

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

和度,同样离心得沉淀,将沉淀溶解于 pH 6.4, 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中,透析后用聚乙二醇浓缩.

1.6.2 DEAE₂ cellulose 离子交换层析 柱床为 2cm × 35cm, 用 pH6.4, 0.05 mol/L PBS 平衡后上样,再用平衡液洗脱,待 $A_{280nm} < 0.1$ 时换用 pH6.4, 0.12mol/L PBS 洗脱. 收集活力部分, 用 pH 7.6, 0.05mol/L PBS(含0.5mol/L NaCl)透析后用聚乙二醇浓缩.

1.6.3 ConA-sepharose 4B 亲和层析 柱床 2 cm × 25 cm, 用 pH 7.6, 0.05 mol/L PBS (含 0.5 mol/L NaCl) 平衡,上样后用平衡液洗脱,当 $A_{280nm} \leq 0.05$ 时换用含 0.2mol/L α -甲基 D-葡萄糖苷的平衡液洗脱,收集活力部分,再用 pH7.6,0.05 mol/L PBS 透析后聚乙二醇浓缩.

1.6.4 Sephadex G-75 凝胶过滤 柱床为 1.5

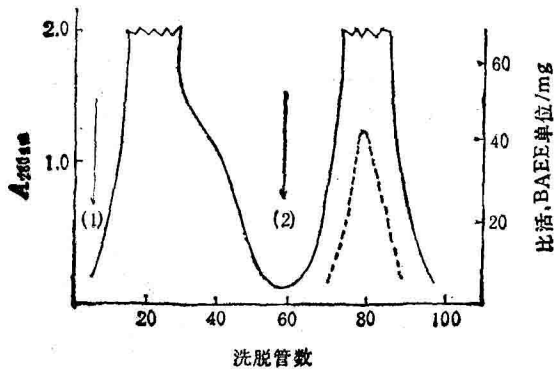


图1 DEAE₂ cellulose 离子交换层析

箭头(1)表示用 pH6.4, 0.05mol/L PBS 洗脱, 箭头(2)表示用 pH6.4, 0.12mol/L PBS 洗脱, 虚线表示比活,每管 10min 收集 3ml

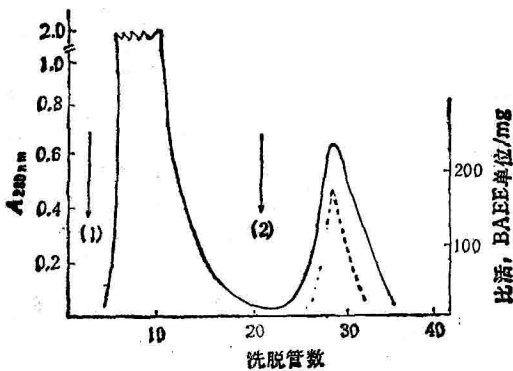


图2 ConA-sepharose 4B 亲和层析

箭头(1)表示用 pH 7.6, 0.05 mol/L PBS (含 0.5mol/L NaCl) 洗脱, 箭头(2)表示用 pH7.6, 0.05mol/L PBS (含 0.5mol/L NaCl, 0.2mol/L α -甲基D-葡萄糖苷)洗脱,虚线表示比活,每管10min 收集 2ml

cm × 50cm, 用 pH7.6, 0.05mol/L PBS 平衡, 上样后用平衡液洗脱.

2 结果与讨论

样品经硫酸铵分级沉淀后再通过离子交换层析, 洗脱曲线如图 1.

收集离子交换层析后的活力部分经亲和层析后其洗脱曲线如图 2.

亲和层析后的活力部分再通过凝胶过滤, 洗脱曲线如图 3.

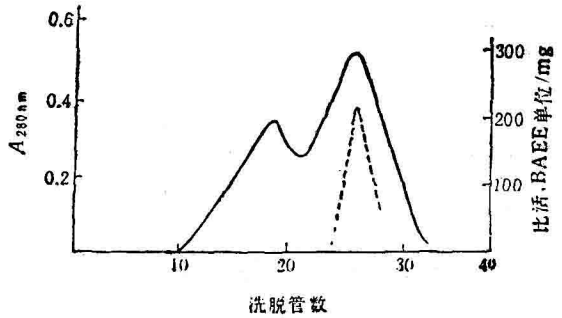


图3 Sephadex G-75 凝胶过滤

虚线表示比活,每管 12min 收集 2ml

经上述 4 个步骤就获得了纯化的 α_1 -AT,各纯化步骤的活力峰的碱性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 4.

