

乳过氧化物酶的制备及猪胸腺激素的酶促同位素碘标记

金以丰 汤国枝 徐贤秀*

(南京大学生物系分子生物学研究室)

同位素碘标记蛋白质、多肽类激素和抗原、抗体的方法,在放射免疫、激素受体的研究中已普遍应用。一般采用的氯胺 T(ChloraminT)法^[1],但反应条件比较激烈,容易使蛋白质失活,因此近年来许多实验室都采用乳过氧化物酶催化蛋白质的碘化^[2-5]。

本实验室从猪胸腺中分离了胸腺激素 T_1 ^[6],为了探索胸腺激素与淋巴细胞受体的结合性质,曾经采用氯胺 T 法,用 ^{125}I 标记胸腺激素,发现标记的胸腺激素与淋巴细胞的结合率比较低,改用了乳过氧化物酶碘标胸腺激素。但是乳过氧化物酶国内尚无商品,为此我们参考 Thorell 等^[7]的工作,从鲜牛乳中制备了 A_{412nm}/A_{280nm} 最高比值达 0.84 的乳过氧化物酶,并用该酶碘标胸腺激素,在胸腺激素的受体研究中得到较满意的结果。

实验与结果

1. 乳过氧化物酶的制备

(1) CM-葡聚糖交换 取生牛乳 5 公斤,加入 5 公斤预冷的蒸馏水,投入 CM-葡聚糖 C50 5 克,在 10℃ 以下搅拌 5 小时,静置过夜,去上清液,以大量冷蒸馏水充分洗去吸附在表面的酪蛋白及脂肪等。已结合乳过氧化物酶的 CM-葡聚糖呈棕褐色,装入层析柱,以 0.2M NaCl pH7.4 的 0.02M Tris-HCl 缓冲液洗脱,测定流出液的 A_{412nm}/A_{280nm} 的比值(图 1),收集合并 A_{412nm} 的高峰部分。

(2) 硫酸铵分部沉淀 将合并的 A_{412nm} 高峰部分,加入固体硫酸铵,取 60%—70% 饱和度的沉淀部分。以少量蒸馏水溶解,对冷蒸馏水和 0.01M pH5.7,醋酸缓冲液透析平衡过夜,

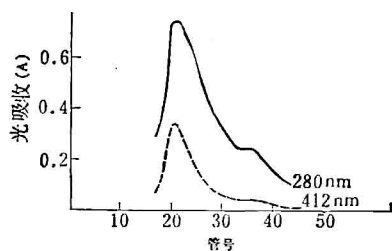


图 1 CM-Sephadex C50 分离乳过氧化物酶层析图谱

次日离心,所得上清液的 A_{412nm}/A_{280nm} 比值为 0.52 左右。

(3) CM-纤维素柱层析 将上述比值为 0.52 的上清液进行 CM-纤维素层析,先以含 0.05M 氯化钠, pH5.7, 0.01M 醋酸缓冲液洗去杂蛋白,接着以含 0.05M—0.40M NaCl 的醋酸缓冲液进行直线浓度梯度洗脱,分部收集,测定 412nm 和 280nm 光吸收,并计算 A_{412nm}/A_{280nm} 比值,结果见图 2。

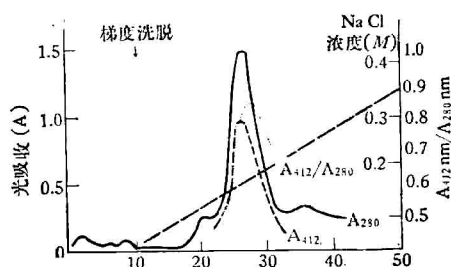


图 2 CM-纤维素层析制备乳过氧化物酶洗脱图谱

层析柱 (1×9cm) 流速 0.5ml/分, 4ml/管

合并 A_{412nm}/A_{280nm} 比值高峰部分,可得比值为 0.82 的酶蛋白 3.26 毫克,比值 0.7 的酶蛋白 3.88 毫克。

以 Dopa 法^[8]测定酶活力,在 3 毫升反应液中含 pH7.0, 0.02M 磷酸缓冲液 (PBS) 1.5 毫升, 0.01M Dopa 1 毫升, 适量酶液和 0.01M

