

文蛤(*Meretrix Meretrix*)凝集素(MML) 的初步研究

II. MML的分子组成及性质鉴定

苏拔贤 高翔 赵景东*

(生物学系)

摘要 文蛤凝集素(MML)经实验证明是一种唾液酸专一性结合的凝集素。MML的活力表现依赖于 Ca^{2+} 。MML对高于 $40^{\circ}C$ 以上的温度敏感,其活力在pH5.0~8.5的范围内稳定。等电聚焦电泳测出MML的等电点是5.6。在12%胶浓度的SDS-PAGE上,用含或不含-S-S-还原剂的样品处理液进行电泳,以及用4%~30%线性梯度胶浓度的PAGE分析,所得结果推测MML分子是由分子量为29 000和30 000道尔顿的2条肽链组成,肽链间经-S-S-共价联系形成约59 000道尔顿的大亚基,再由约18个这种大亚基聚合成1 060 000道尔顿的MML大分子。氨基酸组成及其价结合糖含量测定表明,MML分子是一种含5%的糖类的糖蛋白。初步观察到MML对人体癌变淋巴瘤细胞株(Raji细胞)的生长有抑制或杀伤作用。

关键词 文蛤凝集素(MML),糖专一性,稳定性,SDS-PAGE,Raji细胞

1 引言

目前已知被纯化的几百种不同来源的凝集素中,对唾液酸专一性结合的凝集素数量较少。它们主要分布在:①微生物如大肠杆菌、流感病毒和肺炎枝原体等^[1];②无脊椎动物如蝎子、海蟹、鲎类、牡蛎、蛞蝓、蜗牛等^[2~7];③哺乳动物的肾脏和子宫^[8];④植物的小麦胚和海绵等^[9]。

一般来说,对唾液酸专一性的凝集素都是糖蛋白质,常需要 Ca^{2+} 才能发挥其细胞凝集作用。如流感病毒凝集素含糖量高达25%,鲎(*Limus polyphemus*)凝集素LPL也是一个含糖酸性蛋白,并由18~20个分子量约为20 000道尔顿的2种亚基构成^[10],另一种对唾液专一性的印度鲎凝集素CNS也是大分子糖蛋白,它与专一性糖结合时,能产生光物理效应^[4],蛞蝓凝集素LFA通过超离心及凝胶过滤相互验证,其分子量是44 000道

本文1991年9月20日收到

*现在广州市中国水产科学院南海水产研究所

尔顿,而SDS-电泳只得到一条分子量为22 000道尔顿的区带,也说明LFA是2种亚基组成,而且通过还原剂处理观察到亚基之间无~S-S-交联^[6]。

与抗体不同,各种来源的凝集素在结构上没有相似之处;它们的理化性质及生理功能上有许多问题,迄今仍未阐明。贝类凝集素研究工作较少,尤其是对唾液酸专一性的凝集素的报告更少。本文在文蛤凝集素MML纯化工作基础上^[11],对MML的糖专一性、稳定性、对Ca²⁺的需求、分子的理化构成以及MML对人体癌变淋巴母细胞的杀伤作用等性质作了研究。

2 材料与试剂

2.1 材料

实验中所用的文蛤凝集素MML样品除有特别说明外,均为人血浆糖蛋白-Sepharose 4B亲和层析柱洗脱下来的活性峰部分,蛋白浓度为0.1524mg/ml,活力为2¹⁰,见文献^[11]。

新鲜人血球(A、B、O、AB四型)购自广州市海员医院。新鲜鸭血、鹅血、兔血、猪血和山羊血购自广州农贸市场。新鲜杂种小白鼠血液和中华眼镜蛇(*N. naja atra*)血液由中山大学生物学系制备。以上均为柠檬酸钠抗凝。大肠杆菌K₁₂细胞株细胞也来自本系。人体癌变淋巴母细胞Raji细胞和液体培养基为中山大学生物学系提供。

2.2 试剂

N-乙酰神经氨酸为Sigma产品,其它糖类为国产分析纯。电泳中用的标准分子量蛋白试剂盒和Scphadex G-50是Pharmacia产品,水溶性两性电解质和其它电泳试剂均为国产分析纯或生化试剂。

