

人红血球膜乙酰胆碱酯酶提纯的初步探讨

潘华珍 胡咏梅

(中国医学科学院基础医学研究所分子生物学生物化学研究室)

人的乙酰胆碱酯酶按其作用物及来源分为两大类：一类存在于人的红血球膜、神经末梢、肺、脾及大脑灰质，对乙酰胆碱水解作用最强；一类存在于肝、胰、心以及大脑白质和血清中，对丁酰胆碱水解作用最强。前者称 I 型乙酰胆碱酯酶(简称 AChE)。后者称 II 型乙酰胆碱酯酶，又称丁酰胆碱酯酶(Buch E)。为了研究针麻原理的神经介质作用，需要提取 I 型乙酰胆碱酯酶。本文探讨人红血球膜 AChE 的提纯工作。

人的红血球膜乙酰胆碱酯酶是以膜的固有结构而存在于膜上，故提纯困难。应用有机溶剂或酶解法提取均不够满意。G. Ciliv^[1]等应用 Triton X-100 提取膜酶得到较满意的效果。我们参照 G. Ciliv 等的方法，根据自己的工作条件，提取人红血球膜 AChE，在纯度上取得较好的结果。

1. 实验条件和操作方法

实验条件 除个别操作在室温或 37℃ 进行外，其它在 3℃ 条件下进行。

试剂全部用分析纯，并用无离子水配制。仪器经洗净后再用无离子水洗。用离子交换树脂制得的无离子水，经水质纯度测定计测定，纯度为 99.5%。

全血来自首都医院血库，健康人新鲜采血。

操作方法 新鲜全血于 3℃ 低速离心 2,000 rpm 20 分钟，取沉淀的红血球(注意不能溶血)，用生理盐水洗 4 次(注意吸去上边的一层白血球)，然后将血球一滴滴加入 9 倍于血球体积的 $5 \times 10^{-3}M$ 的柠檬酸缓冲液(pH 6.6)，同时电磁搅拌，使血球裂成碎片。以上操作在 3℃ 冰箱内进行，并放冰箱过夜(注意控制温度；搅拌

速度要与滴入的血球速度相协调)。第二天离心 17,000g, 3℃, 30 分钟，弃去上液，碎片用 $5 \times 10^{-3}M$ 柠檬酸缓冲液(pH 6.6)洗，直至上清液呈浅粉色，沉淀为白色絮状为止(一般需 6—8 次)。所得白色絮状沉淀物可保存三个月。在沉淀物内加入含有 0.5% Triton X-100 的 $5 \times 10^{-3}M$ 柠檬酸缓冲液(pH 6.6)提取酶，振荡保温 37℃, 4 小时。最后上清液呈浅亮黄色，有极少量红色沉淀，离心 17,000g, 3℃, 30 分钟，收集上清液备用。

上清液再用 DEAE-纤维素柱(1.7 厘米 × 30 厘米)分离。柱先用 $5 \times 10^{-3}M$ 柠檬酸缓冲液(内含 0.5% Triton X-100 pH 6.6)平衡，流速 2 毫升/分，15 毫升收集一管，加酶液后先用以上缓冲液洗，每管测蛋白含量及酶活性。当收集管测不出蛋白含量后，改用 $5 \times 10^{-2}M$ 柠檬酸缓冲液(pH 6.6)，内含 0.5% Triton X-100)洗脱酶液。

收集酶活性高的管内溶液，对 $5 \times 10^{-3}M$ 磷酸缓冲液(pH 6.6 内含 0.5% Triton X-100)透析 20 小时。

透析后溶液再用磷酸钙纤维素柱(1.7 厘米 × 21 厘米)分离。柱是参照 Masahiko Roika 等人^[2]的方法自己制备的。磷酸钙纤维素柱先用 $5 \times 10^{-3}M$ 磷酸缓冲液(pH 6.6 内含 0.5% Triton)平衡，流速 10 毫升/小时，每 10 毫升收集一管，每管测蛋白含量及酶活性。加酶液后用同样缓冲液洗脱。以上在室温操作。测酶活性用羟胺显色法^[3]。

