

三嗪染料琼脂糖分离除去 α -甘油磷酸脱氢酶制剂中的磷酸果糖激酶*

李 林 潘济文** 许根俊

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

采用三嗪染料琼脂糖凝胶柱层析的方法,完全除去了混杂在 α -甘油磷酸脱氢酶制剂中的磷酸果糖激酶,并进一步纯化了 α -甘油磷酸脱氢酶。

在用酶偶联法测定某些酶的活性时, α -甘油磷酸脱氢酶是一个重要的工具酶,常用它来测定磷酸果糖激酶^[1],醛缩酶^[2]以及焦磷酸:果糖-6-磷酸,1-磷酸转移酶^[3]的活性。我们在用它来测定研究磷酸果糖激酶-2时发现如果 α -甘油磷酸脱氢酶中含有少量的磷酸果糖激酶就会对测定有较大的干扰。为了去除 α -甘油磷酸脱氢酶制剂中的磷酸果糖激酶,本实验比较了几种不同的染料琼脂糖凝胶柱层析的方法,得到了满意的结果。

材料与 方法

α -甘油磷酸脱氢酶粗制品,上海东风生化试剂厂提供; F6P, Bohringer 公司产品; FDP, Sigma 公司产品; 磷酸甘油醛异构酶, Bohringer 公司产品; 醛缩酶、ATP、NADH, 上海东风生化试剂厂产品; 红色、蓝色三嗪染料, 上海染化八厂提供; Cibacron Blue 3G-A, Fluka 产品; Sepharose 4B, Pharmacia 公司产品。

红色三嗪染料-Sepharose 4B, 蓝色三嗪染料-Sepharose 4B 和 Cibacron Blue 3G-A Sepharose 4B 分别用三种染料与 Sepharose 4B 交联制得^[4]。

α -甘油磷酸脱氢酶的进一步纯化: 三根层析柱分别装有红色三嗪染料-Sepharose 4B, 蓝色三嗪染料-Sepharose 4B 和 Cibacron Blue 3G-A Sepharose 4B(各 $1.0 \times 1.5\text{cm}$), 用缓冲

液(20mmol/L Tris-HCl, pH7.3, 0.5mmol/L EDTA, 5mmol/L 巯基乙醇)平衡。取 α -甘油磷酸脱氢酶制剂对该缓冲液充分透析后,等量上三根层析柱,用上述缓冲液 10ml 洗柱后,用 1mol/L KCl 洗脱,收集洗出的蛋白。

α -甘油磷酸脱氢酶的活性测定: 测定液总体积 1ml, 包括 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L FDP, 0.2mmol/L NADH, 醛缩酶 50 μg , 磷酸甘油醛异构酶 1 μg 。10 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟后,加入 α -甘油磷酸脱氢酶开始反应。测定 340nm 光吸收值的改变。定义 1 单位酶为每分钟变化 6.2 光吸收值的酶量。

磷酸果糖激酶的活性测定: 反应系统含有: 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L F6P, 0.5mmol/L ATP, 0.2mmol/L NADH, 醛缩酶 50 μg , 磷酸甘油醛异构酶 1 μg , α -甘油磷酸脱氢酶 (Sigma 公司产品) 10 μg 及磷酸果糖激酶液, 总体积 1ml, 反应在 10 $^{\circ}\text{C}$ 进行。1 个活力单位定为该条件下每分钟 340nm 光吸收值变化 12.4 的酶量。

蛋白质定量方法: 采用考马斯亮蓝方法^[5], 以牛血清白蛋白为标准。

* 中国科学院科学基金资助的课题

** 武汉大学生物系

本文简写如下: F6P, 果糖-6-磷酸; FDP, 果糖-1,6-二磷酸; NADH, 还原型辅酶 I。

结果与讨论

表 1 给出三种活性染料的琼脂糖凝胶分离 α -甘油磷酸脱氢酶的情况。分离前, 磷酸果糖激酶的比活性为 0.05U/mg 蛋白, 经过三种染料琼脂糖凝胶中的任一种分离后, 均可将磷酸果糖激酶完全除去。



图 1 经红色染料-Sephrose 柱层析分离后的 α -甘油磷酸脱氢酶的 SDS 聚丙烯酰胺电泳图谱

比较三种染料的分离情况, 从 α -甘油磷酸脱氢酶的纯化效果看, 红色三嗪染料比较好。

图 1 为经红色三嗪染料-Sephrose 4B 柱层析分离后的 α -甘油磷酸脱氢酶的 SDS 聚丙烯酰胺电泳图谱。

本方法的优点是快速简便, 磷酸果糖激酶去除完全。

表 1 三嗪染料琼脂糖分离 α -甘油磷酸脱氢酶

	蛋白 (mg)	活力 (U)	比活力 (U/mg)	回收 (%)
分离前	0.65	26	40	100
经红色三嗪染料 Sepharose 4B 分离后	0.33	19	58	73
经蓝色三嗪染料 Sepharose 4B 分离后	0.50	20	40	77
Cibacron Blue 3G-A Sepharose 4B 分离后	0.42	20	48	77

参 考 文 献

- [1] Pilkis, S. J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, 215, 379.
- [2] Gracy, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 3913.
- [3] Van Schaftingen, E. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1982, 129, 191.
- [4] Dean, P. D. G. et al.: *J. Chromatogr.*, 1979, 165, 301.
- [5] Bradford, M. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.

[本文于 1987 年 5 月 18 日收到]

(上接第 160 页)

结果表明: 250mT 磁场强度的磁处理水有延缓凝血酶元时间和降低血小板聚集的作用, 这可能是磁处理水增加了血小板表面电荷所致。有人报道,^[3] 磁处理水可以保护血管内皮细胞免受损伤。因此, 被认为有预防血栓形成的作用。

本实验结果提示: 一定磁场强度的磁处理水, 可以提高大白鼠体内的红细胞和血小板表面电荷, 因而可能有预防血栓形成的作用, 这将为红细胞聚集或早

期血栓的病人提供新的治疗途径, 但目前机理尚不清楚, 如果用于临床还需进行深入广泛的研究。

参 考 文 献

- [1] 施永德: 《生物化学与生物物理进展》, 1983, 6, 16.
- [2] Jan, K.: *Biorheology*, 1979, 16, 137.
- [3] 潘文干等: 《生物化学与生物物理进展》1987, 1, 39.

[本文于 1987 年 5 月 18 日收到]