

猪胰羧肽酶A制剂的抽提及其 对乙型肝炎抗原的降解或灭活作用

I、猪胰羧肽酶A制剂的抽提及其鉴定

传染病研究室 吕新法 张秀芝

指 导 者 何南祥

1929年Walschmidt-Leitz和Purr⁽¹⁾首次报道在牛胰提出物中存在着羧肽酶A的活性,后该酶被Anson(1935)⁽²⁾从牛胰中分离结晶出来。此后对这种金属肽链端解酶(metalloexopeptidase)的结构和功能作了广泛研究^(3~6)。1975年Grabow⁽⁷⁾等人报道,在电镜下观察到人粪中存在一种能破坏乙型肝炎抗原的拮抗物,并认为该物质可能就是羧肽酶A。我室⁽⁸⁾1975年发现人及动物小肠粘膜等组织匀浆中存在一种抑制HBsAg的物质,为了深入研究这些物质,我们参照Cox等⁽³⁾分离结晶牛胰羧肽酶A和Folk等⁽⁹⁾分离猪胰羧肽酶A的方法对猪胰羧肽酶A作了抽提和鉴定,现概述如下。

材料和方法

取新鲜猪胰放入贮有冰块的壶内备用。

DEAE纤维素是Whatman DE11,使用前按Wintersberger⁽¹⁰⁾叙述的方法进行预处理。

激活时用的胰蛋白酶系Difco牌,内加50%的硫酸镁。

羧肽酶的活性因测肽酶和酯酶活力的试剂^(11,12)未能购到,故用能否降解高滴度的HBsAg来判定⁽⁸⁾。

蛋白质浓度用10%三氯醋酸沉淀后置104°C干燥后称量测定之⁽¹³⁾。

等电点测定,样品对双蒸水透析、蛋白浓度要在20毫克/毫升,而后稀释到15毫克/毫升,用0.1N醋酸滴定^(14,15)。

光谱测定时所用稀释剂为pH7.0的0.5M氯化钠、0.01MTris,样品先对稀释液透析平衡后再做⁽¹⁶⁾。

天然羧肽酶A克分子吸收系数的测定⁽¹⁵⁾,将样品在pH7.0的0.1MTris,0.05M氯化钠液中透析3次,每次24小时,取出后用同液稀释、对照就用该缓冲液。

用原素吸收光谱法测定锌含量⁽¹⁷⁾,样品需先对pH7.5的无金属的0.02MTris,0.1M氯化钠缓冲液透析去除多余金属(所有缓冲液在临用前要用含有0.01%二巯胺的四氯化碳抽提去金属方可用),再用EDTA,1.10-菲绕林螯合后测定。

聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳测定酶蛋白的区带。

热稳定性试验:50°C和70°C均加热30与60分钟,在最适pH盐浓度下观察其活力丧失情况。

猪胰羧肽酶A抽提的具体方法如下。

第一法:取新鲜的整只剥下的猪胰,剔除结缔组织与脂肪,捣碎后按1克新鲜猪胰加2毫升双蒸水置4°C抽提4小时、后置-40°C低温冰箱内过夜。用纱布除去组织粗渣和部分脂肪后,再经离心、赛氏滤器除菌过滤得褐黄色透明滤液。

DEAE纤维素柱层析,洗涤后的DEAE纤维素用pH8.0的0.005M磷酸钾缓冲液平衡后,用水泵抽水所产生的真空进行装柱,边摇DEAE纤维素混悬液边装填,装填到一定高度柱床匀称致密无皱褶断层出现为止。用同一缓冲溶液2升滴洗柱子后,把澄清的猪胰提出液直接上柱[54厘米×1.9厘米(内径)],流速约45滴/分,而后用磷酸盐线性梯度即0.005M到0.33M的缓冲液进行洗脱,计时收集,5分钟为一管,每管约10~12毫升,用UV280mμ的吸收度进行蛋白质峰形定位(图1)。该法之优点是在很低的盐浓度下前羧肽酶B就被洗脱下来,从而排除了羧肽酶B的干扰(图1)