收集酶活性高的管，立即冷冻干燥，然后用甲苯洗三次(0℃, 5 分钟)，除去 Triton X-100，迅速用真空抽去甲苯，即得酶制剂。

经层析柱分离提纯后的酶蛋白,加牛清蛋白至每毫升酶液含2毫克,冷冻干燥后放低温-20℃冰箱保存。

2. 结果和讨论

酶液经 DEAE-纤维素柱分离后结果见图1。与 G. Ciliv 的结果比较,非酶蛋白质含量较高,是第一步提取膜时,有部分血红蛋白未提净。酶液经磷酸钙纤维素柱后结果见图2,与 G. Ciliv 的结果比较,所收集的酶活性管范围较窄,最后所得酶活性为600单位(微克分子底物/毫克蛋白/小时)。

所得酶制剂用紫外吸收光谱可见266毫微米有高峰, A_{260} 毫微米/ A_{280} 毫微米=0.77<1,与 G. Ciliv 观察一致。

将酶制剂用 K. Takayama 等人聚丙烯酰胺电泳法鉴定,酶蛋白在电泳前溶于冰醋酸:酚:水(1:2:1 V/W/V),酶蛋白浓度调至10微克/微升,固体尿素加到最后浓度为2M,分离凝胶也加有冰醋酸、尿素,其上用75%醋酸覆盖。电泳结果用氨基黑染色,在凝胶柱内可见一条清晰的蓝色区带(图3)。结果与 G. Ciliv 相符合。

3. 总结

本文报告了参照 G. Ciliv 的方法,按本室的工作条件,建立了用 Triton X-100 提纯人红血球膜乙酰胆碱酯酶的方法。酶活性为600单位。紫外吸收光谱用 Takayama 等人聚丙烯酰胺电泳方法鉴定结果与 G. Ciliv 相符合。

经层析柱分离提纯后的 AChE 加少量牛清蛋白,冷冻干燥低温保存,活性可维持一年之久。

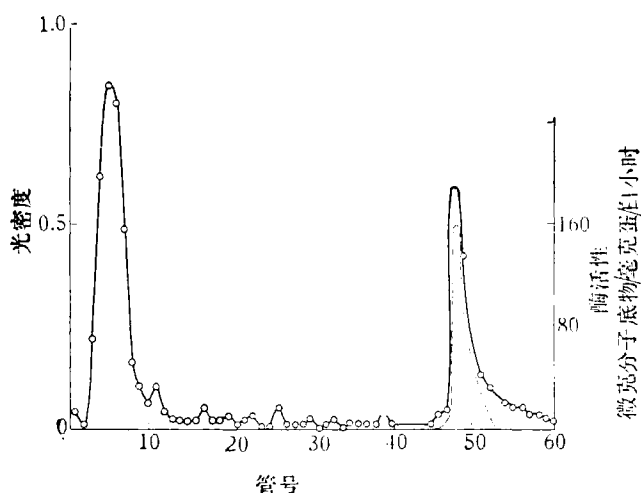


图1 DEAE-纤维素柱分离图谱

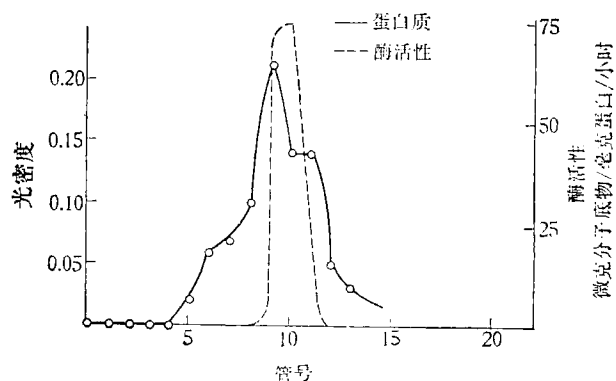


图2 磷酸钙纤维素分离图谱

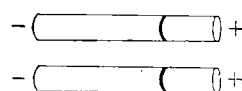


图3 乙酰胆碱酯酶聚丙烯酰胺电泳图谱

参考文献

- [1] Ciliv, G. and Özand, P. T.: *Biochem. Biophys. Acta*, **284**, 136, 1972.
- [2] Masahiko Roika and Minoru Hamada: *Methods in Enzymology*, **22**, 339, 1971.
- [3] Huerga, De. la. et al.: *Am. J. Clin. Path.*, **12**, 1126, 1952.

[本文于1979年2月16日收到]

(上接第58页)

参考文献

- [1] Deutscher, M. P.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 450, 1972.
- [2] Sternbach, H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **22**, 166,

- 1971.
- [3] Miller, J. P., Philipps, G. R.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1274, 1971.
- [4] Williams, K. R.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 5589, 1977.

[本文于1979年5月29日收到]