

一种具有抑制糜蛋白酶活性的血清 DNA结合蛋白质的纯化和理化特性*

於利敏 童坦君 张昌颖

(北京医科大学 生化教研室)

摘 要

本文采用离子交换层析, DNA亲和层析和硫酸铵盐析三步从人血清中分离纯化了一种肿瘤相关DNA结合蛋白质(64DP)。本方法较简便, 产率提高。经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫电泳鉴定纯度符合要求。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量为64,000。等电聚焦电泳测得等电点在4.2左右。醋酸纤维膜电泳和转移电泳表明其为一种 α_1 球蛋白。过碘酸西夫氏糖蛋白染色呈阳性反应。氨基酸分析和酶抑制试验证实64DP与 α_1 抗糜蛋白酶很相似。

关键词: 血清DNA结合蛋白; 64DP; 糜蛋白酶抑制物; 蛋白质纯化; 蛋白质电泳。

前 言

通过DNA亲和层析法, 可将血清蛋白质分成DNA结合蛋白质(DBP)和非DNA结合蛋白质两部分。前者经双向电泳又可进一步分成几十种多肽^[1]。虽然采用免疫化学方法已从中鉴定出少数已知血清蛋白质^[2,3], 但多数血清DBP的性质及其生物学意义仍有待阐明。自1975年以来, 发现若干种血清DBP与肿瘤有关。已见报道的有人血清中的C₃DP^[4], MAD-2^[5], 64DP^[6]以及一种分子量为30,000的小鼠血清DBP^[7]。对这些肿瘤相关DBP的研究, 无论是在肿瘤发病机理的研究上还是在肿瘤的临床诊断和治疗方面均可能具有一定意义。

我们选择64DP为研究对象, 参照Katsunuma^[8]的方法, 经过改良, 从人血清中分离纯化了64DP, 并对其理化特性及生物学活性作了探讨。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 血清: 北医大三院血库正常人混合血清。

本文于1986年8月26日收到。

* 科学基金委员会资助项目

2. 试剂: DNA 纤维素 (按本实验室方法制^[9]) DEAE-Sephadex A-50及 Pharmalyte (Pharmacia), 考马斯亮蓝R-250(Fluka), 蛋白质分子量标准物(Serva), 糜蛋白酶(Boehringer), 胰蛋白酶(Difco), 辣根过氧化物酶 (Miles), 牛血清清蛋白及低电渗琼脂糖 (北京红星生化制品厂), 醋酸纤维素膜及硝酸纤维素膜 (浙江黄岩化工厂), 苯甲磺酰氟 (东风试剂厂)。其余试剂均为国产 AR 级试剂。

二、方法

1. 64DP的纯化

除特别说明之外, 所有操作均在室温下进行。所有缓冲液均为含有 1mmol/L EDTA, 1mmol/L 巯基乙醇及 0.1mmol/L 苯甲磺酰氟的 10mmol/L 磷酸钾缓冲液。其中 A 液 pH6.5, 含 0.15mol/L NaCl; B 液 pH6.5, 含 0.225mol/L NaCl; C 液 pH6.8, 不含 NaCl; D 液 pH6.8, 含 0.3mol/L NaCl。

(1) DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析

步骤与 Katsunuma^[8] 的方法相同。正常人血清 50ml 经 A 液充分透析 (4℃), 然后上样于 DEAE-Sephadex A50 柱上 (2.6×14cm), 先以 A 液充分流洗, 然后换 B 液洗脱收集。

(2) DNA 纤维素柱亲和层析

将以上收集液对 C 液于 4℃ 充分透析过夜。然后缓慢上样于经 C 液平衡的 DNA 纤维素柱上 (3×4cm), 先以 C 液流洗至流出液中不含蛋白质 (280nm 监测), 然后换以 D 液洗脱收集。

(3) 硫酸铵盐析

按 60% 饱和度在电磁搅拌下将固体硫酸铵逐渐加入至收集液中, 继续搅拌 20 分钟。然后于 4℃ 放置 2 小时。冷冻离心 (10,000g 20 分钟)。取上清对蒸馏水于 4℃ 充分透析除盐, 按 Lowry^[10] 法测蛋白含量。冷冻干燥浓缩成干粉后于 4℃ 保存。

