

凝集素(lectin)研究进展

孙 册

(中国科学院上海生物化学研究所)

发现凝集素已近一百年,但直到本世纪四十年代才开始为人们注意。H. Stillmark 首先发现蓖麻籽提取液具有使红细胞凝聚的作用。最初,因为在植物中发现它,又具有凝聚红细胞的活力,遂称之为植物血凝素。以后发现不仅植物(包括细菌)中存在,无脊椎动物如蜗牛、龙虾、蠕、海星等和某些脊椎动物如电鳗等体内也有这类物质,因此又有血凝素之称。继后又发现这类物质除凝集红细胞外,还能凝聚其它细胞,如淋巴细胞、成纤维细胞、精子、细菌等,人们又称它为植物凝集素或凝集素。以后又注意到这类物质的血凝作用具有选择性,不同种的这类物质凝聚不同动物的红细胞,有些还能区别人的血型。根据这些性质, W. C. Boyd 在五十年代提出了 lectin 这一称谓^{*}。近年的研究发现禽类如鸡心细胞、哺乳动物如兔肝细胞、小鼠胸腺和脾细胞、牛脾细胞,乃至人肝细胞均含有凝集素,它们在机体的某些重要的生物学反应中起作用,如哺乳动物肝细胞中的凝集素具有清除血液中某些糖蛋白的功能。

对凝集素这一类蛋白质的研究,早年集中在植物,特别是豆科植物的种子,以后逐渐发现其它植物和植物的其它部位都有,如延命菊叶子、葫芦科的黄瓜、甜瓜、南瓜的韧皮部、马铃薯的块根、蕃茄汁等。已探查的三千余种植物中近千种含有凝集素,其中豆科植物含量最为丰富,如大豆和刀豆的蛋白质中凝集素占 1.5—3%。到目前为止,已纯化并鉴定了性质的已有六、七十种。软体动物和爬虫类中发现的凝集素也已有数十种。对哺乳动物细胞中凝集素的研究,近年来发展较快。

由于一种植物或一种低等动物通常只含有

一类凝集素,因此各种凝集素的称谓主要参照其来源的植物或动物的名称,如麦胚凝集素(简称 WGA),大豆凝集素(简称 SBA),蜗牛凝集素(简称 HP)。

一、分离纯化

第一个被纯化的凝集素是伴刀豆凝集素(简称 ConA)。它于 1919 年由 Sumner 结晶^[1]。以前纯化凝集素采用传统的提纯蛋白质的方法,自从有了亲和层析技术,已广泛采用这一技术。这种分离纯化技术基本上分为两类,一类是凝集素直接吸附于与其互补的糖的聚合体,如 ConA,扁豆凝集素(简称 LCA)、豌豆凝集素(简称 PSL)都可用直接吸附于 Sephadex 的方法纯化,蓖麻凝集素(简称 RcAI),相思豆素均可通过 Sepharose 柱得到纯化。另一类方法是用固定化的受体纯化凝集素,常用的受体有甲状腺球蛋白、卵粘蛋白、颌下腺粘蛋白等。交联的葡萄糖、琼脂糖珠、纤维素或淀粉等均可用作固定受体的载体。固定受体的方法可将受体与 CNBr 活化的琼脂糖珠偶联,也可将受体与载体共聚。

自采用亲和层析技术后,虽能用比较简便的方法纯化凝集素,但由于其本身的某些性质,包括若干凝集素有同工凝集素(isolectin)存在,它们具有相同的生物活性,仅在化学组成或结构上有细微差别。再则,许多凝集素由不同数

^{*} lectin 从拉丁文 legere 来,意为选择,译为外源凝集素。另有 agglutinin 一词,译为凝集素。外文文献中 Lectin 和 agglutinin 二字通用,无多大区别。根据近年研究的进展, Lectin 广泛存在于生物体,可能是细胞的组成成份。因此,译为外源凝集素就欠妥了。作者建议译为异源凝集素或凝集素。本文暂用凝集素。

目的亚基组成,在纯化过程中往往可能产生复杂的聚合——解聚反应,引出同一凝集素的不同聚合体,因此要得到均一的凝集素并非易事。

二、性 质

1. 化学和物理性质 至今已知的纯化的凝集素没有酶活力,它的绝大多数含有共价结合的糖分子。糖的组成主要有甘露糖、葡萄糖、半乳糖,某些凝集素中亦含少量木糖、阿拉伯糖等。但有些凝集素分子中不含糖,如 ConA^[2]、WGA 等^[3]。植物中提取的凝集素的氨基酸成分,含有丰富天冬氨酸、丝氨酸和苏氨酸,而甲硫氨酸和半胱氨酸的含量很低;但也有例外,如 WGA 的半胱氨酸含量特别高,每一克分子含 40 个以上的半胱氨酸分子^[3]。某些凝集素分子中含金属离子如 Mn^{++} 、 Ca^{++} 等,这些凝集素与糖结合的活力和生物活性均有赖于金属离子的存在,如 ConA 每一个亚基有一个 Mn^{++} 和一个 Ca^{++} ^[4]; LCA 含 0.13% 的 Mn 和 0.37% 的 Ca^{++} ^[5]。

许多凝集素由亚基组成,各种凝集素所含的亚基数不同。同一凝集素也可具有不同数目亚基的聚合体的多种形式,如 ConA 其聚合的亚基数随溶液 pH 而异^[6]。各种凝集素的分子量相差很大,可从数万到数十万。

通常一种植物或一种低等动物中只含一种凝集素,但有的也可分离到几种不同的,如荆豆种子中可得到两种凝集素(简称 UEA_I 和 UEA_{II})。UEA_I 与 L-岩藻糖专一地结合,而 UEA_{II} 则与甲壳二糖结合。从欧洲百脉根可分出三种,它们都与 L-岩藻糖结合,但与 L-岩藻糖结合的位点数各不相同,结合常数也不同,并且三种凝集素的化学成分和分子量均不同^[2]。

