

4. 钙调蛋白 (CaM) 对膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活化作用 红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 受 CaM 的调节, 图 3(C)(D) 分别为缺少 CaM 与存在 $0.4\mu\text{g/ml}$ CaM 时的情况, 由斜高可计算缺少 CaM 时的酶活(基本酶活) $0.7\mu\text{M Pi/min}$, 酶浓度为 $50\mu\text{g}$ 膜蛋白/ml, 比活为 14n mole/mg 蛋白 $\cdot \text{min}$, 存在 CaM 时的酶活为 $3.0\mu\text{M Pi/min}$, 比活为 60n mole/mg 蛋白 $\cdot \text{min}$, 以 CaM 完全活化的酶活为 100% 计, CaM 浓度与酶活的关系如图 4 所示。7nM 的 CaM 可使酶达到半最大活化, CaM 对膜 Ca 泵的调节具有显著的生理意义, 在正常胞内低 Ca^{2+} 浓度时 ($\sim 10^{-7}\text{M}$), CaM 不与膜 Ca 泵结合, Ca 泵处于低活性状态, 但也泵出少量的 Ca^{2+} , 以抵销正常被动渗漏进胞内的 Ca^{2+} ^[9]。当某些因素引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高后, $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{CaM}$ 复合物与

Ca 泵结合, 使之跃迁为高活性状态, Ca 泵将以最大效率泵出胞内过多的 Ca^{2+} , 以维持胞内 Ca^{2+} 的稳恒水平 (Homeostasis)

本文叙述的膜 ATPase 自动分析装置, 有以下几个特点: 1) 可以连续测定酶反应中释放的无机磷, 因此可准确计算酶反应速率。2) 通常用 Fiske 及其改进法测定酶反应释放的无机磷时, 酸性钼酸催化的 ATP 非酶促水解将干扰酶反应的测定, 而在自动连续测定体系中, 非酶促水解产生的 Pi 可以忽略不计(见图 3, B)。3) 与使用 ATP 再生系统分析 ATPase 相比, 它无需高纯 ATP 和复杂的外加酶系(丙酮酸激酶, 乳酸脱氢酶等), 因此是一种简便、可行的分析方法。这种装置原则上也适用于其它水解产生 Pi 的酶的测定, 如 Na^{+} - K^{+} -ATPase, 磷酸酶等。

承张筠同志熟练的技术协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Pullman, M. E. et al: *J. Biol. Chem.*, 235, 3322, 1960.
- [2] 李生广等: 《生物化学与生物物理进展》, 6, 70, 1983.
- [3] Lacy, J. *Methods in Enzymology*, vol. 10, 385, 1967.
- [4] Kline, M. H. et al: *Analyt. Biochem.*, 23, 97,
- [5] Arnold, A. et al: *Analyt. Biochem.*, 71, 209, 1976.
- [6] Kakiuchi, S. et al: *FEBS Letters*, 126, 203, 1981.
- [7] Gietzen, K. et al: *Biochem. J.*, 207, 155, 1982.
- [8] Lowry, O. H. et al: *J. Biol. Chem.*, 195, 265, 1951.
- [9] Roufogalis, B.: *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 57, 1331, 1979.

[本文于 1984 年 9 月 8 日收到]

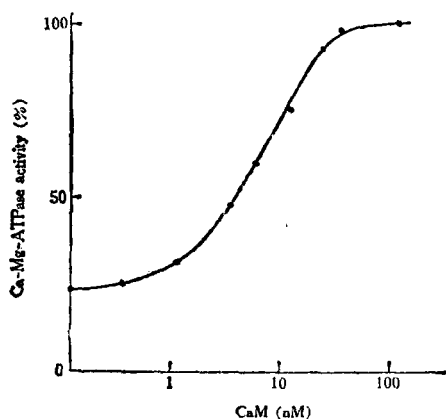


图 4 CaM 对红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活化
酶反应溶液的成分参见正文, $0.4\mu\text{g/ml}$ CaM 活化的酶
活计为 100%, 酶半最大活化要求 7nM 的 CaM。

