

文蛤(Meretrix Meretrix)凝集素(MML) 的初步研究

I. MML在文蛤体内的分布及纯化

赵景东·高翔·苏拔贤
(生物学系)

摘要 在文蛤(Meretrix Meretrix)体内具有血球凝集活性的凝集素(简称MML),经实验证实仅分布于文蛤外套腔液中。向外套腔液中加入固体硫酸铵达40%时,可使99%的MML沉淀。用不同饱和度的硫酸铵溶液依次对上述沉淀进行抽提,得到MML粗制品溶液,其比活比原始外套腔液提高了约9.95倍,总活力回收达48%。最后用自制的人血浆糖蛋白—Sephrose 4B亲和层析柱可将上述MML粗制品的比活再提高400多倍。结果与原始外套腔液比较,MML终产品的比活总共提高了4313倍,总活力回收达44.8%,在电泳鉴定时显示出单一的区带。

关键词 硫酸铵,沉淀,抽提,文蛤凝集素(MML),人血浆糖蛋白—Sephrose 4B亲和层析

1 引言

凝集素是生命体内广泛分布的一种天然的非免疫性蛋白,很多是糖蛋白。凝集素最早在蓖麻中发现,迄今已在上千种生物体中检测到血球凝集活性物质,其中在植物中发现的占绝大多数。

初期凝集素的分离纯化工作多用沉淀、离心、制备性电泳和柱层析等经典方法^[1,2]。由于凝集素具有与糖类物质专一可逆结合的特点,人们设计了各种各样的亲和吸附法用于不同来源的凝集素的提纯,主要分为4种类型:①天然的或修饰的聚糖;②结合载体的单糖或多糖;③结合载体的糖蛋白或糖肽;④固定化的动物细胞等。在未知凝集素的糖专一性之前,通常采用结合载体的糖蛋白或糖肽的方法^[3~5]。

海洋生物资源非常丰富,现已探明近200种海洋生物包括藻类、无脊椎动物及鱼类都含有凝集素,海洋贝类中曾报道有凝集素存在^[6,7]。1989年苏拔贤等对北部湾沿海地区13种贝类凝集素作了调查^[8],报告了文蛤(M. Meretrix)体中含有活性很高的血球凝集素(MML)。本文进一步检测了MML在文蛤体内的分布,并以高浓度硫酸铵沉淀MML取得粗制品,最后通过反复摸索,将人血浆糖蛋白偶联到Sephrose 4B上,制成

本文1990年9月7日收到

生物学系1987、1988级硕士研究生;赵景东现在广州市中国水产科学研究院南海水产研究所

了一种新的亲和层析柱,一步可将MML提纯400多倍,经电泳检验终产品为单一区带,为进一步研究MML分子组成及生理功能提供了高纯度样品。

2 实验材料、试剂与方法

2.1 材料

文蛤(Meretrix Meretrix)购自广西省北海市农贸市场。新鲜正常人血球和人血浆购自广州市海员医院,用0.4%的柠檬酸钠抗凝。

2.2 试剂、配方及简略语

试剂: Sepharose 4B是Pharmacia产品,溴化氰(CNBr)是E. Merck产品。其它试剂除特别说明外,均为国产分析纯或生化试剂。

试剂配方和简略语归列如下。

TBS: 0.14mol/L NaCl, 0.01mol/L Tris-HCl, pH7.4.

TBS-Ca²⁺: TBS中含0.01mol/L CaCl₂, pH7.4.

平衡缓冲液: 1.00 mol/L NaCl, 0.01 mol/L CaCl₂, 0.05 mol/L Tris-HCl, pH7.4.

洗脱缓冲液-I: 0.14mol/L NaCl, 0.01 mol/L 柠檬酸钠, 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.4.

洗脱缓冲液-II: 1.05mol/L NaCl, 0.01mol/L 柠檬酸钠, 0.05mol/L Tris-HCl, pH7.4.

