

GOT, LDH and CPK, are higher than those in control, is in direct proportion to the H_2O_2 concentration and the incubation time.

Key words hydroxyl radical, V79 cells, SOD, LPO

梨形环棱螺凝集素的初步研究

张吉强

(第三军医大学组织胚胎学教研室, 重庆 630038)

李清漪

(西南师范大学生物系, 重庆 630715)

摘要 通过 Sepharose 4B-甲状腺球蛋白亲和层析, 从梨形环棱螺 *Bellamya purificata* 体内分离到的一种凝集素, 不连续 PAGE 显示其为单一的蛋白质谱带。它能凝集兔、猪、鸭等动物的红细胞, 但不能凝集人的 A、B、O 及 AB 型血的红细胞和固定后的兔红细胞。其凝集活力可被 1.0mol/L 的乳糖、半乳糖和 60g/L 的甲状腺球蛋白抑制, 但不能被碱性硼酸缓冲液抑制。对温度变化敏感, 有较宽的最适 pH 范围。

关键词 梨形环棱螺, 凝集素, 理化性质, 纯化

软体动物凝集素大都来源于软体动物的体液或蛋白腺中, 具有调理、避害、识别等功能, 还具有促进细胞的有丝分裂、糖的代谢和利用等作用^[1-3]。我们从梨形环棱螺 (*Bellamya purificata*) 肌肉中提取一种凝集素 (BPL) 并对其部分理化性质及纯化方法进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 梨形环棱螺采自北碚磨滩水库, 经鉴定后取其肌肉用 PBS 按 1:4 (W/V) 匀浆, 4℃浸提过夜, 离心弃去沉淀, 上清液即为 BPL 提取液。

1.2 BPL 的血凝试验和糖抑制试验按孙册^[4]的方法; 采用甲醛和/或戊二醛固定兔红细胞^[5,6]; 按 Ahmed 等^[7]的方法测定碱性硼酸缓冲液对 BPL 血凝活力的影响; 以不同 pH 值的缓冲液 (pH1.89—11.98) 代替糖溶液测定 BPL 的酸碱稳定性。BPL 热稳定性的测定方法如下: 取提取液数份, 在不同温度下各孵育一定时间后迅速冷却至室温, 然后测其血凝活力。

1.3 凝集素的纯化, 采用溴化氰活化的 Sepharose 4B-甲状腺球蛋白亲和层析法^[8],

PBS 平衡并洗脱杂蛋白, 随后依次用 1.0mol/L 的乳糖、0.1mol/L 的醋酸解吸附。洗脱液经活性测定后合并有活性部分, 对 PBS 充分透析, 冷冻干燥后即得 BPL 纯品, 纯度鉴定采用碱性 PAGE。

2 实验结果

2.1 在梨形环棱螺肌肉组织中存在着血凝成分 (BPL), BPL 对不同种属及不同血型的凝血作用列于表 1。

实验结果表明, BPL 对兔血的凝集作用最强, 但不凝集人的各型血红细胞, 酶处理使其敏感性增强。

甲醛和/或乙醛固定的兔红细胞不再与 BPL 发生凝聚反应; 碱性硼酸缓冲液 (pH7.4—9.0) 对 BPL 的血凝活力没有影响。

糖抑制实验证明, 只有高浓度 (1.0mol/L) 的乳糖和半乳糖及 60g/L 的甲状腺球蛋白表现出较强烈的抑制作用, 其它的单双糖在各自的浓度下均无抑制作用 (表 2)。

表 1 BPL 的血凝专一性

红 细 胞	人 (血型)				动 物 血										效 价
	A	B	AB	O	鸡	鸭	蟾 蜍	鼠	兔	鲑 鱼	牛	猪	鸽	黄 鳝	鲤 鱼
未经胰蛋白酶处理	—	—	—	—	—	8	—	—	16	—	—	4	—	—	—
经过胰蛋白酶处理	—	—	—	—	—	32	—	—	128	—	8	16	4	—	—

表 2 BPL 的糖抑制专一性

糖/ $0.3\text{ml} \cdot \text{L}^{-1}$	乳糖	蔗糖	麦芽糖	D-木糖	D-半乳糖	D-果糖	L-岩藻糖	GluNAC ¹⁾	D-甘露糖
血凝效价	4	16	16	16	4	16	16	16	16
糖	乳糖/ $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		D-半乳糖/ $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		乳糖/ $1.0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		D-半乳糖/ $1.0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		猪甲状腺球蛋白 (PTG) / $60\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
血凝效价	4		4		—		—		—

¹⁾N-乙酰-D-葡萄糖胺。

BPL 对酸碱变化耐受力强 (图 1), 表现出

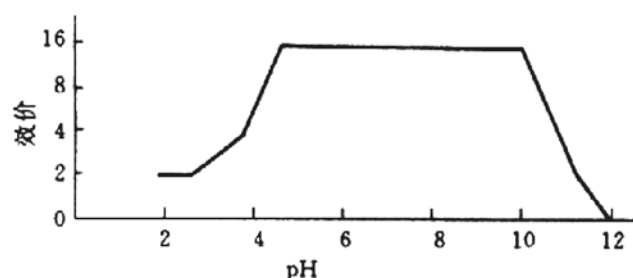


图 1 BPL 的酸碱稳定性曲线

很宽的适应范围 (pH4.56—9.96). 但是, BPL 对温度变化很敏感, 50℃加热 5min 即导致血凝活力显著下降, 55℃加热 5min 则使血凝活力完全丧失。

