

Procion Red HE 3B 亲和层析纯化人 L 型丙酮酸激酶*

郑榕岚 陈惠黎

(上海医科大学生物化学教研室)

提 要

采用国产的红色染料 Procion Red HE3B 亲和层析和底物 ADP 洗脱、配合硫酸铵盐析、DEAE-Sephadex A-50 和磷酸纤维素层析可将人肝 L 型丙酮酸激酶提纯 410 倍,产物电泳纯。其中红色染料一步提纯的倍数平均为 7.8 倍,回收率平均为 59%。

活性染料配基层析法是七十年代发展起来的新技术,应用较广,用于纯化以核苷酸或脱氢辅酶为底物的酶^[1-3]。在国内刚开始应用^[4]。本文采用国产红色染料 Procion Red HE 3B 提纯以 ADP 为底物的人肝 L 型丙酮酸激酶 (L-PyK),这在国内外尚未报道。发现红色染料 Procion Red HE3B 对 L-PyK 亲和力高,提纯方法简便,纯化倍数较高,回收率也较满意。

材 料 和 方 法

1. 材料 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-50, Sepharose 4B、磷酸纤维素 P-11, 牛血清白蛋白 (BSA), 苯甲磺酰氟 (PMSF) 为进口试剂, 1, 6-二磷酸果糖 (FDP), 二磷酸腺苷 (ADP), 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 为东风试剂厂产品, Procion Red HE 3B 由上海染化八厂提供。其他试剂均为国产分析纯。人肝组织来源于暴死的正常人。

2. Procion Red HE3B 与 Sepharose 4B 柱的交联^[1] 红色染料 10g 悬于 100ml 蒸馏水中, 加入 0.5mol/L HCl 100ml, 3℃ 搅拌 30 分钟, 抽滤, 用蒸馏水洗至 pH 6.0 左右, 浸泡于 95% 乙醇中, 再在 10℃ 左右搅拌 30 分钟, 布氏漏斗上抽干, 置于 20% (W/V) KCl 液中, 搅拌 15 分, 用蒸馏水洗去 KCl, 抽干后于 60℃ 烘干备用。

45g Sepharose 4B 悬于 150ml 蒸馏水中, 在 8 分钟内缓慢加至上述处理过的红色染料中, 再加入 3.6g NaCl, 搅拌 30 分钟, 加入 1.2g Na₂CO₃, 45℃ 恒温搅拌 48 小时, 在布氏漏斗上用蒸馏水洗至流出液无色为止。交联后的凝胶保存于含 0.01% NaN₃ 的溶液中。使用前用含有 0.02mmol/L FDP, 10mmol/L β-巯基乙醇, 10mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EDTA, pH7.5 的 5mmol/L 磷酸缓冲液 (FME-PBS) 平衡。

3. 人肝 L-PyK 的提纯 结合 Marie^[5]、Harada^[6] 方法进行改良。后者为鼠肝 L-PyK 的提取法。改良的主要步骤为 Procion Red HE3B 柱的应用。提纯过程如下: 正常人肝用含 1mmol/L PMSF、0.1mol/L KCl、pH7.0 的 FME-PBS 制成匀浆, 18,000g 离心 45 分钟, 上清经 38% 饱和度硫酸铵盐析, 透析后上 DEAE-Sephadex A-50 柱, 用含 KCl 梯度 (0~0.3mol/L)、0.3mol/L 蔗糖、0.02mmol/L PEP pH7.2 的 FME-PBS 洗脱, 收集酶活力峰。此 L-PyK 的粗提液经 Sephadex G-50 去盐后, 吸附于 Procion Red HE3B 柱 (1.5 × 5cm), 待不吸附的杂蛋白流出后, 用 pH8.5 的 FME-PBS 液再洗去另一部分杂蛋白, 然后用含 10mmol/L ADP

* 中国科学院科学基金资助的课题

的 FME-PBS 液亲和洗脱,收集酶活力峰,最后经磷酸纤维素 P-11 柱,用含 2mmol/L PEP、2mmol/L FDP、0.5mol/L 蔗糖、10mmol/L β -巯基乙醇、1mmol/L EDTA, pH6.1 的 50 mmol/L PBS 洗脱而获得纯酶。

