DOI:10.16016/j.1000-5404.1984.04.007

人补体C_{1q}的分离及鉴定

谢佩蓉 何礼芳 董奎微 冯庆和 朱锡华

（免疫学研究室）

提 要

本文报道了按Yonemasu及Stroud二氏略加改进的从人血清中分离C_{1q}的方法。该制剂通过双向扩散、免疫电泳及SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳等免疫化学分析和红细胞凝集试验、^{125}I-结合试验等生物学活性鉴定，其活性及纯度均较满意，产量达血清中C_{1q}量的15—25%。

C_{1q}是补体第一成分亚成分之一，在正常血清中依赖Ca^{2+}与C_1r及C_1s结合成巨分子复合物C_1，它在补体活化的经典途径中起着重要作用。许多实验研究如C_{1q}结构与功能之间的关系、C_1q的生物合成、淋巴细胞及血小板膜表面的C_1q受体以及这些受体在淋巴细胞毒反应、免疫复合物介导的凝聚和血小板的释放反应的可能功能等研究，都需要高纯度的C_1q。此外C_1q更广泛地应用于多种疾病（特别是自身免疫性疾病及结缔组织病）循环免疫复合物的检测。

C_1q的提取方法较多，其中Yonemasu和Stroud二氏[1]报导的在含赘合剂的低离子强度的溶液中分段沉淀的方法，为国外许多实验室所采用，国内也有少数实验室进行C_1q的提取工作。本室为研究免疫复合物病的致病机制，参照Yonemasu氏等的方法略加改进，从人血清中分离C_1q，并进行了鉴定，其纯度及活性均较满意，产量达血清中C_1q量的15—25%。现将C_1q分离及鉴定工作总结于下。

材料和方法

一、人血清及抗人免疫血清

1. 人血清 取自健康供血员新鲜血液，室温放置60分钟，待血液凝固后，放4℃冰箱3—4小时，经4℃1500g离心15—20分钟分离血清，冻存于－20℃冰箱（不超过一周）备用。

2. 抗人免疫血清 马抗人IgG、IgM及IgA血清（购自卫生部北京生物制品所）。兔抗人全血清系本室制备。兔抗人C_1q血清由第二军医大学长海医院免疫室惠赠[14]。

二、提取人Clq所用溶液

先配制0.1M EDTA-Na_2溶液，然后按下表配制其他溶液。

三、双向扩散和免疫电泳试验

按Campbell氏等[2]的方法进行。

四、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按李成文[3]、Kuchler[4]二氏的方法进行。

五、红细胞凝集试验

按McDonald氏[5]的方法进行。

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

溶液名称	0.1M EDTA-Na_2 (ml)	去离子水	pH	相对盐浓度	NaCl
A液 (0.026M EDTA-Na_2)	1560	4440	7.5	0.065	
B液 (0.063M EDTA-Na_2)	2520	1480	5.0	0.1	
C液 (0.035M EDTA-Na_2)	1400	2600	7.5	0.08	
D液 (0.01M EDTA-Na_2 0.75M NaCl)	10	90	5.0		43.83
E液 (0.01M EDTA-Na_2 0.75M NaCl)	10	90	7.5		43.83

注：上述溶液分别以10N及1 NNaOH调pH

实验结果

一、人C_1q的分离

系按 Yonemasu 和 Stroud 二氏的方法略加改进分离人C_1q，其流程如下：

1．取低温冻存之人血清(120-130ml)，融化后装入清洁的透析袋内，置于予冷的A液（约2500ml）中4℃透析4小时，换同样溶液继续透析10—11小时。

2．将透析后之人血清以13000转/分(20000g) 4℃离心20分钟，弃上清，沉淀物用上述A液洗管壁后重悬，并经13000转/分4℃离心20分钟，反复洗涤三次后，沉淀物溶解于1/5原血清量的D液中，4℃静止30分钟。

3．于4℃以14000转/分(25000g) 4℃离心30分钟，弃去不溶性沉淀物。

4．取上清装入清洁的透析袋内，置于予冷的B液（约25000ml）中4℃透析4小时。

5．以13000转/分4℃离心20分钟弃上清，沉淀物用上述B液洗管壁后重悬，并经13000转/分4℃离心20分钟，反复洗涤二次，沉淀物溶解于1/20原血清量的E液中，4℃静止30分钟。

