

人血清胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及抗血清的制备

彭启明 许秀珍

(中国医科大学)

胰蛋白酶抑制剂(α_1 -antitrypsin 简称 α_1 AT) 是一种分子量约五万的糖蛋白, 它广泛分布在人体各组织器官及血液中, 能抑制多种蛋白水解酶, 约占血浆胰蛋白酶抑制总活力的 90%。近来发现这一蛋白质的遗传缺损与肺气肿及某些肝病的发病有密切关系^[1,2]。但是这种蛋白质很不稳定, 而且与血清白蛋白的性质很接近, 用一般层析及电泳方法均难以分离, 故至今对它的性质, 功能及其在发病中的作用尚未做出深入研究了解。我们利用伴刀豆素球蛋白对糖的特异吸附, 可将它与血清白蛋白分离, 方法简便, 所得纯制剂比活较高。我们已制得高特异性的兔抗人 α_1 AT 血清, 用于临床研究。

材料及方法

一、 α_1 AT 活性的测定

胰蛋白酶及底物 BANA (α -N 苯甲酰精氨酸 β -萘胺 α -N-benzoyl arginine- β -naphthylamine) 均由上海生化所东风制药厂制备, 测定抑制能力是将 α_1 AT 与标准量的胰蛋白酶反应, 测定胰蛋白的剩余活力。蛋白质测定用酚试剂显色法。

二、 α_1 AT 的纯化步骤

血清: 取自健康献血者。

1. 盐析 分离血清加等量饱和硫酸铵(事先将 pH 调到 7.6)充分混合, 静置数小时后过滤, 以下步骤均在 4℃ 进行。

每一百毫升滤液中加固体硫酸铵 17.6 克至 0.75 饱和度, 边加边搅拌, 静置过夜后, 吸滤。每一百毫升血清可得 0.5—0.75 饱和度的盐析沉淀, 湿重 13 克左右, 活力回收约为 83%。

将沉淀溶解在 0.05M pH7.6 磷酸缓冲液

中, 并以 10 倍水透析约 36 小时, 12 小时换水一次, 直到外透液检查无硫酸根离子。由于该蛋白对 pH 很敏感, 在酸性条件下极易失活, 故外透液须事先用氨水将 pH 调至中性。

2. DEAE-Cellulose 层析 阴离子交换层析事先用 pH6.4、0.05mM 电导为 0.5×10^4 磷酸缓冲液平衡, 将上一步的透析液 20—50ml 上样, 用 0.05M 及 0.12M pH6.4 的磷酸缓冲液进行分级洗脱, 得两个峰, 活力部分在第二峰。见图 1。右峰比活为 0.1125mg/mg, 活力回收率为 35.68%。

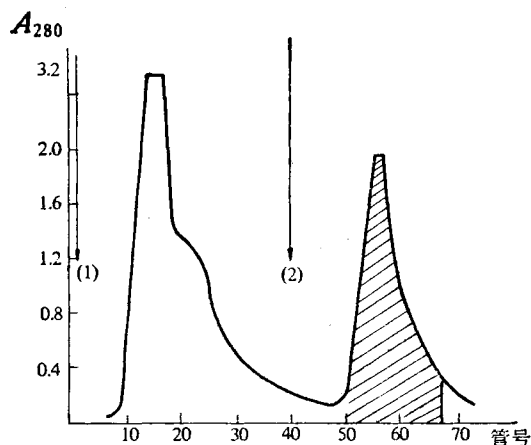


图 1 DEAE-Cellulose 分离纯化人血清 α_1 AT 层析图

箭头 (1): 0.05M 磷酸缓冲液, pH6.4

箭头 (2): 0.12M 磷酸缓冲液, pH6.4

柱 66×1.6 cm, 床体积 130ml, 流速: 5ml/管/5 分

3. 伴刀豆素球蛋白-琼脂糖分离 利用 ConA-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals) 特异性吸附糖将 α_1 AT 与血清白蛋白分离。图 1 的峰 2 调 pH 至 7.4 后, 可直接进行于这一步分离。样品经吸附后, 先用高浓度的氯化钠磷酸缓冲液淋洗柱, 除去非特异性吸附组分。随后

