

与快紫 B 作用形成亮红色区带,以鉴定 PEPC 在凝胶上的分布位置。SDS 凝胶用考马斯亮蓝染色。

2 结果与讨论

2.1 C₄, C₃, CAM 植物 PEPC 亚基分子量 用 SDS-PAGE 方法测定显示 C₄ 玉米和 CAM *Argemone* 亚基分子量均为 100kD; C₃ 小麦 PEPC 亚基分子量为 90kD (图 1)。

2.2 C₄, C₃, CAM 植物叶 PEPC 分子聚体 用原性凝胶电泳结合快紫 B 活性染色测定,显示 C₄ 玉米叶 PEPC 聚体分子量为 400kD,由于亚基分子量为 100kD,为四聚体。CAM 植物 *Argemone* PEPC 分子量为 200kD,由于亚基分子量为 100kD,为二聚体。C₃ 小麦叶 PEPC 聚体分子量一为 180kD,一为 90kD,由于亚基分子量为 90kD,故为二聚体和单体两种形式。上述结果说明在光照条件下,叶 PEPC 分子具活性的聚体有单体、二聚体、四聚体多种形式,不同光合型植物具有不同形式。

2.3 pH 对 C₄, CAM 植物叶 PEPC 分子聚合状态的影响 用原性凝胶电泳结合快紫 B 活性染色,比较 C₄ 玉米在不同 pH 时叶 PEPC 分子聚合状态。显示 pH 8.0 时分子聚体为 400kD,为四聚体,当 pH 为 7.0 或 8.9 时,活性染色大大减弱,说明 pH 不适,聚体介离大于聚合状态。用同样的方法研究 CAM 植物 *Argemone*,显示最适 pH 为 7.0,呈二聚体。pH 5.8 或 8.0 时活性染色能力减弱,pH 4.5 时活性染色消失。

2.4 光/暗对 C₄, CAM 植物叶 PEPC 分子聚体的影响 用原性凝胶电泳结合快紫 B 染色,显示 C₄ 玉米在光照下 12h,叶 PEPC 具活性的聚体其分子量为 400kD,为四聚体;而在黑暗下 12h 活性染色消失,但

在分子量约 5kD 处有微弱的活性染色,这种现象尚难解释。用同样的方法显示 CAM *Argemone* 在光照下 12h,叶 PEPC 具活性的聚体其分子量为 200kD,为二聚体;而在黑暗下 12h,具活性的聚体其分子量也为 200kD 左右,亦为二聚体。但从多次实验看出 *Argemone* 在 400kD 位置上有微弱的染色。看来其四聚体可能是一种不稳定的状态,较易解离为二聚体。

Matsuoka 等^[7]曾发现 C₃ 水稻 PEPC 在亚基上有光激活和暗激活两种类型,C₄ 玉米仅为一种受光激活的类型。结合我们的资料分析可以认为:C₄ 向 CAM 和 C₃ 进化的过程中,光激活亚基加强,暗激活亚基退化发展为 C₄ PEPC。而 CAM 植物 PEPC 则保留了 C₃ PEPC 的二种类型亚基,在白天由光激活亚基聚合成具活性的二聚体;在夜晚由暗激活的亚基聚合为另一种具活性的二聚体或四聚体^[1]。

综上所述,由于植物光合型和环境条件的不同,PEPC 聚体形式呈多样性,这在代谢功能的调节上无疑地具有十分重要的作用,进一步研究 PEPC 分子聚体形成和调节机理是今后值得探讨的问题。

参 考 文 献

- 1 O'Leary M B. *Ann Rev Plant Physiol*. 1982; 33: 297
- 2 Aoyagi K, Bassham J A. *Plant Physiol*, 1985; 78: 807
- 3 Aoyagi K, Bassham J A. *Plant Physiol*, 1986; 80: 334
- 4 Jiao J A, Chollet R. *Arch Biochem Biophys*, 1988; 261(2): 409
- 5 Wu M X, Wedding R T. *Arch Biochem Biophys*, 1985; 240(2): 655
- 6 Karn R C. *Biochim Biophys Acta*, 1973; 293: 567
- 7 Matsuoka M, Yamamoto N. *Plant Cell Physiol*, 1989; 30(4): 479

商陆毒蛋白与蓖麻毒蛋白 A 链作为免疫毒素“弹头”的比较研究

褚嘉佑 朱晓梅* 张和君 胡忠* 杨爱德** 王辨明** 郭仁

(中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650107)

