

辣根皮过氧化物酶同功酶的分离和鉴定

黄天钧 陈立群 陆应钰 连少辉

(中国科学院生物化学研究所)

辣根过氧化物酶商品制剂中同功酶的种类和相对含量常因制备方法而异。如 Shannon 等^[1]报道从辣根汁的硫酸铵沉淀物中分离出七种同功酶。以后 Paul 等^[2]从辣根皮中分离出四种同功酶。Sigma 公司生产的过氧化物酶含二种同功酶。最近陆应钰等^[3]从辣根皮制备过氧化物酶,其 RZ 值达三。但同功酶组成不详。

近期关于过氧化物酶结构功能方面的研究均以单一的同功酶为材料。同时,过氧化物酶作为一种标记酶,随着“酶标记免疫吸附技术”的发展,在临床诊断及其它方面的应用日益广泛。此外过氧化物酶又被引入作为观察蛋白质和生物膜表面结构的“探针”,为研究生物大分子的结构提供了一项新技术。用于以上这些测试技术的过氧化物酶制剂可能因其中同功酶的种类和相对含量的差异而对测试结果有所影响。本文参照 Shannon 等报道的方法^[1]对此过氧化物酶制剂的同功酶组成进行了分离和鉴定。

方法和结果

1. 羧甲基纤维素柱层析分离同功酶

取辣根皮过氧化物酶 300 mg (中国科学院生化所附属东风生化试剂厂生产)溶于小体积透析缓冲液后,对 0.005M pH4.6 醋酸铵缓冲液透析,平衡过夜。羧甲基纤维素(CM-70)按 Peterson 和 Sober 法处理^[5],以同一缓冲液平衡装柱(25 × 200mm)。酶液上柱后,先用此缓冲液洗脱,洗下的淡红色色带,通过蛋白检测器后,用部分收集器收集,此部分称为 A 组分。换浓度梯度洗脱液(500ml 0.005 M pH4.6 醋酸铵缓冲液对 500ml 0.1M pH4.6 醋酸铵缓冲液),对柱上吸附的酶蛋白进行线性梯度洗脱,并收集之。在

蛋白检测仪上描绘出两个酶蛋白峰,分别称为 B 组分和 C 组分。此时,柱上吸附的酶蛋白的红棕色已甚微弱,换梯度洗脱液(300ml 0.1M pH 4.6 醋酸铵缓冲液对 300ml 0.25M pH4.9 醋酸铵缓冲液)进行线性梯度洗脱,未曾检测到酶蛋白的峰。再依次用 30 mM 磷酸缓冲液(pH 7.3)和 50 mM 磷酸氢二钠洗脱,仅在 30 mM 处检测到酶活性小峰。柱上残留的色带可用 1.5% 氨水洗下,结果见图 1。酶活性单位的测定按 Bergmeyer 方法^[6]。

分别收集 B 组分和 C 组分,对 0.005 M pH 4.6 醋酸铵缓冲液透析,平衡过夜后上柱吸附。B 组分吸附在 29 × 200 mM CM-70 纤维素柱上,以浓度梯度洗脱液(500ml 0.005 M pH4.6 醋酸铵缓冲液对 500 ml 0.1 M pH 4.6 醋酸铵缓冲

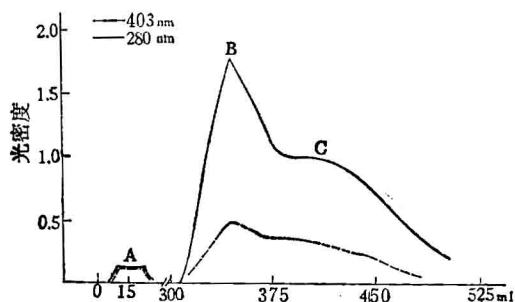


图 1 辣根皮过氧化物酶 CM-70 柱分离图谱

液)在 CM-70 纤维素柱上,进行反复的层析,直到 B 组分和 C 组分完全分开。C 组分吸附在 25 × 120 mm CM-70 纤维素柱上,以相同浓度梯度洗脱液进行线性梯度洗脱,经 4 次层析, C 组分与 B 组分完全分开,层析结果见图 2。

