

蛋白质沉淀剂对棉铃虫谷胱甘肽 S-转移酶的部分纯化

汤 方, 张常忠, 梁 沛, 史雪岩, 高希武*

(中国农业大学农学及生物技术学院昆虫学系 北京 100094)

摘要: 通过用聚乙烯亚胺(PEI)、硫酸铵、聚乙二醇(PEG)沉淀技术和 GSH-Sepharose 4B 亲和柱对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 幼虫中谷胱甘肽 S-转移酶进行了部分纯化研究。结果表明 PEG10000 和 PEG20000 的纯化效果优于硫酸铵的沉淀效果。通过 PEI 沉淀去核酸后,再用硫酸铵沉淀,中肠和脂肪体 GST 活性分布在 70%~75% 和 60%~65% 沉淀段,比活力分别为 1081.49 和 596.41 nmol/(min·mg),纯化倍数分别为 2.53 和 2.2。在 6 种 PEG 中,PEG10000 和 PEG20000 的纯化效果较好。在中肠和脂肪体中 PEG10000 沉淀的 GST 活性峰分别在 40%~45% 和 30%~40%,GST 比活力分别为 795.11 和 1 080.18 nmol/(min·mg),纯化倍数分别是 2.4 和 3.97。PEG20000 沉淀中肠和脂肪体 GST 的活性峰分别在 25%~40% 和 25%~45%,比活力分别是 767.57 和 945.96 nmol/(min·mg),纯化倍数分别是 2.81 和 3.05。用 GSH-Sepharose 4B 纯化中肠 GST,GST 比活力达到 5 888.44 nmol/(min·mg),纯化倍数达到 107.38。

关键词: 棉铃虫;谷胱甘肽 S-转移酶;硫酸铵沉淀;聚乙烯亚胺沉淀;聚乙二醇沉淀;GSH-Sepharose 4B 亲和柱

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2005)02-0172-07

Partial purification of glutathione S-transferases by protein precipitators in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)

TANG Fang, ZHANG Chang-Zhong, LIANG Pei, SHI Xue-Yan, GAO Xi-Wu* (Department of Entomology, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The partial purification of glutathione S-transferases (GST) in larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) was studied using ammonium sulfate fractionation after polyethylene imine (PEI) fractionation, polyethyleneglycol (PEG) fractionation and GSH-Sepharose 4B. The results showed that efficacy of purification by PEG10000 and PEG20000 was better than that of ammonium sulfate fractionation after PEI fractionation. After wiping off nucleic acid using PEI fractionation, the peaks of GST activities were in 70%–75% and 60%–65% of ammonium sulfate fractionation for midgut and fat body, respectively; the specific activities were 1081.49 and 596.41 nmol/(min·mg), and purification factors were 2.53-fold and 2.2-fold, respectively. The efficacy of purification by PEG10000 and PEG20000 was the best in six kinds of PEG tested. The activity peaks of GST were in 40%–45% and 30%–40% of PEG10000 fractionation for midgut and fat body, respectively; the specific activities were 795.11 and 1 080.18 nmol/(min·mg), and purification factors were 2.4-fold and 3.97-fold, respectively; the activities of GST were the highest in 25%–40% and 25%–45% of PEG20000 fractionation for midgut and fat body, respectively. The specific activities of GST were 767.57 and 945.96 nmol/(min·mg) respectively, and the purification factors were 2.81-fold and 3.05-fold. The specific activity of GST from midgut reached 5 888.44 nmol/(min·mg) by GSH-Sepharose 4B column chromatography and the purification factor increased to 107.38-fold.

Key words: *Helicoverpa armigera*; glutathione S-transferases; ammonium sulfate fractionation; polyethylene imine fractionation; polyethyleneglycol fractionation; GSH-Sepharose 4B

自然界中的各种生物,为避免受到内源性或外源性化学物质,尤其是有毒物质的损害,在进化过程中形成了一系列的代谢解毒酶系统(庞战军等,

1997)。谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GST)是其中最重要的酶系统之一。GST 能使有害的亲电物质与内源性的还原型谷胱甘肽(GSH)结合。

基金项目:国家重点基础研究发展规划 973 项目(G2000016207);国家自然科学基金项目(30471153,30170621)

作者简介:汤方,女,1976 年 1 月生,山东单县人,博士研究生,从事昆虫毒理学与抗药性研究,E-mail: tangfang76@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gaowu@263.net.cn

