

图2 亲和印迹法的敏感度试验 (mIgG)

a. IF 后银染色 b. 自然印迹 c. 亲和印迹

图下方所标数值其单位为 mU

(ML) 患者占 25%。按照这些病人的比例, 需要一种敏感的方法来监测病情。在 MM 患者中有 4 例为 mIgD, 其循环中的 mIgD 浓度大都低于 10g/L, 1 例 < 3.0g/L, 有 2 例长期未发现 mIgD 的存在。在 ML 所致的单克隆性 γ 球蛋白病中有 75% 分泌 mIgM, 而这些单克隆性 IgM 中有 76% 血清 IgM 含量均 < 5.0g/L。对这些低浓度的 mIg 以通常的免疫电泳及 IFE 来确定其 Ig 种类及轻链型别是十分困难的。

来文采用的亲和印迹技术, 首先将特异性抗体结合到 NC 膜上, 以薄层琼脂糖凝胶区带电泳把蛋白分离, 蛋白经毛细印迹到 NC 膜上

与其特异性抗体亲和, 再以酶标抗体探测被印迹之蛋白。其灵敏度大约是自然印迹法的 10 倍, IF 银染色法的 100 倍。不需任何昂贵特殊设备。整个过程仅需 2h (包括电泳分离), 不受其他 Ig 的影响。

参 考 文 献

- 1 小出典男, 他. イムノブロット法によるモノクローナル免疫グロブリンおよびペンスジョーンズ蛋白の微量検出法. 临床病理, 1987; (6): 638.
- 2 Mclachlan R. Monoclonal immunoglobulins; affinity blotting for low concentration in serum. *Clin Chem*, 1989; (3): 478.
- 3 Reinhart M, Malamud D. Protein transfer from isoelectric focusing gels; the native blot. *Anal Biochem*, 1982; 123: 229.
- 4 Brogen CH, Peltre P. Filter affinity transfer an immunospecific immunoblotting system [Abstract]. *J Biochem Biophys Methods*, 1987; 14: (Suppl): 22.
- 5 Mclachlan R, Peltre G. Characterization of monoclonal immunoglobulins by filter affinity transfer [Abstract]. *Clin Biochem Rer*, 1988; (9): 94.
- 6 阎有功, 范纯武. 醋酸纤维素膜原位免疫固定电泳技术及其在应用. 生物化学与生物物理进展, 1987; (5): 72.
- 7 叶应妩, 王毓三主编. 全国临床检验操作规程. 第一版, 江苏: 东南大学出版社, 1991: 295—297.

金属硫蛋白分离纯化过程中简便监测方法

铁 锋 潘爱华 李令媛 王文清* 茹炳根

(北京大学生物学系, 100871)

提 要

动物组织用 pH8.6, 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液匀浆, 经加热处理后, 离心上清经凝胶过滤分离, 洗脱组分用简便、快速的线扫极谱监测, 富含半胱氨酸残基的金属硫蛋白或其类似物在钴氨溶液中产生良好的极谱波, 从而达到准确、简便的监测目的。此法特别适用于从新的动植物体提取由复杂因素诱导合成的金属硫蛋白或其类似蛋白。

关键词 金属硫蛋白, 分离纯化, 线扫极谱

*北京大学技术物理系。

收稿日期: 1992-05-22

修回日期: 1992-7-17

在金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 的定义^[1]中两条重要特性是富含半胱氨酸残基和结合金属离子. 金属离子与巯基键合并产生特征光谱吸收, 在分离纯化 MT 时监测方法常以测定洗脱液的紫外吸收和金属离子含量来确定含 MT 组分. 在制备镉诱导的 MT 时^[2], 可方便地监测 254nm 处—Cd—S—键吸收和镉浓度. 然而 MT 所结合的金属离子随不同诱导因素和环境而变化, 分离纯化时需随情况调整监测的紫外波长和金属对象. Zn-MT, Cu-MT 的特征吸收峰分别为 220nm 和 270nm, 前者受肽键在 200nm 左右吸收峰影响, 而后者受 280nm 处蛋白质中芳香氨基酸残基吸收的干扰, 有些金属 (如铅) 诱导 MT 后并不结合在 MT 上, 而研究稀土金属诱导 MT 时, 更不易监测其金属含量. 因此, 在研究许多其它金属和新的因素诱导 MT 时, 难以预知其 MT 的特征吸收和所结合的金属离子, 传统的监测方式受到局限. 对于所有不同来源的 MT 和 MT 类似蛋白 (MT-like protein, MLP), 最基本、最重要的是富含半胱氨酸残基, 因而基于对含巯基蛋白测定的监测方法是可普遍使用的.