6．以14000转/分4℃离心30分钟，弃去不溶性沉淀物。

7．取上清装入清洁的透析袋内，置于予冷的C液（约2500ml）中4℃透析过夜。

8．以13000转/分4℃离心20分钟，弃上清，沉淀物用C液洗管壁后重悬，并经13000转/分4℃离心20分钟洗涤一次，然后溶解于1/40原血清量的E液中，静止30分钟。

9．以19000转/分(40000g)4℃离心50分钟，弃去不溶性沉淀物，上清液即为C_1q。

C_1q含量的测定：按Yonemasu氏等[6]的方法计算，分离物(C_1q)于280nm读取O.D.值按$E^{1\%}_{1cm}$6.82计算含量。C_1q回收率达血清中C_1q的15—25%。

二、人C1q的鉴定

（一）双向扩散试验 由图1可见，分离的人C_1q与兔抗人全血清及兔抗人C_1q血清各形成一条沉淀线，与马抗人IgG、IgM及IgA则未呈现反应；对照侧以人全血清代替C_1q，则与抗人全血清形成多条沉淀线，与抗人C_1q血清、抗人IgG、IgM、IgA于不同部位各形成一条沉淀线。

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

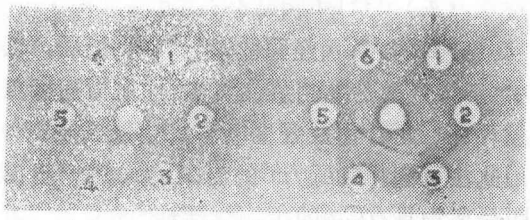


图1　分离的人C_{1q}双向扩散试验结果

试验侧：（左）中间孔为分离的人C_{1q}

对照侧：（右）中间孔为人全血清

周围孔：1.兔抗人全血清　2.兔抗人C_{1q}

3.马抗人IgG　4.马抗人IgM

5.马抗人IgA　6.生理盐水

（二）免疫电泳试验　图2A所示，分离的人C_1q与抗人全血清及抗人C_1q血清于慢γ区呈现一条沉淀线（图2A左侧），而作为对照的人全血清与抗人全血清在不同位置形成多条沉淀线，与抗人C_1q血清在慢γ区亦仅呈现一条沉淀线；当分离物经56℃加热30分钟灭活后C_1q与抗人全血清不再形成沉淀线。

（三）SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳　分离的C_1q经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，用卡马斯兰染色，结果在阴极端有一条染色带（图2B），与Yonemasu[1]和Volanakis[7]二氏分离的C_1q电泳位置相一致。此外距阴极端约1.5cm处尚见有一微细的染色带，可能为污染蛋白。

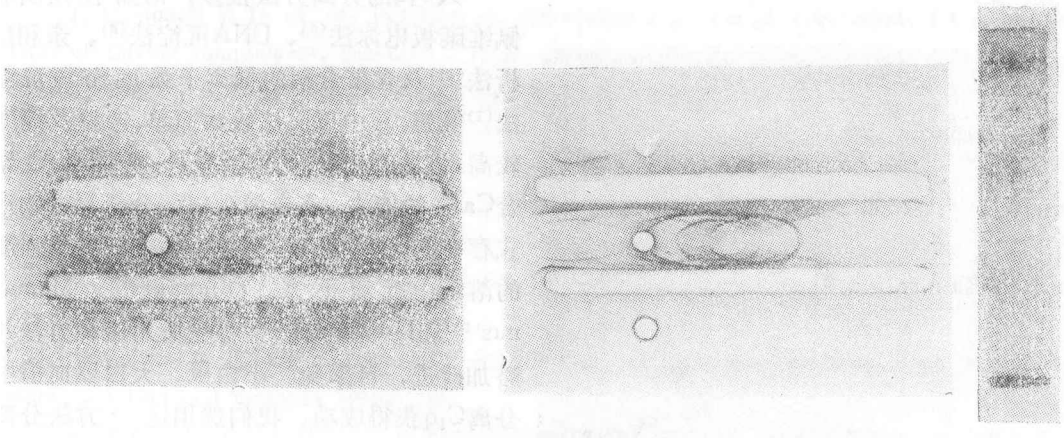


图2 A　　图2B

图2　分离的人C_1q

图2 A：免疫电泳 左图：上下孔为分离的人C_{1q}，中间孔为人全血清，上槽：抗人C_{1q}血清，下槽：抗人全血清；右图：上孔为分离的人C_{1q}，下孔为经56℃，30分钟处理后的分离物，上下槽均为抗人全血清。