MML: 文蛤(M. Meretrix)凝集素。

2.3 实验方法

2.3.1 凝集素活力测定 活力测定在72孔V型微量血凝滴定板中进行。新鲜的正常人红细胞为检测细胞,先用10倍体积的TBS离心洗涤4次,然后配成2%(V/V)的TBS-Ca²⁺细胞悬浮液。测定时,吸取25 μ l凝集素样品,用TBS-Ca²⁺作倍比稀释,然后每孔加入25 μ l人红细胞-TBS-Ca²⁺悬浮液,在37 $^{\circ}$ C下保温1h,肉眼观察,以有血球凝集活力的最大稀释度为该凝集素样品的活力(计为2ⁿ),比活力为 $\frac{\text{活力}(2^n)}{\text{蛋白浓度}(\text{mg/ml})}$ 。以TBS-Ca²⁺作空白对照。

2.3.2 文蛤材料的处理 市售文蛤经洗净,用纱布吸干水份后,用刀切断闭壳肌,打开贝壳,轻拔两侧外套膜收集略带黄色的外套腔液,在4 $^{\circ}$ C下用15 000g离心30min后取上清液。在上清液中加入等体积的2倍浓度的TBS-Ca²⁺,然后测定其凝集活力。开壳后的肉质部份用刀切下,以蒸馏水充分洗净,静置片刻滴去水份,用高速均浆器搅成糊状,然后加入等体积的两倍浓度的TBS-Ca²⁺,在4 $^{\circ}$ C下搅拌抽提过夜。第二天取出在4 $^{\circ}$ C下用15 000g离心30min,取上清液测定凝集活力。实验结果表明,使人红细胞发生凝集的文蛤凝集素MML只存在于外套腔液中,而其肉质部份不含红细胞凝集活性物质。以下实验均用外套腔液开展各项实验工作。

2.3.3 MML的硫酸铵沉淀及反抽初步纯化 60kg文蛤经开壳后,大约可得12 000ml的

外套腔液。经4℃下,用15 000g离心30min取上清液。上清液中加入固体分析纯硫酸铵至40%饱和度,于4℃下搅拌4h,然后在4℃下用15 000g离心30min,收集沉淀。沉淀在4℃下依次以40%、30%和20%饱和度的硫酸铵溶液各180ml反抽,每次反抽的上清液测定其红细胞凝集活力。

2.3.4 亲合吸附进一步纯化MML ① MML的抑制剂人血浆糖蛋白的制备。当凝集素与糖或糖蛋白分子上的糖基结合以后,凝集素的糖结合位点被封锁,从而不能再与红细胞膜表面的糖类结合,故不能再使红细胞凝集。根据这一原理,凝集素抑制剂活力测定方法是,用TBS-Ca²⁺将抑制剂配成一定浓度,在微量血凝板中以每孔(25μl)活力为2⁸的MML-TBS-Ca²⁺将抑制剂—TBS-Ca²⁺溶液进行倍比稀释,在37℃下保温1h后,加入25μl的人红细胞—TBS-Ca²⁺检测液,再保温1h,以肉眼可见能抑制血球凝集的最大稀释度为该抑制剂的活力,以2ⁿ表示,抑制剂比活力为 $\frac{\text{抑制剂活力}(2^n)}{\text{蛋白浓度}(\text{mg/ml})}$ 。以TBS-Ca²⁺做空白对照。蛋白浓度约为64mg/ml的抗凝新鲜人血浆40ml在搅拌条件下,经72℃水浴5min,然后用35 000g在4℃下离心1h,得到上清蛋白浓度为12mg/ml的血浆糖蛋白溶液。由于凝集素溶液和所用的缓冲液中都含有Ca²⁺,会引起血浆凝固,所以在测定原人血浆抑制活力之前,需经56℃加热处理30min以破坏血浆凝固机制,然后用35000g在4℃下离心1h取上清液。将56℃处理后离心得到的人血浆上清和经72℃处理后离心得到的人血浆上清液在4℃下分别对TBS-Ca²⁺作充分透析,然后测定它们的血球凝集抑制活力。②人血浆糖蛋白—Sephacrose 4B亲合层析法提纯MML,按March等人的方法^[9],把经72℃处理后离心得到的人血浆糖蛋白上清液(蛋白浓度为12mg/ml)中的蛋白共价偶联到Sephacrose 4B颗粒上。具体做法是,将浓度为12mg/ml的人血浆糖蛋白溶液对0.2mol/L的NaHCO₃在4℃下充分透析,除去小分子物质,然后用0.2mol/L的NaHCO₃将其稀释至4.0mg/ml的蛋白浓度。在4℃下,将等体积已用CNBr活化了的Sephacrose 4B抽滤饼倒入稀释了的糖蛋白溶液中,中速搅拌18h。偶联完毕,取出在1 000g下离心2min,沉淀物以等体积的0.5mol/L乙醇胺—HCl(pH8.2)浸泡2h,然后依次用0.5mol/L NaCl—0.1mol/L乙酸钠(pH4.0)、2.0mol/L脲—0.5mol/L NaCl及0.1mol/L NaCl—0.1mol/L NaHCO₃(pH10.0)各100ml洗涤,最后装成1.6×20.5cm的层析柱,用5倍床体积的平衡缓冲液过柱后即可使用。经测定,人血浆糖蛋白的偶联率为72%。20%硫酸铵反抽得到的MML粗抽提液(180ml)上柱前对平衡缓冲液充分透析,透析后活力基本无变化。取上述透析样品经35 000g在4℃下离心,得到的上清液立即于4℃下上柱。上柱完毕后,在4℃下以8倍床体积的平衡缓冲液过柱,使流出液的紫外吸收值A₂₈₀小于0.01。最后取出柱子,在20℃下温育30min,然后以体积各为55ml的洗脱缓冲液I和II进行线性梯度洗脱。所有过程中,柱子的液体流速均为15ml/h。于流出液的各管中加入高浓度的CaCl₂溶液,使每管CaCl₂终浓度达0.02mol/L,然后测定各管的凝集活力和A₂₈₀值。

