

人胎盘谷胱甘肽转硫酶分离纯化的简易方法

张燕玲* 张迺哲 符云峰

(河北医学科学院, 石家庄 050021)

关键词 谷胱甘肽转硫酶, 人胎盘, 分离纯化

谷胱甘肽转硫酶 (GST, EC2.5.1.18.) 广泛存在于哺乳动物各组织中^[1], 催化 GSH 与化学物质的亲电子基团结合, 最终形成硫醚氨酸排出体外, 在体内解毒功能上起重要作用^[2,3]。

胎盘型 GST (又称 GST_p) 为酸性蛋白质, pI4.8, 分子量 47000, 由两个亚基组成, 在正常成人肝中仅含少量^[4]。实验证明, 在大鼠增生性肝损害时胎盘型 GST 水平显著升高, 故可做为化学性肝癌的一种指标^[5,6]。

对于胎盘 GST 的提纯, Mannervik 等报道纯化约 477 倍^[7], Guthenberg 等报道纯化约 285 倍^[8], 但纯化步骤均较繁琐费时。Radulovic 等使用简单的高效液相方法将酶的纯化提高到 1342 倍^[9]。

本文试图建立一种不用高效液相层析, 但亦简便易行的提纯胎盘 GST 的方法。

一、方 法**1. 胎盘匀浆的制备及离心分离**

正常人足月胎盘去除羊膜, 预冷蒸馏水及 50 mmol/L Tris·HCl (pH7.4, 含 0.25 mol/L 蔗糖) 冲洗。称取适量胎盘组织, 加入 5 倍体积上述缓冲液制成匀浆, 12250g 离心 20min。上清再经 100000g 离心 1h。上清用于亲和层析。

2. 制备亲和胶

称环氧活化 Sepharose 6B 10g, 加 10ml 蒸馏水, 放置 2 小时, 蒸馏水及 44mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 淋洗。加上述液体 50ml, 真空抽气 5min。另称 GSH3g, 加 10ml 蒸馏水及 20ml 缓冲液, 以 1mol/L NaOH 调 pH7.0 后倒入胶液中, 37℃ 水浴缓慢震荡 36 小时。蒸馏水淋洗, 加 1mol/L 乙醇胺 70ml, 37℃ 稳定 4 小时。以蒸馏水、0.1mol/L 乙酸钠 (pH7.4, 含 0.5mol/L KCl)、0.1mol/L 硼酸钠 (pH8.0, 含 0.5mol/L KCl) 及 0.05mol/L Tris·HCl (pH7.4) 各 250ml 淋洗。

3. 亲和层析

0.05mol/L Tris·HCl (pH7.4) 平衡。超离心后上清液为样品。以 50mmol/L Tris·HCl (pH9.6, 含 10mmol/L GSH) 洗脱。测定酶活性及 280nm 吸光度, 收集酶活性峰。

4. DEAE 纤维素柱层析

以 DEAE 纤维素 52 柱层析代替 Radulovic 等方法^[9]中的高效液相层析。

5. 酶活测定

按 Bengt Mannervik^[7] 方法。以 CDNB (1-氯-2,4-二硝基苯) 为底物, 测定 30℃ 时 OD₃₄₀ 增长值。以每分钟产生 1μmol 产物为 1 个酶活单位。

6. 蛋白测定

按 Bradford 考马斯亮蓝染色法^[10]。

7. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按 Klaus Weber 方法, 采用垂直板凝胶电泳。

二、结 果

1. GST 的纯化 每一步骤纯化倍数见表 1。

表 1 人胎盘 GST 的纯化

步骤	比活(U/mg)	纯化倍数
超离心上清液	0.019	1
6B-GSH	0.89	47
DEAE	16.4	863.1

亲和层析及 DEAE 层析结果见图 1、图 2。

2. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 亲和层析后收集液在图谱中呈数条蛋白区带。DEAE 层析后收集液仅呈一条区带 (GST 两亚基分子量相等)。从以标准蛋白分子量对数值对迁移率所做标准曲线上测得其亚基分子量为 24000。

