

(4) 细胞对游离 HRP 不显示特异性高亲和力的结合。

(5) 生长在不含 LDL-HRP 是培养液中的细胞也无这种特殊性反应。

上述结果说明, LDL-HRP 是结合于质膜表面有外被区特异性的、高亲和力的 LDL 受体上。

### 参 考 文 献

- [1] Goldstein, J. L. and M. S. Brown., 1977, *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 897—930  
 [2] Brown, M. S. et. al., 1980, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 384: 48—66.

- [3] Anderson, R. G. W. et al., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 2434—2438.  
 [4] Anderson, R. G. W. et. al., 1977, *Cell*, 10: 351—364.  
 [5] Orci, L. et. al., 1978, *Exp. Cell Res.*, 113: 1—13.  
 [6] Chung, B. H. et. al., 1980, *J. Lipid Res.* 21: 284—291.  
 [7] 赵祖谟等, 1982, 浙江医科大学校庆七十年学术论文汇编摘要, 27—28。  
 [8] 西安市医学科学研究所情报室, 1979, 医学情报资料, p. 4—5。  
 [9] 骆加里, 1982, 全国免疫学专题学术会议论文摘要汇编, p. 80。  
 [10] Goldstein, J. L. et. al., 1976 *Cell* 7: 85—95.

## 甲<sub>2</sub>巨球蛋白的丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳分析

范佩芳 沈芝芬

(上海医科大学放射医学研究所)

鉴定一种蛋白质的性质和纯度有多种方法, 而利用丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳来鉴定蛋白质, 并测定其分子量, 具有设备简单, 操作简便, 样品量少, 分辨率高和可重复性等优点, 因此已成为蛋白质分子量测定的常用方法。

甲<sub>2</sub>巨球蛋白(简称  $\alpha_2M$ )是存在于人和动物血清中一种分子量很大的糖蛋白, 是天然蛋白酶抑制剂, 其分子量为 725,000。分子结构的特点之一是内部存在许多二硫键, 使肽链连成一个具有空间结构的大分子。天然的有抑制蛋白酶活性的  $\alpha_2M$  和失去抑制活性的  $\alpha_2M$ , 经 SDS 热引导和巯基乙醇还原分解成的亚基分子量是特异的, 有明显差别的<sup>[1,2]</sup>。不同来源的  $\alpha_2M$  经上述相同处理后, 亚基分子量也略有差异<sup>[3]</sup>。我们利用这些性质, 采用 3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳来鉴定纯化过的猪  $\alpha_2M$ , 大鼠  $\alpha_2M$ (两者均为本实验室制品) 和人  $\alpha_2M$  制剂(上海市生物制品所 85 年产

品)。通过与进口的人  $\alpha_2M$  和其他球蛋白分子量比较, 可鉴定上述几种制品的质量(包括纯化程度和抑制活性)。并从亚基分子量和对热诱导敏感性来比较不同来源的  $\alpha_2M$  种属之间的异同。由于  $\alpha_2M$  有上述的特有的分子结构, 因而采用丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶电泳法来鉴定  $\alpha_2M$  远远胜于琼脂电泳、Tris-甘氨酸-丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦凝胶电泳等方法, 使实验得到理想结果。

### 材 料 和 方 法

猪  $\alpha_2M$  和大鼠  $\alpha_2M$ (本实验室制备, 均取血浆经过 Sephacryl S-300 和琼脂电泳分离纯化)、人  $\alpha_2M$  制剂(上海生物制品所 1985 年产品) 和人丙种球蛋白制剂(上海生物制品所)、进口人  $\alpha_2M$  与人 IgM(均为 Calbiochem, Behring 公司)、丙烯酰胺(Fluka 公司)、甲叉双丙烯酰胺(Aldrich 公司)、TEMED(B. D. H 公司)、标准高分子量蛋白质药箱(Pharmacia 公司)。

一、3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳

1) 蛋白质样品电泳前的预处理 蛋白质样品溶

表 I 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板溶液的配制

溶液 No	试剂名称 溶液名称	丙烯酰胺 (%)	甲叉双丙烯酰胺 (%)	TEMED (%)	过硫酸胺 (%)	核黄素 (%)	EDTA (mM)	Tris HCl (M)	pH	SDS (%)	甘氨酸 (M)	蔗糖 (%)
1	分离胶 3% 梯度液	3	0.081	0.029	0.0174	0.0005	2	0.375	8.8	0.1		
2	分离胶 25% 梯度液	25	0.68	0.029	0.0174	0.0005	2	0.375	8.8	0.1		15
3	间隔胶 3% 凝胶液	3	0.081	0.05	0.1		2	0.125	6.8	0.1		
4	电极液						2	0.025	8.3	0.1	0.192	

