

仓鼠肝谷胱甘肽过氧化酶的提纯与鉴定*

徐 燕 谷伯起

李 林 许根俊

(上海医科大学,病理教研室)

(中国科学院上海生化研究所)

提 要

用硫酸铵分级沉淀后, 经过 Phenyl-Sepharose CL-4B 和 DEAE-Sephadex A-50 柱层析分离得到了比活为 1993units/mg、纯化倍数为 443 倍、产率为 12% 的仓鼠肝谷胱甘肽过氧化酶。提纯的酶在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈单一区带。

谷胱甘肽过氧化酶 (Glutathione Peroxidase GSH-Px) 是细胞内抗脂质过氧化作用的酶性保护系统的主要成分之一, 它主要催化谷胱甘肽对脂质过氧化氢的还原反应^[1], 保护细胞免受脂质过氧化的损伤。近年来, 随着人们对脂质过氧化作用机理及其对细胞组织损伤认识的日趋深入, GSH-Px 也日益引起人们的重视。据报道仓鼠肝 GSH-Px 比活性在所有哺乳类动物中居首位^[2], 本文报道一种提纯仓鼠肝脏 GSH-Px 的有效方法, 并对该酶进行鉴定。

材 料 与 方 法

一、材料 仓鼠, 雄性, 100g/只, 由上海市计划生育研究所提供, 谷胱甘肽还原酶、还原型谷胱甘肽 (GSH)、还原型辅酶 II (NADPH) 均为 Sigma 产品, 巯基乙醇为 Fluka 产品, 其它试剂均为国产分析纯。

二、方法

1. 酶活性测定 GSH-Px 活力的测定在 1ml 反应体系中, 其中含有 0.1mol/L、pH8.0 Tris/HCl 缓冲液, 1mmol/L GSH, 0.4mmol/L EDTA, 1mmol/L NaN₃, 1mmol/L 丁基过氧化氢, 1 单位谷胱甘肽还原酶, 0.15mmol/L NADPH 及适量酶溶液, 反应液置于 37℃ 水浴内 2 分钟, 以加入丁基过氧化氢开始反应, 在

Hitachi 557 型双波长双光束分光光度计上测定 340nm 处 NADPH 光吸收值的减少, 酶的单位定义为在 37℃ 每分钟氧化 1 μ mol 谷胱甘肽为一个酶单位。

2. 蛋白质含量测定 用紫外分光光度计测定在 280nm 处的光吸收值, 定量测定采用考马斯亮蓝法^[3], 以牛血清白蛋白作标准。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 分离胶浓度为 15%, 缓冲系统为 0.375mol/L Tris/HAc pH8.8; 浓缩胶浓度为 5%, 缓冲系统为 0.125mol/L Tris/HAc pH6.8 电极缓冲液为含 0.1% SDS, pH8.3 的 25mmol/L Tris/甘氨酸。

结 果

一、GSH-Px 的提纯

匀浆: 全部纯化过程在 4℃ 进行, 将 10 只仓鼠颈椎脱臼法处死, 立即取出肝脏, 用生理盐水洗去血液, 加 3 倍体积磷酸缓冲液 (50mmol/L, pH8.8), 在高速组织捣碎机中匀浆 (30 秒 $\times$ 2 次), 然后以 18000r/min 离心 40min, 经尼龙网过滤, 留取上清。

硫酸铵分级: 将粗提液加入硫酸铵至 30% 饱和度, 搅拌 10min, 离心 (18000r/min, 30

* 国家自然科学基金资助的课题。

表1 仓鼠肝谷胱甘肽过氧化酶的提纯过程

提纯步骤	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	提纯倍数	产 率 (%)
匀浆上清	141	5346	24144	4.5	1	100
30%—60% 硫酸铵分级沉淀	70	2293	22660	9.9	2.2	94
Phenyl-Sepharose CL-4B 柱层析	59	365	19903	55	12	82
DEAE-Sephadex A-50 柱层析(第一)	42	25	8178	328	73	34
DEAE-Sephadex A-50柱层析(第二)	8.3	1.5	2990	1993	443	12

min) 取其上清,再加硫酸铵至 60% 饱和度,搅拌至硫酸铵固体颗粒溶解,放置 15min,离心(同上)弃上清,用少量 pH8.0, 50mmol/L 磷酸缓冲液溶解沉淀。

