

固氮酶抗血清的制备与提纯及氮阻抑固氮酶合成的双向免疫电泳证据

顾天青 王继文

(中国科学院植物研究所)

目前,免疫化学技术已广泛地应用在分子生物学、遗传学、生理学、植物学、分类学等各方面的研究中。免疫化学的优点是它具有高度的专一性和敏感性。利用这种方法能够记录用其它方法常常不能发现的蛋白质结构的微小改变,能够鉴别和测定其它方法完全不能阐明的混合物的物质。

在研究棕色固氮菌的固氮酶上我们应用此法得到一些初步结果,固氮酶是由两个亚基组成,其组份 I 为 MoFe 蛋白,组份 II 为 Fe 蛋白,只有两个组份同时存在才能表现出固氮酶活性。我们用家兔制备固氮酶组份 I 抗体的抗血清,利用特异性吸附的方法把抗血清纯化。用上述抗血清进行单向免疫扩散和双向免疫电泳,证明棕色固氮菌在大量氮存在的条件下不能合成固氮酶。现将实验技术和结果报道如下:

1. 方法

实验所用棕色固氮菌(A. Vinelandii 林土 230,以下简称 AV230)固氮酶的分离、提纯、结晶均按过去所用方法^[1]并有所修改。聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳参考 Daris 等^[2]的方法。蛋白质浓度用双缩脲法^[3]测定。

2. 棕色固氮菌 AV230 固氮酶组份 I 抗血清的制备

抗原为固氮酶组份 I 即 MoFe 蛋白结晶,纯度为电泳纯(见封三图 1)

对健康家兔免疫注射死卡介苗于两后脚掌处,每支脚掌 0.1 毫升(约 7 毫克)。两周后切开腓窝淋巴结,注射 0.1 毫升(约含抗原 0.4 毫

克)抗原及 0.1 毫升福氏佐剂。半月后在背部多点注射加不完全佐剂的抗原 0.2 毫升,眼膜内注射不加佐剂的抗原 0.1 毫升,以后每隔一周同样注射一次,共注射 3 次。注射量同前,最后一次注射一周后,由颈动脉全采血,分装于血清瓶中,冰冻干燥制成干粉保存。用单向免疫扩散检查冰冻干燥后的固氮酶组份 I 抗体的效价。方法为:用 0.05M, pH8.6 的巴比妥缓冲液配成 1% 琼脂胶,制成免疫扩散板,厚度为 2 毫米。中间孔加入抗原-MoFe 蛋白的结晶溶液,浓度 4 毫克/毫升;在其周围等距离制作 6 个孔加入不同稀释度的抗血清,扩散温度 25°C, 24 小时。结果见封三图 2。

结果看出,稀释 8 倍的抗血清仍可出现较明显的沉淀线,比冰冻干燥前的新鲜血清效价降低 1 倍。

用固氮酶的粗提物及经 DEAE 纤维素柱层析分段洗脱的洗脱液^[4]和固氮酶组份 I 的结晶作免疫扩散,结果见封三图 3。

扩散结果说明,抗原结晶出现一条沉淀线,粗提物和 0.25M NaCl 及 0.4M NaCl 洗脱液洗下的样品出现了多条沉淀线,说明抗体不纯,除含有固氮酶组份 I 抗体外,还有其它抗体成份。抗体的纯度取决于抗原的纯度,虽然抗原在聚丙烯酰胺凝胶电泳上表现为一条带,但还可能有微量的杂蛋白,因此得到的抗血清就不够纯,必须进一步纯化。

3. 固氮酶组份 I 抗血清的纯化

我们采用特异性吸附的方法去除抗血清中

组份 I 抗体成份以外的其它抗体,以达到其纯化的目的。

已知在大量氨存在的条件下,固氮菌固氮酶的合成完全受抑制,而在无氨的条件下则能合成固氮酶。我们在大量氨存在的条件下培养固氮菌 AV230,并制备其粗提物,用这个不含有固氮酶的粗提物去吸附抗血清中除固氮酶组份 I 以外的其它抗体成份,经过吸附后的抗血清,就只含有固氮酶组份 I 的抗体成份。具体作法如下:

将 AV230 培养于按 400 微克氮/毫升量加入乙酸铵的改良的 Barks' 培养基中,30℃摇床培养 17 小时,得到的菌糊经压榨机破碎后,20,000 转/分离心 30 分钟,取上清液即为粗提物,蛋白为 8 毫克/毫升。取抗血清 1 毫升,加 3 毫升上述粗提物,充分摇匀后,放置 1 小时,3,000 转/分离心 10 分钟,上清液即为固氮酶组份 I 的抗体。用单向免疫扩散检查结果,见封三图 4。

从图 4 可以看出,抗血清在纯化前对大量氨和无氨条件下培养的 AV230 固氮菌粗提物都出现了多条沉淀线,并可看出在无氨条件下出现的沉淀线更多。而从封三图 5 可看出,将抗血清用吸附法纯化后,无氨条件下培养的固氮菌粗提物只出现一条沉淀线,说明抗血清已被纯化。

用固氮酶组份 I 结晶为抗原做免疫扩散(见图封三 6)。从图中可看出为一条沉淀线。可见抗血清经吸附纯化后保留的是固氮酶组份 I 的抗体。这也进一步证明了固氮菌在有大量氨条件下培养的确是不形成固氮酶的组份 I。

4. 双向免疫电泳

上述结果也可以用双向免疫电泳进一步证明。双向免疫电泳分两个步骤进行,首先抗原组份用电泳法分离,然后切下放到抗体琼脂板一侧,再与各组份垂直的方向泳动一次。根据沉淀峰出现的差异可以看出样品之间的区别。具体作法如下:

第一向电泳

用巴比妥缓冲液配制 1% 琼脂糖胶,在 5 ×

5 厘米的玻片上,水平铺 2 毫米厚的琼脂糖胶,在板的一端打孔加样品,样品量约 100—150r 之间,板两端用滤纸与电泳槽缓冲液相联接,电泳 1 小时,板端压 15 伏。

第二向电泳

在 5 × 5 厘米的玻片上,制 1:35 稀释度的抗体琼脂板,厚为 1.5 毫米。将第一向电泳后的样品胶切下垂直放在抗体琼脂板一端。同前开始电泳,板端电压 15 伏,时间 4 小时。关闭电源取下琼脂板,放入 0.85% 的生理盐水泡 2 天,洗换二次。干燥后用考马斯亮兰 R-250 染色 2 分钟,取出后脱色干燥,结果如封三图 7、8、9、10、11。

从结果中可看出,AV230 在大量氨环境中生长和在无氨环境中生长是有区别的。封三图 7 表现出来的沉淀峰是 AV230 在无氨环境中生长的粗提物样品,封三图 8 是在有氨环境中生长的粗提物样品,从两个图形上看他们的区别就是图 7 有一深色的沉淀峰,这个峰由封三图 9、10、11 的实验证明就是固氮酶组份 I 即 MoFe 蛋白结晶的沉淀峰,而图 8 则没有这个沉淀峰。

特异性吸附法去除抗血清中的不纯成份是可行的。无氨环境中生长的粗提物样品在经过纯化后的抗体琼脂板上电泳,出现了一个沉淀峰(图 9),固氮酶组份 I 的结晶样品在同样的抗体琼脂板上电泳也只出现一个沉淀峰(图 10),说明抗血清经过特异性吸附后,保留的抗体成份是固氮酶组份 I 的抗体成份。固氮酶组份 I 的结晶样品在复合抗血清的琼脂板上电泳,结晶样品也只出现一个峰(图 11),因此说 AV230 在大量氨环境中生长制得的粗提物,能够吸附掉复合抗血清中除固氮酶组份 I 抗体以外的其它抗体成份,使抗血清纯化。

