

刀豆球蛋白 A 的荧光标记方法

朱正美 顾天爵

(上海第一医学院生物化学教研室)

刀豆球蛋白 A (ConA) 能与细胞表面膜上的糖特异性结合, 是研究细胞表面结构与功能的重要工具。ConA 经荧光素标记后, 可用于细胞膜上糖蛋白或糖脂的定位, 或用作糖蛋白经电泳分离后的染色剂。

ConA 与异硫氰酸荧光黄(FITC)结合的方法, 文献虽有报道, 但结合物 (ConA-FITC) 的 F/P 值 ($O. D_{495nm}/O. D_{280nm}$) 仅 0.54^[1]。我们用改良 Marshall's 法^[2]制得的产物 F/P (克分子比) 常在 0.4 左右, 同时有失活现象。国外商品 F/P 值标明为 0.95, 但制备方法不明。

本文介绍一种结合法, 先将 ConA 吸附于 Sephadex G50 上, 以保护 ConA 分子和糖相结合的基团, 再加入 FITC, 得到的结合物 F/P 值可达 1.2, 对兔红细胞凝集效价为 1:1024, 与未结合前 ConA 的效价相同, 得率在 70% 左右, 组织切片及单细胞染色效果良好, 用在聚丙烯酰胺圆盘电泳及等电聚焦电泳分离的糖蛋白染色, 在 254nm 或 360nm 紫外光照射下所得荧光区带, 可用照相或荧光扫描记录。

实验方法及结果

一、ConA-FITC 制备

(1) 用 Sephadex G50 吸附 ConA 称取 ConA 10 毫克溶于 PBS 液 (1.0M NaCl 溶于 0.1M 磷酸缓冲液 pH7.4) 1 毫升中, 与 200 毫克 Sephadex G50 (预先经 PBS 浸泡) 混匀, 置 4℃ 冰箱过夜。次日, 吸去上清液, 用少量 (约 0.5 毫升) PBS 洗 Sephadex G50 三次; 合并洗液, 测蛋白质含量, 计算 ConA 吸附率。

ConA 吸附率

$$= \frac{\text{ConA 蛋白质质量 (毫克)} - \text{Sephadex G50 柱吸附后上清及洗出液中蛋白质质量 (毫克)}}{\text{ConA 蛋白质质量 (毫克)}} \times 100\%$$

$\times 100\%$

(2) ConA 与 FITC 结合 称取 FITC 1 毫克, 溶于 PBS 1 毫升, 逐滴加入 ConA-Sephadex G50 中, 混匀, 轻摇 20 分钟, 再放暗处 4—6 小时 (约 25℃)。然后装入层析柱, 用黑纸包裹以避光。柱用 PBS 液洗, 直至洗出液无明显荧光为止。改用 0.2M 葡萄糖 (溶于 PBS 液中) 洗下结合于 Sephadex G50 上的 ConA-FITC; 收集有荧光部分的洗脱液。

(3) 去除葡萄糖及浓缩 将有荧光的洗脱液装入透析袋, 对 PBS 液透析, 直至洗脱液中的葡萄糖除净为止, 再把透析袋埋入聚乙二醇 (MW~20,000) 浓缩至 3 毫升左右。

二、ConA-FITC 质量鉴定

(1) F/P 值测定 吸出结合物 0.2 毫升, 加 PBS 2.8 毫升 (或两者均用半量) 测定 $O. D_{490nm}$ 及 $O. D_{280nm}$ 。由 $O. D_{490nm}$ 查 FITC 标准曲线得 FITC 微克/毫升值; $O. D_{280nm}$ 按 ConA 的百分消光系数 ($A_{1cm}^{1\%} = 13.7$) 计算得 ConA 毫克/毫升值。

计算公式:

$$\begin{aligned} & \frac{O. D_{280nm}}{13.7} \times 10 \text{ 毫克/毫升} \times \text{样品稀释倍数} \\ &= \text{ConA 蛋白质毫克/毫升} \\ & F/P = \frac{70 \times 10^3 (\text{ConA 分子量})}{389 (\text{FITC 分子量}) \times 10^3} \\ & \quad \times \frac{\text{微克/毫升 FITC}}{\text{毫克/毫升 ConA}} \\ &= 0.18 \times \frac{\text{微克/毫升 FITC}}{\text{毫克/毫升 ConA}} \end{aligned}$$