图2 B：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。接近阳极端的为非特异性染色带[7]。

（四）红细胞凝集试验

用巴比妥缓冲盐水作为稀释液，将分离的人C_1q（400μg/ml）进行一系列倍比稀释做红细胞凝集试验，测定凝集效价，另以巴比妥缓冲盐水代替分离的人C_1q作为对照。此外将－70℃保存30天的分离物以同样条件进行红细胞凝集试验，以了解保存后C_1q的生物学活性下降情况，结果如表1所示，新分离的人C_1q凝集效价达1:16，即25μg/ml之C_1q与致敏绵羊红细胞可呈明显的凝集现象；而－70℃保存30天的C_1q，红细胞凝集效价下降4倍，需100μg/mlC_1q与致敏绵羊红细胞呈明显的凝集现象。

上述结果说明，所分离的人C_1q具有一定的生物学活性，而保存后则活性下降。

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

表1 人C_{1q}红细胞凝集试验

人C_{1q}的稀释度	红细胞凝集效价	
	新分离的C_{1q}	−70℃保存30天的C_{1q}
原液	⧺	⧺
1:2	⧺	⧺
1:4	⧺	⧺
1:8	⧺	++
1:16	⧺	+
1:32	+	±
对照	−	−

“⧺”100%红细胞凝集；“⧺”75%红细胞凝集；“⧺”50%红细胞凝集；“+”25%红细胞凝集；“−”细胞无凝集现象。

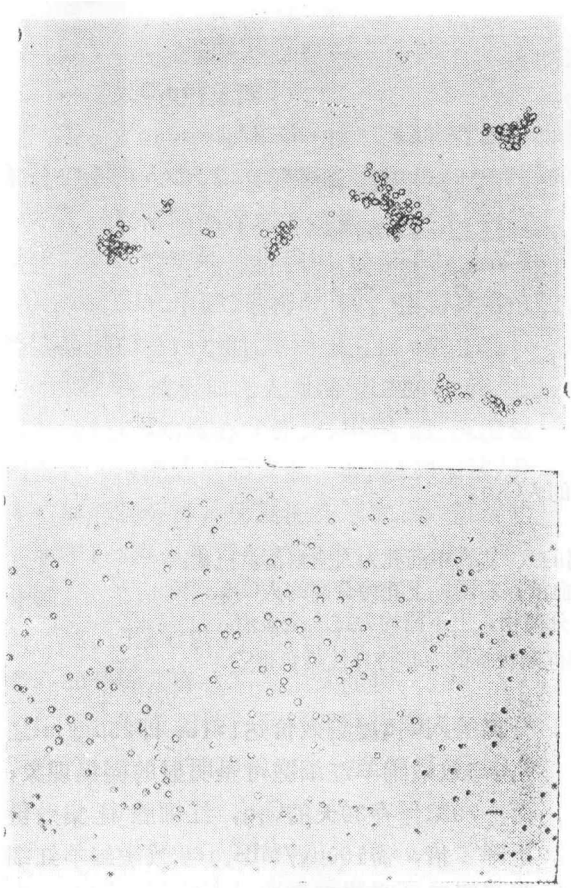


图3 人C_{1q}红细胞凝集试验结果（×280）
上图：人C_{1q}与致敏绵羊红细胞的凝集现象
下图：致敏绵羊红细胞对照

（五）^{125}I-C_{1q}结合试验

分离的人C_{1q}经同位素^{125}I标记后，以^{125}I-结合试验检测急性实验性血清病家兔循环免疫复合物及凝聚IgG，获阳性结果[8]。用此法可测得10μg/ml的凝聚IgG，进一步说明分离物具有C_{1q}的生物学活性。

根据上述免疫化学和生物学的方法鉴定，认为分离物为人C_{1q}，且具有较好的纯度及生物学活性。该制剂并经中国医学科学院基础医学研究所鉴定，亦认为是人C_{1q}。

讨　论

人C_{1q}的分离方法很多，诸如柱层析和佩维康板电泳法[9]、DNA沉淀法[10]、亲和层析法[11]及含赘合剂的低离子强度分段沉淀法[1]等等。其中以后法较为简单、产量及纯度较高。该法利用赘合剂（EGTA或EDTA）结合Ca^{2+}的能力，将血清中以巨分子复合物形式存在的C_1qrs解离，而使C_{1q}在低离子强度的溶液中沉淀下来。Volanakis[7]，Mcmanus[12]和Hoffken氏[13]等先后用这种方法并略加改进，自家兔、小白鼠、大白鼠血清中分离C_{1q}获得成功，我们选用这一方法分离人C_{1q}也获得相似结果。

