

经验交流

辅酶 II-亲和胶的制备和应用*

蔡望伟** 凌光鑫 陈历昌

(湛江医学院生化教研室,湛江 524023) (海南医学院生化教研室,海口 570005)

关键词 亲和胶,亲和层析,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

亲和层析是一种特异性较高的分离纯化方法,目前已广泛应用于多种生物物质的分离纯化。NADP 是生物体内许多酶的辅酶,是一种很好的亲和配基。因此,将 NADP 结合到不溶性介质上,可得到一种分离纯化有关酶及蛋白质的亲和胶。本文介绍 NADP-Sepharose 4B 胶的合成方法及其应用。

材料和方法

1. 材料

Sepharose 4B、溴化氰 (CNBr)、葡萄糖-6-磷酸 (G6P)、辅酶 II (NADP) 为 Sigma 产品;丁二酸二乙酯(化学纯)为上海化学试剂采购供应站分装;水合肼(50%,化学纯)为上海化学试剂分装站分装;高碘酸钠(分析纯)为北京化工厂产品;其它试剂为国产分析纯产品。

2. 方法

2.1 NADP-Sepharose 4B 胶的合成 按 Lamid 等方法^[1]进行。

2.1.1 丁二酸二酰肼的合成 50 ml 丁二酸二乙酯、200ml 50% 水合肼和 100ml 无水乙醇混合,沸水浴中回流 3h,冷却后析出丁二酸二酰肼结晶。用水-乙醇溶液将结晶物重结晶 3 次。

2.1.2 Sepharose 4B 胶的活化 取 Sepharose 4B 胶 50ml,倒入玻璃垂熔漏斗中,抽干,用预冷双蒸水充分抽洗。将胶倒入 250ml 容积的烧杯中,加入 50ml 双蒸水,置电磁搅拌器上不断搅拌,加入 10g CNBr 进行活化,间断加入 5mol/L NaOH 溶液和碎冰块维持反应 pH11 和温度 $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 。当反应 pH 趋于恒定时,加入大量冰块将反应温度迅速降至 4°C 以下,立即抽干,依次用双蒸水和 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 各 500ml 抽洗。

2.1.3 丁二酸二酰肼-Sepharose 4B 胶的合成 将活化的 Sepharose 4B 胶与 50ml 10% 丁二酸二酰

肼-0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.5) 混合, 4°C 下搅拌过夜。抽干,依次用双蒸水和 0.1mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH5.0) 各 500ml 抽洗。

2.1.4 NADP 的氧化及与丁二酸二酰肼-Sepharose 4B 胶偶联 190mg NADP, 用 2.5ml 双蒸水溶解,用 0.1mol/L NaOH 调 pH 至中性,加水至 10ml,然后加入 48mg 高碘酸钠,混匀, 0°C 暗处反应 1h,倒入丁二酸二酰肼-Sepharose 4B 胶中, 4°C 下搅拌 3h,再加入 340ml 2mol/L NaCl 溶液,继续搅拌 30min,抽干,用双蒸水洗涤。测定偶联前 NADP 溶液及偶联后抽洗液在 260nm 波长处的吸光度。根据 NADP 在 260nm 波长处的克分子消光系数计算 NADP 含量。NADP 结合率用差数法计算。

2.2 蛋白质含量测定 用考马斯亮蓝结合法^[2],以牛血清白蛋白作标准。

2.3 人红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(简称 G6PD)的分离纯化 根据 Craney 等的方法^[3]稍加修改。纯化过程在 4°C 下进行,所有溶液均含有 1mmol/L EDTA、0.1% 巯基乙醇、1mmol/L 6-氨基己酸。

人全血 (ACD 抗凝) 450ml, 4°C 下离心,吸去血浆及白细胞层,用 4 倍体积 0.9% NaCl 溶液洗涤红细胞,离心,吸去上清液,重复 4 次,加入 4 倍体积溶血溶液(含 1mmol/L EDTA、0.1% 巯基乙醇、1mmol/L 6-氨基己酸)和少量甲苯 (5ml 甲苯 100ml 溶血溶液)溶血,离心,吸取溶血液。

用 1mmol/L EDTA-0.1% 巯基乙醇-1mmol/L 6-氨基己酸溶液平衡 NADP-Sepharose 4B 胶,将胶倒入溶血液中,经常搅拌,吸附 1h,用布氏漏斗抽滤,先后用 1mmol/L EDTA-0.1% 巯基乙醇-1mmol/L

* 国家自然科学基金资助课题。

** 湛江医学院生化教研室硕士研究生,现在海南医学院生化教研室工作。

6-氨基己酸溶液和 0.3mol/L KCl-0.02mol/L Na-H₂PO₄ 溶液各 1 000ml 洗涤 NADP-Sepharose 4B 胶,再用 0.6mol/L NaCl-10μmol/L NADP-0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH9.0) 300ml 洗脱 G6PD,再将洗脱的 G6PD 经 DEAE-Sepharose A50 柱层析和 Sephadex G200 柱层析进一步纯化。

