

铜离子螯合亲和层析纯化人铜锌超氧化物歧化酶

吕 星 陈吉中 李培峰 杨素红 方允中

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 用铜离子螯合亲和层析对人红细胞铜锌超氧化物歧化酶进行了纯化. 3次实验的结果表明, 此项层析具有重复使用率高和蛋白结合量大的显著优点. 提纯的人铜锌超氧化物歧化酶的比活性为 3037U 每毫克蛋白, 并经活性染色和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳证实其纯度均一. 纯化中, 探索了用紫外 260nm 与 280nm 的 A 比值判断酶纯度的简便方法.

关键词 铜锌超氧化物歧化酶, 金属螯合亲和层析, 人红细胞, 纯化

金属螯合亲和层析 (metals-chelating affinity chromatography, MCAC) 是利用金属离子与蛋白质表面组氨酸残基中咪唑基的特异结合、通过特殊溶剂的洗脱, 对蛋白质进行分离的一项层析技术. 此项技术用于超氧化物歧化酶的纯化, 国外曾有报道^[1,2]. 我们参照并改进了文献报道的方法, 用铜离子螯合亲和层析 (Cu^{2+} -MCAC) 对人红细胞铜锌超氧化物歧化酶 (cuprozinc superoxide dismutase, CuZn-SOD) 进行了纯化. 现将实验方法与结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 材料

人红细胞来自军事医学科学院八所制备人干扰素过程中废弃的新鲜红细胞; Chelating Sepharose 和 DEAE-Sepharose 均为瑞典 Pharmacia 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 人 CuZn-SOD 粗酶物的提取 按乙醇-氯仿沉淀→磷酸氢二钾盐析→丙酮沉淀的手续, 从人红细胞中提取 CuZn-SOD 粗酶物, 操作见文献 [3]. 得粗酶物 925mg.

1.2.2 人 CuZn-SOD 的纯化

a. 柱处理: 将浸泡于 20% 乙醇保存液中的 Chelating Sepharose 装柱 ($1.6\text{cm} \times 15\text{cm}$), 用约 10 个柱体积的蒸馏水洗柱, 洗净乙醇; 用 0.05mol/L 硫酸铜过柱, 至柱内填料全部由白色变为蓝色为止; 再用 $\text{pH}6.6$, 0.015mol/L 磷酸钾缓冲液洗柱, 洗去未结合的 Cu^{2+} . 再次使用时, 先用 2 个柱体积的 $\text{pH}5.0$, 0.5mol/L 柠檬酸缓冲液洗柱, 洗去残留蛋白, 而后重复以上硫酸铜过柱和磷酸钾缓冲液洗柱的过程.

b. 层析纯化: 将 925mg 人 CuZn-SOD 粗酶物溶于 180ml $\text{pH}6.6$, 0.015mol/L 磷酸钾缓冲液. 先以 80ml 粗酶液注入已用硫酸铜饱和的 Chelating Sepharose 层析柱, 用约 2 个柱体积的 $\text{pH}6.6$, 0.015mol/L 磷酸钾缓冲液洗柱后, 改用 $\text{pH}5.0$, 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液洗脱, 监测流出液的 SOD 活性, 收集显示 SOD 活性的各管流出液, 合并. 再分别以 60ml 和 40ml 粗酶液重复以上实验. 将 3 次 Cu^{2+} -MCAC 层析后的收集液合并, 以 $\text{pH}6.6$, 0.015mol/L 磷酸钾缓冲液透析, 而后通过已用相同缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose 层析柱 ($2.6\text{cm} \times 20\text{cm}$), 用 $0-0.2\text{mol/L}$ NaCl 进行梯度洗脱, 收集显示高 SOD 活性和紫外 260nm 与 280nm

的 A 比值大于 1 的各管流出液, 合并后冰冻干燥, 鉴定纯度.

