

凝胶柱层析测定半乳糖苷转移酶的简易方法

陈玲妹

Finn Wold

(上海医科大学法医学教研室)

(美国德克萨斯大学医学院生物化学与分子生物系)

提 要

半乳糖苷转移酶催化转移 UDP-半乳糖上的半乳糖苷到葡萄糖或乙酰氨基葡萄糖上,形成乳糖类化合物。本法采用一根 Bio-gel P-2 小玻璃柱 (0.3×45 cm) 可以将产物乳糖与底物清楚地分开,为该酶活性的测定提供了一个简便的精确的新方法。

半乳糖苷转移酶 (UDP-galactose; D-glucose-4- β -galactosyl Transferase, EC2.4.1.22) 能催化转移半乳糖苷到葡萄糖、乙酰氨基葡萄糖和复杂寡糖链的末端乙酰氨基葡萄糖残基上。该酶活性的测定,在实验室内有着广泛的应用。因为它是高尔基体的标记酶^[1,2];它出现在许多组织与体液中^[3-6];该酶的血清同功酶与某些类型的肿瘤有关^[7]。

目前测定该酶的方法有:(1)用高压电泳法将放射标记的底物 UDP-半乳糖与形成的放射产物分开^[2,8]。但底物的化学分解产物半乳糖与产物如乙酰氨基乳糖电泳时均停留在原点附近,干扰了测定结果。(2)用酶反应偶联的方法,根据 NAD 或 NADH 生成的多少来估计产物 UDP 的生成量^[9,10]。(3)用 HPLC 法将产物与底物分开,用紫外吸收测量 UDP 的生成量^[11]。在测定组织提取液或血清中该酶活性

时,后面两种方法都难以排除由其他酶催化生成或分解 UDP 反应的干扰。

本文采用 Bio-gel p-2 小玻璃柱 (0.3×45 厘米)凝胶柱层析,可以将放射标记的底物 UDP-半乳糖和产物乙酰氨基乳糖,以及副产物半乳糖 1, 2-环磷酸和半乳糖清楚地分开,根据放射标记的产物与底物的比例,可以准确地算出酶的活性。由于使用的设备、材料较简单,操作方便,因此更适合我国实验室内应用。

材 料 与 方 法

材料 UDP-D[U-¹⁴C] 半乳糖 (302 毫居里/毫克分子)(美国 New England Nuclear 公司产品) UDP-半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、半乳糖 1, 2 环磷酸、N-乙酰氨基乳糖、MES [2 (N-morpholino) ethanesulfonic acid]、去污剂 triton x-100、考马氏亮蓝 G-250 和 Bio-

法与一般 Southern 转移-杂交方法一样,小片段 DNA 的转移效率(与滤膜联结的效率)和杂交效果(一定程度还取决于同源性)相对较低,本实验中小于 190 bp 的 DNA 片段未能检测到。

参 考 文 献

[1] 程立等:上海医科大学学报,1986,13(2),91

- [2] Beveren, C. V. et al.: *RNA Tumor Virus*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., 1985, 567.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 109.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 383.

[本文于 1988 年 1 月 29 日收到]

gel P-2 (美国 Sigma 公司产品) Hydrofluor 闪烁液(美国 National Diagnostics 公司)。

柱的制备 在小玻璃管(0.3 × 45 厘米)内充以一半高度的洗脱剂,用针筒吸入 Bio-gel P-2 凝胶糊,接上一根细而硬的塑料管,插入玻璃管的液层下,慢慢推动针筒身挤出凝胶糊,待沉积层达 10 厘米左右,启开玻璃管下端的活塞,让溶液慢慢流出。然后不断地用针筒加入凝胶糊,硬塑管下端要靠近已沉下的柱层(可避免分层或不均匀),不断地从玻管上方吸出过剩的溶液,直至装满,即可得均匀且紧密度适宜的柱层。层析柱经洗脱剂平衡后即可使用。

膜的制备 正常大白鼠高尔基体的制备,按 Elting 法^[12]。正在生蛋的母鸡输卵管高尔基体的制备同上法。酵母中微粒体的制备按 Battaner 法^[13]。

