

植物凝集素固相亲和层析分离胚胎抗原*

陈振国 施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

在细胞生物学研究中固相化的植物凝集素是一种较有用的亲和吸附剂。植物凝集素能够识别并结合多糖、糖蛋白或糖脂,类似于酶与底物、抗体与抗原的识别和结合原理。然而,凝集素与它识别的糖以非共价结合,结合力弱且可逆。因此,利用凝集素识别一定顺序的糖链,并与之专一地结合的特性,可用于分离和纯化含糖大分子物质。前几年,我们证明了人体肝癌细胞表面存在着与3—5个月龄胎人体肝细胞起交叉反应的膜抗原^[1],并用3MKCl溶液和Ultero-gel凝胶过滤提取分离了这种胚胎抗原^[2]。在这基础上我们又利用麦胚凝集素(wheat germ lectin简称WGL)的亲合作用,再以其识别的糖竞争性取代,分离了这种与肝癌相关的胚胎抗原,制得了阳性的抗血清。结果较为理想,本文就方法简述于下。

方法步骤

一、人胎肝细胞表面膜抗原的提取和分离

参照施渭康等人(1979)^[2]的方法进行。取3—5个月新鲜胎儿肝,经去尽血细胞后剪碎,用配于PBS的3MKCl溶液在4℃提取16—20小时,16,000转/分,离心45分钟,上清液对冷蒸馏水透析后再经16,000转/分离心1小时,上清液浓缩,冰冻干燥。将此胎肝细胞3MKCl提取物溶于0.035M磷酸缓冲液(pH8.0)后上Ultero-gel AcA₅₄凝胶柱,再以同样缓冲液洗脱,可得到四个主要洗脱峰,将第1峰各管合并、透析、浓缩冻干后待用。

二、WGL-Sepharose 6MB的交联

取已活化好的Sepharose 6MB(Pharmacia产品)1克溶于3毫升 1×10^{-5} M HCl中,待其充分溶胀后再以同一溶液洗涤多次,最后一次用0.1M NaHCO₃洗,最终压积的6MB珠约为2.2毫升。另称WGL 10毫克溶于5毫升pH8.3的0.1M NaHCO₃-

0.5M NaCl中,然后与上述洗好的Sepharose 6MB混合并置于微型振荡器中来回慢慢振摇3.5小时。反应毕即装柱收集流出液,继以0.1M NaHCO₃-0.5M NaCl洗至280毫微米的光密度(O.D)为0.007。接着以1M乙醇胺洗柱以封闭活化Sepharose 6MB残余的活性基团,并依次用pH4的0.1M HAC-0.5M NaCl缓冲液、pH8的0.1M Borate-0.5M NaCl缓冲液连续反复洗3次。

三、WGL-Sepharose 6MB柱分离胚胎抗原抽提物

将3M KCl胎肝细胞抽提物经Ultero-gel-AcA₅₄分离的第1峰产品8.72毫克溶于1毫升pH7.0的0.05M PB-0.2M NaCl后上柱。以同一PBS洗脱,流速控制在20毫升/小时。每管收集3毫升,并在紫外分光光度计中检测280毫微米处的吸收峰。待洗至第10管后换用10%的N-乙酰葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)(配置于0.05M PB-0.2M NaCl中)继续洗之,待第2峰下来后再换用PBS洗至平衡止。

四、抗胚胎抗原抗血清的制备

将上述第2峰各管合并,经透析浓缩后免疫家兔。免疫前,耳静脉取血,血清冷冻保存,以作对照。该兔共免疫4次,每次剂量为1毫克蛋白。免疫部位在背部皮内多点(12点)。首次免疫时加福氏完全佐剂,末次由耳静脉加强注射。一周后从颈动脉放血。

五、间接免疫膜荧光染色法

参照施渭康等人(1977)^[2]的方法。操作在小试管中进行。取培养72小时的人体肝癌细胞(BEL-7402)悬液(浓度在 $2 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ /毫升)1毫升,低速离心后吸去PBS液,加入0.2—0.3毫升不同稀释度的抗胚胎抗原抗血清,轻轻冲匀,细胞悬液置37℃,30分钟。在温育过程中振摇数次,细胞用PBS洗3—4

