

国产兵豆中凝集素的分离纯化与生化特性的研究

余 健 黄晓春 何晓松 戴美红 朱秋林

(江苏省肿瘤防治研究所肿瘤生化室, 南京)

提 要

从国产兵豆中用葡聚糖凝胶柱层析法分离出一种对人红细胞有凝集作用的凝集素, 当其浓度为 $5-7\mu\text{g/ml}$ 时即可引起血凝。通过电泳分析, 分子量、氨基酸组成、糖与金属离子含量的测定, 对其纯度进行了鉴定。比较了 5 种糖对此种凝集素血凝的抑制作用, 结果以甲基 $\alpha\text{-D-甘露糖苷}$ 抑制能力最强, D-半乳糖无抑制作用。在交叉亲和免疫电泳中, 此种凝集素能对多数原发性肝癌患者血清甲胎蛋白糖基有较的结合作用。

兵豆种子含的凝集素, 即通称的扁豆凝集素 (Lentil Lectin, 简称 LcA), 由于它能特异性地与某些糖基相结合, 是研究细胞表面糖分子结构与功能的常用凝集素之一。近年来发现其对人血清中不同病理状态下出现的甲胎蛋白 (AFP) 糖基有不同的亲和能力, 遂成为研究 AFP 糖基结构的一种重要试剂^[1]。70 年代以来, 关于 LcA 的分离纯化工作陆续有所报道^[2-3], 由于兵豆产地不一, 其理化性质也往往有一定差别。目前有关利用国内资源制备 LcA 的工作, 尚不多见, 故本文研究用国产兵豆种子制备的此种凝集素的特性, 并观察其用于鉴别 AFP 变异体的作用。

一、凝集素的提取

本文采用的兵豆种子, 经江苏省植物研究所鉴定为 *Lens culinaris Medic.* 兵豆为一年生草本, 荚果短而扁, 种子小, 一或二粒, 多为浅绿色, 凸透镜状, 故俗称扁豆。提取时先将磨碎之豆粉于 5 倍体积的 0.15mol/L NaCl 溶液中抽提, 滤去沉渣。滤液经高速低温离心, 得橙黄色上清液, 再以 $0.3-0.6$ 饱和度硫酸铵盐析, 过葡聚糖 (Sephadex G 100, Pharmacia) 凝胶

柱, 用瑞典 LKB 液相层析系统自动程序控制与监测。先以 0.15mol/L NaCl 溶液充分洗脱, 吸附之凝集素用含 0.1mol/L D-葡萄糖 之盐溶液洗脱, 收集有紫外吸收之蛋白峰 (即 LcA), 经透析、浓缩、低温保存。此时制得之 LcA 再过羧甲基纤维素 (CM cellulose, Whatman, C 52) 柱, 用含梯度浓度 NaCl ($0.075-0.15\text{mol/L}$) 之醋酸钠缓冲液 (0.02mol/L , $\text{pH}5.0$) 缓缓洗脱, 可得两个紫外吸收峰, 即同工凝集素 (isoelectin) 之峰。

1. 凝集素血凝活力与糖抑制作用的测定^[3]

健康人新鲜红细胞用磷酸缓冲液 (0.01mol/L , $\text{pH}6.8$)-生理盐水 (PBS) 洗涤 3 次, 配成 2% 的悬浮液备用。LcA (0.1%) 溶液经 2 倍连续稀释成不同浓度, 取 $50\mu\text{l}$ 加于血凝板 V 形孔内, 再加等量之红细胞悬液混匀, 30 分钟后观察红细胞凝集结果。糖抑制作用测定方法基本同上, 将最低血凝 4 倍浓度的 LcA 溶液 $50\mu\text{l}$ 同上法加入血凝板孔内, 再在各孔内分别加入等量之不同浓度的糖溶液, 混匀, 5 分钟后加入红细胞悬液, 观察出现凝集时的最低糖浓度。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳与分子量测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 按 Davis 法, 垂直平板。分

离胶 $T = 7\%$, $C = 2.6\%$; 浓缩胶 $T = 3.5\%$, $C = 20\%$ 。样品量: LcA $8-12\mu\text{g}/\text{孔}$, LcA-A 与 LcA-B 为 $5\mu\text{g}/\text{孔}$ 。电压 130V , 电泳 5 小时。考马斯蓝染色。分子量测定用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 采用中科院上海生化所东风试剂厂生产的低分子量标准蛋白质, 分子量范围 $17500-94000$, 按原说明书要求操作。主要试剂: 丙烯酰胺(E. Merck), Bis(Aldrich), TMEDA(BDH), SDS(Serva), 其余均为国产试剂。

