

较高. 这可能由于 PEG 制备微粒体的回收率高于超速离心法, 同时由于部分非微粒体成分如溶酶体等沉淀所致.

离心沉淀分离法是利用各种亚细胞成分密度不同以及体积(或形态)大小相殊, 再利用不同的离心速度及不同的离心时间而分批收集各亚细胞成分^[6]. 而聚乙二醇法是由于聚乙二醇分子有与盐类似的脱水特性, 与水分子结合后使大分子物质如蛋白质溶解度降低; 同时由于 PEG 是有机溶剂, 又具有绝缘特性, 且 PEG 溶液离子强度和电子密度颇低, 这样蛋白质水溶液由于 PEG 的加入导致溶液介电常数下降, 增加了蛋白质分子上不同电荷的引力, 使蛋白质凝聚以沉淀形式分离出来^[7,8].

微粒体的制备是毒理学和药理学研究的基础. 由于 PEG 法省去了超速离心步骤, 便于在大多数实验室推广使用, 所以用聚乙二醇制备大鼠肝微粒体是一种比较简单易行的方法.

参 考 文 献

- 1 Schenkman J B, Cinti D L. In: Fleischer S ed. Methods in enzymology (Vol. 52, Part C). New York: Academic Press, 1978: 83
- 2 Guengerich F P. In: Hayes A W eds. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press, 1982: 605
- 3 Omura T, Sato R. J Biol Chem, 1964; 239: 2370
- 4 Dignam J D, Strobil H W. Biochemistry, 1977; 16: 1116

- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L et al. J Biol Chem, 1951; 193: 265
- 6 北京医学院主编. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 87
- 7 鲁子贤主编. 蛋白质和酶学研究方法, 第一册. 北京: 科学出版社, 1989: 17
- 8 McPherson A. In: Wyckoff H W eds. Methods in enzymology (Vol. 114 Part A). New York: Academic Press, 1985: 120

Preparation of Microsomes with Polyethylene Glycol. Wang Lie, Yang Mingxue, Xie Guangyun (Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China).

Abstract A microsome preparation procedure using polyethylene glycol (PEG) is reported. The liver homogenate of rats is aggregated by polyethylene glycol-6000, and centrifuged at high speed two times. The obtained pellet is the microsomal fraction. Compared with the ultracentrifugation method, this procedure of using PEG to prepare microsomes greatly eliminated the need for an ultracentrifuge and reduces the time necessary for isolation of this fraction. It is simple and feasible.

Key words polyethylene glycol, microsomes, preparation, high speed centrifugation

丝瓜核糖体失活蛋白的分离与纯化*

吴 伸 朱日荣 郭 峰¹⁾ 刘朵花

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 采用一种改进的方法, 简便快速地从丝瓜 (*Luffa cylindrica*) 籽中得到丝瓜蛋白 α 和 β . 它们在 SDS-PAGE 上均呈一区带, 其分子量分别为 28 000 和 29 000. 等电聚焦测定等电点均为 10. 它们对无细胞体系蛋白质合成都有强烈的抑制活性, 其 ID_{50} 分别为 10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$, 是目前发现的单链核糖体失活蛋白中活性最高的.

关键词 核糖体失活蛋白, 丝瓜蛋白, 蛋白质纯化, N-糖苷酶, 柱层析

核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating protein, RIP) 是一类作用于真核细胞核糖体和裸露原核 rRNA, 抑制蛋白质合成的蛋白毒素^[1~4], 具有抗植物病毒和动物病毒的活力. 现已纯化的 RIP 有两种类型, 即单链 RIP 和双链 RIP, 分别称为类型 I 和类型 II. I 型 RIP 之一, 天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 也是一个能从 28 S rRNA 第 4324 位切掉一个腺嘌呤碱基的 N-糖苷酶^[5], 它具有多种医药功能^[6]. 不仅能用于中期引产和抗早孕等, 而且又发现了它有抗人体免疫缺陷病毒 (HIV) 的活性^[7]. 它的序列结构和空间结构已被测定. 另一个 I 型 RIP, α -苦瓜蛋白 (α -momorcharin, α -MMC) 的序列结构和空间结构也已取得. II 型 RIP 研究最多的是蓖麻蛋白 (ricin), 它的野生型、突变体和与核苷酸复合物的三维结构均有报道. 把 RIP 与抗体或单克隆抗体偶联起来形成免疫毒素, 用于癌症和寄生性疾病的治疗引起了人们的广泛兴趣, 可望为人类做出有益的贡献.