试剂配方及简略语归列如下:PAGE,聚丙烯酰胺胶电泳;MML,文蛤(*M. Meretrix*)凝集素。其它有关试剂配方及简略语与文献^[11]相同。

3 实验方法

3.1 MML的动物细胞专一性和糖专一性的测定

实验所用的MML是活力为2⁸的TBS-Ca²⁺溶液。

动物细胞专一性测定,分别取4种人血球(A、B、O、AB四型)、鹅血球、鸭血球、兔血球、猪血球、山羊血球、杂种小白鼠血球和中华眼镜蛇血球用TBS洗净后,制成2% V/V的TBS-Ca²⁺细胞悬浮液,大肠杆菌K₁₂细胞株细胞也用TBS-Ca²⁺配成10⁷/ml的细胞悬浮液,按凝集素凝集活力测定方法进行测定^[11]。

糖专一性的测定,分别将N-乙酰神经氨酸、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、葡萄糖、乳糖、蔗糖和甘露糖各自用TBS-Ca²⁺配成浓度为200mmol/L的溶液,按凝集素抑制剂活力测定法进行测定^[11]。

3.2 Ca²⁺对MML活性的影响

0.5ml的MML溶液与0.5ml浓度为0.1mol/L的EDTA(乙二胺四乙酸二钠)-TBS溶

液混合,取混合液测定其凝集活力。以0.1mol/L的柠檬酸钠-TBS代替上述EDTA-TBS。测定其与MML溶液混合后的凝集活力。然后分别将上述两种混合液用Sephadex G-50柱(1.5×15cm)脱盐,该柱预先用不含Ca²⁺的TBS平衡,并用TBS洗脱,分部收集洗脱液,分别用2%人红血球-TBS悬液或2%人红血球-TBS-Ca²⁺悬液测定洗脱液各管的凝集活力,同时测定洗脱液各管的A280nm值。

3.3 pH及温度对MML活性的影响

用0.01mol/L CaCl₂-0.1mol/L NaCl-0.05mol/L 乙酸钠-巴比妥钠缓冲液(pH3.0~pH9.16)和0.01mol/L CaCl₂-0.1mol/L NaCl-0.05mol/L 甘氨酸-NaOH缓冲液(pH9.0~pH10.6),将MML溶液的pH值调至3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0。在4℃下密封的容器中放24h,然后将各溶液的pH值调至7.4,测定各溶液的凝集活力。

MML溶液分别在30℃,40℃,50℃,60℃,70℃水浴中保温,每隔10min 取样测定凝集活力,直至处理1h为止。

3.4 MML在电泳中的行为分析

3.4.1 等电聚焦 使用国产两性电解质(pH3.5~10.0),4.5%胶浓度的管状电泳,参照Pharmacia^[12]进行,以考马斯亮蓝R-250染色。

3.4.2 SDS-PAGE 参照Pharmacia^[12],以改良板状Laemmli不连续碱性缓冲系统,浓缩胶浓度为3.0%,分离胶浓度为12%。MML样品分别在含2%SDS-5%巯基乙醇和只含2%SDS的样品处理液中,加热(100℃)10min作还原性和非还原性解离之后电泳^[9]。染色用考马斯亮蓝R-250进行。SDS电泳分子量标准试剂盒(LMW;Pharmacia)所含蛋白作还原性解离。电泳在常温下进行。

3.4.3 凝胶孔径梯度电泳 参照Pharmacia^[12],以Tris-硼酸碱性连续缓冲系统,胶浓度梯度为4%~30%的板状胶,在常温下电泳。用Pharmacia分子量标准蛋白试剂盒(HMW;Pharmacia)作标准,以考马斯亮蓝R-250染色。

3.5 MML的氨基酸组成分析

取4.20mg的MML冻干样品,加入6mol/L的盐酸,在安瓿瓶中经120℃水解24h后,在日立835-50型高速氨基酸分析仪上进行MML的氨基酸组成分析。未另作色氨酸的检定。

3.6 MML的糖含量分析

用3组液态MML,以等体积的洗脱缓冲液I-II做对照,各管中加入分析纯盐酸到终浓度为1.5mol/L,封管后在100℃下消化5.5h。破管后消化液在105℃下烘干至恒重,各管加水溶解样品,最后用α-萘酚法测定糖含量^[13]。以105℃恒重的无水葡萄糖作标准。