2. 抗血清的制备

方法同前文^[11]。抗原为纯化的 64DP 及人血清全 DBP 两种。分别制得抗 64DP 抗血清及抗人血清全 DBP 抗血清。

3. 醋酸纤维膜电泳及转移电泳

(1) 醋酸纤维膜 (2×6cm), 取正常人血清为样品。上样量 3μl。以 0.05mol/L 巴比妥缓冲液 (pH8.6) 为电极液。电泳取恒压 80 伏持续 1 小时。同样样品平行做二份, 一份用 0.25% 氨基黑染色。另一份复盖于硝酸纤维膜上作转移电泳。电极液为 25mmol/L Na₂HPO₄, 电泳时取恒流 1.5 安培持续 1 小时。泳毕将硝酸纤维膜浸于 1% 酪蛋白溶液中 1 小时, 然后与 1:2000 酶标抗 64DP 抗体在室温下孵育 2 小时。经洗涤后以 0.25% 联苯茴香胺为作用物显色, 用水洗终止反应。

(2) 酶的标记: 基本上按照 NaKane 方法^[12], 采用过碘酸盐法将辣根过氧化物酶标记于抗 64DP 抗体上。结合物的酶与抗体的克分子比为 1.88。

4. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

方法同前文^[11]。其中 64DP 的制样方法有加巯基乙醇及不加巯基乙醇两种, 其余步骤相同。

5. 等电聚焦电泳

丙烯酸胺胶5.3%，其中含Pharmalyte 8.8%（由pH2—5.5与pH4—6.5两种等量混合而成）。采用卧式平板电泳（10×10cm，胶厚1mm），电泳时取恒压380伏持续3小时。泳毕以0.25%考马斯亮蓝染色。

6. 免疫电泳

采用低电渗琼脂糖以巴比妥缓冲液（0.05mol/L pH8.6）配成1%胶浓度。电泳时取恒压10伏持续2小时。然后开槽，在槽内加上兔抗人血清全DBP抗血清，置37℃保温18小时观察结果。

7. 糖蛋白染色

参照Johnstone方法^[8]，将SDS-PAGE后的胶板先经甲醇和冰乙酸混合液洗涤，然后以2.5%过碘酸钠酸性溶液氧化，并以Schiff试剂染色，最后用1%焦亚硫酸钠酸性溶液固定。

8. 蛋白酶抑制试验

糜蛋白酶或胰蛋白酶溶液与预保温的1%酪蛋白溶液（pH8.0）混合，37℃保温30分钟后以12.5%三氯乙酸沉淀蛋白质并离心（3000r/min10分钟）。取上清按Lowry法^[10]测OD_{650nm}。作抑制试验时先将酶溶液与一定量64DP混合，并在37℃保温30分钟，然后按上法测酶活性。

9. 氨基酸分析

取64DP 0.2mg加100μl 4mol/L甲磺酸（含0.2%色胺）。抽真空后充氮封口。然后于115℃水解24小时。以4mol/L NaOH中和。用Beckman 121MB型氨基酸分析仪测定。

结 果

一、64DP的纯化及纯度鉴定

纯化的步骤及各步纯化倍数和产率见Table 1。用抗64DP抗血清作火箭电泳定量测定各步提取液中64DP的含量。蛋白质含量以牛血清清蛋白为标准按Lowry法^[10]测定。

终提取物在SDS-PAGE上不论是经巯基乙醇处理与否，均呈现一条蛋白带，见Fig.1（样品4和5），其中5号样品未加巯基乙醇。在免疫电泳中提取物与兔抗人全DBP抗血清只形成单一沉淀线（Fig.2）。

Table 1 Purification of 64DP from Pooled Human Serum*

STEP procedure	volume(ml)	total 64DP(mg)	total protein(mg)	factor of purification	yield (%)
1. serum	50	25	4,000	1	100
2. DEAE-Sephadex A-50	90	20	230	14	80
3. DNA-cellulose	62	11	72	24	44
4. ammonium sulfate fractionation	11	4.4	4.4	160	18

* The 64DP content was measured by the rocket immunoelectrophoresis method.

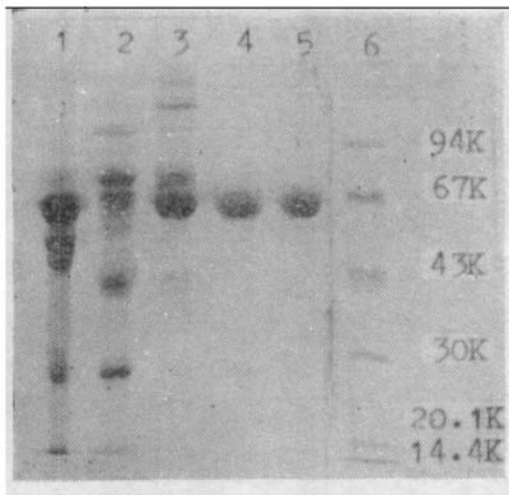


Fig.1 SDS-PAGE of purified 64DP

1. human serum,
2. elute from DEAE-Sephadex,
3. elute from DNA-cellulose,
4. ammonium sulfate fraction,
5. ammonium sulfate fraction without treatment of mercaptoethanol,
6. molecular weight markers consist of phosphorylase b (94,000), BSA(67,000), Ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100) and lactal bumin(14,400)