有些植物中存在同工凝集素,它们与糖结合的专一性、血凝作用和促细胞分裂的作用相同,其他性质也非常相似,但结构不尽相同。如麦胚中有二种或三种同工凝集素,它们均与 D-GlcNAc 专一地结合,它们的分子量和氨基酸组成相似,但用 SE-Sephadex 可将三者分开^[3]。又如大豆、扁豆、蜡豆中均含有同工凝集素。近

年又发现花生等也含有同工凝集素,不同的品种所含的同工凝集素不同。

2. 分子结构 到目前为止,已了解其分子结构的凝集素还不多,仅 ConA、WGA、蓖麻凝集素和相思豆素几种;其中以 ConA 了解得最清楚。

通过 X 线衍射已获得 ConA 的完全结构图象(图 1)。它是由分子量为 25,500 的亚基组成的四聚体。当溶液 pH 为 5.6 以下,解离为二聚体。ConA 的单体(亦称完整亚基)由 237 个氨基酸组成,分子中有大量的 β - 结构,57% 的氨

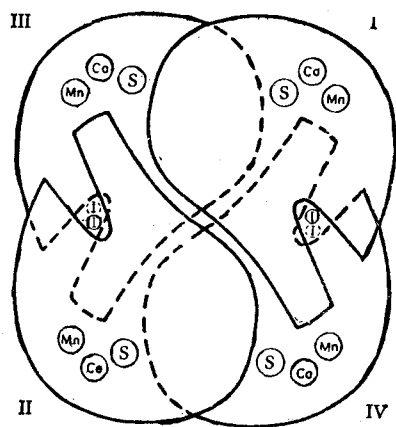


图 1 ConA 结构示意图 (见文献 10)

基酸组成二个反平行褶皱层。“背”褶皱层由 64 个氨基酸组成,“前”褶皱层由 57 个氨基酸组成,它平铺在“背”褶皱层的上面,其长轴与“背”褶皱层的长轴成 45° 角。其余氨基酸呈无规卷曲,没有 α -螺旋结构。每个单体结合一个 Ca^{++} 和一个 Mn^{++} , 并有一个糖结合部位;当两个结合金属离子的位点未填满前,ConA 分子不与糖结合。如果在单体的 118 位和 119 位氨基酸间被解离,得到两个片段(称片段亚基)^[7,8]。用通常方法制备的 ConA 往往是由不同比例的完整亚基(即单体)和片段亚基组成的聚合体,但它们的活性相同。

WGA 分子是由两个相同的原体(protomer)组成的二聚体。原体的分子量为 17500。原体是四个结构相似而相距的结构域的集合体(图 2),每个区域有 41 个氨基酸,区域内的肽链有四个二硫键(图 3)。WGA 分子中没有 α -螺旋

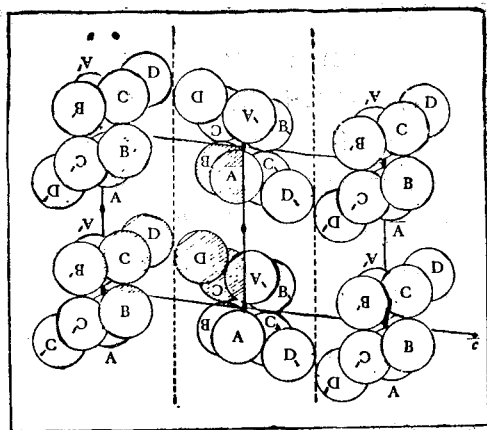


图2 麦胚凝集素结构示意图

WGA 二聚体, 圆圈代表结构域, A、B、C、D 表示二聚体中原体 (protomer) I 的结构域, A'、B'、C'、D' 表示原体, II 的结构域。(见文献 12)

或 β -褶皱。每一原体有两个专一结合 $(\text{Glc-Nac})_2$ 位点^[9]。

蓖麻凝集素 (RCA_I) 和蓖麻素 (ricin RCA_{II}) 的分子量分别为 120,000 和 60,000, 均由 S-S 连接的两条肽链组成(图4), A 链(亦称作用子, effectomer) 比 B 链(亦称连接子, haptomer) 稍短。A 链和 B 链的酶解图谱, RCA_I 和 RCA_{II} 的酶解图谱均相似。 RCA_I 和 RCA_{II} 均不含活性 SH 基。A 链的 N 端和 C 端分别为异亮氨酸和丝氨酸; B 链的 N 端和 C 端分别为丙氨酸和苯丙氨酸。 RCA_I 与 RCA_{II} 均含有以甘露糖和乙酰葡萄糖胺为主要成分的糖链。 RCA_{II} 含有三条寡糖链, 寡糖链与肽的天冬酰胺基相连接。A 链和 B 链分别有 0.3% 和 25% 的氨基酸呈螺旋结构^[10]。