* 79 届学员金洪年、黄晓春参加部分工作。

H₂O₂ 0.1 毫升, 30℃, 测定 5 分钟内的 A_{475nm} 的变化。以每分钟氧化 1 毫微克分子 Dopa 为 1 个酶活力单位, 测定比较制备过程中酶的比活力(表 1)。

(4) 乳过氧化物酶的纯度和等电点: 以聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳^[9], 检验 CM-纤维素层析后的乳过氧化物酶的纯度及其等电点(图 3)。由图 3 可见 pH8.0 处有一条主要蛋白

表 1 乳过氧化物酶在制备过程中的 A_{412nm}/A_{280nm} 比值、比活力及蛋白量(按 5 公斤牛乳计算)

制 备 步 骤	A _{412nm} /A _{280nm}	总蛋白 mg	比活力(单位/mg)	总活力单位(×10 ³)
CM-Sephedex C50	0.25	278.4	206	573
(NH ₄) ₂ SO ₄ 60—70%	0.50	35.7	576	20.4
CMC 洗脱 高	0.82	3.26	2363	16.8
低	0.70	3.88		

带; 通过活力测定证明酶活力峰与主要蛋白带重合。以凝胶长度对 pH 值和 A_{475nm} 作图(图 4)。

62%, 比放射性为 3.41 微居里/微克胸腺激素 T₁; 冰冻保存备用。

(2) ¹²⁵I-胸腺激素 T₁ 的生物学活性 胸腺激素能促使不完全成熟的胸腺淋巴细胞转变为成熟的有免疫功能的淋巴细胞^[10]。胸腺激素作用的第一步是与这些淋巴细胞有特异的结合, 这种结合是胸腺激素生物学活性的一个重要标志。我们通过猪胸腺淋巴细胞与 ¹²⁵I-胸腺激素 T₁ 的结合能力, 以检验酶促碘化的 ¹²⁵I-胸腺激素 T₁ 的生物学活性。

猪胸腺淋巴细胞按前文报道的方法制备^[11], 反应系统如下: 胸腺淋巴细胞 (1 × 10⁵ 细胞/毫升) 0.2 毫升; ¹²⁵I-胸腺激素 T₁ (0—120 毫微克) 0.2 毫升; Hank's 液或未标记胸腺激素 T₁ (100 微克) 0.1 毫升; 0.15M pH6.0, PBS 0.5 毫升。反应液在 37℃ 温育一小时; 从每一管中取 250 微升反应液三份, 分别加在聚乙烯管中, 并小心铺在终止液上面(0℃ 含 0.1% 牛血清白蛋白的 Hank's 液); 测定总放射计数 (T); 然后离心, 小心抽去上清液, 沿壁加入 10% 蔗糖溶液 0.5 毫升; 剪取有细胞的聚乙烯管底部, 测定的放射计数即为激素与细胞结合部分 (B)。B/T × 100% 表示总的结合百分率; 减去非特异结合百分率即为特异结合百分率。结果见图 5。由图 5a 线可见酶促碘化的 ¹²⁵I-胸腺激素 T₁ 保留生物活性, 特异性结合显示一定的定量关系, 而氯胺 T 标记的 ¹²⁵I-胸腺激素 T₁, 在相同方法实验中, 不呈现特异性结合的定量关系(图 5b 线)。



图 3 经 CM-纤维素层析的乳过氧化物酶的等电聚焦
丙烯酰胺 7%, 电压 150V, 聚焦 4 小时。

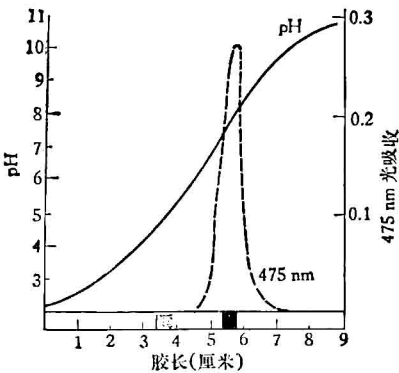


图 4 经 CM-纤维素层析的乳过氧化物酶的等电聚焦及活力测定图谱

2. 胸腺激素的酶促碘化作用

(1) ¹²⁵I-胸腺激素的制备 取纯化的胸腺激素 T₁^[6] (1 毫克/毫升) 0.4 毫升, 0.4M 醋酸缓冲液 pH5.6, 0.2 毫升, Na¹²⁵I (2.2 毫居里) 0.15 毫升, 乳过氧化物酶 (A_{412nm}/A_{280nm} = 0.84) 200 微克 0.2 毫升, 最后加入 H₂O₂ (1:10000) 0.5 毫升, 电磁搅拌一分钟; 加入 2 毫升中止反应液(蒸馏水 100 毫升, 蔗糖 10 克, 碘化钾 1 克, 叠氮钠 100 毫克); 然后通过葡聚糖凝胶 G50 分离, 得 ¹²⁵I-胸腺激素 T₁, 标记放射性占总放射计数的

