DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.030

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1316-04

人红细胞膜DAF的亲和纯化及活性研究

郑 萍,邹 强,周 伟,谢佩蓉,李 华,郭 波 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 获得纯化并具有生物学活性的人红细胞膜促衰变加速因子。方法 经胰蛋白酶消化、正丁醇抽提及DE32离子交换色谱和抗体亲和层析等步骤从人红细胞膜影中分离纯化人红细胞膜DAF。以SDS-PAGE及免疫印迹实验检测纯度及抗原特异性,以C3转化酶体外组装实验及促衰变加速活性实验检测其补体抑制活性。结果 400 ml人全血最终可得纯化DAF约420 μg,回收率达26%;比活性为4.5×10^5 U/mg;纯化产物在SDS-PAGE中表现为70×10^3的单一蛋白条带,并在免疫印迹实验中可与抗人DAF单抗特异性结合。在生物学活性实验中,纯化产物既可促进C3转化酶的衰变,也可抑制C3转化酶的形成。结论 采用本方法可获得纯化的具有生物学活性的人促衰变加速因子。

关键词:促衰变加速因子;分离纯化;C3转化酶
中图法分类号:R329.24;R331.141;R392.11 文献标识码:A

Immunoaffinity purification and activity of decay-accelerating factor from human erythrocytic membranes

ZHENG Ping, ZOU Qiang, ZHOU Wei, XIE Pei-rong, LI Hua, GUO Bo (Institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To purify decay-accelerating factor (DAF) with biological activity from human erythrocyte membrane. **Methods** Human DAF was purified from human erythrocyte ghost by trypsin digestion, butanol extraction, sequential chromatography on DE32 and immunoaffinity chromatography. The purity of purified protein and its reactivity with antibody to human DAF was investigated by SDS-PAGE and Western blotting. The effects of purified DAF on assemble and decay of C3 convertase were also tested. **Results** Approximately 420 μg purified DAF was obtained from 400 ml human whole blood with 26% activity recovery and 4.5×10^5 units/mg specific activity. On SDS-PAGE, the purified protein showed a single band and gave an apparent Mt. about 70×10^3. Western blotting showed that monoclonal antibody to DAF could bind purified protein specifically and also inhibit the assemble and accelerate the decay of classical pathway C3 convertase. **Conclusion** This method can be used to purify DAF with biological activity from human erythrocyte membrane.

Key words: decay-accelerating factor; isolation; C3 convertase

补体系统在抵抗外来微生物入侵方面发挥着重要作用[1],但活化的补体系统也有可能导致自身组织细胞的损伤。为防止此种情况发生,与血清相接触的细胞表面通常表达有多种膜上补体调控蛋白。其中最重要的两个分子即是作用于C3/C5转化酶的促衰变加速因子(Decay-accelerating factor, DAF)和作用于攻膜复合物的CD59[2]。目前国外已构建表达人DAF分子的转基因猪作为异种器官移植的器官来源,并在动物实验中证实[3],猪的器官表达人DAF分子后,超急性排斥反应的发生率明显降低。通过基因工程方法构建可溶性的DAF、含DAF的多种补体调控蛋白嵌合分子以及DAF的突变体也具有巨大的应用潜力。

为比较嵌合分子和DAF突变体比活性的差异,并深入了解DAF分子结构与功能之间的关系,必须获得天然DAF分子的纯品。为此,我们曾采用胰蛋白酶消化、正丁醇抽提以及离子交换层析与凝胶过滤层析相结合的方法,分离纯化人红细胞膜DAF。在获得抗人DAF的单抗后[4],考虑到亲和层析在分辨率和回收率方面具有的独特优势,本研究又以抗人DAF单抗制备亲和层析柱,替代凝胶层析柱分离纯化人红细胞膜DAF,获得了更理想的分离纯化效果。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

