

相思豆毒素及其两个肽链的分离纯化

苗积生 吴吉勇 沈毅 黄利群 谈立松

(上海市结核病防治中心第一防治院)

提 要

相思豆毒素是由 A、B 两条肽链组成的,是对动物细胞毒性最强的蛋白质之一。A 链是毒素的毒性部份; B 链是毒素的载体部份,它可将 A 链转运至靶细胞而杀死细胞。本文报道我们提取制备相思豆毒素及其 A、B 链的方法步骤,以及如何分析鉴定其各个组份。方法上有所改进。

相思豆 (Semen jequiriti) 亦称红豆,古代医书称之为相思子,是有毒性的植物药材^[1]。六十年代就有人从中提取毒素蛋白 (abrin) 和凝集素 (abrus agglutinin)^[2]。前者毒性极强,小鼠注射几十毫微克就可能致死;后者毒性很弱,但对某些动物红细胞有凝集作用。它们的分子量分别为 65,000 和 130,000。毒素是由两条肽链通过二硫键连接,经 β -巯基乙醇处理可将其拆开。其中一条较小的肽链称之为 A 链,分子量为 30,000,是毒素的毒性部份;另一条较大肽链称之为 B 链,分子量为 35,000,是毒素的载体部份,能与细胞表面含有半乳糖残基的糖蛋白结合,携带 A 链,使之进入细胞内,实现对细胞的杀伤作用^[3,4]。

相思豆毒素对真核细胞的毒性很强,据分析,只要有一个毒素分子进入细胞,就可使细胞死亡^[5]。毒素对肿瘤细胞的杀伤具有一定的特异性,因此,国外已在临床上应用毒素开展治疗肿瘤的实验研究^[6]。随着单克隆抗体技术的发展,将完整毒素或其 A 链通过双功能试剂与单抗联接,制成导向毒素(免疫毒素)进行特异性

杀伤肿瘤细胞的实验和临床研究,已引起人们的日益重视。这项研究很有可能使肿瘤的药物治疗取得重大进展。

本文介绍了我实验室对相思豆毒素及其 A、B 链的提取制备过程,并对各组份进行了分析鉴定,方法上作了一些改进。

材 料 和 方 法

一、毒素制备

毒素提取 相思豆购自四川,去壳后浸入 5% 乙酸液 4℃ 过夜。用组织搅碎器打碎,冷冻离心 8000 g 20 分钟,取清液。沉淀重复提取两次,合并清液。清液用 5 mol/L NaOH 调至 pH5,加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使呈 70% 饱和度,4℃ 置 1 小时,冷冻离心 8000 g 20 分钟。沉淀以少量水溶解,即为粗毒素样品。

凝胶过滤脱盐提纯 Sephadex-G75 层析柱 (2.8 × 100 cm) 以 pH7.7 Tris-HCl 10mmol/L 缓冲液 (以下简称缓冲液) 平衡。粗样品以 0.2 mol/L Tris 调至 pH7.7,每次上柱 20 ml,流速 15 毫升/小时 (以下同)。在流出液的体积为

[6] Sando, J. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 4779, 1979.
[7] Hubbard, J. R. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, 65, 95,

1984.

[本文于 1987 年 2 月 22 日收到]

100 ml 时开始收集, 到 180ml 时为止, 共收集 80 ml。

阳离子交换层析 DEAE-cellulose(DE52) 用碱酸处理后装柱 (1.5×30 cm), 以缓冲液平衡。将凝胶过滤得到之样品上柱。继之用 300 ml 缓冲液洗涤, 最后用含有 0.1 mol/L NaCl 的同样缓冲液洗脱, 分管收集 (约 3 毫升/管), 以 280 nm 波长测定蛋白浓度。

亲和层析纯化 Sepharose-4 B 层析柱 (1×35 cm) 经 1 mol/L 丙酸处理后, 以缓冲液平衡。将 DE 52 层析得到之样品上柱, 此时, 毒素蛋白和凝集素被结合到凝胶上。继之以 100 ml 缓冲液洗涤, 用含 0.05 mol/L D-半乳糖和 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱, 分管收集同上。280 nm 波长比色, 所得蛋白部份样品再上一次 Sephadex-G75 柱, 方法同前。这时只得到一个蛋白洗脱峰即为纯毒素。