3.7 MML对癌细胞(Raji细胞)生长的影响

处于对数生长期的人体癌变淋巴瘤母细胞—Raji细胞在液体培养基中37℃培养。培

培养基(RPMI 1640,日本产)内含10%的小牛血清和各为100u/ml的青霉素、链霉素双抗因子,每48h传代1次。

采用每间隔一定时间后,取样进行活细胞计数的方法^[14]。MML样品是人血浆糖蛋白-Sepharose 4 B亲和层析柱洗下的活性峰部分(活力为 2^{18})。在4管6.0ml起始细胞浓度为 $88 \times \frac{1}{4} \times 10^4$ /ml的培养液中,其中3管分别加入MML样品至蛋白终浓度为0.61,3.10,6.10 μ g/ml,另一管加入等体积的洗脱缓冲液I—II,同时在37 $^{\circ}$ C开始培养。每隔一定时间于各管中取200 μ l培养液,加入等体积的活细胞染色液(0.4%台盼蓝),混匀2 min后在血球计数板上计数。在100倍的光学显微镜下,活细胞为淡黄色的荧光球体。

4 结果与讨论

4.1 MML的动物细胞专一性和糖专一性

实验结果表明,MML可以强烈地凝集各种不同血型的人红细胞、鸭红细胞、鹅红细胞及大肠杆菌K₁₂细胞株细胞。而对兔、猪、山羊、杂种小白鼠和中华眼镜蛇等动物的红细胞虽有凝集作用,但活性较弱。这一结果说明,MML的细胞专一性虽然比较广泛,但仍有一定选择性。另外,实验中观察到MML能强烈地凝集微生物大肠杆菌K₁₂细胞,这对前文^[11]所作“MML可能在文蛤体中起防御蛋白作用”的推测是一个间接支持。MML糖专一性的测定结果如表1。

表1 MML糖专一性测定结果

Tab.1 The result of the sugar specificity test of MML

糖 类	N-乙酰神经	N-乙酰	N-乙酰	半乳糖	葡萄糖	乳糖	蔗糖	甘露糖
	氨酸	半乳糖胺	葡萄糖胺					
25	-	-	-	-	-	-	-	-
50	+	-	-	-	-	-	-	-
100	+	-	-	-	-	-	-	-

表中看到,MML的人血球凝集活力仅被浓度为50mmol/L以上的N-乙酰神经氨酸所抑制,而其它糖类在高达100mmol/L浓度时仍无抑制作用。进一步的实验测出,使MML的人血球凝集活力完全受到抑制的最低N-乙酰神经氨酸的浓度为35mmol/L。

N-乙酰神经氨酸和N-羟乙酰神经氨酸两大类共20多种衍生物统称唾液酸^[15],现在人们还把氧(O)-乙酰神经氨酸也归入唾液酸类^[16]。唾液酸广泛地存在于高等动物细胞表面,唾液酸家族的各种异构体在不同动物不同组织细胞表面有不同程度的分布,MML的动物细胞专一性和糖专一性的测定结果反映了这些细胞表面的差别。

4.2 Ca^{2+} 对MML活性的影响

实验结果表明,金属离子螯合剂EDTA或柠檬酸钠对MML活力有抑制作用,所需浓度视系统的 Ca^{2+} 浓度而异。加入 Ca^{2+} 可以使被抑制的MML凝集活力得到恢复,说明这种抑制作用是可逆的。

EDTA-TBS-MML和柠檬酸钠-TBS-MML两种混合液分别经Sephadex G-50柱脱盐,洗出的蛋白峰中所含的离子成份与用以平衡层析柱的缓冲液(TBS)是一致的,不含 Ca^{2+} 。若以不含 Ca^{2+} 的TBS配制的人红血球悬液测定洗脱液蛋白峰的凝集活力,则无法检出活力。但若以TBS- Ca^{2+} 配制的人红血球悬液测定活力,则可以检测出洗脱液的活力,并且活力峰与蛋白峰达到完全吻合。这直接证明了MML的凝集活力需要 Ca^{2+} 。

4.3 pH及温度对MML活力的影响

MML在pH 3~10范围内活力损失情况如图1所示,在pH 5~8.5范围内的活力比较稳定,在pH 9.0或pH 4.0,活力损失了四分之三,当pH超过10.0以及低于3.0时,活力全部丧失。由此可见,MML对pH变化是十分敏感的。