收稿日期 Received: 2004-08-18; 接受日期 Accepted: 2004-11-08

亲电性底物包括内源性物质(如环氧化物、过氧化物、氧化代谢产生的有活性的直链烯类)及外源性物质(如杀虫剂、除草剂等)。在亲电物质与 GSH 结合后把它们排出体外,保护体内的蛋白质和核酸等(唐振华和毕强 2003)。

分离和纯化是进行蛋白质结构和功能研究的基础。而分离参与抗性的蛋白(酶),明确其生物化学特性及其与抗药性的关系,对于害虫抗药性治理具有重要意义。许多研究者利用硫酸铵对 GST 进行了初步的纯化。聚乙二醇(PEG)是近年来用于蛋白质非变性沉淀的主要物质之一,依据其聚合度有许多型号,不同型号适用的蛋白质分子量不同。关于 PEG 沉淀剂不同聚合度对昆虫 GST 沉淀的效果以及硫酸铵沉淀的比较还未见报道。本研究目的是以棉铃虫 *Helicoverpa armigera*(Hübner)为对象比较研究不同类型的沉淀剂对 GST 的非变性沉淀作用,为该蛋白质的进一步纯化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫为室内饲养的品系,1996 年 7 月采自河北邯郸,在不接触任何药剂的条件下用人工饲料饲养。光周期 16L:8D,温度(25 ± 2)℃,相对湿度 75%。

1.2 化学试剂及药剂

1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)和聚乙烯亚胺(PEI)为 Sigma 公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF)购自德国 Merk 公司;二硫苏糖醇(DTT)为美国 Promega 公司产品;GSH-Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品;PEG10000 为 Fluka 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)购自北京同正生物公司;PEG400、PEG6000 和 PEG20000 购自北京化学试剂公司;PEG2000 购自天津天泰精细化学品有限公司;PEG4000 购自北京华博源科技开发中心;其他药剂均购自国内公司。试剂均为国产分析纯。

1.3 酶液制备

取 6 龄老熟幼虫在冰浴上解剖出中肠和脂肪体,中肠去除围食膜后用冰冷的 1.15% KCl 漂洗。解剖的中肠和脂肪体,于 -85℃ 冰箱中保存或立即制备酶液。分别取中肠或脂肪体各 100 个用含 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)的 12 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.4)缓冲液用前加 PMSF 和 DTT 至终浓度为 1 mmol/L)匀浆,然后在 4℃,

10 000 × g 离心 30 min,上清液用滤纸抽滤 2 次。滤液再在 4℃,105 000 × g 离心 90 min,上清液于 -85℃ 冰箱保存或直接用于测定。

1.4 硫酸铵沉淀

在中肠和脂肪体 GST 酶液中分别加入 10% PEI 母液,其终浓度为 0.4%。用磁力搅拌器轻微搅拌下,在冰上孵育 30 min,然后在 4℃放置 10 min,4℃,1 170 × g 离心 30 min,取部分上清液放入 -20℃ 用于 GST 活性测定;在上清液中加入硫酸铵,使其饱和度和分别达到 20%,在冰上孵育 30 min,用磁力搅拌器轻微搅拌,然后在 4℃放置 10 min,4℃,1 170 × g 离心 30 min,用 pH 7.4 的磷酸缓冲液(含 1 mmol/L EDTA)重悬浮沉淀,放入 -20℃ 用于 GST 活性测定;上清液中继续加入硫酸铵,使其饱和度达到 40%,在冰上孵育 30 min,用磁力搅拌器轻微搅拌,然后在 4℃放置 10 min,4℃,1 170 × g 离心 30 min,用 pH 7.4 的磷酸缓冲液(含 1 mmol/L EDTA)重悬浮沉淀,放入 -20℃ 用于 GST 活性测定;用同样的方法进行不同沉淀段的分析直到硫酸铵的饱和度达到 100%。

根据上述方法分别得到棉铃虫中肠和脂肪体 GST 0.4% PEI 沉淀后的 20% ~ 25%, 25% ~ 30%, 30% ~ 35%, 35% ~ 40% 和 60% ~ 65%, 65% ~ 70%, 70% ~ 75%, 75% ~ 80% 硫酸铵沉淀。