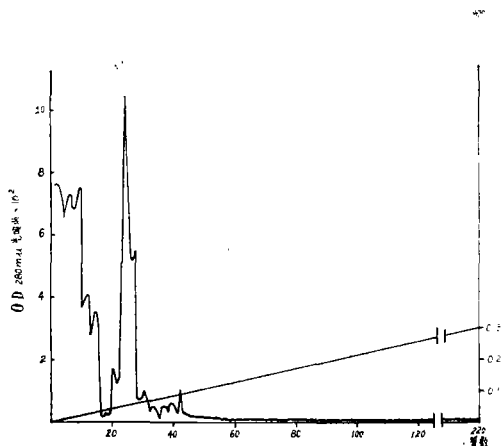


图1. DEAE DE11的柱层析结果

把符合文献上所描述的峰形管号(21管—120管)混合起来。每升洗脱液加入固体硫酸铵283克(相当于40%饱和度),待前次加入的溶解后再添加第二次,加入的总时间不得超过1小时。同时随时滴加1N氢氧化钠使混悬液的pH保持在7.2以上。振荡后置4°C冰箱沉降。次日将析出沉淀的混悬液离心,收集黄色沉淀称为沉淀1,此沉淀用双蒸水作成悬液,对蒸馏水透析除盐,同时收集上清液备查。

酶的激活和结晶,部分纯化的前羧肽酶A(沉淀1),虽经透析除盐通常仍有稀疏

的,非结晶形态的沉淀存在,要离心去除。而后在清晰的、微微发黄的上清液中加入相当原体积的1/3的1M磷酸钾缓冲液,使pH恢复到8.0,其时盐浓度为0.25M。加入胰酶,同时加入少量百里酚抑制细菌生长,置37°C水浴中孵育16小时后,立刻用冰块冷却到0°C,孵育时形成的小量沉淀用离心去除,激活了的上清液(所谓羧肽酶A)在5°C下对pH8.0的1升0.001M磷酸钾缓冲液透析24小时。如此反复对同一缓冲液透析多次待用。

为了证实上述提出液中有无酶的活性,把胰提出液、柱层析收集的前羧肽酶B液、和硫酸铵沉淀后的上清液及所谓羧肽酶A与HBsAg抗原作成1:1(稀释抗原),在37°C水浴中作用3小时,进行对流免疫电泳测定。结果:胰提出液已无活性、前羧肽酶B和所谓的羧肽酶A稍次,而以硫酸铵沉淀后的上清液降解活力最佳。

接着在冰块冷却下,往备查的硫酸铵沉淀过的上清液中再继续加入固体硫酸铵至0.65饱和度左右,做法同前,其时有乳白色沉淀出现,置4°C冰箱静置过夜,次日离心收集沉淀,得沉淀2(呈灰褐色),用双蒸水做成适量悬浮液,对蒸馏水透析除盐后,再对pH8.0的0.001M磷酸钾缓冲液透析三次,接着依次对pH8.0的0.02M佛罗那钠配成的0.5M、0.2M、0.15M、0.1M的氯化钠缓冲液,各透析24小时贮存储备用。所不同的是该处沉淀2溶液未经胰酶激活,其沉淀后的上清也收集备查。

这时再进行HBsAg的降解试验表明:沉淀2作成的悬液对HBsAg具有很好的降解能力,所谓羧肽酶A稍次,上清液最差。

第二法:为了克服柱子小,酶得量低的困难,我们把Folk和Schirmer⁽¹⁷⁾分离猪胰羧肽酶A方法同Cox等人结晶牛胰羧肽酶A的分离方法结合起来,加以适当更改,达到提高小柱分离能力的目的。其方法是:往

双蒸水猪胰提出液中加入1N NaOH溶液,把pH调到7.2,搅拌下加入固体硫酸铵到0.35饱和度(每升加209克),并滴加1N NaOH溶液维持该液pH在7.0~7.2之间,放置30分钟,离心收集蛋白沉淀用双水蒸配成适量体积(250毫升)。搅拌下往该液里加入50毫升于零度下饱和的硫酸铵溶液,调节pH至7.2。平衡30分钟后,离心去沉淀,往每100毫升上清液里再次加入零度下饱和的硫酸铵液22.5毫升,搅拌30分钟离心之,收集沉淀用最少量pH8.0的0.005M磷酸钾缓冲液加以溶解,并对它透析多次至平衡,然后上DEAE纤维素柱,其后步骤与第一法基本类同,层析结果看图2,用该方法可直接分离得沉淀2。