2.2 BPL 提取液经亲和柱层析, 只有用 1.0mol/L 乳糖洗下的峰有活性. 该部分经透析、冷冻干燥、PAGE 染色后为单一的蛋白质谱带, 说明得到的是 BPL 纯品, 参见图 2a、b.

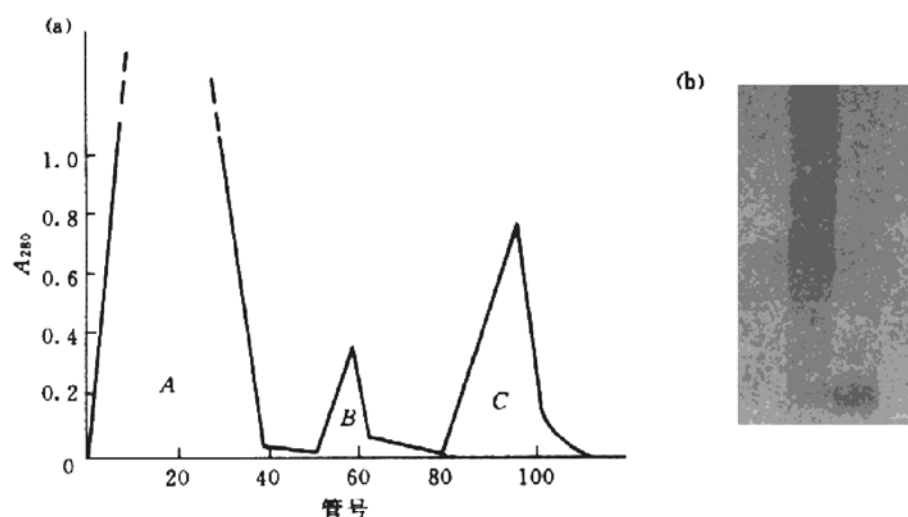


图 2 BPL 的纯化结果

(a) A、B、C 峰是用 PBS、乳糖及醋酸洗脱所得, 其中只有 B 峰有活性;

(b) 为 BPL 在碱性 PAGE 中的电泳行为, 左侧为有多条带的提取液, 右侧为亲和层析所得的 BPL, 仅一条蛋白质谱带. Tris-HCl 缓冲系统 (pH8.3), 浓缩胶为 2.5%, 分离胶为 7.5%.

3 讨 论

虽然大多数软体动物凝集素都来源于其体液或蛋白腺中,但BPL仅见于梨形环棱螺的肌肉组织内,这种分布的生理意义尚不清楚。另外,实验表明BPL的最佳抑制糖可能不是乳糖或半乳糖,而可能为某种半乳聚糖,其结合位点亦可能较大。BPL不能与固定后的兔红细胞发生凝集,这和宋平等^[9]、Flick^[10]的研究报道相似。

Renkonen最早发现碱性硼酸缓冲液能抑制植物凝集素的血凝活力^[7]; Horejesi等^[11]提出了这种抑制的可能机理,并认为可用该缓冲液作通用的亲和洗脱液。我们的实验表明BPL的血凝活性不受硼酸缓冲液影响,这可能与凝集素的不同来源有关。

不同的温度或酸碱度对不同的软体动物的凝集素作用的影响不同。*Saxidomus giganteus*凝集素在70℃加热20min才完全失活^[12]; *Achatina fulica*凝集素只在13℃以下才与兔红细胞发生凝集,其活力在pH6.2—7.2范围内很稳定^[13]; Tridacnin的活力在pH4.8—10.6范围维持不变且最高^[14]。我们得到的BPL在55℃加热5min即完全失活,但其最适pH范围较宽,pH4.56—9.96。

目前,关于BPL性质的进一步研究正在进行之中。

致谢 承蒙四川大学曾仲奎教授,上海生化所孙册教授的不吝赐教,作者谨深表谢忱。

参 考 文 献

- 1 Kalm W. The mollusca, Vol. 5: Physiology, part II. London: Academic Press, 1983; 442—469
- 2 Sanae M, Iguchi M. Comp Biochem Physiol, 1985; 4 (81B): 897

- 3 Boyd W C. Introduction to immunochemical specificity. New York: Interscience, 1962; 58
- 4 孙 册. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1986; 39
- 5 张惟杰. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1987; 344
- 6 Butler W T. J Immunol, 1963; 90: 633
- 7 Ahmed I A, Yin Y, Osuga D T *et al.* J Biol Chem, 1976; 251 (10): 3033
- 8 March S C, Parikh I. Anal Biochem, 1974; 60: 159
- 9 宋 平, 熊全沫. 水生生物学报, 1988; 12 (3): 279
- 10 Flick J A. Proc Soc Exp Biol & Med, 1948; 64: 448
- 11 Horejesi V, Haskovec C, Kocourek J. Biochim Biophys Acta, 1978; 532: 98
- 12 Johnson H M. Science, 1964; 146: 548
- 13 Sarkar M, Bachhawat B K, Mandal C. Arch Biochem Biophys, 1984; 233 (1): 286
- 14 Baldo B A, Sawyer W H, Stick R V *et al.* Biochem J, 1978; 467

A Preliminary Study on *Bellamya purificata* Lectin. Zhang Jiqiang, Li Qingyi. (Third Military Medical College, Chong Qing 630038, China).

Abstract By Sepharose 4B-thyroglobulin affinity column chromatography a lectin was purified from *Bellamya purificata*. It showed a single band on alkaline PAGE. This lectin (BPL) agglutinated red blood cells of rabbit, duck and pig, but not of human blood types or formalin and/or glutaraldehyde-fixed rabbit erythrocytes. Its agglutination activity could be inhibited by 1.0mol/L lactose or galactose as well as 60g/L thyroglobulin, but not by alkaline borate buffer. BPL was temperature-sensitive, while showed a broad optical pH range (pH4.56—9.96).

Key words *Bellamya purificata*, lectin, physicochemical characterization, purification