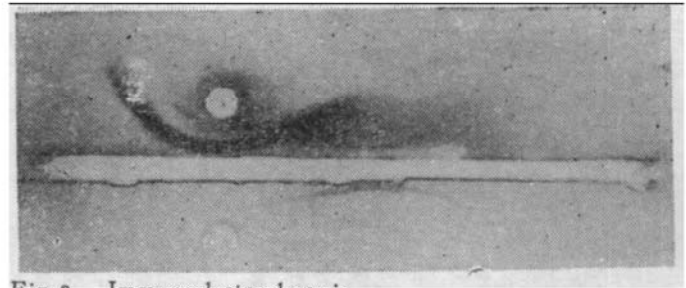


Fig.2 Immunoelectrophoresis
upper well, human serum DNA binding proteins
lower well, purified 64DP
middle trough, antiserum against human serum DNA binding proteins

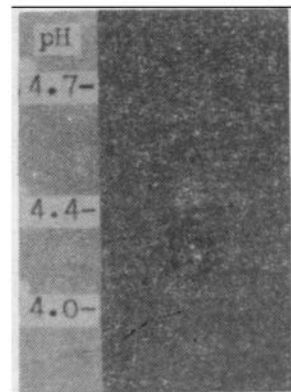


Fig.3 The pattern of isoelectric focusing electrophoresis of purified 64DP

二、分子量，等电点及其在血清蛋白质中的定位：

根据SDS-PAGE 测得 64DP 的分子量为64,000 (Fig.1)。等电聚焦电泳证实其等电点在4.2~4.4, 呈三至五条紧密相连的蛋白带 (Fig.3)。从人血清醋酸纤维膜电泳及特异显示64DP的对照中可见64DP在醋酸纤维膜电泳中的迁移率略小于清蛋白, 位于 α_1 球蛋白附近的位置 (Fig.4)。

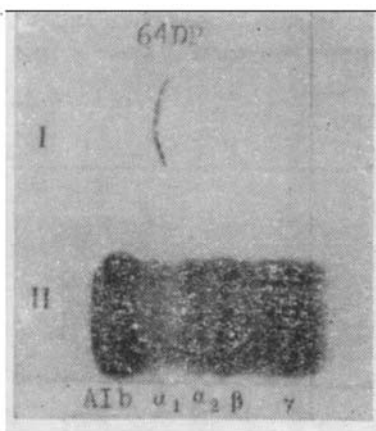


Fig.4 Localizaiothn of 64DP in acetate cellulose sheet electrophoresis of human serum.
lower, acetate cellulose sheet electrophoresis stained with amido black
upper, proteins electricly transferred from acetate cellulose sheet to nitro cellulose sheet and stained by the immunoenzymologic method using antibody against 64DP coupled with horseradish peroxidase.

三、糖蛋白染色

采用高碘酸Schiff试剂作糖蛋白染色能使64DP呈粉红色, 而对照的牛血清清蛋白未能显

色。说明提取物系一糖蛋白 (Fig.5)。

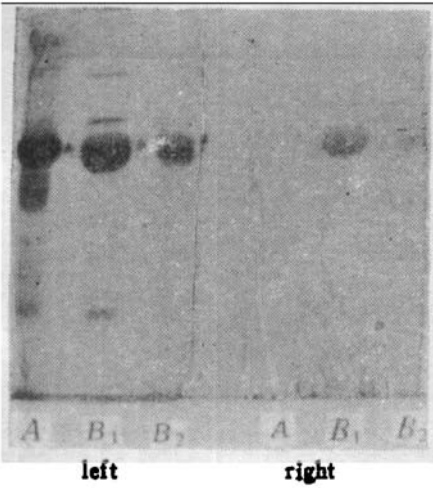


Fig.5 SDS-PAGE of 64DP and BSA
left, stained with coomassie brilliant blue R-250
right, stained by periodic acid Schiff's glycoprotein method
A, BSA, B₁, partly purified 64DP
B₂, purified 64DP