2.3.5 MML样品的纯度电泳鉴定 采用垂直板状凝胶电泳装置,碱性不连续缓冲系统。聚丙烯酰胺凝胶的分离胶浓度为7.5%,浓缩胶浓度为3.0%,以考马斯亮蓝R-250染色。具体操作参考文献^[10]。为了便于比较,电泳的样品分别为文蛤外套腔液、20%硫

酸铵反抽得到的MML粗抽提液和亲和层析柱经洗脱缓冲液(I—II)洗下的蛋白峰管。上述3种样品经预处理后,在室温下进行电泳。

3 结果与讨论

3.1 MML在文蛤体内的生理意义

经测定我们发现文蛤外套腔液中含有2'活力的人红细胞凝集活性,乘上稀释度,外套腔原液的活力为2⁸。而经匀浆抽提肉质部分的上清液中没有检测到红细胞凝集活力。

在其它无脊椎动物中,有人认为凝集素起调理和应急反应蛋白的作用,但在贝类中还未见这类报道。凝集素作为生命体内的一种识别蛋白,兼有识别自己和异己的两种功能,围绕着这两种功能,各种凝集素在生命体内起的生理作用是多种多样的。作者鉴于MML仅存在于文蛤外套腔液中这一事实,推测MML可能在文蛤在适应外环境变化中具有保护的功能及作为内外环境变化中具有中介因子的作用。

3.2 硫酸铵盐析及分步反抽初步纯化MML

用高浓度硫酸铵沉淀文蛤外套腔液的MML,实验结果显示,在40%饱和度的基础上,继续加入固体硫酸铵以提高饱和度并不能在离心后的沉淀中回收更多的MML活力。事实上,经40%饱和度的硫酸铵沉淀,根据外套腔液中的总活力与沉淀后离心得到的上清液中的总活力之比可得出,99%的外套腔液的活力分布在沉淀之中。离心取出沉淀,加入定量体积的TBS-Ca²⁺溶解之,在4℃下搅拌4h后,测得该液体所含活力为外套腔液的96%,比活提高了3.58倍。

上述文蛤外套腔液经加入固体硫酸铵达40%饱和度后离心所得的沉淀依次用180ml的饱和度为40%和30%的硫酸铵进行搅拌反抽,结果经离心后的上清中主要是杂蛋白。红细胞凝集活力主要集中在20%饱和度的硫酸铵反抽液中。剩余沉淀再用180ml的TBS-Ca²⁺抽提,活力回收不多。所以20%饱和度的硫酸铵反抽是最佳浓度,所得反抽上清液的总活力回收为外套腔液的48%,比活比原始外套腔液提高了9.95倍。硫酸铵盐析及反抽结果见表1。