二、毒素 A、B 链的分离

将毒素配成含 0.5 mol/L D-半乳糖和 5% β -巯基乙醇的溶液, 置 4℃ 一天后, 加等体积蒸馏水, 离心。清液用 0.2 mol/L Tris 调至 pH5, 上预先用 pH8.5 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的 DEAE-cellulose 层析柱 (2.2×12 cm), 同时分管收集同上。样品流完后, 以 100ml 含 2% 巯基乙醇的上述缓冲液洗涤, 继之以不含巯基乙醇的该缓冲液约 200 ml 洗涤, 不上柱之蛋白溶液即为 B 链。最后用 0.2 mol/L NaCl 的该缓冲溶液进行洗脱, 得到之蛋白部份即为 A 链。所得到之 A、B 链溶液分别用 1.0 mol/L HCl 调至 pH7.7, 分别上 Sepharose-4B 柱纯化 (同上亲和层析方法), 不上柱部份即为纯化的 A 链, 上柱后以 D-半乳糖洗下的部份为纯化的 B 链。

三、毒素及其 A 链的鉴定

毒性实验 体重约 18~25 克健康小鼠 (性别不论), 腹腔分别注射 1 ml 不同剂量的实验样品, 观察五天内的死亡情况, 以注射生理盐水为对照。

血凝滴度测定 取健康人红血球, 以 PBS 洗三次, 制成 5% 红血球悬液。将一定浓度的实

验样品溶液用 PBS 等体积稀释成系列浓度, 分别加入凝集板孔里。然后加入等体积 5% 红血球悬液。37℃ 温培 20~60 分钟, 观察凝集孔数。以 PBS 作对照。

SDS 电泳 将纯化了的毒素进行 SDS 电泳, 测定毒素纯度。SDS 的浓度为 7.5%, 磷酸缓冲系统。以标准蛋白样品作对照, 测毒素及其 A、B 链的分子量。

凝胶过滤 用 Sephadex-G75 凝胶过滤, 以标准蛋白样品作对照, 比较确定样品分子量。

A 链活性实验 采用间接活性测定法。将 A 链的巯基暴露后, 使 A 链与蓖麻毒素 B 链 (Ricin B-Chain) 联接起来, 制成杂交毒素分子, 用上述毒性实验方法进行测定。

结 果

一、毒素纯化

粗毒素经 Sephadex-G75 层析得到的样品中虽含有毒素蛋白, 但因杂蛋白太多, 因而得不到明显单纯的毒素洗脱峰。而经过离子交换层析后才分离出明显的毒素洗脱峰 (见图 1), 其中峰 I、II、III 都含有毒素。凝集素仍在柱上, 它须用大于 0.1 mol/L NaCl 溶液才能被洗下 (见峰 IV)。将峰 I、II、III 样品合并上 Sepharose-4 B 柱, 洗脱结果见图 2, 只有一个毒素蛋白峰, 即峰 V。将此峰重复进行 Sephadex-G75 层析, 可得到纯化的毒素蛋白 (见图 3 之峰 VI)。

二、毒素鉴定

将纯化的毒素进行血凝滴度测定, 证明基本无凝集作用, 符合毒素无凝集作用的特性。用 Sephadex-G75 层析和 SDS 电泳 [见图 4 之 (1) 毒素] 标定此蛋白的分子量为 65,000 左右, 符合有关报道^[4]。毒性实验结果表明: 0.185 微克/毫升的毒素即可致死小鼠, 毒性很强, 与文献报道接近^[4]。SDS 电泳和聚酰胺凝胶电泳 (见图 5 之毒素) 的结果说明, 此毒素可以达到电泳纯度。

