

- [8] Sanger, F. et al.; *J. Mol. Biol.*, **94**, 448, 1975.
 [9] Maxam, A. M. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 560, 1977.
 [10] Merril, C. R.; *Biopolymers*, **6**, 1727, 1968.

- [11] Shine, J. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **7**, 1342, 1974.

【本文于 1979 年 7 月 27 日收到】

高活性辣根过氧化物酶的制备

潘家秀 何慕璋 蒋传葵 杨佩娟

(中国科学院上海生物化学研究所)

(东风生化试剂厂)

过氧化物酶^[1]是一类每个分子含有一个正铁血黄素 IX 的蛋白质,存在于竹笋、萝卜、辣根等十五种以上的植物中,其中以辣根的含量为高。来源于辣根的,即称辣根过氧化物酶,其分子量为 40 000,它是一种糖蛋白。糖的含量达到 18% (W/W),有特殊的吸收光谱,在 403 毫微米和 275 毫微米均有吸收高峰。

辣根过氧化物酶自 1966 年被列为抗体的标记物^[2]以来,其应用日益广泛,是免疫细胞(组织)化学和酶免疫测定(ELISA)^[3]等技术中最常用的标记酶之一。目前在蛋白质、多肽、激素、病毒、寄生虫等方面多有应用,具有特异性强、灵敏度高的优点。此外,七十年代初期辣根过氧化物酶又被引入作为观察轴突逆行传递的试剂^[4],为研究神经系统提供了一项新技术。

辣根过氧化物酶的活性和纯度将直接影响上述各类工作的实验效果。本文报道一种高活性酶的制备方法,并与国外产品进行了比较。

辣根过氧化物酶的抽提纯化

一、粗制 新鲜辣根 50 公斤洗净,用自制切片机切成片状,用电动绞肉机绞碎;加入 1.5—2 倍体积离子交换水,搅拌后,浸泡过夜。压榨机压滤,取其抽提液。加固体硫酸铵(25 克/100 毫升)至 0.40 饱和度。室温过夜。虹吸取上清液,并将沉淀过滤。合并清液,再加固体硫酸铵(25 克/100 毫升),至 0.80 饱和度。室温放置过夜。虹吸去上清液,过滤收集沉淀(沉淀必须滤干),约得 800 克(湿重)。

每克沉淀用 15—20 毫升离子交换水溶解,

室温对水透析,直至无 SO_4^{2-} 为止。取透析液搅拌滴加等体积丙酮,室温放置数小时,过滤取清液,再加 0.8 倍体积的丙酮;室温放置过夜。过滤取沉淀,用少量离子交换水溶解,得粗制酶液, $RZ = 0.4—0.8$ 、冻干后约 2—3 克。

二、提纯 取粗制酶液对 0.002 M 醋酸铵缓冲液 pH 4.6 透析,平衡过夜。CM 纤维素(Whatman CM-11)以同一缓冲液平衡装柱(5 × 120 厘米)。酶液上柱后,先用此缓冲液洗脱,一淡红色带被洗下,用部分收集器收集,此为峰 I。换 0.01 M 醋酸铵缓冲液 pH 4.6,一棕红色带被洗下,收集之,此为峰 II。再换 0.1 M 醋酸铵缓冲液 pH 4.6,一深棕色带被洗下,收集之,此为峰 III。柱上残留的色带,可用 1 M 醋酸铵缓冲液洗下。以各管 RZ 值对管数作图,结果见图 1。

