

人血浆 α_2 -巨球蛋白的分离纯化

彭启明

(中国医科大学,沈阳)

张淑琴

(沈阳医学专科学校)

α_2 -巨球蛋白 (α_2 -Macroglobulin, 简称 α_2M) 是一种高分子量的糖蛋白,含糖量为 8—11%, 分子量为 725,000, 等电点为 5.5, 已知每克分子 α_2M 含有 4.8 克原子锌, 占血浆总锌含量的 20%。

α_2M 是血浆中重要的蛋白酶抑制剂。含量约为 2 毫克/毫升, 能抑制四种内肽酶的活性。 α_2M 使蛋白酶失活的机理尚未彻底弄清, 文献报道 α_2M 与胰蛋白酶、凝血酶、纤溶酶及激肽释放酶反应时, 可从 α_2M 分子上游离出一段多肽 (MW: 85000), 这一裂解作用使 α_2M 分子构象发生变化, 酶与经过这种变化的 α_2M 结合时, 酶掉进 α_2M 的陷阱 (Trap) 且是不可逆地。由于空间位置的障碍, 使酶失去对大分子底物的催化活力。然而这种结合并不占据酶的活性中心, 故对小分子量底物仍然保持其催化活性。这是 α_2M 与其他蛋白酶抑制剂作用的不同之处^[1]。

α_2M 的生理功能主要表现在它能使蛋白酶失活, 一旦 α_2M 与蛋白酶结合形成复合物, 则能被迅速地血循环中清除出去。因此, 它可作为细胞外蛋白酶释放的调节者, 例如, 在炎症区由粒细胞及其他细胞释放的蛋白酶可以与 α_2M 结合成复合物, 并运往网状内皮系统进行处理。但是, 在正常的情况下, 因 α_2M 的分子量太大不易透过血管, 只有当炎症时血管的通透性增加 α_2M 才可进入组织。因此, 在许多病理情况下, α_2M 可以以游离的或与蛋白酶形成复合物的形式在细胞外液中检出。例如, 在胸膜炎、腹膜炎、关节炎时, 可在胸水、腹水及关节液中检出 α_2M 与弹性蛋白酶及胶原蛋白酶形

成的复合物, 此作用能使胸膜、腹膜及关节软骨不被蛋白酶进一步破坏。由于 α_2M 作用的广泛性, 它可参与凝血、血栓形成, 活性肽的释放、机体防卫等许多重要的生理及病理过程的调节, 为研究这些作用, 1955 年, Schultze 等首先从人血浆中分离出了 α_2M ^[2], 随后国外许多文献报道了多种分离纯化方法, 包括沉淀分离、凝胶过滤、免疫吸附及电泳等。近年来, 更普遍的是应用各种亲和层析方法, 如 cibacron blue sepharose 柱层析等^[3-6]。国内在这方面的工作尚未见到报道。

材料及方法

锌螯合琼脂糖 (Zn-chelate sepharose 6B) 由美国国立大学医学中心王大栋教授赠送, 蓝色琼脂糖 (blue sepharose CL6B)、胰蛋白酶 (trypsin) 及大豆胰蛋白酶抑制剂 (ST1) 均由 SIGMA 产, DL-苯甲酰精氨酸对硝基苯胺 (BAPNA) 由 MERCK 产。

α_2M 活力测定 据 Ganrot 方法, 略有修改。将 0.05ml 检品中加入 0.85ml 的 Tris-HCl, pH8.2, 含 0.02M CaCl₂ 的缓冲液, 加入胰蛋白酶 0.05ml (2mg/ml) 于室温反应 3 分钟, 使 α_2M 与酶形成复合物, 然后加入 0.05ml 大豆胰蛋白酶抑制剂 (2mg/ml) 抑制剩余胰蛋白酶活力, 放置 3 分钟后加入 0.003M 的 BAPNA 2ml 于室温下反应 10 分钟, 用 30% 醋酸终止反应。由于 α_2M 与胰蛋白酶形成的复合物对小分子底物 BAPNA 仍有催化活性, 可使 BAPNA 水解产生黄色产物。用标准胰蛋白酶管及不加胰蛋白酶的空白管进行同样处理, 于 410nm 波长