1.5 PEG400、PEG2000、PEG4000、PEG6000、PEG10000 和 PEG20000 沉淀 GST 效果比较

在中肠和脂肪体 GST 酶液中分别加入 10% PEI 母液,使其终浓度为 0.4%,在冰上孵育 20 min,用磁力搅拌器轻微搅拌,然后在 4℃放置 10 min,4℃,4 670 × g 离心 15 min,取少量的上清液放入 -20℃ 用于 GST 活性测定;在上清液中加入 PEG,使其终浓度分别为 5%,在冰上孵育 20 min,用磁力搅拌器轻微搅拌,然后在 4℃放置 10 min,4℃,4 670 × g 离心 15 min,用 pH 7.4 的磷酸缓冲液(含 1 mmol/L EDTA)重悬浮沉淀,放入 -20℃ 用于 GST 活性测定;上清液中继续加入 PEG,使其终浓度达到 10%,在冰上孵育 20 min,用磁力搅拌器轻微搅拌,然后在 4℃放置 10 min,4℃,4 670 × g 离心 15 min,用 pH 7.4 的磷酸缓冲液(含 1 mmol/L EDTA)重悬浮沉淀,放入 -20℃ 用于 GST 活性测定;用同样的方法进行不同沉淀段的分析直到 PEG 的浓度达到 20%。

在中肠和脂肪体 GST 酶液中分别加入 PEG10000 和 PEG20000,使其终浓度为 5%,放在冰上孵育,用磁力搅拌器轻微搅拌 20 min,然后在 4℃

放置 10 min, 4℃ 4 670 × g 离心 15 min, 用磷酸缓冲液 pH 7.4 (含 1 mmol/L EDTA) 重悬浮沉淀, 放入 -20℃ 用于 GST 活性测定; 在上清液中分别继续加入 PEG10000 和 PEG20000, 使其终浓度达到 10%, 放在冰上孵育, 用磁力搅拌器轻微搅拌 20 min, 然后在 4℃ 放置 10 min, 4℃ 4 670 × g 离心 15 min, 用磷酸缓冲液 pH 7.4 (含 1 mmol/L EDTA) 重悬浮沉淀, 放入 -20℃ 用于 GST 活性测定。用同样的方法进行不同沉淀段的分析, 直到 PEG10000 和 PEG20000 的浓度达到 50%。

1.6 Sephadex G25、Sephadex G150 和 GSH-Sepharose 4B 分离纯化中肠 GST

上 30 mL 样品于 Sephadex G25, 用 pH 6.5、0.1 mol/L 的磷酸缓冲液以 2 mL/min 的速度洗脱。收集第 1 个活性峰, 用冷冻干燥仪浓缩后上 Sephadex G150 柱, 洗脱方法同上。收集活性峰, 用冷冻干燥仪浓缩后上 GSH-Sepharose 4B 亲和柱, 先用洗脱液 A (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄) 洗脱 5~10 个柱体积, 用 BioLogic LP 检测程序检测并记录层析图, 直到紫外检测器显示的 OD₂₈₀ 值回到基线, 表明杂蛋白已被洗脱下来; 改用洗脱液 B (pH 8.0、50 mmol/L Tris-HCl 中含 GSH 10 mmol/L) 洗脱, 收集第 1 个洗脱峰, 此峰即为 GST 活性峰; 冷冻干燥备用。

1.7 GST 活性测定

参照 Habig 等 (1976) 方法。

1.8 蛋白质含量测定

参照 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 方法。采用 3 mL 的反应体系。对照缓冲液 (pH 7.4) 500 μL, 考马斯亮蓝 2.5 mL。处理缓冲液 (pH 7.4) 490 μL, 酶液 10 μL, 考马斯亮蓝 2.5 mL。以牛血清白蛋白作标准曲线。

2 结果

2.1 硫酸铵沉淀

2.1.1 中肠 GST 硫酸铵沉淀: 棉铃虫中肠匀浆液差速离心后, 先用 0.4% PEI 沉淀, 上清液再用硫酸铵沉淀, 当使用的硫酸铵饱和度梯度差为 20% 时, 发现在硫酸铵饱和度为 40% 和 80% 时各有一个 GST 活性峰。但是这时 GST 活性峰与蛋白质峰几乎是重叠的, 说明 GST 蛋白和非 GST 杂蛋白并没有很好的分离, 特别是硫酸铵饱和度为 60%~80% 时。