用甲基葡萄糖苷, 将吸附在柱上的 α_1 AT 顶替下来, 为第 2 峰 (见图 2)。经过这一步, 杂蛋白被进一步清除, 因而比活大大提高, 达 0.36, 其活力回收率为 13.36%。

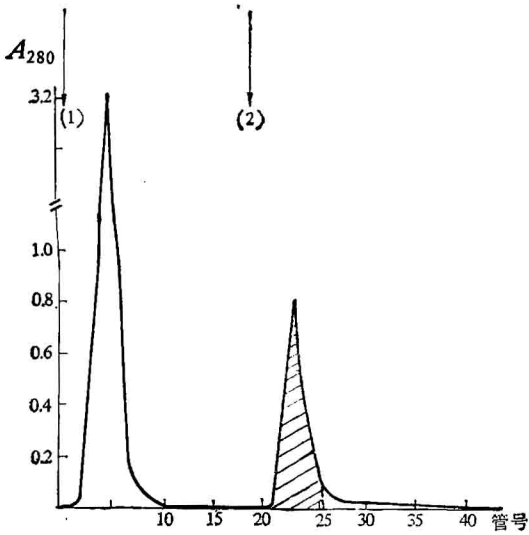


图 2 ConA-Sepharose 分离血清 α_1 AT 层析图
箭头 (1): 第一洗脱液 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液, 0.5M NaCl 箭头 (2): 第二洗脱液 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液, 0.5M NaCl, 0.1M 甲基葡萄糖 柱 3.0×1.0cm 床体积 20ml, 流速: 2ml/管/10 分

4. Sephadex G-100 分离 这一步分离主要得到两个峰 (图 3), 活力部分在后一个主峰上, 比活为 0.408mg/mg, 活力回收率 11.193%, 比 1976 年国外五步提纯产率 17.1% 要低。通过上述四步纯化, 纯化倍数达 24。

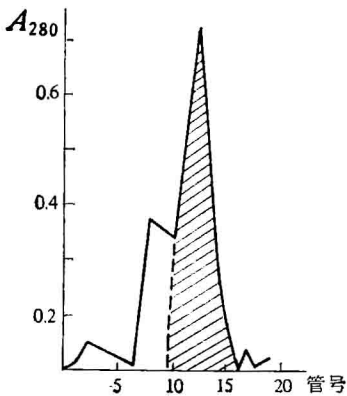


图 3 Sephadex G-100 分离层析图
柱: 48×1.0cm 床体积 34ml
洗脱液: 0.01M pH7.4 磷酸缓冲液,
流速: 0.8ml/管/10 分

表 1 人血清 α_1 AT 提纯过程中蛋白质及抑制力的回收

分离步骤	蛋白量 (mg)	比活	总活力	活力回收%	纯化倍数
1. 血清 (120ml)	9000	0.017	160.8	100	1
2. 盐析	3522.6	0.038	133.8	83.2	2.2
3. DEAE- 纤维素	510.0	0.11	57.3	35.6	6.6
4. ConA-Sepharose	59.89	0.36	21.4	13.3	21
5. Sephadex G-100	44.115	0.408	17.9	11.2	24

注: 比活: 每毫克蛋白质抑制胰蛋白酶的毫克数
总活力: 抑制胰蛋白酶的毫克数

三、 α_1 AT 纯度的鉴定

1. 醋酸纤维膜、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (图 4, 5) 及琼脂电泳 (图 6 见封三), 由琼脂电泳看, 所显蛋白带居于正常人血清 α_1 -蛋白的位置。

