

Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China).

Abstract The purified Beijing duck serum lipoproteins were observed by electronmicroscope for its shape and size. The distributions of total cholesterol and LCAT activities and their gradient gel electrophoresis, the amino acid composition and partial amino acid sequences of each fragment of apo A-I were studied and determined, respectively. Furthermore, their

hydrophilicity and hydrophobicity of α -helices were also studied and compared with human and other species. When the above results were integrated together they provided further evidence for the hypothesis that the cholesterol of Beijing duck is carried and transported by HDL instead of LDL and apo A-I played an important role in the cholesterol metabolism.

Key words Beijing duck, HDL, apo A-I, α -helix, structure, function

大鼠阴离子交换蛋白合成肽抗体制备及鉴定*

李津婴 赵法伋¹⁾ 郭俊生¹⁾ 叶煦亭²⁾ 胡小健³⁾ 张志鸿³⁾ 周汉清³⁾

(第二军医大学长海医院, 上海 200433)

摘要 根据带3蛋白(阴离子交换蛋白)拓扑学模式、氨基酸保守片段、功能片段、天然抗原表位, 设计大鼠带3膜外侧片段合成肽, 制备抗合成肽(12肽)抗体, 同时制备抗大片带3抗体加以印证。多项免疫学实验鉴定结果表明, 该12肽是带3抗原决定簇之一, 也是带3发挥阴离子转运功能的关键肽段; 12肽的氨基酸组成与序列在各种属间高度保守。免疫金银显色——扫描电镜结果给出该12肽为带3蛋白膜外侧区片段的最直接证据。制备的抗带3抗体可作为研究带3结构与功能、探讨与带3病变有关的疾病发病机理和病理过程的有用工具。

关键词 带3蛋白, 合成肽, 抗体

高等动物细胞膜阴离子交换蛋白(anion exchange protein, AE, 即带3蛋白, band 3 protein)家族由三种不同基因编码, 产物分别称为AE1、AE2和AE3。AE1见于红细胞、肾细胞, 分子质量95~102 ku, 氨基酸残基数848~929个。AE2见于肾细胞、脑细胞、B淋巴细胞系等; AE3见于心肌细胞、脑细胞。AE2和AE3的分子质量约为135 ku, 氨基酸数1227~1237。非红系有核血细胞、肺和小肠等组织细胞的带3样蛋白, 分子质量60~180 ku不等, 均属AE家族。已对11种AE的基因序列、氨基酸序列、拓扑学构型、阴离子转运位点等进行了大量比较研究, 提出多种

拓扑学模式^[1~4]。在红细胞, AE即带3蛋白有10、12甚至更多穿膜次数的模式。但有一点得到多数作者肯定, 即第五穿膜区外侧片段与阴离子通透、抗原抗体反应、细胞衰老清除等生命活动有关, 是各组织间、各种属间高度保守的片段。为了研究带3蛋白的结构与功能, 探讨带3蛋白在有关疾病中的病变机理,

*国家自然科学基金资助项目(39270589)。

¹⁾第二军医大学军队卫生教研室。

²⁾第二军医大学电镜室。

³⁾复旦大学生物物理系。

收稿日期: 1996-06-24, 修回日期: 1996-10-23

本研究制备了抗大鼠阴离子交换蛋白 (带 3 蛋白) 第五穿膜区膜外片段 12 肽抗体和抗大鼠红细胞膜带 3 蛋白大片段抗体, 对所得抗体进行了多项指标鉴定.

1 材料与方法

1.1 选择抗原片段和合成 12 肽

目前文献尚无大鼠红细胞带 3 蛋白全段氨基酸序列报告, 本研究根据大鼠肾脏 AE 氨基酸序列, 比较多种 AE 拓扑图, 选择与阴离子交换、衰老抗原有关的第五穿膜区外侧片段^[1~4], 制定合成肽组成与序列: Ser-Lys-Leu-Ile-Lys-Ile-Phe-Gln-Asp-Tyr-Pro-Leu. 该 12 肽与小鼠红细胞带 3 蛋白相应片段相同, 与人红细胞带 3 蛋白相应片段差别一个氨基酸 (图 1).

RKB3	SKLIKIFQDYPL	476~ 487
MEB3	-----Y--	557~ 568
HEB3	-----H--	538~ 549

图 1 大鼠肾脏 (RKB3) 与小鼠红细胞 (MEB3) 和人红细胞 (HEB3) 带 3 蛋白膜外 12 肽氨基酸序列比较
右侧为氨基酸序号.