2.4 酶活性测定按赵剑等方法^[4]进行; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Laemmili 等方法^[5]进行。

结果和讨论

合成 NADP-Sepharose 4B 胶时加入的 NADP 总量为 219μmol, 未结合的 NADP 量为 77μmol, NADP 结合率为 65%。

从 450ml 正常人全血, 制备 600ml 溶血液, G6PD 总活性为 222IU, 总蛋白质为 30000mg, 比活性为 0.0074IU/mg。经 NADP-Sepharose 4B 胶层析

后,获得 G6PD 总活性为 192IU, 总蛋白质 12mg, 比活性为 16IU/mg, 回收率 87%, 纯化了 2 162 倍, 再经 DEAE-Sephadex A50 柱层析和 Sephadex G200 柱层析后,获得 G6PD 总活性 135IU, 总蛋白质 0.83 mg, 比活性为 163IU/mg, 回收率 60%, 纯化了 22 027 倍, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳为单一带(见图 1)。

结果表明, NADP 已结合到了二酸二酰肼-Sepharose 4B 胶上, 结合率为 65%。合成的 NADP-Sepharose 4B 胶能较牢固地吸附人红细胞 G6PD, 一步可除去绝大部分蛋白质, 纯化了两千多倍, 回收率高达 87%, 再经 DEAE-Sephadex A50 柱层析和 Sephadex G200 柱层析后, 可得到电泳纯的 G6PD。应用 NADP-亲和胶纯化人红细胞 G6PD 是一种快速有效的方法^[3,6], 所需时间明显短于离子交换法^[7-11], 有利于纯化一些酶活性低的 G6PD 变异型及研究 G6PD 变异的分子基础。

NADP 不仅是 G6PD 的辅酶, 也是其它一些酶如 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、黄递酶、谷胱甘肽还原酶及 β-羟-β-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶等的辅酶。因此, NADP-亲和胶除了应用于纯化 G6PD 外, 还可用于纯化上述有关的酶类, 对于研究这些酶的理化特性及结构与功能的关系有重要的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Lamed R et al. *Biochim Biophys Acta*, 1973; 304: 231
- 2 Sedmak J J et al. *Anal Biochem*, 1977; 79: 544
- 3 Craney C L et al. *Anal Biochem*, 1983; 128: 312
- 4 赵剑等. 中华血液学杂志, 1985; 6(3): 173
- 5 Laemmili U K et al. *J Mol Biol*, 1973; 80: 575
- 6 Yoshida A. *J Chromatography*, 1975; 114: 312
- 7 Yoshida A. *J Biol Chem*, 1966; 241: 4966
- 8 Cohen P et al. *Eur J Biochem*, 1969; 8: 1
- 9 Rattazzi M C. *Biochim Biophys Acta*, 1969; 181: 1
- 10 Yoshida A. *Anal Biochem*, 1970; 37: 357
- 11 Kahn A et al. *Biochim Biophys Acta*, 1974; 334: 257

[本文于1990年7月6日收到, 9月25日修回]

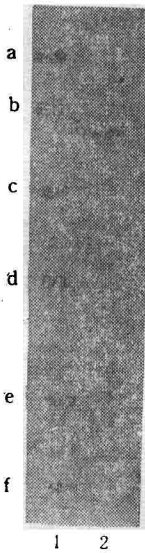


图 1 纯化的 G6PD 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
1. 标准蛋白质: a. 磷酸化酶 b. 牛血清白蛋白, c. 卵清蛋白, d. 碳酸酐酶, e. 胰蛋白酶抑制剂, f. α-乳清蛋白 2. 纯化的 G6PD

(上接第 348 页) 加拿大、日本、奥地利、澳大利亚、新几内亚、印度、以色列、葡萄牙、意大利、苏联、保加利亚和中国的著名专家教授。内容分四大部分:

1. 基础研究 应用血液流变学基本方法、理论和技术, 阐明脑血管病的发病机理和病因, 并提出了防治脑血管病的新方法、新技术和新措施;
2. 临床研究 在脑血管病发病之前、发病急性期、后遗症和康复期的血液流变学行为上的变化、价值、疗效和药物作用;
3. 治疗药物和措施 对于血液流变学上有作用的中药、西药、蛇毒制剂、血液稀释、体育疗法、食物疗法及物理疗法等, 从血液流变学上进行了检测和评价;
4. 血液流变学上新技术、新仪器的研制及其在脑血管病上的应用。

从以上四个侧面反映了血液流变学上的新动向, 它对于心血管病、脑血管病、神经科、心内科、老年病学、生理、生化、检验医学、生物物理学和医学工程学等工作来说, 是一本极有价值的参考书。

书价每套 100 元(包括邮费): 汇款请寄至上海曹杨路 500 号 809 室上海生物物理学会科技部收, 款到即寄书和收据。书量不多售完为止。