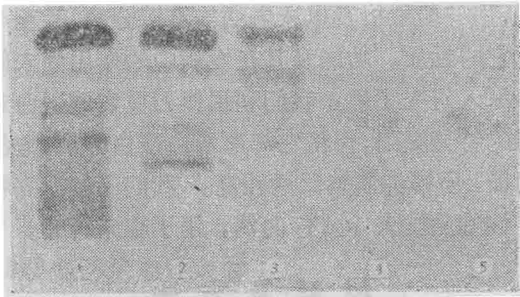


图 4 醋酸纤维膜电泳纯化各步图象
电泳条件: 巴比妥缓冲液 pH8.6 $\mu = 0.06$;
电压 100—120V; 电流 0.4—0.6mA/cm 时间
40 分; 氨基黑 10B 染色

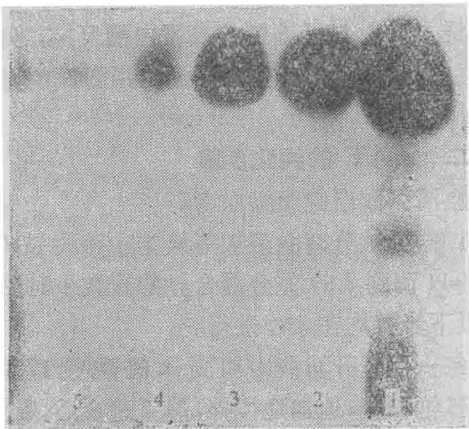


图 5 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化各步电泳图象
电泳条件: 8% 聚丙烯酰胺凝胶 Tris-HCl
缓冲液 pH8.9; 电压 200V 时间 1.5 小时
考马斯亮兰 R250 染色

2. 免疫电泳 (1)用兔抗人全血清检查: 分离的 α_1 AT 与兔抗人全血只呈现一条沉淀弧, 弧形位置处于正常人血清 α_1 AT 相应的位置 (图 7 见封三)。

(2) 用 α_1 AT 抗血清检查: 兔抗人 α_1 AT 与正常人血清及提纯的 α_1 AT 均呈现一条沉淀弧, 二者处于相对应的位置 (图 8 见封三)。

(3) 用双向免疫扩散法检查: 制备的 α_1 AT 对兔抗人血清的双向扩散呈现一条沉淀线, 它与血清本身产生相应的线完全结合 (图 9 见封三)。

四、兔抗人 α_1 AT 抗血清的制备和应用

用上述制得的抗原, 按常规制备抗血清, 通过五次, 历时九周得到了较纯的抗血清。

1. α_1 AT 抗血清的制备 用同一起来源的杂种雄性家兔, 体重 1.5 公斤左右。

佐剂: 采用 5:1 体积石蜡油与羊毛脂混合液。10ml 浓度为 8mg/ml α_1 AT 加 1.0ml 活卡介苗 (75mg) 加 3.0ml 佐剂, 充分乳化后按表 2 注射免疫。

用双向免疫扩散法进行抗血清效价测定, 在琼脂板上找出现沉淀线的最低稀释倍数为 1:32。

表 2 免疫次数、途径及用量

次 数	免疫途径	抗原用量	间隔时间
第一次	双后脚垫	1.0mg	
第二次	双腭窝淋巴结	1.0mg	半月后
第三次	背部多点	2.0mg	半月后
第四次	耳静脉	2.5mg	三周后
第五次	耳静脉	2.5mg	一周后

* 耳静脉注射时不加佐剂, 抗原用生理盐水稀释

2. α_1 AT 抗血清的应用 我们用单向琼脂免疫扩散法测定血清 α_1 AT 的含量。

(1) 标准曲线绘制: 把纯化的 α_1 AT 作为标准蛋白 (蛋白浓度用 Folin 酚法标定), 将正常人血清用生理盐水稀释成不同浓度。以不同稀释度抗血清制板, 然后加入不同浓度的标准蛋白及正常人血清, 于 37℃ 湿盒中 24 小时观