高纯度 α_1 -抗胰蛋白酶的提取、抗血清的 制备及其火箭免疫电泳测定

顾学范 陈瑞冠
(上海市儿科研究所)

齐 家 仪
(上海第二医学院附属新华医院)

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -AT) 是肝细胞分泌的一种糖蛋白, 是血浆蛋白电泳 α_1 球蛋白的主要

成份。它能抑制多种蛋白酶, 如胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、纤维蛋白溶酶等的活性。

α_1 -AT 在血浆中含量较高,在组织中广泛存在,对维持机体正常生理功能,防止组织过度破坏起重要作用^[1,2]。

本文报道经我们改良的高纯度 α_1 -AT 提取方法、抗血清的制备及其火箭免疫电泳定量测量方法。

一、材料与方法

1. α_1 -AT、蛋白质测定方法 α_1 -AT 按 Eriksson 法测定胰蛋白酶抑制容量(TIC)^[3]。结晶胰蛋白酶为 Sigma 产品,胰蛋白酶的特异性底物, N-苯甲酰-D, L-精氨酸-P-对硝基苯胺盐酸盐(BAPNA)为上海生化所产品。

蛋白质含量用紫外吸收法测定。

2. 醋酸纤维薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫电泳等按余澍等方法^[4]。

3. 刀豆蛋白 A(ConA)-Sephacrose 4B 按 Jakoby 法自制^[5]。

4. 提纯 α_1 -AT 操作在 13—18℃ 室温下进行。因 α_1 -AT 是巯基酶,所有缓冲液中均含 1mM β -巯基乙醇,以保护巯基基团,防止二硫键产生。

1) 盐析 50ml 混合血清加等量 pH7.0 饱和硫酸铵,搅拌 15 分钟,2500g 离心 30 分钟。上清液置半透膜中,用 pH7.6,10mM PBS 透析。经常换水,直到用钠氏试剂测定无硫酸根离子,再用 pH 6.5 的 5mM PBS-0.05M NaCl 透析 5 小时;聚乙二醇浓缩至 50ml。

2) DE52-Cellulose 层析 按 Crawford 方法^[6]。层析柱用 pH 6.5 PBS-0.05 M NaCl 平

衡。上样后用相同缓冲液,NaCl 浓度从 0.05—0.20M 进行线性洗脱。收集液中含有 α_1 -AT 活力的 83—104 管合并。透析、浓缩。洗脱曲线见图 1。

3) ConA-Sephacrose 4B 亲和层析 ConA-Sephacrose 4B 用 pH7.6, 50mM PBS-0.2M NaCl 平衡,上样后用相同缓冲液洗柱至 $A_{280nm} < 0.05$,再用相同缓冲液含 0.2M α -甲基-D-葡萄糖苷解联洗脱,有 α_1 -AT 活性的部分在第二峰,洗脱曲线见图 2。经测定,我们自制的 ConA-Sephacrose 4B,一次可吸附 16mg 蛋白质。

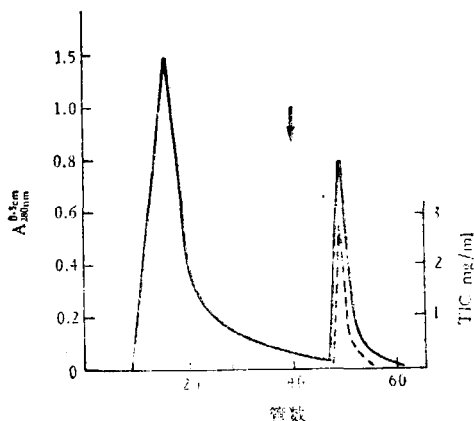


图 2 ConA-Sephacrose 4B 亲和层析图

ConA-Sephacrose 4B 柱 1.5 × 25cm pH7.6, 50mM PBS 含 0.2M NaCl 洗柱,箭头处开始用相同缓冲液含 0.2M 甲基葡萄糖苷解联洗脱,2ml/10 分/管。