1.2 交联半抗原和制备抗 12 肽带 3 抗体

交联原理见文献 [5] 制备的 12 肽作为半抗原, 在交联剂碳二亚胺盐酸盐 (EDC·HCl, 中国科学院东风生化技术公司) 作用下, 与铜蓝蛋白 (hemocyanin, Sigma) 交联. 交联比例为 12 肽: EDC: hemocyanin= 10: 20: 1. 交联条件: 25℃, 2 h.

按常规方法免疫动物: 首次加全佐剂、后续加不完全佐剂与交联肽制成乳剂, 免疫新西兰纯种兔 (2 kg, 雄性), 每 2 周一次加强免疫. 第 16 周颈动脉放血, 离心, 分离血清, 得抗 12 肽带 3 抗体 (anti-12C).

1.3 大片段带 3 蛋白分离及抗体制备

为印证 12 肽的功能及其抗体的反应活性, 本实验从带 3 全蛋白上切割大片段肽, 制备抗体. 取 Wistar 品系大鼠 (150~ 200 g), 断头

取血, 生理盐水清洗红细胞, 以低渗法制备红细胞膜. 低渗缓冲液为 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L 苯甲磺酰氟 (PMSF), pH 7.4. 用 5 mm 无齿板梳、10% SDS-PAGE 做制备胶电泳, 分离红细胞膜蛋白, 纵切下边缘一胶条, 直接用考马斯亮蓝 G25 全谱染色或转移印迹后染色, 确定带 3 区带位置. 切割带 3 上 1/3 部分作为大片段带 3 抗原. 下 1/3 部分可能与血型糖蛋白 A (GPA) 有部分重和, 故下 2/3 弃之不用. 切下的胶条置 1% 琼脂糖胶上做垂直平板电泳, 20 mA, 20 min, 使聚丙烯酰胺凝胶中的带 3 转入琼脂糖胶中. 搅碎含带 3 的琼脂糖胶, 混合佐剂制成乳剂, 按前述方法免疫动物, 得抗大片段带 3 抗体 (anti-b3).

1.4 抗体鉴定实验

免疫双扩散试验: 制备 Wistar 大鼠、昆明小鼠和人的红细胞膜, 作为抗原, 按常规方法进行免疫双扩散试验. 1% 琼脂糖-巴比妥缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.6) 制胶板, 打孔, 周边孔加倍比稀释抗血清, 中央孔加抗原, 37℃, 24 h 后观察结果.

免疫印迹实验: 红细胞膜蛋白经 4%~ 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 分离, 用 Towbin 系统^[6] (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇) 转移至 NC 膜上 (硝酸纤维素膜, 0.2 μm 孔径, 浙江黄岩四青生化试剂厂). NC 膜于封闭液中封闭 30 min (封闭缓冲液成分: 20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 8, 0.1% Tween 20), 加入抗带 3 抗体, 4℃过夜. 用无 Tween 20 缓冲液清洗, 加二抗 (HRP-羊抗兔, 军事医学科学院邦定公司产品), 37℃, 2 h. 清洗, 加辣根过氧化物酶 (HRP) 底物显色 (显色液组成: 4-氯-1-萘酚 10 mg, 甲醇 3.3 ml, 30% H₂O₂ 10 μl, 无 Tween 20 缓冲液 16.7 ml), 观察抗原抗体结合带.

免疫扫描电镜: 参照文献方法 [7, 8] 进行, 将免疫金银显色技术用于免疫扫描电镜. 主要步骤: 取新鲜 wistar 大鼠红细胞, 于 PLP

固定液中固定 30 min (固定液成分: 10 mmol/L 过碘酸钠, 75 mmol/L 赖氨酸, 2% 多聚甲醛, 37.5 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.2). N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) 缓冲液 (含 1 g/L 卵蛋白片, 0.02% 皂苷) 清洗细胞, 与一抗 (anti-r12C) 反应, 4℃ 过夜. 不加一抗样品为阴性对照. 与二抗 (胶体金-蛋白 A) 反应 2 h, 37℃. 清洗, 再加硝酸银进行银放大处理, 在 Hitachi S-520 扫描电镜下观察细胞表面抗体结合情况.