3. 氨基酸组成分析 样品经 6mol/L HCl 在 110°C 下水解 22 小时, 用“日立”835-50 型高速氨基酸分析仪测定除色氨酸之外的各种氨基酸。

4. 糖与金属含量之测定 糖的测定依 Dubois 等之苯酚-硫酸法^[6]。金属离子系用 J. A. Atomcomp Mark III, 1100 真空型, 63 通道等离子体发射光谱仪测定, 配用 PDP11/23 计算机。LcA 事先经过如下处理: 称取 10mg 冻干样品, 于聚四氟乙烯坩埚中, 加 1ml 浓硝酸浸泡过夜, 然后加热至样品澄清, 加 4 滴高氯酸蒸发至近干, 再加 1ml 硝酸和 2 滴高氯酸, 蒸发至近干, 用 7% 盐酸提取, 移入比色杯中, 最后用 7% 盐酸定容至 5ml , 即可上机测定。

5. AFP 交叉免疫亲和电泳 (CIAE) 按 Børg-Hansen 法^[7], 先将 LcA 溶于 1% 琼脂糖凝胶中 (LcA $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 凝胶), 在玻板一侧浇制凝胶块, 在近阴极端开一加样槽, 加入含 AFP 的血清标本适量 (一般为 $3-30\mu\text{l}$, 视 AFP 浓度而定), 在 LKB 多用电泳仪 (Multiphore) 上进行第一向电泳, 然后在玻板之空余部分铺满含 AFP 抗体的凝胶 (抗体量须与 AFP 量相匹配), 使之与已电泳之凝胶连接, 即可进行第二向电泳, 温度控制在 10°C 左右。电泳后用盐水漂洗, 压干、染色, 计算 LcA 结合型 AFP 与不结合型沉淀峰面积之比。

二、结果与讨论

本文制备 LcA 的过程主要是先经 0.15mol/L NaCl 抽提, 用硫酸铵分级沉淀, 除去大量杂

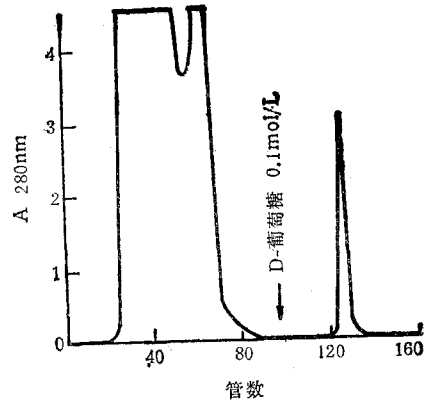


图1 LcA 用葡聚糖 G100 凝胶柱层析的洗脱图型

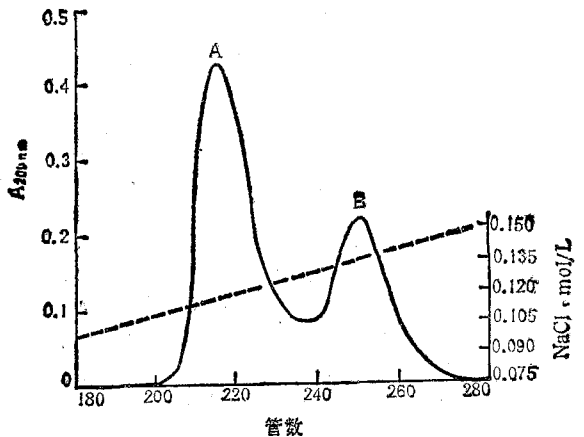


图2 LcA 混合物 (M) 在羧甲基纤维素柱上用氯化钠梯度浓度缓冲液洗脱 LcA-A(A) 与 LcA-B (B) 同工凝集素

蛋白, 再利用凝集素与糖的亲性和, 使其吸附在葡聚糖凝胶上, 经 D-葡萄糖溶液洗脱后即可获得有较高凝集活力的 LcA (图 1)。其消光系数在波长 280nm 时, $E_{1\text{cm}}^{0.1\%}$ 为 12.5 。此时制得的 LcA 实际上是一种含两种同工凝集素的混合物 (LcA-M)。再通过阳离子交换剂柱层析, 经含 NaCl 梯度浓度的缓冲液洗脱, 在较窄的浓度变化范围内 (NaCl $0.11-0.15\text{mol/L}$) 即可使 LcA-M 分离为同工凝集素 A (LcA-A) 与同工凝集素 B (LcA-B) (图 2)。这两种同工凝集素的量是不均等的, LcA-A 较 LcA-B 之量为多, 两者之比约 $1:1.8$ 。不同品种的兵豆, 一般均含有二种同工凝集素, 但两者之量常因地区而异, 有以 LcA-B 为主者, 亦有两者之量相等者^[8]。我们曾将本实验中所获之同工凝集

