

R927.12

中国鲎试剂中凝固蛋白原的快速纯化*

王志光¹⁾ 杜良成²⁾

(1) 昆明医学院第一附属医院临床免疫室, 昆明 650032; 2) 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 报道一种从商品中国鲎试剂中快速分离纯化凝固蛋白原的方法, 经透析、离子交换、凝胶过滤从该品中获得一种均一蛋白, 紫外光谱和 SDS-PAGE 证实为鲎凝固蛋白原。SDS-PAGE 和凝胶过滤测得其分子量分别为 26 kD 和 20 kD, 其得率为 50%。

关键词 中国鲎试剂 凝固蛋白原 纯化 热原检测

中图分类号 R371

鲎试剂是由鲎变形细胞裂解物 (amoebocyte lysate) 制得的专供热原检测的试剂, 它能非常灵敏、专一地与细菌内毒素等起凝胶化反应, 从而广泛用于药物、临床、卫生防疫等方面的热原检测。

鲎试剂中含有一种高分子量的凝固酶原 (proclotting enzyme) 和一种可凝固的蛋白——凝固蛋白原 (coagulogen)。在鲎试验 (limulus test, LLT) 过程中, 前者经内毒素激活转变成成为具活性的凝固酶 (clotting enzyme), 后者经凝固酶的酶解, 释放出一个 28 个氨基酸残基的肽段 (C 肽), 剩下的部分 (A 肽和 B 肽) 经二硫键联结成为凝固蛋白, 凝固蛋白相互聚合, 最终形成凝胶。因此, 凝固蛋白原是 LLT 的主要反应物, 对其性质的研究既受到科研人员的关注, 也一直得到生产部门的重视。

凝固蛋白原分离纯化及生化性质研究已经有 20 多年的历史, 许多研究者已从鲎的变形细胞中直接分离纯化了凝固蛋白原^(1~5), 但由于鲎都栖生于特定海洋地带, 对于大多数实验工作者来说得之不易, 若能从商品化鲎试剂中分离凝固蛋白原, 对

从事凝固蛋白原的理化性质和免疫特性研究者来说无疑是一条方便的途径, 可以随用随制。为此, 本文介绍一种从商品化中国鲎试剂中快速分离凝固蛋白原的方法。

1 材料和方法

1.1 鲎试剂

为厦门鲎试剂厂产品 (批号 901010), 每支安瓿含 0.5 mL 鲎变形细胞裂解液的冻干粉。

1.2 凝固蛋白原的分离纯化

于每支中国鲎试剂中加入 0.25 mL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH7.5 缓冲液, 溶解冻干粉, 吸出, 再在每支中加入相同体积的同种缓冲液, 洗涤后合并两次所得的溶液于 4°C 下对相同的缓冲液透析 ($4 \times 100 \text{ vol.}$, Co. Mr. 10 000) 过夜, 透析液 $12 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min (4°C), 上清液上样于经 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH7.5 平衡的 CM-Cellulose CM-52 柱, 用平衡缓冲液洗去未吸附物, 收集 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱液, 经适当浓缩, 上样于已经相同缓冲液平衡的 Sephadex G-50 柱, 同法洗脱, 收集第二峰, 冻干备用。

* 云南省教委资助课题

1.3 凝固蛋白原的纯度鉴定

SDS-PAGE 参照 Laemmli 的方法^[6]. 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%. 蛋白质分子量标准为 Pharmacia 试剂盒, 含磷酸化酶 B、牛血清白蛋白, 卵白蛋白, 碳酸酐酶, 大豆胰蛋白酶抑制剂和卵清蛋白. 样品电泳时, 一种加入巯基乙醇, 另一种不加巯基乙醇.

2 结果和讨论

2.1 凝固蛋白原的分离与纯化

由于鲑试剂对热原非常敏感 (当内毒素浓度在 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就可产生阳性结果), 因此, 以前的报道要么要求对实验过程中所有器具进行严格地无菌、无热原质处理, 要么采用酸碱处理以灭活凝固酶原^[5]. 但前者费时费力, 后者效果不佳. 我们曾用 1 mol/L HCl 处理中国鲑试剂 15 min 后, 再用 1 mol/L NaOH 中和, 但发现出现大量沉淀, 经纯化后, 凝固蛋白的得率很低. 如果采用适当的处理 (如器具经洗液浸泡), 在尽可能短的时间内完成分离纯化, 最后冻干, 尽管有损失 (主要是透析时的损失), 但得率仍较高.

由于凝固蛋白原的等电点很高 (10 左右), 因此, 宜采用较高 pH 值的缓冲液对样品进行透析和平衡阳离子交换柱, 以尽可能少吸附杂质. 样品经透析后, 出现一些沉淀, 用高速离心除去; 上清液上样于 CM-Cellulose CM-52 柱后, 用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl pH} 7.5$ 缓冲液洗脱, 出现一个峰 (PCE), 为等电点低于 7.5 的杂质; 在缓冲液中加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, 又洗下一个峰 (CA-1), 为吸附物 (图 1). 紫外吸收光谱表明, 吸附峰 (CA-1) 具有典型的蛋白质吸收光谱.