液(包括标准分子量蛋白质和被检测样品)各自加等体积两倍浓度的 SDS 样品溶液 ( $20 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  Tris-HCl pH8.0 含 2.0% SDS, 25% 甘油,  $2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$  EDTA, 2.0% 巯基乙醇——临用时加), 在  $100^\circ\text{C}$  沸水浴中加热 5 分钟, 自然冷却, 放置冰箱待用。

2) 3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板配制 基本按 Mahadik 方法<sup>[4]</sup>配制, 已简略列表 I 说明。按溶液 1 分别配制等体积 3% 和 25% 丙烯酰胺分离胶溶液, 分别倒入梯度管, 借助电磁搅拌器和电子微量泵使两液形成梯度, 恒速流入预先制好的垂直凝胶板槽内(槽大小为  $120 \times 120 \times 1$  毫米<sup>3</sup>), 置于光照下, 半小时左右凝胶, 再灌注 10 毫米高的 3% 间隔胶(按表 I 溶液 3 配制),  $4^\circ\text{C}$  保存过夜。

3) 电泳 电极液为 Tris-甘氨酸 pH 8.3 (按表 I 溶液 4 配制), 已处理好的各蛋白样品中加入适量 0.04% 溴酚蓝以指示电泳的前沿。电泳开始时电压为 300 伏, 待样品进入凝胶后改用 150 伏, 直至电泳结束。电泳过程中始终用冷却板冰水回流冷却。

4) 固定、染色、脱色和凝胶板保存 电泳结束, 先用 95% 乙醇溶液固定一小时, 然后用 0.2% 考马斯蓝 G 250 溶液(含 40% 乙醇, 10% 冰醋酸), 染色过夜, 第二天用 40% 乙醇、10% 冰醋酸溶液快速脱色 2 小时, 再改用 7% 冰醋酸溶液进一步脱色直至底色脱清为止。为保存凝胶板, 在脱色液内加 5% 甘油, 照相或用凝胶干燥器干燥。

## 二、标准分子量蛋白质曲线的制作及蛋白质或亚基分子量测定

标准分子量是根据半分子铁蛋白  $M.W = 220,000$ 、牛血清白蛋白  $M.W = 67,000$ 、过氧化氢酶亚基  $M.W = 60,000$ 、乳酸脱氢酶亚基  $M.W = 36,000$ 、铁蛋白亚基  $M.W = 18,500$ , 另有人 IgM 的重链  $M.W = 75,000$ 、轻链  $M.W = 22,500$  等的电泳迁移距

离求得的标准分子量蛋白质电泳相对迁移率和它们各自的分子量对数值作图, 得到回归直线, 再根据  $\alpha_2M$  亚基的相对迁移率从直线上查出它们的分子量。

## 结 果

标准分子量蛋白质在 3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶上的电泳带见图 3、图 4。它们的电泳相对迁移率与其分子量对数作图, 得出回归直线。见图 1。其相关系数  $r = -0.9989$ , 非常接近 1, 从图中看出已知分子量的蛋白质都在直线上, 测得的  $\alpha_2M$  各亚基分子量均在已

