

人心肌胞质天门冬氨酸转氨酶的纯化及性质

荣墨克 谢 风 孙荣武

吕凤昌 印 璞

(白求恩医科大学三院中心实验室, 长春 130021) (吉林省医院检验科, 长春 130021)

提 要

从人心肌提纯胞质天门冬氨酸转氨酶同工酶 (c-AST)。经匀浆、热处理、硫酸铵分离, 进一步用离子交换层析和亲和层析。其比活为 220 u/mg。经免疫电泳和 PAGE 鉴定, 达到免疫纯和电泳纯。免疫动物获得较高效价抗体。并对该酶的分子量, 等电点和氨基酸组成进行了研究。

关键词 胞质天门冬氨酸转氨酶, 纯化, 同工酶

天门冬氨酸转氨酶 (EC 2.6.1.1, AST), 又称谷草转氨酶 (GOT), 以两种同工酶存在于动物和人的细胞中。存在于细胞质的称胞质天门冬氨酸转氨酶 (c-AST); 存在于细胞线粒体的称线粒体天门冬氨酸转氨酶 (m-AST)。两种同工酶的生物化学、动力学和免疫学性质不同。可用离子交换层析等方法将其分离提纯^[1,2]。用于制备高纯度的 AST 标准物质、及作为抗原制备抗体, 建立免疫学原理测定 m-AST 的方法^[3]。该同工酶对心脏和肝脏疾病的诊断及治疗监测有重要的临床价值^[4,5]。

本文报道的提纯方法, 适合一般实验室操作。试剂和材料容易在国内获得。纯化过程简便, 达到免疫纯和电泳纯。并通过对 c-AST 的分子量、等电点和氨基酸分析等研究, 确定提纯酶的性质。

材 料 和 方 法

一、材料、试剂和仪器

人心肌, 试验兔, CM-Sepharose CL-6B, Blue-Sepharose CL-6B, AH-Sepharose 4B (pharmacia), 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) (sigma), 天门冬氨酸, 琥珀酸酐 (国产试剂), 抗人全血清 (自制), 蛋白检测仪 (浙江永嘉电器厂), 层析框 (万宝公司), 低温超速离心机 (东德 VAC 602),

生化自动分析仪 (日立 105 型), 紫外分光光度计 (岛津 UV 240), 氨基酸自动分析仪 (日立 835-50 型)。

二、分析技术

酶活性测定 天门冬氨酸转氨酶 (AST), 肌酸激酶 (CK), 丙氨酸转氨酶 (ALT), 乳酸脱氢酶 (LD), γ -谷氨酰转移酶 (GGT), 用 Beckman 试剂盒, 日立 105 型生化自动分析仪, 温度 37°C, 以速率法测定。

蛋白质测定 用紫外吸收法^[6], 以牛血清白蛋白为标准。

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 见文献^[6]

分子量测定 用 Sephadex G-200 凝胶柱层析法和 SDS-PAGE 法^[6]。

等电聚焦电泳 见文献^[7]。

氨基酸分析 c-AST 1 ml, 经 5.7 mol/L HCl 置 110°C 水解 24 小时。以日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。

三、抗体制备

选用 2 kg 雌兔, 以 1 ml 心肌 c-AST 与等量弗氏完全佐剂混合。四足掌及脊柱两侧皮内注射。间隔 10 天重复注射、一月后动脉放血。置冰箱中 24h, 离心 2000g, 10min。经硫酸铵纯化后, 放 -20°C 保存。

四、纯化过程

1. 制匀浆 死后 24h 内的人心脏, 取心室肌 100g, 切成小块, 加 200ml 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (含 40 μ mol/L 磷酸吡哆醛, 2.5 mmol/L α -酮戊二酸, 14 mmol/L 巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 0.05% 叠氮钠)。以高速组织捣碎机制成匀浆, 离心, 30000g, 50min, 4 $^{\circ}$ C。取上清液。

2. 热处理 上清液在 55 $^{\circ}$ C 水浴保温 20min, 慢慢搅拌。然后在冰浴中冷却至 4 $^{\circ}$ C。离心 30000g, 30min 4 $^{\circ}$ C。取上清液。