与此同时,实验清楚的表明,AV230 在有氨和无氨的条件下生长的区别就在于:前者不能合成固氮酶组份,也就是说氨阻抑了固氮酶的合成,而后者则能合成固氮酶组份。通过免疫的方法也证实了这个结果。

5. 小结

从我们的工作中可以看出,免疫化学技术应用在固氮酶的研究中是可行的。纯化后的固氮酶组份 I 的抗血清,不仅可以检查出在大量氨和无氨条件下 AV230 生长的区别,而且也在今后在固氮酶的研究中,应用免疫化学技术开辟更广阔的途径。由于免疫化学高度的敏感性和专一性,也可以用它来筛选固氮生物,进行固氮遗传学研究,进而推动生物固氮研究工作的进展。

本工作曾得到宣武医院盛树力大夫和李天

佑大夫的协助与指导及本组同志们的大力帮助,特此致谢。

主要参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所七室:《植物学报》,1973年,第15卷,第2期,第281页。
- [2] Davis, L. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 256, 1972.
- [3] Layne, E.: *Methods in Enzymology*. Vol. III (Eds. S. P. Colowick and N. O. Kaplan) 1957: Acad. Press, N. Y. P. 450.

[本文于 1978 年 11 月 27 日收到]

抗体的免疫荧光定量测定法

王征太 何赐科 欧阳恒静 李倩

(重庆医学院生化教研室)

随着免疫学理论与实验研究的迅速发展,在临床医学以及病因学、发病学的研究工作中都迫切要求建立灵敏、可靠的抗体检测法,特别是简易的定量测定法。检出抗体(Ab)的方法,是依赖于Ab与特定抗原(Ag)的特异的结合反应,生成抗体-抗原复合物(Ab-Ag)。这是最基本的反应,定为“一级”反应。此外,在“一级”反应的基础上亦即生成Ab-Ag后,在一定的条件下,在体外引发的现象如沉淀反应、凝集反应等称为“二级”反应;而在体内引发的现象称为“三级”反应,如被动皮肤过敏反应等^[1,2],也都可能为检出Ab的依据。

显然,由于“一级”反应是显示抗体的最本质的反应,是最可靠的依据。而“二级”、“三级”反应则是有条件性的,所以为了获得可靠结果,必须在采用的多种检出Ab的方法中至少有一种方法是基于“一级”反应的Ab检出法。不少材料指出,基于“一级”反应的方法能检出相当量的Ab,而用基于“二级”或“三级”反应的方法有时不能获得阳性结果^[2]。

本方法是一种基于“一级反应”,利用荧光技术的Ab定量测定法。方法的原理是:首先

把可溶性Ag制成不溶性固态Ag。通过与被测样品一起保温,使被测样品中的Ab与固态Ag进行“一级”反应。离心去除样品并洗净非特异地吸附于固态Ag上的多余样品后,加入定量的荧光素标记的抗免疫球蛋白G(IgG)抗体(FA),使与已特异地结合在固态Ag上的被测Ab再次进行“一级”反应。再次保温后,测定溶液中剩余的FA,并以此表示被测样品中Ab的含量。在不溶性固态Ag上进行二次Ab、Ag的结合反应的间接法,不但比直接法有更高的灵敏度,而且只需制备一种FA,选用不同的Ag可进行多种Ab的定量测定。例如利用抗人IgG-FA,选用不同组织器官的提取物作Ag,可进行多种自身抗体的定量测定。

材料与方 法

利用二种Ab,Ag系统:(1)人免疫球蛋白G(HIgG)与兔抗HIgG(RAHIgG)及(2)人心匀浆上清液(HHS)与兔抗HHS(RAHHS)作方法学的研究,皆得较满意的结果。