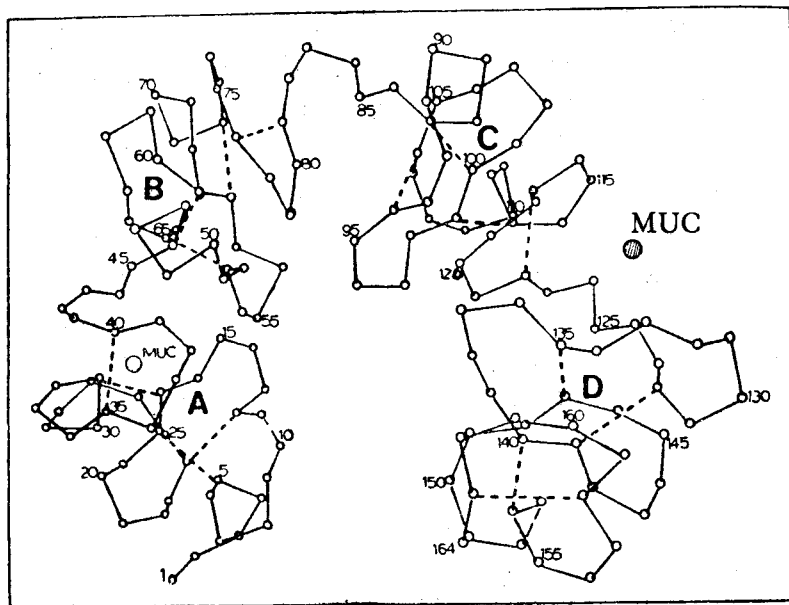


图3 麦胚凝集素结构示意图

WGA 原体分子, A、B、C、D 表示结构域。MUC 表示推断的与糖结合的位置, 虚线表示二硫键。(见文献 12)

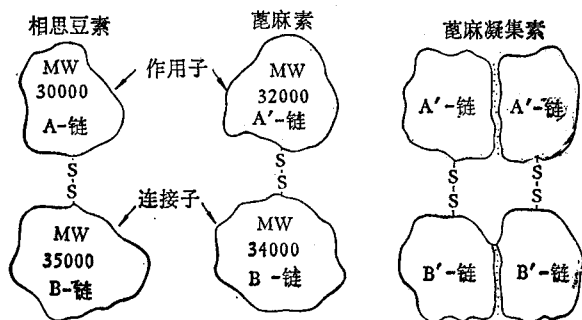


图4 相思豆素、蓖麻素和蓖麻凝集素结构示意图
相思豆素的结构与蓖麻素的相似。(见文献 13)

旋结构^[10]。

3. 糖结合的专一性 凝集素与它识别的糖以非共价结合, 结合力弱且可逆。凝集素与它识别的多糖、糖蛋白或糖脂的结合和酶与底物、抗体与抗原的结合相似。

凝集素与互补的多糖、糖蛋白或糖脂能形成沉淀, 能使细胞凝聚, 均表明它每一个分子必须具有至少两个结合糖的位点, 如 HP 有六个、WGA 有四个、SBA 有两个结合位

点。各凝集素的结合位点的大小各不相同,每一个位点适合一个互补的单糖分子或一个寡糖的几个糖单元的互补分子。如SBA的糖结合位点适合N-乙酰半乳糖胺(GalNAc);花生凝集素(简称PNA)的最适互补糖分子是半乳糖- β (1 $\rightarrow$ 3)N-乙酰半乳糖胺(Gal- β (1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc)这种结构的二糖。

研究凝集素的糖结合专一性的基本方法是“半抗原”抑制。凝集素与糖的结合不仅要求一定的糖,并且在结构上也有一定的要求。如ConA的结合位点需六原子环中C-3、C-4和C-6羟基未被取代的 α -D-甘露吡喃糖苷或 α -D-葡萄糖吡喃糖苷。ConA分子上的糖结合位点比单糖所需的空间大一些,因此它能与 α (1 $\rightarrow$ 2)连接的甘露二糖或三糖结合。ConA与含有二个GlcNAc替代基团的甘露三糖有最大亲和力,提示ConA的结合位点最适于这种结构。利马豆凝集素(简称PLA)和SBA虽均对GalNAc专一,但PLA只与 α -构型互补,而SBA既能与 α -GalNAc结合也能与 β -异构体结合。此外,各种凝集素还识别一定顺序的糖链,如LCA识别Gal(β -1.4) $\rightarrow$ GlcNAc(β -1.2) $\rightarrow$ Man^[11]。有些凝集素具有复合型的位点,如刺槐凝集素需要糖链的末端为半乳糖和内核为甘露糖的结构。

在“半抗原”抑制中,一般寡糖比单糖的抑制效力大得多,如对WGA与相应糖蛋白结合的抑制效力,GlcNAc的三聚体比单体大3000倍^[5]。但也有例子说明,单糖与寡糖同样有效,如抑制双花藕豆凝集素(简称DBL)与糖蛋白的结合,甲基- α -D-GalNAc与寡糖的效力相似^[12]。

三、凝集素的作用

1. 凝集细胞的作用 继Stillmark的发现二十年后,Landsteiner和Raubitschek观察到凝集素的血凝活力,因被凝聚的红血球的来源而异,证明了凝集素的血凝作用具有供血动物种属专一性。同时他们还发现它与血型有关。但直至四十年代才对凝集素的血型专一性有所

了解。不是所有凝集素而仅其中若干种有血型专一性。某些凝集素的血型专一性极强,不仅能区别A、B、O型,还能区别血液的亚型如A₁、A₂、M、N等。各种凝集素的血型专一性与它们的糖结合专一性相关。Watkin和Morgen确立了这一观点。利用“半抗原”抑制,他们发现PLA导致的A型红细胞的凝聚能被 α -GalNAc有效地抑制,确立了 α -GalNAc是A型血球的专一性决定簇。欧洲百脉根凝集素和电鳗血清凝集素对O型红细胞的凝集作用被L-岩藻糖最有效地抑制,证明O型红细胞的决定簇是L-岩藻糖。用同法证明B型红细胞的决定簇为半乳糖。

凝集素除了凝集红细胞外,也能凝集其它种类的细胞。对某些变异细胞,经致病病毒感染的细胞以及其它生长活跃的细胞,如精子、骨髓细胞和胚胎来源的细胞等的凝集作用往往大于一般正常细胞。利用标记凝集素可证明变异细胞或病毒感染的细胞的表面结合凝集素的量与正常细胞没有差别,但细胞膜上受体的分布明显不同,这提示凝集活力的不同与细胞表面结合凝集素的量无关,而受细胞膜上受体分布的影响。