* 现通讯地址: 天津第二医学院中心实验室, 天津 300203。

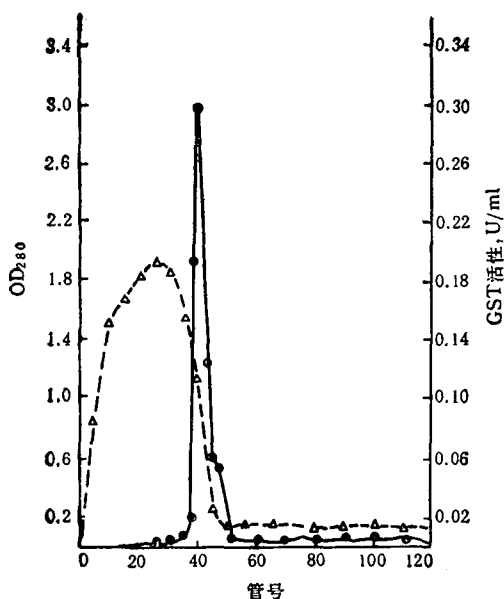


图1 人胎盘 GST 亲和层析图
—●—酶活性, —△—OD₂₈₀

三、讨 论

本文对胎盘 GST 纯化方法做了简化。将 6B-GSH 亲和层析提前至离心后第一步,以去除红细胞对 GST 的抑制作用^[9],并可去除大量杂蛋白。Radulovic 等报

表2 纯化人胎盘 GST 的两种方法比较

Mannervik 方法		本文方法	
步骤	纯化倍数	步骤	纯化倍数
1.超离心上清液	1.0	1.超离心上清液	1.0
2.Sephadex G-25	0.86	2.亲和层析	46.8
3.DEAE 层析	3.2	3.DEAE 层析	863.1
4.CM 层析	19.3		
5.亲和层析	353.6		
6.Sephadex G-75	477.2		

道,亲和洗脱液中加入 GSH 可保持 GST 活性。使用不含 GSH 的洗脱液, GST 回收率仅为 2.7%,加入 GSH 则回收率上升至 75%。而加入 DTT (二硫苏糖醇) 等巯基试剂可维持 GSH 的还原状态^[9]。本文在

(上接第 404 页)

算机学、医学和农学多学科的研究人员参加,学科之间相互渗透,研究人员相互配合,这也正是本学科能迅速发展,并很快取得一些阶段性成果的原因所在,尤其是年轻的研究生参加学术讨论,他们工作认真,思路敏捷,对新事物特别敏感,使学术讨论气氛活跃,交流特别深入。

发光分析应用研究毕竟是新的技术,还有许多理

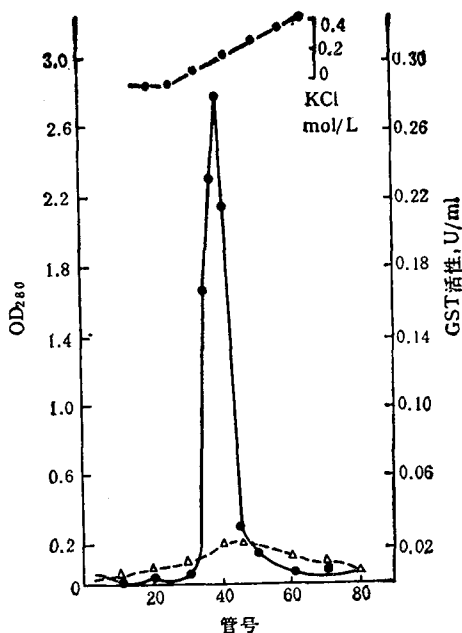


图2 人胎盘 GST 的 DEAE 纤维素柱层析图
—●—酶活性, —△—OD₂₈₀, ---电导率

DEAE 层析时亦注意到这一点。另外在梯度洗脱时,模仿高效液相法,快速加大 KCl 的浓度梯度,使酶活性峰更为集中,得到较好的纯化结果。

本文由刘建功、芦振敏同志协助离心,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Meister A et al. *Ann Rev Biochem*, 1983;52:711
- 2 Simmons D C et al. *Anal Biochem*, 1977; 82:334
- 3 Habig W H et al. *Method in Enzymology*, 1981; 77:28
- 4 Polidoro G. *Biochemical Pharmacology*, 1980; 129: 1681
- 5 Sato K et al. *Gann*, 1984; 75:149
- 6 Rushmore T H et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 143:98
- 7 Mannervik B et al. *Method in Enzymology*, 1981; 77:231
- 8 Guthenberg C. *Acta Chimica Scandinavia*, 1979; B33:595
- 9 Radulovic L L et al. *Biochem Biophys Commun*, 1985; 28:75
- 10 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72:248

[本文于 1989 年 8 月 3 日收到]

论问题没有搞清,影响因素也较多,许多代表反映,本技术不够稳定。会议就技术、试剂、仪器诸方面进行了深入讨论。

本次学术讨论会是成功的,许多代表纷纷要求加入主办的两个学会。根据代表们的要求,执委会决定两年以后将再度开会,作更广泛、更深入地讨论。

(胡天喜、陈纪)