4) Sephadex G 100 凝胶过滤 将 ConA 柱第二峰有 α_1 -AT 活性各管合并、浓缩,上 Sephadex G100 柱。这一步有两个洗脱峰,二者重迭。 α_1 -

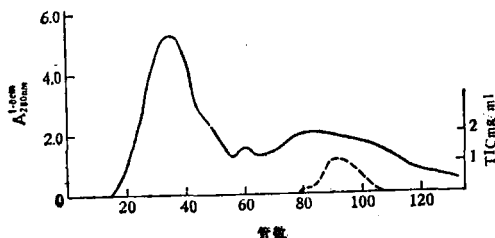


图 1 DE52 纤维素柱层析

DE52 纤维素柱 2.0 × 40cm, pH6.5, 5mM PBS 洗脱, NaCl 从 0.05M 到 0.20M 线性梯度,洗脱液总量 1 升, 3.5ml/10 分/管。虚线为 TIC

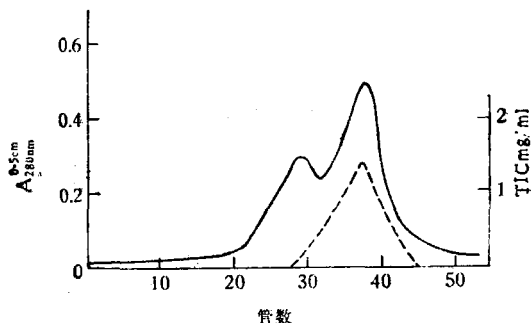


图 3 Sephadex G 100 层析图

Sephadex G 100 柱 1.5 × 55cm, pH7.6, 20mM PBS 洗脱, 2ml/10 分/管

AT 活性部分在第 2 峰(见图 3), 合并 32—43 管。

5) 电泳切割制备 经上述 4 步提纯, 在凝胶电泳中还见一条杂蛋白带, 采用不连续电泳系统切割制备。聚丙烯酰胺凝胶直径 2.2cm, 长 12cm。浓缩胶 pH6.7, 凝胶浓度 4%(W/V); 分离胶 pH8.9, 凝胶浓度 10%。使用 pH8.2 甘氨酸-Tris 电极液, 电压 110V, 电流 40mA (2

根凝胶柱), 电泳时间 $4\frac{1}{2}$ 小时。取出凝胶后,

纵向 V 形切下一条, 加温快速固定、染色、脱色。参考染色凝胶所显示的 α_1 -AT 部位, 切下未染色凝胶的相应部位, 捣碎, 收集上清液。

二、 α_1 -AT 的纯度鉴定及其性质

1. 提取 α_1 -AT 各步骤的有关参数见表 1,

表 1 人血清 α_1 -AT 的纯化步骤

步 骤	体 积 ml	总蛋白 mg	TIC mg/ml	TIC 总活力 mg	特异性活力 mg TIC/mg 蛋白	回收%	纯化倍数
血清	50	3488	1.92	96	0.0276	100	1
50% 硫酸铵	53	1219	1.44	76	0.0623	79.16	2.2589
DE52 纤维素	24	364	1.70	41	0.1342	42.70	4.8627
ConA-Sepharose 4B	6	11.7	2.65	15.9	1.3590	16.56	49.2382
Sephadex G 100	7	7.6	1.84	12.9	1.6947	13.44	61.4035
电泳制备	1.36	4.1	1.98	8.63	2.1056	8.99	76.2884