健康人全血采自本校附属西南医院血站;PMSF购自E. Merck, TPCK处理的胰蛋白酶购自Sigma公司。CNBr活化的Sepharose 4B购于Phamacia公司。10000 NMWL超滤离心管购于Millipore公司。豚鼠血清1∶30稀释于40 mmol/L EDTA-明胶-巴比妥缓冲液(EDTA-GVB)作为C3-C9,以下称C-EDTA。

1.2 抗体

抗人DAF单抗DG9由本室制备和纯化[4]。鼠抗人血型糖蛋白A的单抗pep80由波兰科学院Duk教授惠赠。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(HRP-IgG),购自中山生物制品有限公司。

1.3 亲和层析柱的制备

按产品说明书将纯化的DG9单抗30 mg与3 g CNBr活化的Sepharose 4B偶联制备亲和层析柱。

1.4 人红细胞膜DAF的分离纯化

1.4.1 红细胞膜影的制备 400 ml人全血经PBS磷酸缓冲

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30080032);重庆市科委重点攻关项目(2000)
作者简介:郑 萍(1962-),女,四川省南充市人,高级实验师,主要从事补体生物学方面的研究。电话:(023)68752238
收稿日期:2002-07-01;修回日期:2002-09-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

盐溶液离心洗涤除去血浆及白细胞, 加至 10 L 膜影液中(5 mmol/L PB, pH 7.5, 含 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF), 4 ℃搅拌过夜, 以溶破红细胞。采用 Pellicon 超滤系统(Millipore)洗涤膜影并去除血红蛋白, 最后浓缩至 200 ml。

1.4.2　胰蛋白酶消化　　参照文献[5]方法, 膜影中加入胰蛋白酶于 4 ℃消化过夜(胰蛋白酶与膜影蛋白的质量比为 1∶20), 膜影液离心洗涤 3 次。

1.4.3　正丁醇抽提　　于消化的膜影中加入正丁醇至终体积为 20%, 4 ℃搅拌 30 min。10 000× *g* 离心 30 min。吸取水相部份, 加入固体 NaCl 至终浓度为 40 mmol/L, 以 Tris 调节 pH 至 8.0。重复抽提 1 次。

1.4.4　离子交换层析柱色谱分离　　50 ml 正丁醇抽提蛋白直接加至已充分平衡的 DE32(16.5 cm× 1.3 cm)离子交换柱, 封闭 2 h 后, 以 200 ml 平衡液(20 mmol/L Tris-HCl; 40 mmol/L NaCl; pH 8.0)淋洗, 除去未结合的蛋白质。接着进行线性梯度洗脱(40～420 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)。流速 1 ml/min。分部收集, 0.5 ml/管。逐管检测洗脱液中促衰变加速(Decay-accelerating, DA)活性、蛋白浓度及离子强度, 并将具有 DA 活性的组份合并。

1.4.5　亲和层析　　合并后的样品于 PBS 中透析平衡除盐后, 缓慢加至经充分平衡的亲和层析柱, 4 ℃留存 3 h 时。以 PBS 充分淋洗, 在紫外检测仪监视下以 3 mol/L KCNS 洗脱, 合并洗脱的蛋白峰, 随即用 10000 NMWL 超滤离心管更换缓冲液为 PBS 系统(0.02 mol/L PB, pH 7.0, 0.04 mol/L NaCl)。浓缩后测定蛋白浓度及 DA 活性。

1.5　DA 活性检测

按文献[6]方法制备豚鼠血清功能 C1、C2 及含有人 C4 分子的溶血中间体 EAC4。取最适用量的 C1 与 EAC4 共同孵育形成 EAC14, 随即加入最适用量 C2 孵育 5 min, 以形成经典途径 C3 转化酶 EAC4b2a。将倍比稀释的待检样品(75 μl)与 75 μl 的 EAC4b2a(1×10^8/ml)于 30 ℃继续孵育 15 min, 加入 150 μl 的 C-EDTA, 于 37 ℃孵育 60 min, 测定溶血率(Y), 并换算成每个细胞表面的 C3 转化酶平均有效溶血位点数(Z), 计算 C3 转化酶的衰变率。公式如下:

$Z = -\ln(1-Y)$

0 衰变百分率= (ZC－ZE)/ZC× 100%

ZC: 对照孔有效位点数; ZE: 检测孔有效位点数

将导致 30%衰变率所需的样品量定义为 1 个活性单位(U)。

1.6　蛋白浓度测定

按常规 Lowry 法进行, 以 BSA 为标准品。

1.7　SDS－PAGE 及免疫印迹实验

按照文献[7]方法, 采用 Laemmli 法, 于 10%的聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-PAGE。经 SDS-PAGE 电泳分离的人红细胞膜影及纯化蛋白转移至 NC 膜, 封闭后, 加入鼠抗人 DAF 单抗 IC6 培养上清(1∶1), 以鼠抗人血型糖蛋白 A 的单抗作为对照, 37 ℃孵育 1 h。漂洗后, 加入 HRP-GAMIgG(1∶500), 37 ℃继续孵育 1 h。最后以 4-氯-1-萘酚显色。

1.8　生物学活性检测

1.8.1　纯化产物对 C3 转化酶组装的影响　　将不同用量的纯化产物与 EAC4 于 30 ℃孵育 15 min 后, 随即加入最适用量的豚鼠功能纯 C1 和 C2, 孵育 5 min, 补加 150 μl 的 C-EDTA, 于 37 ℃孵育 60 min, 测定每管溶血率(Y), 并换算成每个细胞表面的 C3 转化酶平均有效溶血位点数(Z)。以淋洗蛋白作为对照。

1.8.2　纯化产物对 C3 转化酶衰变率的影响　　参照方法 1.5 制备经典途径 C3 转化酶 EAC4b2a, 然后加入不同用量的纯化产物于 30 ℃继续孵育, 分别于 10、20、30、40 和 50 min 取出 150 μl, 补加 150 μl 的 C-EDTA, 于 37 ℃孵育 60 min, 测定每管溶血率(Y), 并换算成每个细胞表面的 C3 转化酶平均有效溶血位点数(Z)。以 DGVB 缓冲液作为对照。

2　结果

2.1　DAF 的亲和层析纯化

人红细胞膜影经胰蛋白酶消化、正丁醇抽提, 透析除去正丁醇, 经 DE32 分离, 见图 1, DA 活性峰位于蛋白峰的上升支。收集合并有活性的洗脱管, 透析后直接上样到 DG9－Sepharose 4B 亲和层析柱, 结合, 淋洗, 再以 3 mol/L 的 KCNS 洗脱, 结果形成两个蛋白峰, 见图 2。分别收集、超滤、更换为 PBS 缓冲液体系, 测定其蛋白质浓度及 DA 活性, 结果 400 ml 全血可纯化产物约 420 μg, DA 活性回收率达 26%, 见表 1。而本实验室既往采用离子交换与凝胶过滤色谱分离方法, DA 活性回收率仅为 10.4%。