3. 硫酸铵提取 上清液加入硫酸铵使成 45% 饱和液, 慢慢混合 30min。离心, 9000g, 30min。取上清液, 加入硫酸铵使成 80% 饱和液, 慢慢混合 3h。离心, 9000g 30min, 弃去上清液。沉淀溶于 40ml 0.02 mol/L pH 6.0 磷酸盐缓冲液中, 以同样缓冲液 400ml 在 4 $^{\circ}$ C 透析 24h。

4. CM-Sepharose CL-6B 柱层析 制备 CM-Sepharose CL-6B 层析柱 (2.6 $\times$ 26 cm)。用 0.02 mol/L, pH 6.0 磷酸盐缓冲液平衡。样品经浓缩后上样, 以平衡缓冲液洗脱, 流速 30 ml/h。

5. Blue-Sepharose CL-6B 柱层析 制备 Blue-Sepharose CL-6B 层析柱 (0.9 $\times$ 30cm)。用 10 mmol/L, pH 7.0, Tris-HCl 缓冲液平衡。上样后先用平衡缓冲液洗脱, 然后用 0—250 mmol/L NaCl, 600ml 梯度洗脱。

6. AH-Sepharose 4B-天门冬氨酸柱层析 层析柱制备: 取 10g AH-Sepharose 4B, 用 0.5 mol/L NaCl 涨溶, 以布氏漏斗抽洗数次。加 40 mmol/L 琥珀酸酐, 用 5 mol/L NaOH 调至 pH 6.0, 慢慢混合 12h, 用蒸馏水冲洗。加 50 mmol/L L-天门冬氨酸, 15ml 1.3mol/L 碳二亚胺盐酸盐, 调 pH 值为 5.0, 室温混合 20h。用大量蒸馏水冲洗。以 0.01 mol/L, pH 5.2 醋酸钠缓冲液平衡装柱。样品经同样缓冲液透析后上样, 流速 10ml/h。先以平衡缓冲液洗脱, c-AST 用 0.05 mol/L, pH 7.8 含 0.05 mol/L L-天门冬氨酸的 Tris-HCl 缓冲液洗脱。

结果与讨论

一、纯化结果

有关 c-AST 的纯化、国外文献中多用离子交换层析方法从动物脏器提取, 我们结合本室条件, 参照国外有关文献[1,2,8], 从人心肌中纯化 c-AST。表 1 为 100g 心肌组织的纯化结果。CM-Sspharose CL-6B 柱层析可将 c-AST 和 m-AST 完全分开。c-AST 首先随 0.02

表 1 c-AST 的提纯过程

提纯步骤	总活力 (U)	总蛋白 (mg)	比活力 (U/mg)	回收率 (%)	提纯倍数
1. 匀浆上清	4094	3140	1.30	100	1
2. 热处理	3976	2910	1.36	97	1.05
3. 硫酸铵提取	3736	624	4.38	67	3.37
4. CM-Sepharose	1380	122	11.31	34	8.87
5. Blue-Sepharose	922	6.48	135.59	23	104.36
6. AH-Sepharose 4B-天门冬氨酸	529	2.42	220.41	13	169.55

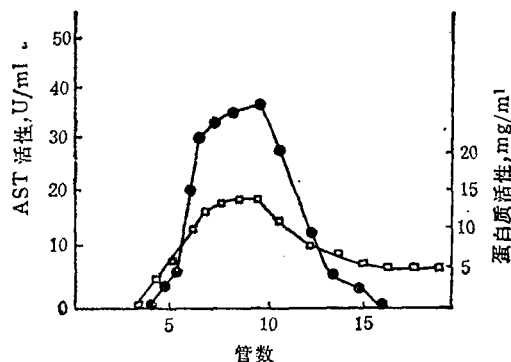


图 1 CM-Sepharose 柱层析洗脱图谱

●—● c-AST □—□ 蛋白质

mol/L, pH 6.0 磷酸盐缓冲液洗脱 (见图 1)。此收集液 PAGE 显示还含有白蛋白和球蛋白。Blue-Sepharose CL-6B 层析可结合白蛋白和 c-AST。经平衡缓冲液洗脱, 大量球蛋白被除去, c-AST 随盐梯度洗脱与白蛋白分开 (图 2)。收集的 c-AST 进一步用 AH-Sepharose-天门冬氨酸层析纯化。c-AST 与亲和凝胶结合力较弱^[4], 需用低 pH 和低离子强度的醋酸钠缓冲液平衡上柱。未结合的杂蛋白首先随平衡缓冲液洗脱, c-AST 用 0.05 mol/L, pH 7.8 的

