

人血清补体 3b 的提纯与鉴定

潘华珍 李彩华 靳 艳

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

据报道红细胞膜上有补体 C_3b 的受体^[1], 阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 是属红细胞的膜病变, 对补体较为敏感, 易产生溶血, 可能是因为膜上 C_3b 受体与正常红细胞不同。为了研究 C_3b 与膜上 C_3b 受体结合情况, 并进一步分离膜上 C_3b 受体, 我们制备了纯的 C_3b 。

一、材料与方法

1. C_3 的提纯 见文献[2]
2. 免疫双扩散 见文献 [3]
3. C_3 的垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

见文献[2]

4. C_3 分子量测定 按 Pharmacia 标准蛋白测定分子量法

5. C_3b 的制备 用 10 mM、pH7.4 PBS 配成 1% 胰蛋白酶溶液, 取 0.5 ml, 加入提纯的 C_3 中 (700—1000 μ g), 室温放置 1 分钟, 加等体积的 1 mM 氟化苯甲基磺酸终止反应。

将水解的样品, 加入预先用 PBS 平衡好的 Sephadex G100 柱内 (1 $\times$ 20 cm), 用 PBS 洗脱, 流速 0.05 ml/分, 分管收集, 分别测生物活性与酶活性。

6. C_3b 与抗 C_3 抗体的免疫电泳 见文献[4]。

7. C_3b 生物活性测定 用分离的样品 0.2 ml, (其含量分别为 40 μ g, 100 μ g, 200 μ g, 300 μ g, 400 μ g) 加 PNH 红细胞 0.1 ml, 血清 (AB 型) 0.1 ml, 37°C 保温 60 分钟, 再加生理盐水 4.0 ml, 离心, 取上清, 在 412 nm 处测 O.D., 并与 0.1 ml 红细胞加 0.05% NH_4OH 4.3 ml 全溶血后所测得的 O.D. 之比, 计算溶血百分数。以 (1) 红细胞 0.1 ml, 加血清 0.1 ml; (2) 红细胞 0.1 ml, 加分离样品 0.2 ml 为对照。

二、结果与讨论

1. 提纯的 C_3 与兔抗人 C_3 抗血清的免疫双扩散, C_3 与抗 C_3 抗体有明显的沉淀线, 说明提纯的是 C_3 (图 1)。

2. 提纯 C_3 的 PAGE (图 2) 为一条带, 说明所提的 C_3 为电泳纯。

3. C_3 分子量测定 按 Pharmacia 标准蛋白测定分子量方法计算其分子量为 18 万。

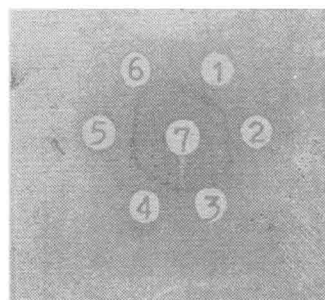


图 1 C_3 与抗 C_3 的免疫双扩散图谱
1—6: 不同稀释度的抗 C_3 抗体, 7: C_3 。

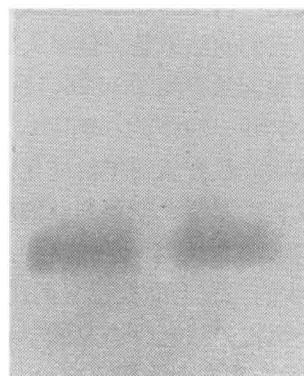


图 2 C_3 的 PAGE 图谱

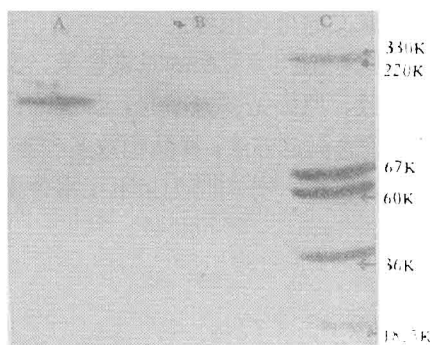


图 3 SDS-PAGE 测 C_3 分子量图谱
A, B: 提纯的 C_3 C: 标准蛋白

4. 胰蛋白酶水解的 C_3 (即 C_3b) 免疫电泳: 从图 4 结果看出, C_3b 与抗 C_3 抗体有沉淀线, 且比 C_3 与抗 C_3 抗体的沉淀线前移。