1.2.3 人 CuZn-SOD 的纯度鉴定 按本实验室建立的化学发光法^[4]测定酶活性, 活性单位采用 McCord 和 Fridovich 规定^[5]的单位; 按 Lowry 法^[6]测定蛋白含量, 牛血清白蛋白作标准; 按 Beauchamp 法^[7]进行酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳与活性染色定位; 按 Leammli 法^[8]进行

酶的 SDS 电泳, 确定亚基分子量.

2 结 果

图 1 为分别以 80, 60 和 40ml 人 CuZn-SOD 粗酶物通过 Cu^{2+} -MCAC 层析的洗脱图. 由图 1 可见, 3 次 Cu^{2+} -MCAC 层析的洗脱图极为相似, 说明重复性稳定. 图中尖锐的紫外吸收峰为洗下的 Cu^{2+} .

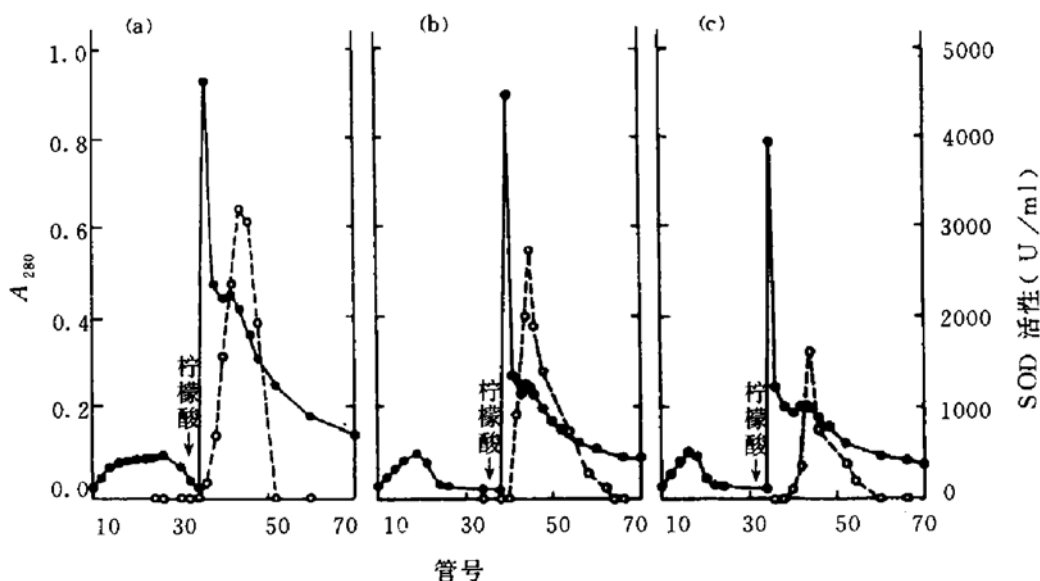


图 1 人 CuZn-SOD 粗酶物通过 Cu^{2+} -MCAC 的洗脱图

(a): 上样 80ml; (b): 上样 60ml; (c): 上样 40ml. (—) A_{280} ; (---) SOD 活性.

按每管 5ml 收集.

人 CuZn-SOD 分 3 次经 Cu^{2+} -MCAC 和 DEAE-Sepharose 层析过程中蛋白含量与酶活性的变化情况分别列于表 1 和表 2. 从表 1 中可见, 在 3 次 Cu^{2+} -MCAC 层析实验中, 酶的比活性均有较大幅度提高. 从表 2 可见, Cu^{2+} -

MCAC 层析的平均提纯倍数和产率分别为 1.6% 和 75.5%, 最后经 DEAE-Sepharose 层析获得的人 CuZn-SOD 的比活性为 3037U 单位每毫克蛋白.