MML在不同温度下处理不同时间,活力损失情况如图2所示。在40℃下保温1h或在50℃下保温20min均不会引起明显的活力损失。但是在50℃下处理30min或60℃下处理10min后,MML活力损失达75%。若在60℃下处理超过20分钟或在70℃下处理10min,则活力全部丧失。

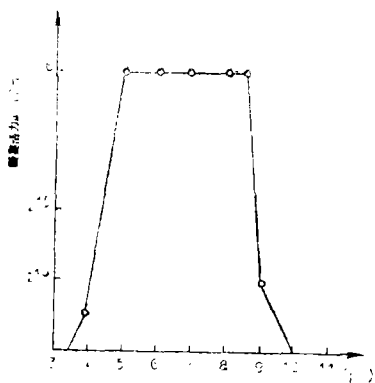


图1 pH对MML活力的影响
Fig.1 The influence of different pH on the activity of MLM

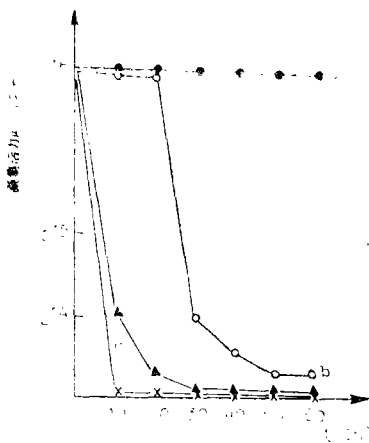


图2 温度对MML活力的影响
Fig.2 The influence of different temperature on the activity of MML
a. incubation at 40℃,
b. incubation at 50℃,
c. incubation at 60℃,
d. incubation at 70℃

4.4 MML在电泳中的行为分析

4.4.1 等电聚焦 纯化的MML在管状等电聚焦实验中发现pI值为5.6的单一区带,说明MML是一种酸性蛋白。据报道LPL也是酸性蛋白,其pI值为4.8。

4.4.2 SDS-PAGE MML分子的亚基组成及其分子量的测定结果由SDS-PAGE得

到。参考文献^[9]的方法,将MML样品作两种电泳前处理。一种在样品处理液中含2% SDS和5% β -巯基乙醇,另一种在样品处理液中只含2% SDS,与样品分别混合后共同经100℃加热10min,冷却后在室温下电泳,结果如图3所示。从图3中可以看到,经含SDS- β -巯基乙醇的样品处理液处理的MML样品泳道上出现分子量为29 000和30 000道尔顿的两条区带。而经只含SDS的样品处理液处理后的MML样品泳道上显示出一条分子量约59 000道尔顿的主要区带及一些分子量更高的浅色区带。因此,我们推测,MML分子内含分子量各为29 000和30 000道尔顿的2种“亚基”,这2种“亚基”在天然状态下是由-S-S-交联起来的,这种交联物是MML分子的三级结构的基础。这一特点也是文蛤凝集素MML与其它几种唾液酸专一性的凝集素,如LPL、CNS、LFA^[6]、海绵凝集素^[9]等分子内亚基之间无-S-S交联的不同之处。

4.4.3 凝胶孔径梯度PAGE MML分子量的测定由梯度电泳得到。纯化的MML在梯度(4%~30%)电泳中呈单一区带,结果如图4所示。由图4可见,MML的分子量大于标准蛋白中分子量最大的蛋白。依据标准曲线外推,并用马脾铁蛋白不同聚合体迁移率作参考,估算出MML的分子量约1 060 000道尔顿。

上述实验结果表明,MML分子内部的两种亚基是由-S-S-共价交联的,交联成的大亚基分子量约为59 000道尔顿,由大约18个大亚基构成了有活性的MML分子,其分子量为一百万上下。这一结果与文献报导的LPL分子是由分子量均为20 000道尔顿左右的两种亚基(中间无-S-S-交联)组成的18~20聚体^[10]相比较,差异很大。至于为什

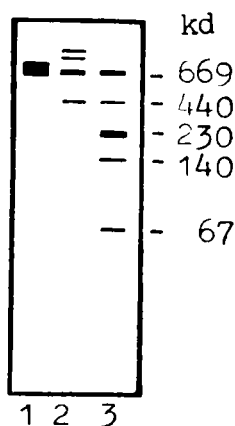


图3 MML在还原及非还原条件下的SDS-PAGE结果

Fig.3 The result of SDS-PAGE of MML after different treatment with different sample buffers