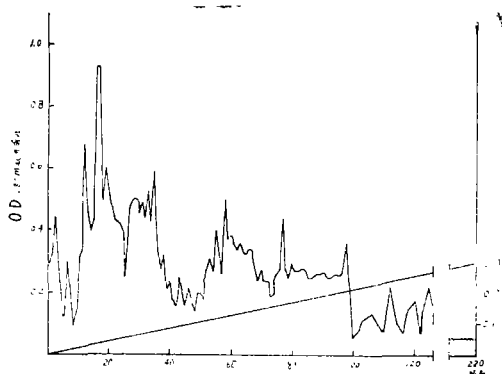


图2、国产DEAE的柱层析结果

第三法,将经三次硫酸铵分部沉淀,后用pH8.0的0.005M磷酸钾缓冲液溶解,再对该液透析24小时,继而对双蒸水透析3次,每次24小时,再用 $-5^{\circ}\text{C}\sim-10^{\circ}\text{C}$ 的盐水冷却,以6,000转/分离心45分钟,去除透析中析出的无定形沉淀。上清液经pH计测定后直接用0.1N醋酸滴定到5.5,这时清晰液由清变成乳浊,静置平衡5分钟。马上放入 $-5^{\circ}\text{C}\sim-10^{\circ}\text{C}$ 的用盐水冷却的离心机上离心,弃上清液,沉淀用冷却的双蒸水溶解,如此重复进行2~3次等电沉淀,对HBsAg作了降解试验,表明也可得到活力高的羧肽酶A。

结果与讨论

一、羧肽酶A的一般性质以及将提出物定为羧肽酶A的几个实验依据?

1. 羧肽酶A的一般性质。

羧肽酶A属于蛋白水解酶类的肽链端解酶(exopeptidase)之一,它能水解与末端羧基邻接的肽键,即能切去C端部位的芳香族的和非极性氨基酸⁽¹⁸⁾。近年来,蛋白水解酶受到极大的重视,因为它们在研究蛋白质结构上是一种很有用的工具,对它们的化学性质和作用机制的阐述有着理论与重大的现实意义。

羧肽酶A在机体中以无活性的酶原形式即前羧肽酶A的形式存在,分子量为98,000,经过胰酶等激活,成为有活性的羧肽酶A,分子量为34,300。它的沉降常数为 $S_{20,w}=3.34$,由308(或307)个氨基酸组成。其等电点为5.5,第248个位置是酪氨酸,它结合有一个锌原子,每个克分子羧肽酶A含有1克原子锌,即65.38克锌,或者说每克酶蛋白含锌1,910微克。锌起催化作用,当用1.10-菲绕林、 β -苯基丙酸等把锌去掉时酶便无活性。而由这类螯合剂引起的抑制可以通过稀释或者加入象铜这类金属离子而恢复活性。许多金属离子如钴、锌、镍、锰、镉等也能起催化作用,以钴和锌为最佳。该酶在水溶液中较稳定、纯度越高稳定性越差。把酶液冰冻会导致部分活力丧失,冻干的酶仅保留原有活力的20~40%。酶的最适pH为7.5~8.0,盐浓度为0.15M~1M NaCl液。测定活力时常用的底物为苯酯基甘氨酸-L-苯丙氨酸(Carbobenzoxylglycyl-L-Phenylalanine),它还具有酯酶活性能催化苯酰胺基乙酰-dl- β -苯基乳酸盐(hippuryl-dl- β -phenyllactate)水解。若用N-乙酰咪唑处理使酶乙酰化能增加酯酶活力,降低肽酶活力。用羧胺去酰化后又能恢复该酶的原有活力。四硝基甲烷亦具有类似的效果。此酶对热不

表1 三种不同方法制得的提出物降解HBsAg的结果

方法及浓度	HBsAg 的 稀 释 度						内 对 照
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
第一法(0.89毫克/毫升)	—	—	—	—	—	—	—
第二法(0.75毫克/毫升)	—	—	—	—	—	—	—
第三法(2.2毫克/毫升)	—	—	—	—	—	—	—
HBsAg 对 照	+	+	+	+	+	+	—