CA-1 经适当浓缩, 再上样于 Sephadex G-50 柱, 首先出现一个很小的峰, 然后出现一个非常对称的大峰

(CA-2), 这表明经离子交换分离的蛋白峰只含很少的杂质 (图 2). 这样, 经分子筛过滤, 既进一步纯化了凝固蛋白原, 又除去了其中的 NaCl.

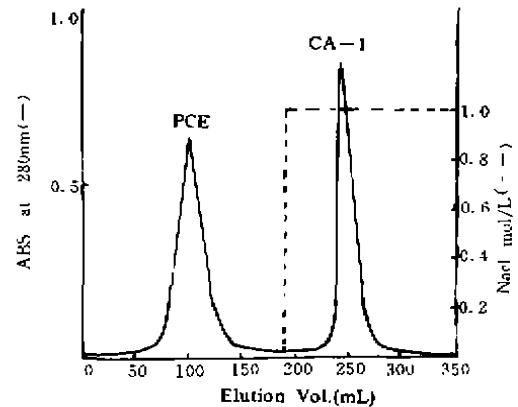


图 1 鲑试剂的 CM-Cellulose CM-52 柱层析

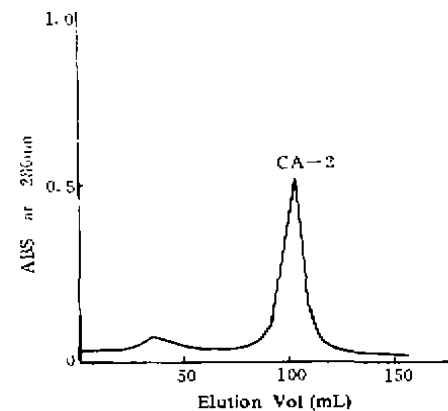


图 2 CA-1 在 Sephadex G-50 柱的凝胶过滤

2.2 凝固蛋白原的纯度测定

经 Sephadex G-50 脱盐的蛋白 (CA-2) 在 SDS-PAGE 电泳板上出现一条均一的区带, 且无论加巯基乙醇与否, 均为一条相对分子量为 26 kD 的单带, 表明该蛋白为单一多肽链 (图 3). 该蛋白经 Sephadex G-75 柱层析, 估计其分子量约为 20 kD. 这些均与已知的凝固蛋白原的电泳特性一致^[1].

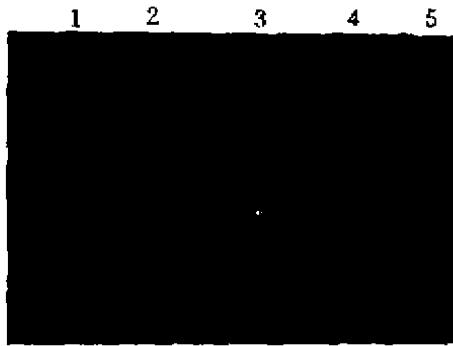


图 3 CA-2 和 PCE 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1: Mr. markers, 2: PCE; 3: CA-2, 4: PCE; 5: CA-2.

该蛋白具典型的蛋白质紫外吸收光谱。其最大吸收峰在 277 nm, 最小吸收峰在 248 nm, 在 260 nm 区域表现明显的苯丙氨酸吸收特征 (图 4)。这些都是凝固蛋白原的紫外光谱特征⁽¹⁾。

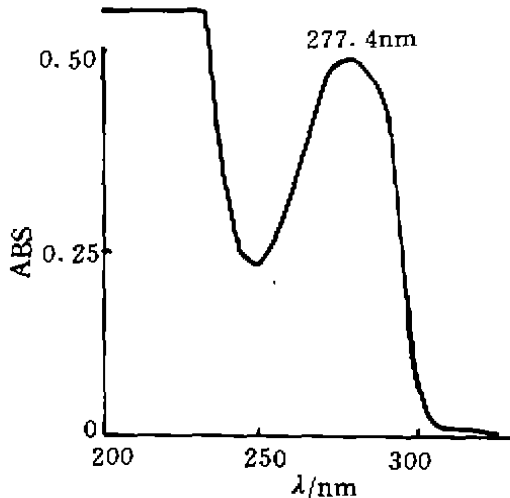


图 4 CA-2 的紫外吸收光谱

2.3 凝固蛋白原的得率

由于本法避免了无菌操作, 不仅分离方法简单, 蛋白损失量很小, 而且还使整个过程在 3 d 内完成 (如果除去冻干过程, 则需时不到 2 d)。加上采用离子交换法, 既快速, 上样量又大。而以往普遍采用的是两次分子筛过滤, 流速慢, 上样量少, 特别是用 Sephadex G-100, G-75 等进行分离更是如此^(3, 5)。因此, 该方法尤其适用于

