

蛋白酶水解免疫球蛋白 G

韩澄源

三十年前就已开始用蛋白酶消化免疫的马血浆,以获得精制高效的破伤风和白喉抗毒素。这一方法目前仍是制备各种精制抗毒素的良好手段。近二十年来由于蛋白质分离技术的进展,对进一步了解免疫球蛋白的结构、功能和遗传性提供了有利的条件。

Porter (1959) 首先用木瓜酶水解家兔抗体免疫球蛋白 G IgG 得到两种碎片, 一为 Fab (F 代表碎片, ab 代表能与抗原相结合的抗体部分), 另一为 Fc (c 表示可结晶之意) 碎片。最近的研究说明家兔和人的 IgG 几乎可被所有的蛋白水解酶所分解^[1], 所试过的蛋白水解酶如木瓜酶、胃酶、胰酶、胰凝乳蛋白酶及组织蛋白酶等对 IgG 的分解基本上是相似的。IgG 主要分解为两部分, 一为具有能结合抗原的 Fab 或胃酶分解时有二个抗原结合位点的 F(ab')₂; 另一成份是不能与抗原结合, 但具有与 G 球蛋白分子抗原特异性决定基的 Fc 段, 胃酶水解时为 Fc' 或 pFc 碎片。用抗体碎片致敏红血球, 在反向间接血凝试验中有良好结果^[5,6]。

一、IgG 的基本结构

免疫球蛋白 G 占球蛋白总量的 70—90%, 是血清抗体的主要成份, IgG 的分子量约 150,000, 沉降常数为 7S。每个 IgG 分子由四条多肽链借四个二硫键联结而成(如图 1), 两条长的多肽链叫重链(H链), 两条短的叫轻链(L链), 两条相同的重链之间通过二硫键和非共价键联结起来, 形成“Y”字形; 两条相同的轻链通过二硫键联结在“Y”字形的两侧; 由此可见免疫球蛋白的分子结构是对称的。每条重链或轻链又分为两部分, 在多肽链 N 端(氨基) $\frac{1}{2}$ 的轻

链和 N 端 $\frac{1}{2}$ 的重链部分, 氨基酸的排列顺序可随免疫球蛋白种类的不同而有所变化, 这部分叫作可变区(V区), 是抗体的活性部分, 也就是与特异性抗原结合的部位。N 端的可变性, 可用来解释免疫球蛋白电泳的多样性和抗体的特异性。四条肽链的其余部分叫作稳定区(C区), 这区的氨基酸排列顺序比较稳定。IgG 重链的分子量为 53,000, 与其他四类免疫球蛋白(IgM、IgA、IgD 和 IgE) 不同, 具有 IgG 分类的特异性。根据 IgG 重链抗原性的差别, IgG 可分为 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄ 四个亚类, 分别以 r₁、r₂、r₃ 和 r₄ 代表各亚类重链的特异性。IgG 轻链的分子量为 22,000, 根据抗原性的差别, 可分为 κ 及 λ 链, IgG 的轻链与其他四类免疫球蛋白的轻链相同^[4]。

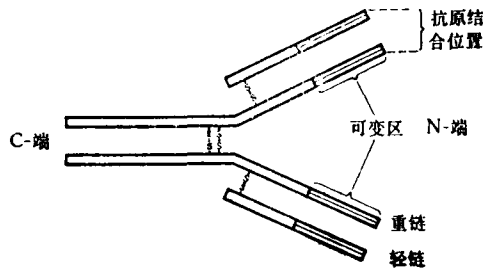


图 1 IgG 结构示意图

二、消化方法及消化产物的分离

许多蛋白分解酶均可使 IgG 分解, 以木瓜酶、胰酶和胃酶为常用, 本文仅就木瓜酶、胃酶消化 IgG 和消化后碎片的分离方法及其性质介绍如下:

1. 木瓜酶消化家兔 IgG

(1) 方法 将 IgG 溶解在含有 0.01M 半胱氨酸及 0.002M EDTA 的 pH 7.0 0.1M 磷酸钠缓冲液中,浓度为 15 毫克/毫升,按 100 毫克蛋白质加 1 毫克酶的比例加入木瓜酶,在 37°C 下消化 16 小时,将消化产物装在透析袋中,在搅拌下用蒸馏水透析 48 小时,以去除半胱氨酸和 EDTA,促进氧化作用和终止酶的作用。再用 pH 5.5, 0.1M 醋酸钠缓冲液透析平衡过夜,然后上 CM-纤维素层析柱。

(2) 层析分离 将 150 毫克 IgG 的消化产物上 CM-纤维素层析柱(2.4 × 20 厘米),收集 200 毫升洗脱液后就用梯度洗脱 (pH 5.5 0.1—0.9M 醋酸钠缓冲液),木瓜酶消化的家兔 IgG 产物通过 CM-纤维素层析柱可得三个洗峰(如图 2), I、II 峰含有 Fab 碎片,分子量为 50,000—55,000, Fc 在 III 峰中,分子量为 80,000, 两个 Fab 是相同的。

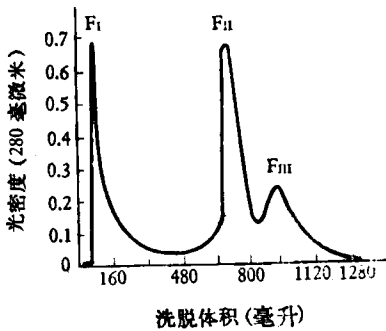


图 2 木瓜酶消化家兔 IgG 的产物通过 CM-纤维素层析柱的洗脱峰

2. 胃酶消化 IgG

(1) 消化方法 ① 用 pH 4.5, 0.1M 醋酸钠将 IgG 溶解,浓度为 1—3%。② 用相同的缓冲液溶解胃酶,并加于 IgG 溶液中,其比例为 1:100 (即 1 毫克酶加于 100 毫克蛋白中)。③ 于 37°C 消化 20—24 小时。④ 终止消化,加固体 Tris,调 pH 为 8.0。

(2) 用凝胶过滤法分离消化的 IgG 碎片 将胃酶消化的 IgG 产物调为中性,然后上葡聚糖凝胶 G-150 层析柱,用中性缓冲液洗脱,洗脱峰有三个(如图 3),上柱量为 人 IgG 3% 10 毫升,柱床大小 3.2 × 92.4 厘米,洗脱液 0.1M

Tris; 0.2M NaCl; 2mM EDTA Na 缓冲液 pH 7.7, 流速 17.5 毫升/小时。第一峰含有 $F(ab')_2$ 碎片,是一个较大的成份,该峰中常含有微量 IgG 和 Fab' 碎片,如果再用葡聚糖凝胶 G-200 过滤一次,则可获得较高纯度的 $F(ab')_2$ 制品。另一个小的碎片类似 Fc 叫 pFc' ,洗脱在第二峰中。第三峰为小分子的多肽成份。