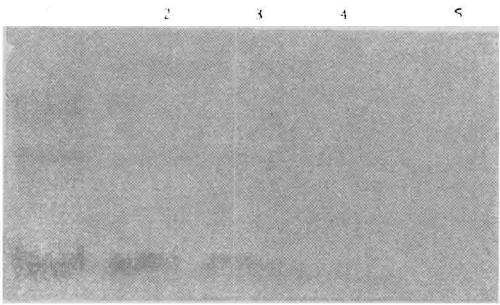


图 4 提纯 α_1 -AT 各步醋酸纤维膜电泳图谱

巴比妥缓冲液, pH8.6, 1. 血清 2. 盐析 3. DE52 纤维素 4. ConA-Sepharose 4B 5. Sephadex G 100

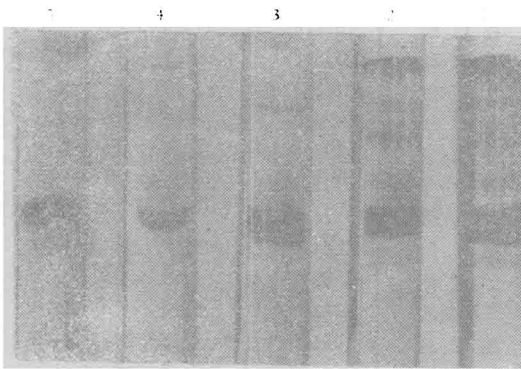


图 5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

凝胶浓度 10%, pH8.9, 电流 2mA/管 1. 血浆 2. 盐析 3. ConA-Sepharose 4B 4. Sephadex G100 5. 电泳制备

纯化的 α_1 -AT 特异性活力为 2.1056, 提高了 76 倍, 回收率接近 9%。

2. 提纯 α_1 -AT 各阶段的醋酸纤维薄膜电泳、凝胶电泳结果见图 4, 5。提纯的 α_1 -AT 在正常人血清 α_1 球蛋白位置。

3. 在 pH 8.9 和 6.7 二种不同值的凝胶电泳中, 提纯的 α_1 -AT 都只显示一条染色带(见图 6 的 1, 2)。

4. α_1 -AT 能与胰蛋白酶结合, 在凝胶电泳中出现 α_1 -AT 胰蛋白酶复合物带(见图 6 的 3,

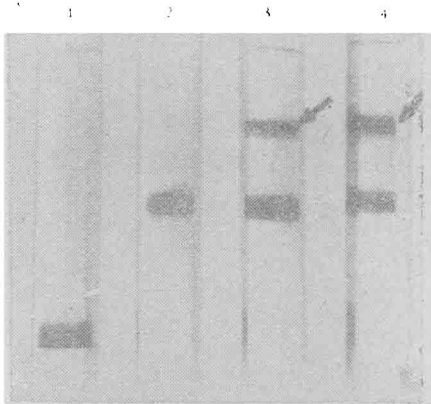


图 6 提纯的 α_1 -AT 以及与胰蛋白酶形成的复合物

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳, pH6.7. 2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳, pH8.9, 3, 4. α_1 -AT 与不同剂量的胰蛋白酶形成的复合物(箭头处)。

4)。这是因为胰蛋白酶带正电荷,与 α_1 -AT 结合后使 α_1 -AT 泳动受阻滞所致。

5. 免疫电泳结果见图 7。兔抗人全血血清由上海免疫学研究所提供。提纯的 α_1 -AT 在正常人 α_1 -AT 位置出现一条沉淀弧;用兔抗人 α_1 -AT 血清鉴定,正常人血清、提纯的 α_1 -AT 和进口的 α_1 -AT (Sigma 产品)均只出现一条沉淀弧,位置相同。

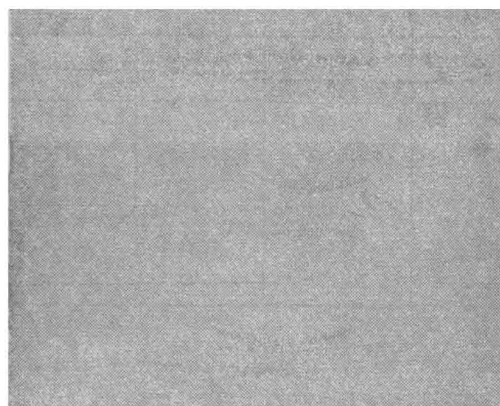


图 7 琼脂免疫电泳图谱

1. 上孔: 正常人血清; 下孔: 提纯的 α_1 -AT; 槽内: 兔抗人全血血清 2. 上孔: 正常人血清; 下孔: 提纯的 α_1 -AT; 槽内: 兔抗人 α_1 -AT 血清 3. 上孔: Sigma α_1 -AT; 下孔: 提纯的 α_1 -AT; 槽内: 兔抗人 α_1 -AT 血清。