* 本工作承姚鑫先生指导,田林同志参加实验工作,谨致谢意。

次,加入 0.05—0.1 毫升异氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗兔 γ -球蛋白抗体, 37℃ 温育 30 分钟, 经常振荡。再以 PBS 洗几次, 细胞沉淀加 1—2 滴磷酸盐缓冲的聚乙烯醇甘油混合液, 轻轻冲匀, 吸 1 滴悬液置载玻片上, 覆以盖玻片, 封片后立即观察。

结果与讨论

一、利用 WGL-Sephrose 6MB 分离人胎肝细胞表面膜抗原, 得到一个较为典型的洗脱图谱(图 1)。用 PBS 洗脱时先下来一个含正常人血清与正常人肝成分的杂蛋白高峰, 接着用 N-乙酰葡萄糖胺取代下来的第 2 峰含有胚胎抗原。用免疫琼脂扩散法检测, 前者对抗正常人全血清的抗血清与抗正常人肝的抗血清均为阳性, 而后者则均为阴性。

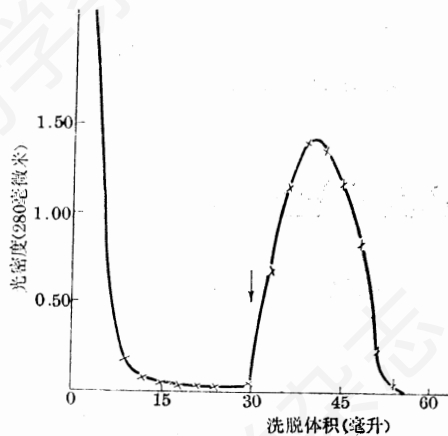


图 1 WGL-Sephrose 6MB 柱层析

样品: 经 Wtrogel-AcA₅₄ 分离的 3 MKCl 胚胎抽提物第一峰
洗脱缓冲液: 0.05 M PB-0.2 M NaCl (pH 7.0)
取代剂: 10% N-acetyl-D-glucosamine in 0.05 M PB-0.2 M NaCl
柱体积: 9mm × 54mm
洗脱速度: 20ml/hr

Sephrose 6MB 是一种大颗粒的琼脂糖珠 (200—300 μ m)。选择它作基质的优点是细胞不受损伤而且对细胞或细胞可溶性抽提物的非特异性吸附也很小, 有利于凝集素的亲和层析。使用已活化好的 Sephrose 6MB 是较方便且安全的, 但使用前必须用稀酸充分洗涤以除去添加的稳定剂。在与 WGL 交联过程中既

要使其充分混和又不致因搅拌过剧而遭变性, 所以我们采用微型振荡器来回慢慢振摇, 反应时间宜长些, 温度保持在 4℃ 左右。如操作小心, 交联率可达 98% 以上。

二、用分离到胚胎抗原免疫家兔后制得了对培养的人体肝癌细胞 BEL-7402 呈膜荧光阳性反应的抗血清(图 2), 免疫前兔血清则为完全阴性反应(图 3)。实验组与对照组的血清稀释度均为 1:3。在免疫第三次后已测出兔血清中有抗体产生。一年后对该抗体再次检测膜荧光, 仍呈明晰的阳性反应。

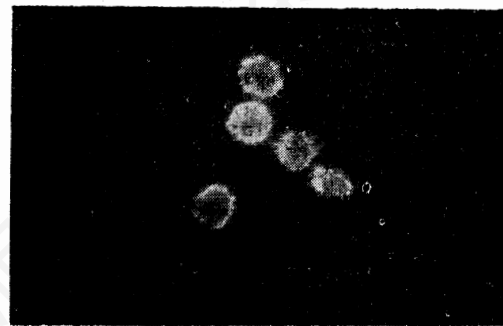


图 2 亲和层析分离的胚胎抗原免疫家兔后的抗血清对 BEL-7402 呈膜荧光阳性反应 × 320

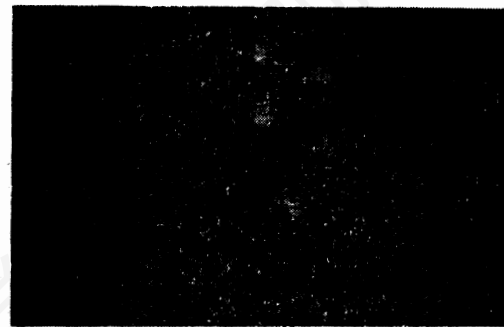


图 3 免疫前的兔血清对 BEL-7402 呈膜荧光阴性反应 × 320

三、亲和层析是纯化生物大分子的有效生化技术之一。它甚至能纯化和浓缩微量存在的物质。在细胞生物学研究方面, 它除了能分开细胞外, 对细胞质成分和细胞分泌因子等可溶性细胞产物的分离以及制备纯的表面受体和经酶、去污剂处理的细胞膜可溶性表面抗原等方面, 起的作用往往是其他方法所不能达到的。