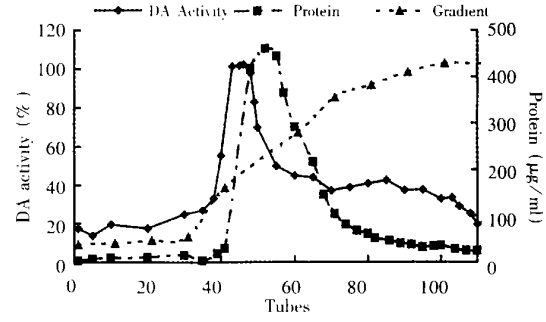


图 1　DE32 分离纯化 DAF

Fig 1　Isolation and purification of DAF with DE32

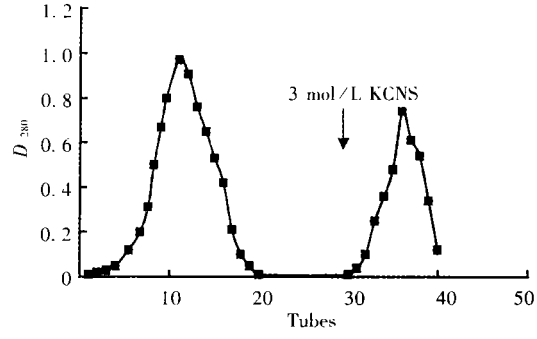


图 2　DG9 亲和层析柱纯化 DAF

Fig 2　Purification of DAF by DG9-Sepharose 4B column

表 1　DAF 分离纯化过程中比活性的改变

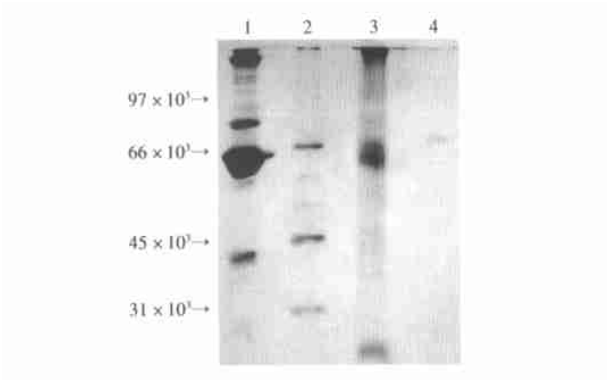
Tab 1　Changes of specific activity during isolation of DAF

Step	Total activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification efficiency	Activity recovery(%)
Butanol extract	7.3×10^5	898	813	1	100.0
DE32	3.1×10^5	81	3827	4.7	42.5
DG9-Sepharose 4B	1.9×10^5	0.42	4.5×10^5	556	26.0

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 纯化产物的鉴定

2.2.1 纯化产物分子量和纯度鉴定 所得纯化产物样品经SDS-PAGE分离，在70×10^3处可见单一蛋白条带，见图3。



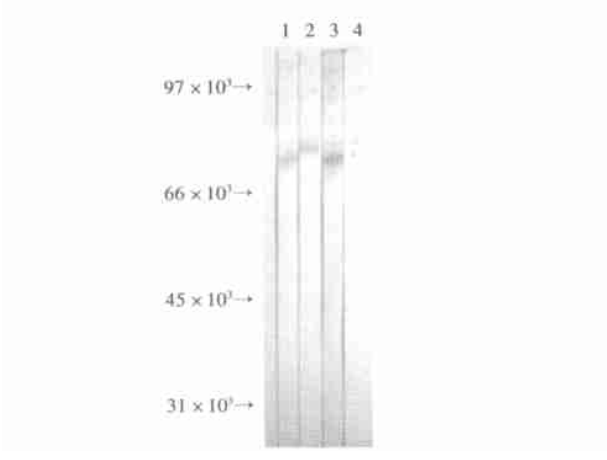
1: Human serum; 2: Mt. marker; 3: Erythrocyte ghost; 4: Purified DAF

图3 SDS-PAGE鉴定DAF纯度

Fig 3 Purity identify of DAF with SDS-PAGE

2.3 纯化DAF的抗原性鉴定

为确定洗脱液中DAF的抗原特异性，将浓缩后的洗脱液经SDS-PAGE电泳后，转移至NC膜，行免疫印迹实验。结果显示，纯化的DAF可与抗人DAF单抗IC6上清特异性在70×10^3处形成单一蛋白条带，而不与抗人血型糖蛋白A单抗pep80反应，见图4。提示所得DAF纯品中不含血型糖蛋白A，SDS-PAGE实验中70×10^3蛋白条带为人的DAF分子。此外，纯化DAF可与3株针对不同SCR的抗DAF单抗反应，提示纯化DAF具有天然分子的正确折叠构象(结果略)。



1: Erythrocyte ghost+IC6; 2: Erythrocyte ghost+pep80; 3: Purified DAF+IC6; 4: Purified DAF+pep80

