

将功能蛋白组装到人工膜(脂质体)上的方法很多。一般常用的有超声法、透析法和胆酸盐稀释法。这三种方法各有利弊。超声法比较简便,但一些对超声比较敏感的功能蛋白就不适宜。透析法重复性较好,但功能蛋白必须经受较高浓度(2%以上)胆酸盐的处理,而且慢透析也比较费时。胆酸盐稀释法的优点在于组装的功能蛋白既可以不受超声处理,也可以免受较高浓度胆酸盐的作用,但这种方法并不是所有功能蛋白都能获得成功的^[8]。究竟采用哪种方法才能获得较理想的结果?这一问题要根据具体对象具体分析。从细胞色素 c 嵌入脂质体的三种方法效果比较来看,是否可以认为对于与磷脂主要以静电作用相结合的一类功能蛋

白(如细胞色素 c)以超声法嵌入脂质体较为合适。还需要积累更多的实验资料来加以验证。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉:《生物物理与生物化学进展》,1977年,第6期,第36页。
- [2] Kagawa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.* **246**, 5477, 1971.
- [3] Eytan, G. et al.: *FEBS Letters* **57**, 121, 1976.
- [4] Papahadjopoulos, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624, 1967.
- [5] Azzi, A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 322, 1969.
- [6] Kaminsky, L. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 40, 1973.
- [7] Nicholls, P. et al.: *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 372, 1973.
- [8] Miller, G. et al.: *J. Memb. Biol.* **26**, 319, 1976.

[本文于1978年2月5日收到]

乙型肝炎表面抗原的分离及 沉降性质的初步研究

中国科学院生物物理研究所六室二组
湖北省微生物研究所肝炎组

肝炎是严重危害人民健康的常见病、多发病,急待研究解决。自发现乙型肝炎表面抗原(HB_sAg)后,对肝炎的研究有了很大发展。1972年湖北省微生物研究所从临床肝炎病人及多次输血的血友病人血清中分离出 HB_sAg,制成乙型肝炎表面抗原抗体^[1],并用电子显微镜观察了 HB_sAg 的形态^[2]。HB_sAg 由三种形态颗粒组成:(1)直径 200 埃的球状颗粒,含量最大。(2)棒状颗粒,直径 200 埃,长度由几百埃到几千埃不等。(3)直径 420 埃的大球状颗粒,含量极少。目前许多研究结果指出直径 420 埃的大颗粒很可能就是病毒颗粒^[3]。本文主要研究:(1)试用分部离心法和差速区带离心法分离 200 埃小颗粒及 420 埃大颗粒。(2)纯化后 HB_sAg 的稳定性。(3)测定 200 埃小颗粒及棒状颗粒的沉降系数。

一、材料与方 法

1. 血清

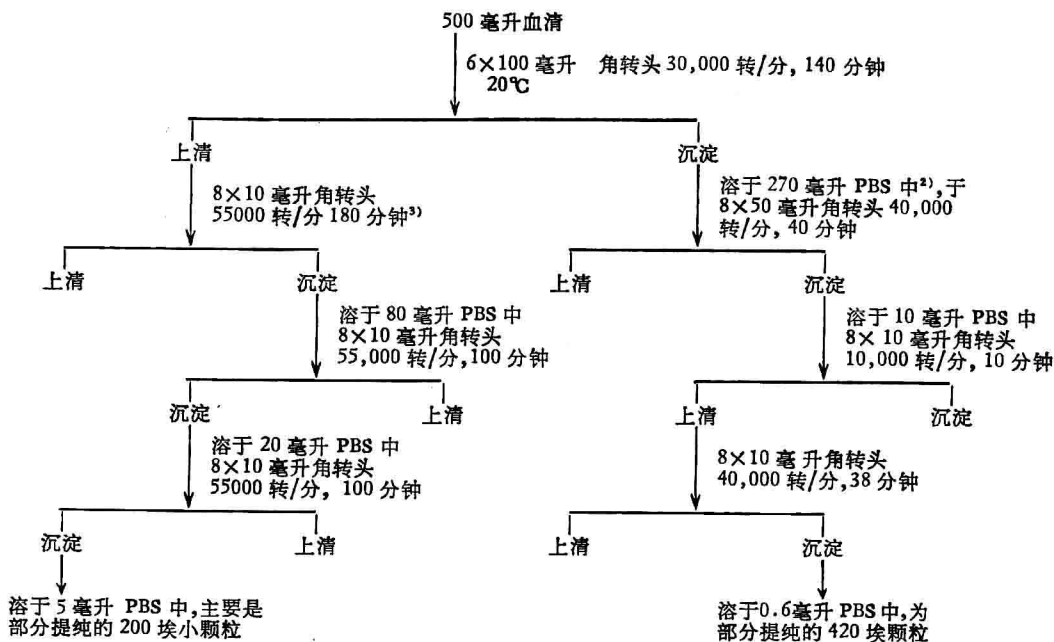
由血库选取 HB_sAg 阳性血清用不连续免疫电泳法^[4]测定乙型肝炎表面抗原活性(HB_sAg),选活性较高者再用免疫电泳法^[5]检查,选择含有 420 埃大颗粒较多的血清为分离样品。我们选用的分离血清其 HB_sAg 活性为 1:8。