图 1(A) 显示出棉铃虫中肠匀浆液差速离心后,

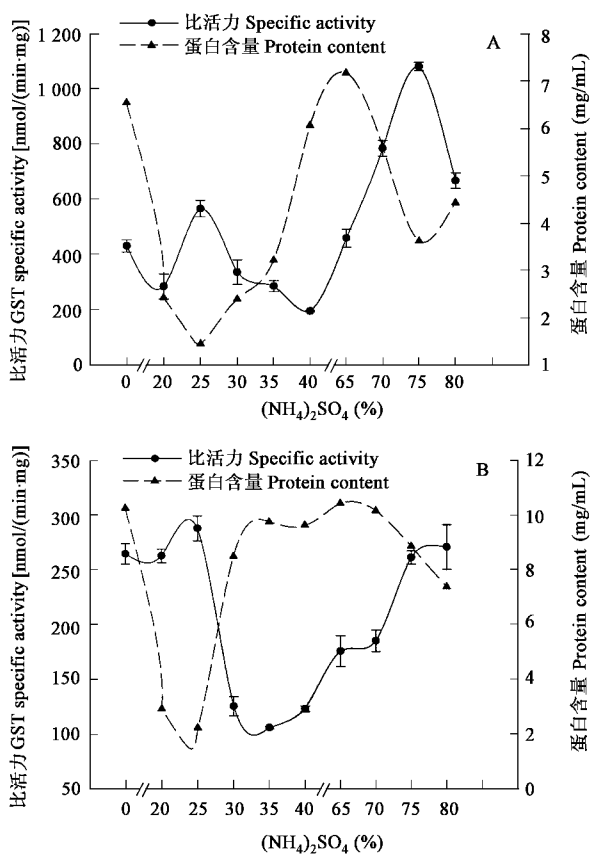


图 1 棉铃虫中肠 (A) 脂肪体 (B) GST 0.4% PEI 沉淀后的硫酸铵沉淀图

Fig. 1 Ammonium sulfate fractionation after 0.4% PEI fractionation of GST in the midgut (A) and fat body (B) of *Helicoverpa armigera*

先用 0.4% PEI 沉淀, 然后上清液用硫酸铵沉淀, 当饱和度梯度差为 5% 时, GST 活性峰与蛋白质峰得到较好的分离。GST 比活力在硫酸铵饱和度为 25% 时出现一个小的活性峰, 在 75% 时出现一个大的活性峰, 比活力分别是 566.21 和 1 081.49 nmol/(min·mg), 纯化倍数分别是 1.32 和 2.53。在 GST 的两个活性峰处, 蛋白含量都是最低的, 分别为 1.45 和 3.62 mg/mL; 而在硫酸铵饱和度为 40%, GST 比活力最低时, 蛋白含量几乎达到顶峰 6.07 mg/mL。说明 GST 蛋白和非 GST 蛋白已经得到很好的分离。因此, 硫酸铵饱和度为 70% 能够沉淀大量的杂蛋白, 饱和度为 70%~75% 硫酸铵沉淀段 GST 比活力最高。

2.1.2 脂肪体 GST 硫酸铵沉淀: 棉铃虫脂肪体匀浆液差速离心上清液经 0.4% PEI 沉淀后上清液再用硫酸铵沉淀, 当梯度差为 20% 时, GST 的比活力在硫酸铵饱和度为 80% 时达到峰值, 比活力为 596.41 nmol/(min·mg), 纯化倍数为 2.2。蛋白质的高峰在

饱和度为 60% ~ 80% 沉淀段,在 80% 时仍很高,为 20.92 mg/mL。GST 活性峰与蛋白质峰部分是重叠的,说明 GST 蛋白和非 GST 蛋白并没有很好的分离。

棉铃虫脂肪体匀浆差速离心上清液经 0.4% PEI 沉淀后上清液再用硫酸铵沉淀,以 5% 为梯度差沉淀时,GST 的比活力在硫酸铵饱和度为 25% 时达到峰值,比活力为 288 nmol/(min·mg),但此时蛋白的含量最小,为 2.25 mg/mL。可以看出 GST 比活力的趋势恰好与蛋白含量相反,说明 GST 蛋白和非 GST 蛋白已经得到很好的分离(图 1:B)。