蛋白质浓度的测定用 Sedmak 考马氏亮蓝法^[14]。

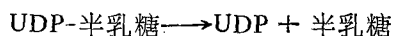
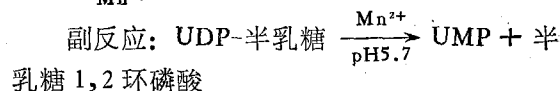
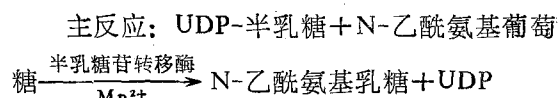
糖的测定按 Dubois 法^[15]。

酶活性测定 反应总体积为 50 微升,其中含有下列成分: 5.0 微克分子 MES 缓冲剂(pH 5.7), 3.0 微克分子 $MnCl_2$, 0.25 微升 triton X-100, 1.0 微克分子 N-乙酰氨基葡萄糖和 0.056 微克分子 UDP-半乳糖(2000cpm), 反应液与膜悬浮液在 37°C 预保温 5 分钟后,加入一定量高尔基体或微粒体制备液启动反应,于 37°C 保温半小时,加入 5 微升 2% (V/V) 四硼酸钠(含有 0.25 mol/L EDTA) 终止反应。吸出 20 微升反应后溶液加到 Bio-gel P-2 小玻璃柱上进行层析,用 0.1mol/L 醋酸钠(内含 0.2% 叠氮钠)洗脱,用部分分部收集仪收集流出液,控制流速 40 微升/分,收集体积 160 微升/管,共收集 45 管。在 18 管后,每管加入液体闪烁液(Hydrofluor) 2 毫升,在闪烁仪上进行计数测定(Backman 133 闪烁计数器)。酶活性可以直接根据¹⁴C 标记的产物 N-乙酰氨基乳糖占总计数的百分比求出。同时要做对照试验。在对照试验中,不加入外源性的 N-乙酰氨基葡萄糖,看有多少¹⁴C 标记的半乳糖合并到内源性的

N-乙酰氨基葡萄糖中生成产物。在计算酶活性时,要减去这个产物的百分数。

结果与讨论

产物、副产物与底物的分离与鉴定 本实验中,半乳糖苷转移酶催化反应产物是 N-乙酰氨基乳糖和 UDP。该酶在起作用时,需要有 Mn^{2+} 存在。但是 Mn^{2+} 可以促进 UDP-半乳糖水解为 UMP 和半乳糖 1,2 环磷酸。UDP-半乳糖也可以自动分解为半乳糖与 UDP。反应式如下:



放射标记的产物 N-乙酰氨基乳糖、副产物半乳糖 1,2 环磷酸和半乳糖以及底物 UDP-半乳糖在 Bio-gel P-2 柱层析中均能分开。见图 1。

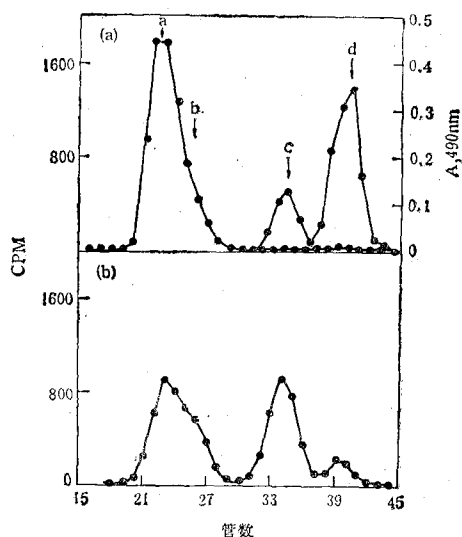


图 1 酶反应混合物层析图

a: UDP-半乳糖, b: 半乳糖 1,2 环磷酸, c: N-乙酰氨基乳糖, d: 半乳糖。(a) 对照试验 反应液中分别加入标准的半乳糖、N-乙酰氨基乳糖、半乳糖 1,2 环磷酸和放射标记的 UDP-半乳糖,其中无放射标记的半乳糖、N-乙酰氨基乳糖及半乳糖 1,2 环磷酸用硫酸—酚比色法定位^[17]。(b) 正常反应结束后反应混合物的层析图。层析条件见本文内容。

