

6s 微管蛋白的提纯及其抗体的制备

蒋 传 葵

(中国科学院上海细胞生物研究所)

一、前 言

细胞骨架中主要结构组分之一是微管系统。现已知与组成微管有关的蛋白质有两大类:微管蛋白和微管伴随蛋白(MAPs),前者中包括 α -微管蛋白和 β -微管蛋白,其二聚体称为6s微管蛋白,而后者则包括高分子微管伴随蛋白(HMW)和分子量较小的tau蛋白,近年来对这些蛋白质的性质、提纯和其抗体的制备等研究都有相当大的进展。方法学上利用免疫荧光和免疫酶标促进了对细胞的微管系统及细胞骨架整体的了解。我们曾对组成微管的蛋白做过一些工作^[1,4]。本文报道我们在以前工作的基础上所做的6s微管蛋白的提纯和其抗体的制备。为了检测6s微管蛋白抗血清,我们还制备了可溶性过氧化物酶和过氧化物酶抗体的复合物(PAP)。

二、实验结果与讨论

1. 组成微管有关蛋白质的提取

为了便于在兔中制备抗体,采用小鸡脑作为提取抗原的材料。提取的方法基本采用聚合解聚循环法^[5],增强了超离心的g。提取的流程见图1。经过两个聚合解聚循环后得到的与组成微管有关蛋白质,再用来提纯6s微管蛋白。

将微管有关蛋白质进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(见图2-A)。可以看出,除6s微管蛋白(α -和 β -微管蛋白)外尚有一些高分子量和低分子量的微管伴随蛋白。从染色深度估计6s微管蛋白占主要部分。

2. 6s 微管蛋白的提纯

(1) 将第二聚合解聚循环所得130kg微管有关蛋白质沉降物溶于0.025M PIPES (1,4-哌

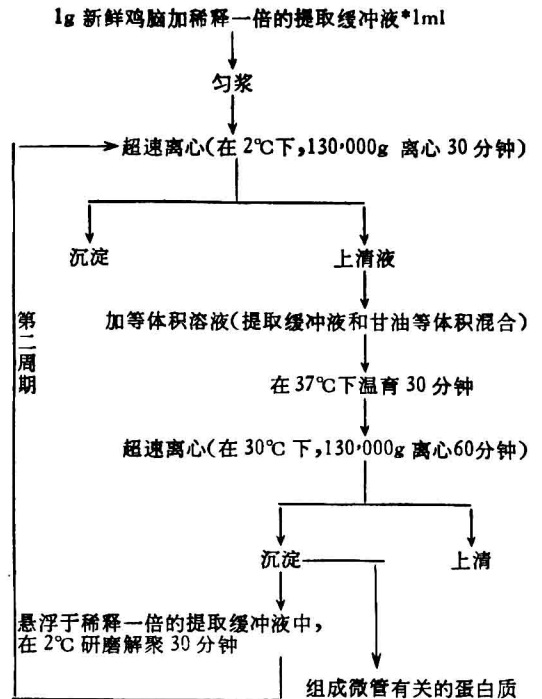


图1 制备组成微管有关蛋白质的流程

* 提取缓冲液含: 2mMMgCl₂、2mMGTP、0.2M PIPES、0.2mM EGTA

嗉双-乙磺酸), 0.5mM EGTA, 0.25mM MgSO₄, 0.1mM GTP, pH6.9 缓冲液中, 再用磷酸纤维素提纯6s微管蛋白。磷酸纤维素P11预先处理后与上述缓冲液进行平衡, 而后装柱, 上柱样品量是每1ml P11床体积上样1mg蛋白质, 在2°C下层析, 流速约为12ml/小时, 分管收集流出的液体, 在280nm波长下测定每管的光密



图2 微管有关蛋白质的SDS聚丙烯酰胺电泳图
A 微管有关蛋白100μg
B 6s微管蛋白50μg

度,合并含 6s 微管蛋白的各管,测定其蛋白质含量,并以此与上柱蛋白质量比较,计算回收率,这种分离方法基本上类似于 Clayton 氏^[6]法。

用上述方法共进行了三次实验,所得的 6s 微管蛋白质的回收率分别为 55.6%, 36.0% 和 51.1%,平均 44.2%(见表 1)。

表 1 用两种方法纯化 6s 微管蛋白的回收率比较

条件 次数	上柱条件	上柱前 总蛋白 量 (mg)	6s 微管 蛋白量 (mg)	回收率 (%)	回收率 增加的 百分比 (%)
第一次	clayton 氏法	19.95	11.10	55.60	
	含 Ca^{++} 缓冲液法	16.95	12.65	74.85	34.6
第二次	clayton 氏法	8.14	2.99	36.00	
	含 Ca^{++} 缓冲液法	8.14	4.50	55.30	53.6
第三次	clayton 氏法	7.08	3.62	51.10	
	含 Ca^{++} 缓冲液法	3.15	2.64	83.80	63.9