(2) 凝集活性测定 ConA 1 毫克/毫升及 ConA-FITC 1 毫克/毫升倍比稀释得不同浓度液体, 各管加入兔血细胞悬液在 37℃ 保温 30 分钟, 观察凝集反应, 记录血细胞出现凝集时的最低稀释度。

(3) 荧光染色 细胞或组织切片加入 ConA-FITC 液(含蛋白质约 0.1 毫克/毫升)适量, 37℃ 保温 30 分钟, 后用 0.1M PBS(pH8.0) 洗, 在荧光显微镜下拍片(图 1)。

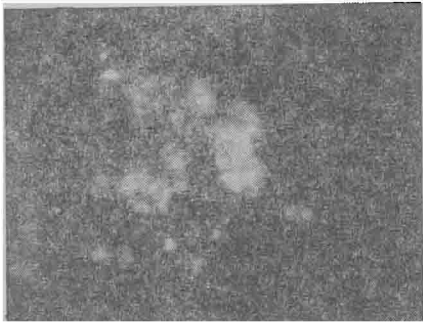


图 1 小鼠 S₁₈₀ 腹水细胞荧光染色
(细胞因 ConA-FITC 的作用已凝集成团)

三、ConA-FITC 产率计算

$$\text{产率} = \frac{\text{产物蛋白质量(毫克)}}{\text{被 Sephadex G50 吸附蛋白质量}} \times 100\%$$

实验结果

ConA 用量 (毫克)	Sephadex G50 吸附率(%)	F/P	凝集 效价	产率 (%)
10.2	82	1.20	1:1024	54.7
20	—	1.18	1:1024	77.8*
6	80	1.66	—	53.7
20	—	1.12	—	70.0*

* Sephadex G50 吸附率未测, 均按 80% 计算。

讨 论

一、我们利用 ConA 与葡萄糖基特异性结合的特性, 将其亲和吸附在 Sephadex G50 上, 并且在对 ConA 有稳定作用的溶液 (1.0M

NaCl) 中进行反应, 明显提高了结合物的质量与得率。本法有以下长处:

- (1) ConA 吸附于 Sephadex G50 使之固相化, 保护了它与糖反应的基团, 使 ConA 在反应过程中性质稳定, 不易失活, 因而产物活性受加入 FITC 量、反应温度及时间等影响小。
- (2) 被 Sephadex G50 吸附的 ConA 是有活性的分子, 原料中无活性或低活性的分子及反应中失活的分子, 均随溶液流出, 达到了分离的目的。

二、本法所得的 ConA-FITC 用于细胞, 组织切片的荧光染色及荧光显微镜照相记录, 效果满意。聚丙烯酰胺凝胶圆盘及板电泳所分离的糖蛋白区带, 用改良 Christopher 法染色^[3], 可得较明显荧光区带。

三、Sephadex-ConA 与 FITC 在 pH7.4 条件下进行反应, 生成的 ConA-FITC 用葡萄糖易于洗脱。如 pH 调到 9 以上, 反应后 Sephadex G50 上可见明显荧光, 但难以用糖洗脱。此时如用甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH3) 洗脱, 洗脱物立即加 NaHCO₃ 中和, 也可得活性较高的产品, 但得量低。

四、在亲和吸附固相化的基础上进行荧光标记的方法应可用于其他外源凝集素。

参 考 文 献

- [1] Tkacz, J. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **105**, 1, 1971.
- [2] Marshall, J. D. Jr. et al.: *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. (N. Y.)*, **98**, 898, 1958.
- [3] Christopher, M. W. et al.: *J. Cell Biol.*, **74**, 264, 1977.

[本文于 1980 年 7 月 28 日收到]

核磁共振的去水峰实验技术

张 水 珍

(中国科学院生物物理研究所)

核磁共振 (NMR) 已成为化学工作者有力的分析工具, 在用质子谱测试生物样品时, 常因

水溶剂峰极大, 遮盖了欲观察信号。即使以重水作溶剂, 对于质子谱, 重水中未氧化的 HDO