4. SDS-PAGE 鉴定人 L-PyK 纯度及亚基分子量 根据 Laemmli^[7] 方法,蛋白质染色用考马氏亮蓝 R-250。

5. 蛋白质测定 采用 Bradford^[8] 考马氏亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

6. 酶活力测定 按陈惠黎等^[9]方法。

结果与讨论

人 L-PyK 经表 1 中的各步纯化后比活为 172 单位/mg 蛋白,纯化 410 倍。根据三次实验结果,红色染料亲和和层析一步可使比活力平

均提高 7.8 倍,回收率平均为 59%。红色染料亲和洗脱曲线如图 1 所示。

纯化后的 L-PyK 经 SDS-PAGE 鉴定,含单一亚基(图 2),证明肝中另一次要型 M_r -PyK 已被完全去除,亚基分子量为 57,500 (图 3),与文献报道的人 L-PyK 亚基分子量相近。

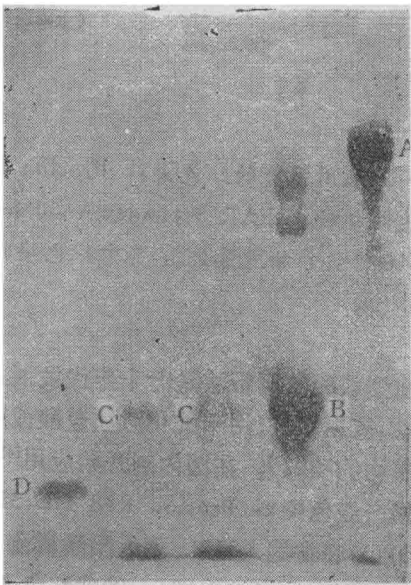


图 2 SDS-PAGE 鉴定人 L-PyK

- A. 兔免疫球蛋白 G(IgG, 150,000)
- B. 牛血清白蛋白 (BSA, 66000)
- C. 纯化的人 L-PyK
- D. 胃蛋白酶 (Pepsin 35,000)

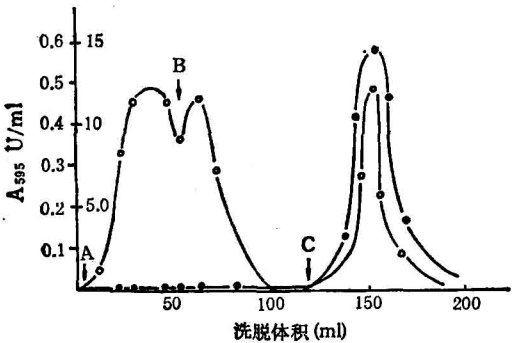


图 1 Procion Red HE3B 柱亲和和层析洗脱曲线

A 加入去盐后的 L-PyK 粗提液 B 加入 pH8.5 的 FME-PBS 液 C 加入含 10mmol/L ADP 的 pH 8.5 FME-PBS 液

—○— 蛋白质 —●— 酶活力

表 1 人肝 L-PyK 纯化步骤与结果

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (单位)	比活力 (单位/mg)	纯化倍数
匀浆	7,085	3,000	0.42	1.00
38% 硫酸铵沉淀	523	1,549	2.96	7.04
DEAE-Sephadex A-50 KCl 梯度洗脱	88	680	7.73	18.4
Procion Red HE3B 柱, ADP 洗脱	6.0	345	58.0	138
磷酸纤维素 P-11 柱, PEP、FDP 洗脱	1.13	194	172	410