1. MML, sample buffer containing 2% SDS-5% β -mercaptoethanol
2. MML, -sample buffer containing only 2% SDS
3. LMW marker of pharmacia

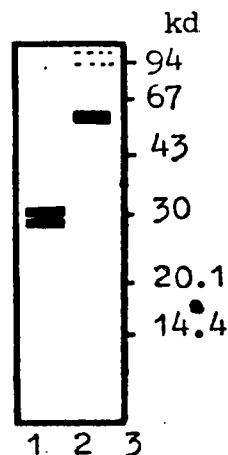


图4 MML凝胶梯度(4%~30%)PAGE结果

Fig.4 The result of pore gradient (4%~30%) PAGE of MML

1. MML,
2. Ferritin from horse spleen (Sigma)
3. HMW marker of pharmacia

么MML要形成这么大的多体聚才能显示出其凝集活力,其生理意义目前还不能解释。

4.5 MML的氨基酸组成分析结果

MML的氨基酸组成分析结果见表2。在表2右侧列出了LPL的氨基酸组成分析结果^[10]。从两者的比较中,我们可以发现MML和LPL两者的酸性氨基酸(Glu, Asp)和碱性氨基酸(Lys, His, Arg)含量都十分接近,疏水氨基酸含量也很接近;其它共同特点还有,酸性氨基酸含量很高,而Met和Cys/2的含量却很低。

MML和LPL的氨基酸组成上相差较大的是, MML和Pro含量比LPL的Pro含量要高出1倍以上,由此推测MML在构象上是个灵活性很大的分子。

表2 MML的氨基酸组成
Tab.2 Amino acid composition of MML

氨基酸	MML ^a	MML ^b	LPL ^c	氨基酸	MML ^a	MML ^b	LPL ^c
Asp	38	12.5	11.4	Met	1	0.37	1.4
Thr	19	5.7	6.0	Ileu	10	3.3	4.5
Ser	19	5.1	6.5	Leu	22	7.1	10.2
Glu	39	14.4	13.6	Tyr	10	4.7	5.1
Pro	33	9.5	4.4	Phe	14	5.8	5.0
Gly	25	4.8	4.7	Lys	19	7.1	6.1
Ala	17	3.7	3.2	His	8	3.2	5.1
Cys/2	4.5	1.4	2.8	Arg	12	5.5	3.5
Val	21	6.0	4.5				

a.为推算出最低氨基酸残基数, b.为100g纯蛋白中,氨基酸克数(w/w), c.同b.见文献[19]
注:色氨酸未进行测定

4.6 MML分子含糖量分析结果

取3组样品(已知蛋白含量)用作糖含量分析。得到MML分子中糖含量为5.0%。从结果来看, MML分子属于低糖含量的一类糖蛋白,与LPL分子的糖含量(3.5%)相近。

4.7 MML对癌细胞(Raji细胞)生长的影响

按照活细胞计数法,经过重复实验将MML对Raji细胞生长的影响作图(图5)。

Raji细胞是癌变的人淋巴母细胞。从曲线上显示,当培养基仅含0.61 μ g/ml的MML时,即有抑制细胞分裂的作用。当MML浓度增加至3.10 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C培养6.5h后,活细胞数明显少于零时的起始细胞数;当MML浓度增加至6.10 μ g/ml时,效果稍有扩大。含MML的Raji细胞培养液中,在培养开始的4h内细胞生长受到明显抑制,此时效果与MML浓度的关系不明显;但在4h后,含MML浓度为3.10 μ g/ml的细胞生长受抑制的情况,远比浓度为0.61 μ g/ml时细胞生长受抑制情况强烈。在MML浓度分别为3.10 μ g/ml和6.10 μ g/ml的培养液中,出现了生长中的活细胞数低于起始的细胞数(在培养了6.5~10.0h之间)的现象。