UDP-半乳糖的柱回收率为 93%。

酶活性的测定 用正常大白鼠肝细胞高尔基体作为半乳糖苷转移酶的来源,从图 2 中可以看出,至少在 50 分钟时间内,反应产物的生成量与时间成良好的线性关系。图 3 表明,至少在酶量有 10 倍差别的范围内,反应产物的生成量与酶浓度成正比。

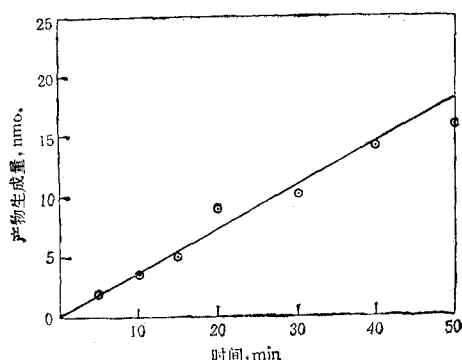


图 2 酶反应时间曲线图

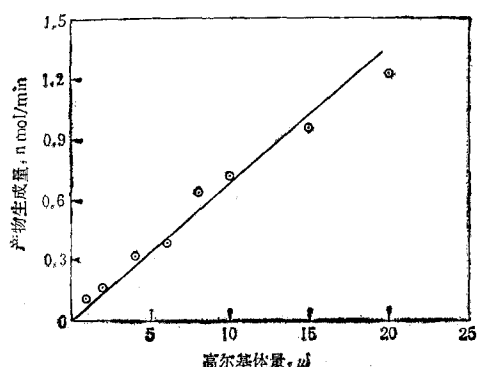


图 3 酶反应酶量曲线图

几种不同来源的半乳糖苷转移酶比活性的比较,利用本法比较了三种不同来源的半乳糖苷转移酶的比活性(表 1)。发现正常大白鼠肝细胞高尔基体中含的半乳糖苷转移酶比活性最高,比活性为 18.8 毫微克分子/(分钟·毫克蛋白质),是鸡输卵管细胞高尔基体的 16 倍。至于在酵母中没有发现该酶的活性。在酵母中至

表 1 三种不同来源的半乳糖苷转移酶的比活性

酶来源	酶浓度 mg 蛋白质/ml	比活性 ng/(min·mg 蛋白质)
正常大白鼠高尔基体	3.6	18.8
正在生蛋的鸡输卵管高尔基体	5.4	1.2
酵母微粒体	7.6	0

今未发现杂交型或复杂型的糖蛋白,普遍认为这与酵母中缺乏该酶有关^[16]。

在组织提取液或血清中,常含有碱性磷酸酶^[17]。它水解 UDP-半乳糖为 UMP 和半乳糖-1-磷酸。但半乳糖-1-磷酸在层析柱中的位置与半乳糖 1,2 环磷酸相同,因此该酶的存在对本法无干扰作用。

参 考 文 献

- [1] Shao, M-C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 2968.
- [2] Williams, D. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 5105.
- [3] Rao, A. K. et al.: *Biochemistry*, 1976, **15**, 5001.
- [4] Liu, C-K. et al.: *Enzyme.*, 1982, **28**, 258—267.
- [5] Lau, J. T. Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 7142.
- [6] Fujita-Yamaguchi, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 2701.
- [7] Weiser, M. M. et al.: *In The Glycoconjugates* (Horowitz, M., ed.), 1982, **4**, 301—333.
- [8] Babad, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 2672.
- [9] Morrison, J. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1970, **246**, 3977.
- [10] Fitzgerald, D. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 2103.
- [11] Hymes, A. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 1984, **139**, 68.
- [12] Elting, J. J. et al.: *Methods in Enzymology*, 1983, **83**, 416.
- [13] Battaner, E. et al.: *Methods in Enzymology*, 1976, **46**, 446.
- [14] Sedmak, I. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 1977, **79**, 544.
- [15] Dobojs, M. et al.: *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 350.
- [16] Wold, F. et al.: *FASEB J.* 1988, in press.
- [17] Garcia-Rozas, C. et al.: *J. Immunol.*, 1982, **129**, 52.

[本文于 1988 年 2 月 4 日收到]