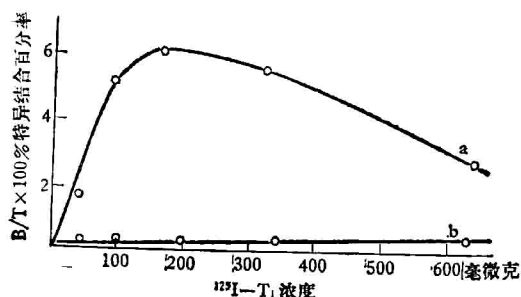


图5 ^{125}I -胸腺激素 T_1 与淋巴细胞结合关系

- 乳过氧化物酶法标记的 ^{125}I -胸腺激素 T_1 比放射性 3.41 微居里/微克。
- 氯胺 T 法标记的 ^{125}I -胸腺激素 T_1 比放射性 4.9 微居里/微克。

讨 论

Polis^[8], Morrison^[12-13]和 Thorell^[7]等先后报道从牛乳中制备高纯度乳过氧化物酶的方法, $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值可达 0.8—0.9。Thorell 认为乳过氧化物酶 $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值在 0.5—0.65 即可用于标记实验, 一般碘标记蛋白质需用的酶量很少, 因此对实验室小量制备, 立即使用或短期低温保存, 十分方便。

我们主要基于 Thorell 1971 年制备乳过氧化物酶的方法, 简化了其中用等电聚焦纯化的一步, 改用 CM-纤维素层析, 制备的酶从 $A_{412\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值和等电聚焦纯度鉴定, 证明可以用于蛋白质的碘标记试验。

在 CM-纤维素层析时我们采用氯化钠直线浓度梯度洗脱, 此法比较易得到高比值的酶;

低比值部分如再重复一次 CM-纤维素层析, 比值可以从 0.4 左右提高到 0.8。

该酶稳定性较差, 在水中或低浓度缓冲液中比值易下降, 因此要获得高比值的酶, 关键是保持牛乳的新鲜度, 低温操作和一定的盐浓度。高比值的酶可制成硫酸铵糊, 低温 (-20°C) 保存或带盐冻干, 使用前透析去盐。

参 考 文 献

- [1] Hunter, W. H. et al.: *Nature*, **194**, 495, 1962.
- [2] Marchalonis, J.: *Biochem. J.*, **113**, 299, 1969.
- [3] Hamlin, J. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 21, 1974.
- [4] Sodoyez, J. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4268, 1975.
- [5] Mednieks, M. I. et al.: *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 267, 1978.
- [6] 金以丰等: 《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 12 卷, 2 期, 133 页。
- [7] Thorell, J. I. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **251**, 363, 1971.
- [8] Polis, B. D. et al.: *Methods in Enzymology*, **2**, 813, 1955.
- [9] Wrigley, C. W.: *Methods in Enzymology*, **22**, 559, 1971, Academic Press.
- [10] Hooper, J. A. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **249**, 125, 1975.
- [11] 金以丰等: 《南京大学学报》(自然科学版), 1979 年, 1 期, 115 页。
- [12] Morrison, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2847, 1963.
- [13] Morrison, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **228**, 767, 1957.

[本文于 1980 年 6 月 5 日收到]

一种简易的固相蛋白质顺序测定仪

徐佐杰 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所)

据了解目前不少单位正向国外订购此类仪器, 这将耗费许多宝贵的外汇。本文介绍的固相蛋白质顺序测定仪, 材料全部国产, 造价只千元, 而性能与国外同类产品不相上下, 如果能加以推广, 在国家经济较困难的情况下, 就可以节省下许多外汇。

—— 编 者

随着我国蛋白质化学结构研究的需要, 我们最近试制了一台半自动蛋白质顺序测定仪

(图1), 结构简单, 经济实用, 维修方便。通过对胰岛素 B 链和肌红蛋白标准样品的分析表明, 能