表 1 Cu^{2+} -MCAC 层析人 CuZn-SOD

实验次数与步骤	总蛋白/mg	总活性/U	比活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	纯化倍数	回收率/%
1 SOD 粗酶物	411.2	442403.4	1076.0		
Cu^{2+} -MCAC	234.4	416189.6	1775.1	1.65	94.0
2 SOD 粗酶物	308.4	331802.5	1076.0		
Cu^{2+} -MCAC	131.3	197844.0	1506.8	1.40	59.6
3 SOD 粗酶物	205.6	221201.7	1076.0		
Cu^{2+} -MCAC	70.5	137213.9	1946.3	1.81	62.0

表 2 Cu^{2+} -MCAC 和 DEAE-Sepharose 纯化人 CuZn-SOD

纯化步骤	总蛋白/mg	总活性/U	比活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	纯化倍数	回收率/%
SOD 粗酶物	925.1	995390.1	1076.0		
Cu^{2+} -MCAC ¹⁾	436.2	751247.5	1722.3	1.60	75.5
DEAE-Sepharose	227.3	698660.2	3037.4	1.78	91.0

¹⁾取 3 次 Cu^{2+} -MCAC 层析后蛋白量和酶活性的总和,并推算比活性、纯化倍数和回收率。

图 2 为人 CuZn-SOD 的聚丙烯酰胺凝胶电泳与活性染色定位及 SDS 电泳图。由图 2 可见,人 CuZn-SOD 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示出四条带,其数目和位置与活性染色中的空白带相应;人 CuZn-SOD 在 SDS 电泳中显示出 1 条带,按电泳迁移率计算,其亚基分子量为 18 600。人 CuZn-SOD 由两个大小相同的亚基组成^[9],故按亚基分子量可推算其分子量为 37 200。

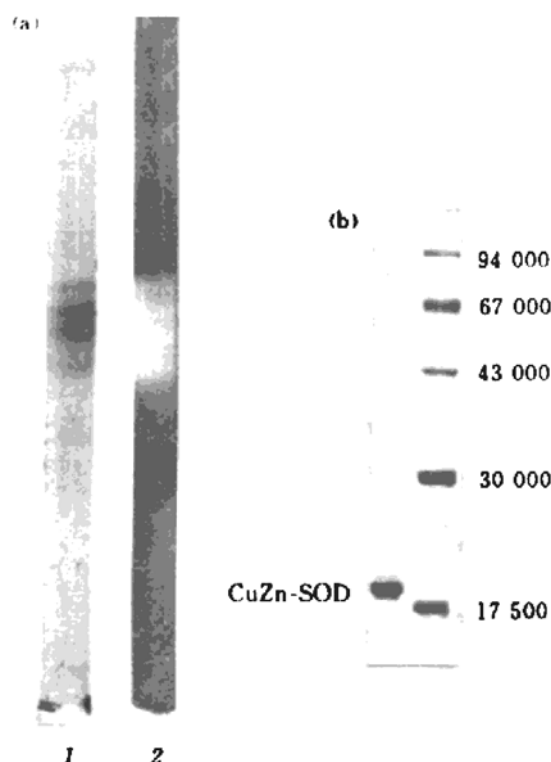


图 2 人 CuZn-SOD 的 PAGE 电泳与活性染色 (a) 及 SDS 电泳图 (b)

(a), 考马斯亮蓝蛋白染色; (b), 四氮唑蓝 SOD 活性染色。

以上鉴定结果表明,我们提取的人 CuZn-SOD 的比活性、电泳、亚基分子量等理化性质,

均符合文献报道的纯酶要求^[9]。

3 讨 论

文献报道的方法是先进行 DEAE 层析,再进行 Cu^{2+} -MCAC 层析。但有一个比较麻烦的问题:用柠檬酸溶液洗脱时,少量 Cu^{2+} 会随酶一起洗下。Weselake 采取的措施是在 Cu^{2+} -MCAC 柱下再接一个小柱,Junbauer 则是在用硫酸铜饱和柱时,只饱和柱的上三分之二,保留柱的下三分之一不饱和,目的都是为了接收随酶洗下的 Cu^{2+} 。但操作比较繁琐,也不便于柱的重复使用。为此,我们变换了层析次序,先进行 Cu^{2+} -MCAC 层析,后进行 DEAE 层析。这样 Cu^{2+} -MCAC 层析洗下的 Cu^{2+} 可在 DEAE 层析时经脱盐作用被除去,从而简化了操作,并可在不卸柱的情况下进行重复使用。