Phenyl-Sepharose CL-4B 柱层析: 将上述溶液上柱(2.0 × 12cm), 用含 30% (NH₄)₂SO₄

的上述缓冲液洗一个体积,再用 20% (NH₄)₂SO₄ 的上述缓冲液洗脱,收集洗脱液至活力基本回收。将收集的洗脱液上第二个 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱,用含 30% (NH₄)₂SO₄ 的上述溶液洗约 3 个柱体积,然后用含 20%—0 (NH₄)₂SO₄ 的上述缓冲液进行梯度洗脱,收集有活力部分(图 1),用 60% (NH₄)₂SO₄ 沉淀,再用含巯基乙醇 5mmol/L、pH7.2、20mmol/L 磷酸缓冲液透析平衡。

DEAE-Sephadex A-50 柱层析: 将透析好的溶液上柱(2.0 × 18cm),用平衡缓冲液洗两个柱体积后,再用 0—300mmol/L KCl 梯度洗脱(图 2)。收集活力峰,用 60% (NH₄)₂SO₄ 沉淀,再用 10mmol/L、pH6.0 磷酸缓冲液透析去盐。

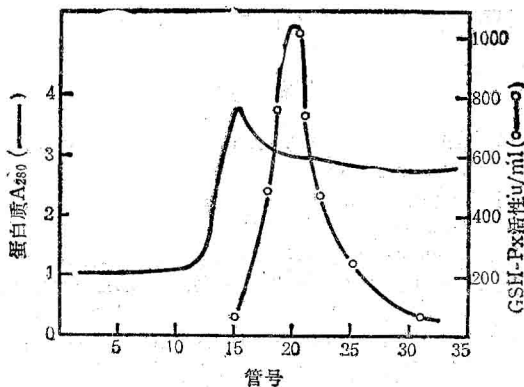


图1 GSH-Px 的 Phenyl-Sepharose 柱层析图谱

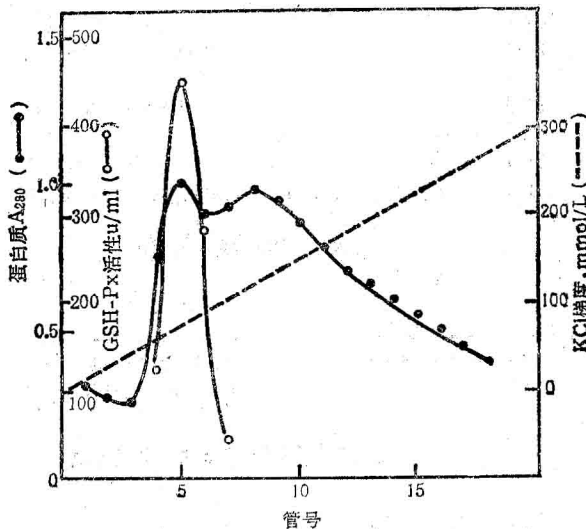


图2 GSH-PX 的 DEAE-Sephadex 柱层析图谱

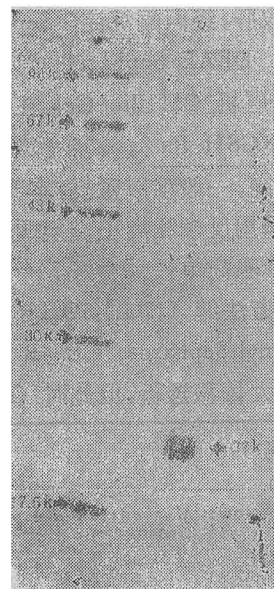


图3 仓鼠肝 GSH-Px 电泳图谱

a. 标准分子量样品 b. 纯化的 GSH-Px (15μg)

透析好的溶液上样于用上述缓冲液平衡的另一 DEAE-Sephadex 柱 (1.5 × 6cm), 用含 50mmol/L KCl 的上述缓冲液洗至柱流出液 280nm 处光吸收值小于 0.01, 换用含 150mmol/L KCl 的上述缓冲液洗脱, 收集洗脱出的蛋白, 4℃ 冰箱保存。表 1 总结了酶提纯的过程与结果。经过上述一系列步骤, 仓鼠肝 GSH-Px 被纯化 443 倍, 产率为 12%。