将分离纯化的 6s 微管蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果见图 3。由图 3 看出通过 P 11 提纯的蛋白质是 α -微管蛋白和 β -微管蛋白,没有可觉察的 MAP₂,虽然电泳上样量高达 100 μg 蛋白质。

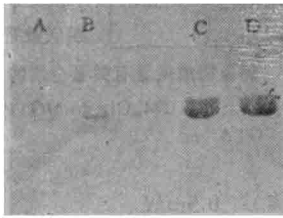


图 3 6s 微管蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺电泳图

- A. 以 clayton 氏法纯化的样品 50 μg 。
- B. 以含 Ca^{++} 缓冲液法纯化样品 50 μg 。
- C. 以 clayton 氏法纯化样品 100 μg 。
- D. 以含 Ca^{++} 缓冲液法纯化样品 100 μg 。

以上方法所得的 6s 微管蛋白是相当纯的。但回收率仅占层析上样蛋白质量的 44% 强,从上样前蛋白质电泳图 2-A 估计,6s 微管蛋白所占的比例应较高。因此,我们将上述方法做了修改。

(2) 因为 clayton 氏所用的缓冲液基本上是有利于微管蛋白和微管伴随蛋白在试管内聚合的,而我们提纯所用的原始材料又是 130k g

的沉降物(聚合的微管),我们怀疑溶于 clayton 氏缓冲液中的微管在 2 $^{\circ}\text{C}$ 未充分解聚。因而影响了回收率。已知 Ca^{++} 不但能抑制微管蛋白的聚合,而且可以促进微管的解聚^[7]。于是,我们采用了 0.025M PIPES, 0.5mM CaCl_2 , pH6.9 的缓冲液,然后用以此缓冲液平衡过的 P 11 柱层析。用本法进行了三次提纯。6s 微管蛋白的回收率分别为 74.9%、55.3% 和 83.8%,平均为 71%。6s 微管蛋白的回收率明显提高。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果见图 3D,电泳上样量虽高达 100 μg 蛋白质,仍无明显的微管伴随蛋白,仅见 α -和 β -微管蛋白质。

将这样得到的 6s 微管蛋白对 0.025M PIPES、0.5mM EGTA, pH6.9 缓冲液透析,除去钙离子,并将透析过的 6s 微管蛋白以 1.5mg/ml 的浓度在 0.5 mM GTP、0.5 mM MgCl_2 、1 mM EGTA、0.4M PIPES, 10%二甲亚砜 pH 6.9, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下聚合。图 4 是在波长 350nm 下光密度对时间的函数。此聚合动力学曲线说明用含 Ca^{++} 缓冲液提纯之 6s 微管蛋白,在除去 Ca^{++} 后能够聚合。

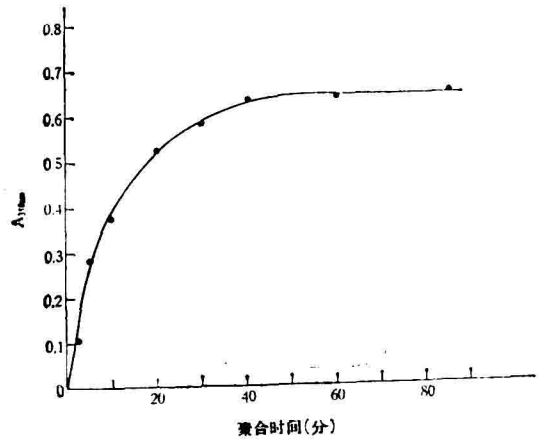


图 4 6s 微管蛋白的聚合动力学曲线

6s 微管蛋白浓度为 1.5mg/ml, 溶液系统含有 0.5 mM GTP, 0.5mM MgCl_2 , 1mM EGTA, 10% Me_2SO , 0.4M PIPES, pH6.9, 37 $^{\circ}\text{C}$

3. 兔抗鸡 6s 微管蛋白血清的制备^[8]

用上述两种方法获得的鸡 6s 微管蛋白免疫兔以获得兔抗鸡 6s 微管蛋白的血清。基础免疫抗原量为每只新西兰兔该免疫前血清作免疫酶标的细胞化学实验结果为阴性 0.5mg, 注