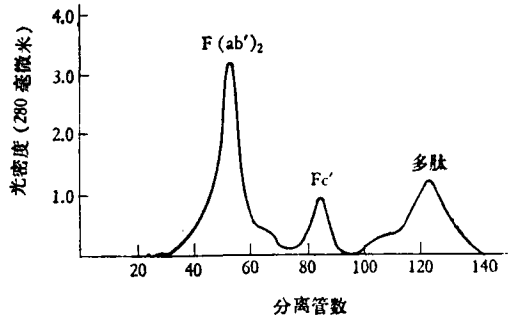


图 3 胃酶消化人的 IgG 产物通过葡聚糖凝胶 G-150 的洗脱峰

(3) 用硫酸盐沉淀 IgG 消化产物 将胃酶消化 IgG 的产物调为 pH 8.0, 然后离心除去在消化过程中产生的少量沉淀。取上清液在室温下滴加 25 克/100 毫升的 Na_2SO_4 溶液,边加边搅拌,使 Na_2SO_4 的最后浓度为 18 克/100 毫升,此时可见浓厚的沉淀。静置 30 分钟,离心去上清,将沉淀的蛋白质装在透析袋内,用蒸馏水透析,以除去 Na^+ 和 SO_4^{2-} 离子。2 克的 IgG 消化后可提取 870 毫克的 $F(ab')_2$ 抗体碎片,所提取的 $F(ab')_2$ 用超速离心检查为一个峰, $S_{20} = 4.8$ 。亦可用硫酸铵提出 IgG 消化产物。方法是将消化产物用 1N NaOH 或固体 Tris 调为 pH 8.0, 然后用 33% 饱和硫酸铵提取三次。沉淀物为 $F(ab')_2$ 碎片。

三、pH、温度和酶量对胃酶消化 IgG 的影响

IgG 被蛋白酶分解时需要合适的条件,以达到既能消化完全而又使抗体球蛋白不失去活性的目的,不同的蛋白酶消化 IgG 时需要不同的条件,仅就胃酶消化 IgG 的条件分述如下:

1. pH 对胃酶消化家兔 IgG 的影响

Nisonoff 等(1960)观察了在 pH 4、5 及 6 三种条件下胃酶消化家兔抗卵白蛋白 IgG 的作用是不同的,在 pH 4 和 5 消化时,大部分球蛋白的沉降常数从 6.4 降到 5.5 或 4.9S,消化作用在 pH 4 时最强。在 pH 6 胃酶对 IgG 的分解作用很弱, IgG 的分子基本上是完整的,在消化时加入 0.01M 半胱氨酸,则在 pH 4 和 5 胃酶分解抗体碎片的沉降常数为 3.4—3.5S,这种碎片不再有沉淀抗原的能力,但仍有抑制抗原抗体反应的作用,与木瓜酶消化的碎片相似。

2. 胃酶量的影响

在有 0.1M 半胱氨酸的条件下,胃酶为 IgG 量的 0.3%、1% 及 3% 时,分解的产物是相似的,沉降常数均为 3.5S,这说明当胃酶量增大 10 倍时,对 Fab 碎片没有损坏作用。

3. 温度的作用

家兔 IgG 抗体用胃酶及 0.01M 半胱氨酸在 37℃、25℃ 及 5℃ 的条件下进行消化。如表 1 所示。在 37℃ 消化 7 小时, IgG 已大部被分解;在 25℃ 消化 24 小时, 75% 的 IgG 被分解;在 5℃ 消化 48 小时,没有明显的分解作用。

表 1 在不同温度下用胃酶和半胱氨酸消化家兔 IgG 的作用

反应温度(°C)	反应时间(小时)	收获的蛋白(%)	沉降常数(S ₂₀)
37	3	91	3.2 (70%)
			6.2 (30%)
37	7	89	3.4 (92%)
			6.5 (8%)
25	24	91	3.6 (75%)
			6.4 (25%)
5	48	95	6.4 (>90%)

四、消化时间的影响

将 IgG 用木瓜酶和胃酶消化,隔一定时间取消化产物通过葡聚糖凝胶 G-150 层析柱,观察洗脱峰的变化并用免疫扩散进行鉴定。

1. 木瓜酶消化 IgG

用木瓜酶消化人的 IgG 仅 10 分钟,多数的 IgG 分子已分解成 Fc 和 Fab 两个主要碎片(见图 4),在一小时之前产生的 Fc 和 Fab 量最多,此后这两种碎片的量逐渐下降,因为随着消化