Brdička^[3]早在 1933 年就报道在钴氨缓冲液中用直流极谱测定含硫 (—SH, —S—S—) 蛋白质, 这种方法被发展为用微分脉冲极谱测定 MT^[4]或 MLP^[5], 只需加热去掉高分子量蛋白质, 即可对 MT 进行分析. 微分脉冲极谱有灵敏度高的优点, 但其电压扫描速度慢 (5mV/s) 和一次测定需在多滴汞上完成. 目前国内的线扫波极谱仪扫速快, 一个完整图谱在一滴汞上几秒钟完成, 加上络合物在汞滴上吸附而预富集, 可达较高的灵敏度. 本文提出用线扫极谱法, 在所选用合适的钴氨缓冲液中简便、快速测定 MT, MT 所结合不同的金属离子对极谱波无影响, 证明该法可用于 MT 分离纯化过程中的监测.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

MP-1 型溶出分析仪为山东电讯七厂产

品, 使用线扫功能, 三电极系统: 滴汞、铂丝和饱和甘汞电极; 德国的 Sigma 202MK 高速冷冻离心机, 北京市医疗设备厂生产的小型三用水箱; 凝胶过滤采用瑞典 Pharmacia 公司常规层析分离纯化系统; 主要溶液为 pH8.6, 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液和钴氨溶液: 2×10^{-4} mol/L $\text{CoCl}_2 \cdot 0.1$ mol/L $\text{NH}_4\text{Cl} \cdot 0.1$ mol/L $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. MT 纯品为本实验室自制^[6], 牛血清白蛋白 (BSA) 为 Sigma 产品, 还原型谷胱甘肽 (GSH) 和半胱氨酸盐酸盐 (Cys) (层析纯) 为中科院东方仪器设备公司生化部商品.

以上一般化学试剂为分析纯, 溶液用去离子二次蒸馏水配制.

1.2 实验方法

样品处理: 取动 (植) 物组织, 用 2 或 3 倍体积的 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液匀浆, 于 4℃ 下 10 000g 离心 20min, 上清在水浴中加热至 80℃ 5min, 再经离心的上清用 80% 乙醇沉淀过夜, 离心弃上清, 将沉淀溶于少量的 Tris-HCl 溶液, 离心去掉不溶物, 或加热后的离心上清直接上凝胶柱分离, 用 0.01mol/L Tris-HCl 洗脱.

极谱测定: 取 2ml 钴氨溶液于 5ml 烧杯中, 加入各收集管中溶液 100 μL (10—200 μL), 混匀后将三电极插入杯中溶液, -0.05V 静置 4s, 随后扫描至 -1.80V, 扫描时间为 2s, 记录 1 次微分图谱中 -1.46V 左右处波高.

2 结果与讨论

2.1 极谱测定的钴氨溶液

由于传统的 Brdička 溶液是用于扫速慢, 不够灵敏的直流极谱, 其钴浓度为 1mmol/L. 在扫速快、灵敏的线扫极谱中, 钴浓度过大会影响后面的 MT 波形, 而适量的钴浓度能保证一定的灵敏度. 在本实验中选用 0.2mmol/L CoCl_2 及氨缓冲液, MT 与钴络合物在 -1.46V (vs. SCE) 左右出现极谱波, 最低灵敏度浓度可达 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 图 1 为不同量 MT 在钴氨溶液中产生的极谱波, -1.25V 处为钴还原波, -1.46V 波高随 MT 量增大而升高. 在测定标

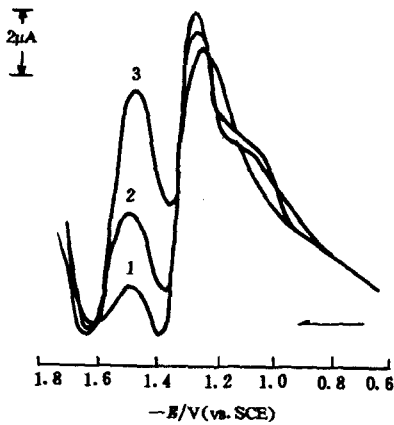


图1 金属硫蛋白在钴氨溶液中的极谱波
2mL 钴氨溶液中含 $4 \times 10^{-4}\%$ Tween-20
MT 量分别为: 峰1: 0.57 μ g;
峰2: 1.14 μ g; 峰3: 2.28 μ g

准 MT 时, 在钴氨溶液中加入 $4 \times 10^{-4}\%$ Tween-20 作为表面活性剂抑制极谱极大, 改善 MT 波形, 而样品测定时, 因样品中少量杂质蛋白在汞滴上吸附起到极大抑制作用而不需另加 Tween-20. 对于含锌、镉或铋的 MT 或 MLP, 其极谱波形和峰电位无差别.