细胞凝集是高度复杂的现象。凝集素使细胞凝聚是它与细胞表面的糖分子连接,在细胞间形成“桥”的结果。因此被与凝集素互补的糖所抑制。影响形成“桥”的因素很多,主要是凝集素的糖结合专一性、结合价和结合常数,受体细胞的种类,细胞膜上受体的分布与可近性以及迁移度,细胞膜上糖蛋白或糖脂中糖链的结构,细胞内微管结构对细胞膜结构的影响和细胞表面所带的电荷等。细胞表面的凝集位点数和结合凝集素的分子数可能是形成“桥”的决定因素。

2. 促细胞分裂的作用 Nowell于1960年首先发现菜豆凝集素(简称PHA)具有刺激淋巴细胞生长、分裂的能力,而与淋巴细胞受体的抗原专一性无关。以后发现美洲商陆(简称PWM)和多花紫藤凝集素(简称WFM)、ConA等也具有促细胞分裂的作用。近十几年来陆续

发现的具有促细胞分裂活力的凝集素很多。迄今,已纯化并经鉴定的已有近二十种,如 ConA、SBA、LCA、PHA 等。

像凝集细胞的作用一样,凝集素促细胞分裂的作用是它与细胞表面的糖蛋白或糖脂分子上的糖链结合而导致的,因此也被互补的单糖或寡糖抑制。它的促细胞分裂作用也受许多因素的影响:(1)细胞类型:凝集素促细胞分裂的作用具有细胞类型专一性,如 ConA、PHA 只激活 T 细胞^[14]。同一类淋巴细胞的亚群对凝集素的促分裂作用的反应亦不同,如 ConA 能激活小鼠胸腺的未成熟亚群和成熟亚群,而 PHA 只能激活成熟亚群^[15]。(2)淋巴细胞的来源,凝集素促细胞分裂的作用具有动物种属专一性,如 PNA 能激活经神经氨酸酶处理的人和大鼠的淋巴细胞,使其分裂,而不能激活经同样处理的小鼠淋巴细胞^[16]。(3)受细胞表面糖蛋白或糖脂分子上糖链结构的影响,如 SBA 不激活小鼠淋巴细胞使其分裂,但可使经神经氨酸酶处理的小鼠淋巴细胞分裂^[17]。细胞经神经氨酸酶处理后,其表面糖链上的神经氨酸被除去,改变了糖链末端的糖基。(4)与凝集素的结合价有关,二价的 PLA 没有促分裂作用,而四价的 PLA 是强促分裂原^[18]。(5)凝集素的浓度,各种凝集素促细胞分裂的最适浓度不相同,一般当浓度超过 100 微克/毫升时,绝大多数凝集素不再有促细胞分裂活力^[14]。

凝集素促细胞分裂的机理还不十分清楚。根据顺磁共振(EPR)测定,凝集素激活淋巴细胞可能和它与细胞表面结合后导致细胞膜上分子流动性的改变直接有关。破坏细胞内微管结构的秋水仙碱,亦抑制凝集素诱导的细胞分裂作用;可能淋巴细胞被激活是凝集素与细胞结合后改变了细胞内微管结构的结果。还能观察到与凝集素一起温育的人淋巴细胞的 K^+ 和 Ca^{++} 内流的速率增加^[19]。

3. 免疫作用 Ehrlich 于十九世纪末借蓖麻素和相思豆素确立了免疫学的某些最基本的原理,包括免疫反应的专一性和抗体-抗原相互作用的可逆性。他给小鼠多次皮下注射小剂量

蓖麻素后,小鼠对致死剂量的蓖麻素获得免疫力。并证明免疫的小鼠血清能中和蓖麻素的毒性,但不能中和相思豆素的毒性,同样,抗相思豆素的抗血清也不能中和蓖麻素的毒性。中和反应非常专一。

凝集素的免疫作用是复杂的,它能激活免疫系统,但在不同的条件下,它又有抑制作用。凝集素激活淋巴细胞的反应与抗原诱导的免疫反应相似,被激活的 B 细胞合成免疫球蛋白, T 细胞转变为“T-杀伤细胞”。凝集素激活的淋巴细胞与抗原激活的一样,释放淋巴细胞活素,包含干扰素、淋巴毒等多种具有生物活性的物质^[15]。凝集素的显著的免疫抑制作用表现为抑制各种动物对移植的同种异体器官或组织的排斥,如 ConA、PHA 可延长移植到异体中的皮肤和肾的存活时间^[19],抑制迟缓过敏反应和抑制多形核白细胞的吞噬作用。

4. 毒性作用 某些凝集素对动物细胞具有毒性,至今了解的有蓖麻素、相思豆素和从 *Modecca digitata* 根中分离的 modeccin。这三种凝集素的致毒作用相似。它们对整体动物和培养的细胞都有毒性。不同的动物对毒素的敏感性不同,马是最敏感的。它们对培养细胞的作用与在整体动物中一样,都要经过潜伏期才开始抑制蛋白合成。但将毒素加至细胞水解液中,不需潜伏期,说明毒素必须进入细胞才发挥作用。它们抑制蛋白质合成,是作用于核糖核蛋白体,阻止延伸因子 2 的作用,使在核糖核蛋白体上已起始的新生肽链不能完成。乳糖或相应的抗血清在加入毒素后的潜伏期起始阶段能阻断毒素的作用,表明毒素先与细胞膜结合,然后才进入细胞。完整的网状红细胞与毒素温育,细胞的蛋白质合成不被抑制,但若与网状红细胞的水解液温育,蛋白质合成立即被抑制。网状红细胞的内存活力极低,说明毒素与细胞膜结合后经内存进入细胞。电镜观察也证明此途径。