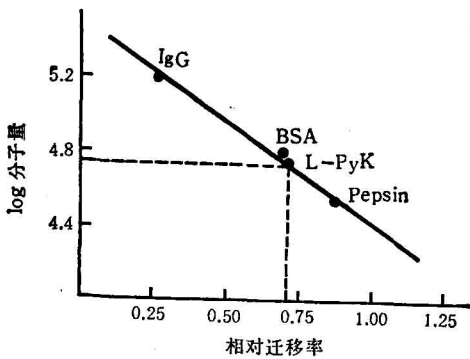


图 3 SDS-PAGE 测定人 L-PyK 亚基分子量

标准蛋白分子量如图 2 所示

活性染料层析具有层析胶制备方便,无需溴化氢处理或接臂,层析方法简便,柱子可反复使用,纯化效果较好等特点。Procion HE3B 几乎可将 L-PyK 完全吸附,在不加 ADP 的洗脱液中测不到 Pyk 活力,而用 10mmol/L ADP 洗脱

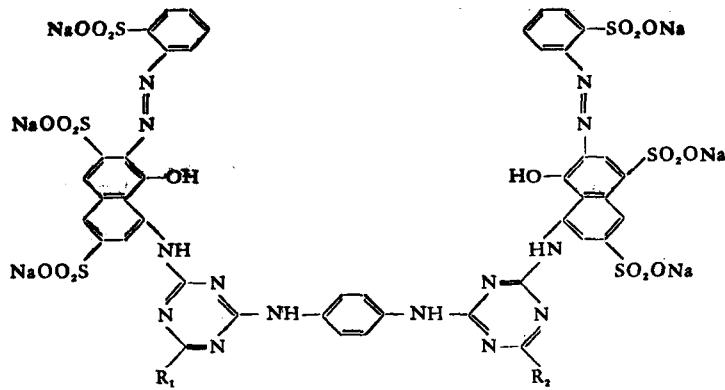


图4 Procion Red HE 3B 的结构

时则能顺利地将 L-PyK 从柱上解析下来。这一步的提纯倍数及回收率均超过一般的离子交换层析。染料亲和层析的作用机理尚不清楚,图4所示为 Procion Red HE3B 的结构,因染料主要对以核苷酸或脱氢辅酶(组成中有核苷酸)为底物的酶有亲和力。推测可能由于染料结构的某一部分类似于核苷酸所致^[1]。因活性染料有上述优点,故可推广应用于其它以核苷酸及脱氢辅酶为底物的酶的提纯。

参 考 文 献

[1] Dean, P. D. G.: *J. Chromatography*, 1979, 165, 301.

- [2] Kotlarz, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 484, 35.
- [3] Kirchberger, J. et al.: *Preparative Biochem*, 1982, 12, 29.
- [4] 徐伟军等:《生物化学与生物物理学报》,1986,18,410.
- [5] Marie, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 438, 393.
- [6] Harada, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 524, 327.
- [7] Laemmli, U. K. et al.: *Nature*, 1970, 227, 680.
- [8] Bradford, M. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.
- [9] 陈惠黎等:《生物化学与生物物理学报》,1980,12,263.

[本文于1986年12月29日收到]

(上接第51页)

为临床、营养学及药检部门提供了一个良好的抗坏血酸各组分分析方法。本法优点是一次制备无蛋白血滤液,同时测得 TAA、AA 及 DHA,且有利于抗坏血酸各组分比值分析,操作简便,重复性好。减少了以往用不同方法测定抗坏血酸不同组分,操作繁琐,系统误差大的缺点。

须指出,本法在测定 DHA 时,二酮古洛糖酸可同时被显色,但由于后者在血液中含量甚微^[1],实际应用中可以不予考虑。

南京医学院俞正荣副教授、宁丹谔讲师对此课题曾给予帮助,谨致谢。

参 考 文 献

- [1] Chatterjee, I. B. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 98(2), 368.
- [2] Som, S. et al.: *Metabolism*, 1981, 30, 572.
- [3] Patterson, J. W.: *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 81.
- [4] Chatterjee, I. B. et al.: *Annals New York Academy of Sciences*, 1975, 258, 24.
- [5] 中山大学生物系生化微生物教研室:《生化技术导论》,人民教育出版社,1978,45页.
- [6] 司世麟:《生物化学与生物物理进展》,1984,6,80.
- [7] Donald, B. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 62; Academic Press, New York 1979, P. 7.
- [8] Roe, J. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1948, 174, 201.

[本文于1987年3月2日收到]