下,用 721 型分光光度计比色分析,即可计算出 α_2M 结合胰蛋白酶的活力^[7]。

蛋白质含量的测定 用酚试剂法。

α_2M 的分离方法 第一步聚乙二醇分段沉淀。取健康献血者全血,按照每 100ml 全血中加入 0.13M 枸橼酸钠 10ml,大豆胰蛋白酶抑制剂 10mg,聚凝胺 (polybrene) 40mg 进行抗凝,离心后得血浆。在 4℃ 条件下,取 18ml 血浆加入两倍血浆容积的 0.02M NaH_2PO_4 , 0.1M NaCl, pH7.4 的缓冲液,然后缓慢加入 50% 的聚乙二醇 (polyethylene glycol 6000 或 8000, 简称 PEG),使 PEG 最终浓度为 4%,充分搅拌 15 分钟,离心弃去沉淀。于上清液中再加入 50% 的 PEG,使 PEG 最终浓度为 12%,再充分搅拌 15 分钟,离心后,尽量吸去全部上清液,所得沉淀即为富含 α_2M 部分。

第二步 Zn-chelate sepharose 6B 亲和层析分离。取 20 × 1cm,床体积为 17ml 的锌螯合琼脂糖层析柱,用 0.02M NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, pH6.4 缓冲液平衡后,将所得血浆 PEG 沉淀用 7.5ml 上述缓冲液溶解后直接上样,用同一缓冲液冲洗下第一峰。然后换成 0.1M Na_2EDTA , pH7.0 洗脱液洗下第二峰。测得 α_2M 活力部分

在第二峰。如图 1 所示。收集比活较高的 28—30 三管,体积 10ml,供下步分离使用。

第三步 Blue sepharose CL6B 亲和层析分离。取 12.5 × 1.5cm,床体积 22ml 的蓝色琼脂糖层析柱,用 0.05M Tris-HCl, pH8.0 缓冲液平衡后,将第二步分离所得 10ml 样品用 2M Tris-HCl, pH9.0 缓冲液调 pH 至 8.0 后上样,用 0.05M Tris-HCl, pH 8.6 缓冲液洗下第一峰。然后加大离子强度用 0.05M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.0 缓冲液洗脱下第二峰。测得 α_2M 活力部分在第一峰的前半部分。如图 2 所示。收集比活较高的 3—4 两管,体积 10ml,供下步分离使用。

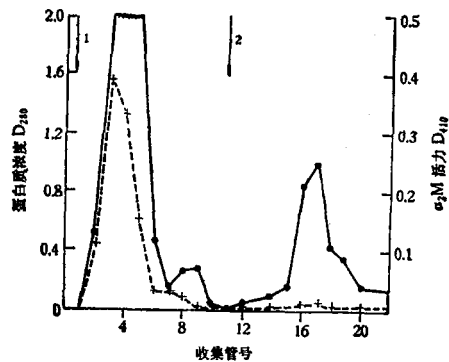


图 2 Blue sepharose CL6B 分离人血浆 α_2M 层析图

蛋白质浓度 —●—●—
 α_2M 活力 --+--+--
 1 为 0.05M Tris-HCl, pH8.0 缓冲液
 2 为 0.05M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH8.0 缓冲液

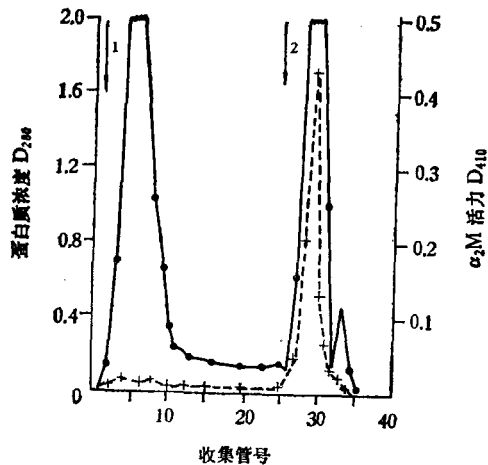


图 1 Zn-Chelate sepharose 6B 分离人血浆 α_2M 层析图

蛋白质浓度 —●—●—
 α_2M 活力 --+--+--
 1 为 0.02M NaH_2PO_4 , 0.5M NaCl, pH6.4 缓冲液
 2 为 0.1M Na_2EDTA , pH7.0 缓冲液