阴离子通透抑制试验: 按张志鸿所建方法, 测定红细胞对 NO₂⁻ 通透速率 (T_s)^[9]. 测定原理: 带 3 蛋白介导 NO₂⁻ 跨膜通透, NO₂⁻ 进入红细胞后, 使氧合血红蛋白 (HbO₂) 变为高铁血红蛋白 (MetHb), 从而改变细胞的光谱吸收特性. 经微机拟合、处理光电转换数值, 从光密度的经时变化得到 A_{576} 下降幅度达 50% 所需的时间 T_s , 进而可通过 $K_T \cdot T_s$ 得出 NO₂⁻ 跨膜通透速率常数 K_T . 反应介质为 46.5 mmol/L (对大鼠和小鼠) 或 15.5 mmol/L (对人) NaNO₂, 5 mmol/L PBS, pH 7.4. 2 ml 介质液与 50 μl 20% 红细胞悬液在搅拌、恒温 (37℃) 条件下进行反应. 抗体加入量 20 μl (anti-r12C 54.66 g/L, anti-b3 17.25 g/L), 与红细胞混合后, 室温放置 30 min, 加介质液, 测定.

2 结 果

2.1 免疫双扩散试验

结果显示, 本研究制备的两种抗带 3 抗体 (anti-r12C, anti-b3) 可与大鼠、小鼠和人的红细胞膜形成沉淀线, 反应的抗体效价在各种属间无明显差别.

2.2 免疫印迹试验

两种抗带 3 抗体 (anti-r12C, anti-b3) 均可与大鼠、小鼠和人的红细胞膜带 3 蛋白特异结合, NC 膜上显示一条抗原抗体专一结合区带 (图 2).

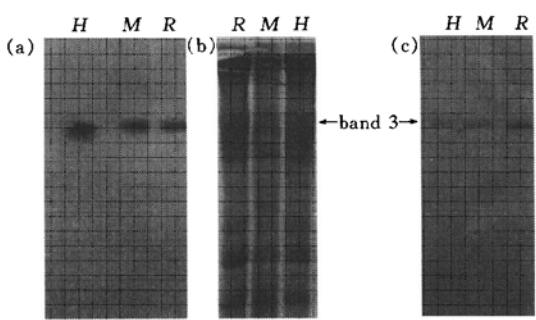


图 2 抗带 3 抗体与大鼠 (R)、小鼠 (M) 和人 (H) 红细胞膜蛋白免疫印迹图

(a) anti-r12C; (b) 10% SDS-PAGE; (c) anti-r12C.

2.3 免疫扫描电镜

在扫描电镜下, 观察经 anti-r12C/Au-protein A 标记、Ag 放大处理的大鼠红细胞, 可见完整红细胞表面呈现清晰的、分布均匀的抗体结合颗粒 (图 3), 表明 anti-r12C 特异结合在红细胞带 3 蛋白膜外侧片段.

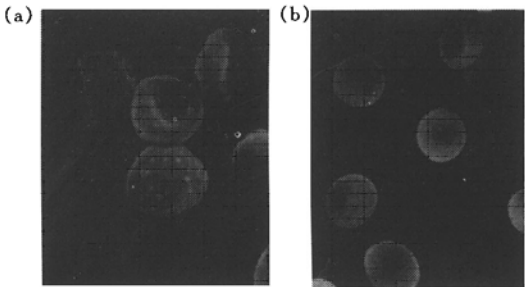


图 3 大鼠红细胞膜带 3 蛋白免疫扫描电镜图

(a) 加 anti-r12C (×1 790, SEM); (b) 未加 anti-r12C (×890, SEM).

2.4 对红细胞阴离子转运抑制特性

NO₂⁻ 通透试验反应液中无带 3 抗体时, 大鼠、小鼠和人的 T_s 分别为 12.28、3.4 和 2.29. 加入带 3 抗体后, NO₂⁻ 透入红细胞受到抑制, A 值呈短暂下降后回升至基线, 无持续 A 值下降变化, 计算机无法拟合、计算 T_s 值. 表明本实验制备的两种抗带 3 抗体均能有效抑制红细胞阴离子通透功能 (图 4).