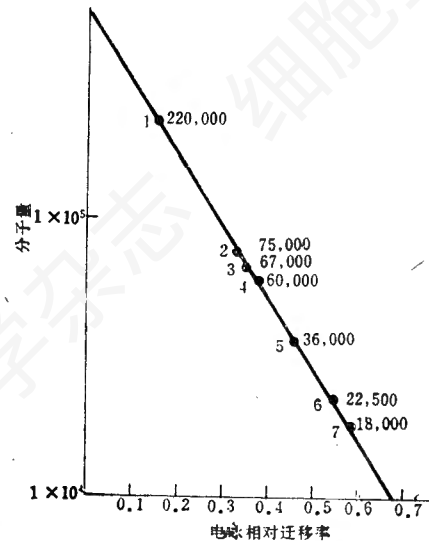


图 1 标准分子量在 SDS 梯度凝胶电泳上相对电泳迁移率对分子量对数作图

1. 半分子铁蛋白
2. IgM 的重链
3. 牛血清白蛋白
4. 过氧化氢酶亚基
5. 乳酸脱氢酶
6. IgM 的轻链
7. 铁蛋白亚基

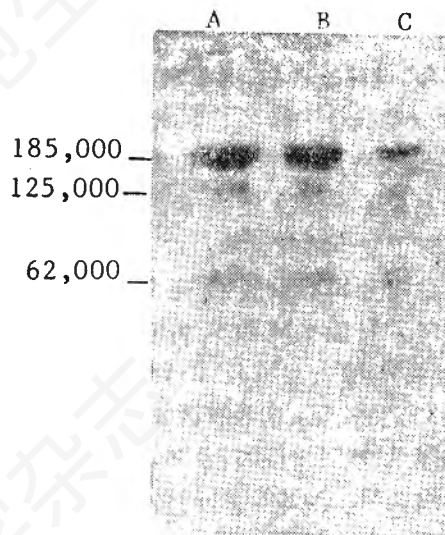


图2 猪 $\alpha_2M$ 的3—25%丙烯酰胺梯度SDS凝胶板电泳

A、B——猪 $\alpha_2M$   
C——进口人 $\alpha_2M$

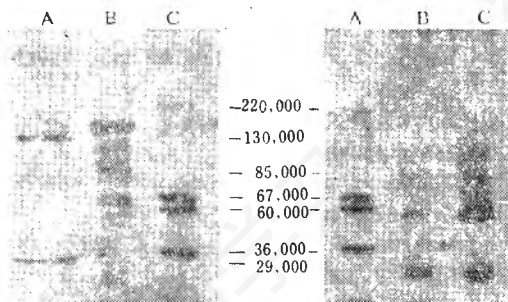


图3 大鼠 $\alpha_2M$ 3—25%丙烯酰胺梯度SDS凝胶板电泳  
图4 人 $\alpha_2M$ 制剂3—25%丙烯酰胺梯度SDS凝胶板电泳

A: 大鼠 $\alpha_2M$       A: 标准高分子量药箱  
B: 进口人 $\alpha_2M$     B: 人 $\alpha_2M$ 制剂  
C: 标准高分子量药箱    C: 人丙球制剂

知分子量范围内。

图2主要鉴定纯化的猪血浆 $\alpha_2M$ 的亚基分子量,并配有进口的人 $\alpha_2M$ 作比较。图2指出猪 $\alpha_2M$ 与人 $\alpha_2M$ 溶于SDS样品溶液(见材料与方法),经100℃沸水浴处理5分钟后,两者均具有亚基分子量185,000、125,000和62,000的三条亚带。大鼠 $\alpha_2M$ 和人 $\alpha_2M$ 制剂的SDS电泳结果见图3、图4。上述两样品经相同的

热处理,大鼠 $\alpha_2M$ 主要有两条电泳亚带,其分子量为130,000和29,000,还有一条色浅的90,000分子量的电泳带。人 $\alpha_2M$ 制剂的电泳结果显示它除了与人丙种球蛋白制剂有相同的53,000和22,500的IgG的重链和轻链外,属于 $\alpha_2M$ 的主要有85,000分子量亚带和较浅的62,000分子量的电泳亚带。

## 讨 论

本实验采用3—25%丙烯酰胺梯度SDS凝胶板电泳和Tris-甘氨酸pH 8.3的电极液系统。由于被测蛋白质 $\alpha_2M$ 是一种分子量很大的糖蛋白,其分子量为725,000,它的亚基分子量最大的也有185,000,为此我们用高分子量蛋白质校正药箱并配有人IgM的重链和轻链为已知标准分子量。电泳结果绘制的标准分子量回归直线, $r = -0.9989$ ,是一条理想的直线。这是因为除了在灌胶时凝胶成均匀的线性梯度是重要因素外,对于高分子量的蛋白质SDS凝胶电泳必须选择凝胶浓度差距较大的丙烯酰胺梯度。这样使高分子量蛋白质不受丙烯酰胺交联度大小的影响而得到正确的Rf值。本实验选用3—25%丙烯酰胺梯度SDS凝胶板电泳,得到理想的标准分子量回归直线。从而认为我们被测的 $\alpha_2M$ 的各样品的分子量也是可靠的。

图2指示猪 $\alpha_2M$ 与人 $\alpha_2M$ 有相似的亚基分子量,它们分别为185,000、125,000和62,000三条电泳带。表明猪 $\alpha_2M$ 和人 $\alpha_2M$ 由分子量非常相似的亚基组成。这三条不同分子量的亚带与文献报道的人 $\alpha_2M$ 的亚基完全一致<sup>[2]</sup>,均代表天然有抑制蛋白酶活性的 $\alpha_2M$ 经SDS热引导和巯基乙醇还原后的产物。猪 $\alpha_2M$ 的三条电泳带图谱清晰,表明我们纯化的猪 $\alpha_2M$ 的质量不低于进口的人 $\alpha_2M$ 。