近年来,已广泛应用植物凝集素的固相亲和层析分离和纯化各类含糖化合物、抗原、激素、细胞膜上的糖蛋白或糖脂,也用于分离酶和其他生物物质。例如:从人血清中纯化血凝乳酶(haemopexin)^[3],从甲基胆蒽诱发的小鼠肉瘤中获得部分纯化的TSTA^[4]等。又如:Lando等(1980)^[5]用ConA-Sepharose柱成功地从大鼠D₂₃肝癌3MKCl抽提物中分离出有活力的抗原,这个抗原对带D₂₃肝癌的大鼠血清细胞毒活力有强的抑制作用。与此相仿,我们所提取的人胎肝细胞表面膜抗原通过凝集素的亲和而获得进一步的纯化也说明了这一点。

为了比较不同的凝集素对胚胎抗原的亲合作用,在WGL-Sepharose 6MB分离的同时,我们还做了ConA柱分离试验,用专一性的 α -methyl-D-glucoside去取代时未见有

蛋白峰洗脱下来,似乎提示这种胚胎抗原可能缺乏ConA所能识别的糖分子。这个现象与Sikora等人(1979)^[4]工作的结果是相类似的。我们的实验结果证实:凝集素的特异亲和作用为膜抗原的纯化提供了一个相当简便有效的方法。虽然至今我们尚不清楚这种与肝癌相关的胚胎抗原分子的蛋白组成,但至少也表明了它们是含某些糖的蛋白。

参 考 文 献

- [1] 施渭康、卢延龄、叶敏、姚鑫, 1977, 动物学报, 23:337-344。
- [2] 施渭康、陈振国, 1979, 实验生物学报, 12:170-172。
- [3] Vretblad, P. and Hjorth, R., 1977, *Biochem. J.* 167: 759-764.
- [4] Sikora, K. et al., 1979, *Br. J. Cancer.* 40: 831.
- [5] Lando, P. et al., 1980, *Scand. J. Immunol.* 11: 253-260.

不同离子对原生质体表面电荷和融合的影响*

王辅德 夏镇澳 宛新杉 宋永根

(中国科学院上海植物生理研究所)

原生质体融合的一个先决条件是不同亲本的原生质体首先发生粘连。有些工作证明原生质体的表面带有负电荷,其电位从负十几毫伏到负五十几毫伏不等^[8-9]。这一特性无疑地会影响原生质体的粘连和融合。此外也有一些结果表明, CaCl₂、NaNO₃、多聚氨基酸、某些蛋白质或磷脂可以降低原生质体的表面负电位;甚至还能将负电荷转变为正电荷。如果这些物质对原生质体的正常功能没有损害,则将有助于提高原生质体的融合率。

材 料 和 方 法

一、材料 芹菜、烟草都是温室栽培、自然光照,取用平展幼嫩的叶片为试验材料。胡萝卜是大田栽培,收获后取肉质根的皮层部分为试验材料。

二、原生质体制备 各种材料均用酶法脱壁,以0.5-0.7 M 甘露醇或cpw溶液**做渗透压稳定剂(cpw溶液的组分为:KH₂PO₄ 27.2, KNO₃ 101.0, CaCl₂·2H₂O 1480.0, MgSO₄·7H₂O 246.0, KI 0.16, CuSO₄·5H₂O 0.025, 毫克/升;甘露醇0.7 M, pH5.8)。胡萝卜根和芹菜叶用含有1%纤维素酶(EA₃-867)和0.2%果胶酶(Macerozyme R-10)的酶液(pH5.8),在25℃保温15-20小时。烟草叶片用含有0.7%纤维素酶和0.3%葡聚糖硫酸钾的酶

* 本工作得到陈季楚、傅婉华同志热情协助,谨致谢意。

** cpw溶液为英Nottingham大学用于分离原生质体的常规溶液。

*** 原生质体的活力系指用FDA染色后能产生绿色荧光反应,失去生活力的和破碎了的原生质体都无此反应。