我们所用 Cu^{2+} -MCAC 柱体积仅为 30ml,上样的蛋白量在 200—400mg,蛋白量与体积之比 (mg/ml) 约 10:1,可见 MCAC 层析具有蛋白结合量大的优点,这对酶的大规模制备无疑是十分有利的。

CuZn-SOD 的氨基酸组成中,酪氨酸和色氨酸的含量极少或缺乏,故在紫外 260nm 处的光吸收高于 280nm。这是 CuZn-SOD 区别于其它蛋白的一个显著特征。我们采用 260nm 和 280nm 的 A 比值作为纯化过程中追踪和判断 SOD 纯度的指标,比值大于 1 提示酶纯度高,小于 1 表明仍有杂蛋白。实践证明,这个方法准确易行。

参 考 文 献

- 1 Weselake R, Chesney S, Petkau A *et al.* Anal Biochem,

- 1986; **155**: 193—197
- 2 Jungbauer A, Shonhofer W, Pettau D *et al.* Bio-Sciences, 1989; **8**: 21—26
- 3 吕星, 方允中, 陈吉中. 军事医学科学院院刊, 1991; **15**: 88—91
- 4 李益新, 方允中. 生物化学与生物物理进展, 1983; **2**: 59—62
- 5 McCord J M, Fridovich I. J Biochem, 1969; **244**: 6049—6055
- 6 Lowry O H, Roseberough N J, Farr A L *et al.* J Biochem, 1951; **193**: 265—276
- 7 Beauchamp C D, Fridovich I. Anal Biochem, 1971; **44**: 276—287
- 8 Leammli U K. Nature, 1970; **227**: 680—685
- 9 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989: 71—78

免疫沉淀法测定乳酸脱氢酶同工酶 1 的研究

吴希云 岳秀玲 陈燕 司学众 王仲泉

(北京天坛医院检验科, 北京 100050)

摘要 应用免疫沉淀法测定了乳酸脱氢酶同工酶 1 (LD1), 血清与抗血清用量为 10:1, 加入抗血清 5min 后再加入与血清量相等的饱和硫酸铵溶液, 离心后测定上清液中的 LD. 总酶活性在 618U/L 内线性关系良好, 二份标本批内精度 CV 值分别为 3.76% 和 4.70%, 批间 CV 值为 7.00%. 免疫沉淀法与电泳法高度相关 ($n=22$, $r=0.976$). 72 例正常人 LD 参考值为 102.31 ± 16.4 U/L, LD1 为 23.65 ± 4.39 U/L, LD1/LD 为 23.12 ± 3.85 %. 免疫沉淀法的优点是特异性高, 操作简单, 可用于自动生化分析仪. 精确度高, 线性关系好, 测定范围宽, 是测定 LD1 的理想方法.

关键词 乳酸脱氢酶同工酶 1 (LD1), 免疫沉淀法, 抗 LD_m 抗体

在人体各种组织细胞中已发现五种乳酸脱氢酶 (LD, EC 1.1.1.27) 的同工酶, 分别为 LD1, LD2, LD3, LD4 和 LD5. 其中心肌中主要含 LD1, 肝细胞中主要含 LD5. 因而同工酶的测定有特殊的诊断意义. 测定同工酶的方法有电泳法、化学抑制法、酶切抑制法和免疫沉淀法. 电泳法可测定各种同工酶的相对含量, 结果可靠, 但需要特殊仪器, 操作复杂, 难以普遍应用. 其他方法目前均为测定 LD1. 化学抑制法和酶切抑制法国内已有报道^[1-3]. 免疫沉淀法在国外早有报道^[4-7], 但国内尚未见正式报道. 我们对免疫沉淀法测定 LD1 进行了方法学的研究. 我们认为本法特异性高, 操作简单, 精确度和线性关系好, 测定范围宽, 是一种理想的方法. 总结如下.