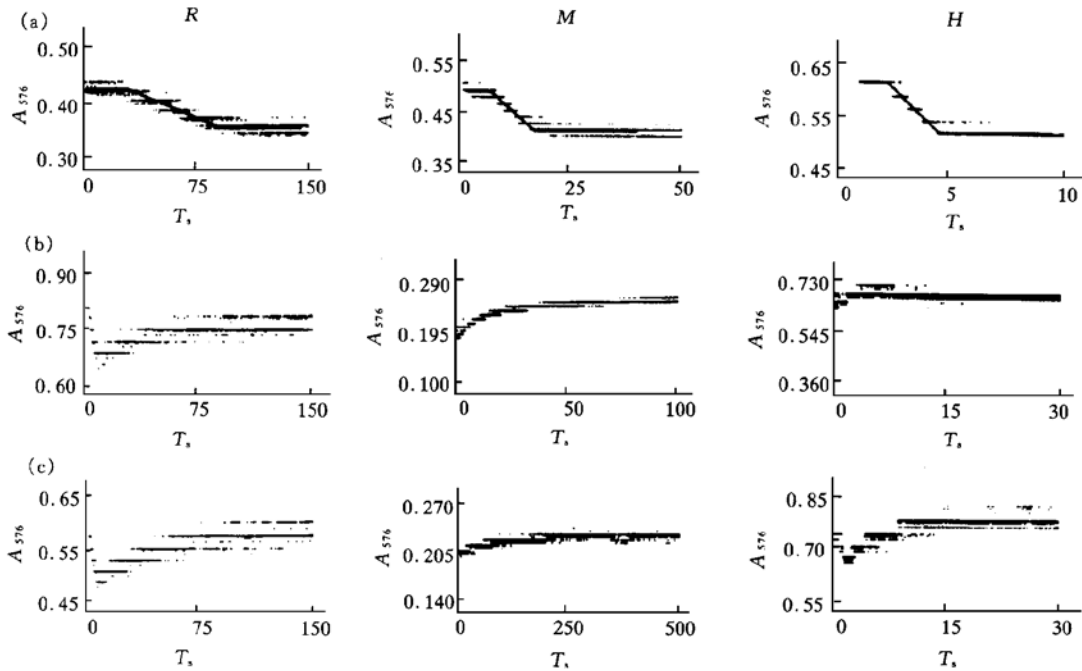


图4 抗带3抗体对大鼠(R)、小鼠(M)和人(H)红细胞 NO_2^- 通透抑制曲线

(a) 未加抗体; (b) anti-12C; (c) anti-b3.

3 讨 论

红细胞阴离子交换蛋白(AE,带3蛋白)是红细胞中含量较高(20%强)、分布与功能联系广泛的内嵌膜蛋白,它以高速率 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 转运调节细胞内酸碱平衡和离子平衡,同时调节与之纵向关联的膜骨架蛋白、血红蛋白、糖酵解酶等的功能和与之横向关联的 Na^+ 泵、血型糖蛋白、胆固醇等的排列与活动,在血型识别、抗原抗体反应、跨膜信息传递及细胞衰老清除等生命活动中起着重要的甚至是关键的作用. 10多年来对带3蛋白的研究证明,非红系有核血细胞和多种组织(肺、肾、肠、脑、心等)细胞膜中也有带3样蛋白,具阴离子交换功能,不同来源的带3由三种不同的基因编码,构成氨基酸组成和分子质量有别的三类AE,组成AE家族. 与阴离子转运有关的氨基酸残基及某些功能片段在AE家族成员中具高度保守性^[1~3,10]. 本文根据带3蛋白拓扑学模式、氨基酸保守片段、功能片段和天然抗原表位,设计一段带3合成肽,

制备合成肽(12肽)抗体,同时制备大片段带3抗体加以印证.

免疫扫描电镜清晰地显现出anti-12C在红细胞膜上与带3特异结合的抗原抗体反应颗粒,给出该12肽为带3蛋白膜外侧区片段的最直接证据. 抗体鉴定结果显示,抗带3抗体(anti-12C, anti-b3)可以与大鼠、小鼠和人的红细胞膜带3蛋白结合,证明此合成肽的氨基酸组成与序列在各种属间具高度保守性. 在阴离子通透抑制实验中,两种抗体均能有效抑制 NO_2^- 透入红细胞,表明作为带3第五穿膜区外侧片段的12肽是带3阴离子转运功能所必需的结构,12肽中的两个Lys可能起着关键作用^[10]. 在该实验中, A_{576} 有瞬时下降变化,而后回升,持续在基线上. 其原因可能是加入 NO_2^- 初始,少数带3位点尚未被抗体完全占据,经过 NO_2^- 少量透入、转运位点运作之后,促使这些位点与带3抗体结合,产生 NO_2^- 通透完全抑制;另一方面,在红细胞胞浆中高铁血红蛋白还原酶(NADH-MR)等氧

还代谢酶作用下, 将被 NO_2^- 氧化的 MetHb 还原为 HbO_2 , 故 A_{576} 回复至基线并维持不变.