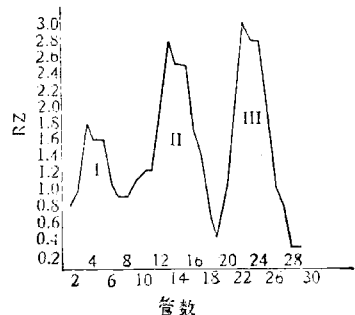


图 1 辣根过氧化物酶粗抽提液在 CM-纤维素柱上的分离

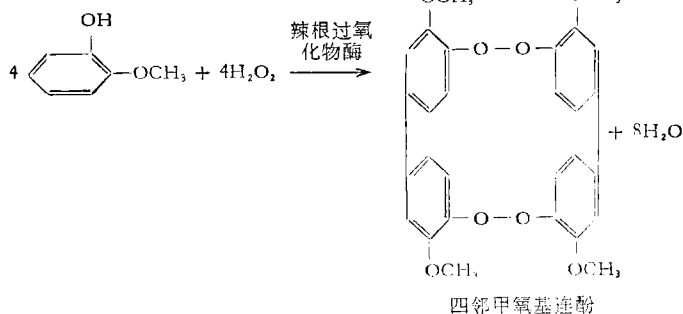
各峰分别收集,酶浓度较高的部分可以直接用离子交换水透析,浓度较低的部分在旋转蒸发仪中 40℃ 浓缩,再用离子交换水透析,冷冻干燥,得无盐冻干粉。

峰 II、峰 III 中间各管 RZ 为 3。峰的两侧 RZ 较低,可以对 0.005M 磷酸缓冲液 pH8.0 透析平衡,再用 DEAE 纤维素柱分离提纯。柱 (2.5 × 40 厘米)预先以同一缓冲液平衡。上酶液后,用该缓冲液洗脱,收集高峰部分, RZ 可以达到 3。用水透析,冷冻干燥。

三、产量 50 公斤辣根可以得到 $RZ \approx 3$ 的酶 200 毫克及 $RZ = 2-2.5$ 的酶 400 毫克。

辣根过氧化物酶的鉴定

一、 RZ 值的测定 收集的酶液或冻干粉溶于蒸馏水中,分别读取 403 毫微米和 275 毫微米的光吸收,取其比值即得 RZ 值。



1. 测定 K_4 值^[4] 底物 (H_2O_2), 氢供体 (邻甲氧基苯酚) 和反应速度呈下列关系:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{e}{\frac{1}{K_4 a_0} + \frac{1}{K_1 x_0}}$$

式中 e —— 酶浓度; a_0 —— 邻甲氧基苯酚的浓度; x_0 —— 最初底料浓度。

当选择 $K_1 x_0 \gg K_4 a_0$ 的条件时,则

$$\frac{dx}{dt} \approx K_4 a_0 e \quad K_4 \approx \frac{1}{a_0 e} \times \frac{dx}{dt}$$

测定时 (25°C) 在比色杯中依次加:

10 mM 磷酸缓冲液 pH7.0 2.9 毫升。

20 mM 邻甲氧基苯酚 0.05 毫升, $3.3 \times 10^{-4} \text{M}$ (终浓度)。

酶 (100 微克/毫升) 0.01 毫升, $8.3 \times 10^{-9} \text{M}$ (终浓度)。

搅匀后测 O. D.₄₇₀ 毫微米,为零时读数,然

$$RZ = \frac{A_{403}}{A_{275}}$$

本厂产品与国外商品 Calbiochem Grade A 和 Sigma Type VI 的比较见表 1。

表 1 几种辣根过氧化物酶的 RZ 值和活性

辣根过氧化物酶	RZ 值	活 性	
		$K_4 \times 10^{-5}$	单位/毫克
中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂	3.00	3.69	437
Calbiochem Grade A	2.92	3.53	
Sigma Type VI	2.90		432

二、活性测定 酶经适当稀释后,用邻甲氧基苯酚法测定活力。

后加 40mM H_2O_2 (0.4 毫升 30% H_2O_2 加水稀释至 100 毫升) 0.01 毫升, $1.3 \times 10^{-4} \text{M}$ (最终浓度)。

立即记时,并每隔 30 秒测定一次 A_{470} 毫微米,以 A 读数对时间作图,得一直线,自斜率得

$$\frac{\Delta A}{\Delta t (\text{秒})},$$

$\Delta x = \frac{\Delta A \times 4.0}{26.6 \times 10^3}$ (其中 26.6×10^3 是邻甲氧基苯酚的克分子消光系数)

$$K_4 = \frac{1}{3.3 \times 10^{-4} \times 8.3 \times 10^{-9}} \times \frac{\Delta x}{\Delta t} = 5.51 \times 10^7 \times \frac{\Delta A}{\Delta t (\text{秒})}$$

本厂产品与 Calbiochem Grade A 辣根过氧化物酶的 K_4 测定值见表 1。

2. 活性单位的测定^[5] 依次在比色杯中加下列试剂:

0.1 M 磷酸缓冲液, pH 7.0 2.8 毫升(测定杯) 2.9 毫升(对照杯)。

18 mM 邻甲氧基苯酚 (24.5 毫克/100 毫升) 0.05 毫升(测定杯) 0.05 毫升(对照杯)。

8 mM H_2O_2 (0.1 毫升 30% H_2O_2 加水稀释至 120 毫升) 0.05 毫升(测定杯) 0.05 毫升(对照杯)。

酶(100 微克/毫升) 0.1 毫升(测定杯) 0 毫升(对照杯)。

加入酶时作为零时, 立即追踪 436 毫微米光吸收变化, 得 $\Delta A/\text{分钟}$ 。

活性以单位/毫克酶表示。每个单位活性的酶定义是在 25°C 能催化转化一个微克分子邻甲氧基苯酚的酶量。

酶活性(单位/毫克)

$$= \frac{\Delta A/\text{分钟} \times 3 \times 4.0 \times \text{稀释倍数}}{25.5 \times 0.1 \times \text{酶毫克/毫升(起始浓度)}}$$

本厂产品与 Sigma Type VI 的比较见表 1。

三、聚丙烯酰胺等电聚焦电泳 用 7% 聚丙烯酰胺凝胶, 含 1% 两性电解质载体 (pH 3—10) 作等电聚焦电泳, 借样品本身颜色监视。结果峰 I 靠近正极, 在溴酚蓝标志物附近, 峰 II 停留在胶的原点附近, 峰 III 靠近负极, 离开凝胶移动至胶上面的溶液中。粗制酶液在偏正极处另有一蛋白带, 为三氯醋酸所沉淀, 经离子交换柱层析分离, 可以除去。由此可以看出, 等电点峰 I 最低, 峰 II 与峰 III 相近, 峰 III 最高, 与 CM 纤维素层析结果相符。

四、琼脂免疫电泳 本厂产品的峰 I、II、III 和 Sigma Type VI 在同一板上进行电泳, 抗血清用山羊抗 Sigma Type VI 辣根过氧化物酶的免疫血清。峰 II、III 与 Sigma Type VI 的沉线位置, 形状未见差别, 峰 I 的弧位偏向负极 (图 2)。

五、免疫酶标记 1. 将兔 IgG 对用 Calbiochem Grade A 及本厂产品的峰 II 或峰 III 标记的羊抗兔 IgG 的 IgG 作琼脂双扩散, 出现沉淀条纹, 经底物 3, 3'-二氨基联苯胺显色, 均呈深棕色, 未见明显的差别。2. 肝细胞内乙型肝炎抗原定位^[6]; 用本厂产品与 Calbiochem

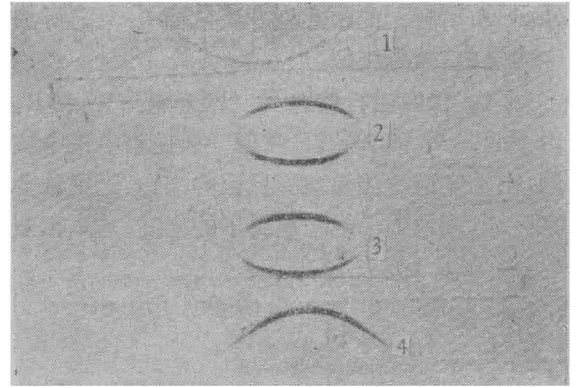


图 2 辣根过氧化物酶的免疫电泳图

抗原: 1—峰 I; 2—峰 II; 3—峰 III; 4—Sigma Type VI 抗血清: 山羊抗 Sigma Type VI



(a)



(b)

图 3 辣根过氧化物酶注射于猫丘脑中央核内, 由轴突逆行传递被酶标记的细胞

(a) 本厂产品峰 III, $RZ = 3$;

(b) Sigma Type VI, $RZ = 2.9$

Grade A 所标记的抗乙型肝炎抗原 IgG 进行细胞内定位,效果相似。

六、轴突逆行传递^[7] 比较本厂产品峰 II、III 和 Sigma Type VI 注射于猫丘脑中央中核内,由轴突逆行传递被酶标记的细胞,无论其分布区域、颗粒大小或暗视野下的亮度,基本相似(见图 3a 及 b)。