1 材料和方法

1.1 试剂 LD_m 抗血清和饱和硫酸铵溶液 (沉淀剂) 由北京医院检验科、奥斯邦公司提供. LD 试剂盒来自上海长征公司.

1.2 血标本 来自本院病人和体检人员. 取静脉血, 凝固后分离血清.

1.3 方法 a. 免疫沉淀: 取血清 200 μ l 加入抗血清 20 μ l (血清与抗血清为 10:1) 混匀, 室温放置 5min. 加硫酸铵溶液 200 μ l (与血清量相等) 混匀, 室温再放置 5min, 3000r/min 离心 5min, 取上清液进行测定. b. 用 BT-2245ARCO 自动生化分析仪测定上清液中的 LD 含量即为 LD1. 参数如下:

方法: 速率法; 延迟时间: 30s; 波长:

was modulated by the ratio of different nucleotides in reaction system. Through this binding, the interaction of VIP and its receptor was regulated.

Key words VIP, photo-affinity, nucleotide

Study on Sensitivity Improvement of Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay. Zhao Qiren, Zhang Fuhua, Lu Jie, Lin Han. (*Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 255

Factors influencing the sensitivity, or the signal/noise ratio, of dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFA) have been studied. The fluorescence responses and signal/noise ratios for different europium amount were shown to be changed with the volume of enhancement solution, and there was an optimum volume at a certain europium amount. The smallest europium amount leads to the smallest optimum volume. 20% of the net fluorescence intensity was increased by using tinfoil reflection layer. Effective washing and drying methods of microtitration strips decreased background fluorescence have been developed.

Key words time-resolved fluoroimmunoassay, dissociation enhanced lanthanide fluoroimmunoassay, sensitivity

Purification of Cuprozinc Superoxide Dismutase From Human Erythrocytes by Cu^{2+} Chelate Affinity Chromatography. Lu Xing, Chen Jizhong, Li Peifeng, Yang Suhong, Fang Yunzhong. (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 259

Cuprozinc superoxide dismutase (CuZn-SOD)

from human erythrocytes was purified by a procedure involving Cu^{2+} chelate affinity chromatography. It was shown in three experiments that the special chromatography held a number of important advantages for protein purification, such as a high rate of repeating performance and a large protein capacity. The purified enzyme, with a specific activity of 3073 U/mg protein, was tested for homogeneity by activity-stained and SDS gel electrophoresis. Accompanied by the study, a simple and efficient method was worked out for assessing the homogeneity of CuZn-SOD using its ratio of the absorbance at 260nm to that at 280nm.

Key words cuprozinc superoxide dismutase, metals-chelate affinity chromatography, human erythrocyte, purification

Determination of Isoenzyme 1 of Lactate Dehydrogenase by an Immunoprecipitation Method.

Wu Xiyun, Yue Xiuling, Chen Yan, Si Xuezhong, Wang Zhongquan. (*Clinic Laboratory, Beijing TianTan Hospital, Beijing 100050*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 262

Isoenzyme 1 of lactate dehydrogenase (LD1) was measured by an immunoprecipitation method. The antibody to M subunit of LD was added to the patient's serum and incubated for 5 min, at room temperature. The ratio of serum to antibody was 10 : 1. After incubation, a saturated ammonium sulphate solution was added with the same volume as serum. Then, centrifuged to precipitate all M-containing isoenzyme (LD2—LD5) as insoluble antigen-antibody complex. Determined the residual activity of LD in supernatant fluid. The relationship Between the LD activity and absorbance was linear up to 618U/L. Within-run