时间的延长, Fc 碎片可释放出 Fc' 碎片来,在消化 4 小时时 Fc' 出现在免疫电泳上,像 Fc 的延长弧。

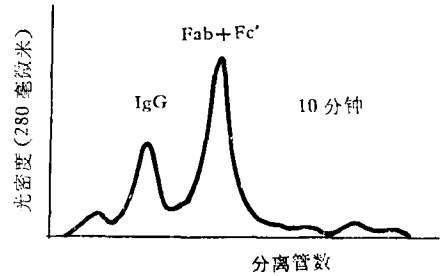


图 4 木瓜酶消化 IgG 10 分钟的葡聚糖凝胶 G-150 层析图

2. 胃酶消化人的 IgG

胃酶消化 IgG 比木瓜酶慢得多(见图 5),两小时后 IgG 分子还是完整的;6 小时后 5S 的 F(ab')₂ 才开始出现,10 小时完整的 IgG 和 F(ab')₂ 的量基本上是相同的。在 24 小时时 F(ab')₂ 碎片为洗脱峰的主要成分,随着消化的进行 pFc' 的相对比例逐渐增加,至 24 小时维持稳定,消化 144 小时完整的 IgG 和 pFc' 碎片的峰消失了,在 F(ab')₂ 碎片后出现一个峰,称为类 Fab' 碎片。

五、骨髓瘤病人 IgG 亚类对胃酶消化的差异

根据 IgG 重链抗原性的差异, IgG 可分为 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 及 IgG₄ 四个亚类,正常 IgG 是由约 70% IgG₁、18% IgG₂、8% IgG₃ 和 3% IgG₄ 分子所组成,可见对 IgG 分子的研究主要是 IgG₁ 分子,Turner 等(1970)详细地研究了胃酶对分解骨髓瘤病人 IgG 亚类的作用。他们的资料说明 IgG₁ 被胃酶分解的情况与 IgG 很相似,因为 IgG 的组成中 IgG₁ 占大部分, IgG₁ 在四个亚类中对胃酶分解的抵抗力最强,消化 24 小时还有完整的 IgG₁ 分子。IgG₂ 是第二个对胃酶有抵抗力的亚类,消化 10 小时还有完整的 IgG₂ 分子。这个亚类的特征是 F(ab')₂ 碎片可被进一步分解。IgG₃ 亚类对胃酶的分解作用最为敏感,消化二小时就查不出完整的 IgG₃ 分子

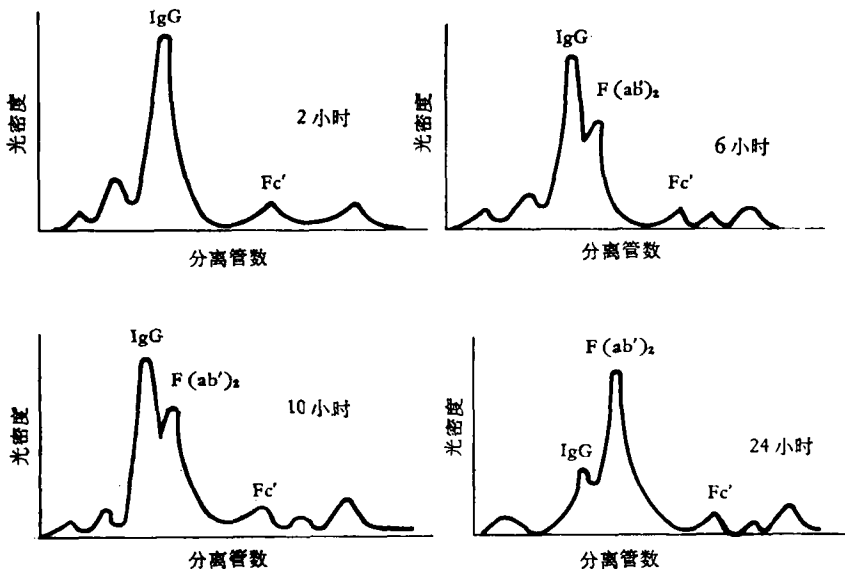


图5 胃酶消化人的IgG时不同时间的消化产物葡聚糖凝胶G-150层析图

了。IgG₄对胃酶的分解作用也是相当敏感的，消化6小时完整的IgG₄分子就很少了。总之骨髓瘤病人的IgG亚类对胃酶分解的敏感性可分为两大类：IgG₁和IgG₂是对胃酶有相当抵抗力的蛋白质，而IgG₃和IgG₄则对胃酶很敏感。