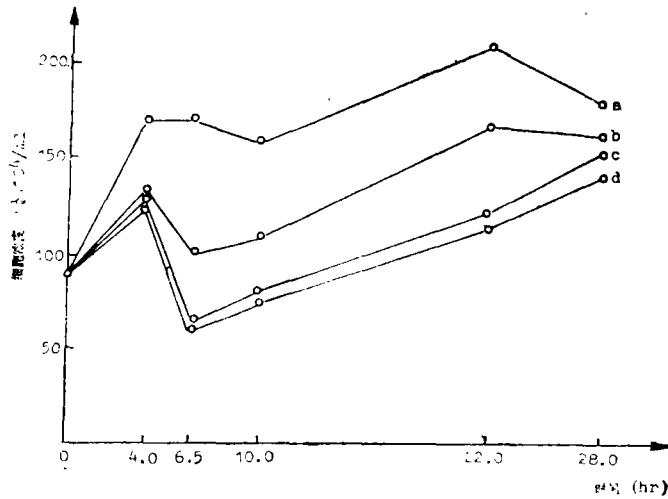


图5 MML对培养的Raji细胞生长的影响

Fig.5 The influence of MML on the growth of human cancer cells (Raji cells)

a. control, b. containing 0.61 μ g/ml MML,
c. containing 3.10 μ g/ml MML, d. containing
6.10 μ g/ml MML

蓖麻和相思豆等植物凝集素对实体癌细胞有明显的抑制及杀伤作用已有不少报道,并尝试作临床治疗药物^[17]。但对唾液酸专一性的凝集素对肿瘤细胞的作用研究迄今尚未见于文献。根据我们实验的初步结果,指出MML可能成为另一种新的研究癌细胞的实验试剂或临床药物。至于MML在体内(文蛤)起着防御蛋白的作用,其作用机理及其与低等动物的原始免疫机制的起源有什么关系,在理论上是一个十分重要的研究课题。

参 考 文 献

- 1 孙册等著. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1986
- 2 Vasta G R *et al.* Comp Biochem Physiol, 1984, 77B(4):721
- 3 Ravindranath M H. J Biol Chem, 1985, 260:8850
- 4 Bishayee S *et al.* Biochem Biophys Acta, 1980, 623:89
- 5 Oppenheim J D *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1974, 58:1127
- 6 Miller R L *et al.* J Biol Chem, 1982, 257:7574
- 7 Basu S *et al.* Mol Cell Biochem, 1986, 71:149
- 8 Chowdhury M *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1985, 130:1301
- 9 Bretting H. Biochemistry, 1976, 15:5029
- 10 Marchalonis J J *et al.* J Mol Biol, 1968, 32:453
- 11 赵景东, 高翔, 苏拔贤. 中山大学学报(自然科学版), 1992, 32(1):86
- 12 Pharmacia Laboratory Separation Division, Sweden, Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Laboratory Techniques, 1982

- 13 Dische Z. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 1962. Vol-1, 478
- 14 兰州大学细胞学及遗传学、细胞生物学教研室主编。细胞生物学实验,北京:高等教育出版社,1986
- 15 Schaur R. *Methods in Enzymol*, 1978, 50(c):64
- 16 Higa H H. *J Biol Chem*, 1985, 260:8838
- 17 朱公悦等。癌症,1984, 3(2):144

The Preliminary Studies on the Lectin (MML) from Sea Clam (*Meretrix Meretrix*)

I. The molecular composition and the characterization of MML

Su Baxin* Zhao Gingdong Gao Xiang

Abstract MML is a sialic acid binding lectin. The lowest concentration of N-acetylneuraminic acid which can inhibit human RBC agglutination activity of MML is 35mmol/L. MML widely agglutinates every kinds RBC from different animals tested in the experiment. MML can also cause the agglutination of E. coli K₁₂ cells. As a Ca²⁺ dependent lectin MML is sensitive to the temperature over 40°C and to the pH over 8.5 or below 5.0. On rod gel IEF MML can be focused as one band with an appearance pI 5.6. On plate SDS-PAGE of MML if adding -S-S- reductant to the sample buffer two bands separately with MW 29kd and 30kd can be seen, if not adding -S-S-reductant to the sample buffer one main band with MW 59kd and several little coloured bands with MW larger than 59kd can be seen. So we conclude that these two kinds of subunit of MML are naturally connected by -S-S-. On plate pore gradient PAGE MML exhibits one band with MW 1060kd. In this paper, the amino acid composition analysis result and the sugar percentage analysis result of MML were reported. As the first time among the lectins which are sialic acid binding specificity, this paper also reported that MML has the ability of inhibiting or even killing cancer cells—human malignant lymphoblast (Raji cells).

Keywords MML (lectin from sea clam *Meretrix Meretrix*), sugar specificity, SDS-PAGE, pore gradient PAGE, human malignant lymphoblast (Raji cells)

* Department of Biology