射时将此量的 6s 微管蛋白溶于 0.5ml 完全福氏佐剂内,以后每隔 10 天加强免疫一次,加强免疫时的佐剂是不完全福氏佐剂。由心脏放血取得血清。

这样获得的血清,稀释至 1:16 可获得满意的免疫酶标的细胞化学结果。图 5-A、B、C 就是用此稀释度免疫过氧化物酶酶标染色 (PAP 法)得到的。图中的细胞是爬片巨噬细胞。

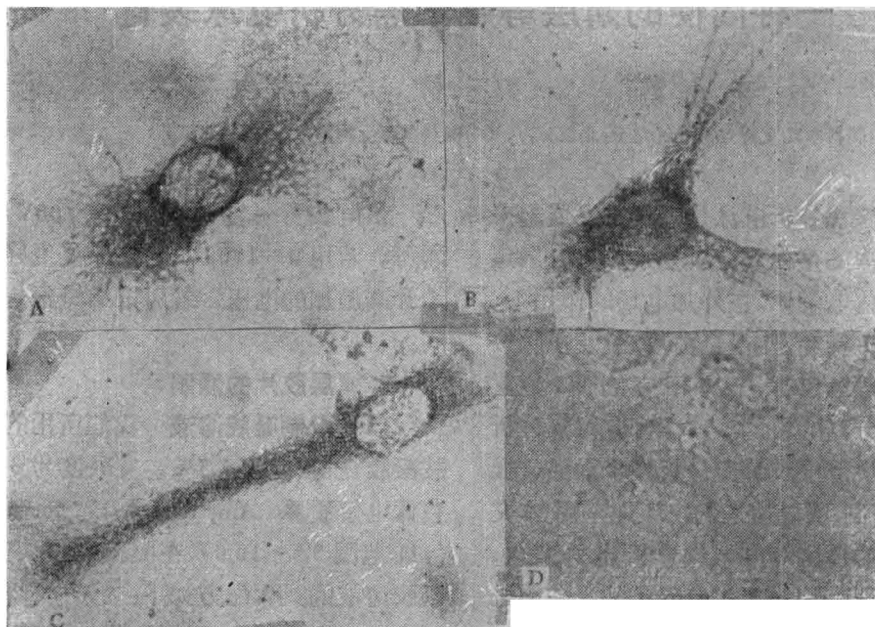


图 5 用 PAP 染色技术显示巨噬细胞的微管结构
A、B、C 为爬片的小鼠巨噬细胞的微管结构。D 为以牛血清白蛋白代替抗血清做 PAP 染色的空白对照。放大 1237×

附 录

1. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[9]

将待测样品用等体积冷丙酮沉淀,在 -20℃ 低温冰箱内放置过夜,次日,离心后将沉淀溶于样品缓冲液,在 100℃ 水浴中加热 90 秒钟,立即冷却备用。电泳上样时加 0.001% 溴酚兰溶液。

分离胶浓度为 6%,其中含 0.375M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.025% TEMED, 0.025% 过硫酸铵。

浓缩胶浓度为 3%,其中含 0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.025% TEMED, 0.025% 过硫酸铵。

电极缓冲液含 0.025M Tris, 0.192M 甘氨酸, 0.1% SDS, 最后调节 pH8.3。

样品缓冲液含 0.0625M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇。

电泳板厚 1mm, 电流 12mA, 电泳时间一般为 6 小时。染色液为 0.1% 考马斯亮兰,用醋酸:异丙醇:水 (10:25:65 体积比)配置。退色液为醋酸:异丙醇:水 (10:25:65 体积比)。

2. 蛋白质浓度的测定

按 Ohnishi^[10] 的缩脲福林合并法测定蛋白质的浓度,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

3. 过氧化物酶-抗过氧化物酶可溶性复合物(PAP)的制备。

按 Sternberger (1970)^[11]方法自制 PAP,用中科院生化所东风生化试剂厂出品的过氧化物酶 (RZ=3) 免疫兔子,得到兔抗过氧化物酶抗血清(双扩散法检验滴度为 1:32),以该抗血清和过氧化物酶反应得到复合物,利用该复合物在酸性溶解和中性沉淀的性质将复合物纯化,所得到 PAP 的 $A_{280nm} = 1.89$, $A_{405nm} = 0.9$ 。

本文得到施履吉教授和倪祖梅副教授的直接指导,得到林仲翔老师的关心,特此表示感谢。本文照片是由细胞所照像室和畜牧兽医所肖永平同志协助拍摄。还有杨扬、陆仕芳和金瑞芬同志参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] 施履吉《科学通报》, 7, 430, 1983。
- [2] 严缘昌等《科学通报》, 7, 431, 1983。
- [3] 倪祖梅等《科学通报》, 7, 434—436, 1983。