若将毒素的 A 链和 B 链分别与完整细胞温育,均不能抑制细胞的蛋白质合成。如分别与细胞水解液温育, B 链不抑制蛋白质合成,而 A

链则有抑制活性,表明A链需通过B链与细胞结合后才能进入细胞起作用。

四、细胞膜上的凝集素受体

细胞膜上的凝集素受体是糖蛋白或糖脂。它们的功能如何?它们与细胞膜上其它物质如激素、毒素、抗体等的受体间的关系怎样?近年陆续发现哺乳动物的多种细胞含有凝集素,它们与异源细胞的识别关系又怎样?这些都是人们目前感兴趣的问题。

不同类型的细胞或同一细胞的同一凝集素受体的生物功能可以不同。相同的或相似的糖基可以在不同种的蛋白质分子上。再则,同种的蛋白质分子上可含有不止一种凝集素的受体。已有的研究表明,人红细胞膜上有二种糖蛋白成分,其中之一——血型蛋白是主要成分,它含有WGA、PHA和UEA三种凝集素的受体。人KB细胞膜上有四个LCA受体。大鼠脑的LCA受体和电鳗的ConA受体具有乙酰胆碱酯酶活力。大鼠脂肪细胞膜上的胰岛素受体也与WGA、半夏蛋白和ConA结合^[21,22]。它们可能各自识别受体分子上不同的部位,但它们之间又相互影响,因此凝集素和糖蛋白分子上糖链的结合也受蛋白质分子空间结构的影响。

凝集素可通过细胞膜上它的受体,诱导或抑制若干生物效应,如PHA、LCA、ConA、WGA、RCA和蘑菇凝集素与脂肪细胞反应都有类似胰岛素的作用,能激活葡萄糖氧化。PHA、ConA、WGA、RCA和蘑菇凝集素能诱导释放血小板。蘑菇凝集素可诱导胰岛细胞释放胰岛素。ConA抑制粒性白细胞的吞噬作用。ConA、WGA和RCA抑制卵细胞的受精作用等。但须指出一点,这些植物凝集素在哺乳动物体内不是天然的生理效应物,不能假定天然的生理效应物诱导的同一反应也必须通过与凝集素的同一受体作用。

近年来的研究进展表明,许多细胞膜如粘菌、酵母、禽类,哺乳动物乃至人体细胞都含有凝集素,它们都具有重要的功能。如粘菌当环境不利于其生长时,就粘着形成丛,这种作用是

粘菌表面的凝集素与其邻近细胞表面的糖分子连接的结果。不同的粘菌识别不同的糖。又如某些酵母菌有可以配成对的两种类型,它们之间可形成具有双套染色体的杂交细胞^[23]。这说明一种细胞表面具有另一种细胞膜上的凝集素的受体。目前,在哺乳动物细胞中类似凝集素的识别系统经鉴定的已有六种。从这种意义讲,细胞膜上的凝集素和它的受体可能是同一类分子。在更多的系统中研究凝集素与受体的关系,不仅能阐明这种关系,还可能对凝集素在机体中存在的意义的认识发生根本性的改变。

五、应 用

1. 研究细胞膜的结构及结构与功能的关系的探针 细胞膜上的糖蛋白和糖脂在细胞的多种功能中起主要作用,如细胞间的相互作用,识别和粘着,细胞对外源物质的识别,抗原-抗体反应等,均主要决定于分子中的糖链结构。凝集素具有与特定的糖链专一结合的特性,使它成为研究细胞膜结构的很好的探针。利用标记凝集素可测量细胞膜上糖的分布,如用六种糖专一性不同的凝集素确立了精子表面糖的分布。用荧光标记的ConA揭示淋巴细胞膜上ConA的受体集聚在一起,形成“帽子”。利用冰冻蚀刻技术阐明红细胞膜上PHA受体是均匀分布的。也可利用标记凝集素研究细胞的变异、分裂、分化。鉴别肿瘤细胞和相应正常细胞膜结构的差异;阐明细胞恶变过程中膜结构的改变;研究胚胎发育过程和细胞分裂不同周期细胞膜结构的变化等。

2. 分离和纯化细胞 各种细胞膜上的糖链的结构不同,因此可利用不同种类的凝集素分离不同类型的细胞。分离的方法主要有四种:(1)利用凝集素对细胞的选择性凝聚,将细胞悬液与凝集素温育,然后将凝聚的和未凝聚的细胞分开;(2)将细胞吸附于固定化的凝集素上,再用适当的方法将吸附抗凝集素的细胞分开;(3)细胞与荧光标记的凝集素作用,然后经荧光激活细胞分类器将结合凝集素的和不结合的细胞分开;(4)细胞与经凝集素处理的羊红

细胞温育、离心,将游离细胞与形成玫瑰花结的细胞分开。目前已广泛使用凝集素分离B细胞和T细胞以及T细胞的亚群。如用SBA、WGA、HP分离T细胞和B细胞,PNA、龙虾凝集素(简称HA)分离成熟的和未成熟的T细胞^[24]。PNA从ConA激活的T细胞分离抑制T细胞,HP从LCA激活的T细胞分离辅助T细胞^[25],长柔毛野豌豆凝集素(简称VVL)分离杀伤细胞的前身细胞等。也用于分离其他细胞,如用PNA分离胚胎瘤细胞,分离不同功能的小鼠胚胎肝细胞,LCA分离Hela细胞^[24]。又如利用吸有ConA的尼龙纤维分离红细胞和胸腺细胞等^[26]。

3. 分离和纯化含糖高分子 凝集素识别一定顺序的糖链,并与之专一地结合的特性,给分离纯化含糖高分子提供了新方法。目前已广泛应用凝集素分离各类含糖化合物。分离抗原,如用ConA、RCA分离不同变种的甲胎蛋白^[27],ConA分离纯化乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的亚基等^[28]。分离纯化激素,如用ConA纯化绒毛膜促性腺激素(HCG),促黄体激素(LH)等。分离细胞膜上的糖蛋白或糖脂,如用ConA纯化血小板上的糖蛋白,分离胰岛素受体;WGA、RCA分离人红细胞膜上的糖蛋白等。也用于分离纯化酶和其它生物物质,如用ConA纯化碱性磷酸酯酶^[29]。PSL纯化乙酰胆碱酯酶^[30]。凝集红血球的PNA(E-PHA)分离干扰素,ConA纯化IgG等^[31]。