第四步 Zn-Chelate sepharose 6B 柱再次亲和层析分离。将第三步分离所得的 10ml 样品用 2M NaH_2PO_4 , pH5.5 缓冲液调 pH 至 6.4 后上样,条件与第二步分离相同。第一峰杂蛋白质较少,测得 α_2M 活力部分在第二峰。如图 3 所示。收集比活最高的第 15 管,体积 4ml,即为 α_2M 纯化产品。

经上述四步分离所得 α_2M 产品纯化倍数达 72 倍,活力回收在 31% 以上。如表 1 所示。

α_2M 的纯度鉴定 采用 SDS-梯度聚丙烯酰胺凝胶平板电泳,凝胶浓度为 5—18%,稳流 40mA, 4 小时。染色、洗脱。从所得电泳图谱

表1 人血浆 α_2M 分离纯化过程中蛋白质含量及活力回收

分离步骤	体积 ml	蛋白质浓度 mg/ml	活力 mg/ml	比活 mg/mg	总活力 mg	活力回收 %	纯化倍数
血浆	18.0	67.87	0.248	0.0037	4.46	100	1
第一步	7.5	64.18	0.538	0.0084	4.04	90.7	2.3
第二步	10.0	10.54	0.270	0.0256	2.70	60.8	6.9
第三步	10.0	2.36	0.233	0.0986	2.34	52.0	26.7
第四步	4.0	1.30	0.347	0.2600	1.39	31.1	72.2

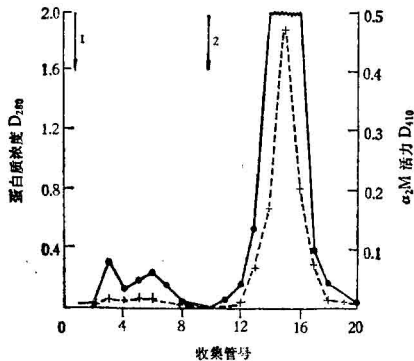


图3 第二次 Zn-chelate sepharose 6B 分离人血浆 α_2M 层析图

蛋白质浓度 —●—●—
 α_2M 活力 --+--+--

1 为 0.02M NaH_2PO_4 , 0.5M $NaCl$, pH6.4 缓冲液
 2 为 0.1M Na_2EDTA , pH7.0 缓冲液

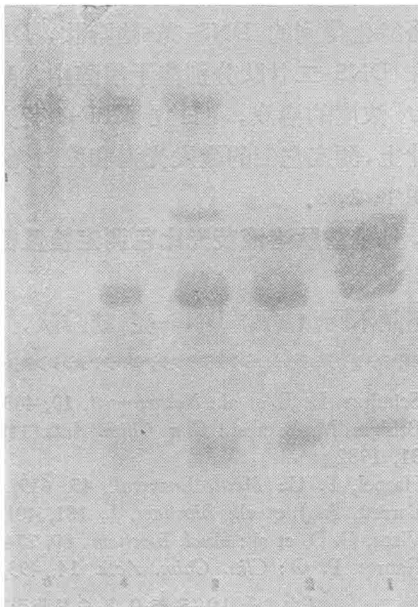


图4 SDS-梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
 (上面为负极,下面为正极)

1 血浆 2, 4—12% PEG 沉淀 3, 第一次锌螯合柱层析
 4, 蓝色琼脂糖柱层析 5, 第二次锌螯合柱层析

上可以看到, 血浆经四步纯化, α_2M 含量逐步增高(血浆中 α_2M 含量极少, 区带很细, 照像后看不清), 杂蛋白质逐步减少, 最终 α_2M 纯化产品为一条区带。电泳图谱如图 4 所示。

结果与讨论

α_2M 是所有内肽酶的抑制剂, 因此从血浆中提取时, 很容易与血浆蛋白酶反应而失去活力。它也能因与胺类结合而失活。过去曾采用 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀分离, 因不能保持其活性而告失败。此次我们采用了聚乙二醇分段沉淀, 收集 4—12% 浓度的沉淀富含 α_2M , 活力回收达 90%。为防止 α_2M 与血浆蛋白酶结合, 加入聚凝胺和大豆胰蛋白酶抑制剂。并且在操作过程中避免接触普通玻璃, 全部采用硅化玻璃或塑料器材, 以防止哈哥曼因子的激活。反应条件均控制在 4℃ 冰室中进行。因此, 最终产品比活较高。

