

高效液相色谱分离人红细胞乳酸脱氢同工酶

李 晋 萍

(军事医学科学院 放射医学研究所, 北京)

P. Steffener

(发玛西亚公司 生物技术部, 瑞典乌布萨拉)

提 要

本文介绍选用经济易得的人红细胞作原料, 以高效液相色谱方法, 同时提纯了四个乳酸脱氢酶同工酶。

测定血清乳酸脱氢酶 (L-乳酸: NAD^+ 氧化还原酶, E. C1.1.1.27; LDH) 含量是一个临床常用的生化指标。但对于同工酶的测定, 目前还只能通过混合物的分析来进行, 如电泳分离后谱带的扫描及选择不同底物^[1]或变性某些同工酶^[2]来测定其它成份。由于各种 LDH 同工酶在不同器官中含量不同, 因此分别测定各种同工酶对于临床诊断是很有意义的。如测定 $\text{LDH}_1/\text{LDH}_2$ 比例有助于诊断溶血或心肌梗塞^[3,4]。虽然已经有不少色谱分离部份 LDH 同工酶的报道^[5,6], 但用高效液相色谱方法的报道甚少, 为此, 我们选用经济, 易得的人红细胞作为原料, 用高效液相色谱方法同时提纯了四个乳酸脱氢酶同工酶。

材料及方法

一、材料

正常人红细胞由瑞典乌布萨拉大学医院血库提供。快速蛋白液相色谱系统 (Fast Protein Liquid Chromatography FPLCTM)、快速电泳系统 (Phast SystemTM) 以及分子量标准蛋白质为 Pharmacia AB 产品; 其它化学试剂均为分析纯; 所有溶液用 MilliTMQ 纯水配制。

二、方法

1. 制备红细胞匀浆

除去血浆的红细胞用磷酸缓冲液 (0.15M

NaCl , 0.001M EDTA, 0.005M 磷酸, pH7.4) 洗三遍, 3,500 rpm 离心 15 分钟, 以洗去血浆蛋白质。然后加入三倍量溶胀液 (0.1mM 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, NADP; 0.001M EDTA; 0.1% β -巯基乙醇; 0.005M 磷酸, pH 7.4) 静置 15 分钟, 20,000rpm 离心 30 分钟, 除去细胞膜碎片, 上清液作为粗品贮存于 -70°C 备用。

2. 色谱

三步柱色谱的条件分别见图 2, 3, 均在室温 (25°C) 进行。

3. 电泳

按照产品说明书操作^[7]。所有样品为色谱分离后直接收集部份, 未经浓缩; 银染色的红细胞匀浆用蒸馏水 20 倍稀释。酶谱图参照文献 [8] 进行。反应液组成: 50mg 乳酸钙; 5mg NADP; 3mg 甲基噻唑四鎓 (MTT); 2mg 甲基硫酸吩嗪 (PMS) 溶于 10ml 0.2M pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 与 1% 琼脂糖凝胶溶液混合, 覆盖在电泳后的聚丙烯酰胺凝胶面上。

结果与讨论

本文最初旨在结合快速电泳与 FPLCTM 系统, 建立一个常用的蛋白质纯化过程。因此我们选用滴定曲线 (Titration Curve TC) 作为最初的估价 (图 1); 由滴定曲线所见, 主要成份血

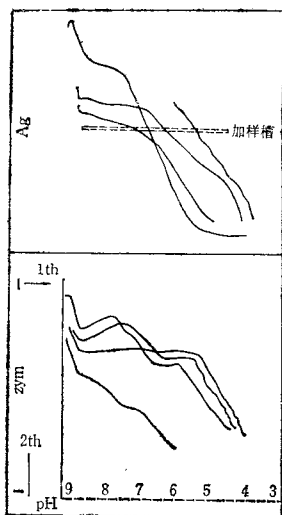


图 1 电泳滴定曲线

T₂C₃ 聚丙烯酰胺凝胶, 第一向: pH 梯度 3—9; 1,000V, 2.5 mA, 3.5W, 15°C, 100vh; 第二向: 1,000 V, 2.5mA, 0.2W, 50vh; 样品 3 μ l 红细胞浆, 上图为银染色, 下图为酶谱图; TC-第一向电泳不加样, 为产生 pH 的过程; 电泳结束后, 顺时针转 90° 凝胶, 切去正负两极处的凝胶, 加样进行第二向电泳。

