

旋氢键。

此外,胰岛素分子中的两个N末端和两个C末端均未形成非螺旋氢键,这些末端的N、O原子可及性也相对较大,但A₁与A₅形成了螺旋氢键(A₁— $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{O}}}(0.0000) \dots (1.3358) \text{—A}_5$),A₁与A₄形成了4→1氢键(A₁— $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{O}}}(0.0000) \dots (0.0000) \text{—A}_4$),A₂₁与B₂₃形成了A、B链间氢键(A₂₁— $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{O}}}(0.0000) \dots (0.0000) \text{—B}_{23}$),这些氢键中成键原子的可及性很小或为0.0000,因而这3个氢键均是埋藏的。

胰岛素分子中存在着两对盐桥,即B₂₂侧链胍基与A链C端羧基形成了盐桥,A₄侧链羧基与A链N端氨基亦形成了盐桥,从成桥基团可及性来看,前对盐桥是比较暴露的,后对盐桥部分埋藏。同时,注意到从胰岛素原转化为胰岛素时必然伴随着A链N末端的暴露(A₁中N原子的可及性为22.5416,相对很大),以及在不同种属胰岛素中A₄的变异都恒定保持为酸性残基这样一些事实,说明A₄侧链羧基与A链N端氨基形成的盐桥的作用是相当奥妙的。形成盐桥的这些基团同时亦

形成了氢键,这两对盐桥应是离子的。这两对盐桥可能对活性部位的准确构象起稳定和保证作用。

参 考 文 献

- 1 Lee B, Richards F M. The interpretation of protein structures; estimation of static accessibility. *J Mol Biol*, 1971; **55**:379
- 2 Rashin A A, Honig B. On the environment of ionizable groups in globular proteins. *J Mol Biol*, 1984; **173**:515
- 3 温元凯,戴亚,孟庆涛等.由残基计算蛋白质的可及表面积. *生物化学杂志*,1989;**4**:344
- 4 戴亚.根据蛋白质的可及性分析细胞色素C的结构和功能. *生物物理学报*,1990;**4**:393
- 5 北京胰岛素结构研究组.胰岛素晶体结构的研究:1.8埃分辨率的胰岛素分子. *中国科学*,1974;**6**:591
- 6 王大成,常文瑞,戴金壁.胰岛素分子中的非螺旋氢键. *生物化学与生物物理学报*,1983;**1**:55
- 7 常文瑞,戴金壁,张季平等.经各向异性温度因子修正后的1.2Å分辨率的猪胰岛素晶体结构. *生物物理学报*,1986;**2**:149

人溃疡型胃癌中结合β半乳糖苷凝集素的分离纯化*

许凤浩 刘在贵

(滨州医学院生化教研室,滨州 256603)

关键词: 胃癌, 内源性凝集素, 肿瘤, 细胞内糖结合蛋白

动物凝集素是一种细胞内或细胞膜上的糖结合蛋白,参与细胞间的识别连接,调节细胞的生长发育^[1]。不同的肿瘤细胞,其凝集素含量不等,类型不一^[2]。结合β半乳糖苷凝集素是肿瘤细胞凝集素中的一种,广泛分布于人肺癌^[3],人肝细胞瘤^[4],小鼠黑色素瘤^[5],及纤维肉瘤和癌基因转化的大鼠细胞瘤中^[6]并调节着肿瘤细胞之间,肿瘤细胞与基质之间的粘附,参与肿瘤细胞的转移。胃癌是山东省的一种高发恶性肿瘤,人胃癌中是否含有结合β半乳糖苷的凝集素及含量高低,联机检索证明国内外均未见报道。本文使用去唾液酸的胎球蛋白柱研究比较了正常人胃和人溃疡型胃癌中此种凝集素含量的变化,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 溴化氰活化的 Sepharose 4B 和 Sephadex G 50: pharmacia; 胎球蛋白: Fluka; PMSF: Merck; SDS-PAGE 标准蛋白: 华美公司。