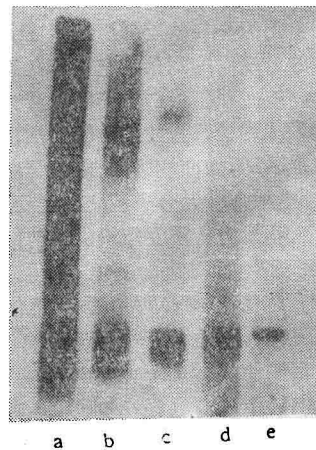


图4 α_1 -AT 纯化过程中碱性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳图

a 表示全血浆, b 表示硫酸铵沉淀, c 表示离子交换层析, d 表示亲和层析, e 表示凝胶过滤

由图4可知, 经最后步骤得到的含 α_1 -AT 活力峰在凝胶电泳胶条上只出现一条带. 其扫描图也只出现单一的尖峰, 由此说明所得的 α_1 -AT 达到了电泳纯. α_1 -AT 位于血浆蛋白电泳 α_1 球蛋白区域. 各步纯化

结果见表1。

表1 α_1 -AT纯化过程中蛋白质含量和抑制剂活力的回收情况

步骤	总蛋白 mg	总活力 BAEE 单位 $\times 10^3$	比活 BAEE 单位/mg	活力回 收率 %	纯化倍数
血浆 (50ml)	3270	8.00	2.4	100	1
硫酸铵 沉淀	1590	7.10	4.5	88.7	1.9
离子交 换层析	215	4.45	20.6	55.6	8.3
亲和层析	36	3.75	104.3	46.8	43.4
凝胶过滤	19	2.32	122.1	29.0	50.8

由于 α_1 -AT 是糖蛋白, 它又与血浆清蛋白的分子量大小, 电泳行为等很相似, 采用一般的层析和电泳很难把二者分开。本文利用 ConA 与糖蛋白中甘露糖的亲性和性能而建立的亲和层析, 达到了将 α_1 -AT 与血清蛋白分离的目的。本方法运用于猪血浆 α_1 -AT 的纯化在国内外尚属首次。从国内外纯化人 α_1 -AT 的工作来看, 要使活力回收率和纯化倍数都较高是比较困难的, 有人曾反复用各种离子交换层析和分子筛层析, 其结果并不令人满意^[11], 即使有人在各种层析的基础上加上电泳切割, 虽说提高了纯化倍数, 但活力回收率很低^[12]。本方法与 R Geiger 纯化猪 α_1 -AT 的方法相比较具有简便、快速、稳定性好、纯化倍数和活力回收率高等优点。

用 ConA-sepharose 4B 亲和层析时, 开始用的洗

脱液中含 0.2mol/L NaCl, 0.1mol/L α -甲基 D-葡萄糖苷, 结果洗脱效果不佳, 后来增加 NaCl 浓度到 0.5 mol/L, 增加 α -甲基 D-葡萄糖苷的浓度到 0.2mol/L, 结果结合在柱上的蛋白质几乎全部被洗下来。

本实验用的 ConA-sepharose 4B 亲和凝胶由自己制备, 经测定 Sepharose 4B 对 ConA 的偶联效率达 85%。从 DEAE 柱到 ConA 柱后主要包括清蛋白在内的杂蛋白有 83% 被除去。合成的 ConA-sepharose 4B 亲和凝胶的稳定性较好, 室温下放置 5 个月仍具较好的亲和性能。

参 考 文 献

- 1 Bangh R *et al.* *Biochemistry*, 1976; 15: 495
- 2 Matheson N R *et al.* *Biochem J*, 1976; 159: 495
- 3 Geiger R *et al.* *J Clin Chem Clin Biochem*, 1985; 23 (10): 637
- 4 Lowry OH. *J Biol Chem*, 1951; 195: 265
- 5 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 141
- 6 袁晓华等. 植物生理生化实验. 北京: 高等教育出版社, 1983: 48
- 7 莽克强等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975: 32
- 8 Piero M *et al.* *Biochemistry*, 1976; 15: 4
- 9 Irvin E L *et al.* *Biochem Biophys Commun*, 1973; 51(2): 436
- 10 彭启明. 生物化学与生物物理进展, 1982; (3): 59
- 11 Crowford L P. *Arch Biochem Biophys*, 1973; 156: 215
- 12 顾学范等. 生物化学与生物物理进展, 1985; (5): 59

利用聚合酶链反应扩增基因片段

邹民吉 王嘉玺 任启生 李满 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

关键词 PCR, 亚磷酸胺法, 引物, 模板

聚合酶链反应 (PCR) 是一种模拟天然 DNA 复制过程的核酸扩增法, 具有敏感特异、产率高、操作简单、容易自动化等特点。由于它有成指数倍 (2^n) 扩增靶序列的能力, 又被称之为“无细胞分子克隆”或“试管内分子克隆”^[1]。我们以化学合成的寡核苷酸的粗提物为引物, 含目的基因片段的重组质粒 DNA 为模板, 利用 PCR 技术成功地扩增出数百至 3544bp 的特异性

DNA 片段。这些片段均容易定位组入特定载体, 使分子克隆过程大为简化。现将实验方法和结果简报如下:

1 寡核苷酸引物的设计 尽量遵循以下原则:

a. 碱基分布, GC 含量与待扩增序列类似, 避免多聚