研究发现, RIP 广泛地存在于植物界. 目前, 人们已经从多种植物中分离出不同的 RIP 和具有 RIP 活性的粗提物. 1983 年, K. Kishida 等^[8]首先由丝瓜籽中提取出丝瓜蛋白 (luffin). M. Kamenosono 等^[9]在 1988 年进一步分离出分子量很接近的 α -luffin 和 β -luffin 两种蛋白, 这两种蛋白的氨基酸序列在 1990 年和 1991 年已被 M. R. Islam 等^[10,11]测定. 1991 年杨显荣等人^[12]也分离出 α -luffin. 序列比较发现 α -luffin 与 TCS 和 α -MMC 分别有 58% 和 65% 是相同的, 且 TCS 不含糖基, α -MMC 含一个糖基结合位点, α -luffin 含 6 个糖基结合位点, β -luffin 含 3 个糖基结合位点. 对于无细胞体系, α -luffin 是目前发现的单链 RIP 中蛋白质合成抑制活性最高的. 为了测定丝瓜蛋白的三维晶体结构, 进而探索 RIP 结构与功能的关系, 我们在比较前人分离纯化 RIP 工作^[8,9,12~17]的基础上, 改进了方法, 分离纯化了丝瓜蛋白 α 、 β .

1 材料和方法

1.1 原料 前一年结的广西丝瓜籽, 平均每粒

重 88 mg.

1.2 试剂 S Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-75 皆为 Pharmacia LKB 产品; ATP、放线菌酮为 Fluka 产品; 盐酸苯胍为上海试剂三厂产品; 氯化血红素为 Sigma 产品; 磷酸肌酸为华美生物技术公司产品; 磷酸肌酸激酶为 BHD 产品; Bis-Tris 为上海新华化工厂进口分装; LD- [4, 5-³H] 亮氨酸为中科院上海原子能研究所产品; 各种其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.3 方法

1.3.1 纯化: 用 S Sepharose Fast Flow 和 Sephadex 层析柱在 Pharmacia FPLC 系统上进行.

1.3.2 纯度鉴定及分子量测定: 采用 10%~15% 的梯度胶在 PhastSystem TM 电泳仪上进行. 分子量标准为 Pharmacia 产品 ($M_r = 17\ 000 \sim 64\ 000$).

1.3.3 等电点测定: 在 PhastSystem TM 电泳仪上进行. 采用 pH8~10.5 IEF 胶, 以 Pharmacia 公司等电点标准来判断各组分等电点.

1.3.4 无细胞系统测蛋白合成抑制活性

a. 兔网织红细胞系统的制备: 主要根据 Godchaux 等^[18]的方法, 稍加改动. 取成年白色雌兔一只, 8 d 连续注射 1.2% 盐酸苯胍-0.9% NaCl 溶液, 每天注射量分别为 1.6 ml、1.6 ml、0.8 ml、1.0 ml、1.2 ml、1.4 ml、1.6 ml 和 1.6 ml. 第 10 天抽心脏血. 兔血收集于 2% 肝素溶液中. 以生理盐水洗涤红细胞并离心 (4000 r/min, 10 min, 4℃, 日本 Tomy 离心机) 反复 5 次. 取所得红细胞聚集物与等体积冷双蒸水混合裂解, 用上述离心机离心 (4℃, 11 700 r/min, 15 min), 上清液 (红细胞的溶胞产物) 即为兔网织红细胞系统, 分装后于 -70℃ 或液氮中保存.

b. 无细胞蛋白合成系统: 试剂配制主要按照 Woodward 等^[19]的方法进行, 实验步骤参考了王润华等^[20]的方法. 反应混合物 100 μ l, 由添加液和溶胞产物按 1:3 比例混合, 再加毒素蛋白而成. 添加液中含有多种氨基酸、磷酸

肌酸、磷酸肌酸激酶供能系统、氯化血红素、LD- $[4, 5-^3\text{H}]$ 亮氨酸等, 阳性对照中加入 10 μl 无菌水, 阴性对照中加入 10 μl 50 mmol/L 放线菌酮溶液. 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h 后取 20 μl , 滴于一个 49 号滤纸片上, 纸片在冷的 10% 三氯乙酸中浸泡 10 min, 再用热的 10% 三氯乙酸处理两次, 每次各 10 min, 用 200 ml 漂白液 (10% 三氯乙酸: 88% 甲酸: 30% 过氧化氢=2:1:1) 漂白 3 h, 漂白后的滤纸片用无水乙醇清洗两次, 乙醇+乙醚 (1:1) 洗一次, 乙酸洗一次, 然后置于 2, 5-二苯基恶唑 1, 4-双-2- (5-苯基恶唑) 苯-二甲苯闪烁液中, 在液闪计数器上计数 ^3H -Leu 参入的 cpm 值. 最后按照下列公式计算单链核糖体失活蛋白的抑制百分率.