棉铃虫中肠和脂肪体匀浆液差速离心后,先用 0.4% PEI 沉淀后,再用硫酸铵沉淀时,20% 硫酸铵饱和度梯度不能把 GST 活性峰与蛋白质峰分离,当硫酸铵饱和度梯度为 5% 时,GST 蛋白和非 GST 蛋白都能够很好的分离,GST 比活力的峰值恰是蛋白质的谷底。

2.2 GST 的 PEG 沉淀

2.2.1 6 种 PEG 的选择实验：棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液经 0.4% PEI 沉淀后上清液再分别用 PEG400、PEG2000、PEG4000、PEG6000、PEG10000 和 PEG20000 6 种聚合度不同的 PEG 沉淀,PEG10000 和 PEG20000 的沉淀效果明显优于其他 4 种(图 2)。在一定范围内,PEG 分子量越大,对 GST 的沉淀效果越好。

2.2.2 GST 的 PEG10000 沉淀：图 3(A)为棉铃虫中肠匀浆差速离心上清液用 PEG10000 的沉淀图谱。PEG10000 的浓度为 10% 时,GST 的比活力达到谷底,而蛋白含量达到峰值;PEG10000 的浓度为 45% 时,GST 的比活力达到峰值,而蛋白含量到达谷底。GST 活性峰与蛋白峰是相反的,说明 GST 蛋白和非 GST 蛋白能够很好的分离。PEG10000 的浓度为 10% ~ 45% 时,中肠 GST 的比活力随着浓度的增加而增大,PEG10000 的浓度为 45% 时,比活力达到最高。而在 PEG10000 的浓度为 10% 时,蛋白的含量达到峰值,为 13.83 mg/mL。当比活力达到峰值,蛋白含量最低,为 1.56 mg/mL。因而,40% ~ 45% PEG10000 的沉淀段 GST 的比活力最高。

棉铃虫脂肪体匀浆差速离心上清液在 PEG10000 沉淀中,PEG10000 的浓度为 10% 时,GST 的比活力到达谷底,而蛋白含量达到峰值;PEG10000 的浓度大于 20% 时,蛋白的含量都很低。GST 活性峰与蛋白峰是相反的,说明 GST 蛋白和非 GST 蛋白能够很好的分离(图 3:B)。PEG10000 的

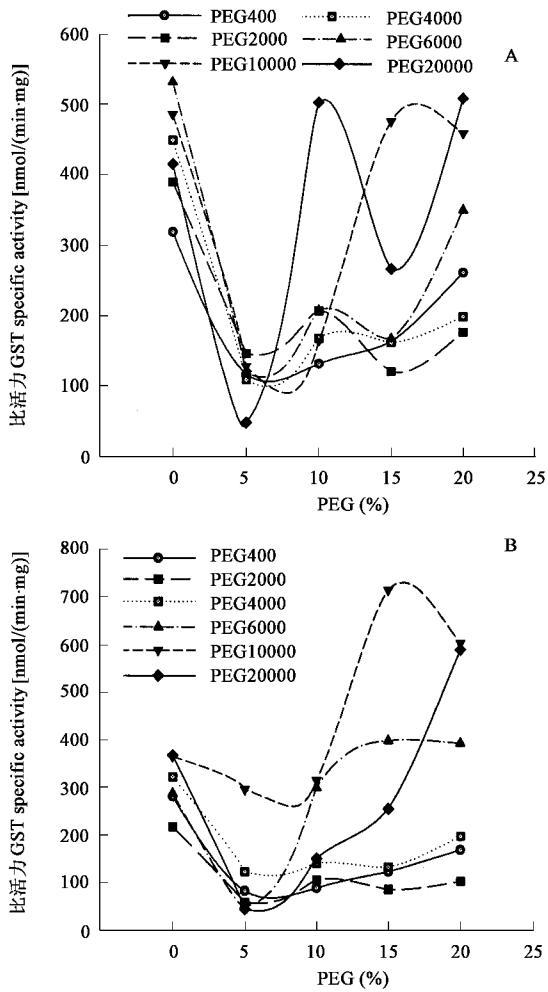


图 2 棉铃虫中肠 (A) 和脂肪体 (B) GST 0.4% PEI 沉淀后的 PEG 沉淀图

Fig. 2 PEG fractionation after 0.4% PEI fractionation of GST in the midgut (A) and fat body (B) of *Helicoverpa armigera*