总之, 我们的研究结果直接地证明, 本文选择、应用的 12 肽位于带 3 穿膜区外侧片段, 是带 3 抗原决定簇之一, 在各种属间高度保守; 该 12 肽是带 3 发挥阴离子转运功能的关键肽段. 本研究制备的带 3 蛋白合成肽抗体和大片段带 3 抗体可作为研究带 3 结构和功能、探讨与带 3 病变有关的疾病发病机理和病理过程的有用工具.

致谢 上海肿瘤研究所曲淑敏老师为本研究合成 12 肽; 实验中得到上海华东师范大学生物系范培昌教授和第二军医大学生生化教研室魏尧梅教授热情指导及长海医院实验诊断科沈茜研究员、血液科宋献民硕士、黄建国硕士具体帮助. 在此一并表示谢意!

参 考 文 献

- 1 Alper S L. Molecular and cell biological aspects of the AE anion exchanger gene family. *Prog Cell Res*, 1992, **2**: 9~15
- 2 Espanol M J, Saier M H. Topological and segmental phylogenetic analyses of the anion exchanger (band 3) family of transporters. *Mole Membr Biol*, 1995, **12**: 193~200
- 3 Kudrycki K E, Shull G E. Primary structure of the rat kidney band 3 anion exchange protein deduced from a cDNA. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 8185~8192
- 4 Kudrycki K E, Shull G E. Rat kidney band 3 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger mRNA is transcribed from an alternative promoter. *Am J Physiol*, 1993, **264** (3Pt2): F540~F547
- 5 Briand J P, Muller S, Regenmortel M H V. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J Immun Meth*, 1985, **78**: 59~69
- 6 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 4350~4354
- 7 Fukuda M N, Klier G, Yu J *et al.* Anomalous clustering of underglycosylated band 3 in erythrocytes and their precursor cells in congenital dyserythropoietic anemia type II. *Blood*, 1986, **68**: 521~529
- 8 Holgate C S, Jackson P, Cowen P N *et al.* Immunogold silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem*, 1983, **31**: 938~944
- 9 张志鸿, Deyev A I. 红细胞膜对 NO_2^- 通透性的研究. *生物物理学报*, 1990, **6**: 254~257
- 10 李津婴, 李建新. 红细胞膜带 3 蛋白研究新进展. *国外医学分子生物学分册*, 1987, **9**: 37~41

Preparation and Analysis of the Antibodies Against Synthetic Peptide Immunologically Related to the Peripheral Domain of Anion Exchanger (Band 3) in Rat Erythrocyte Membrane. LI Jinying, ZHAO Faji¹⁾, GUO Junsheng¹⁾, YE Xuting²⁾, HU Xiaojian³⁾, ZHANG Zhihong³⁾, ZHOU Hanqing³⁾ (*Department of Hematology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China; ¹⁾ Department of Military Hygiene, Shanghai 200433, China; ²⁾ Electron Microscopy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³⁾ Department of Biophysiology, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Based on the conservative sequences, topological, biochemical, physiological and immunological data of anion exchanger (AE, band 3 protein) families, a peptide included 12 amino acids (position 476 ~ 487: SKLIK-IFQDYPL) was synthesized and the antibodies against this peptide and the native segment of band 3 from rat erythrocyte membrane were prepared. The findings of immunoblotting and anion transport studies indicated that the peptide is an essential segment of the anion transport which is a conservative sequence in mammals (rat, mouse as well as human). Immunoscanning electron microscopic study proved directly that the peptide is located at the peripheral domain of band 3 in rat erythrocyte membrane. The antibodies against band 3 are useful tools in studying the structures and functions of the anion transport protein and investigating the relationship between band 3 and diseases.

Key words band 3 protein, synthetic peptide, antibody