关键词 免疫毒素,商陆毒蛋白,蓖麻毒蛋白,单克隆抗体

免疫毒素系由具有导向能力的载体和具有杀伤能力的毒素或药物偶联形成的复合物。单克隆抗体的问世使载体的高度特异性得到解决,选择合适的“弹头”

* 中国科学院昆明植物研究所

** 同济医科大学血液病研究所

收稿日期: 1991-04-05

修回日期: 1991-09-10

即成为免疫毒素制备的重要因素。我们将商陆属两种植物中提取的商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral protein from seeds, PAP-S) 与国外在免疫毒素中最常用的弹头药物蓖麻毒蛋白 A 链 (ricin A) 进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料

美洲商陆抗病毒蛋白 PAP-S(am), 从美洲商陆属植物 *Phytolacca americana* 种子中提取; 中国商陆抗病毒蛋白 PAP-S(ac), 从云南分布的商陆属植物 *Phytolacca acinosa* 种子中提取和纯化; 蓖麻毒蛋白 A 链 ricin A, 购自美国 Sigma 公司; ^{14}C -亮氨酸, 为英国 Amersham 产品; ^3H -亮氨酸, 为中国科学院上海核技术开发公司产品; N-琥珀酰 胺-3-(2-二硫吡啶)丙酸 (SPDP) 为第四军医大学生化教研室和美国 Sigma 公司产品; 抗人 T 细胞单克隆抗体 Wu71 和 FITC-兔抗鼠 IgG 为卫生部武汉生物制品研究所史良如教授提供。为 IgG1 亚类单抗, 相当于 CD5, 识别全部入外周血 T 细胞及慢性 B 淋巴细胞性白血病细胞, 相应的抗原分子量为 67kD^[1]。

细胞株: 人 T 淋巴细胞白血病 CEM 细胞株, 人 B 淋巴细胞白血病 Raji 细胞。

1.2 PAP-S 的提取及其理化性质测定

详见另文 [2]。

1.3 蚀斑抑制法检测 PAP-S(am) 和 PAP-S(ac) 的抗病毒活性^[3,4]

健康猴肾细胞以 0.25% 胰酶液灌注肾脏, 使成单个细胞, 以营养液悬浮细胞成 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 接种于 50ml 小方瓶, 37°C 培养 7d, 使成单层, 取 III 型脊髓灰质炎病毒, 以爱尔氏液稀释 1×10^4 倍, 装小管内, 每管 0.9ml, 加入用爱尔氏液稀释的 PAP-S (am), 或 PAP-S (ac) 0.1ml, 对照加入 0.1ml 爱尔氏液, 以 PBS 洗细胞一次后, 接种于致密单层细胞上, 吸附 50 min, 加蚀斑营养液 5ml, 37°C 避光培养 3d 后观察蚀斑数, 计算结果。

1.4 无细胞蛋白质合成系统测定 PAP-S(am), PAP-S(ac) 和 ricin A 抑制无细胞蛋白质合成的活性

参照文献 [5,6] 的方法, 建立一个可用于分析蛋白质毒力的兔网织红细胞蛋白质合成体系 (共 90 μl 反应液, 含 KCl, MgCl₂, 19 种氨基酸及 6 μCi ³H-亮氨酸)。取反应液 89 μl , 对照组加入 1 μl 双蒸水, 反应组分别加入 PAP-S(am), PAP-S(ac) 和 ricin A 溶液 1 μl , 使其终浓度为 $1 \times 10^{-10}\text{mol/L}$ 37°C 反应 1h 后, 取 5 μl 反应液在 Whatman 3 号滤纸上, 进行液体闪烁计数。

1.5 Wu71:PAP-S 和 Wu71:ricinA 免疫毒素

的制备及其测定

Wu71:PAP-S 的制备, 详见文献 [7]。

Wu71:ricin A 的偶联方法相似, 制成抗体-SPDP 衍生物后用二硫苏糖醇 (DTT) 还原通过 SH 基与 -S-S-交换反应, 将抗体与 ricin A 连接起来。

抗体: 毒素偶联物用间接免疫荧光检测抗体活性。常规免疫制备免抗 PAP 抗血清, 用免疫双扩散检测抗体和毒素的抗原性, 用 SDS-PAGE 检测其组成。

1.6 细胞毒作用测定

方法见文献 [7], 在 96 孔板上无亮氨酸培养液中培养的 CEM 细胞中加入不同浓度的 PAP-S, ricin A 或 Wu 71:PAP-S, Wu71: ricin A, 37°C 培养 20h 后加入 ^{14}C -亮氨酸, 继续培养 5h, 微孔滤膜抽滤, 液闪测量。