浓度为 10% ~ 35% 时,GST 比活力随着浓度的增加而增大,PEG10000 的浓度为 35% 和 40% 时,GST 比活力达到最高,分别是 1 065.53 和 1 080.18 nmol/(min·mg),其纯化倍数分别是 3.92 和 3.97。蛋白含量在 PEG10000 的浓度为 10% 时达到高峰,为 31.08 mg/mL,此时 GST 比活力达到最低;当 PEG10000 的浓度大于 20%,蛋白含量越来越低,表明 20% 的 PEG10000 便能沉淀绝大部分的杂蛋白。因而利用 PEG10000 来沉淀脂肪体匀浆差速离心上清液,30% ~ 35% 的 PEG10000 沉淀段 GST 的比活力最高,蛋白含量也最少。

2.2.3 GST 的 PEG20000 沉淀：棉铃虫中肠匀浆差速离心上清液在 PEG20000 沉淀中,PEG20000 的浓度为 10% 时,GST 的比活力达到最低,而蛋白含量达到峰值;PEG20000 的浓度为 35% 时,GST 的比活力

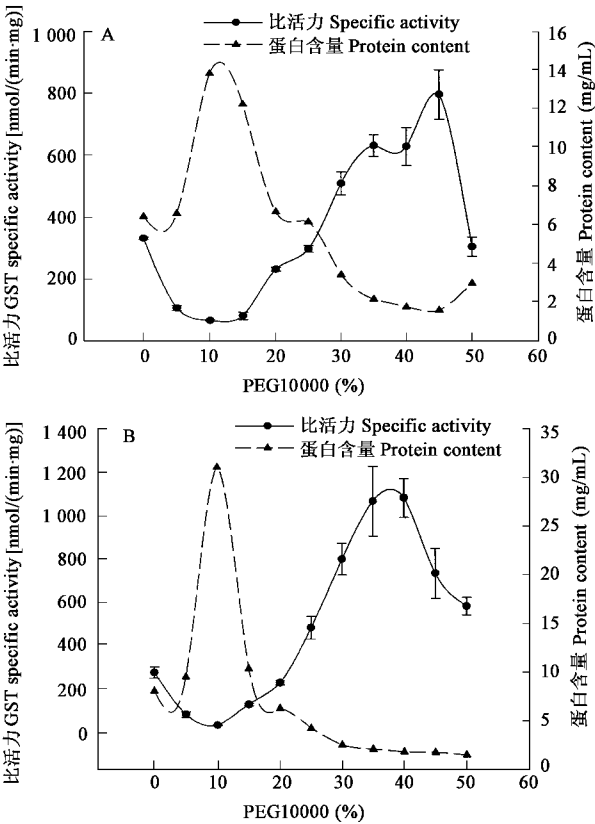


图3 棉铃虫中肠(A)和脂肪体(B)GST的PEG10000沉淀图
Fig. 3 PEG10000 fractionation of GST in the midgut (A) and fat body (B) of *Helicoverpa armigera*

达到峰值,而蛋白含量达到谷底。GST活性峰与蛋白峰是相反的,说明GST蛋白和非GST蛋白能够很好的分离(图4:A)。PEG20000的浓度在10%之前,中肠GST比活力随着PEG浓度的增加而降低,在10%~30%时,比活力随着PEG20000浓度的增加而增加。当PEG20000的浓度为30%时,GST的比活力是744.19 nmol/(min·mg),纯化倍数是2.72。在PEG20000的浓度为10%时,蛋白含量为32.60 mg/mL,达到峰值,然后随着浓度的增加蛋白含量减少,此时GST的比活力达到谷底。当PEG20000的浓度分别为15%、20%、25%、30%、35%、40%和45%时,蛋白含量分别为10.02、5.58、3.00、4.39、1.48、1.44和1.97 mg/mL。PEG20000沉淀中肠GST时,PEG浓度为25%~30%时效果最好,此时得到的沉淀比活力高,GST蛋白和杂蛋白能够很好的分离。

图4(B)表明棉铃虫脂肪体PEG20000沉淀的比活力出现2个峰,在PEG20000的浓度分别为25%和40%时各有一个活性峰,这2个峰的比活力分别是921.93和945.96 nmol/(min·mg),纯化倍数分别是2.97和3.05。PEG20000的浓度为5%时,比活力达到最低,为61.44 nmol/(min·mg),仅仅为原酶比活力