2. 分部离心法^[1]

步骤如下:(见下页)。

3. 差速区带离心法

(1) 梯度溶液的制备 用自制的梯度混合装置(图 1),先在混合器中加 3 毫升 5.5% CsCl 溶液,后在搅拌下由注射器慢慢滴入 26% CsCl 溶液,由于混合器是密封的,混合溶液仍由另一管压出,慢慢流入 5 毫升离心管底部,等到液面



- 1) 实验使用 Omega I 型制备超速离心机。
- 2) PBS 为磷酸缓冲液, 内含 0.15M 磷酸盐, 0.85% NaCl 及 0.001% EDTA, pH 7.4。
- 3) 这一步亦可用硫酸铵沉淀法代替, 把血清配成 40% 饱和度的硫酸铵液使沉淀, 再用 40% 硫酸铵饱和度液洗沉淀一次。沉淀溶于 80 毫升 PBS 中, 透析除去硫酸铵, 低速离心除去不溶部分, 上清液接下面离心实验。

距离心管口约 5 毫米处停止。将离心管慢慢放正, 并抽出输液管。用折射仪测量离心管内溶液的梯度范围是 6% 到 24% CsCl 浓度, 相当于

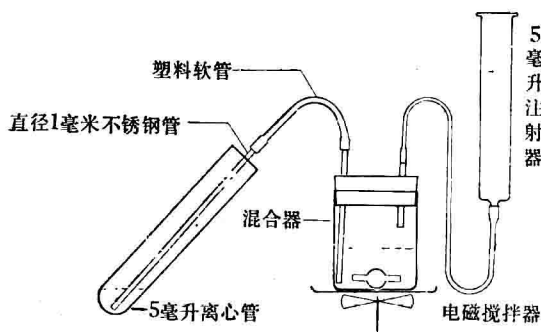


图 1 梯度混合装置

比重 1.045 到 1.216 范围。图 2 是离心管内 CsCl 浓度梯度分布曲线图。为微凸形曲线, 靠近离心管底部梯度较平。

(2) 加样品和离心 用 0.2 毫升注射器及弯头注射针 (图 3), 使注射针弯头向上, 在梯度液顶部慢慢铺加 0.1 毫升样品, 把离心管小心放入 SW-40 水平转头。然后离心。对 420 埃大颗粒样品依 30000 转/分于 18℃ 离心 80 分钟。对 200 埃小颗粒样品依 30000 转/分, 18℃