二、GSH-Px 的纯度鉴定

图 3 示纯化的仓鼠肝 GSH-Px SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。GSH-Px 呈现分子量约为 22000 的单一区带。表明该酶的纯化已达到电泳均一。

讨 论

谷胱甘肽过氧化物酶最早由 Mills 和 Randall 从红细胞中发现^[1], 以后人们又从牛、羊、人等红细胞以及大鼠肝^[4-7]中提纯了该酶, 并对它们的一些特性进行了研究。谷胱甘肽过氧化物酶广泛分布于机体各器官、组织和细胞中, 一般认为肝脏是该酶活力最高的器官^[8], 而仓鼠肝 GSH-Px 又较其他动物肝具有更高比活性^[2], 因此, 我们选择了仓鼠肝来提纯该酶。

Jean Chaudiere 用预先经腹腔注射 ⁷⁵Se 的仓鼠, 处死取肝, 经丙酮沉淀, Sephadex G-100 凝胶过滤, DEAE-Sephacel 滴定, DEAE-Sephacel 柱层析 CM-Bio-Gel 柱层析等步骤, 提取仓鼠肝 GSH-Px^[9], 其步骤繁琐, 设备及操作要求较高, 一般难以重复, 本实验选择了合适的条件, 采用反相和离子交换两种柱层析, 纯化了该酶, 步骤简单效果良好。

本实验方法继 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀后, 首先采用 Phenyl-Sepharose CL-4B 柱层析分离, 是为了避免大体积透析, 但此时 GSH-Px 并不

被吸附, 而随 30% (NH₄)₂SO₄ 洗下, 当洗脱液加少量 (NH₄)₂SO₄, 重新上柱于另一个 Phenyl-Sepharose CL-4B, GSH-Px 则被吸附, 30% (NH₄)₂SO₄ 不能洗下该酶。这一现象提示粗提液中可能有某种成分与 GSH-Px 并存, 影响其层析行为, 该成分可能对 Phenyl-Sepharose 的亲性和性优于 GSH-Px, 只有当该成分完全被吸附掉后, GSH-Px 才能较好地被 Phenyl-Sepharose 所吸附。

从不同动物不同组织提纯的 GSH-Px, 其催化性质相同, 并均由四个相同的亚基构成, 而其亚基分子量却不完全相同。如大鼠肝 GSH-Px 亚基分子量约 23500^[10], 肺约 21000^[7], 牛红细胞约 20000^[11], 兔肝约 18000^[12], 仓鼠肝约 23000^[9], 本实验结果为 22000, 与前文报道仓鼠肝亚基分子量基本相符。

参 考 文 献

- [1] Mills, G. C. and Randall, H. P.: *J. Biol. Chem.*, 1958, **232**, 589.
- [2] Tappel, M. et al.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, **B73**, 945.
- [3] Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248.
- [4] Awasthi, Y. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, 5144.
- [5] Nakamura, W. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, **358**, 251.
- [6] Little, C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 3632.
- [7] Chiu, D. T. Y. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, **445**, 558.
- [8] Tappel, A. L.: *Am J Clin. Nutr.*, 1974, **27**, 960.
- [9] Chaudiers, J. et al.: *Arch Biochem. Biophys.*, 1983, **226**, 448.
- [10] Yoshimura, S. et al.: *Bioem. Biophys. Acta*, 1980, **621**, 130.
- [11] L. Flohe, et al.: *Physiol. Chem.*, 1971, **352**, 151.
- [12] 韩珣等: «生物化学与生物物理学报», 1986, **18**, 436.

[本文于 1988 年 8 月 20 日收到]

(上接第 398 页)

80, 1830.

- [2] Peter. Setlow: *Methods in Enzymology*, 1974, **29**, 3.

- [3] Fritz M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1972, **67**, 375.
- [4] Aaron Bendich: *Methods in Enzymology*, 1957, **3**, 715.

[本文于 1988 年 8 月 22 日收到]