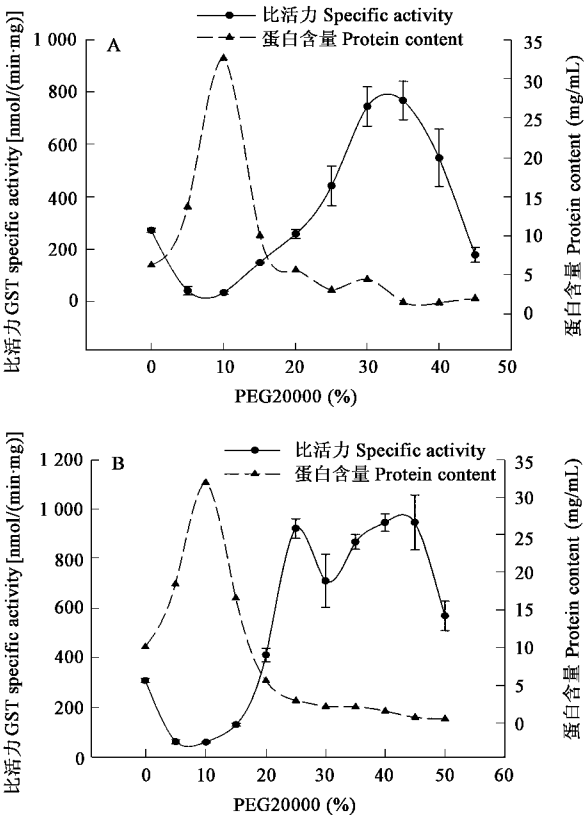


图4 棉铃虫中肠(A)和脂肪体(B)GST的PEG20000沉淀图
Fig. 4 PEG20000 fractionation of GST in the midgut (A) and fat body (B) of *Helicoverpa armigera*

的1/5,但此时沉淀的蛋白达到较高值,为18.44 mg/mL,表明在PEG20000的浓度为5%时能够沉淀出大量的杂蛋白。

无论是PEG10000还是PEG20000,达到20%的浓度就能沉淀绝大部分棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液中的杂蛋白。GST活性峰与蛋白质峰是完全分开的,GST比活力的峰值恰是蛋白含量的谷底,而比活力的谷底恰是蛋白含量的峰值。GST蛋白和非GST蛋白能够很好的分离。

2.3 GST的硫酸铵沉淀与PEG沉淀的比较

表1表明对于棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液而言,PEG10000的沉淀效果>PEG20000的沉淀效果>PEI沉淀后硫酸铵的沉淀效果。在6种PEG中,PEG10000和PEG20000对棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液的沉淀效果较好,但是PEG10000的沉淀效果优于PEG20000。PEG沉淀所需的浓度较小,GST蛋白与杂蛋白能够分离的完全,杂蛋白沉淀的更加彻底,所得沉淀GST的比活力更高。例如20%PEG10000和PEG20000便可沉淀绝大多数杂蛋白。PEG10000对棉铃虫脂肪体匀浆差速离心上清液的纯化倍数达3.97;而饱和度为70%~

75%的硫酸铵对棉铃虫中肠匀浆差速离心上清液的纯化倍数最高为 2.53。所以 ,对于棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心液来说 ,PEG10000 的沉淀效果最

好 ,所得到的沉淀 GST 的比活力最高 ,GST 蛋白与杂蛋白能够分离的完全。

表 1 蛋白质沉淀剂对棉铃虫幼虫 GST 纯化效果的比较

方法 Method	沉淀前 Before the fractionation		沉淀后 After the fractionation		纯化倍数 Purification factor
	比活力 Specific activity [nmol(min·mg)]	蛋白含量 Protein content (mg/mL)	比活力 Specific activity [nmol(min·mg)]	蛋白含量 Protein content (mg/mL)	
PEI/硫酸铵沉淀 PEI/Ammonium sulfate fractionation	429.82	6.54	1 081.49	3.62	2.53
PEG10000 沉淀 PEG10000 fractionation	271.79	8.13	1 080.18	1.91	3.97
PEG20000 沉淀 PEG20000 fractionation	310.12	10.18	945.96	1.61	3.05

