

一种快速简便的提取和纯化蓖麻毒素的方法*

贺永怀 刘演波** 陈 兴 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

蓖麻毒素是免疫毒素的重要组成之一。本文采用硫酸铵盐析法, 从蓖麻籽匀浆液中直接制备粗毒。然后, 在酸化 Sepharose 4B 柱上用半乳糖溶液梯度洗脱。由此得到分子量为 65000 道尔顿的电泳纯蓖麻毒素。其小鼠 LD_{50} 为 $0.53 \mu g$, Molt-4 细胞毒性试验 IC 为 $3.8 \times 10^{-10} M$ 与以前报道用改良 Olsnes 法所得结果相近。但操作简便、得率提高近 5 倍。

近几年, 人们用蓖麻毒素与抗体连接, 制备免疫毒素^[1], 由于抗体的特异性, 蓖麻毒素被定向地带到靶细胞上。发挥杀伤靶细胞的作用。以前提取蓖麻毒素的方法比较麻烦。首先用乙醚反复抽提除去油脂, 然后粉碎、离心, 透析得到粗毒, 再经过羧甲基纤维素离子交换柱和琼脂糖 6B 柱进一步纯化^[2,3]。本文采用 60% 硫酸铵沉淀的方法直接制备粗毒, 然后在酸化 Sepharose 4B 柱上一次纯化, 大大简化了提取, 纯化步骤, 使得率增加 5 倍。

材 料 和 方 法

蓖麻子由北京市种子公司提供。

Sepharose 4B 和标准分子量蛋白质购自 pharmacia 公司。

1. 酸化-Sepharose 4B 柱的制备^[4]

20 克经过蒸馏水洗涤的 Sepharose 4B 在水泵上抽干后加到 20ml 0.2M HCl 溶液中, 56℃ 水浴孵育 2 小时, 用蒸馏水充分洗涤。装柱后用 10mM Tris-HCl, pH7.7 (含 0.1M NaCl) 缓冲液平衡, 备用。

2. 蓖麻毒素蛋白质浓度测定

用紫外分光光度法测定蓖麻毒素的

$$E_{280, 1cm}^{1\%} = 11.8。$$

3. 小鼠半致死量 (LD_{50}) 测定^[5]

上海种小鼠, ♀, 体重 18—22 克, 随机分组, 每组 5 只, 腹腔注射不同剂量蓖麻毒素后, 观察 72 小时, 计算 LD_{50} 。

4. 3H -亮氨酸掺入法测定蓖麻毒素毒性^[6]

取培养的人白血病细胞株 Molt-4, 用 Hanks 液洗一次后悬浮在无亮氨酸的培养液中 (10% 无亮氨酸的氨基酸溶液, 5% 透析过的小牛血清, 85% Hanks 液)。在 96 孔培养板的每孔中加 0.1ml 细胞悬液, 10 μl 待测毒素。于 5% CO_2 孵箱中培养 3 小时, 然后每孔加 1 μci 3H -亮氨酸, 继续培养 3 小时。培养液于 49 号滤纸上过滤。10% 三氯醋酸洗孔三次, 一并过滤; 滤纸用蒸馏水洗三次。70—80℃ 烤干后放在测量瓶中, 加 5ml PPO-POPOP-甲苯闪烁液, 测放射性。

5. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[7]

根据 Laemmli 方法用 10% 胶进行电泳, 考马斯亮蓝染色。标准分子量蛋白为: 肌球蛋白 (205KD)。 β 半乳糖苷酶 (116KD), 磷酸化

* 本课题受中国科学院自然科学基金资助

** 广州军区总医院

酶 B(97KD), 牛血清白蛋白 (66KD), 卵清蛋白(45KD), 碳酸酐酶 (29KD)。

结 果

一、蓖麻粗毒的提取

50 克去壳蓖麻子在 200ml 10mM 磷酸缓冲液, PH7.3 (含 0.2M NaCl) 中匀浆。匀浆液 4℃ 放置 24 小时。用 4 层纱布滤去残渣。上清液于 17000g 离心 30 分钟。弃去沉淀和上层脂肪。在上述上清液中加入固体硫酸铵 使成 60% 饱和度。4℃ 放置 4 小时。17000g 离心 40 分钟。沉淀溶解在蒸馏水中,并对 10mM 磷酸缓冲液 pH7.3 透析过夜, 17000g 4℃ 离心 15 分钟,取上清液即为蓖麻粗毒。