(—)表示HBsAg阴性, (+)表示HBsAg阳性。

稳定, 50°C加热50分钟, 活力丧失 90%⁽⁹⁾, pH5.0时酶就失活。

在用第一法试制时, 由于系用未经加工的抽提原液上柱, 其结果是得量很低。第二法将第一法原液先经三步硫酸铵盐析预筛, 去掉原液中的相当数量的杂蛋白, 由于提高了上柱样品的纯度; 最大限度地使用了柱子的分离效能, 从而提高了得量, 终于制得了小量、形状为晶亮的细微盐状结晶(当在双蒸水中反复透析时)。我们将上述三法提得的提出物对HBsAg作了降解试验, 均显示它们有降解HBsAg的能力(表1)。

2. 本文用上述三法制得的提出物认为是羧肽酶A的实验依据是:

(一) 等电点5.5~5.6与文献相符。

(二) 235~320mμ的全光谱测定: 证明有一典型的蛋白质峰形(图3)。

(三) 天然羧肽酶A克分子吸收系数为 $6.42 \times 10^4 \text{ mole}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ 或者说 1%羧肽

酶A溶液在光路为 1 Cm的比色杯中, 其278 mμ的吸收度为 18.8即 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 18.8$, 本文为 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 19.1$ 。

(四) 本提出物的含锌量为 1690 微克/克酶蛋白(可能是受酶纯度不高的影响)。

(五) 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳层析图谱显示区带所处位置与文献同⁽⁹⁾, 但还有其它杂蛋白存在, 说明我们的提出物系由 $A_1A_2A_3$ 组成的(图4)。

(下转216页)

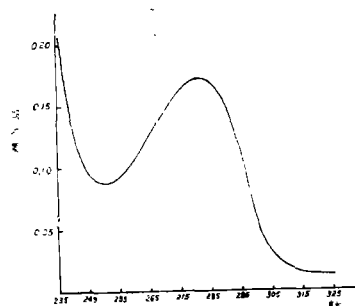


图3 提出物的全光谱测定结果

表2 提出物加热后的失活情况

作用温度 (°C)	作用时间 (分)	HBsAg 的 稀 释 度						内对照
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
50	30	—	—	—	—	—	—	—
	60	+	+	+	+	—	—	—
70	30	+	+	+	+	—	—	—
	60	+	+	+	+	+	+	—
对 照		—	—	—	—	—	—	—
HBsAg对照		+	+	+	+	+	+	—

三、本病例根据第一次手术记载，术前、术后都考虑为畸胎瘤。实际上，即使是实质性的畸胎瘤，多半也是恶性的。对于恶性卵巢肿瘤，不论包膜完整与否，术后加用一定量的预防性化疗，以防手术不彻底，是十分必要的。本病例当时无明显转移征象，但从术后3个月出现锁骨上转移性无性细胞瘤这一事实，充分证明当时实质上已有淋巴转移。临床上，为了初步判断卵巢肿瘤的性质，我们建议，肿瘤切下后，立即剖开检查，最好列为常规。本病例先后3次住院手术，2次复发，第1次左锁骨上转移瘤完整切除后，虽采用化疗，但因白血球下

降，被迫停药。事后不单在原处又出现转移瘤，而且左上腹也出现巨大转移瘤，在如此广泛转移而又无法切除的情况下，第2次化疗，同样因反应严重和白细胞降到950，血小板降到29,000，而再次被迫停药。经过化疗，疗效是显著的，但自动回家时，肿瘤未完全消失，病情垂危。在绝望之余，采用长期服用草药蛇莓的治疗方法，收到肿瘤完全消失，健康逐渐恢复的效果。迄今3年余，特别经过1次足月妊娠分娩，仍无复发征象。应该说，中草药蛇莓也发挥了一定作用。因此，这是一个中西医结合治愈的典型病例，大有探讨的价值。

（上接第176页）

（六）对热很不稳定，50°C加热60分钟和70°C加热30分钟时，70~80%的降解HBsAg活力遭到破坏。表2是同一批提出物在最适PH盐浓度下加热造成降解活力丧失的情况。