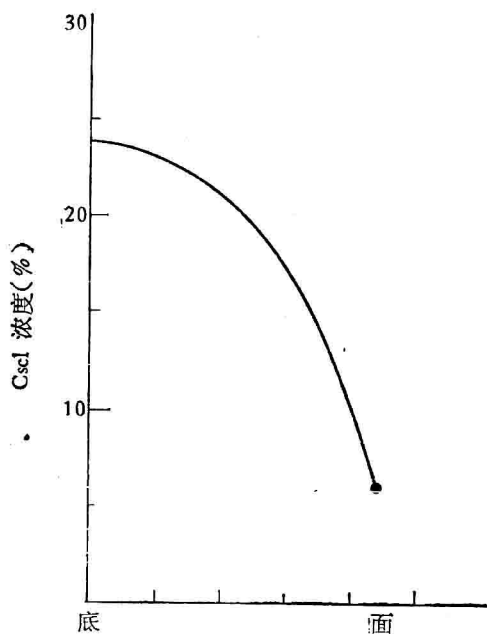


图 2 CsCl 梯度形状

离心 180 分钟, 离心毕, 小心取出转头及离心管。

(3) 样品收集及检测 离心管小心装在自制梯度取样器 (图 4) 上。由右侧压气瓶压入空气使梯度分离溶液由底部经中央不锈钢管流

出,用1毫升小玻璃指管收集,每管8滴,约收集30管。可以用变动压气瓶压力的办法控制梯度液流出速度,使每一离心管收集时间不少于10分钟。每一玻璃指管收集液分别在MSP-AIII型显微分光光度计的常量测定部分用自制光程为0.4厘米、容量0.1毫升的测量池在280毫微米波长测量光密度值,依收集管号作图,得紫外吸收检测图。



图3 加样用注射针

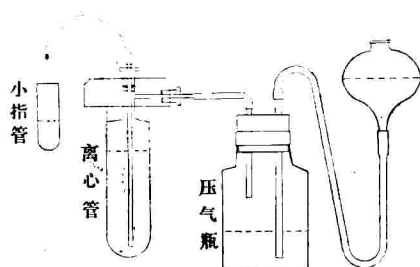


图4 梯度取样器

4. 沉降系数测定

由差速区带离心收集的200埃小颗粒样品及棒状样品,用PBS溶液透析,然后用UCA-1A型分析超速离心机紫外光学系统测定沉降系数。

5. 电子显微镜观察

分部离心部分提纯的样品及差速区带离心分离的样品分别用蒸馏水透析,滴铺于覆盖有火棉胶膜的铜网上,约一分钟,用滤纸吸去多余液体,用pH6.9的2%磷钨酸负染2分钟,吸去染液,干燥。用JEM-7及HU-11A电子显微镜作形态观察。

6. HB_sAg活性及正常血清蛋白测定

分部离心及差速区带离心纯化的样品,曾用不连续免疫电泳法测定HB_sAg活性及人正常血清蛋白量。HB_sAg活性测定使用湖北省微生物研究所制备的HB_sAg马抗血清。人正常血清蛋白测定用北京生物制品所制备的正常人血清的马抗血清。

二、实验结果

1. HB_sAg各形态颗粒的分离

(1) 200埃小颗粒的分离纯化 血清经过

一次30000转/分,140分钟离心除去420埃大颗粒及部分棒状颗粒,然后经过一次55000转/分,180分钟及二次55000转/分,100分钟离心除去大部分血清蛋白成分,得到初步纯的200埃小颗粒。免疫电泳检测指出HB_sAg活性提高20倍,仍含有少量正常血清成分。初步纯的200埃小颗粒再用差速区带法离心纯化,它的紫外检测结果见图5a。图中18管所表示峰代表200埃小颗粒,24管峰代表残存的正常血清蛋白。第18管收集样品有很强的HB_sAg活性及微量的正常血清成分。电子显微镜观察几乎全是200埃小颗粒。免疫电泳检测指出13—22管HB_sAg阳性,其余各管为阴性。而以第18管为最高。正常血清成分检测15—28管为阳性,其余各管为阴性,而以21—24管为最高。所以免疫电泳与电泳结果说明第18管峰主要是200埃小颗粒,杂有微量血清蛋白成分。

(2) 420埃大颗粒分离提纯 血清经三次分部离心,使420埃大颗粒得到浓缩及部分提纯。图版I图1是经三次分部离心初步分离的420埃大颗粒样品的电子显微镜照片。原血清中420埃大颗粒含量很低,经分部离心后大颗粒比例已有很大提高,从电泳照片估计约占总数的3%。样品再用差速区带法离心使进一步

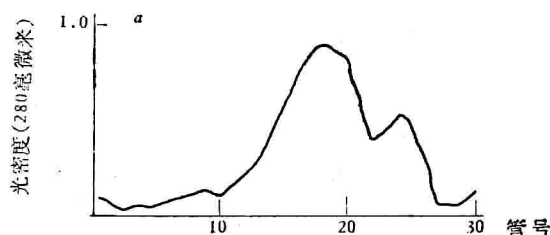


图5a 分部离心法初步纯化的200埃小颗粒样品差速区带离心分离后的紫外检测图(30000转/分,180分钟)