素 LcA-A与 LcA-B 的主要特性作一比较,如下文所述,除在电泳行为上不同外,消光系数、糖抑制作用与血凝活性均相同。

1. 纯度鉴定 (1) 电泳 LcA-M, LcA-A 与 LcA-B 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, LcA-M 在近阴极端出现深浅不同的二条蛋白区带(即两种同工凝集素), LcA-A 迁移快且染色深。而纯化后之 LcA-A 与 LcA-B 在分别电泳时, 均仅出现单一区带, 不同的是两者迁移速度不同, LcA-A 快于 LcA-B, 其迁移率(Rf)相应为 0.20 与 0.125, 与 LcA-M 一深一浅的蛋白区带相对应,如图 3 所示。同时也说明同工凝集素之间含量的差别,与柱层析分离所得的结果一致。

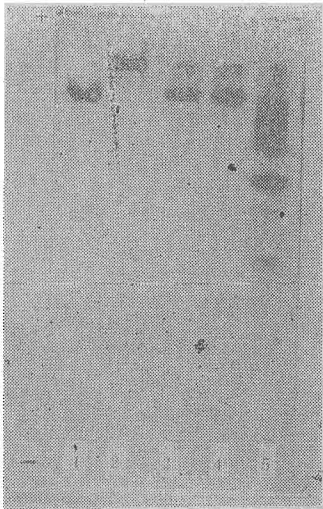


图 3 LcA 聚丙烯酰胺凝胶电泳图型

1. LcA-A, 2. LcA-B, 3. LcA 混合物(8μg),
4. LcA 混合物(12μg), 5. 粗提 LcA

(2) 分子量 以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳测其分子量。分子量标准为: 磷酸化酶 B(94000), 牛血清白蛋白(67000), 肌动蛋白(43000), 碳酸酐酶(30000), 烟草花叶病毒外壳蛋白(17500)。结果无论 LcA-M 或 LcA-A、LcA-B 均在相同位置出现二区带, 分子量约为 7000 与 17000, 此即 LcA 亚基之 α 链与 β 链。因 LcA 系由两亚基组成的二聚体结构, 故其完整分子之分子量为 48000(图 4)。

LcA 之分子量据各家报道^[2-5], 无论用沉降系数法, Biol gel P 100 凝胶过滤以及 SDS-

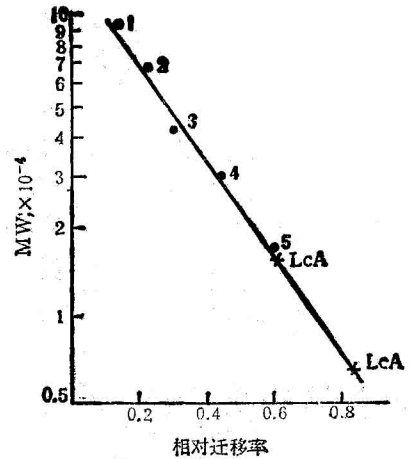


图 4 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 LcA 分子量

1. 磷酸化酶(94000) 2. 牛血清白蛋白(67000)
3. 肌动蛋白(43000) 4. 碳酸酐酶(30000)
5. 烟草花叶病毒外壳蛋白(17500)
×: LcA 肽链

凝胶电泳等法测定, 虽不完全一致, 但基本上在一定范围之内: 42000—63000。

(3) 氨基酸组成 本实验分析结果表明, 在 LcA-M 中(除色氨酸未测外)含 15 种氨基酸, 其中以天冬氨酸、苏氨酸、缬氨酸含量较多, 约占氨基酸分子总量的 34%。不含胱氨酸与蛋氨酸, 如下表所示。本文虽未对同工凝集素氨基酸组成进行分析, 但据 Howard^[2] 报告