2.2 其它含巯基物质的影响及消除

在本实验系统中, 其它含巯基物质亦产生极谱电流, BSA 于 -1.40V 有极谱峰, 二巯苏糖醇 (DTT) 峰电位为 -1.45V , GSH 和 Cys 分别于 -1.50 和 -1.60V 左右有极谱波. MT 为热稳定性蛋白, 可在 100°C 加热 2min 或 80°C 加热 5min 而不被破坏. 将动物组织匀浆上清进行加热处理, 可将其中大分子蛋白及热敏蛋白沉淀去掉, 而小分子的 GSH 和 Cys 因峰电位与 MT 的差别明显, 从波形上即可区别. 另用 80% 乙醇沉淀 MT 亦可去掉小分子巯基物质. 图 2 为经铋盐诱导大鼠 (8d 累积注射 40mg Bi 每公斤体重) 肝样, 用加热和乙醇沉淀处理后上 Sephadex G-75 柱, 不同洗脱组分在钴氨溶液中显现的波形. 曲线 1 为高分子蛋白洗脱组分, 在 -1.46V 处基本无峰; 曲线 2 为中分子蛋白组分, 即 MLP 组分, -1.46V 产生一极谱峰, 而低分子色素部分在更负的电位才有波出现 (曲线 3).

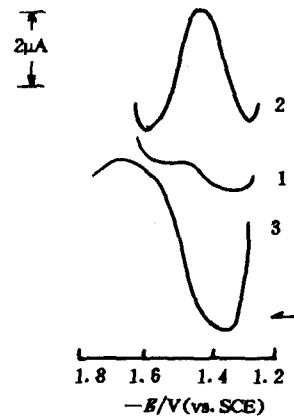


图2 样品中不同洗脱组分的极谱波形
大鼠肝样经 Sephadex G-75 柱分离组分 (见图 4)
在钴氨溶液中记录极谱波形. 1: 32 号管, 2: 68 号
管, 3: 85 号管

2.3 样品中 MT 或 MLP 分离纯化过程中的监测

2.3.1 锌诱导肝 MT 分离纯化 大量锌盐可诱导动物肝合成 MT, 图 3 为锌诱导刺猬 (4d 累积注射 110mg Zn) 肝样在 Sephacryl S-200 上的凝胶过滤图, 图 3a 为传统的紫外和锌含量监测, 根据 230nm 处的吸收峰, 结合锌含量峰和 280nm 处的低吸收, 可知 28—35 管主要含 MT; 图 3b 为钴氨溶液中 -1.46V 处极谱峰电流监测, 峰值几乎同样集中在 28—35 管, 这说明极谱监测峰反映了含 MT 组分.

2.3.2 铋盐诱导 MLP 的分离纯化 大鼠在 8 天 5 次累积注射 40mg Bi 每公斤体重, 肝样按实验方法进行加热和乙醇沉淀处理后进行分离纯化, 图 4 为其凝胶过滤色谱图, 采用传统的紫外监测和本法极谱监测. 铋盐在动物组织中诱导 (MT) 能力不如镉和锌盐, 而且主要在肾中诱导 MLP 合成, 其次在肝中. 因此大鼠肝中 MLP 含量不高, MLP 又在 280nm 处有吸收值, 其结合金属也不单一, 用传统监测无法确定含 MLP 组分. 而极谱测定在 61—71 管有峰电流, 表明它含有 MLP. 由于加热变性沉淀高分子量蛋白不完全, 在 33—38 管亦有小极谱波, 但其管中洗脱液呈棕色, 且在柱洗脱液中首先流出, 易与 MLP 组分区别.