凝固蛋白原的制备性分离, 可获得较好的得率。资料表明⁽⁷⁾, 厦门产的鲎试剂中蛋白含量约为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (每支安瓿含 0.5 mL, 即含蛋白质 2.5 mg)。根据鲎细胞裂解物中凝固蛋白原约占总裂解物蛋白的 50%⁽⁵⁾ 推算, 上述中国鲎试剂每支中约含凝固蛋白原 1.25 mg。用本分离纯化程序, 在 30 支安瓿中凝固蛋白原的产量是 18.46 mg, 即每支的产量为 0.62 mg。这样, 总凝固蛋白原的得率为 50%。

综上所述, 我们建立了一种从商品化中国鲎试剂中快速分离凝固蛋白原的方法。其程序简单, 上样量相对大, 得率高, 特别适用于在短期内制备一定量的凝固蛋白原以进行其生化性质及免疫特性研究时采用。

参考文献

- 1 Nakamura S. A clottable protein (coagulogen) from amoebocyte lysate of Japanese horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*), its isolation and biochemical properties. *J Biochem.* 1976, 80: 1011
- 2 Shishikura F. Comparative study on horseshoe crab coagulogens. *J Exp Zool*, 1978, 206: 241
- 3 Solum N O. The coagulogen of *Limulus polyphemus*. A comparison of the clotted and nonclotted forms of the molecule. *Thrombosis Res.* 1973, 2: 55
- 4 Tai J Y. Studies on *Limulus* amoebocyte lysate II. Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting. *J Biol Chem.* 1977, 252: 4773
- 5 Young N S. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *J Clin Invest.* 1972, 51: 1790
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227 (5259): 680
- 7 邱文庆, 吴伟洪. 鲎试剂质量标准暂行规定起草

说明 厦门: 厦门市医药研究所, 1983 41~66

(1993-05-05 收稿)

Fast Purification of Coagulogen from Commercial Limulus Reagents

Wang Zhiguang¹⁾ Du Liangcheng²⁾

(1) Department of Clinical Immunology, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032; 2) Kunming Institute of Botany, the Sciences Academy of China, Kunming 650204)

A method for rapid isolation of Limulus coagulogen from commercial Limulus reagents (*Tachypleus tridentatus* leach) was established. The isolated protein purified through a procedure including dialysis, ion exchange, and gel filtration is a homogenized protein. It is a Limulus coagulogen verified by its UV-spectrum and SDS-PAGE properties, which has a molecular weight of 26 and 20 kD determined by SDS-PAGE and gel filtration respectively. The yield of the coagulogen is 50%.

Key words *Tachypleus tridentatus* ameocyte lysate Coagulogen Purification

银杏叶制剂对脑缺血实验治疗的研究* (摘要)

研究生 方思伟 导师 李麟仙 王子灿

(昆明医学院病理生理教研室, 昆明 650031)

在沙土鼠短暂性脑缺血和大鼠局部脑缺血模型上应用含有血小板活化因子 (platelet-activating factor, PAF) 受体拮抗剂的银杏叶制剂, 以观察其对缺血性脑损伤的作用效应, 结果表明: (1) 在沙土鼠双侧颈总动脉结扎 10 min 再灌 4 d 模型上, 与对照组相比, 银杏叶制剂明显增强海马 CA₂ 区神经元存活数, 结果分别为 38.50 ± 16.31 和 133.13 ± 20.99/mm (P < 0.01), 与给苯妥英钠组 (165.42 ± 29.63/mm) 结果相近 (P > 0.05), (2) 大鼠左侧大脑中动脉 (MCA) 凝闭后 48 h, 与对照组相比, 银杏叶制剂可使: ①梗塞面积明显减小, 分别为 42.84 ± 10.61% 和 23.07 ± 6.15%

(P < 0.05); ②梗塞中心区和周边区水含量明显降低, 对照组为 83.03 ± 1.14%、81.18 ± 1.44%, 给银杏叶制剂组为 81.83 ± 1.13%、79.69 ± 0.52% (P 均 < 0.05); ③梗塞中心区和周边区钠含量明显降低, 对照组为 478.59 ± 85.65 和 415.65 ± 154.93 μmol · g⁻¹, 给银杏叶制剂组为 352.40 ± 63.62 和 243.65 ± 56.15 μmol · g⁻¹ (P 均 < 0.05); ④梗塞中心区钙含量明显降低, 对照组为 515.99 ± 140.27 μg · g⁻¹, 给银杏叶制剂组为 364.41 ± 122.81 μg · g⁻¹ (P < 0.05) 结果提示: 银杏叶制剂可减轻缺血性脑损伤。

关键词 脑缺血 血小板活化因子 银杏叶制剂

中图分类号 R36 R965

* 云南省应用基础研究基金资助课题