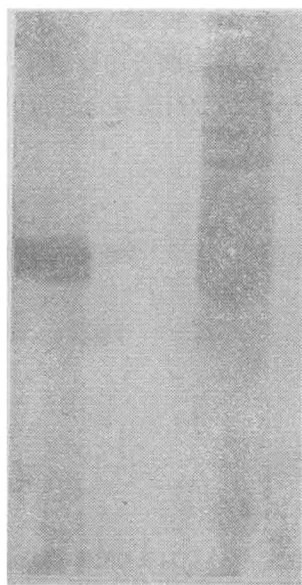


图 8 α_1 -AT 聚丙烯酰胺凝胶电泳

左图: 提纯的 α_1 -AT 右图: Sigma 层析纯的 α_1 -AT

6. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳比较, 结果我们提纯的 α_1 -AT 较进口产品纯度更高, 见图 8。

7. α_1 -AT 分子量 用 SDS 凝胶电泳检测几种标准品蛋白质和 α_1 -AT 的电泳迁移率, 算出各自的相对迁移率 (Rf 值)。以标准品蛋白质的 lg 分子量作纵坐标, Rf 值作横坐标作图, 求出 α_1 -AT 分子量是 52,500, 见图 9

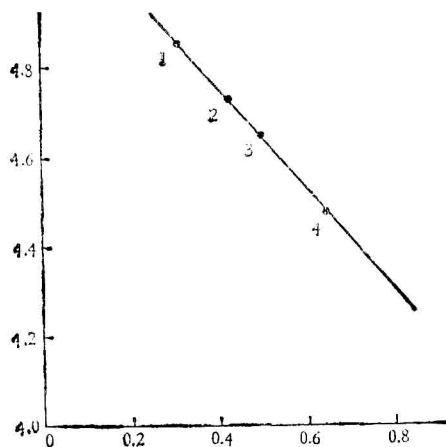


图 9 SDS凝胶电泳的相对泳动率

玻璃管 $0.5 \times 10.0 \text{ cm}$, 电压 100V, 电流 2mA/管, 电泳时间 2.5 小时。纵坐标: 蛋白质 lg 分子量; 横坐标: Rf 值 1. 牛血清白蛋白, 2. α_1 -AT, 3. 卵白蛋白, 4. 花生素凝素

表 2 α_1 -AT 的氨基酸组成分析

氨基酸种类	毫克分子/ mg 蛋白质	残基重量/ mg 蛋白质	残基数/克分 子蛋白质
天冬氨酸	854.7	98.0	44.8
苏氨酸	481.9	48.7	25.3
丝氨酸	322.0	28.0	16.5
谷氨酸	857.6	110.6	45.0
脯氨酸	338.8	32.9	17.8
甘氨酸	402.5	23.0	21.1
丙氨酸	424.0	30.1	22.3
缬氨酸	433.6	43.0	22.8
蛋氨酸	103.1	13.5	5.4
异亮氨酸	328.0	37.0	17.2
亮氨酸	864.3	97.8	45.4
酪氨酸	60.2	9.8	3.2
苯丙氨酸	473.8	69.7	24.9
组氨酸	271.9	37.3	14.2
赖氨酸	597.3	76.5	31.4
精氨酸	97.6	15.4	5.1

8. 氨基酸组成分析 α_1 -AT 加 6N 盐酸置

110℃ 中水解 24 小时, 经 LKB Biochrom 4400 氨基酸分析仪测定, 其氨基酸组成列于表 2, 与 Morii 等^[6,7]所报告的结果近似。

三、抗血清的制备及火箭免疫电泳定量测定

1. 抗血清制备^[8] 用上述方法提取的 α_1 -AT 作抗原, 按小剂量多点皮内注射法制备抗血清。经 7 次注射, 历时 80 天, 获得了高特异性、高效价的兔抗人 α_1 -AT 血清。