13例人溃疡型胃癌标本和3例人胃大部切除标本均来源于外科手术。

1.2 亲和层析载体的制备 按文献[7]。

1.3 结合β半乳糖苷凝集素的分离纯化 将人胃癌及正常胃标本洗净,称重,剪碎。每克标本加4—

* 山东省教委资助课题。

收稿日期: 1992-06-13 修回日期: 1992-09-20

5ml 抽提液 (pH7.8 25mmol/L Tris-HCl 溶液, 含0.1% 脱氧胆酸钠, 1% Triton X100, 0.1mmol/L PMSF, 0.3mol/L 乳糖, 1mmol/L 二硫苏糖醇, 0.15mol/L NaCl 和0.2mol/L KCl), 高速匀浆15min. 15 000转离心30min 取上清, 用平衡液 (pH7.8 25mmol/L Tris-HCl 溶液, 含20mmol/L CaCl_2 , 1mmol/L 二巯基苏糖醇, 0.15mol/L NaCl 和0.05% Triton X100) 充分透析72h, 用 Sepharose 4B 吸附, 去除非特异性吸附蛋白质. 然后将此上清液过去唾液酸后的胎球蛋白柱. 进样后用平衡液洗至 $A_{280} < 0.2$, 再用乳糖洗脱液 (pH7.8 25mmol/L Tris-HCl 溶液, 含4mmol/L EDTA, 0.3mol/L 乳糖, 1mmol/L 二硫苏糖醇, 0.15mol/L NaCl 和0.05% Triton X100) 洗脱, 收集洗脱峰, 经 Sephadex G50 柱层析, 分部收集蛋白峰, 并检测血凝活性.

1.4 纯度鉴定 亚基分子量测定和天然状态分子量的估测 纯度鉴定用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 亚基分子量测定用 SDS-PAGE, 天然状态分子量的估测用 Sephadex G50 凝胶过滤法.

1.5 血凝活性检测和糖抑制实验 兔红细胞的消化固定按文献[8]. 血凝检测方法如下: 在“V”型板中每孔加检测液100 μl , 兔红细胞15 μl , 混匀后静置90min 观察结果. 凝集孔呈片状, 非凝集孔呈点状. 以能够引起明显血凝的稀释倍数作为待测样品的血凝滴度.

糖抑制实验: 将不同单糖和聚糖配成0.1mol/L 的浓度, 在“V”型板中每孔50 μl 连续等倍稀释, 以能够引起血凝抑制时糖的浓度作为该糖对结合- β 半乳糖苷凝集素的有效抑制浓度.

1.6 蛋白质含量测定 用 Folin-酚法, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白.

2 结 果

2.1 人溃疡型胃癌和正常胃中都含有结合 β 半乳糖苷的凝集素

将人溃疡型胃癌匀浆, 透析去除乳糖及去污剂, 过去唾液酸的胎球蛋白亲和层析柱. 上样后, 用平衡液洗脱去除杂蛋白, 用0.3mol/L 乳糖洗脱液分离结合 β 半乳糖苷的凝集素, 结果出现了一个尖而不对称的蛋白峰 (图1).

将乳糖洗脱峰过 Sephadex G50 柱, 结果出现了两个蛋白峰. 第一个峰无凝血活性, 为杂蛋白; 第二个峰有凝血活性, 高峰处血凝滴度大于128, 为结合 β 半乳糖苷的凝集素 (图2).

将人正常胃做同样处理, 在相应的洗脱部位可以

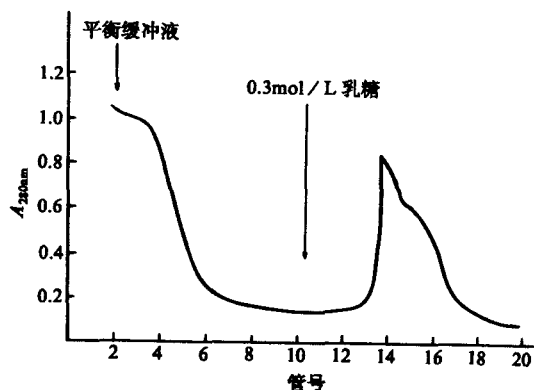


图1 人溃疡型胃癌匀浆经去唾液酸胎球蛋白柱层析图谱

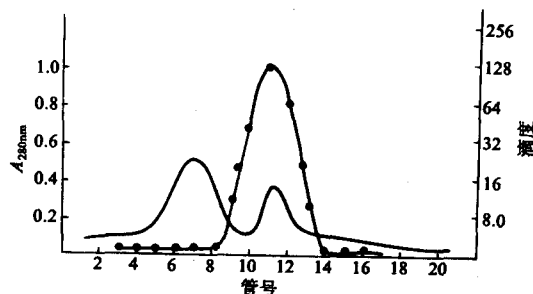


图2 结合 β 半乳糖苷凝集素的凝胶过滤层析图谱和血凝活性检测曲线

“—”示蛋白浓度; “●—●”示凝血活性

检测到血凝活性, 滴度为1:8, 说明正常胃中也含有结合 β 半乳糖苷的凝集素.