四、64DP的抑酶活性

以酶催化反应产物的吸光度 (O.D._{650nm})代表酶活性, Fig.6显示 64DP对糜蛋白酶有明显抑制作用, 而对胰蛋白酶活性无影响。

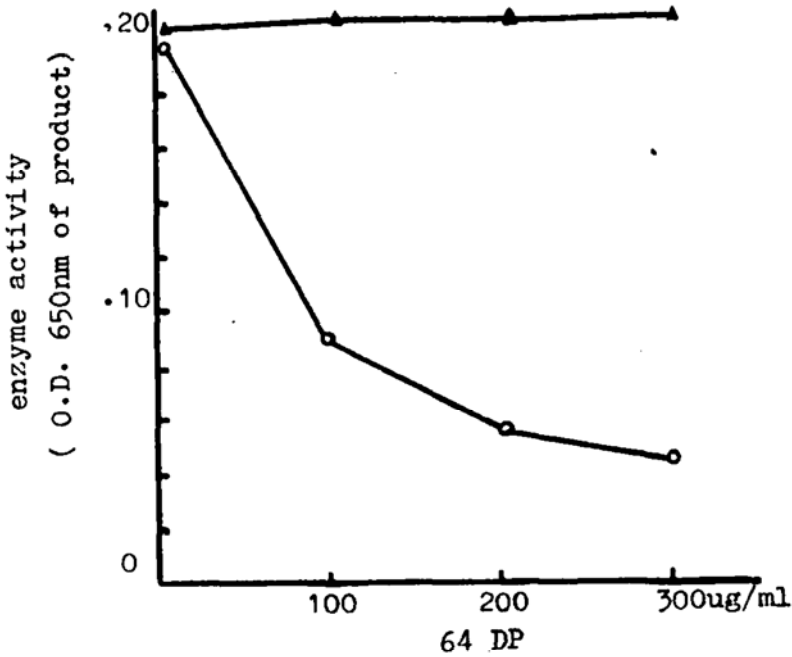


Fig. 6 Inhibition test of 64DP on chymotrypsin and trypsin
▲—▲ trypsin 20 ug/ml •—• chymotrypsin 100 ug/ml

五、氨基酸组成

纯化的64DP氨基酸分析结果见Table 2,其氨基酸组成及含量与 α_1 抗糜蛋白酶比较接近。其中酸性氨基酸和亮氨酸的含量比较丰富。

Table 2 Comparison of Amino Acid Compositions of 64DP and α_1 -Antichymotrypsin.*

amino acid	residues %	
	64DP	α_1 -antichymotrypsin*
Asp	11.12	11.19
Thr	6.92	7.08
Ser	7.03	7.31
Glu	11.75	11.42
Pro	1.84	3.42
Gly	3.87	4.11
Ala	8.19	7.76
Cys	0	0.46
Val	6.90	6.16
Met	3.66	2.51
Ile	3.40	5.25
Leu	11.97	12.79
Tyr	2.20	2.05
Phe	5.90	5.94
Lys	7.96	6.16
His	2.53	2.05
Trp	1.27	0.91
Arg	3.48	3.42

* The data for α_1 -antichymotrypsin were from Travis et al (14)

讨 论

本实验采用离子交换层析, DNA亲和层析以及硫酸铵盐析三个步骤, 从人血清中分离纯化了64DP。与Katsunuma^[8]方法相比, DNA亲和层析法较为简化, 同时省却了凝胶过滤这一步。经SDS-PAGE和免疫电泳鉴定, 纯度基本符合要求。按原法每100ml血清可提纯7mg 64DP, 而改良法可得9mg左右, 收率也有提高。

经多次SDS-PAGE测定, 纯化的64DP的分子量均为64,000, 与文献^[8]报道结果一致。氨基酸分析发现其酸性氨基酸含量较高, 同时用等电聚焦电泳测得其等电点在4.25附近, 比清蛋白的等电点(4.7)还低, 说明它是一种酸性蛋白质。

Siddiqui等^[15]发现64DP与 α_1 抗糜蛋白酶有交叉免疫反应, 同时两者在双向电泳中行为一致, 认为两者可能是同一种血清蛋白质。我们的实验结果支持这一意见。首先, 蛋白酶活性抑制试验表明64DP对糜蛋白酶有明显抑制作用, 而对胰蛋白酶却无影响, 表明它是一种有选择性的蛋白质类蛋白酶抑制物。已知人血清中存在着一组具有抑制蛋白酶活性的蛋白质, 包括 α_1 抗胰蛋白酶, α_1 抗糜蛋白酶以及 α_2 巨球蛋白等几种主要成分。它们的抗酶谱各不相同, 而其中能选择性抑制糜蛋白酶而不影响胰蛋白酶的只有 α_1 抗糜蛋白酶一种^[16]。据此, 64DP很可能就是 α_1 抗糜蛋白酶, 或者是它的衍生物。其次, 64DP的分子量与文献报道 α_1 抗糜蛋白酶很接近(58,000~68,000)^[14, 17]。醋酸纤维膜电泳和转移电泳证实64DP也属于 α_1 球