4. 鉴定血型 某些凝集素的血型专一性非常强,不但能十分准确地区别A、B、O型,且能区别不同的亚型,因此它是鉴别血型的一种良好工具。对于O型血球的鉴定,由于没有天然的抗O抗体,凝集素有其独特的作用,如欧洲百脉根凝集素,鳗血清中的凝集素等都是鉴定O型血球的良好试剂。双花藕豆凝集素国外已在血库中广泛应用,是鉴别A₁亚型的简便又快速的试剂。Vicia graminia凝集素和屈曲花(亦称蜂宝花)凝集素可分别鉴定N亚型和M亚型。抗-B凝集素直到六十年代初由Goldstein发现,Bandeiraea simplicifolia凝集素有较强的抗-B作

用,遗憾的是它又有相似强度的抗-AB活力,因此不能用于鉴定B型血球。最近发现不蹄层孔菌和矾沙蚕抽提液、日本蠅和Lymantria dispar的血淋巴都能凝集人B型血球,也许有可能作为抗-B试剂。另外,凝集素还可用于“异分泌者(Secretors)”^{***}的诊断和分型^[4]。

5. 鉴别变异细胞 凝集素是检测细胞膜结构的有效工具。细胞变异与细胞膜结构改变密切相关,因此利用它对变异细胞凝集活性的改变为指标来鉴别变异细胞是一种简便有效的方法,如新城鸡瘟病毒致病株和非致病株对BHK细胞的影响,用ConA很易区别,ConA对非致病株感染的细胞的凝集活性与未感染的细胞没有明显差别,而对致病株感染的细胞的凝集活力则明显增加。表明致病株导致细胞变异。也可利用凝集素测定细胞膜上的标志酶变化来鉴别恶变细胞。

6. 选择细胞变异株 某些凝集素具有细胞毒作用,将这类凝集素与细胞一起温育,然后分离存活的细胞,就可得到抗毒素的细胞株,例如用蓖麻素选择膜上缺乏这种凝集素受体的中国地鼠卵细胞“克隆”^[35]。可以利用凝集素选择不同的变异细胞株供生物科学研究使用。

凝集素的应用范围很广,上面所列举的仅是几个方面。此外,还用于研究免疫反应的机理、细胞癌变的机制、染色体的细胞遗传。在临床方面用于诊断先天的和获得的免疫缺陷,检验由感染或自身免疫导致的过敏,监测各种免疫抑制和免疫治疗的效应,还可用于诊断畸胎、炎症病情等。因此凝集素不仅在生物科学的研究中是一类极有用的工具,而且在工业生产和临床诊断方面应用日益广泛。

目前人们开始注意到凝集素在其自身机体内的作用。

本文承沈昭文教授提出宝贵意见,谨此致谢。

^{***} 异分泌者是指某类患者,分泌有血型专一性的糖蛋白到唾液、尿及其他体液中。

附表 若干凝集素的纯化方法和性质

凝集素名称及来源	分离纯化方法	生化性质					血型专一性	促细胞分裂作用
		分子量	亚基数	亚基分子量	糖蛋白	抑制剂		
相思豆素 (<i>Abrus precatorius</i>)	NaCl 溶液抽提 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Sepharose 亲和层析	有毒 65,000 无毒 120,000	2 4	30,000(A) 35,000(B) 2×33,800 和 2×32,200	是	D-半乳糖		-
蘑菇 (<i>Agaricus bisporus</i>)	NaCl 溶液抽提, DEAE-纤维素, Sephadex G-100 磷酸纤维素层析	58,500			否	D-半乳糖 D-GalNAc		+
(<i>Flammulina velutipes</i>)	PBS 抽提 Zn(OAc) ₂ 处理 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 CM-纤维素层析	20,000	2	12,000 (FVA-L) 8,000 (FVA-S)	否	甲壳二糖, 甲壳三糖		+
花生 PNA (<i>Arachis hypogaea</i>)	NaCl 溶液抽提 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 Sepharose-6 氨基乙酰胺-β-半乳糖胺亲和层析, 半乳糖洗脱	110,000	4	27,500	否	Galβ(1→3)- galNAc, D-半乳糖	T, TK, Th	
(<i>Bandeiraea simplicifolia</i>)	甲醇抽提, 含 Gal 的 PBS-Ca 抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Biogel P-300-蜜二糖亲和层析, 半乳糖洗脱	114,000	4	28,500	是	D-半乳糖	B, A + B.	
刀豆 ConA (<i>Conocanavalia ensiformis</i>)	NaCl 溶液抽提 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 Sephadex G-50 亲和层析, 葡萄糖或低 pH 缓冲液洗脱	102,000	4	25,500	否	D-葡萄糖 D-甘露糖		T-细胞
蓖麻酥 (亦称印度麻) (<i>Crotalaria juncea</i>)	Sepharose 亲和层析, 乳糖洗脱	120,000			是	D-半乳糖		
西葫芦 (<i>Cucurbita pepo</i>)	含蔗糖醇的冰冷的 PBS 抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Sepharose-甲壳三糖亲和层析, 0.1M 乙酸洗脱。	29,000 (凝胶 过滤) 20,000 (PAGE)	无		否	甲壳寡糖 GlcNAc		
曼陀罗 (<i>Datura stramonium</i>)	PBS 抽提, 丙酮分级沉淀, Sepharose-胎蛋白亲和层析, GlcNAc 洗脱		2	40,000 45,000	是	甲壳寡糖		
双花藕豆 DBL (<i>Dolichos biflorus</i>)	乙醇沉淀、或聚亮氨酸-猪 A + H 血型物质亲和层析	111,000	4	26,000 26,500	是	D-GalNAc	A, Tn, Cad	
大豆 SBA (<i>Glycine max</i>)	水抽提 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, 对乙醇透析, 磷酸钙柱和 DEAE-纤维素柱层析, NaCl 溶液抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Sepharose-半乳糖亲和层析, 半乳糖洗脱	111,000	4	30,000	是	D-GalNAc D-半乳糖		T-细胞 (SBA 聚集体)