察沉淀环直径, 以标准蛋白含量为横坐标, 以沉淀环直径为纵坐标绘制标准曲线, 可见 α_1 AT 标准蛋白在 1:80 抗体稀释板上是“直线”形曲线 (图 10)。并在此稀释度的琼脂板上经实验找出合适的血清稀释倍数为 1:30。

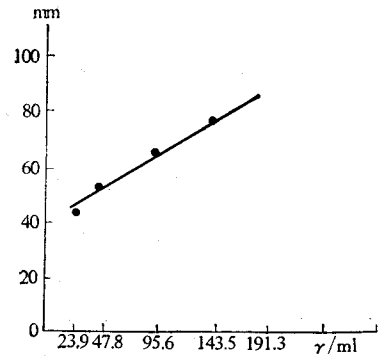


图 10 单向免疫扩散测定 α_1 AT 标准曲线

(2) 标本的测定 用生理盐水将血清稀释 30 倍, 每张琼脂板均有标准蛋白对照, 标准蛋白沉淀环直径与标准曲线同浓度沉淀环直径相比不得超过 0.2 毫米。待测标本根据沉淀环直径大小, 从标准曲线上求其含量。以 mg/dl 表示。

讨 论

对 α_1 AT 这一重要的蛋白酶抑制剂, 国外早期分离纯化是采用各种沉淀方法^[3], 以后改用各种层析及电泳方法^[5,6], 但均不理想, 直到近年来应用亲和层析, 即用伴刀豆素球蛋白对糖的特异性吸附, 达到与血浆中大量存在的清蛋白分离的目的^[7-9]。

我们用少量多次多途径的免疫方式能得到较满意的抗血清浓度, 基本可用在临床上做单向免疫扩散法测定 α_1 AT。两年来, 利用自制抗体, 对正常人及肺气肿患者血清进行定量测定, 同时测其活力, 即胰蛋白酶抑制力 (trypsin inhibitory capacity 简称 TIC) 的测定进行对比观察。测得沈阳地区 161 例健康人体血清 α_1 AT 水平及血清胰蛋白酶抑制力为 1.031 ± 0.093 mg/ml, α_1 AT 含量为 323.3 ± 39.52 mg%, 与国际资料报告基本一致。对慢性气管炎合并肺气肿患者

血清 α_1 AT 水平进行了调查,表明急性发作期患者血清 α_1 AT 水平比平稳期高,也高于正常人。这可能是由于炎症反应使机体合成 α_1 AT 代偿性升高。对病人的调查中,尚未发现 α_1 AT 先天性缺损者,病人血清 α_1 AT 虽高于正常,可能是长期慢性炎症,蛋白水解酶增加,因而造成 α_1 AT 相对不足。

对某些疗效较好的中草药观察表明,上咳七号(猪胰脏浸出液)可提高 α_1 AT 水平,而复方首乌却无此作用。

中国科学院上海生物化学研究所戚正武同志对本文曾做指导,谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] Fueppers, F. et al.: *Amer. Rev. Respiratory disease.*, 110, 176, 1974.
- [2] Lauvell, C. B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 15, 132, 1963.
- [3] Mell, F. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 233, 121, 1958.
- [4] Bundy, H. F. et al.: *J. B. C.*, 234, 1124, 1959.
- [5] Kress, L. F. et al.: *Practise. Biochem.*, 3, 541, 1973.
- [6] Crowford, I. P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 215, 1971.
- [7] Liner, I. E. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 436, 1973.
- [8] Musian, P. et al.: *Biochemistry*, 15, 798, 1976.
- [9] Massig, M. P.: *Clin. Chem. Acta.*, 73, 561, 1976.

[本文于1981年4月23日收到]

科技消息

脂质体还是红细胞是合适的药物载体?