抑制百分率 = (样品值 - 阴性对照值) / (阳性对照值 - 阴性对照值)

2 结果和讨论

选取纯黑颗粒饱满的丝瓜籽, 洗净后, 用 10 倍体积的浸泡液 [0.1% 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP), 20 mmol/L 巯基乙醇; 0.1 mmol/L EDTA] 浸泡 2 h, 用打碎机打碎三遍, 四层纱布过滤, 用 2 mol/L 盐酸调 pH 至 4.0, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中搅拌抽提 2 h, 用超速离心机 (Beckman L7-35 在 3 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 20 min, 调 pH 至 7.0, 重复离心一次后, 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和, 置冰箱中过夜. 3 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 r/min 离心 30 min 得白色微黄沉淀, 用尽量少的 5 mmol/L Bis-Tris 缓冲液 (pH 7.2, 含 20 mmol/L 巯基乙醇, 0.1 mmol/L EDTA) 溶解后除去不溶物, 在 Sephadex G-25 柱 (3.65 cm $\times$ 50 cm) 上脱盐, 用同样缓冲液洗脱.

脱盐后的蛋白溶液上 S Sepharose Fast Flow 离子交换柱 (0.8 cm $\times$ 8 cm), 用 0~0.3 mol/L NaCl, 5 mmol/L Bis-Tris 缓冲液 (pH 7.2, 含 20 mmol/L 巯基乙醇, 0.1 mmol/L EDTA) 洗脱, 流速为 4 ml/min, 其层析结果见图 1, 其收集峰分别用无细胞系统测活, 发现

图 1 中的组分 C_3 和 C_5 有明显地抑制蛋白质合

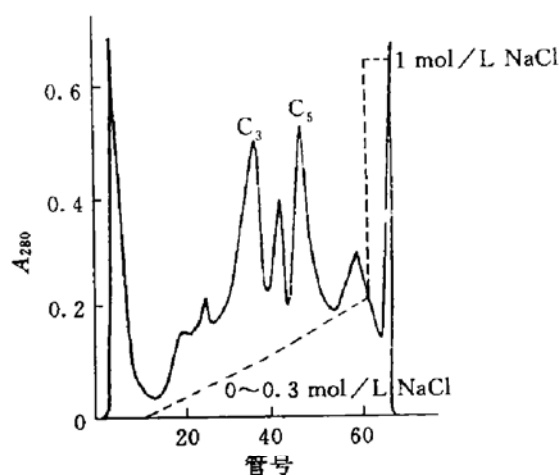


图 1 丝瓜籽粗提液在 S Sepharose Fast Flow 离子交换柱上的层析结果

柱: 0.8 cm $\times$ 8 cm; 流速: 4 ml/min; 4 ml/管.

----: NaCl 洗脱曲线.

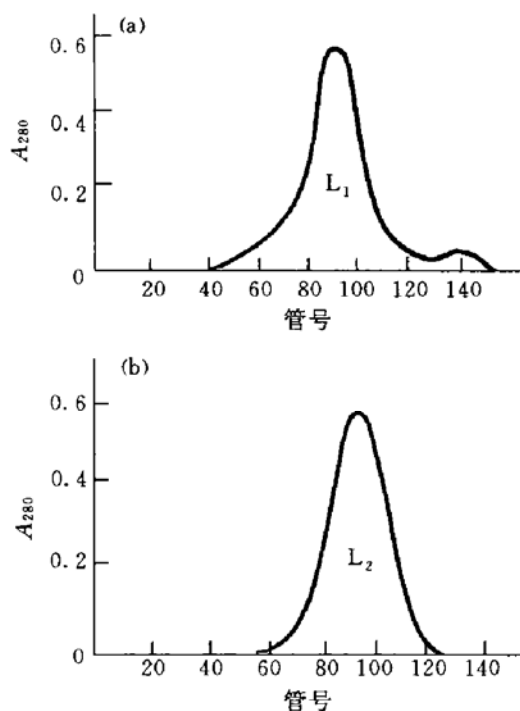


图 2 组分 C_3 和 C_5 在 Sephadex G-75 凝胶过滤柱上的层析曲线

(a): 组分 C_3 ; (b): 组分 C_5 . 柱: 2.5 cm $\times$ 100 cm; 流速: 18 ml/h; 3 ml/管.