Yonemasu氏等分离人C_{1q}的预备试验中曾经表明，在一定范围内溶液的相对盐浓度与血清中C_{1q}及IgG、IgM的丢失成正比关系，也就是说溶液的相对盐浓度低，C_{1q}丢失少，制剂中IgG、IgM污染量多，反之提高溶液的相对盐浓度，C_{1q}丢失多，IgG、IgM污染量亦随之减少，为使Ig的污染量为最低限度，而保持C_{1q}有较高产量，氏等采用不同相对盐浓度的溶液，以三次分段沉淀的方法分离人C_{1q}，经本实验室反复实践的结果，认为溶液离子强度的高低直接影响到C_{1q}的产量及纯度，因而配制溶液时掌握好这一点是极为重要的。

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

C_{1q}通过其末端球形亚单位可与抗原抗体复合物或凝聚IgG相结合，这是C_{1q}生物学活性之一，目前已利用这一特性，建立了数种检测循环免疫复合物的方法，因而分离的C_{1q}除要求具有一定的产量及纯度外，尚须具有较好的生物学活性。鉴定C_{1q}生物学活性的方法，诸如溶血试验、乳胶凝集试验、红细胞凝集试验等，后者方法简单，实验条件要求不高，结果比较稳定曾为McDonald氏[5]等用于检测马C_{1q}的活性。用该实验证明新提取的C_{1q}活性高，冷冻保存后可使活性下降，反复冰冻融化则活性完全消失。我们用红细胞凝集试验来鉴定人C_{1q}的活性，也获得类似结果。

参考文献

1. Yonemasu K and Stroud RM: C_{1q}: Rapid purification method for the preparation of monospecific antisera and the biochemical studies. J Immunol 1971; 106:304

2. Campbell R D, et. al: Purification and characterization of subcomponent C_{1q} of the first of Bovine complement. Biochem J 1979; 177: 531

3. 李成文：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的进展。国外军事医学资料1980;3:7

4. Kuchler RJ: Protein. In: Biochemical methods in cell culture and virology. 1977, part 3, pp. 280

5. McDonald TL and Burger D: Purification of the subunit C_{1q} from the first component of equine complement. Immunol 1979; 37:517

6. Yonemasu K, et al: Chemical studies on C_{1q}; a modulator of immunoglobulin. Biochem Biophys Res Commun 1971; 43: 1388

7. Volanakis JE and Stroud RM: Rabbit C_{1q} purification, functional and structural studies. J Immunol methods 1972; 2:25

8. 谢佩蓉等；应用^{125}I-C_{1q}结合试验检测急性实验性血清病家兔循环免疫复合物的动态。第三军医大学免疫学进展（二）12页

9. Calcott MA and Müller-Eberhard HJ: C_{1q} protein of human complement. Biochemistry 1972; 11:3443

10. Agnello V, et al: Precipitin reaction of the C_{1q} component of complement with aggregated γ-globulin and immune complexes in gel diffusion. Immunology 1970; 19:909

11. Sledge CR and Bing DH: Purification of the human complement protein C_{1q} by affinity chromatography. J Immunol 1973; 111:661

12. Mcmanus LM and Nakane PK: Isolation and characterization of mouse C_{1q}. J Immunol methods 1980;36:159

13. Hoffken K, et al: Rat C_{1q}, similarity to human C_{1q} in functional and compositinoal properties. Immunochemistry 1978; 15:409

14. 曹文飞等：用优球蛋白作免疫原制备抗人C_{1q}抗体。上海免疫学杂志 1982; 2:2

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

Isolation & Identification of Human Complement C_1q

Xie Peirong, He Lifang, Dong Kuiwei, Feng Qinghe, Zhu Xihua

(Department of Immunology, The Third Military Medical College)

This paper is to report the authors' experience in using the modified Yonemasu and Stroud's method to isolate C_{1q} from human serum. After immuno-chemical analysis with double diffusion, immunoelectrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and after biological activity evaluation with red cell agglutination and ^{125}I binding assay, the C_{1q} prepared was found to be satisfactory both in its purification and in its activity. The amount isolated could reach as high as 15-25% of the amount in the serum.

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