去年6月底在希腊 Cap Sounion 召开了一次定向药物研究讨论会。与会者讨论了在体内如何使药物仅作用于指定器官或肿瘤组织的问题。一些人主张把药物包在脂质体中,然后可以很方便地装上肿瘤或器官抗原的单克隆抗体。另一种意见是用红血球来作药物的载体。

脂质体与红细胞进入体内,最后都到肝、脾及骨髓中并被降解。因此,它们是两种定向运送药物到上述这些器官里的比较理想的运载体系。例如患利什曼原虫病(一种肝寄生虫病)的病人,已经用包入高毒性锑化物的脂质体来进行治疗,药效可以提高一千多倍。美国 Water Reed Army 医疗中心年内将大规模用这种方法。Illinois 州 Argonne 实验室的 Y. Rahman 利用脂质体自然定向到肝里的特点发展了一种新技术,可以从患严重 Thalassaemia 病病人的肝和其他器官里除去堆积的铁。小鼠实验表明,包在脂质体内螯合剂能非常有效地被肝吸收而除去过量的铁。他预言用脂质体治疗只需一周处理一次,而不必象目前每天进行处理。这种方法还可以从肝里除去其他重金属。Rahman 估计这种方法在5年内可以用于临床。

主张用红细胞作载体的人认为:红细胞同样也能被肝巨噬细胞选择性地吸收,而且大量制备、储存要比脂质体容易得多。但红细胞目前还不能代替温度敏感的脂质体,这类脂质体的磷脂组分是经过选择的。因此,当他们进到肿瘤组织时,由微波或水浴加热使温度升

到40℃左右,这时由于磷脂发生相变,使脂质体内含药物得以释放。动物实验表明,用这种方法运送进入到肿瘤组织里药量可以增加14倍以上。

红细胞和脂质体也都可以应用于遗传工程的研究。目前大家都在寻找一个能引导大量“正确”的基因到细胞里去的体系。首先要求做到在体外能把基因嵌入到细胞(如遗传缺陷病人取出的骨髓细胞里),而后再加以移植。加州癌研究所的 Papahadjopoulos 利用脂质体将基因或药物送入培养的细胞中,这样可增加细胞中DNA的含量。通过加入聚乙二醇或甘油的作用可使靶细胞中DNA的量增至100倍以上。将来,让装有正确基因的脂质体或红细胞定向送到体内任何需要它们的部分是有可能实现的。Papahadjopoulos 还成功地用脂质体将基因纳入暴露的植物细胞,即原生质体中。脂质体与原生质体膜融合,而后纳入的基因可在原生质体中表达。

对植物遗传工程来说脂质体可以说是最好的运载工具。但在体外,对动物或人的细胞工程来讲,红细胞可与脂质体争高低。Texas 大学的 rhler 将噬菌体DNA与受体蛋白一起大量地包在红细胞中远送给靶细胞。当红细胞与靶细胞融合时DNA即从噬菌体内挤到靶细胞中。虽然用这种方法转移的DNA尚未见到表达,但因为细胞融合是比较容易进行的,如若一旦表达地功,将使红细胞技术变得十分有价值。

李才元摘自“New Scientist”