图4 DAF的免疫印迹分析

Fig 4 Analysis of DAF with Western blot

2.4 纯化产物的生物学活性鉴定

将纯化产物与溶血中间体EAC4共同孵育，然后加入C1和C2体外组装C3转化酶，以观察纯化产物对C3转化酶组装的影响，结果发现，加入纯化产物后，红细胞表面形成的C3转化酶有效溶血位点数明显减少，且呈剂量效应关系，见图5。若先体外组装C3转化酶，然后与纯化产物混合，结果发现，与DGVB对照组相比，加入纯化产物后，C3转化酶的衰变过程明显加快，且随着纯化产物用量的增加，促衰变效应越明显，见图6。

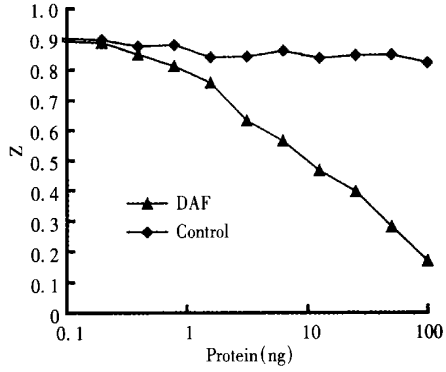


图5 纯化DAF对C3转化酶组装的影响

Fig 5 Effects of purified DAF on the assemble of C3 convertase

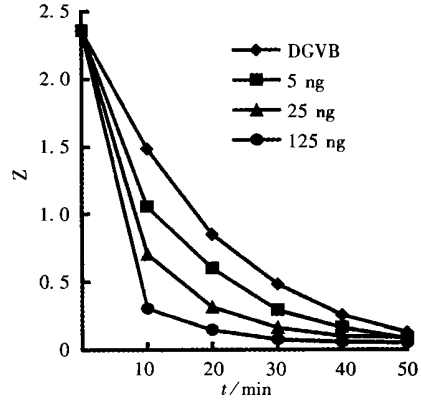


图6 纯化产物的促衰变活性

Fig 6 Decay-accelerating activity of purified protein

3 讨论

由于亲和层析法具有较高的分辨率和蛋白活性回收率，因而各实验室在获得抗原的单抗后，通常会建立抗原的亲和层析分离法，以简化抗原的分离纯化步骤并提高产率。但是，单纯依靠亲和层析一种方法，在大多数情况下很难获得高纯度的蛋白质，因而蛋白质的前期处理仍然是十分重要的。此外，在未经处理的蛋白质混和物中往往含有一些不可溶性的杂质及有机溶剂，会严重阻塞价格昂贵的亲和层析柱，缩短其使用寿命，因而必须加以避免。在DAF的分离纯化中，如果以亲和层析柱替代离子交换柱和凝胶柱，正丁醇抽提液中含有的正丁醇及残留脂类就会使亲和层析柱在使用1~2次后即不可使用。有鉴于此，我们以亲和层析柱替代凝胶过滤柱，保留了离子交换柱高吸附容量与低成本的优势，同时克服了凝胶过滤柱中样品被极大稀释的缺点，取得较好的分离效果。400 ml人全血最终可得纯化DAF约420 μg，回收率达26%，比活性达4.5×10^5 U/mg，高于我们曾采用的DE32与凝胶柱相结合的方法。对所得样品的纯度及免疫原性的鉴定结果表明，所得纯化产物在

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SDS-PAGE 中表现为 70×10^3 的单一蛋白质条带，分子量与文献报道相符，且该条带可与抗人 DAF 的单抗特异性结合。在功能活性实验中，纯化产物既可抑制 C3 转化酶的组装，也可促进 C3 转化酶的衰变。上述结果表明，采用上述技术路线，可获得具有生物学活性的人红细胞膜 DAF 纯品。

由于亲和层析中的洗脱步骤是在非生理条件下进行，因而是影响靶蛋白回收率的关键环节。与单抗结合的抗原能否被洗脱，是否会在洗脱过程中失活，均因抗原抗体的不同而情况各异。在本实验中，我们先曾采用亲和层析中较普遍使用的 pH 2.8 的甘氨酸-HCl 洗脱液，结果洗脱液中回收的 DA 活性显著低于上样样品中的总活性，提示甘氨酸-HCl 洗脱液不能将 DAF 有效洗脱或易导致 DAF 的失活。后换用 3 mol/L KCNS，取得理想的洗脱效果。