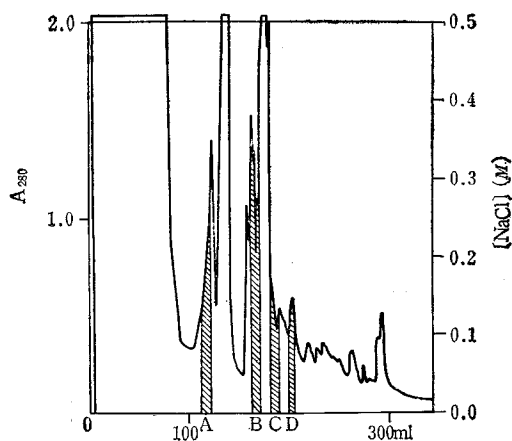


图 2 阴离子交换色谱

Mono Q HR10/10 柱, 柱高 10cm, 直径 10mm, 上样 80ml 红细胞匀浆, pH7.4, 0.02M Tris-HCl 缓冲液, 0—0.5M NaCl 线性浓度梯度洗脱, 阴影部份为第二步色谱样品。

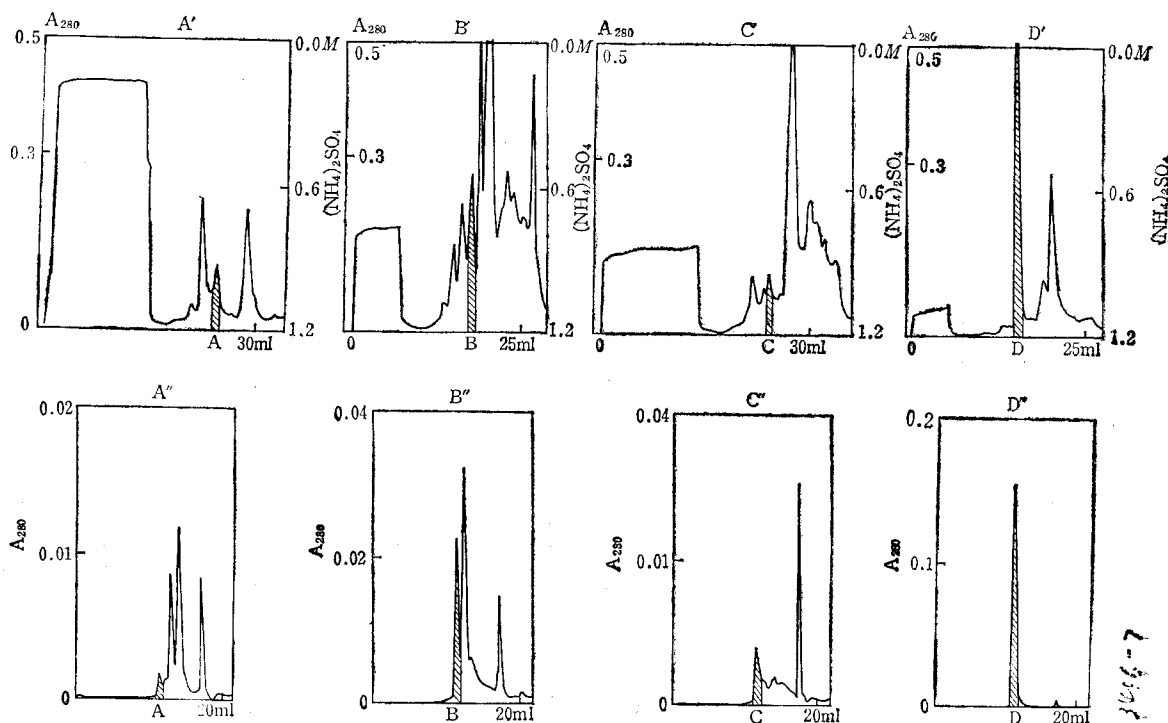


图 3 凝胶过滤色谱

A'B'C'D' 色谱条件: Phenyl-Superose HR 5/5 柱, 柱高 5cm, 直径 5mm, pH 7.4, 0.02M 磷酸缓冲液, 硫酸铵 1.2M—0.0M 线性梯度洗脱。(样品为第一步离子交换色谱的 A, B, C, D 部份。上样前用 3M 硫酸铵平衡至 1.2M, 体积 10ml); A''B''C''D'' 色谱条件: Superose 12HR10/30 柱, 柱高 30cm, 直径 10mm, 上样 200 μ l, pH 7.4, 0.05M 磷酸缓冲液洗脱, 图中 A, B, C, D 分别为 LDH₁, LDH₃, LDH₂, LDH₄。