讨 论

一、分离提纯方法 对辣根过氧化物酶分离和提纯的各步骤分别讨论如下:

(1) 从辣根抽提酶 Shannon^[8] 曾用 0.1 M K_2HPO_4 , Calbiochem^[9] 用 0.15 饱和度硫酸铵,也有用水者。我厂生产辣根投料量甚大,为便于操作用水抽提,效果良好,因此未使用盐溶液。

(2) 硫酸铵分级沉淀,多取 0.40—0.50 至 0.80—0.85 饱和度部分。Calbiochem 粗制时取 0.15—0.95 饱和度部分,精制时取 0.53—0.65 饱和度部分。我厂由于考虑到 CM 纤维素分离效果较好,采用一次分级盐析,取 0.40—0.80 饱和度部分。

(3) 有机溶剂处理,文献报道^[10] 系用乙醇在 $-10^{\circ}C$ 至 $-13^{\circ}C$ 进行,难以控制。本厂使用丙酮,可在室温操作,无需特殊降温设备。

(4) 为进一步提纯,文献报道多用 CM 纤维素、DEAE 纤维素或偶而应用 SP A-50 葡聚糖凝胶等。粗制酶经过这些离子交换剂的分离,一方面除去杂蛋白,一方面将各种不同等电点的同功酶分成几个部分。我厂用 0.002 M、0.01 M、0.1 M 和 1 M 醋酸铵缓冲液 pH 4.6 分步洗脱,得 4 个峰,酶活力主要在峰 II、III,在高峰处 RZ 值近于 3。方法的优点是用挥发性缓冲液,分离提纯的样品,冻干后即得到无盐制品,酶可以较长期保存不失活。

我厂采用 DEAE 纤维素作为分离提纯的辅助手段。即将 RZ 值较低的部分进一步提纯。由于酸性同功酶的 RZ 值低,在 pH 8.0 被 DEAE 纤维素吸去,使产品 RZ 值提高。

SP-A 50 或 SE-A 50 葡聚糖可以代替 CM

纤维素,但这些离子交换剂价格较贵,目前不宜作为工业化生产使用。

经过以上 4 个步骤,我厂产品无论 RZ 值或活性均已达到要求,不再采用葡聚糖凝胶 G-100 过滤。从 50 公斤辣根原料可以提得 $RZ \approx 3$ 的酶约 200 毫克,与 Braithwaite^[11] 的产率相当。

我厂产品以无盐冻干粉包装,比悬于 2.8 M 硫酸铵中者(如 Calbiochem Grade A)使用方便,无需透析去盐,即可称量直接进行实验,缩短操作周期。

二、同功酶的选择 酶的活性和纯度均直接影响最终反应的灵敏度,然而为了得到高效的酶制剂,还应当对于同功酶有所选择。等电点低的酶,活力低,等电点在 pH 5.5—7.6 的活性高;等电点在 pH 7.6—9.0 的对于酸性物质,如核糖体、粘多糖等容易吸附。为轴突逆行传递,酸性同功酶(Shannon 的 A 峰)无效, Sigma Type VI 和 Shannon 的 C 峰有效。我厂产品的峰 II 和 III 均有效。为免疫酶标记酸性同功酶也将降低灵敏度。为此我厂产品将酸性同功酶去除。Calbiochem 和 Worthington 的产品也去除了较酸性的同功酶 Sigma Type VI ($RZ = 3$)是含有 2 个碱性同功酶而无酸性同功酶的制品。我厂产品的峰 II、III 是两类等电点不同的同功酶。为了避免某些组织的非特异吸附,可以分别采用我厂峰 II 或峰 III 产品进行试验。

总 结

我厂用水抽提,硫酸铵分级盐析,丙酮沉淀和 CM 纤维素、DEAE 纤维素离子交换柱层析分离提纯了辣根过氧化物酶,与文献上提供的资料相比,方法上有所改进。产品中不含酸性同功酶, RZ 达到 3、活性达到 $K_4 = 3.69 \times 10^5$ 或 437 单位/毫克,与 Calbiochem Grade A 或 Sigma Type VI 的指标相当。50 公斤辣根得量为 200 毫克。产品以无盐冻干粉包装,使用方便,酶活力稳定。无论在酶免疫标记或轴突逆行传递工作中,均得到灵敏度高、特异性强的效