表 1 LcA 的氨基酸组成

氨基酸*	g/100g	mol/48000g LcA
天冬氨酸	12.85	48.15(48)
苏氨酸	11.35	47.18(47)
丝氨酸	6.98	32.87(33)
谷氨酸	8.63	29.28(29)
脯氨酸	3.41	14.69(15)
甘氨酸	4.10	27.04(27)
丙氨酸	5.26	29.28(29)
缬氨酸	8.74	36.92(37)
异亮氨酸	4.94	18.32(18)
亮氨酸	5.17	19.51(20)
酪氨酸	4.68	12.71(13)
苯丙氨酸	9.11	27.31(27)
赖氨酸	6.04	20.44(20)
组氨酸	2.26	7.21(7)
精氨酸	2.97	8.43(8)

* 色氨酸未测。

LcA-A 与 LcA-B 之氨基酸组成基本相同,唯 LcA-B 分子多 4 个赖氨酸,因而两者电泳行为不同。

(4) 糖与金属含量 以葡萄糖为标准,测得 LcA-M 含糖量为 1.9%。在检测含糖量之前,样品曾对蒸馏水充分透析,直至用苯酚-硫酸法在外透液中不能测出游离之葡萄糖。

金属含量经等离子体发射光谱仪测定,含钙 0.112%,含锰 0.09%。

2. 血凝活力与糖抑制作用 测得 LcA-M、LcA-A 与 LcA-B 引起人红细胞凝集的最低浓度均为 5—7 μ g/ml,而且其凝集活力强弱与人 ABO 血型无关。多种糖类对凝集素均有不同的抑制作用,根据我们用 5 种糖检测的结果,其中以甲基 α -D-甘露糖苷抑制能力最强(200 μ g/ml),其余依次为 D-甘露糖 (375 μ g/ml), D-葡萄糖 (750 μ g/ml) 与蔗糖 (2850 μ g/ml); D-半乳糖在其浓度为 0.2mol/L 时仍无抑制作用(图 5)。实验结果还表明 LcA-A 与 LcA-B 受糖的抑制作用的特性与 LcA-M 相同。与文献报告的结果比较^[8],本文制备的 LcA 在受糖的抑制作用时,要求的糖浓度略有不同,但各种糖抑制作用的强弱顺序是一致的。

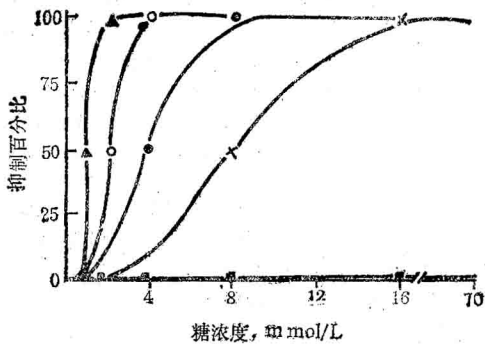


图 5 糖对 LcA 血凝活性的抑制作用

▲-▲ 甲基- α -D-甘露糖苷, ○-○ D-甘露糖,
●-● D-葡萄糖, ×-× 蔗糖, ■-■ D-半乳糖

3. 对 AFP 变异体 (variant) 的鉴别作用

肝病患者如出现血清 AFP 增高,在 LcA 作用下,经 CIAE 电泳后,一般会出现两种 AFP 变异体^[3],一为 LcA 结合型 AFP (LcA-

R-AFP),另一为 LcA 不结合型 AFP (LcA-N-AFP)。LcA 与大多数原发性肝癌患者血清 AFP 糖基有较强的结合能力,故肝癌 AFP 变异体中 LcA-R-AFP 与良性肝病相比有明显的增高。我们用上述制备的 LcA-M 初步进行了 AFP 变异体的鉴别实验,结果肝癌 AFP 中的 LcA-R-AFP 明显多于良性肝病患者。在受检的 11 例原发性肝癌患者中,除一例 LcA-R-AFP 为 11% 外,其余均在 30% 以上 (均值 54.08%,范围 32.04—91.70%);而 8 例良性肝病之 AFP-R-AFP 均在 10% 以下。而未与 LcA 相作用的肝癌 AFP (即对照组)则仅出现单一的免疫沉淀峰(图 6)。说明用国产兵豆制备的 LcA 对于鉴别各种肝病 AFP 变异体同