1. HIgG 的提取与纯化

健康人血清(HS)经硫酸铵分段沉淀取得

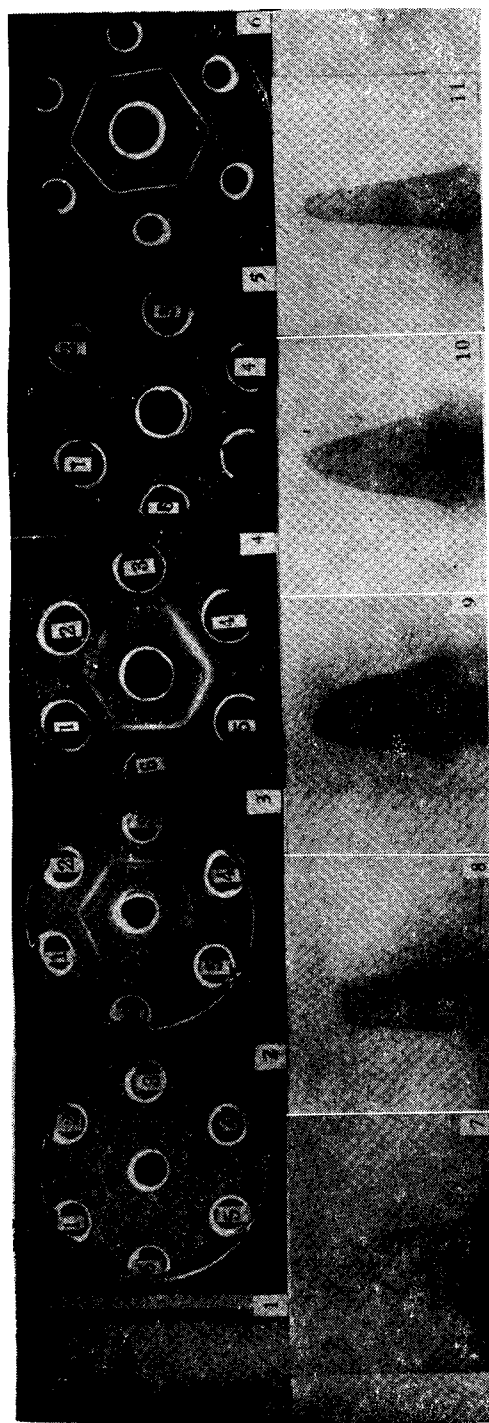


图 1 MoFe 蛋白结晶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

图 2 不同稀释度的抗血清与 MoFe 蛋白结晶的免疫扩散

1, 2 孔——2 倍稀释的抗血清
3, 4 孔——4 倍稀释的抗血清
5, 6 孔——8 倍稀释的抗血清

图 3 中间孔——抗血清, 周围 6 孔为抗原

1 孔——固氮酶组分 I 结晶, 2 孔——粗提物, 3 孔——0.25 M NaCl 洗脱液洗下的样品, 4 孔——0.4 M NaCl 洗脱液洗下的样品, 5, 6 孔——0.1 M NaCl 洗脱液洗下的样品

图 4 单向免疫扩散图

中间孔为复合抗血清; 周围 6 孔为抗原; 1, 2, 3 孔为在大量氮条件下培养 AV 230 的粗提物; 4, 5, 6 孔为在无氮条件下培养 AV 230 的粗提物

图 5 中间孔为纯化后的固氮酶组分 I 抗体; 周围 6 孔为抗原, 处理同图 4

图 6 中间孔——纯化后的固氮酶组分 I 抗体; 周围 6 孔为抗原-组分 I 结晶

图 7 免疫板——纯化后的抗血清样品——无氮下生长的 AV 230 粗提物

图 8 免疫板——没经纯化的抗血清样品——大量氮下生长的 AV 230 粗提物

图 9 免疫板——纯化后的固氮酶组分 I 抗体; 样品——无氮下生长的 AV 230 粗提物

图 10 免疫板——纯化后的固氮酶组分 I 抗体; 样品——固氮酶组分 I 结晶

图 11 免疫板——纯化前的抗血清样品——固氮酶组分 I 结晶