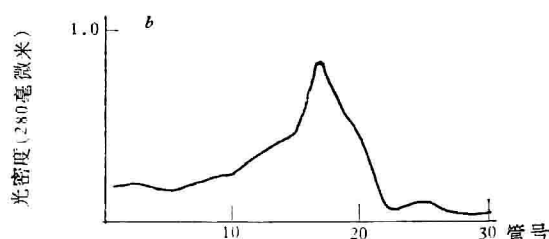


图5b a图中第18—21管收集样品经透析浓缩后第二次差速区带离心的紫外检测图(30000转/分,180分钟)

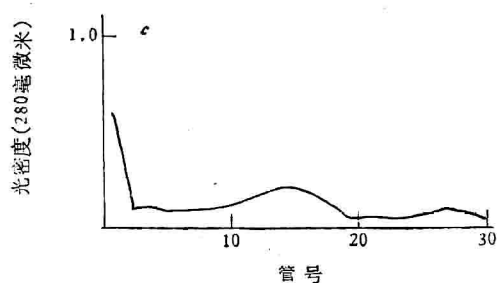


图 5c a 图中第 12—17 管收集样品经透析浓缩后第二次差速区带离心的紫外检测图 (30000 转/分, 180 分钟)

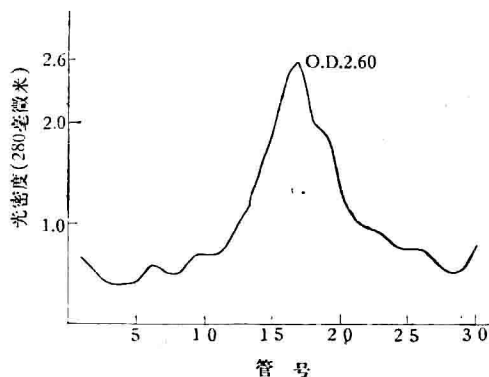


图 6 分部离心法初步纯化的 420 埃大颗粒样品差速区带离心分离后的紫外检测图 (30000 转/分, 80 分钟)

提纯, 紫外检测结果见图 6。由离心管底部起数, 第 6 管有一吸收峰, 从电子显微镜观察半数 420 埃大颗粒。第 9 管主要是长棒状颗粒。第 17 管峰主要是中等长度的棒状颗粒。第 23 管小峰主要是 200 埃小颗粒, [以上见图版 II 图 2 (1—4)]。第 26—27 管的峰主要是残余的血清蛋白。免疫电泳检定指出第 5—23 管 HB_sAg 阳性。第 10 管始有正常血清成分, 往后逐渐增高。电镜及免疫电泳结果说明第 6 管峰区约半数 420 埃大颗粒, HB_sAg 为弱阳性, 免疫电泳测不出正常血清成分。第 17 管峰主要是中等棒状颗粒, HB_sAg 阳性, 还含有微量正常血清成分。

2. 纯化 200 埃小颗粒样品的稳定性

经分部离心及差速区带离心纯化的 200 埃小颗粒 (图 5a) 样品在 4℃ 冰箱内放置一星期后, 准备进一步纯化。把图 5a 的 18 到 21 管收集样品合并用 PBS 液透析, 然后于 6 × 10 毫升角转头中依 55000 转/分离心 100 分钟, 去上清液, 把沉淀溶于 0.3 毫升 PBS 液中。然后做

第二次差速区带离心, 紫外检测图见图 5b。图中第 17 管处有一最大吸收峰, 峰明显不对称, 偏向离心管底部, 说明原 200 埃小颗粒样品中有部分沉降速度变大, 可能是发生了聚合。对图 5a 的第 12—17 管收集样品亦同样合并, 浓缩及作差速区带离心, 紫外检测图见图 5c。可见在第 15 管区有一小峰, 而在底部沉积物很多, 说明这部分 200 埃小颗粒表现更明显的聚合。

3. 200 埃小颗粒及棒状颗粒的沉降系数测定

200 埃小颗粒选用图 5a 中第 18 管收集样品用 PBS 溶液透析, 用分析超速离心机紫外光学系统测量, 样品呈现一个很狭的单峰, 计算 S_{20w} 为 40S。棒状颗粒选用图 6 的第 17 管收集液为样品, 结果也呈现单一狭峰, 计算 S_{20w} 为 80S。