三、A、B 链制备

将纯化毒素经巯基乙醇处理后进行 SDS 电泳, 得到两个区带, 见图 4 之 (2) A、B 链的分

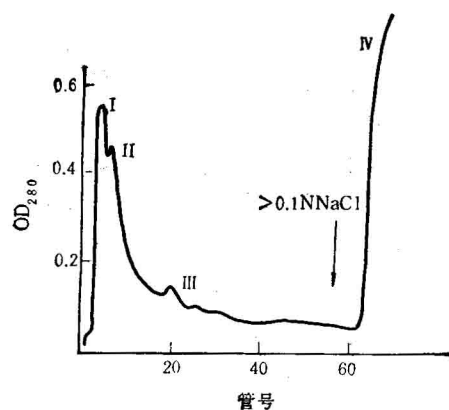


图1 DEAE-Cellulose(DE52)
层析分离毒素

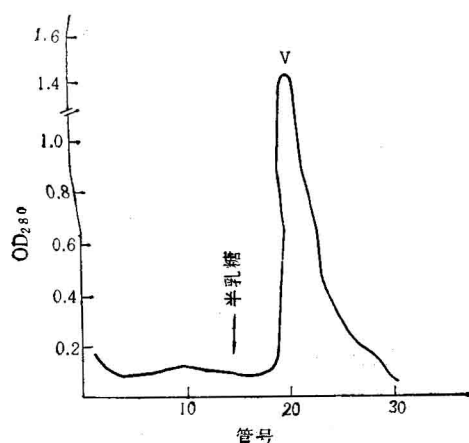


图2 Sepharose-4B 纯化毒素

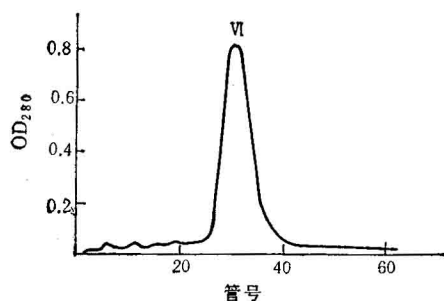


图3 Sephadex-G 75 纯化毒素

离。迁移率小的是B链，大的是A链。DEAE-cellulose 层析分离 A、B 链的洗脱曲线见图 6，峰 VII 为 B 链，被 NaCl 洗脱下来的峰 VIII 为 A 链。分别经 Sepharose-4B 层析纯化后，得到 A、B 链的纯制品。

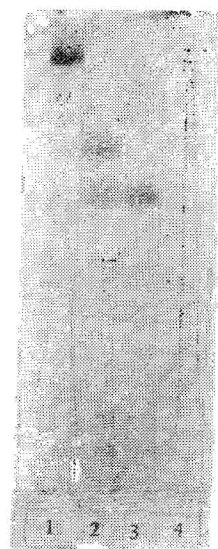


图4 电泳图谱
1.毒素 2.A,B 链分离 3. A 链 4. B 链

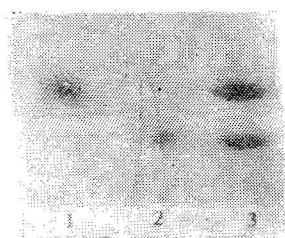


图5
1.凝集素 2.毒素 3.凝集素毒素

四、A、B 链的鉴定

经分析，A、B 链都基本无凝血作用。由 SDS 电泳标定它们的分子量分别为 30,000 和 35,000 左右，达到了电泳纯度[见图 4 之(3)、A 链、(4)B 链]，符合有关报道^[4]。毒性实验表明，A 链约 40 μ g、B 链约 5 μ g 不致死小鼠，与文献报道类似^[4]。

将 A 链与 20 倍量的蓖麻毒素 B 链连接后进行 A 链间接活性测定。每只小鼠注射相当于未连接前 0.32 μ g 剂量的 A 链(或 0.64 μ g 的蓖麻毒素 B 链)，在 40 小时内就可致死小鼠，而单用 A 链 40 μ g 或单用蓖麻毒素 B 链高达 400 μ g 也不致死小鼠，说明 A 链与蓖麻毒素 B 链联接成杂交毒素后才具有毒性。如果这时所有 A 链都与一个 B 链联接而形成杂交毒素，最多只能生成 0.64 μ g 杂交毒素，其毒性接近完整相思豆毒素。这证明，上述制备的 A 链基本保持

