

人胎盘雌二醇 17 β -脱氢酶的染料凝胶亲和层析*

王春霞 卿 晨** 金长振***

(北京医科大学药学院, 北京 100083)

提 要

利用染料凝胶亲和层析及 DEAE-Sephrose 离子交换层析改进了雌二醇 17 β -脱氢酶的提纯方法, 提纯的酶的质量有所改进, 制备步骤简便, 且凝胶层析柱可以反复使用。

关键词 雌二醇 17 β -脱氢酶, 染料凝胶亲和层析

雌二醇 17 β -脱氢酶 [EC.1.1.1.62] 是一种 NAD⁺ 依赖性酶, 最初从人胎盘中提取时^[1], 至少要经过四个主要步骤和许多浓缩、透析、高速离心及凝胶过滤等复杂的操作。到 1972 年, 法国的 Nicolas 等^[2]和美国的 Chin (金长振) 等^[3]各自以不同的 Sepharose 凝胶亲和层析法制成纯酶。其后, Chin 等^[4]进一步从所得的纯酶获得酶的结晶。不过以 Sepharose 凝胶亲和层析法制酶, 亲和层析柱的制备比较麻烦, 且难以重复使用; 待染料凝胶层析的方法发现后^[5], 可以利用一种称作 Cibachrome Blue F3 GA 的蓝色凝胶作亲和层析, 将雌二醇 17 β -脱氢酶初步提纯, 再进一步用 DEAE-Sephrose 的离子交换层析柱将酶纯化^[6,7]。蓝色凝胶和 DEAE-Sephrose 均有商品, 且可反复使用, 这种方法既方便, 又经济。此外, 在过去的研究中, 发现原来所用热处理步骤会导致酶的结构和性质有某些改变, 不利于酶结晶的生长和酶结构的研究, 所以在本文改进的方法中去掉了热处理步骤。

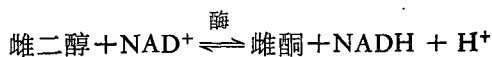
材 料 与 方 法

Reactive Blue 2-Agrose, 雌二醇-17 β , 雌酮, NAD⁺, NADP⁺ 购自 Sigma 公司; DEAE-

Sephrose 购自 Pharmacia 公司; 考马斯亮蓝 G250 为 Fluka 进口分装; 各种化学试剂均为北京化工厂分析纯产品。微型浓缩器 Minicon-B15 为 Amicon 公司产品; 超滤器为上海市步进电子仪器厂产品。所用水均为双蒸去离子水。

所有操作及分析除特别标明外, 均在室温 (25 $^{\circ}$ C) 下进行。

粗酶利用 Bradford^[8] 法测定蛋白含量 (以人血清白蛋白为参考), 纯酶以 280nm 处的吸收值来计算蛋白含量 ($E_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0.89$)。酶活性的测定依据雌二醇 17 β -脱氢酶催化反应:



利用 NADH 在 340nm 处吸收值的增加求得酶活性^[9]。

DEAE-Sephrose 凝胶柱的制备及再生: 将 DEAE-Sephrose 凝胶用 1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.50) 倾洗数次装柱, 然后以 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.50) 洗, 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.50) 平衡就可以反复使用。

* 国家自然科学基金项目。

** 昆明医学院进修生。

*** 北京医科大学客座教授。

Reactive Blue 2-Agarose 凝胶柱的制备及再生: 将 Reactive Blue 2-Agarose 凝胶用双蒸去离子水倾洗数次装柱,用缓冲液 A(10mmol/L K_2HPO_4 , 20% 甘油, 0.02% NaN_3 , pH7.50) 平衡即可。上柱洗脱后,顺次经过以下步骤即可再生(100ml Reactive Blue 2-Agarose 凝胶的再生): (1)1000ml 2—3mol/L NaCl 洗, (2) 500ml 1mol/L NaCl , 0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ 洗, (3)500ml 50% 乙醇洗, (4)双蒸水洗, (5) 保存于 250ml 0.5mol/L NaCl 溶液中(4℃)。

电泳分析: 采用连续缓冲系统 SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)板式凝胶电泳,在变性条件下进行,分离胶浓度 7%, 浓缩胶浓度 2.5%, 以 Tris-甘氨酸缓冲溶液(pH 7.80)作电极缓冲液,酶样量为 4 μg 。