六、酶解IgG碎片的性质

被木瓜酶消化后的IgG产物通过cM-纤维素层析柱，其洗脱液可显出三个峰(如图2)，称为F_{I,II}及F_{III}，这三部分从分子大小来看相差不大(表2)其中两个碎片(F_{I,II})在化学和生物性质方面是相同的，为“抗原结合碎片”，称作Fab。第三个碎片是“结晶碎片”称为Fc，它和前两个碎片的性质不同。木瓜酶从IgG分子重链间的二硫键的N端一侧切断(如图6)，每一个Fab碎

片，由整条轻链及靠N端的半条重链(Fd)构成。Fab具有抗体活性，能和抗原结合，但不能与抗原形成肉眼可见的沉淀。因为每一个Fab碎片只有一个抗原结合点，即它结合抗原的能力是单价的，而原来的抗体分子有两个Fab碎片，也就有两个抗原结合点，亦即是双价的。Fc是C端半条重链的一个双体，无抗体活性，不能与抗原结合。每一种免疫球蛋白都有其特异的抗原性，而这种抗原性就存在于Fc片上。木瓜酶分解家兔IgG的碎片物理性质列于表2。

表2 木瓜酶分解IgG碎片的物理性质

球蛋白*种类	分子量+SD	沉降常数 S ₂₀
全丙种球蛋白	187,600 ± 1,400	6.50
F _I	49,600 ± 1,800	3.59
F _{II}	52,600 ± 2,600	3.55
F _{III}	80,200 ± 9,100	3.40

* 球蛋白来源为家兔丙种球蛋白

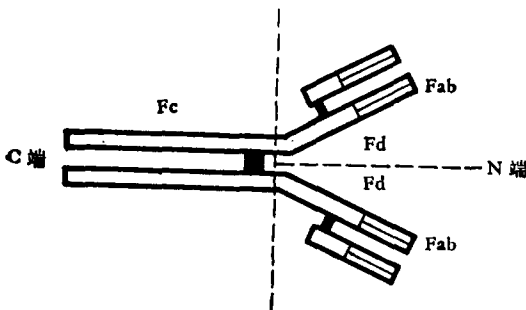


图6 木瓜酶分解IgG示意图

三种成份的比例是1:0.8:0.9。经层析后可获得全量的85—90%。三个碎片分子量的总和近于正常的IgG。F_I、F_{II}及F_{III}三个碎片的相对大小是1:1.05:1.6。

用胃酶消化IgG时，IgG分子被切断成大小不等的两个碎片。小的碎片类似Fc，称为pFc'，大的碎片(5S)是个双体，称为F(ab')₂，如

果 IgG 用胃酶消化后再经巯基化合物（如巯基乙醇等）处理使二硫键还原，就可以产生两个 3.5S 碎片 (Fab')。F(ab')₂ 能和两个抗原分子结合，而 3.5S 碎片只能和一个抗原分子相结合。胃酶分解 IgG 的作用点在联结两条重链的二硫键靠 C 端处（如图 7），所以这个二硫键保留在 5S 碎片上，把两个 Fab 联结起来成为 F(ab')₂，因而 F(ab')₂ 碎片保留着两个抗原结合点。