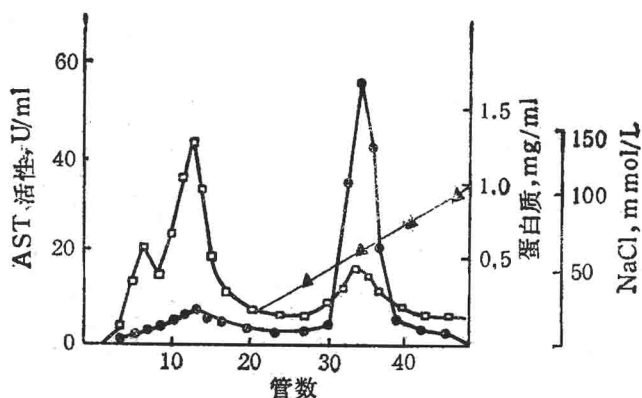


图2 Blue-Sepharose 柱层析洗脱图谱

●—● c-AST □—□ 蛋白质 ▲—▲ NaCl 浓度

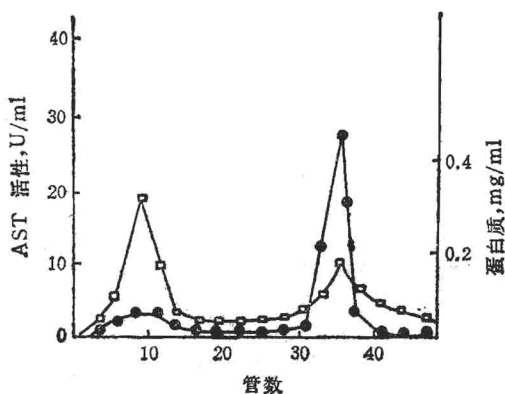


图3 亲和层析洗脱图谱

●—● c-AST □—□ 蛋白质

Tris-HCl 缓冲液洗脱(见图3)。纯化的 c-AST 免疫动物,抗体效价为 1:32。

二、纯度鉴定

1 PAGE 电泳 上柱前样品 PAGE 电泳呈多条带,经3步层析纯化的 c-AST 在 PAGE 电泳上只有一条酶蛋白区带。达到电泳纯度(见图4)。

2. 琼脂凝胶板免疫电泳 纯化的 c-AST 在免疫电泳上与抗人全血清未见沉淀线。与抗 c-AST 抗体出现一条沉淀线,未见杂蛋白沉淀线。达到免疫纯度(见图5)。

3. 酶活力测定 用速率法测定提纯品的各种酶活力。CK、LD, GGT, ALT 与 c-AST 的

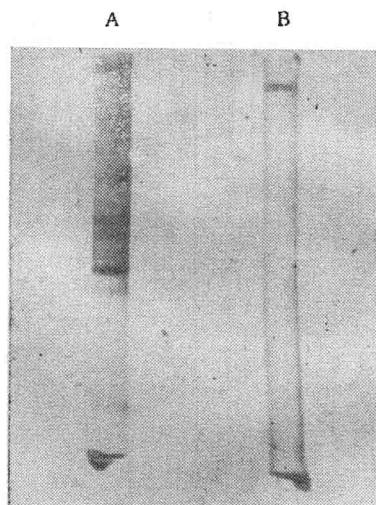


图4 PAGE 电泳图谱

(A) 上柱前样品 (B) 纯化 c-AST

活力比率分别为 3.0×10^{-3} , 4.0×10^{-4} , 1.0×10^{-4} , 2.3×10^{-3} 。其杂酶的含量几乎测不出来。

三、性质鉴定

1. 离子交换层析分离 AST 两种同工酶的等电点相差很大, c-AST 大约为 5.6, m-AST 大约为 9.0。在离子强度 0.02 mol/L, pH 6.0 条件下, 阳离子交换剂 CM-Sepharose 吸附全部 m-AST, c-AST 首先被洗脱。将两峰的提纯液与抗 c-AST 抗体作免疫电泳, 第一峰与抗 c-AST 有沉淀线; 第二峰与抗 c-AST 无沉