(下转第 68 页)

极面电流密度 $0.08-0.09\text{A}/\text{cm}^2$ 。再冷却水管装置控制阴极电解液在 40°C 左右。同时需经常向阳极区补加 2N 盐酸,以补充因电解和蒸发而造成的消耗,使电解液保持原有体积。电解过程中,阴极电解液的旋光值不断从左旋向右旋变化。在反应终点到达之前应每隔一定时间取样测定其旋光值,以掌握变化情况,当通电达 $8.5-9$ 小时,通电量达到 $850-900$ 安培小时,阴极电解液的旋光值往右旋转变至不再增高旋光读数,表示还原反应已达终点,即停止通电。

电解液再次用活性炭脱色过滤。滤液用薄膜浓缩装置浓缩至大量结晶析出(总体积约 3 立升),置冰库过夜。过滤,结晶用冰冷的 6N 盐酸洗二次后置固体氢氧化钠(工业用)上真空干燥,得 L-半胱氨酸盐酸盐-水合物 2000 克。

母液及洗滤液合并浓缩回收 L-半胱氨酸盐酸盐-水合物 $100-200$ 克, L-半胱氨酸盐酸盐总得量 $2.100-2000$ 克。

产率: $82\%-86\%$ (按照 L-胱氨酸 70% 纯度计算)。

1. 产品分析鉴定

含量:(按 $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 计算)不小于 99.0% (测 SH) $[\alpha]_D^{20} + 6.5^\circ \rightarrow +8.0^\circ$ (干品, $\text{C} = 5\%$ $1\text{N}\text{HCl}$)

层析: 纯($4:1:1:2$)

杂质含量: 约烧残渣 $<0.1\%$ 铁 (Fe) $<0.001\%$

重金属(Pb) $<0.001\%$

四、讨 论

1. L-半胱氨酸盐酸盐也可用 L-胱氨酸盐

(上接第 71 页)

- [4] 张基增等《实验生物学报》, **13**, 481, 1980.
- [5] Shelanski, M. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, (3), 765, 1973.
- [6] Clayton, L. et al.: *FEBS Letters*, **106**(1), 67, 1979.
- [7] Weisenberg, R. C.: *Science*, **177**, 1104, 1972.

酸盐通过化学还原方法制得^[3],但实验条件,操作方法都比电解还原法复杂。本文叙述的电解还原法,工艺简单,操作方便,安全可靠。我们用纯度差、不含有其他氨基酸、价格便宜的 L-胱氨酸粗品制得了合格的 L-半胱氨酸盐酸盐,产率也较高,具有实用价值和经济意义。

2. 电极材料对电解反应及其产物有重要影响。文献报道,可使用具有一定表面面积的锡、铜、银、镍片或炭棒中的任何一种作阴极,炭棒作阳极^[1],或利用铅、汞、锌、银、石墨等作阴极,铂、石墨、铅等作阳极^[2]。我们根据材料来源容易,价格低廉,加工和使用方便等条件,选用铅板作阴极,石墨作阳极,取得了满意的结果。

3. 电解反应的终点应准确掌握。电解过程中, L-胱氨酸 $[[\alpha]_D^{20} - 232^\circ (\text{C.1\% 在 } 5\text{N}\text{HCl 中})]$ 不断被还原成 L-半胱氨酸盐酸盐,阴极电解液旋光值不断从左旋向右旋转变,当通电进行到电解液的旋光值不再变化,趋向稳定时,即已达到反应终点,应即截断电流,终止反应。若继续延长电解时间,会引起反应液旋光值的波动,反而影响反应产率和产品纯度。

产品分析工作由分析室金承德同志完成,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Paul Rambacher: *U. S. P.* 2,907,703, 1959, C. A., **54**, p. 3015 h.
- [2] Yoshio Hosaka: *Tapan*, **2022**, 1962, C. A., **58**, 3104 C.
- [3] Stanislaw Rolski et al.: *Acta polon pharm.*, **19**(6) 523-6, 1962.

[本文于 1983 年 4 月 12 日收到]

- [8] Fuller, G. M. et al.: *Science*, **187**, 948, 1975.
- [9] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680, 1970.
- [10] Ohnishi, S. T.: *Anal. Biochem.*, **86**, 193, 1978.
- [11] Sternberger, L. A. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **18**(5), 315, 1970.

[本文于 1983 年 3 月 25 日收到]