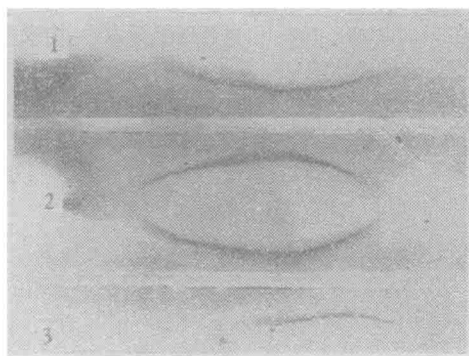


图4 C_{3b} 与抗 C_3 抗体的免疫电泳图谱
1, 2: C_3 , 3: C_{3b} 槽内: 抗 C_3 抗体。

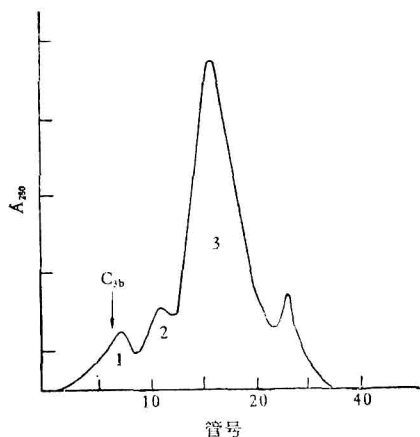


图5 Sephadex G 100 分离 C_{3b} 图谱

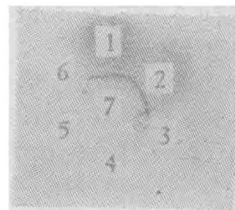


图6 提纯的 C_{3b} 与抗 C_3 抗体的免疫双扩散图谱

1: 抗 C_3 抗体原液. 2, 3, 4, 5, 6: 分别用原液以 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 稀释. 7: 提纯 C_{3b} .

5. 用 Sephadex-G 100 分离 C_{3b} , 分别测 1, 2, 3 峰的生物活性与胰蛋白酶活性, 第一峰有生物活性, 第三峰有酶活性(图 5)。

6. 经柱层析分离的 C_{3b} 与抗 C_3 抗体的免疫双扩散见图 6, C_{3b} 与抗 C_3 抗体有明显的沉淀线。

7. C_{3b} 活性测定 以 PNH 红细胞为材料, 加不同量的 C_{3b} , 随着 C_{3b} 量的增加, 其溶血度分别为 10%, 17%, 24%, 30%。证明所提纯的 C_{3b} 是有生物活性的。PNH 红细胞较正常人红细胞易产生溶血。在一般情况下, 被激活的 C_3 (即 C_{3b}) 与红细胞作用, 能产生较高的溶血度, 所以采用 PNH 红细胞为材料。从本实验结果证明, 本法是简单易行的。

参 考 文 献

- [1] 赵修竹等:《生理科学进展》13. 292. 1982.
- [2] 潘华珍等:《中华血液学杂志》2. 114. 1981.
- [3] 王世中主编:《免疫化学技术》54. 1980.
- [4] 王世中主编:《免疫化学技术》74. 1980.

[本文于 1984 年 1 月 20 日收到]

小白鼠角膜细胞染色体的制备及洗净剂 对染色体损伤的初步观察

樊 蓉 陈采琴

(中国科学院生物物理研究所)

在工农业生产实践中, 多种理化因素可造成角膜损伤以及导致各种角膜疾病^[1,2]。因此, 对角膜细胞的形态、功能、病理变化、损伤因素等方面的研究, 已引起人们广泛重视。而角膜细胞染色体的制备, 为研究角膜细胞的结构、功能提供了一种简便、可靠的手段。

为了制备分散良好的角膜细胞染色体标本以观察染色体的损伤, 我们用小白鼠角膜为材料, 洗净剂为致损伤剂, 做了初步摸索。

一、材料和方法

采用雄性昆明种小白鼠(1.5—2月龄) 60 只, 随机分成五组。

将海鸥牌洗净剂(上海合成洗涤剂五厂生产), 用蒸馏水稀释成 5%、10%、20% 和 50% 四种浓度。分别滴入四个实验组的小白鼠眼内(每只眼 2 滴)。24 小时后, 各自再加 2 滴。同时, 每只小白鼠腹腔注射 1%