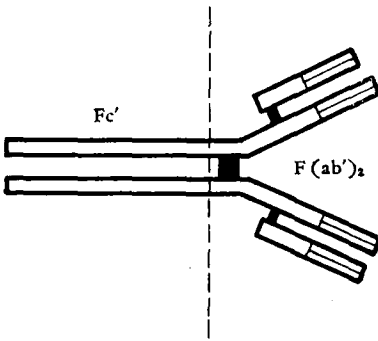


图 7 胃酶分解 IgG 示意图

结 语

人和家兔的 IgG 可被多种蛋白水解酶所分

解，不同蛋白水解酶对 IgG 的分解基本上是相似的。将 IgG 主要分解为两部分，一为具有结合抗原能力的 Fab 或 F(ab')₂ 部分，另一部分能形成结晶。木瓜酶消化 IgG 获得的每一 Fab 碎片只有一个抗原结合点，故不能与抗原形成肉眼可见的沉淀。经胃酶消化 IgG 获得的 F(ab')₂ 碎片，能和两个抗原分子结合，与抗原结合后能形成肉眼可见的沉淀。木瓜酶对人 IgG 的消化很快，仅 10 分钟 IgG 分子就开始分解成 Fc 和 Fab 两个主要碎片，而胃酶对 IgG 的消化比木瓜酶慢得多，经六小时，5S 的 F(ab')₂ 碎片才开始出现。

参 考 资 料

- [1] Victor Ghetie et al.: *Immunochemistry*, 10: 251, 1973.
- [2] 北京生物制品研究所肿瘤免疫组: 《医学研究通讯》, 1975 年(二)。
- [3] 上海生物制品研究所疫苗室肿瘤组: 《生物制品资料选编》, 1975 年。
- [4] 上海第二医学院疾病学基础教研组: 《医学情况交流》(副刊), 《免疫学基本原理》, 1975 年。

[本文于 1976 年 9 月收到]

科 技 消 息

从小白鼠血液制备染色体的快速方法

每只小白鼠注射 (I.P) 0.1 毫升秋水仙素 (0.6 毫升/毫升)，四小时后杀死。从心脏取血，用肝素抗凝。取 10 滴左右血液置于一刻度离心管中，管内预先装好 3—5 毫升 0.7% 柠檬酸钠，放在 37℃ 下温浴，摇匀后加一滴稳定的玻璃酸酶 (150 N. F. 单位/毫升)。在 37℃ 下温浴 20 分钟。用温浴的最后五分钟配制 3:1 甲醇-醋酸固定液。温浴完毕时加 2 滴固定剂并温和地摇匀。600 转离心机离心 5 分钟弃去上清液 (留 1 毫升左右) 再加 3 毫升固定剂，加塞后放置冰箱 30 分钟。在 600 转离心机离心 5 分钟弃去上清液 (留 1 毫升)，再加预冷固定液 3 毫升，用吸管来回搅匀。离心弃去上清液。再加 2 毫升冷固定剂，并在冰箱中过夜。第二天离心后弃去上清液，用甲醇洗，吸去甲醇，取一

滴沉淀物放载玻片上。空气干燥后，进行染色 (4—10 分钟) 效果极好。

细 菌 电 极

美国最近研制成功一种分析精氨酸浓度的细菌电极，这是继发明酶电极以后又一种适用于分析体液或活组织中某些生化物质的有力工具。鉴于目前尚没有适于分析精氨酸的酶电极，研制者选用了一种可以分解精氨酸以释放氨的细菌，并把这种细菌的活细胞制成糊状。涂在一支对氨灵敏的标准玻璃电极上，外面裹着一层玻璃纸。当这种新电极与含精氨酸的液体接触时，即可以对在细菌作用下释放的氨作出响应。用其它化合物测试时，反应强度不到精氨酸的百分之一，表明这种电极对精氨酸是特异的。这种新电极的特点是制造时无需考虑酶的分离、鉴定和贮存以及如何把酶反应所需的辅因子与酶一起涂在电极头上的问题。因为在活细胞中，酶和辅因子总是处于进行特定反应的最佳条件下。通过选择不同的细菌，可能制成各种不同的细菌电极以测定目前用一般电极或酶电极尚无法测定的其它生物分子。