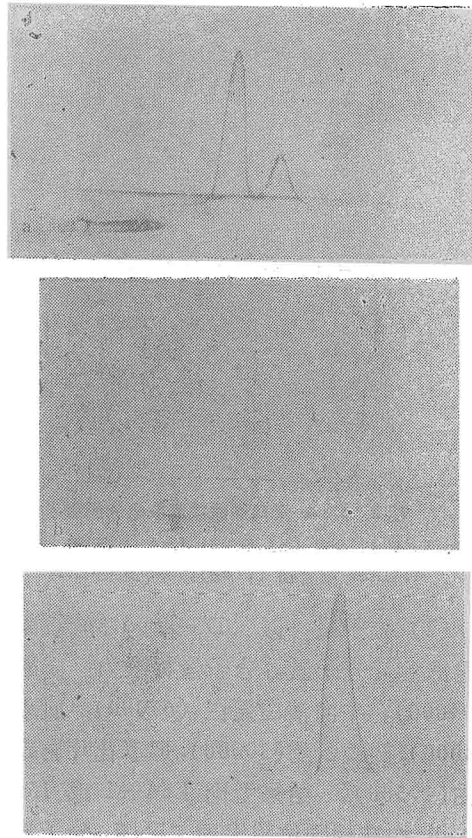


图 6 血清 AFP 的 LcA 交叉免疫亲和电泳示不同肝病患者的 AFP 变异体

a. 肝癌患者, b. 良性肝病患者, c. 未与 LcA 作用的 AFP (血清标本同照片 a)

样是有效的。LcA 与不同来源的 AFP 有不同的结合作用,提示 AFP 糖基存在结构上的差

猪 PDGF 的部分纯化

施产甫 许琳 肖祥华

(海军医专中心实验室, 南京)

提 要

对猪血小板衍生的生长因子 (PDGF) 进行了部分纯化。通过对提取的猪血小板进行冻融裂解、CM-Sephadex C-50 离子交换吸附、Blue-Sepharose 柱层析和羧甲基纤维素 CM-52 柱层析等较简单的纯化步骤将猪 PDGF 提纯到 6250 倍。

人血小板衍生的生长因子 (platelet derived growth factor, 简称 PDGF) 是贮存于血小板 α 颗粒中的一种碱性蛋白质^[1]。PDGF 能刺激停滞于 G_1/G_0 细胞周期的成纤维细胞、神经胶质细胞、平滑肌细胞等多种细胞进入分裂增殖周期。目前认为, PDGF 在伤口愈合、胆固醇与磷脂合成的调节、动脉粥样硬化等多种生理及病理过程中起重要作用。

血凝后人血清中的 PDGF 浓度为 15—20 ng/ml, 含量极微。国外都从过期的血库血或

血小板中提取^[2-4]。亦有从猪血中提取猪 PDGF 的报道^[5,6]。已知人 PDGF 由两种多肽链 A 和 B 组成异二聚体, 而猪 PDGF 则由 B-B 链组成的同二聚体, 但两者具有相似的生理和生化特性。

本文报道用较简单的方法初步提纯猪 PDGF 的结果。

材 料 与 方 法

1. 细胞 本实验所用活性检测细胞为小鼠

别。Aoyagi 等^[9]认为 LcA 与 AFP 相结合的糖基是岩藻糖基化的糖基。换言之, 肝癌时往往伴有岩藻糖基 AFP 的急剧增高。

本文通过各种纯度指标的鉴定以及血凝活力的测定, 研究了用国产兵豆制备的 LcA 的理化特性。在交叉免疫亲和电泳中, 证实此种凝集素对肝癌 AFP 糖基具有较高的亲和性, 是研究 AFP 糖基结构与癌变关系的一种有效工具。

本文承江苏省植物研究所副研究员方文哲鉴定豆种; 南京大学现代分析中心分析金属含量; 江苏省理化检测中心分析氨基酸组成均此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Breborowicz, A. et al.: *Scand. J. Immunol.*, 1981,

14, 15.

[2] Howard, I. K., Sage, H. J.: *Biochemistry*, 1969, 8, 2426.

[3] Tichá, M., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 221, 282.

[4] Toyoshima, S., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 221, 514.

[5] Fliegerová, A., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 351, 416.

[6] Dubois, M., et al.: *Anal. chem.*, 1956, 28, 350.

[7] Børg-Hansen, T. C.: *Anal. Biochem.*, 1973, 56, 480.

[8] Howard I. K., et al.: *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 1950.

[9] Aoyagi, Y., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 830, 217.

[本文于 1988 年 7 月 30 日收到]