为将 α_2M 与血浆中其他大分子蛋白成分如 β -脂蛋白、纤维蛋白原、免疫球蛋白 M 及 A、触珠蛋白等分离开, 我们进行了三步亲和层析, 锌螯合琼脂糖是一种金属螯合亲和层析技术, 是一较新的分离方法。由于 α_2M 分子上富含半胱氨酸残基, 它能与锌离子形成复合物而被吸附在琼脂糖上, 从而与其他不易被吸附的蛋白质分开。Blue sepharose CL6B 含有色素, 它对一切含有腺苷酸为辅酶的酶类、清蛋白及各种凝血因子、转铁蛋白等均有较高的亲和力, 而对 α_2M 的亲和力很小, 因此能将 α_2M 与多种血浆杂蛋白分离, 分离时 α_2M 被首先冲下来形成一个穿透峰, α_2M 活力部分在该峰的前半部分。

丹磺酰肽的荧光定量分析法研究

潘小平 蔡金莲 张炳海 王德岭

(上海医科大学基础医学部化学教研室)

丹磺酰氯和肽反应,得丹磺酰肽(DNS-肽),它具有很强的荧光,对酸水解十分稳定,目前广泛地应用于肽和蛋白质的N-末端氨基酸分析^[1],也用于组织中氨基酸含量的超微量定量分析^[2,3]。近几年,将此法试用于脑脊液和脑组织中小肽含量的测定^[4,5],不但灵敏度高,荧光强度稳定,而且线性关系良好,重复性也很好。现将我们试用结果介绍如后。

实验和结果

1. 肽的荧光标记

实验用的亮氨酸脑啡肽和脑新肽,由中国科学院上海生化所合成^[6]。丹磺酰氯(DNS-Cl)为BDH出品。丹磺酰肽的制备,是根据Gray的方法^[1]。称取约20 μ g的肽,置于微量玻璃试管中,加入30 μ l 0.2N NaHCO₃溶液(调pH到9.5,用无氨蒸馏水配制),再加等体积的DNS-Cl丙酮溶液(2.5mg/ml),用塞子盖紧后,在37 $^{\circ}$ C水浴中保温1小时,或避光放置过夜。加1N HCl酸化到pH4左右,以分解多余的DNS-Cl,真空干燥。

我们纯化的 α_2 M产品经SDS-梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为一条区带,与国外文献报道的电泳图谱比较结果相同^[1,3]。证明其纯度较高。可用于制备抗血清。

本文经美国国立大学医学中心王大栋教授指导,特此致谢。

2. DNS-肽的纯化

在上述干燥的DNS-肽样品中,加入少量质谱纯甲醇溶解,在硅胶G(GF₂₅₄, Type 60, Merk)薄板上(10 \times 10cm)点样,层析,以除去DNS-Cl的分解产物DNS-OH和DNS-NH₂等杂质。层析时,第I相用正丁醇:醋酸:水=4:1:1溶剂系统展开,第II相用正庚烷:正丁醇:醋酸=3:3:1溶剂系统展开。干燥后在365nm波长紫外灯下定出DNS-肽斑点的位置,将此斑点,连同硅胶吸入小层析管中,用质谱纯甲醇洗脱,洗脱液真空干燥。再用质谱纯氯仿抽提一次,真空干燥,得纯品。

3. 丹磺酰肽的激发光谱和发射光谱的测定

将纯化得到的DNS-亮-脑啡肽, DNS-脑新肽和DNS-二甘肽分别溶于甲醇中,配制成10⁻¹²M浓度的溶液,在日立MPF-4荧光分光光度计上,测定它们的激发光谱和发射光谱,结果见图1, 2, 3。

4. 丹磺酰肽溶液荧光比色测定检量标准曲线

配制不同浓度的DNS-亮-脑啡肽, DNS-

[2] Schultze, H. E. et al.: *Naturforsch.*, **10**, 463, 1955.
 [3] Bridges, M. A. et al.: *Clin. Chim. Acta.* **118**, 21-31, 1982.
 [4] Harpel, P. C.: *Meth. Enzymol.*, **45**, 639, 1976
 [5] Barrett, A. J. et al.: *Biochem. J.*, **181**, 401, 1979.
 [6] Virca, G. D. et al.: *Anal. Biochem.*, **89**, 274, 1978.
 [7] Ganrot, P. O.: *Clin. Chim. Acta.* **14**, 493, 1966.

[本文于1985年9月6日收到]

参 考 文 献

[1] Barrett, A. J. et al.: *Biochem. J.*, **133**, 709, 1973.