2 结 果

2.1 PAP-(am) 和 PAP-(ac) 的理化性质

SDS-PAGE 测得 PAP-S(am) 和 PAP-S(ac) 的分子量均为 30kD, 与凝胶过滤层析结果一致。盘状电泳测得 PAP-S(am) 和 PAP-S(ac) 均为碱性蛋白, 等电点为 8.4。氨基酸测定表明 PAP-S(am) 和 PAP-S (ac) 的氨基酸组成相近, 富含天冬氨酸和赖氨酸, 与文献报道的 PAP-S 氨基酸组成相符^[8]。Edman 降解法分析 N 端氨基酸, 高压液相层析结果显示 PAP-S(am) 和 PAP-S (ac) 的末端氨基酸均为异亮氨酸, 与文献报道的 PAP-S 一致^[9]。

2.2 PAP-S 的抗病毒活性

蚀斑抑制试验 (表 1) 显示, PAP-S(am) 和 PAP-S (ac) 均有很强的抗病毒作用, 在猴肾细胞培养液中加入浓度为 10^{-8}mol/L 的 PAP-S (am) 和 PAP-S(ac) 分别能抑制 97.3% 和 97.2% 的 III 型脊髓灰质炎病毒增殖, 二者抗病毒活性无显著差异。

表 1 蚀斑抑制试验检测 PAP-S(am) 和 PAP-S (ac) 的抗病毒活性

毒素	毒素含量 mol/L	蚀斑数 X \pm SD	蚀斑形成单 位/ml	抑制率 %
PAP-S (am)	3.3×10^{-8}	7.00 \pm 1.00	2.76×10^5	97.3
	3.3×10^{-9}	49.33 \pm 1.53	2.47×10^6	79.1
	3.3×10^{-10}	113.67 \pm 1.52	5.69×10^6	52.0
PAP-S (ac)	3.3×10^{-8}	6.67 \pm 1.00	3.33×10^5	97.2
	3.3×10^{-9}	65.00 \pm 5.57	3.25×10^6	72.5
	3.3×10^{-10}	135.00 \pm 10.44	6.75×10^6	43.0

病毒对照蚀斑数 236.7 \pm 32.15, 细胞对照蚀斑数 0.00, n = 3。

2.3 PAP-S 和 ricin A 在无细胞系统中抑制蛋白质合成的作用

PAP-S (am) 和 PAP-S (ac) 抑制无细胞蛋白质合成的 ID_{50} 分别为 2.51ng/ml ($8.36 \times 10^{-11}\text{mol/L}$) 和 2.67ng/ml ($8.91 \times 10^{-11}\text{mol/L}$), 与文献报道的 PAP-S 抑制活性 1.1ng/ml ($3.6 \times 10^{-11}\text{mol/L}$) 相近^[8], ricin A 抑制无细胞蛋白质合成的 ID_{50} 为 2.49ng/ml ($8.3 \times 10^{-11}\text{mol/L}$), 三者活性无统计学差异。

2.4 Wu71:PAP 和 Wu71:ricinA 对完整细胞蛋白质合成的抑制作用

完整细胞中 ^{14}C -亮氨酸掺入蛋白质合成抑制实验 (图 1) 显示 Wu71:PAP-S (am) 在 10^{-9}mol/L 时对蛋白质合成抑制率为 72.4%, 在 10^{-10}mol/L 时为 42.38%。

Wu71:ricin A 在 10^{-9}mol/L 时对蛋白质合成率为 72.7%, 在 10^{-10}mol/L 时为 45.9%。

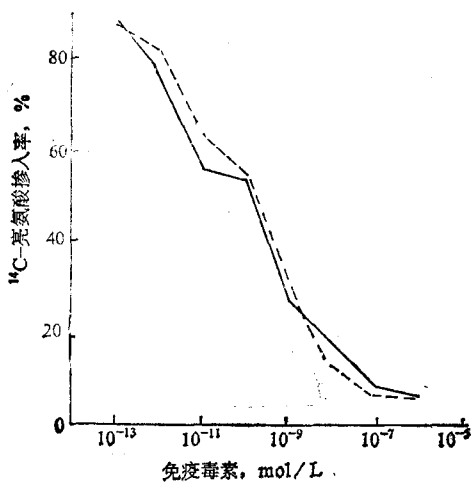


图 1 免疫毒素对蛋白质合成的抑制作用

——Wu71:PAP-S(am) -----Wu71:ricin A

2.5 游离 PAP-S 和 ricin A 的细胞毒作用

游离 PAP-S(am) 和 PAP-S(ac) 在较低浓度下对白血病细胞无明显杀伤作用, 浓度为 10^{-9}mol/L 时, PAP-S(am) 可杀伤 10.9% 的 CEM 细胞和 11.2% 的 Raji 细胞, 二者无明显差异。PAP-S(ac) 可杀伤 9.9% 的 CEM 细胞和 10.4% 的 Raji 细胞, 与 PAP-S(am) 基本一致。