二、蓖麻粗毒的纯化

在平衡好的酸化-sepharose 4B 柱 (1.6 × 15cm) 上,加 3ml 蓖麻粗毒 (总蛋白量为 33.5mg), 待溶液进入柱体后, 关闭柱子 30 分钟。用平衡缓冲液洗去杂蛋白。然后用 0—100 mM 半乳糖 (配在平衡缓冲液中) 进行梯度洗脱。洗脱曲线见图 1。

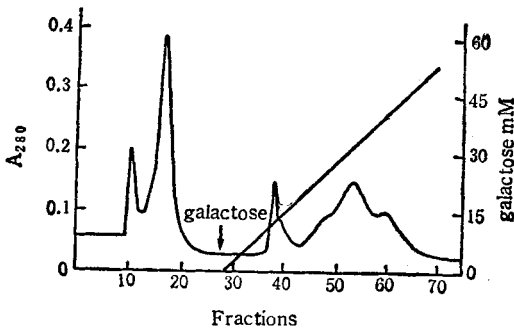


图 1 在酸化 sepharose 4B 柱上用半乳糖梯度洗脱蓖麻毒素

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析各部分洗脱液的组成成分(图 2)。39,43,47,50,55 各管取样进行电泳结果同图 2-B 所示,57,60,62,64 各管电泳结果同图 2-C、D。

当半乳糖浓度大于 32.8mM 时,蓖麻凝集素被洗脱下来。根据梯度洗脱的结果,我们选用 28mM 半乳糖进行一次洗脱。洗脱曲线见图 3。

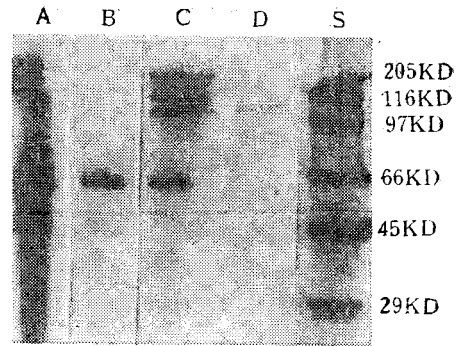


图 2 图 1 中各洗脱部分的 SDS 电泳分析

A. 蓖麻粗毒 B. 55 管以前的部分 C. 55—60 管 D. 60 管以后的部分 S. 标准分子量蛋白

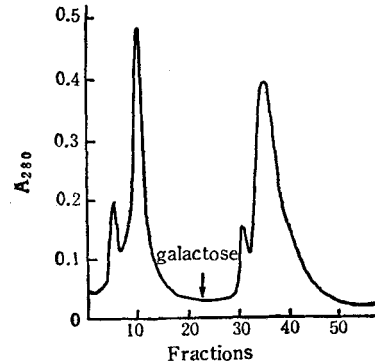


图 3 在酸化sepharose 4B柱上用半乳糖一次洗脱蓖麻毒素

电泳分析表明洗脱峰的最后部分 即 40 管以后含有少量蓖麻凝集素。

三、蓖麻毒素的得率及毒性

蓖麻毒素纯化过程中各步的得量见表 1。

表 1 蓖麻粗毒及纯蓖麻毒素的得量

	总重量 (g)	蛋白量 (mg)
去皮蓖麻籽	50	
蓖麻粗毒		648.8
纯蓖麻毒素		148.6

50 克去皮蓖麻子能得到 648.8mg 蓖麻粗毒。再经酸化-Sepharese 纯化后的电泳纯蓖麻毒素得量为 148.6mg, 是粗毒的 22.9%。

用上述方法制备的蓖麻毒素给小鼠腹腔注射后 LD₅₀ 为 0.53±0.07μg, 而粗毒的 LD₅₀ 为 1.414±0.160μg。对 Molt-4 细胞蛋白合成的抑制见表 2。

使 Molt-4 细胞蛋白合成抑制 50% 所需的毒素浓度为 3.8 × 10⁻¹⁰M。

表2 蓖麻毒素对 Molt-4 细胞蛋白合成的影响

	蛋白合成抑制率(%) [*]		
	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹¹ M	10 ⁻¹³ M
不加半乳糖	81.1±4.3	36.9±2.9	29.8±2.4
加半乳糖	28.0±1.4	5.4±5.6	5.0±4.8