2.2 人溃疡型胃癌中结合 β 半乳糖苷凝集素的含量高于人正常胃

取3例溃疡型胃癌标本各100g 和3例人正常胃标本各100g, 分别进行了同样的亲和层析和凝胶过滤层析. 分别收集活性峰, 量其体积, 测定结合 β 半乳糖苷凝集素的含量, 结果示于表1.

表1 结合 β 半乳糖苷凝集素的定量测定

	正常胃			胃癌		
	例1	例2	例3	例1	例2	例3
体积(ml)	35	42	39	36	38	40
浓度($\mu\text{g/ml}$)	15	12.5	11.5	60	55	48
蛋白总量(mg)	0.525	0.525	0.449	2.16	2.09	1.92

取3份不同样品, 每份重复16次, 批内 $CV=1.4-5.3\%$ (表1)。

表1 批内变异系数

样品	蛋白质浓度/ (mg/ml)	CV/%
1	0.764±0.034	4.4
2	0.500±0.026	5.3
3	0.921±0.013	1.4

另取3份样品, 连续测定10d, 每天1次, $\bar{X} \pm s$ 分别为0.763±0.033, 0.494±0.019和0.869±0.051, 批间CV分别为4.4%, 3.9%和5.7%。

2.3 钙调素样品的测定

钙调素是一种小分子的蛋白质, 牛脑钙调素的分子量为16 680, 这种蛋白质不含半胱氨酸和色氨酸。我们用3种方法以牛血清白蛋白为标准分别测定了经过 phenyl-Sepharose 4B 纯化的钙调素的含量 (表2)。

表2 3种方法测定钙调素的含量 (mg/ml)

方 法	样品1	样品2	样品3
微量 Lowry 法	1.286	1.041	0.595
Lowry 法	1.340	0.971	0.544
考马斯亮蓝 G250法	0.566	0.452	0.281

结果表明, 在测定缺少半胱氨酸和色氨酸的钙调素时, 微量 Lowry 法的结果与 Lowry 法近似, 而考马

斯亮蓝 G250法结果明显偏低。这是因为, 微量 Lowry 法及 Lowry 法的测定原理是, 福林试剂主要与铜-蛋白质复合物、酪氨酸及色氨酸反应^[3], 产生深蓝色。而考马斯亮蓝 G250主要与蛋白质中半胱氨酸和色氨酸反应^[6], 钙调素中缺少这两种氨基酸, 故考马斯亮蓝 G250对牛血清白蛋白及钙调素的着色不同。所以, 微量 Lowry 法 (及 Lowry 法) 测定钙调素比考马斯亮蓝 G250法更准确。

微量 Lowry 法的测定时间短 (15min), 节省福林试剂 (仅需50μl), 测定范围比 Lowry 法宽, 方法可靠, 在酶联免疫检测仪上可迅速测定大量样品, 值得推广。

参 考 文 献

- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; **72**: 248
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol chem*, 1951; **193**: 265
- 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法 (第一册). 北京: 科学出版社, 1988: 3—5
- Cooper T G. *The Tools of Biochemistry*. New york: John wiley & Sons Inc, 1977: 53—55
- Grinstein S, Furuya W. Calmodulin binding to platelet plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1982; **686**: 55
- 文允镛, 张志明, 胡蓓. 钙与钙调素. 北京: 化学工业出版社, 1989: 56
- Raz A, Meromsky L, Zvibel I *et al.* Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer*, 1987; **39**: 353
- Allen H J. Binding specificity of a human leucocyte carbohydrate-binding protein. *Immun Invest*, 1986; **15**: 379
- Nowak T P, Haywood P L, Barondes S H. Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and myogenic cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; **68**: 650
- Baenziger J U, Fiete D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J Biol Chem*, 1979; **254**(3): 789

(上接第392页)