

猪血清补体成分 B 因子的分离及其与异种 B 因子的抗原性交叉

曾一鸥 徐 愤*

(南京医学院分子免疫学研究室,南京)

提 要

作者应用不同种属同功能补体成分抗原性交叉的特性,用抗-人 B 因子抗体制备成亲和层析柱,从猪血清中分离到纯度相当好的猪 B 因子。样品具有 B 因子的溶血活性、免疫原性等生物学功能。本文报告猪 B 因子的分离,并与人 B 因子的性质进行了比较。

B 因子是补体 C3 旁路 C3 转化酶 C3 bBb 的组成分子,是一个特殊的丝氨酸蛋白酶。人 B 因子是一个沉降系数为 5.9S 的糖蛋白,整个分子由单一多肽链构成,分子量为 93.000 道尔顿;人 B 因子是一个不耐热分子,50℃30 分钟处理将使其丧失溶血活性^[1]。人 B 因子已被分离提纯,并已完成其一级结构的分析^[2]。有关人 B 因子的生物学功能和分子结构的特征已有综述^[3]。

费等在研究补体溶血中间体 EAC1q4 的过程中发现人和猪 C4 之间有抗原性交叉,并用免疫吸附剂分离出交叉性抗体^[4]。此后又证明不同种属的许多同功能补体成分之间都表现有抗原性交叉现象,并应用于一些补体成分的分离、初步发展成为补体分离工作中的一种新的通用手段(费等、待发表资料)。本文报告用抗人 B 因子抗体亲和层析柱分离猪 B 因子的工作。

材 料 和 方 法

巴比妥缓冲盐水、含 Mg^{2+} 和明胶的巴比妥缓冲盐水 ($Mg-GVB$)^[5];琼脂双扩散、免疫电泳^[6];聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、SDS-PAGE、分子量测定^[7];2% E_R ^[8] 按相应文献

的方法。

缺乏 B 因子的猪血清 (RB^p) 的制备和溶血活性的测定 参考 Lesavre 的方法^[9],取新鲜猪血清,加进 0.1mol/L $Mg-EGTA$ 使其终浓度为 0.005mol/L,于 50℃ 加温 30 分钟。保温毕查其 C3 旁路活性是否灭活,及加进猪 B 因子 (B^p) 后看其能否恢复 C3 旁路溶血活性。 RB^p 活性和猪 B 因子溶血活性的测定详见结果部分。

人 B 因子的提纯、抗-人 B 因子抗血清的制备及抗-人 B 因子亲和柱的制备 见以前报道^[8]。

$E-B^h$ 、 $E-B^p$ 、 $E-B^r$ 的制备 按王介召的方法^[6]制备醛化血球、将醛化血球分别与人 B 因子 (B^h)、猪 B 因子 (B^p)、大白鼠 B 因子 (B^r) 结合,并以 PBS 配成 1% 悬液。

凝集反应 以 1% $E-B^h$ 、1% $E-B^p$ 、1% $E-B^r$ 50 μ l,与不同稀释度的抗-人 B 因子抗血清 50 μ l 混合,充分振荡,室温放置 24 小时后记录结果。

N-末端测定 基本按 Tarr 的方法^[9],稍有修改。所得 PTH-氨基酸与标准 PTH-氨基

* 通讯联系人: 徐愤教授。

酸在聚酰胺薄膜上层析；在碘蒸气中显色后与标准的 PTH-氨基酸比较，确定 PTH-氨基酸的种类。

猪 B 因子的分离 取冻存猪血清以 1mol/LHCl 调至 pH5.5, 对 pH5.5, 0.008mol/L EDTA 液透析约 16 小时 (4℃)；以 10,000 转/分离心 20 分钟；弃优球蛋白沉淀后调至 pH7.2 左右，加于抗-人 B 因子亲和层析柱，让其缓慢流出，并吸附约 4 小时；然后以 pH7.2PBS($\mu=0.075$) 洗脱杂蛋白过夜(约洗脱 250 毫升)；此时洗脱液之 OD₂₈₀ 值为 0。然后加进 pH2.8 0.05mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液解离柱中吸附的蛋白质，分部收集，并将此收集液调至 pH7.2。测定每管收集液之 OD₂₈₀ 值，测定其溶血活性；将活性部分合并冻存于-70℃，或立即用于分析。