成的活性, 把有活性的两个峰分别用 Sephadex G-75 层析柱 (2.5 cm $\times$ 100 cm, 流速为 18 ml/h) 纯化, 洗脱液为 5 mmol/L Bis Tris (pH 7.2) 缓冲液, 其柱层析曲线如图 2. 纯化

后的 L_1 和 L_2 , 再用 Sephadex G-25 脱盐. 冷冻干燥后, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 分子量分别为 28 000 和 29 000 左右, 见图 3. 经等电聚焦测定, 其等电点均为 10.0. 可确认纯化后的 L_1 和 L_2 分别为丝瓜蛋白 α 、 β . 丝瓜蛋白 α 、 β 的 ID_{50} 分别为 10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$, 得率分别为 0.02% 和 0.01%, 和文献 [9] 的结果类似. 另外我们还发现丝瓜蛋白 β 对温度较为敏感, 低于 10℃ 进行提取、分离和纯化更有利.

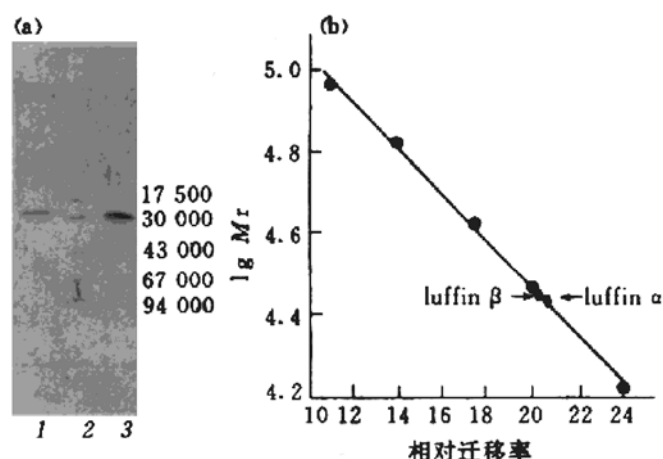


图 3 丝瓜蛋白的电泳图谱和用 SDS-PAGE 估计相对分子量

(a): 电泳图谱; (b): 估计相对分子量. 1: 丝瓜蛋白 α ; 2: 标准蛋白; 3: 丝瓜蛋白 β . ●—●: 标准蛋白.

我们在比较前人分离纯化核糖体失活蛋白工作的基础上, 改进了方法, 并试用了 S Sepharose Fast Flow 做离子交换剂进行分离, 取得了满意的效果. 我们的纯化方法与上述文献的方法相比较, 分离效果好, 而且快速, 更适合大量制备.

本实验中抽提过程在 4℃ 下进行, 这样有利于抑制蛋白水解酶的活性. 由于丝瓜籽蛋白 α 、 β 都是强碱性蛋白, 等电点都在 10 左右, 所以实验中我们采用在 pH4.0 时抽提有利于核酸及一些酸性蛋白的沉淀而不影响丝瓜蛋白本身. 另外, 我们在整个纯化过程中采用的是 Bis-Tris 缓冲液而不是通常所用的磷酸缓冲液. 植物种子中一般都含有酚类和单宁类物质. 酚氧

化酶在氧气存在的情况下可以氧化酚类为醌类物质, 后者可以和蛋白发生不可逆的反应而形成棕色色素, 如果不加注意, 抽提液会成棕红色而严重影响以后的分离. 一般采用加入还原性物质如抗坏血酸或巯基乙醇的方法来抑制酚氧化酶的活性. 本实验抽提液中加入了 20 mmol/L 巯基乙醇. 单宁类物质也易于和蛋白质形成复合物而影响纯化, 用聚乙烯吡咯烷酮来吸附单宁类物质. 另外一个问题是植物种子中含有较多的油脂类物质, 往往需要抽提后用石油醚等来脱脂. 本实验中发现实验用的丝瓜种子中脂类物质含量不高, 对纯化影响不大, 少量脂类物质可以在抽提后的离心中轻易地用滤纸条刮去, 所以未进行脱脂处理.