^{*} 三批毒素共6次实验的平均值

讨 论

Sephacrose 4B 是一种琼脂糖凝胶,骨架上含有半乳糖残基,经过盐酸部分水解后能暴露出更多半乳糖残基。蓖麻毒素由 A、B 二条多肽链组成。B 链上有一个结合部位,能与含半乳糖基的蛋白或糖脂结合。而蓖麻凝集素由二条类似 A 链的多肽链和二条 B 链组成。它们与半乳糖结合的能力大于蓖麻毒素。利用它们与半乳糖结合能力的差别,在酸化-sephacrose 4B 柱上用半乳糖梯度进行洗脱就可以将二者分开。半乳糖分级洗脱的效果稍差。

用本方法提取的蓖麻毒素在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示分子量为 65000 道尔顿的单一区带。小鼠 LD₅₀ 为 0.53μg,使 Molt-4 细

胞蛋白合成抑制 50% 的浓度为 3.8×10^{-10} M,与以前报道用改良 Olsnes 法^[2]所得到的结果相近(小鼠 LD₅₀ = 0.54μg,抑制 50% 蛋白合成所需浓度 3.2×10^{-10} M)。但得率提高了约 5 倍。

在用 ³H-亮氨酸掺入法测定蓖麻毒素毒性时,当培养系统中加入 100mM 半乳糖时,基本上能阻断蓖麻毒素对 Molt-4 细胞的毒性。表明 Molt-4 细胞蛋白合成的抑制确是蓖麻毒素的作用,而非其它有害物质。

参 考 文 献

- [1] Blakey, DC. et al.: *Bioassays*, 4, 292, 1986.
- [2] Olsnes, S. et al.: *Biochemistry*, 12, 3121, 1973.
- [3] 姚志建等:《上海免疫学杂志》,4(6), 345, 1984.
- [4] Schluter, SF. et al.: *J. Immunol. Methods*, 66, 89, 1984.
- [5] 郭祖超等:《医用数理统计方法》,人民卫生出版社, p 169, 1965.
- [6] 沈倍奋等:《中华微生物学和免疫学杂志》,5(4), 209, 1985.
- [7] Laemmli, UK. et al.: *Nature*, 227, 680, 1970.

[本文于 1987 年 2 月 2 日收到]

科技消息

尿中粘多糖(MPS)的简易定量法

尿中 MPS 的传统定量方法是,采用沉淀捕集分离出尿中 MPS 后,用吡啶硫酸法定量。此方法的不足之处是,操作复杂,分析周期长。本文提出一种用纤维柱迅速地分离尿中 MPS,并利用 MPS 与邻硝基苯酚(ONPH)反应进行定量的简易方法。实验证明:使用纤维柱比传统的沉淀捕集进行尿前处理时间短、效率高(加入回收率高达 92.5%);利用 MPS 与 ONPH 反应进行 MPS 定量与传统的吡啶硫酸法定量具有相关性($r = 0.950$),并且提高了 MPS 定量的灵敏度,实现了微量化。测定原理如下:

在 20ml 人尿中加入 0.1% 的十六烷基吡啶(CPC)水溶液 4ml,使其通过纤维柱($\phi 8 \times 35$ mm),则生成的 MPS-CPC 复合体被吸附在柱子上。先用 20ml 蒸馏

水清洗柱子,再用 30ml 氯化钠溶液把柱中(复合体中)的 CPC 分离洗脱出来,最后用 9ml 蒸馏水洗脱出柱中的 MPS 作为分析试样。取上述分析试样 2ml,依次加入 0.01M 的 ONPH 和 0.15M 的 EDC* 溶液各 1ml,充分搅拌。在 40℃ 恒温 30 分钟后,再加入 1.5M 的 NaOH 水溶液 1ml,并升高温度至 60℃ 恒温 15 分钟。在 530nm 波长下测定吸光度,计算出尿中 MPS 含量。

[《分析化学》(日),1986, No.4, T29,

石家庄维尼纶厂封勇编译]

^{*} EDC: “盐酸 1-乙基-3-(3-二甲氨基) 碳化二亚胺”。EDC 溶液用 4% 的吡啶水溶液配制。