表1 MML的提纯结果

Tab.1 The purification of MML

组份	体积(ml)	蛋白(mg)	活力 μ (2 ⁿ)	活力回收(%)	比活力(μ /mg)	提纯倍数
外套腔液	12 000	31 200	2 ⁸	100	98	1
40%硫酸铵沉淀	180	8 400	2 ¹⁴	96	351	3.58
20%硫酸铵反抽上清液	180	1 512	2 ¹³	48	975.3	9.95
亲和层析洗脱液活力峰部份	21	3.20	2 ¹⁶	44.8	422 813	4313.33

硫酸铵盐析法是蛋白质纯化中使用的经典方法, 本文经改进, 先用高浓度硫酸铵盐析, 然后依次降低硫酸溶液的浓度分级反抽, 不仅便于运输, 而且避免了共沉效应, 提高了分离的效率和活力回收率。

3.3 高效亲和吸附法纯化MML的几个问题

3.3.1 人血浆糖蛋白的热处理 根据亲和层析法提取凝集素的一般方法^[4,11,12], 我们曾对几种糖蛋白包括鸡卵类粘蛋白、人红细胞血型蛋白(Glycophorin)、猪胃粘蛋白及人血浆糖蛋白等进行凝集素(MML)抑制活力测定, 以观察它们与MML之间亲合力的大小, 结果发现人血浆糖蛋白的抑制活力最高。为了克服血浆自身凝集作用, 我们测得人血浆经56℃处理30min和72℃处理5min后离心得到的上清液对MML溶液(活力为2⁸)的抑制活力如表2。

表2 经不同条件处理后的人血浆对MML的抑制作用
Tab.2 The inhibition of human plasma to MML after different treatment

样 品	人血浆	56℃下处理30min后的人血浆上清液	72℃下处理5min后的人血浆上清液
抑制活力(μ)	—*	2 ⁷	2 ⁷
蛋白浓度(mg/ml)	64.03	61.60	12.05

* 因血浆自身凝集未能测出

实验中发现, 未经处理的人血浆与凝集素溶液混合之后, 很快发生凝固, 无法测定其抑制活力。经56℃处理30min后, 血浆凝固机制被破坏, 方可测定其抑制活力。从表2可见, 经56℃去活的人血浆上清液测出其MML(活力为2⁸)的抑制活力为2⁷, 而经72℃处理5min后的人血浆上清蛋白浓度虽然只是原血浆的17%, 但其抑制活力与经56℃处理后的人血浆上清是相同的, 说明后者在单位蛋白浓度下抑制效率更高。

3.3.2 人血浆糖蛋白—Sephacrose 4B亲和柱层析 洗脱曲线如图1。从图1可见, MML活力峰最高部分的活力为2¹⁷, 蛋白浓度为0.17mg/ml, 相当于最近两篇报道的最高比活^[11,12], 比原始外套腔液的比活提高了约7850倍, 而整个活力峰也比原始外套腔液比活提高了4313倍(表1)。文蛤凝集素MML的全部提纯过程归列于表1。

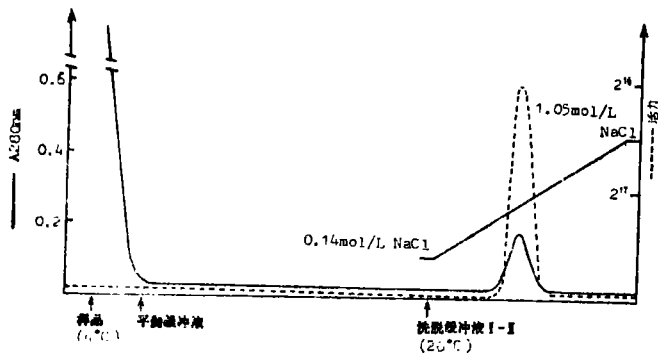


图1 人血浆糖蛋白—Sephacrose 4B亲和柱层析结果

Fig.1 MML was highly purified by human plasma glycoprotein—Sephacrose 4B affinity column chromatography