2.5—3.0kg 家兔, 采用完全福氏佐剂, 1:3 体积羊毛脂与石蜡油混合, 与 α_1 -AT 充分乳化后在家兔背部皮内多点注射, 每只家兔每次用 2ml 佐剂, 含抗原 0.15mg。

用双向免疫扩散法进行抗血清效价测定, 在琼脂板上找出最低稀释倍数的沉淀线为 1:64 (图 10)。

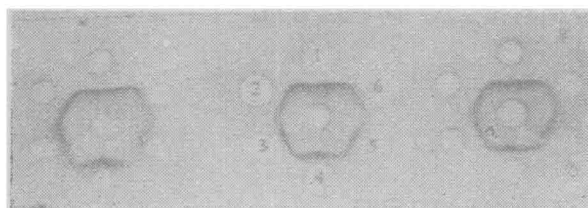


图 10 双向免疫扩散测抗血清效价
孔 1 为 1:2 稀释, 孔 6 为 1:64 稀释。

2. 火箭免疫电泳定量测定^[4,9]

1) 标准曲线绘制 纯化的 α_1 -AT 作标准蛋白。不同稀释度的抗血清加入琼脂糖凝胶中制板, 打洞, 然后在小孔中加入不同浓度的标准

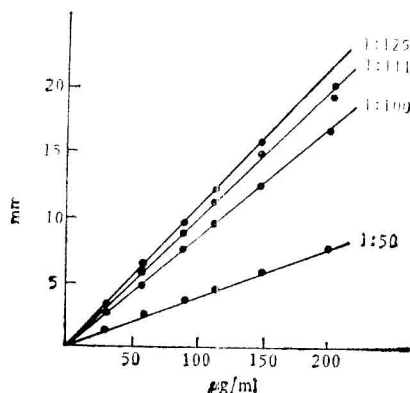


图 11 抗血清不同浓度稀释的标准曲线

蛋白。电压 10V/cm, 电泳 4 小时后观察沉淀峰的高度。以标准蛋白含量为横坐标, 沉淀峰高度为纵坐标绘制标准曲线, 结果标准蛋白在 1:111 抗体稀释板上直线斜率最好 (图 11)。

2) 标本测定 用生理盐水将血清稀释 30 倍, 每块琼脂板上均有标准蛋白对照。待测标本根据沉淀峰高度, 从标准曲线上求其含量 (mg/ml)。

四、讨 论

经盐析、离子交换层析、ConA-Sepharose 4B 亲和层析、凝胶过滤和电泳切割制备等步骤, 我们成功地从血清中提纯了 α_1 -AT。

有关 α_1 -A 的各种分离方法及其发展, 请参看文献[10—13]。从血浆中提取 α_1 -AT, 国内也有报告, 但都没有加 SDS 进行不同 pH 值电泳分析, 也没有进行分子量测定和氨基酸分析。有的缺乏标准品对照^[14], 有的抗血清特异性不高, 在交叉免疫电泳中主峰可见有二个小峰^[15], 难以满足更高的实验要求。目前商品化的 α_1 -AT, 经我们鉴定纯度也不够高, 在交叉免疫电泳中, 主峰内有一个峰, 峰后还有两个小峰。

本文提取 α_1 -AT、提纯的抗原和制备的抗血清主要有以下特点:

1. 采用亲和层析法提取 α_1 -AT 时, ConA-Sepharose 4B 是自制的。

2. 提纯的最后一步采用柱状不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分辨率较高。电泳后立即取出凝胶, 纵向 V 形切下一条, 加温快速固定、染色、脱色作为对照。这既防止了制胶中蛋白带进一步扩散而影响分辨率, 又使含 α_1 -AT 的凝胶部位切割准确, 避免了盲目的分段切割, 或用不同凝胶柱作对照, 造成误差较大的缺点。

3. 提纯的 α_1 -AT 经多项指标检查, 纯度超过了美国 Sigma 层析纯产品。⁵

4. 制备的抗血清, 效价高, 火箭免疫电泳抗体工作稀释度为 1:111。特异性好, 在交叉免疫电泳中只显示出一个沉淀峰。目前国内商品化的抗 α_1 -AT 血清以及文献中, 还未报道有类