三、讨 论

HB_sAg 在血清中含量很少, 一般分离方法是第一使 HB_sAg 与正常血清蛋白分开, 第二是用差速区带离心法使三种形态颗粒分开。^[6]曾用等密度区带离心法离心二次使 HB_sAg 与正常血清蛋白分离。这个方法要用区带转头及很长时间离心。我们试用分部离心法把 HB_sAg 与正常血清蛋白分开。据实验结果看来用分部离心法分离 200 埃小颗粒仍含有相当量的正常血清蛋白, 可能是沉降系数大于 20S 的巨球蛋白。它们与 200 埃小颗粒的沉降系数很接近, 用分部离心法难以完全除去。而且离心时间亦太长。分部离心分离的 200 埃小颗粒进一步用差速区带离心法提纯, 由紫外检测图 5a 可以看到分开的 200 埃小颗粒峰和正常血清蛋白峰, 但 200 埃小颗粒峰区收集液也还含有微量正常血清蛋白, 分部离心法分离 420 埃大颗粒结果是较满意的。由三次分部离心分离的 420 埃大颗粒样品用免疫电泳测定含有微量正常血清成分, 同时大颗粒浓度提高到约占总颗粒数的 3%, 达到后面紫外检测法可能检出的浓度。差速区带离心法分离 HB_sAg 三种形态颗粒, 可以分出三个区带, 但间距太近, 分离效果还要改进。主要可改进

梯度形状,取样方法,提高离心速度和改用长离心管以提高区带的分辨能力。由差速区带离心最后纯化的 420 埃大颗粒样品用免疫电泳已测不出正常血清蛋白。所以用分部离心法和差速区带离心法分离 420 埃大颗粒是可行的。应该指出分离 420 埃大颗粒成功的另一关键是选择阳性血清。必须选择含 420 埃大颗粒多的阳性血清,经过分部离心法分离浓缩,至少要达到以后紫外检测可以测出的浓度,这样才能由紫外检测图上找到 420 埃大颗粒的区带,达到分离的目的。

从纯化 200 埃小颗粒样品稳定性实验说明图 5a 的 18—21 管样品表现一定的聚合,而 12—17 管样品表现了更大的聚合。gerin 亦曾发现纯化的 HB_sAg 随着放置时间增长而活性下降,他认为可能是聚合。我们的实验证明聚合确实存在。从距血清蛋白峰(24 管)的距离和免疫电泳结果知道第 18—22 管样品杂有较多的血清蛋白成分,而第 12—17 管则明显的少,因此可能一定量的血清蛋白对 200 埃小颗粒有稳定作用。纯化的 420 埃大颗粒亦有类似现象。为了长期保存纯化的 HB_sAg 样品,必须进一步解决 HB_sAg 纯化后的稳定保存问题。

我们测定纯化 200 埃小颗粒峰区的沉降系数为 40S。gerin 等(1971)用区带离心实验计算为 54S。以后 Bohme(1972)和 Kim(1973)等用分析离心机测定都在 30—40S 之间^[3]。目前一般认为 30—40S 是正确的。因为 200 埃小颗粒的直径分布在 180—230 埃,由于不同实验室分离样品的大小、分布不同,测定结果有些波动是正常的。认为测定结果大于 40S 的是样品发生了聚合,所以我们纯化的 200 埃小颗粒峰区的沉降系数值与文献是一致的。棒状颗粒的沉

降系数还没有文献报道,我们选用图 6 第 18 管收集液为样品测量结果是 80S。同样这个值只代表棒状颗粒峰区测量值,相当于电镜照片图版 II 图 2(3)所示颗粒分布的平均沉降系数。实际棒状颗粒长度分布更广,由差速区带离心的区带分布估计它的沉降系数可能在 50—180S。