提纯步骤如下。

1. 匀浆抽提: 将新鲜胎盘去掉羊膜,脐带后,用滤纸将淤血擦净,剪碎,称重,按每 75g 胎盘组织加 150ml 缓冲液 A 的比例匀浆 15s(3 $\times$ 5s),匀浆液在 4℃, 10000 $\times$ g 下离心 60min,倾出上清,弃去沉淀。

2. 盐析: 将研细的硫酸铵在电磁搅拌下缓慢加入上清液中,用 1mol/L NH_4OH 维持 pH 7.50,使硫酸铵在溶液达到 50% 饱和溶液(31.2g/100ml 酶溶液),充分搅拌,将硫酸铵完全溶解后,在 4℃ 静置 2h 或过夜,然后,在 4℃, 10000 $\times$ g 下离心 60min,弃上清,将沉淀悬浮在缓冲液 A 中,每个胎盘(250g 左右)约用 20ml 缓冲液 A。

3. 去盐及其他杂蛋白: 在缓冲液 A 中,将上步所得酶液透析 20—24h(换透析液 3—4 次),以除去硫酸铵及一些小分子物质,之后在 4℃, 20000 $\times$ g 离心 60min,保留上清,弃去沉淀。

4. 第一次 DEAE-Sephrose 凝胶层析: 备好一支 2 $\times$ 30cm 的 DEAE-Sephrose 凝胶柱,将上步所得上清液上柱,(一次可上两个胎盘的酶抽提液),先用 10mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.50)50ml 冲洗,检测其洗脱液应无酶活性,即以 10 mmol/L—1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.50)各 200ml 梯度洗脱,收集后合并有酶活

性的各管,在缓冲液 A 中透析(2 $\times$ 500ml)。

5. 染料凝胶亲和层析: 备好一支 2 $\times$ 20 cm 的 Reactive Blue 2-Agarose 凝胶柱,将上步所得并透析好的酶提液上柱(一次两个胎盘的酶提液),用缓冲液 A 50ml 冲洗,续用 0.1 mol/L KCl 的缓冲液 A 洗至洗脱液无色透明,再用缓冲液 A 25ml 洗,检查所有洗脱液需均无酶活性。然后,用含 0.1mmol/L NADP^+ 及 0.1 mmol/L 雌酮的缓冲液 A 200ml 洗脱(如发现有些微混浊现象,需过滤)。收集后合并有酶活性的各管。

6. 第二次 DEAE-Sephrose 凝胶层析: 备好另一支 1.2 $\times$ 15cm 的 DEAE-Sephrose 凝胶柱,将第 5 步亲和层析所得到的酶提液上柱(两个胎盘的酶提液)。(注意: 两支 DEAE-Sephrose 层析柱不得混用),用 10mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.50)冲洗,检测其洗脱液应无酶活性,然后用含有 0.05—0.5 mol/L KCl 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.50)各 150ml 梯度洗脱,收集后合并有酶活性的各管。

结果与讨论

测得所提酶之比活性为 7.2U/mg,经 PAGE 及 SDS-PAGE 凝胶电泳结果都得到单带,与以往报告的结果相符^[9]。若用 DEAE-Sephrose 再进行磷酸盐浓度梯度层析会得到一个占全洗脱物 96.3% 而形状对称的峰,(图 1 的 3 号峰),而经蓝色凝胶层析分离后的酶,由同一层析柱,在同一条件下,在上述的峰(48.3%)之后不远尚出现一个等量的峰(45.6%)和一些小峰,都没有酶活性。所有小峰的量共占总面积的 6%。

图 1 中主峰之后经约 30 min 才出现的小峰可能是雌二醇 17 β -脱氢酶的聚合体,也可能是矫作物

提纯后将酶溶液浓缩,少量可用微型浓缩器或超滤器,量大时可用 50% 饱和度的硫酸铵溶液沉淀后再溶解于适量的缓冲液 A 或缓冲液 B(缓冲液 B: 10mmol/L K_2HPO_4 , 50% 甘油, 0.02% NaN_3 , pH 7.50) 中。在缓冲液 B 中的酶

表 1 人胎盘雌二醇 17 β -脱氢酶的提纯(四个胎盘)