结 果

一、RB^p 的鉴定和 B^p 因子溶血活性的检测

RB^p 的鉴定和 B^p 因子溶血活性测定的方法和结果如表 1；其中第一排为测定管，其余三排为对照管。

表 1 RB^p 的鉴定和 B^p 因子溶血活性的检测

B 因子 检样	RB ^p	B ^p 对照*	2%ER	Mg-GVB $\xrightarrow[30分]{37℃}$	溶血 反应
20 μ l	25 μ l	0	20 μ l	85 μ l	+++
0	25 μ l	0	20 μ l	105 μ l	-
0	25 μ l	20 μ l	20 μ l	85 μ l	+++
0	0	20 μ l	20 μ l	110 μ l	-

* B^p 为活性好、功能纯的 B^p 因子样品。

上述结果说明所制备的 RB^p 符合要求；此法适于检测 B^p 因子样品的溶血活性。

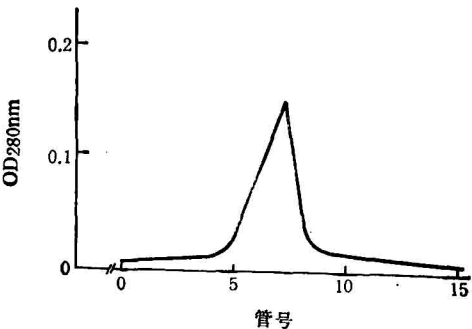


图 1 以抗-人 B 因子亲和层析柱分离猪 B 因子的层析图

二、B^p 因子的亲和层析分离

以 10 毫升猪血清按照上述方法除去优球蛋白沉淀后加于以 pH7.2PBS($\mu=0.075$) 平衡的抗-人 B 因子亲和层析柱 (1 × 15cm)，其层析结果如图 1。以 10 毫升猪血清约能分离到具有溶血活性的 B 因子约 400 μ g。

三、猪 B 因子的性质

(1) 猪 B 因子的不耐热性

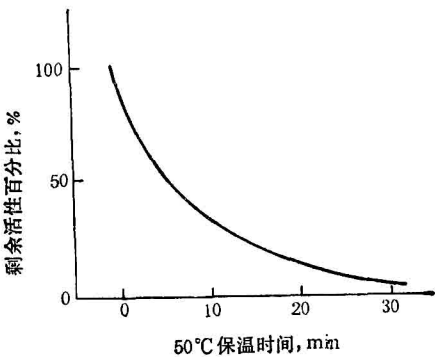


图 2 猪 B 因子的灭活曲线

将 B^p 因子样品置 50℃ 保温不同时间，保温毕立即置冰浴，然后按前述方法查其中 B^p 因子的剩余活性，计算其灭活百分比，结果如图 2。

结果说明，猪 B 因子在 50℃ 时不耐热，30

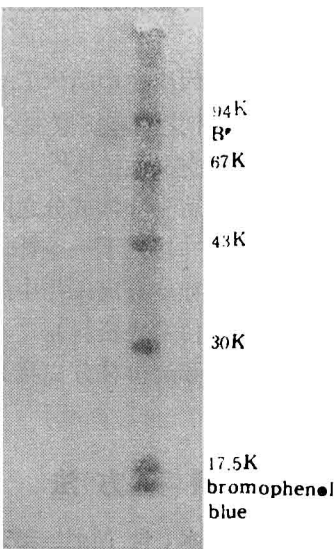


图 3 B^p 因子及分子量标准品在 10% 凝胶上作 SDS-PAGE 的结果

分子量标准：94K，磷酸化酶b；67K，清蛋白，43K，肌动蛋白；30K，碳酸酐酶；17.5K，TMV 外壳蛋白

分钟处理丧失全部溶血活性。

(2) PAGE 及 SDS-PAGE 分析

将 B^p 因子样品在 7.5% 的凝胶中作 PAGE, 显示单一蛋白带; 在还原状态下以 10% 凝胶作 SDS-PAGE, B^p 因子仍只显示一条蛋白带, 并测得其分子量为 84,000 道尔顿。其 SDS-PAGE 的结果如图 3。

(3) N-末端分析

测得其 N-末端为甘氨酸。

(4) 兔抗-猪 B 因子抗体的制备

以约 300 μ g B^p 因子加弗氏佐剂充分乳化后在家兔背部、颈后作多点皮内注射; 三周后以相同量 B 因子以硫酸钾铝佐剂沉淀后作深部肌肉加强注射; 三周后试血, 再如此加强注射一次, 两周后放血。从心脏穿刺采血, 常规分离、灭活抗血清。以琼脂双扩散法测得其效价为 1:4; 免疫电泳显示单一沉淀弧, 结果如图 4。