摘 要

1. 试用分部离心法及差速区带离心法分离 HB_sAg 的 420 埃大颗粒。纯化产品用免疫电泳法测不出血清蛋白成分,仍杂有其他 HB_sAg 颗粒。

2. 试用分部离心法及差速区带离心法分离 HB_sAg 的 200 埃小颗粒。产品用电镜检查未发现 420 埃大颗粒及棒状颗粒,仍杂有微量血清蛋白成分。

3. 证明纯化的 200 埃小颗粒放置后发生聚合。

4. 用分析超速离心机测量 200 埃小颗粒峰区样品沉降系数 S_{20w} 为 40S,测量棒状颗粒峰区样品沉降系数 S_{20w} 为 80S。

参 考 文 献

- [1] 湖北省微生物研究所:《应用微生物与病毒》1973 年,第二集,第 9 页。
- [2] 湖北省微生物研究所:《应用微生物与病毒》1973 年,第二集,第 13 页。
- [3] Zucherman, A. J.: Human (Viral) hepatitis, hepatitis associated antigen and viruses, 1975.
- [4] 湖北省微生物研究所:《应用微生物与病毒》1972 年,第一集,第 35 页。
- [5] Meyrick, E. A. et al.: *Med. Lab. Technol.*, 30, 391, 1973.
- [6] Gerin, G. L. et al.: *J. Virology May*, p. 569—576, 1971.

[本文于 1977 年 9 月 3 日收到]