红蛋白与 LDH 的等电点不同。在 pH 中性时,二者电荷差别最大(比较银染色与酶谱图)。同时又保证酶不失活。根据这个结果,我们选用阴离子交换色谱,用 pH7.4 缓冲液洗脱作为第一步分离方法。图 2 显示红细胞的主要成份——血红蛋白在梯度外洗脱,而 LDH 因带正电荷被吸附于柱上,分别于 7%, 26%, 35% 和 50% 盐梯度时洗脱出来,然后用聚丙烯酰胺 8—25% 梯度凝胶电泳 (PAGE) 分析,取酶活性最高的部份 A, B, C, D 分别作为 LDH₅, LDH₃, LDH₂, LDH₁ 的来源,进一步用 Phenyl-Superoose 疏水反应色谱提纯。由图 3 可见,绝大多数杂蛋白出现在梯度前,LDH 约在 50—60% 盐梯度处洗脱。根据 PAGE 分析,这一步除去了大部份杂蛋白,为了脱盐并得到更好的纯化,我们用 Superose 柱作为第三步色谱分离,得到提纯的 LDH 同工酶 LDH₅, LDH₃, LDH₂, LDH₁ (图 4)。图中可见,即使用灵敏度比考马斯亮蓝 R-250 染色高 50—100 倍的银染色,纯化蛋白均为一条谱带。过去的文献报道中,同时最多纯化三个同工酶^[5],而我们用同一原材料,在一个流程中得到四个同工酶。

用 PAGE 监测和估价每一个分离步骤,我们认为对于提取纯化蛋白质是一个非常必要的过程。它可以指导选择色谱方法与色谱条件,有利于及时发现色谱条件的优劣,有助于提示改进条件的方向。此外,以离子交换色谱和疏水反应作为前两步的优点是可以大量上样(样

品体积 10 倍于柱体积或更多),并有浓缩效应。最后用凝胶柱脱盐,虽然样品稀释了,但可以用冰冻干燥方法浓缩、干燥。

总的来说,用高效液相色谱大规模制备蛋白质正在崛起,根据我们的经验,除省时间外,对于一般温度不敏感的酶或蛋白质,可以在室温下操作,避开了要求冷室的条件;而对于一些温度敏感的物质,亦可因缩短操作时间而减少了变性。

虽然,此文仅为方法学的初步探讨,即提纯蛋白质的模式: 制备原材料→电泳(得到信息,选择色谱条件)→色谱(分离)→电泳(产品鉴定)。但是,鉴于 LDH 是不少疾病的特征酶,临床上又亟需标准品和质量控制品的出现。因而我们将继续此项工作,在保持纯度的前提下,提高回收率,放大规模,并试图得到微量成份 LDH₄。

参 考 文 献

- [1] Emerson, P. M. and Wilkinson, J. H.: *Br. J. Haematol*, **12**, 678, 1966.
- [2] Plummer, D. T., et al.: *Biochem J.*, **89**, 48, 1963.
- [3] Vasudevan, G., et al.: *Circulation*, **57**, 1055, 1978.
- [4] Leung, F. Y. and Henderson, A. R.: *Clin. Chem.*, **25**, 209, 1979.
- [5] Pridgar, E. M., et al.: *Clin. Chem.*, **30**(8), 1953, 1985.
- [6] Pettit, S., et al.: *Clinica Chimica Acta*, **100**, 59, 1980.
- [7] Pharmacia AB, Laboratory Separation Division, Phast System™ System Guide, 1986.
- [8] Harris, H. and Hopkins, D. A.: *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*, Holland, Amsterdam, 1976.

[本文于 1986 年 6 月 12 日收到]

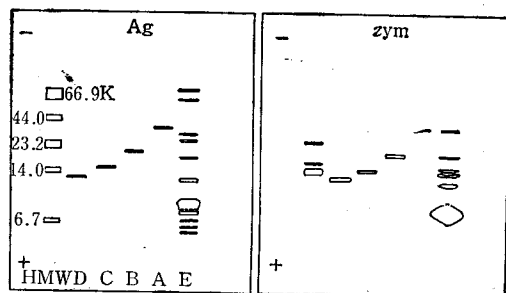


图 4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

8—25% 梯度胶, 电泳条件 400 V, 10mA, 2.5W, 15°C 280 Vh; 样品 HMW 为高分子量标准品(分子量从大到小为: 甲胎球蛋白, 铁蛋白, 触酶, 乳酸脱氢酶, 白蛋白) A, B, C, D 分别为 LDH₅, LDH₃, LDH₂, LDH₁; E-红细胞匀浆。