蜗牛 HP (<i>Helix pomatia</i>)	NaCl 溶液抽提, 聚酰胺-猪 A + H 血型物质亲和层析, GalNAc 洗脱	79,000	6	13,000	是	D-GalNAc, D-GlcNAc	A	
香豌豆 (<i>Lathyrus odoratus</i>)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级沉淀, DEAE-纤维素, CM-纤维素层析	37,000	可能 2		是	D-甘露糖 D-葡萄糖		+
草香豌豆 (<i>Lathyrus sativus</i>)	Sephadex G-100 亲和层析, DEAE-纤维素层析	43,000	2	21,500 10,000	是	D-甘露糖 D-葡萄糖		+
扁豆 LCA (<i>Lens culinaris</i>)	NaCl 溶液抽提, DEAE-纤维素柱层析, Sephadex 亲和层析, 葡萄糖洗脱	48,000	2	24,500	是	D-甘露糖 D-葡萄糖		T-细胞
鳖 LP (<i>Limulus polyphemus</i>)	超离心, 淀粉区带电泳, Sephadex G-200 过滤, Ultragel A-4-牛颌下腺球蛋白亲和层析	400,000	18	22,500		NeuNAc, NeuNAc-Gal, D-葡萄糖酸-L-文杜糖醛酸(2:1)聚合体		
百脉根 (<i>Lotus tetragonolobus</i>)	PBS 抽提, Sepharose-岩藻糖亲和层析, 岩藻糖洗脱	A, 120,000 B, 58,000 C, 117,000	4 2 4	27,000		L-岩藻糖	H(O)	A, +
蕃茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	汁 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, 胰酶处理的人 B 型血球吸附, GlcNAc 寡糖解离, Sephadex G-200 层析, 或聚酰胺-猪 A + H 血型物质亲和层析	84,000 或 63,000	无		是	(GlcNAc) ₄		-
(<i>Modecca digitata</i> 或 <i>Adenia digitata</i>)	PBS 抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Sepharose 4B 亲和层析, 0.2M 半乳糖洗脱	63,000	2	28,000 38,000	是	D-半乳糖		
米胚, RGL (<i>Oryza sativa</i>)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Sepharose-卵粘蛋白层析, CM-纤维素层析	37,000	2	19,000	是	D-GlcNAc	无	+
利马豆 PLA (<i>Phaseolus limensis</i> 或 <i>P. lunatus</i>)	NaCl 溶液抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, 聚酰胺-A 血型物质亲和层析, D-GalNAc 洗脱	1) 247,000 2) 124,000			是	D-GalNAc	A	1) + 2) -
菜豆 PHA (亦称植物血凝素) (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	SE-Sephadex 层析, Sephadex G-150 凝胶过滤磷酸纤维素层析或 Sepharose-甲壳质球蛋白亲和层析, 甘氨酸-HCl 洗脱	128,000	4	33,000	是	D-GalNAc		T-细胞
豌豆 PSL (<i>Pisum sativum</i>)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, Sephadex G-150 亲和层析, 甘氨酸-HCl 洗脱, 或葡萄糖或甘露糖洗脱	49,000	4	2×8,000 和 2×15,000	是	D-甘露糖 D-葡萄糖		T-细胞

附表续

凝集素名称及来源	分离纯化方法	生化性质					血型专一性	促细胞分裂作用
		分子量	亚基数	亚基分子量	糖蛋白	抑制剂		
蓖麻 RCA (<i>Ricinus communis</i>)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, 琼脂糖亲和层析、半乳糖或乳糖洗脱, Sephadex G-200 或 G-150 凝胶过滤, 分为 RCA _I 和 RCA _{II}	RCA _I 120,000 RCA _{II} 60,000	4 2	2×29,500 和 2×37,000 29500 和 37,000	是	D-半乳糖 D-GalNAc > 半乳糖		- -
刺槐 (<i>Ribinia pseudo-acacia, black locust</i>)	PBS 抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀、DEAE-纤维素和 CM-纤维素层析	100,000			是	具有 D-半乳糖末和甘露糖内核的寡糖		T, B 有时有活力
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	NaAc 缓冲液抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, DEAE-纤维素, CM-纤维素层析, Sephadex G-100 过滤, SP-Sephadex 层析	120,000	4	46,000	是	D-GalNAc, D-GlcNAc		
槐 (<i>Sophora japonica</i>)	PBS 抽提, 乙醇沉淀, 聚酰胺-猪胃粘蛋白亲和层析, 半乳糖洗脱	138,000	2	71,000	是	D-半乳糖 D-GalNAc	A + B	+
麦胚 WGA (<i>Triticum vulgaris</i>)	卵粘蛋白亲和层析、0.1N HCl 洗脱, 或甲壳聚糖亲和层析、0.05N HCl 洗脱等	34,000	2	17,000	否	D-GlcNAc, NANA		-
荆豆 UEA (<i>Ulexeuropaeus</i>)	NaCl 溶液抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, UEA _I , CM-纤维素 Sephadex G-200, Biogel P-200 层析、淀粉凝胶, 岩藻糖亲和层析、甘氨酸-HCl 洗脱, UEA _{II} , DEAE-纤维素层析, 电泳, Biogel P-200 层析淀粉凝胶-甲壳三糖亲和层析、甘氨酸-HCl 洗脱	17,000			是	UEA _I L-岩藻糖 UEA _{II} 甲壳二糖	H(O)	UEA _I +
草蓼 (<i>Vicia cracca</i>)	NaCl-Tris 抽提, NaAc 沉淀去杂质, Sephadex G-100 层析、或 Sepharose-A 血型物质亲和层析	10,000	4	29,000	是	D-GalNAc	A	-
(<i>Vicia graminea</i>)	磷酸缓冲液抽提, (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, DEAE-纤维素层析、Sephadex G-150 凝胶过滤	105,000	4	25,000	是	N-型红血球的主要糖蛋白, 酪蛋白、糖肽, 羊颌下腺蛋白	N	-
多花紫藤 WFFH (<i>Wisteria floribunda</i>) WFM (<i>Wisteria floribunda</i> var. <i>macrobotrys</i>)	NaCl 溶液抽提 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀, SE-Sephadex 层析、Sephrose 6B 过滤	WFFH136,000 WFM67,000	4 2	35,000 32,000	是	D-GalNAc 甲壳二糖		WFFH - WFM +