步 骤	总体积 (ml)	总活性 (U)	比活性 (U/mg)	产率(%)	提纯倍数
1.匀浆离心后上清	2895	250	0.0044	100	1
2.盐析沉淀透析后的酶液	300	140	0.0080	56	1.8
3.透析后再离心的上清	280	138	0.074	55	17
4.第一次 DEAE-Sephrose 层析	315	123	0.098	49	22
5.染料凝胶亲和层析	330	110	2.41 ¹⁾	44	545
6.第二次 DEAE-Sephrose 层析	215	85	7.21 ¹⁾	34	1640

1) 由 $E_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0.89$ 计算蛋白含量,其余由 Bradford 法测出。

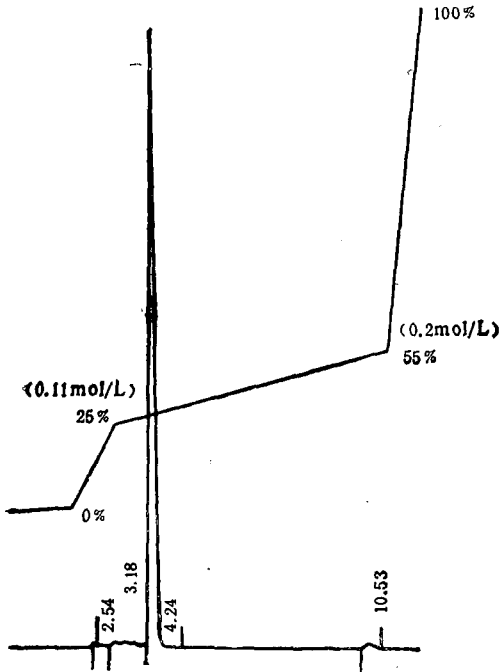


图 1 人胎盘雌二醇 17 β -脱氢酶 (7.2U/mg) 的 DEAE-Sephrose 层析图谱

层析柱用含 0.05mol/L—0.5mol/L KCl 的缓冲液 A 梯度洗脱, A 为含 0.05 mol/L KCl 的缓冲液 A; B 为含 0.5mol/L KCl 的缓冲液 A

0% B 15min
0—25% 10min
25—55% 60min
55—100% 10min

峰	峰面积%	保留时间 (min)	峰面积
1	0.243	2.54	292
2	1.772	3.16	2127
3	96.33	4.24	115646
4	1.655	10.53	1987
总面积	100		120050

可保存 3—6 个月而酶活性损失极小,使用时再用透析法或稀释法转变为缓冲液 A 的酶溶液。

表 1 概括了人胎盘雌二醇 17 β -脱氢酶的整个提纯过程。

本文人胎盘雌二醇 17 β -脱氢酶的分离提纯方法系根据文献 [3] 加以改进的。主要改进之处在于: (1) 废除热处理步骤, 改用 DEAE-Sephrose 凝胶柱去掉血浆蛋白及其他杂蛋白, 将酶初步纯化。可避免酶因热处理而稍有变性, 不利于培养酶的单晶。 (2) 使用易由市场上购得之蓝色染料凝胶将粗酶经亲和层析纯化, 不必再费时费力自制亲和层析凝胶。该种亲和层析凝胶不论洗脱或再生均极为方便, 可以反复使用一年以上。本文的改进方法自 1983 年开始研究试用, 其后并屡经改进, 以求更加完备。但在 1984, 1985 年 Mendoza-Hernández 等曾相继发表类似的论文^[6,7], 经仔细阅读, 所载提纯方法过程, 难使结果重现, 故将本论文整理发表, 以供有兴趣从人胎盘提纯雌二醇 17 β -脱氢酶者参考。

参 考 文 献

- 1 Langer L J, Engel L L. *J Biol Chem*, 1958; 233: 583
- 2 Nicolas J C et al. *FEBS Letters*, 1972; 23: 175
- 3 Chin C C, Warren J C. *Steroids*, 1973; 22: 333
- 4 Chin C C et al. *J Biol Chem*, 1976; 251: 3700
- 5 Amicon Corporation, *Dye Ligand Chromatography: Applications, Methods, Theory of Matrex Gel Media*. Lexington, Mass., 1980
- 6 Mendoza-Hernández G, Calcagno M, Sánchez-Nuncio H R et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 119: 83
- 7 Mendoza-Hernández G, Rendón J L, Diaz-Zagoya J C. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 126: 477
- 8 Bradford M M, *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- 9 金长振. 酶学的理论与实际, 北京: 北京科学技术出版社, 香港雪谷出版社, 1989: 149—151; 44—48

[本文于 1990 年 1 月 18 日收到, 1990 年 5 月 8 日修回]