参考文献：

[1] Song W C, Sarrias M R, Lambris J D. Complement and innate immunity[J]. Immunopharmacology, 2000, 49(1—2): 187—198.
[2] Miwa T, Song W C. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(3): 445—459.
[3] Schuurman H J, Pino-Chavez G, Phillips M J, *et al*. Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors[J]. Transplantation, 2002, 73(7): 1 146—1 151.
[4] 邹 强，谢佩蓉，郑 萍. 抗人 DAF 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志，1999, 15(2): 122—124.
[5] Sugita Y, Negoro T, Matsuda T, *et al*. Improved method for the isolation and preliminary characterization of human DAF (decay-accelerating factor)[J]. J Biochem Tokyo, 1986, 100(1): 143—150.
[6] 邹 强，谢佩蓉，郑 萍. 豚鼠血清功能纯 C2 分子的制备和鉴定[J]. 免疫学杂志，1999, 15(1): 57—60.
[7] 金冬雁，黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 888—897.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2002)11-1319-01

个案与短篇

畸形子宫妊娠 10 例临床分析

Clinical analysis on 10 cases of pregnancy with deformity of uterus

王晓峰，夏华琼，吴国华 （重庆市涪陵中心医院妇产科，重庆 408000）

畸形子宫临床上较常见，可分为双子宫、双角子宫、中隔子宫、单角子宫、残角子宫。畸形子宫妊娠在诊治中有一定困难，处理不当，可导致严重后果。现将我院近 10 年诊治的 10 例畸形子宫妊娠，并探讨误诊原因和并发症，报告如下。

1 临床资料

我院从 1989—1999 年共收治畸形子宫妊娠 10 例，年龄 23～30 岁，平均年龄 25.5 岁。不全中隔子宫 7 例，完全中隔子宫 1 例，残角子宫 2 例。其中 9 例均有生产史，多次人流史，3 例有引产史。4 例行剖腹探查，其中 2 残为例角子宫妊娠（1 例妊娠至 42 周），1 例人流穿孔，1 例多次人流失败。

2 讨论

2.1 误诊原因

本组 10 例病例术前均未能作出子宫畸形诊断，误诊原因如下：①未询问既往有无阴道、宫颈畸形病史，双子宫常合并阴道、宫颈畸形，如双阴道、阴道不全纵隔、双宫颈等。②宫腔操作时未仔细探查宫腔。③人流术后未仔细检查吸刮组织，如漂浮检查有无绒毛，或将刮出物送病理检查。④忽略相关检查，如怀疑畸形子宫，可经 B 超引导下探宫腔，必要时作宫腔镜、腹腔镜检查。

2.2 并发症

①人流漏吸；②人流子宫穿孔；③反复引产失败；④宫内死胎；⑤子宫内膜异位症；⑥早产；⑦子宫破裂。

总之，畸形子宫类型各异，合并妊娠后诊断常有困难，可造成处理失误，甚至严重并发症，诊断需结合病史、妇科检查、宫腔探查，以及 B 超检查，必要时可作宫腔镜、腹腔镜最后确诊。确诊后再做手术及处理，以免造成病人痛苦。

关键词：子宫/畸形；妊娠
中图法分类号：R714.422 文献标识码：B

参考文献：

[1] 范光华. 残解子宫合并癌内膜异位症 10 例分析[J]. 中华妇产科杂志，1988, 23(2): 158—159.
[2] 张香珍. 6 例畸形子宫早孕的诊治体会[J]. 实用妇产科杂志，1988, 1(3): 44.
[3] 陈宗蕃. 残角子宫误诊 2 例分析[J]. 实用妇产科杂志，1999, 3(4): 148.

（编辑 张大春）

作者简介：王晓峰（1955—），女，重庆市涪陵区人，主治医师，主要从事妇产方面的研究。电话：(023)72223057
收稿日期：2002-03-11；修回日期：2002-06-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net