图3主要鉴定大鼠 $\alpha_2M$ ,它在梯度SDS凝胶电泳图谱上主要有两条电泳带,分子量为130,000和29,000,还有一条较浅的90,000分子量的电泳带。根据文献报道<sup>[3]</sup>,由于大鼠

$\alpha_2M$  对 SDS 热引导和巯基乙醇还原不比人  $\alpha_2M$  敏感, 因而图 3 中的只有一条 130,000 分子量的电泳带(相当于人或猪  $\alpha_2M$  的 125,000 的电泳带)代表有抑制活性的大鼠  $\alpha_2M$ 。一条较深的 29,000 和另一条较浅的 90,000 分子量的电泳带代表失去抑制活性的蛋白部分。

人  $\alpha_2M$  制剂的电泳见图 4。从它的纯度来看, 它混有相当量的人丙种球蛋白, 为分子量分别为 53,000 和 22,500 的二条亚带。一条 85,000 分子量的电泳带, 代表了人  $\alpha_2M$  与蛋白酶结合, 失去了抑制活力的蛋白部分经 SDS 热引导和巯基乙醇还原后的亚基带。一条较浅的 62,000 分子量的电泳带表明制剂中只存在少量有天然抑制活性的  $\alpha_2M$ 。近来文献报道, 失去抑制活性的  $\alpha_2M$ , 在炎症反应中起了反馈调节作用<sup>[5]</sup>。该现象是否可为临床用此制剂治疗辐射灼伤病有显著疗效提供依据, 有待今后进一步研究。

SDS 凝胶电泳测定蛋白质分子量对某些特殊蛋白质会产生与实际分子量偏离较大的结果<sup>[6]</sup>, 如糖蛋白, 由于糖蛋白的糖部分不被 SDS 包被, 因而糖基的含量和性质会影响分子量的测定。 $\alpha_2M$  是一种大分子的糖蛋白, 它的 185,000 的亚基带相对迁移率 Rf 值偏大, 从回归直线上查得分子量约 170,000, 比实际的小, 因而有的文献把这一电泳带称为 170,000 分子量, 这说明这一亚带含有糖基。

## 摘 要

甲<sub>2</sub> 巨球蛋白(简称  $\alpha_2M$ )是一种分子量为 725000 的大分子糖蛋白。天然有活性的和失活的  $\alpha_2M$  经 SDS 热引导和巯基乙醇还原分解的亚基分子量有明显差别。不同来源的  $\alpha_2M$  亚基分子量也略有差异。本实验用 3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳来鉴定纯化的猪  $\alpha_2M$ 、大鼠  $\alpha_2M$  和人  $\alpha_2M$  制剂。结果指出猪  $\alpha_2M$  和人  $\alpha_2M$  均有 185000、125000 和 62000 三条亚带, 代表有活性的天然  $\alpha_2M$ , 大鼠  $\alpha_2M$  电泳图谱指出, 130000 分子量亚带代表天然  $\alpha_2M$ , 29000 和 90000 分子量二带为失活部分。人  $\alpha_2M$  制剂图谱表明除了混有两种球蛋白外, 只有一条 62000 分子量亚带代表少量有活性的  $\alpha_2M$ 。

## 参 考 文 献

- [1] Lorand, L., 1981, *Method in Enzymology*, 80: 737.
- [2] Harpel, P. C. et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 8669-8678.
- [3] Okubo, H. et al., 1981, *Biochim. Biophys. Acta* 668: 257-267.
- [4] Mahadik, S. P., 1974, *Anal. Biochem.* 76: 615-633.
- [5] Hoffman, M. et al., 1983, *Biochim. Biophys. Acta* 760: 421-423.
- [6] Neurath, H., 1975, *Proteins* 1: 187-191.

## 血清中甲<sub>2</sub> 巨球蛋白对胰蛋白酶抑制活力测定

范佩芳 沈芝芬\*

(上海医科大学 上海放射医学研究所)

甲<sub>2</sub> 巨球蛋白(简称  $\alpha_2M$ )是存在于人和脊椎动物血清中的主要蛋白质之一, 是多种蛋白酶的抑制剂, 并有体内多余蛋白酶的“清道夫”作用。健康人  $\alpha_2M$  在血清中的含量较稳定, 但当机体出现某些疾病时, 含量就会有变化<sup>[1,2]</sup>

因为当机体出现某些炎症时, 细胞会坏死, 大量蛋白酶被释放, 机体就会动员  $\alpha_2M$  抑制多余的蛋白酶; 另一方面  $\alpha_2M$  是一种分子量很

\* 本工作得到金为翘教授、何介薇副教授的指教, 在此表示衷心感谢。