分别收集经 4 次层析后的 B, C 组分,用离子交换水透析,透析袋在冷室用风扇吹浓,冷冻干燥。B 组分和 C 组分经多次层析其 RZ 值无明显降低。

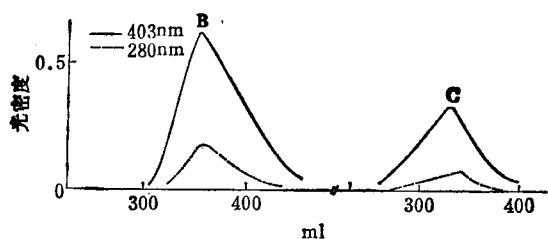


图2 辣根皮过氧化物酶 B 组分和 C 组分在 CM-70 纤维素柱上第四次层析分离图谱

2. 同功酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

A 组分的聚丙烯酰胺凝胶电泳参照 Davis 方法^[7], 采用高 pH 系统。凝胶浓度 5% (Acr: Bis = 37:1), 电流强度 2mA/管。按 Lewis 和 Williams 方法 B 组分和 C 组分的电泳采用低 pH 系统^[8]。凝胶浓度 5.6% (Acr: Bis = 37:1), 电流强度 4mA/管。考孟斯亮兰 R_{250} 染色按 Lawrence 法^[9]。过氧化物酶活性染色方法, 浸电泳后的凝胶于含有 0.01 M 邻联二茴香胺 (O-dianisidine) 的 0.005M 磷酸缓冲液中, 并加入 H_2O_2 使最终浓度为 0.01 M。过氧化物酶的糖蛋白染色^[10], 凝胶取出后, 依次浸泡于下列试剂中: (1) 25% 异丙醇 10% 冰醋酸过夜, (2) 0.5% 高碘酸二小时, (3) 0.5% 亚砷酸钠 5% 冰醋酸 30 分钟至 60 分钟, (4) 0.1% 亚砷酸钠 5% 冰醋酸 20 分钟, 并重复 (4) 一次, (5) 10% 冰醋酸 10 分钟至 20 分钟, (6) 10 ml Schiff 试剂过夜, (7) 0.1 N 偏重亚硫酸钠 0.01 N HCl 浸泡数小时, 反复几次, 直

到溶液无红色, 再加入甲醛。酸性同功酶 A 和碱性同功酶 B、C 的凝胶电泳图谱见图 3 (见图版 II)。它们在各种染色方法中呈现单一色带, 都有酶活性。都是糖蛋白。

以上实验结果表明: 分离的三个同功酶组份在上述检验方法中是均一的。采用 Shannon 等^[1] 报道的相同层析条件和同一命名法, 表明此酶制剂中没有 D、E 组份, A 组份含量极微, 主要是 B、C 二个同功酶组份, 但 B 组份多于 C 组份。同功酶 A 组份在凝胶电泳图谱中只呈现单一色带, 不如 Shannon 报道那样出现 A_1 、 A_2 、 A_3 组份。

参 考 文 献

- [1] Shannon, L. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 9, 2166, 1966.
- [2] Poul, K. G. et al.: *Acta Chemica Scandinavica*, **24**, 3607, 1970.
- [3] 陆应钰等:《生化通讯》, 1980 年, 第 5 期, 第 80 页。
- [4] Marrison, M. et al.: *Annual Review of Biochemistry*, **46**, 861, 1977.
- [5] Paterson, E. A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 75, 1956.
- [6] H. V.: Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, **1**, 495, 1974.
- [7] Davis, B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964.
- [8] Reisfld, R. A. et al.: *Nature*, **195**, 281, 1962.
- [9] Lawrence, B. Soh Schwartz et al.: *J. B. C.*, **249**, 5898, 1974.
- [10] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, **10**, 2606, 1971.