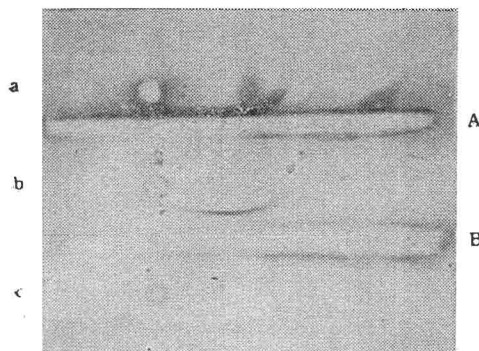


图5 琼脂免疫电泳图谱
(A) 抗人全血清 (B) 抗人 c-AST 抗体
(a) 正常人血清 (b) 纯化 c-AST
(c) 纯化 m-AST

淀线。并说明 AST 两种同工酶间无交叉免疫反应(见图5)。

2. 等电聚焦电泳 c-AST 在等电聚焦电泳上呈三条带, pH 值分别为 5.45, 5.60, 5.75。说明 c-AST 为多分子型酶。与文献报道相近^[9]。

3. 分子量测定 我们应用两种方法测 c-AST 的分子量; SDS-PAGE 法其分子量为 46700 道尔顿。凝胶过滤法其分子量为 93000 道尔顿。说明 c-AST 分子由两个相同亚基组成。

4. 氨基酸组成分析 人心肌 c-AST 的氨基酸组成见表 2, 它由 412 个氨基酸残基组成。与已报道的猪和鸡心肌 c-AST 比较^[10,11], 猪心肌 c-AST 与人的氨基酸残基总数相同, 但每种氨基酸的残基数有一些差别。

表 2 c-AST 的氨基酸组成

氨基酸	人心肌 c-AST	猪心肌 c-AST	鸡心肌 c-AST
天冬氨酸	44	42	43
苏氨酸	21	25	23
丝氨酸	20	26	27
谷氨酸	45	41	36
脯氨酸	28	24	20
甘氨酸	26	28	32
丙氨酸	35	32	37
缬氨酸	32	29	28
蛋氨酸	5	6	10
异亮氨酸	20	19	19
亮氨酸	38	38	35
酪氨酸	13	12	12
苯丙氨酸	23	23	21
赖氨酸	23	19	21
组氨酸	7	8	7
精氨酸	20	26	26
胱氨酸	5	5	4
色氨酸	7	9	9
总 数	412	412	410

参 考 文 献

- 1 Gracia R *et al.* *Enzyme*, 1988; **40**: 189
- 2 Charalampos M *et al.* *Biochem cell Biol*, 1987; **65**: 239
- 3 Theodore P Z. *Clin Chem*, 1988; **34**: 225
- 4 Hiroshi WADA *et al.* *Rinsho Kensa*, 1988; **32**: 1291
- 5 Mauro P. *et al.* *Clin Chem*, 1987; **33**: 67
- 6 张龙翔等. 生物化学实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1987
- 7 周本正. 实用电泳及免疫电泳技术, 湖北: 湖北科学技术出版社, 1988
- 8 Cuatrecasas P J. *Biol Chem*, 1970; **245**: 3059
- 9 Rej R. *Clin Chim Acta*, 1981; **112**: 1
- 10 Ovchinnikov Y A *et al.* *FEBS Lett*, 1973; **29**: 31
- 11 Shlyapnikov S V *et al.* *FEBS Lett*, 1979; **106**: 385

[本文于 1989 年 12 月 26 日收到,

1990 年 3 月 5 日修回]