1% 胶浓度, 电泳时恒压 10 伏持续 2 小时, 然后开槽, 在槽内加上兔抗人全血清和兔抗人 α_1 -AGP, 置 37℃ 保温 18 小时观察结果。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 PAGE 按 Davis 法^[8]; SDS-PAGE 按 Weber-Osborn 法^[9]。

(3) 糖蛋白染色, 参照 Glossmann 等方法^[10]。

(4) 氨基酸组成测定, 用日立 835 型氨基酸自动分析仪测定。

4. 其它 蛋白浓度测定。按 Lowry 法^[11], 以牛血清白蛋白为标准。

结 果

一、 α_1 -AGP 的纯化

图 1 为经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CCl_3COOH 混合

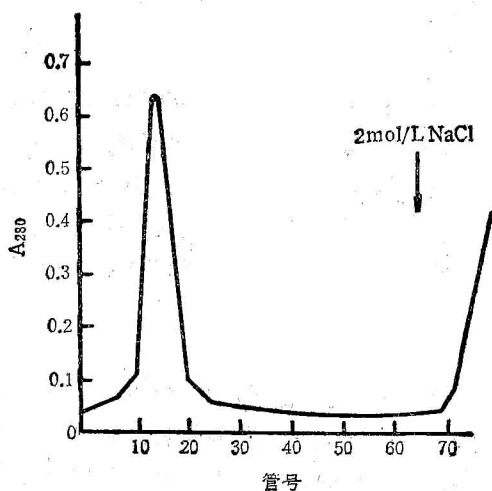


图 1 Cibacron Blue F3G-A-Sephadex G-100 层析图谱

柱 $4 \times 16\text{cm}$, pH5.8 0.01mol/L 磷酸缓冲液洗脱, 12ml/h

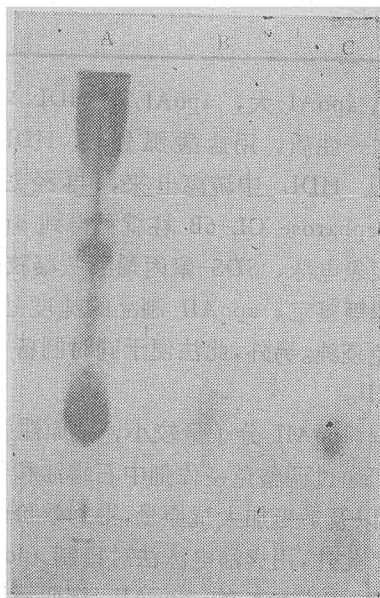


图 2 α_1 -AGP 聚丙烯酰胺凝胶电泳

(A) 人血清, (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 CCl_3COOH 沉淀后, (C) 纯化 α_1 -AGP

溶液沉淀后,部分纯化的人血清 α_1 -AGP 在 Cibacron blue F3G-A-Sephadex G-100 凝胶柱上的层析图谱。在 pH5.8 的条件下, α_1 -AGP 并不与染料结合而随空体积流出,形成一个对称的洗脱峰,而残留的少量杂蛋白被吸附于凝胶柱上。用平衡缓冲液继续洗脱时,未见另有洗脱峰出现。将该洗脱峰各管收集、浓缩,即为纯化的 α_1 -AGP。与染料结合的蛋白可用 2mol/L NaCl 溶液洗脱。凝胶经再生后可继续使用。

100ml 血清经二步提纯后,得 α_1 -AGP 纯品约 10mg。聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示,

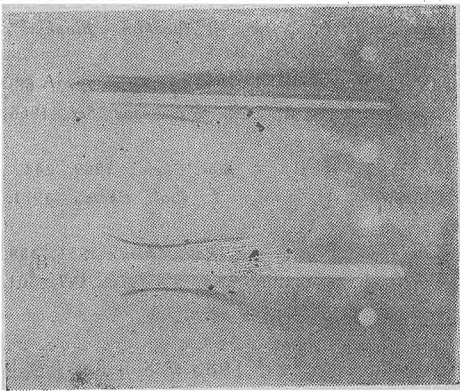


图3 α_1 -AGP 免疫电泳图谱
(A) 上孔: 正常人血清;下孔: 提纯的 α_1 -AGP;
槽内: 兔抗人全血清
(B) 上孔: 正常人血清;下孔: 提纯的 α_1 -AGP;
槽内: 兔抗人 α_1 -AGP 血清

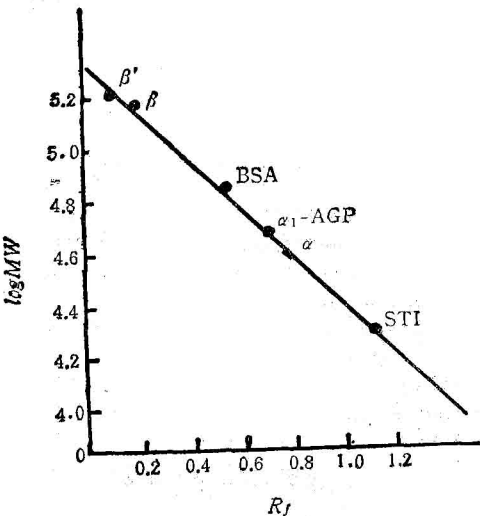


图4 SDS-PAGE 测定 α_1 -AGP 分子量

在阳极端仅显示一条蛋白带,并且与血清中此蛋白之迁移率一致(图2)。在免疫电泳中,纯化的 α_1 -AGP 与兔抗人全血清及兔抗人 α_1 -AGP 均呈现单一沉淀弧(图3)。