似纯度的抗血清,我们的抗血清可以满足等电聚焦电泳 Pi 表型分型研究要求。

上海第二医学院生化教研室和中科院上海生物化学所提供标准分子量蛋白质,上海免疫学研究所提供兔抗人全血血清,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Harris, H. et al.: *Advances in Human Genetics*, 11, p. 1, Plenum Press, New York, 1981.
- [2] Cox, D. W. et al.: *Pediatr. Clin. North Am.*, 26, 267, 1979.
- [3] Eriksson, S.: *Acta Med. Scand.*, 177, Suppl, 432, 1, 1965.
- [4] 余演等:《临床免疫技术》,p. 49, 57, 425, 上海科学技术出版社, 1982.

- [5] Jakoby, W. B.: *Methods in Enzymology*, vol. 34, p. 499, Academic Press New York, 1974.
- [6] Crawford, I. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 215, 1973.
- [7] Morii, M. et al.: *J. Biochem.*, 83, 269, 1978.
- [8] Cameron, F. H. D. et al.: *Steroid Immunoassay*, p. 87, Alpha Omega Publishing Ltd, Cardiff, 1975.
- [9] Laurell, C. B.: *Anal. Biochem.*, 15, 45, 1966.
- [10] Musiani, P. et al.: *Biochemistry*, 15, 798, 1976.
- [11] Saklatvala, J. S. et al.: *Biochem. J.*, 157, 339, 1976.
- [12] Murthy, R. et al.: *FEBS Lett.*, 32, 243, 1973.
- [13] 莫汉庆, 孙册:《生物化学与生物物理进展》, 5, 46, 1982.
- [14] 彭启明等:《生物化学与生物物理进展》, 45, 59, 1982.
- [15] 关赛芳等:《中华医学检验杂志》, 7, 88, 1984.

[本文于 1984 年 10 月 18 日收到]

限制性内切酶 Sau3AI 的提取与纯化

郑 文 尧

(中国科学院微生物研究所, 北京)

限制性内切酶 Sau3AI 是分子生物学与遗传工程研究的重要工具酶之一。它能确定 DNA 复制的起点或终点的位置, 确定 RNA 在 DNA 上的转录位置, 分析 DNA 中脱氧核苷酸序列的排列以及基因的分离等。

J. S. Sassenbach 等人^[1]首先从 *Staphylococcus aureus* 3A (1) 中提取限制性内切酶 Sau3AI, 其

↓
5'-G-A-T-C-3'
3'-C-T-A-G-5'
↑

切割序列为: 5'-G-A-T-C-3', 它除了对腺嘌呤的甲基化作用不敏感之外, 是 MboI 的异源同功酶。

我们参考 J. S. Sassenbach 等人的方法, 并做了适当的改进, 因而获得了较高纯度的 Sau3AI 核酶内切酶。

一、材料与试剂

1. 菌种: *Staphylococcus aureus* (本所保藏,

编号 AS. 1.1529)。

2. 试剂: 磷酸纤维素 (P11) (Whatman 公司), 肝素琼脂糖 (上海生化所制备), Lysostaphin (Sigma 公司), λDNA (自制), T₄DNA 连接酶 (生物物理所生化试剂厂), [³²P]E. coli DNA (本所方荣祥同志惠赠)。

3. 培养基: Nutrient broth (每升含牛肉膏 3 克, 多聚蛋白胨 5 克, pH7.2)。

二、方 法

1. 细菌的培养: 将金黄色葡萄球菌在 BPY 斜面上转接三代 (每 10—16 小时一代), 最后转入 500 毫升三角瓶之营养肉汁培养基中 (每瓶装 100 毫升, 共四瓶), 在 37℃ 摇床上振荡培养过夜, 次日转接到 5000 毫升三角瓶中 (每瓶装 900 毫升营养肉汁培养液, 共 4 瓶), 继续振荡培养 4 小时。然后 5000rpm 离心 30 分钟, 收集菌体, 并用细胞洗涤缓冲液 (0.05M Tris-