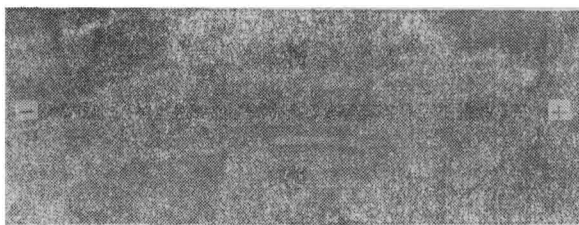


图 4 B^p 与抗 B^p 抗血清作免疫电泳的结果
上孔: B^p 因子; 下孔: B^p 因子 1:2 稀释液; 抗 B^p 抗血清

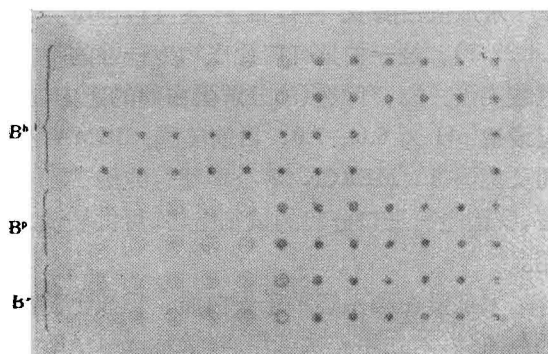


图 5 人 B 因子 (B^h)、猪 B 因子 (B^p)、大白鼠 B 因子 (B^m)
与抗-人 B 因子抗血清的凝集反应
凝集板中自左至右抗血清的浓度为对倍稀释

(5) 猪 B 因子与人 B 因子的抗原性交叉

以醛化 E-B^p、E-B^h (以及 E-B^m) 与不同稀释度的抗-B^h 抗血清作凝集反应。除 E-B^h 与抗 B^h 有明显的凝集反应外, E-B^p、E-B^m 与抗-B^h 也有凝集反应发生, 说明 B^p 因子、B^m 因子和 B^h 因子中有相同的抗原结构。凝集反应的结果如图 5。

讨 论

补体 C3 旁路是种系发生中出现较早的补体活化通路, 在环节动物和节肢动物的血淋巴中就已发现有补体 C3 旁路的活化, 但并未发现 C1 活化通路的存在; 直至两栖动物的蛙类才发展成为既有 C3 旁路、也有 C1 通路两个完整的补体活化通路^[10]。对人和猪 B 因子进行研究, 可探索不同种属间同功能补体成分的分子结构和功能的关系。

应用抗原性交叉的特性, 以抗-人 B 因子亲和层析柱分离到猪 B 因子。分离的样品具有 B 因子的溶血活性、免疫原性、单链结构; 以 SDS-PAGE 初步测得其分子量为 84,000 道尔顿; 50°C 30 分钟处理完全丧失溶血活性; 这与人 B 因子的性质基本相同。初步测得猪 B 因子的 N-末端为甘氨酸, 与人 B 因子的 N-末端 (丝氨酸)^[12] 不同。猪 B 因子的分子量 (84,000 道尔顿) 也比人 B 因子的分子量 (93,000 道尔顿) 小, 其原因有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Curman, B. et al.: *Biochemistry*, 1977, **16**, 5368.
- [2] Mole, J.E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 3407.
- [3] 曾一鸥: 《生物化学与生物物理进展》, 1986, (4), 28.
- [4] 费如珍等: 《生物化学与生物物理学报》, 1985, **17**, 743.
- [5] Lesavre, P.H. et al.: *J. Immunol.*, 1979, **123**, 529.
- [6] 王世中: 《免疫化学技术》, 科学出版社, 1980, 54; 74.
- [7] 莽克强: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 科学出版社, 1975, 26; 88.
- [8] 曾一鸥等: 《中华微生物学和免疫学杂志》, 1985, **5**, 24.
- [9] Tarr, G.E.: *Anal. Biochem.*, 1975, **63**, 361.
- [10] Day, N. et al.: *J. Immunol.*, 1972, **109**, 164.

[本文于 1987 年 10 月 13 日收到]