二、分子量测定

从 SDS-PAGE 测定 α_1 -AGP 的分子量。

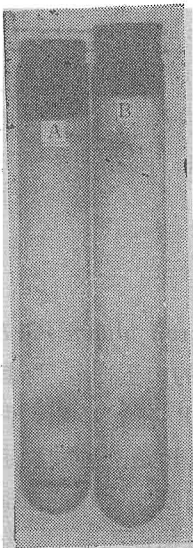


图5 α_1 -AGP 的糖蛋白
染色分析图谱
(A) 考马斯亮蓝 R-250 染色, (B)
过碘酸 Schiff 氏试剂染色

标准蛋白取大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI)、牛血清白蛋白 (BSA), 大肠杆菌聚合酶 (α 、 β 和 β'), 分别以蛋白质分子量的对数对聚丙烯酰胺

表1 α_1 -AGP 的氨基酸组成分析

氨基酸种类	残基数/分子
天冬氨酸	22.59(23)
苏氨酸	16.42(16)
丝氨酸	6.75(7)
谷氨酸	31.26(31)
脯氨酸	6.34(6)
甘氨酸	8.44(8)
丙氨酸	9.90(10)
胱氨酸	2.09(2)
缬氨酸	9.40(9)
甲硫氨酸	1.00(1)
异亮氨酸	13.16(13)
亮氨酸	17.36(17)
酪氨酸	10.95(11)
苯丙氨酸	10.38(10)
赖氨酸	14.88(15)
组氨酸	2.56(3)
色氨酸	未测
精氨酸	9.40(9)

凝胶电泳相对迁移率作图,由图 4 求得 α_1 -AGP 的分子量为 45000。

三、糖蛋白染色

采用过碘酸 Schiff 氏试剂作糖蛋白染色能使 α_1 -AGP 呈粉红色,说明提纯物系一糖蛋白。

四、氨基酸组成测定

取一定量的 α_1 -AGP 于水解管内,加 5.7mol/L 盐酸置 110℃ 烘箱内水解 24 小时,经日立 835 型氨基酸自动分析仪测定,其氨基酸组成列于表 1,其结果与 Charlwood 等^[6]所报告的基本一致。

讨 论

已表明,固相化的 Cibacron blue F3G-A 染料能够吸附血浆中约 98% 的白蛋白以及其它多种血浆蛋白^[12],而 α_1 -AGP 在 pH5.8 条件下并不被吸附^[13]。由于 α_1 -AGP 是一种酸稳定的糖蛋白,因此本实验先采用硫酸铵和三氯醋酸沉淀以除去血清中大量非酸稳定的蛋白,然后在 pH5.8 条件下,利用一个 4 × 16cm 大小的固相化染料凝胶柱,从血清中成功地分离得到了免疫电泳纯的 α_1 -AGP。其分子量和氨基

酸组成测定结果均与文献报道的基本一致。过碘酸 Schiff 化试剂染色亦证实为糖蛋白。本方法简便、省时,适合于一般实验室开展工作。

本工作得到北京医科大学细胞生物学教研室周柔丽教授的指导和帮助,谨致谢意。

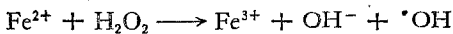
参 考 文 献

- [1] Kushner, I.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1982, 389, 39.
- [2] Mogensen, O. et al.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1986, 154, 1165.
- [3] Ganz, P. A. et al.: *Cancer. Res.*, 1984, 44, 5415.
- [4] Chin, K. M. et al.: *Immunology*, 1977, 32, 997.
- [5] Hao, Y. L. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 322, 99.
- [6] Charlwood, P. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 453, 81.
- [7] Böhme, H. J. et al.: *Chromatogr.*, 1972, 63, 219.
- [8] Davis, B. J. et al.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1964, 121, 404.
- [9] Weber, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406.
- [10] Glossmann, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 6339.
- [11] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 139, 265.
- [12] Travis, J. et al.: *Biochem. J.*, 1976, 157, 301.
- [13] Laurent, P. et al.: *FEBS*, 1984, 168, 79.

[本文于 1988 年 8 月 8 日收到]

(上接第 374 页)

+ 脱氢抗坏血酸



从反应方程式可见,少量抗坏血酸可清除超氧阴离子自由基 (O_2^-),对机体起到保护作用。当多量的抗坏血酸则生成 H_2O_2 增多,后者与铁离子作用生成羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$),该自由基的特点是很不稳定,半衰期短,损伤活性高^[6]。它可直接与线粒体膜多不饱和脂肪酸发生连锁反应,使膜不饱和双键断裂形成脂质过氧化产物——丙二酸。该物质与膜上的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、氨基酸、蛋白质等物质交联形成脂褐素。由于这些过氧化作用,一方面使调节线粒体膜流动性的脂质、蛋白质组分改变,导致线粒体膨胀。从而破坏线粒体膜结

构的完整,丧失其氧化磷酸化的生理功能。

本实验通过诱导自由基损伤实验模型,可为筛选清除自由基的药物提供手段。

参 考 文 献

- [1] Aruoma, O. I. et al.: *J. Biochem.*, 1987, 241, 273.
- [2] 路雪雅等:《药学报》,1987,22(8),586.
- [3] 王继峰等:《药学报》,1986,21(11),857.
- [4] Shimozaki, H. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, 792, 123.
- [5] Fukuzawa, K. et al.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1981, 206, 173.
- [6] Halliwell, B. Y. et al.: *J. Biochem.*, 1984, 219, 1.
- [7] Giorgio, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 1098.

[本文于 1988 年 5 月 27 日收到]