综上所述，根据制品的理化性质和对HBsAg具有降解作用，我们初步认为本实验提出物即是羧肽酶A。

二、为什么本文第一法提得的酶的活性物质在沉淀2而不在沉淀1中呢？

猪胰提出物对HBsAg的降解试验中，发现活性物质在沉淀2而不在沉淀1中。沉淀2是我们在沉淀1的上清液中加入固体硫酸铵而得的一个灰褐色沉淀物。按Cox等人制备结晶牛胰羧肽酶A的方法，羧肽酶A应在用40%饱和度的固体硫酸铵沉淀部分中，而本文在降解HBsAg的试验中沉淀1的活力不及沉淀2的活力强。分析造成酶的活性主要在沉淀2的原因是由于分离过程中1.全过程温度太高；2.无酶的自动激活的抑制剂盐酸苯甲脒（Benzamidine·HCl）和激活该酶的胰酶抑制剂——大豆胰酶抑制剂；3.无螯合剂1.10-菲绕林或β-苯基丙酸，以致在实验中还未来得及用40%饱和度固体硫酸铵沉淀之前，就导致无活性的酶原前羧肽酶A自动激活成有活性的羧肽酶A。而第二法除前面增加几步用零下饱和的硫酸铵沉淀步骤外其余同于一法、意味着有更多时间让前羧肽酶A激活和自动激活，

故此分离不到沉淀1。第三法是利用各种蛋白质的等电点的差异进行分离的一种简便方法，故不牵涉沉淀1与沉淀2等用不同浓度硫酸铵盐析的问题。

（本文原素吸收光谱测定承省地质局实验室协助；聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳由浙医一院生化室协助；抽提酶制剂的冰库由杭州肉联厂提供；DEAE DE11由上海生物制品研究所赠予，特此致谢）（图见插页18）

参 考 文 献

1. Walschmidt-Leitz, et al, Chem Ber 62B: 2217, 1929.
2. Anson M L: Science 81: 467, 1935.
3. Cox D J, et al: Biochemistry 3: 44, 1964
4. Lacko A G, et al: Biochemistry 9: 4680, 1970.
5. Gates B J, et al: Biochemistry 12: 1867, 1973.
6. Peterson L M, et al: Biochemistry 15: 2501, 1976.
7. Grabow W O K, et al: J Infect Dis 131: 658, 1975.
8. 何南祥等：人肠粘膜匀浆对乙型肝炎抗原的抑制作用，浙江医科大学学报。8（4）：181, 1979.
9. Folk J E et al: J Biol Chem 238: 3884, 1963.
10. Wintersberger E, et al: Biochemistry 1: 1069, 1962.
11. Coleman J E, et al: J Biol Chem 235: 390, 1960.
12. Simpson R T, et al: Biochemistry 2: 616, 1963.
13. Hoch F L, et al: Anal Chem 25: 317, 1953.
14. Allan B J, et al: Biochemistry 3: 40, 1963.
15. Altman P L, et al: Biology Data Book second Edition volume 111, P 1476, 1974.
16. Bargetzi J-P, et al: Biochemistry 2: 1468, 1963.
17. Fuwa, K, et al: Anal chem 36: 2407, 1964.
18. Ellis G P, et al: Progress in medicinal chemistry 13: 1, 1976.

猪胰羧肽酶A制剂的抽提及其对
乙型肝炎抗原的降解或灭活作用

I 猪胰羧肽酶A制剂的抽提及其鉴定

(正文见173页)

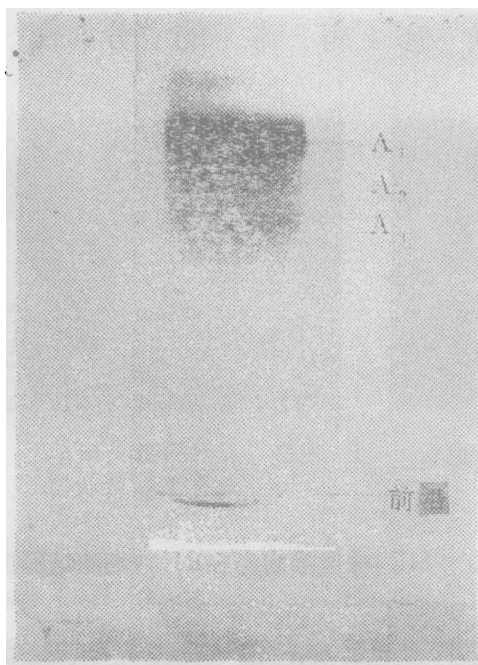


图4 凝胶盘状电泳结果

II. 羧肽酶A制剂对乙型肝炎抗原的降解或灭活作用

(正文见177页)



图1 为对照组，显示乙型肝炎抗原各形颗粒的形态与数量。(×12万)



图2 为实验组，显示一只外膜开始破裂的Dane颗粒。(×12万)