3.4 电泳纯度鉴定

取文蛤外套腔液、20%硫酸铵反抽得到的MML粗制品和从人血浆糖蛋白—Sephrose 4B亲合层析柱洗脱的活性峰管,经过透析等预处理后,在室温下进行板状碱性不连续系统电泳比较。电泳完毕之后,板状胶经固定、染色和脱色等步骤,得到结果如图2所示。

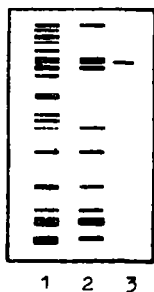


图2 不同样品在板状碱性不连续系统中的电泳结果

Fig.2 The result of different samples on plate alkaline disc-PAGE

1. 原始外套腔液
2. 20%硫酸铵反抽得到的上清
3. 亲合层析柱洗下的活力峰

从图2可以看到,最后经人血浆糖蛋白—Sephrose 4B亲合层析柱洗下来的MML活性峰管在电泳胶上显示出一条迁移率较低的区带,说明文蛤凝集素MML的最终产品达到了极高纯度。在MML的分离纯化中,本文提供了一个简单易行、效率极高的方法,用这一方法分离纯化其它贝类凝集素也取得了显著成功。至于MML的分子组成情况及某些性质鉴定,我们将在另文作进一步报道。

参 考 文 献

- 1 Marchajonis J J, Edelman G M. *J Mol Biol*, 1968, 32: 453~465
- 2 Hall J L, Rowland D T. *Biochemistry*, 1974, 13(4): 821~832
- 3 Marchesi V T. *Methods in Enzymol*, 1972, 28(B): 354~356
- 4 Oppenheim J D, Nachbar M S *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1974, 58(4): 1127~1134
- 5 Sela B, Wang J L, Edelman G M. *J Biol Chem*, 1975, 250(18): 7535~7538
- 6 Baldo B A, William H S *et al.* *Biochem J*, 1978, 175: 467~477
- 7 Tatsumi M, Arai Y, Itoh T. *J Biochem*, 1982, 91: 1139~1146
- 8 苏拔贤等, *热带海洋*, 1986, 5(1): 81~84
- 9 March S C, Parikh I, Cuatrecasas P. *Anal Biochem*, 1974, 60: 149~152
- 10 Pharmacia laboratory separation division, Sweden. *Polyacrylamide gel electrophoresis, laboratory techniques*. 1982, 22~23
- 11 Ravindranath M H, Higa H H *et al.* *J Biol Chem*, 1985, 260(15): 8850~8856
- 12 Basu M S, Mandal C. *Mol Cell Biochem*, 1986, 71(2): 149~158

The Preliminary Studies of a Lectin(MML) from Sea Clam (*Meretrix Meretrix*)

I. The distribution in the sea clam tissues of MML and its purification

Zhao Gingdong* Gao Xiang Su Baxin

Abstract A lectin (shortly call MML) with high human blood red cell agglutination activity was detected in the sea clam (*Meretrix Meretrix*). This lectin(MML) distributes only in the mental cavity fluid of the sea clam. When adding solid ammonium sulfate into the mental cavity fluid upto 40% concentration at 4℃, 99% of the total activities of MML were precipitated. The precipitate was continually extracted by cold ammonium sulfate with different concentration. The last supernatant which was called primary MML fluid gived a 9.95-fold purification and a 48% recovery of total activities compared with the crud mental cavity fluid. Finally by using our self-made human plasma glycoprotein-Sepharose 4B affinity colum chromatography, the MML in the primary MML fluid was highly purified. Compared with the crud mental cavity fluid the final purified MML gived a 4 313-fold purification and a 44.8% recovery of total activities. This final purified MML exhibited one band on plate alkaline disc-PAGE.

Keywords ammonium Sulfate, precipitate, extract, MML (lectin from sea clam *Meretrix Meretrix*), human plasma glycoprotein-Sepharose 4B, affinity

* South China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fisheries Science, Guangzhou