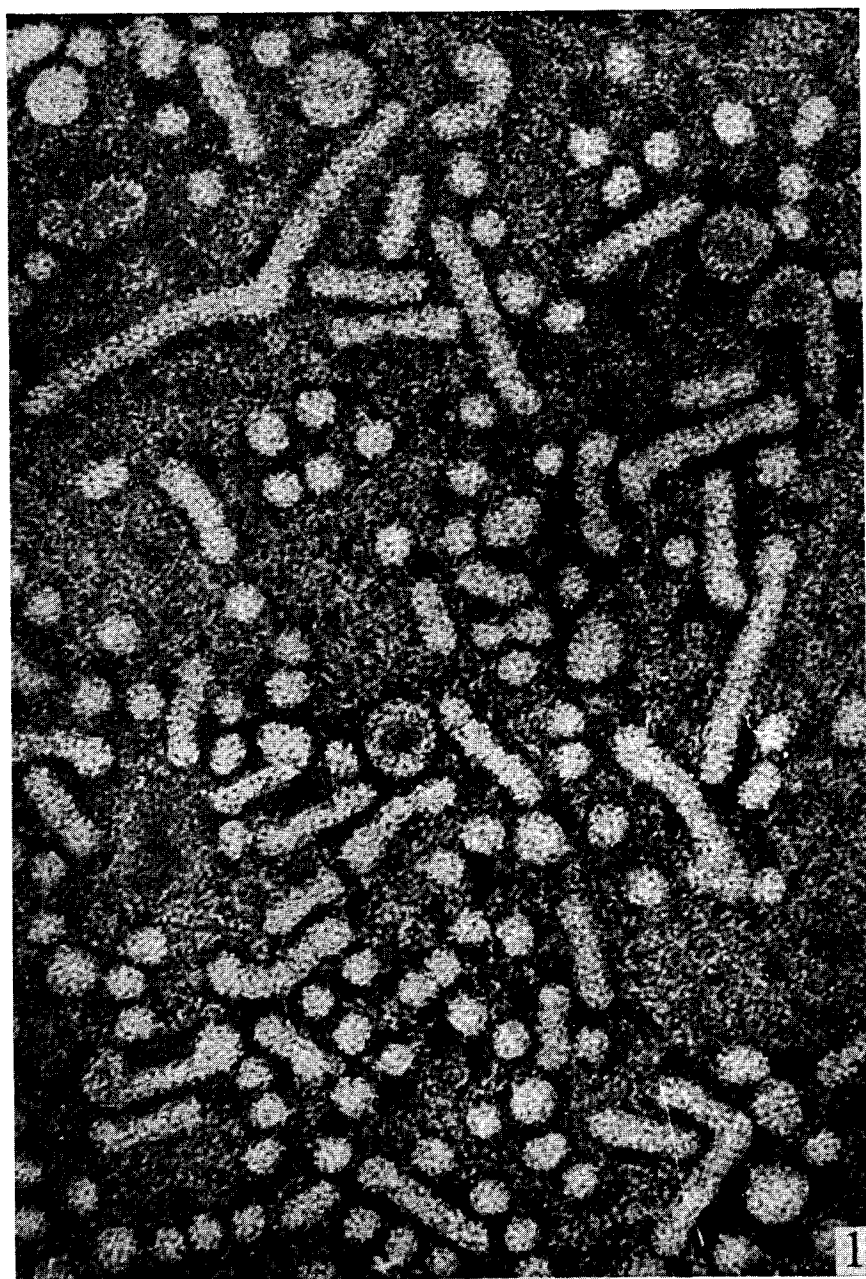


图1 经三次分部离心初步分离的420埃大颗粒样品的电子显微镜照相 25000×

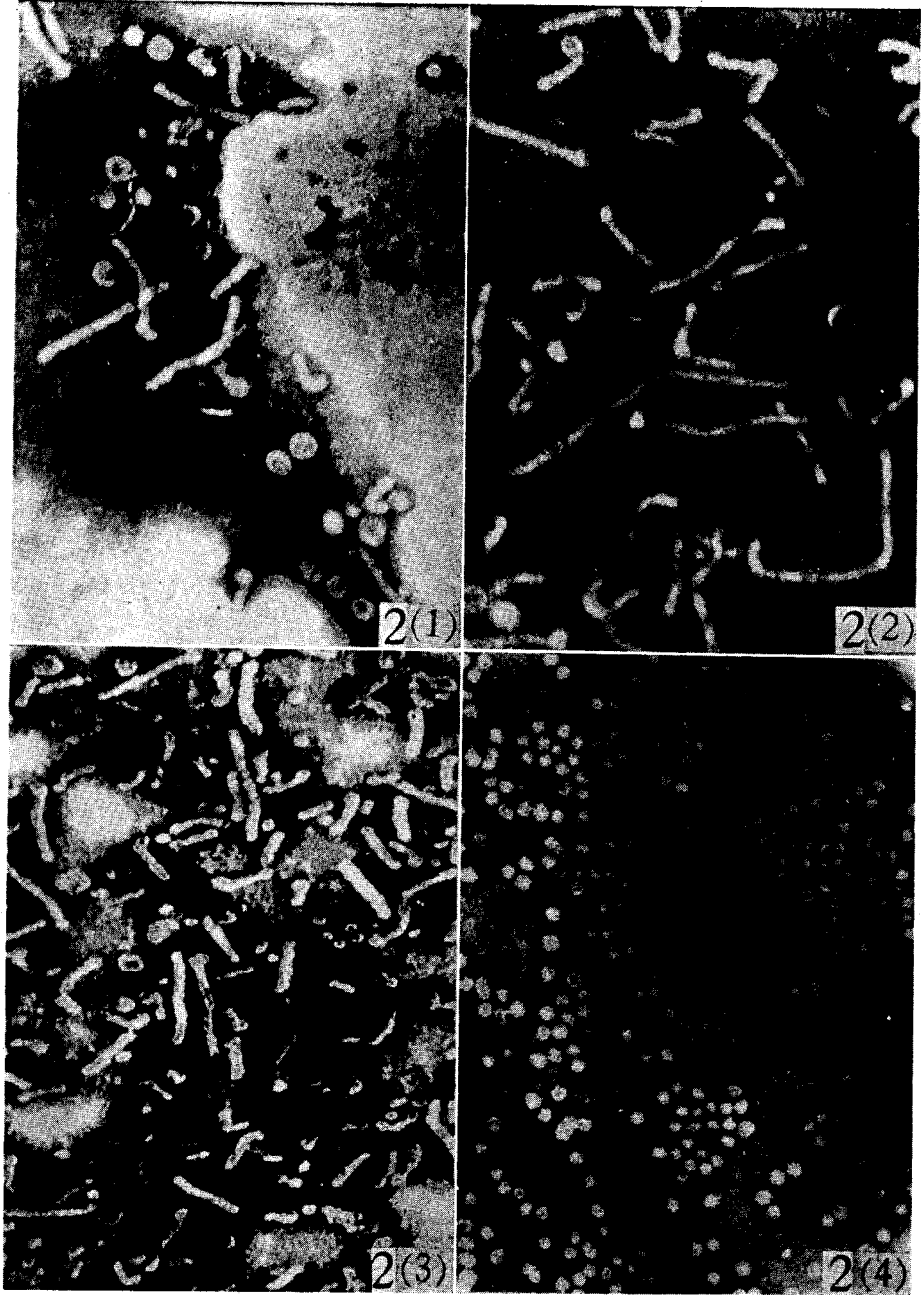


图 2 初步纯的 420 埃大颗粒样品差速区带离心分离各区带的电子显微镜照相 10500 $\times$
(1) 第六管主要是 420 埃大颗粒；(2) 第 9 管主要是长棒状颗粒；(3) 第 17 管主要是中等长度的棒状颗粒；(4) 第 22 管主要是 200 埃小颗粒