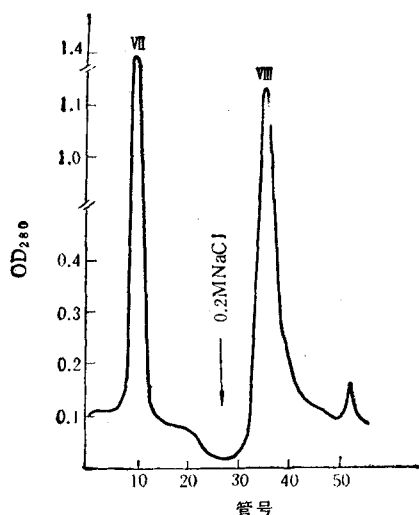


图6 相思豆毒素 A、B 链分离

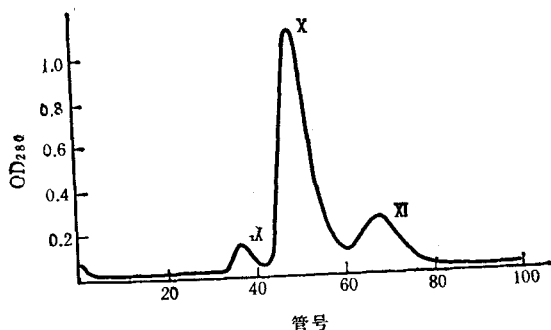


图7 Sephadex-G75 纯化相思豆毒素

了在原毒素中所具有的活性。

讨 论

本文介绍的相思豆毒素提取纯化及 A、B 链分离纯化,方法比较简单,一般实验室都可进

行。提取毒素关键是把凝集素除去。与一般文献不同,我们采用 Sephadex-G75 凝胶过滤,使凝集素、毒素分离,从而得到较纯的毒素。为此做了如下实验:把毒素粗样品直接进行 Sepharose-4 B 亲和层析,然后进行 Sephadex-G75 凝胶过滤分离,得到的蛋白洗脱曲线见图 7,是三峰型蛋白组分,分别称之为峰 IX、X、XI。经鉴定和比较^[3,4]可以确定,峰 XI 是毒素,无红细胞血凝作用,约 0.25 μg 就可致死小鼠;峰 X 是凝集素,具很强凝集作用,含量为 1 μg 不致死小鼠。上述“方法”中凝胶过滤提纯毒素所收集的体积范围,就是由此结果推算得到的。

以往文献都是用 SDS 电泳鉴定毒素纯度,我们采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。实验结果证明:后者比前者容易将毒素和凝集素分离开来(见图 5)。

采用 A 链的间接活性测定法简便可靠,在无同位素参入示踪无细胞系统 (Cell-free systems) 蛋白合成的抑制实验条件下,是一种很好的取代方法。它不需要昂贵设备,在普通实验条件下都可进行。这对毒素 A 链的制备及其应用研究是很有价值的。

参 考 文 献

- [1] 李时珍:《本草纲目》。
- [2] Lin, J. -Y. et al.: *J. Formosan Med. Assoc.*, 68, 518, 1969.
- [3] Olsnes, S. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 35, 179, 1973.
- [4] Olsnes, S.: *Methods of Enzymol.*, 50, 323, 1978.
- [5] Yamaizumi, M. et al.: *Cell*, 15, 245, 1978.
- [6] Eiklid, K. et al.: *Expl. Cell Res.*, 126, 321, 1980.
- [7] Fodstad, ϕ . et al.: *Cancer Research*, 44, 862, 1984.

[本文于 1986 年 9 月 19 日收到]

(上接第 78 页)

低端扩展容易。

本工作承施履吉教授指导,孙慧芳同志曾参加研制工作,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] 纪树赓:《自动显示技术及装置》,机械工业出版社,

p. 28, 1979.

- [2] Biétry, L. Zurich et al.: *Dictionary of Weighing Terms*, Switzerland, Mettler Instrument AG, p. 48, 1983.

[本文于 1986 年 11 月 10 日收到]