蛋白。糖蛋白染色 64DP 呈阳性反应；SDS-PAGE 时，加或不加巯基乙醇其电泳模式没有改变，说明它是一种单链糖蛋白与 α_1 抗糜蛋白酶相同^[14, 18]。氨基酸分析发现两者在氨基酸组成上比较相近。少数几种氨基酸，如脯氨酸，半胱氨酸和蛋氨酸等差别较大。考虑到这几种氨基酸含量都比较少，不易准确定量，故不能排除测定误差。 α_1 抗糜蛋白酶能溶解于 50% 饱和度硫酸铵^[18]，但按 Katsunuma 法^[8]分离 64DP 是取 50~70% 饱和度硫酸铵的沉淀。我们在提取过程中发现这一浓度硫酸铵溶液中的 64DP 主要是以溶解状态存在着的。此发现提供了又一证据说明 64DP 和 α_1 抗糜蛋白酶的类同性。同时也简化了纯化步骤，提高了产率。

已知 α_1 抗糜蛋白酶是一种急性反应蛋白，在感染、外伤及恶性肿瘤时其血清水平会异常增高^[19-21]。由于其特异性不高，限制了它作为肿瘤标志物在临床上的应用。而据 Nakasaki 等^[6]报道，血清 64DP 水平在癌症病人有特异增高。这一结果似与前述关于 α_1 抗糜蛋白酶的临床变化不一致。因此，关于各种病理条件下 64DP 水平的改变，有必要作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Anne, E.H. et al. (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 1089
- [2] Brehm, S.P. et al. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 24
- [3] Kroll, J. et al. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 434, 490
- [4] Parsons, R.G. et al. (1977), *Cancer Res.*, 37, 692
- [5] Parsons, R.G. et al. (1979), *Cancer Res.*, 39, 4341
- [6] Nakasaki, H. et al. (1981), *Cann.*, 72, 280
- [7] 董坦君等 (1984), 《中华医学杂志》64, 291
- [8] Katsunuma, T. et al. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 93, 552
- [9] 董坦君等 (1984), 《科学通报》12, 757
- [10] Lowry, O.H. et al. (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265
- [11] 於利敏等 (1986), 《生物化学杂志》, 2, 27
- [12] Nakane, P.K. et al. (1974), *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084
- [13] Johnstone, A. et al. (1982), *Immunocytochemistry in Practice*, Alden Press, Oxford, p143
- [14] Travis, J. et al. (1978), *Biochemistry*, 17, 5467
- [15] Siddiqui, A.A. et al. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1737
- [16] Heimberger, N. (1970), *Proceedings of the First International Res., Conf. on Proteinase Inhibitors*, pp 1-21
- [17] Laine, A. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 668, 429
- [18] Travis, J. et al. (1980), *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol 80, 765-71
- [19] Stockeley, R.A. et al. (1980), *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 122, 81
- [20] Daniels, J.C. et al. (1974), *J. Trauma*, 14, 153
- [21] Kelly, U.L. et al. (1978), *Biomedicine*, 28, 209

**A SERUM DNA BINDING PROTEIN WITH CHYMOTRYPSIN
INHIBITION ACTIVITY—PURIFICATION AND
CHARACTERIZATION**

Yu, Li-ming Tong, Tan-jun Zhang, Chang-ying
(Department of Biochemistry, Beijing Medical University)

ABSTRACT

A malignancy related DNA binding protein (64DP) in human serum was isolated and purified by ion-exchange column chromatography, DNA cellulose affinity column chromatography and ammonium sulfate fractionation. The purification procedure is simpler than that has been reported and the yield increased. The homogeneity of the purified protein has been tested by SDS-PAGE and immunoelectrophoresis. Its molecular weight is 64,000 and isoelectric point around pH 4.2 as determined by SDS-PAGE and isoelectric focusing analysis respectively. Acetate cellulose sheet electrophoresis and electric blotting proved it to be an α_1 -globulin. It showed a positive reaction in periodic acid Schiff's glycoprotein staining test. Amino acid analysis and enzyme inhibition test suggest that this protein is or resembles α_1 -antichymotrypsin.

Key words: serum DNA binding protein, 64DP, inhibitor of chymotrypsin, protein purification, protein electrophoresis.