[本文于 1980 年 11 月 5 日收到]

介绍一个简易的多用途电泳装置

张友堃 王 祁 杨太兴*

(北京六一仪器厂) (中国科学院遗传研究所)

自 1955 年 Smithies 用卧式平板淀粉凝胶装置分析人血清蛋白质以后^[5], Davis 等 (1964) 又用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分析血清蛋白, 建立了“Disc”电泳^[6]。此后各式各样的电泳装置陆续问世^[2,3,4,5,7,8,9], 有关专著也相继出现^[1,8]。目前, 电泳技术应用十分广泛, 电泳装置种类繁多, 总括起来分为两大类——垂直式和卧式。垂

直式又分为板状和管状 (包括环形管状) 两种, 卧式也可分为板状和管状两种。此外, 又衍生出若干电泳装置和电泳技术。但是, 以上单用途电泳装置难以满足多种电泳要求, 而外国同类产品, 价格又较昂贵。因此, 我们参考 Smithies^[5],

* 邵勤田同志拍摄照片, 谨此致谢

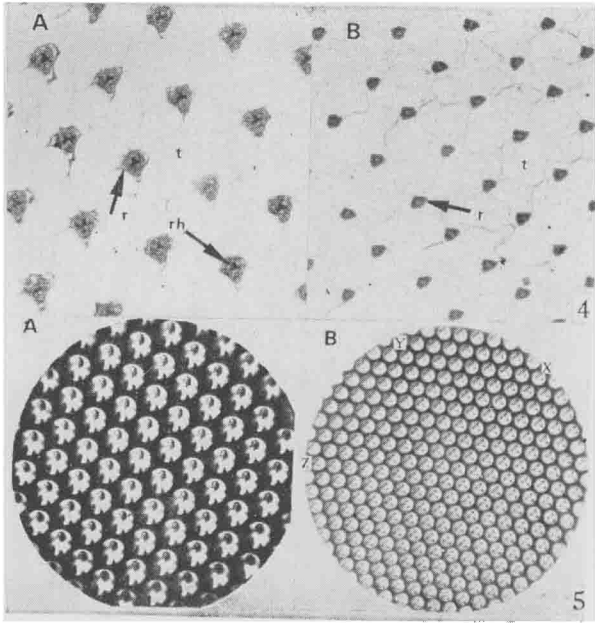
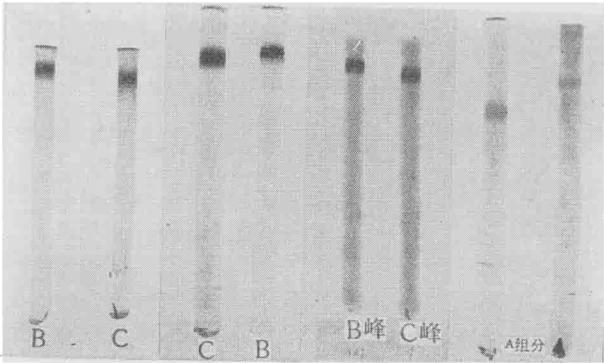


图 4 黄蜻复眼部分小眼网膜的横切面($\times 360$)

A——背区 B——腹区 r——小网膜细胞 t——气管 rh——感杆束

图 5 A——黄蜻复眼部分小眼角膜晶体形成的小倒像($\times 100$)

B——黄蜻复眼部分小眼角膜晶体成像的视差 $\times 50$ (X、Y、Z 表示复眼小眼面排列的三个轴)



考孟氏兰 R_{250} 酶活性染色 糖蛋白染色 schiff 考孟氏
试剂染色 孟氏兰染色

图 3 同工酶 A、B、C 聚丙烯酰胺凝胶电泳的各种染色图谱