游离 ricin A 在 10^{-9}mol/L 时 8.9% 的 CEM 细胞和 9.0% 的 Raji 细胞。

2.6 Wu71:PAP 和 Wu71:ricin A 对白血病细胞 CEM 的特异杀灭作用

处理 72h 后, Wu71:PAP-S (am), Wu71:PAP-S(ac) 和 Wu71:ricin A 对 CEM 细胞的杀灭率分别为 76.4%, 72.2% 和 78.1%; 对于非靶细胞 Raji, 三种免疫毒素的杀灭率分别为 11.2%, 8.7% 和 13.4%。三种免疫毒素之间无显著性差异, 而对非靶

细胞与靶细胞的杀灭均有显著性差异 (图 2)。

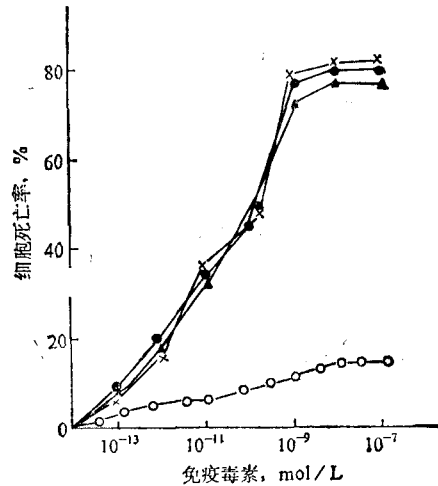


图 2 免疫毒素对 CEM 和 Raji 细胞的杀灭作用

●——● Wu71:PAP-S(am) 作用 CEM 细胞
▲——▲ Wu71:PAP-S(ac) 作用 CEM 细胞
×——× Wu71:ricinA 作用 CEM 细胞
○——○ Wu71:PAP-S(am) 作用 Raji 细胞

3 讨论

ricin 由 A, B 两条链组成, 二者间靠二硫键连接。A 链单独存在时毒性极低, 但 A 链的分离十分困难, 很易带有 B 链成分而表现非特异性杀伤^[10]。

植物界中存在的单链核糖体失活蛋白 (RIP) 的结构和作用机制等都与 ricin A 相似, 这类 RIP 在无细胞系统对蛋白质生物合成的抑制活性不亚于 ricin A, 但因其不具备细胞结合能力, 对动物毒性很低, PAP 即其中一种。值得注意的是云南广泛生长的另一种商陆属植物 *Phytolacca acinosa* 种子中提取的 PAP-S(ac) 在分子量、等电点和氨基酸组成上均与 PAP-S(am) 相同, 其抗病毒作用、细胞毒作用及对免疫细胞合成系统的抑制作用等生物活性也与 PAP-S(am) 一致。尤其是用 PAP-S(am) 制备兔抗血清, 在琼脂免疫双扩散中可见 PAP-S(am) 和 PAP-S(ac) 均与兔抗血清发生沉淀反应, 表明它们具有共同的抗原性。提示可以用其代替 PAP-S(am) 制备免疫毒素。这在开发植物资源利用上有重要价值。

用 PAP-S(am) 分别与抗人 T 细胞单抗 Wu71 组成免疫毒素, 结果显示 72h 可杀灭白血病 T 淋巴细胞 CEM 的 76.4% 和 72.2%, 这应考虑到 CEM 细胞仅有 80—87% 表达 Wu71(CD5) 抗原^[11], 至于靶细胞的进一步杀灭, 可以通过多种单抗制备的混合免疫毒素来解决。这种混合免疫毒素不仅可以解决肿瘤细胞的异质性问题, 也有助于迅速杀死肿瘤细胞而避免抗药性的产生。