参 考 文 献

- [1] Sharon, N.: *Scientific Am.*, **236** (6), 108, 1977.
- [2] Sharon, N. et al.: *Science*, **177**, 949, 1972.
- [3] Allen, A. K. et al.: *Biochem. J.*, **131**, 155, 1973.
- [4] Reeke, G. N.: *Advances in Expt. Med. and Biol.* (Eds Chowdhury, T. K. et al.), Plenum Press, Vol **35**, p. 13, 1974.
- [5] Lis, H. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 451, 1973.
- [6] Sawyer, W. H.: *Advances in Expt. Med. and Biol.* (Eds Chowdhury, T. K. et al.), Plenum Press, Vol. **35**, p.71, 1974.
- [7] Edelman G. M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3580, 1972.
- [8] Hardman, K. D. et al.: *Biochemistry*, **11**, 4910, 1972.
- [9] Wright, S. C.: *J. Mol. Biol.*, **111**, 439, 1977.
- [10] Olsnes, S. et al.: *the Specificity and Action of Animal Bacterial and Plants Toxins* (Receptors and Recognition, Series B. Vol. 1) (Ed. Cuatrecasas), p.129, Chapman and Hall, 1977.
- [11] DeBray, H. et al.: *Protides Biol. Fluids* (Ed. Peeter, H.), Vol. **27**, p.451, Pergamon Press, 1981.
- [12] Kornfeld, S. et al.: *The Glycoconjugates II* (Eds. Horowitz, M. I. et al.), p.473, N. Y. Academic, 1978.
- [13] Brown, J. C. et al.: *Intern. Rev. Cytology*, **52**, 277, 1978.
- [14] Lis H. et al.: *The Antigen* (Ed. Michael, S.), Vol. **IV**, p. 429, Academic Press, 1977.
- [15] Stobo, J. D. et al.: *J. Immunol.*, **108**, 1, 1972.
- [16] Novogrodsky, A. et al.: *J. Immunol.*, **115**, 1243, 1975.
- [17] Novogrodsky, A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2515, 1973.
- [18] Bessler, W. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 578, 1976.
- [19] Lis, H. et al.: *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Eds. Chowdhury, T. K. et al.), Vol. **55**, p. 309 Plenum Press, 1974.
- [20] Olsens, S. et al.: *Protides Biol. Fluids* (Ed. Peeter, H.), Vol. **27**, p. 395, Pergamon Press, 1980.
- [21] Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3528, 1973.
- [22] 孙册等: «免疫技术在分子生物学和细胞学中的应用研究»交流讨论文札, 1980年9月第46页。
- [23] Fox, J. L.: *Chem. and En. News*, **56** (31), 25, 1978.
- [24] Reisner, Y. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 29, 1980.
- [25] Nakano, T. et al.: *Glycoconjugates Proc. 5th. Intern. Sym.* (Eds. Schauer, R. et al.), p. 452, 1979.
- [26] Edelman, G. M. et al.: *Methods Enzymol.* (Eds. Jakeby, W. B. et al.), Vol. **34**, p. 195, 1974.
- [27] Bavard, B. et al.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 489, 1977.
- [28] Skelly, C. R. et al.: *J. Gen. Virol.*, **44**, 679, 1979.
- [29] Latner, A. C. et al.: *Anal. Chem.*, **101**, 483, 1980.
- [30] 杨建中: «免疫技术在分子生物学和细胞生物学的应用研究»交流讨论会文札, 中国生化学会印, 1980年, 9月, 第8页。

[本文于1980年12月27日收到]

蛋白质晶体学——分子生物学的得力工具(一)

王 家 槐

(中国科学院生物物理研究所)

一、引 言

自从劳埃 (Von Laue) 在1912年成功地拍摄了第一张晶体的X射线衍射像后, 近七十年来, X射线晶体学一直是研究物质结构极其有用的工具。最初人们仅用X射线晶体结构分析方法测定一些晶胞内一个独立单位*, 只含几个原子的简单的矿物结构, 以后是十几个到上百个原子的有机化合物。五十年代后, 晶体学家成功地发展了一整套方法, 可以测定蛋白质分

子的几百、几千个非氢原子在三维空间的排布。由于大型计算机以及自动衍射仪的出现, 七十年代大批蛋白质结构被测定, 达到原子分辨率水平 (优于 $2.5 \text{ \AA}$) 的约有一百个; 与此同时还测定了几个转移核糖核酸的晶体结构。从测定的精度看, 经过仔细修正的蛋白质结构, 一些定位较好的原子的位置误差已降到 $0.15 \text{ \AA}$ 左右^[1]。分子量高达几百万, 由几十万个非氢原

* 在晶体学里把晶胞内不能由晶体学对称元素相关联的部分叫独立单位。