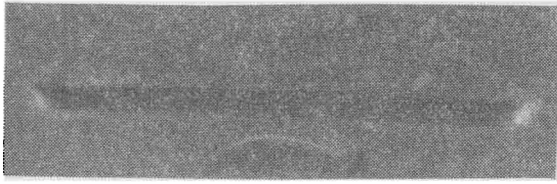


图6 正常人血清提纯的 α_1AT 琼脂电泳图象
上: 提纯的 α_1AT 下: 正常人血清

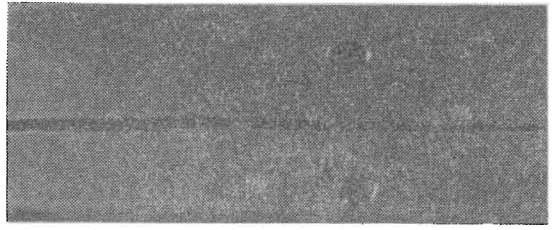


图7 兔抗人全血清与正常人血清 α_1AT 免疫电泳图象
上: 正常人血清 下: 提纯的 α_1AT

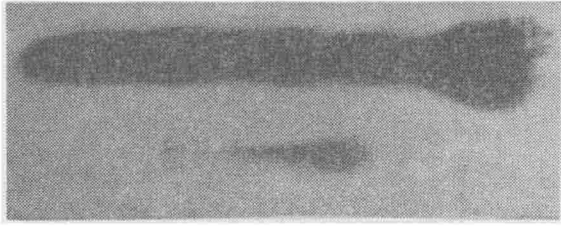


图8 正常人血清与提纯的 α_1AT 与抗血清免疫电泳图
上: 正常人血清 下: 提纯的 α_1AT

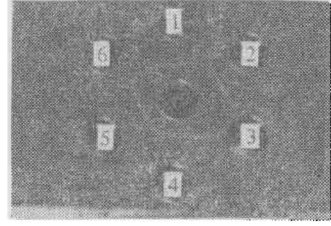


图9 双向免疫扩散检查 α_1AT
中间孔为 α_1AT 抗血清 周围孔 1,4 为正常人血清
2,5 为纯化 α_1AT 3,6 为空白

科技消息

生物系统在不均匀可变电场中的电泳研究

中性或带电颗粒在不均匀的可变电场作用下产生的泳动现象称为“dielectrophoresis”。这种泳动和电泳(electrophoresis)不同,电泳是指带电颗粒在稳定的均匀电场作用下的运动。在相距几毫米的两支电极上,对酵母细胞悬液施加频率为100赫至5兆赫,电压高达70伏的不均匀可变电场时,可以观察到酵母细胞出现如下的泳动现象:细胞向电极上集中,在实验腔中处处形成珠串,出现有分支的束状排列,不对称细胞出

现定向排列、转动和膜融合。这种在不均匀可变电场中的泳动现象可以为收集细胞,区别活细胞与死细胞;研究药物对细胞状态的影响;膜或细胞融合实验;以及为研究不同的细胞表面电荷状态提供一种有趣的生物物理和微生物学研究手段。它在生物学方面的应用还刚刚开始。

(摘自“Naturwissenschaften” 68 (10),
1981, 10 月号。(情))

名词解释

基因库与基因文库 基因库 (gene pool) 与基因文库 (gene library 或 gene bank) 是两个不同的概念。基因库是指一个有性繁殖的生物群体中各成员所具有的全部遗传信息。根据这一定义,一个完整的基因库应该是一特定物种所具有的遗传信息含量。自然界常常通过复杂的手段,精巧地防止物种之间发生遗传方面的相互作用;基因在自然条件下只能在一个特定的物种内相互作用。地球上居住着的各种生物,其基本特征一代复一代地保留着,它们的形成并不是由很不相关机体的特征结合,而是由种内进化而来。在无性繁殖生物中,种属之间也存在着防止其遗传物质相互作用的许多天然“屏障”。因此,基因库的维持和发展

进化维系于物种的维持和发展进化。近年由于分子遗传学研究的长足进步,尤其是DNA重组技术的开发,人们甚至把本地球上按照不同进化路线发展而成的所有生物的遗传信息看成为一个本星球的基因库。

基因文库是人工建立的基因“活期储蓄所”。它是通过DNA重组技术,以一段段的形式将特定生物的遗传信息全部或大部分转移到繁殖很快的大肠杆菌中去,使之无性繁殖。由于需要把遗传物质切割成一定长度的片段,因此要建立一个能代表某种生物的信息含量的基因文库,往往要获得上万至上百万个携带有不同片段遗传物质的大肠杆菌。而一个生殖细胞所含有的信息量则大致等于或接近其所属物种的信息量。建立基因文库可以大量生产某些生物中含量很少的单拷贝基因,从而有利于对它的结构、功能和调控机制进行研究。

(劳卫德)