果。

徐俊杰、卓尚阳、孔军等同志曾参加酶粗制工作。王克夷、金承德同志协助测定及鉴定工作。特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Draetta-Guite, A.: *J. Mol. Biol.*, 106, 229, 1976.
 - [2] Avramas, S.: *Int. Rev. of Cytol.*, 27, 349, 1970.
 - [3] Engvall, E. & Perlmann, P.: *Immunochemistry*, 8, 871, 1971.
 - [4] Chance, B. & Moenchly, A. C.: *Methods of Enzymology*, 2, 764, 1955.
 - [5] Bergmeyer, H. V.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 1, 495, 1974.
 - [6] 上海生物制品研究所等:《生物化学与生物物理学报》, 1977年,第9卷。
 - [7] 郑则慧、毛金棕:《生理学报》, 1978年,第30卷,第41页。
 - [8] Shannon, L. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 241, 2166, 1966.
 - [9] Kasinsky, H. E. & Hackett, D. P.: *Phytochem.*, 7, 1147, 1968.
 - [10] Paul, K. G. & Stigbrand, T.: *Acta Chem. Scand.*, 24, 3607, 1970.
 - [11] Bunt, A. H. et al.: *Brain Res.*, 102, 152, 1976.
- [本文于1979年5月18日收到]

气液催化交换法制备氚标记脱氧腺嘌呤核苷三磷酸

沈德福 林奋智

(中国科学院上海原子核研究所)

近年来应用气液催化交换法制备氚标记化合物越来越广泛^[1]。这一方法是在催化剂的存在下,将氚气和溶液中的有机分子接触,引起氚-氢同位素交换,经分离纯化制得所需的标记化合物^[2]。与其它氚标记制备方法相比较,有操作简便、催化交换效率高的优点,而且不受前体来源困难的限制。用这种方法制得的 ^3H -dATP,其比度和放化纯度都可以满足开展分子生物学和遗传工程学科科研工作的需要。

实验方法

一、氚-氢交换反应: 在反应瓶里加入 6.3 毫克脱氧腺嘌呤核苷三磷酸四钠盐, 51.5 毫克 $\text{PdO}/\text{BaSO}_4^{[3]}$ 和 1 毫升 0.1M pH10.8 磷酸缓冲液,液氮冷冻,抽真空,充氚,然后在 25°C 时搅拌,常压反应二小时。

二、分离和纯化: 反应结束后,回收剩余的氚气,反应液滤去催化剂,减压抽干,除去活性氚,然后用少量水溶解残渣,溶解液用毛细管滴在 32×25 厘米² 新华 3 号厚型层析滤纸上,在异丁酸:水:氨:0.1M EDTA (100:56:4.2:1.6) 溶剂系统中进行层析分离十四个小时,晾干层析纸,在紫外灯下显出 ^3H -dATP、 ^3H -dADP 和

^3H -dAMP 三条色带。把 ^3H -dATP 色带剪下,用少量水浸泡,提取 ^3H -dATP。

放化纯度用甲烷气流式无窗正比计数器进行放射性层析扫描,溶剂系统为:(1)异丁酸:水:氨:0.1M EDTA (100:56:4.2:1.6) 和 (2) 正丁醇:丙酸:水:氨 (40:27:28:0.3)。

dATP 含量用 751 型紫外分光光度计测定。

放射性强度由 NE8312 型液体闪烁谱仪测定。

实验结果及讨论

一、实验结果: 1. 氚-氢交换反应结束后,反应液滤去催化剂后的放射性强度为 1400 毫居里;反应液除去活性氚以后的放射性强度为 226 毫居里;经纸层分离以后得到的纯 ^3H -dATP 放射性强度为 168 毫居里。

2. 反应液除去活性氚后(即粗制品)的放化纯度在异丁酸:水:氨:0.1M EDTA (100:56:4.2:1.6) 溶剂系统中进行纸层析鉴定。经放射性层析扫描,放化纯度约为 ^3H -dATP 85%, ^3H -dADP 13% 和 ^3H -dAMP 2%。

反应液经层析制备分离后得到的纯 ^3H -