在用 DEAE 离子交换和凝胶柱脱盐进一

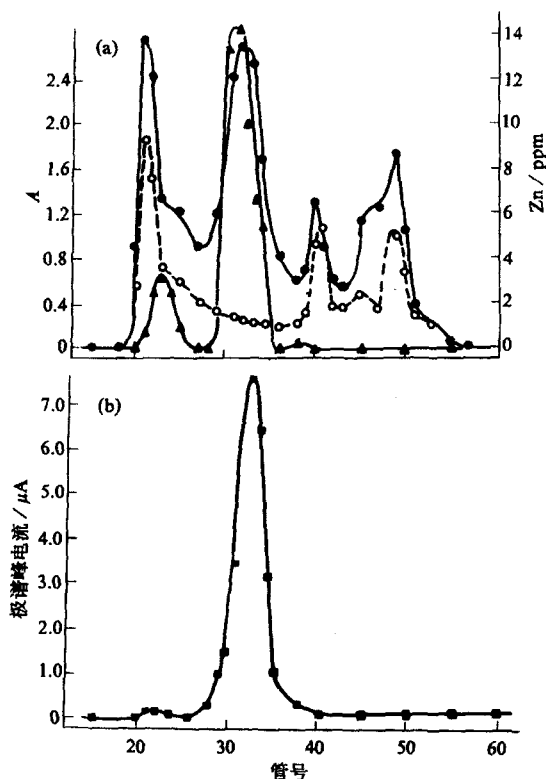


图3 锌盐诱导肝样的凝胶过滤图

刺猬肝 (17g) 的匀浆上清液于 80℃ 加热 5min, 清液上 Sephacryl S-200 柱 (2.6cm×107cm), 用 0.01mol/L Tris-HCl (pH8.6) 缓冲液洗脱, 16ml/管收集。(a) 监测 230nm 和 280nm 紫外吸收, 以及锌含量; (b) 监测为每个收集 10μl 洗脱液在 2ml 钴氨溶液于 -1.46V 处极谱峰电流

· · · : 230nm; - - - · : 280nm; ▲ - ▲ : Zn; ■ - ■ : 极谱峰电流

步分离、纯化 MT 或 MLP 时, 洗脱液的 MT 或 MLP 组分含杂质极少, 要在线扫描极谱测定的钴氨溶液中加入 $4 \times 10^{-4} \%$ Tween-20, 以抑制波形极大现象, 易于准确测量。

本法亦用于铋盐诱导兔肝、肾中 MLP 的分离纯化, 这将使体外研究 Bi-MLP 与顺铂 (cis-diaminedichloroplatinum, cDDP) 相互作用成为可能, 无疑这有助于研究铋盐诱导 MLP 合成以避免 cDDP 在肿瘤治疗时的毒性^[7]。该法可用于动植物组织中 MT 含量的测定, 结果优于镉饱和法 (另文报道)。

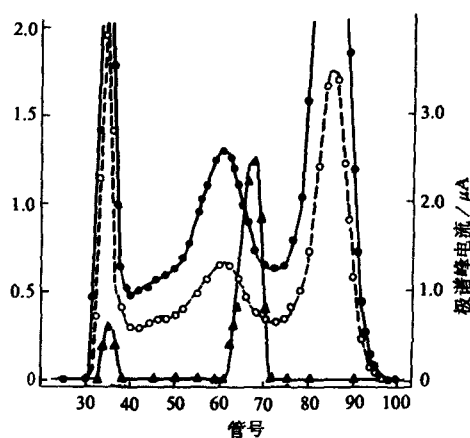


图4 铋盐诱导大鼠肝样凝胶过滤图

大鼠肝样 (其 27g) 经处理后清液上 Sephadex G-75 柱 (2.8cm×87cm), 洗脱液同图 3. 7ml/管收集。监测 250nm (·) 和 280nm (○), 以及极谱峰电流 (▲)

参 考 文 献

- 1 Kagi J H R, Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein. In: Kagi J H R *et al* eds. *Metallothionein I*. Basel: Birkhauser Verlag, 1987;25
- 2 茹炳根, 潘爱华, 王正新等. 小鼠肝脏金属硫蛋白 (Metallothionein) 的分离纯化及鉴定. 生物化学杂志, 1991;7(3): 284
- 3 Brdička R. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. XXXI. New test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solns. of ammonium chloride. *Collect Czech Chem Commun*, 1933;5:112
- 4 Olafson R W, Sim R G. Electrochemical quantification and characterization of metallothioneins. *Anal Biochem*, 1979;100:343
- 5 Raspor B, Pavicic J, Branica M. Possible biological reference material for environmental control analysis-cadmium induced proteins from *Mytilus galloprovincialis*. *Fresenius' Z Anal Chem*, 1987;326:719
- 6 潘爱华, 铁锋, 茹炳根等. 铋诱导家兔金属硫蛋白的分离纯化及鉴定. 生物化学与生物物理学报, 1992;24(6):509
- 7 Boogaard P J, Slikkerveer A, Nagelkerke J F *et al*. The role of metallothionein in the reduction of cis-platin-induced nephrotoxicity by Bi(3+)-pretreatment in the rat *in vivo* and *in vitro*. Are antioxidant properties of metallothionein more relevant than platinum binding? *Biochem Pharmacol*, 1991;41(3):369