参 考 文 献

- 1 Stirpe F, Legg R F, Onyon L J *et al.* Biochem J, 1980; **190**: 843
- 2 Endo Y, Woll L G. J Biol Chem, 1982; **257**: 9054
- 3 Endo Y, Tsurugi K. J Biol Chem, 1987; **262**: 8128
- 4 Gluck A, Endo Y, Wool G. J Mol Biol, 1992; **226**: 411
- 5 Zhang J-S, Liu W-Y. Nucleic Acids Research, 1992; **20**: 1271
- 6 汪 猷. 天花粉蛋白. 北京: 科学出版社, 1990: 1~197
- 7 McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 2844
- 8 Kishida K, Maush Y, Hara J. FEBS Lett, 1983; **153**: 209
- 9 kamenosono M, Nishida H, Funatsu G. Agric Biol Chem, 1988; **52** (5): 1223
- 10 Islam M R, Nishida H, Funatsu G. Agric Biol Chem, 1990; **54** (11): 2967
- 11 Islam M R, Hirayama H, Funatsu G. Agric Biol Chem, 1991; **55** (1): 229
- 12 Yeung H W, Li W W, NG T B. Int J Peptide Protein Res, 1991; **38**: 15
- 13 Barbieri L. Biochem J, 1980; **186**: 443
- 14 Stripe F, Olsnes S, Phil A. J Biol Chem, 1980; **255**: 6947
- 15 Stripe F, Barbieri L, Batteli M G *et al.* Biochem J, 1986; **240**: 659
- 16 Yueng H W, Wong D M, NG T B *et al.* Int J Peptide Protein Res, 1986; **27**: 325
- 17 Yueng H W, Wong D M, NG T B *et al.* Int J Peptide Pro-

tein Res, 1987; 30: 135

18 Godchaux W, Adamson S D, Herbert E. J Mol Biol, 1967; 27: 57

19 Moldave K, Grossman L. Methods in enzymology. 1974; X X X part F (67a): 724

20 王润华, 郑 硕, 陈 兴等. 生物化学杂志, 1992; 8(4): 395

Isolation and Purification of α - and β -Luffins, Ribosome Inactivating Protein from Seeds of *Luffa cylindrica*. Wu Shen, Zhu Yuerong, Guo Feng, Liu Duohua (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract α - and β -luffins were easily and quickly isolated and purified from seeds of

Luffa cylindrica by using an improved procedure that involved ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on S Sepharose Fast Flow and gel filtration on Sephadex G-75. α - and β -luffins were basic proteins with isoelectric points of about 10, with molecular weight of 28 000 and 29 000, respectively, as judged by SDS-PAGE. Inhibitory activities of α -luffin and β -luffin on cell-free protein synthesis were stronger than that of any known type-1 RIPs, with ID_{50} 10 μ g/L and 50 μ g/L, respectively.

Key words ribosome inactivating protein, luffin, purification of protein, column chromatography

离子交换柱层析法纯化重组人 IL-4*

王 宏 王锦娟 李 燕 刘 洁 陈慰峰

(北京医科大学免疫学教研室, 北京 100083)

摘要 用离子交换层析法一步纯化重组人白细胞介素 4, 该方法简单易行, 对样品不产生稀释作用; 所得产品具有高纯度 ($\geq 95\%$), 高生物学活性 (≥ 10 MU/mg) 和低毒性 (内毒素含量 ≤ 0.5 ZU/L) 的特点, 可满足实验室工作的需要. 当与凝胶过滤法结合使用时, 所得产品纯度可达 98%, 生物学活性进一步提高.

关键词 重组人白细胞介素 4, 纯化, 离子交换

人白细胞介素 4 (hIL-4) 是一种对人的 T 细胞和 B 细胞均有生长刺激作用的多功能因子, 其在免疫调节及抗炎症中的作用日益受到重视. 而研究这类作用的前提条件之一就是要通过基因工程的方法生产出具有高纯度, 高生物学活性, 低毒性的重组 hIL-4 的产品, 以满足科研工作以及临床试用的需要. 自 1986 年 Yokota 等^[1]首次利用小鼠 IL-4 cDNA 片段作为探针克隆出人 IL-4 cDNA 以来, 国际上许多学者对重组人白细胞介素 4 (rhIL-4) 的制备及纯化进行了研究^[2~5], 大多数为分子筛层析.

我室也开展了这方面的工作^[6]. 在保证产品的高纯度, 高活性和低毒性的前提下, 如何做到制备纯化流程相对简单易于开展, 目前的研究结果还不甚理想. 为此, 我们在本实验室对制备方法改进的基础上, 分别探讨了利用两种阳离子交换柱纯化 rhIL-4 的途径以及在此基础上结合其它方法进一步纯化的效果, 以期获得更好的制备纯化方法.

* 国家“863”计划资助项目.

收稿日期: 1994-11-19, 修回日期: 1995-05-22