稳定性的检测表明两种 PAP 及其与单抗的偶合物均比 ricin A 及其偶合物稳定。实验结果表明, PAP 在抗病毒、体外系统抑制蛋白质合成,与单抗偶联制备免疫毒素等方面均可与 ricinA 媲美,由于 PAP 的应用绕开了复杂的 ricin A 纯化问题,我们支持 PAP 可能成为免疫毒素制备中“弹头”药物更好的选择的提法^[12]。

参 考 文 献

- 1 史良如. Schneider M, Ziegler *et al.* 中华微生物学和免疫学杂志, 1984;4:141
- 2 朱晓梅,胡忠. 云南植物学研究, 1989;(3):12
- 3 Irvin J D. *Pharma Chem*, 1983; 21:371
- 4 Duggar B M, Armstrong J K. *Ann Mo Bot Grad*, 1925, 2:359;

- 5 Maniatis T. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 171-175
- 6 申庆祥,郭礼和. 实验生物学报, 1984;17:193
- 7 褚嘉佑,杨爱德,王辨明等. 同济医科大学学报, 1989;(3):152
- 8 Barbicri L, Aron G M, Irvin J D *et al.* *Biochem J*, 1982; 203:55
- 9 Hoston L L, Ramakrishnan S, Hermodson M A. *J Bio Chem*, 1983; 258:9601
- 10 Vitetta E S, Krolick K A, Inaba M M, *et al.* *Science*, 1983; 219:644.
- 11 Mcmichael A J. *Leucocyte typing III: White cell differentiation antigens*. Oxford University Press, 1987: 56-60
- 12 Ramakrishnan S, Hoston L. *Cancer Res*, 1984; 44: 201

猪血浆 α_1 -抗胰蛋白酶的分离纯化

周 昂* 郑远旗

(四川大学生化教研室,成都 610064)

关键词 α_1 -抗胰蛋白酶,猪血浆, ConA-sepharose 4B 亲和层析,纯化

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -Antitrypsin, 简称 α_1 -AT) 是由肝细胞分泌的一种糖蛋白,是存在于动物血液中的一种重要的蛋白酶抑制剂,它能抑制多种丝氨酸类蛋白水解酶,占血浆胰蛋白酶抑制总活力的 90% 以上^[1,2]。 α_1 -AT 通过调节蛋白水解酶的活性而参与机体的一系列生理活动,如血液凝固、纤维蛋白溶解、组织激肽释放、细胞融合、大分子装配和免疫反应等过程,对防止组织过度损伤有重要作用。目前国际上对人的 α_1 -AT 研究较多,而对猪 α_1 -AT 的研究甚少,仅见 R. Geiger^[3]有纯化猪 α_1 -AT 的报道,但他所用的方法较复杂,步骤较多,不适于简便快速地纯化猪 α_1 -AT。本文采用了自制的 ConA-sepharose 4B 亲和层析柱成功地纯化出猪 α_1 -AT (经初步研究猪 α_1 -AT 与人 α_1 -AT 有相似的理化性质,详见另文),为拓宽 α_1 -AT 的新来源,为将猪 α_1 -AT 和人 α_1 -AT 作比较研究以及代替人 α_1 -AT 作理论研究和临床应用研究打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂 取屠宰猪血经抗凝后离心得血浆。ConA 为 Sigma 产品, Sepharose 4B, Sepha-

dex G-75 为 Pharmacia 产品, DEAE₂ cellulose 为 Whatman 产品,胰蛋白酶为 Boehringer Mannheim GMBH 产品,苯甲酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE) 为上海生化所产品,其余所用试剂均为国产分析纯或优级纯试剂。

1.2 蛋白质含量测定 按 Lowry^[4]法。

1.3 α_1 -AT 活力测定 按文献 [5],以 BAEE 为底物,将 α_1 -AT 与一定量的胰蛋白酶作用,测胰蛋白酶被抑制的活力大小表示为 α_1 -AT 的活力,即抑制 1 个胰蛋白酶活力单位 (BAEE 单位)所需的 α_1 -AT 的量定为抑制剂的 1 个活力单位,用 BAEE 单位表示。比活以每 1 mg α_1 -AT 所具有的活力单位数来表示即 BAEE 单位/ mg。

1.4 ConA-sepharose 4B 的制备 按文献 [6]。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 按文献 [7]。

1.6 分离纯化步骤^[8-10]

1.6.1 硫酸铵分级沉淀 取猪血浆 50ml,加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀静置后于 4℃、5000 r/min 离心 20min,取上清液加入硫酸铵达 75% 饱

* 现在南充市四川师范学院工作。

收稿日期: 1991-04-18 修回日期: 1991-11-11