2.4 GSH-Sepharose 4B 亲和柱分离纯化中肠 GST
粗酶液经过超速离心、硫酸铵沉淀、Sephadex G25 和 Sephadex G150 分离后再利用 GSH-Sepharose 4B 亲和柱来分离纯化中肠 GST。GSH-Sepharose 4B 亲和层析柱能够除去大量的杂蛋白 ,纯化效果较好 ,但回收率较低。当用洗脱液 B(pH 8.0、50 mmol/L Tris-HCl ,含 GSH 10 mmol/L)洗脱时 ,能够得到 2 个峰 ,收集第 1 个洗脱峰 ,此峰即为 GST 活性峰(图 5)。经 GSH-Sepharose 4B 纯化 GST ,比活力达到 5 888.44 nmol(min·mg) ,纯化倍数达到 107.38。

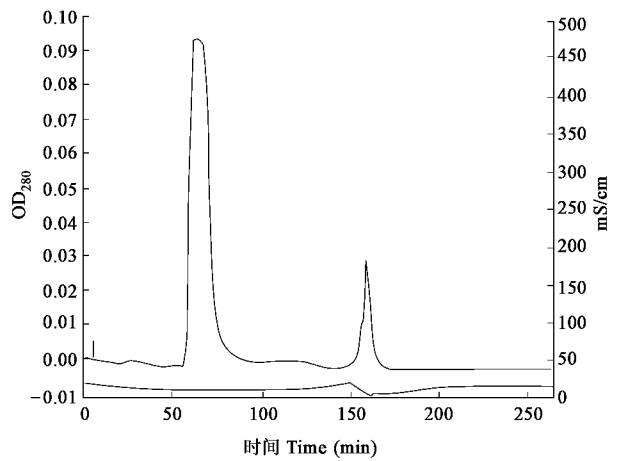


图 5 棉铃虫中肠 GST 的 GSH-Sepharose 4B 洗脱图
Fig. 5 The elution of GSH-Sepharose 4B of GST in the midgut of *Helicoverpa armigera*

3 讨论

在进行柱层析(例如凝胶过滤、DEAE 纤维素、

亲和层析等)前 ,首先用非变性蛋白质沉淀剂部分纯化是常用的手段。最经典的沉淀剂是硫酸铵。Chien 和 Dauterman (1991)用硫酸铵沉淀的方法对美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 的 GST 进行了初步纯化研究 ,其活性主要分布在 55% ~ 80% 沉淀段 ,纯化倍数为 4.3。Yawetz 和 Koren (1984)用硫酸铵沉淀技术对地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 的 GST 纯化达到 6.3 倍。Yu (1989)在对 5 种植食性鳞翅目害虫的 GST 纯化时 ,采用了同样的技术 ,用 45% ~ 70% 的硫酸铵进行分级沉淀 ,再亲和层析进行分离。Ku 等 (1994)在纯化小菜蛾 *Plutella xylostella* 幼虫 GST 同工酶时 ,首先使用 30% ~ 60% 的硫酸铵沉淀。Yu 和 Huang (2000)在纯化德国小蠊 *Blattella germanica* 的 GST 时 ,在上亲和柱之前使用了 45% ~ 75% 的硫酸铵沉淀。本研究以棉铃虫 GST 为例比较研究不同类型的沉淀剂对蛋白质的非变性沉淀作用 ,结果表明 PEG 沉淀所需的浓度较小 ,GST 蛋白与杂蛋白能够分离的完全 ,杂蛋白沉淀的更加彻底 ,所得沉淀 GST 的比活力更高。

棉铃虫中肠和脂肪体同工酶的组成既有一定的相似性又有一定的差异。在硫酸铵的饱和度为 25% 和 75% 时 ,棉铃虫中肠和脂肪体沉淀的 GST 比活力都达到峰值 ;棉铃虫脂肪体匀浆差速离心上清液中的 PEG10000 和 PEG20000 沉淀的比活力和蛋白含量的趋势都与中肠的类似 ,说明中肠和脂肪体同工酶的组成具有一定的相似性。在硫酸铵各沉淀段 ,棉铃虫脂肪体酶液的比活力与中肠的有很大的差别 ;在 PEG10000 和 PEG20000 沉淀中 ,脂肪体沉淀的 GST 比活力和蛋白含量的实际值都与中肠的又有所不同 ,可能是由于中肠和脂肪体同工酶的组

成具有一定的差异。

PEG10000 在浓度大于 40% 及其 PEG20000 的浓度大于 30% 时粘度便增大 , 从而也增大了误差。所以 , 棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液 PEG10000 沉淀的最佳浓度为 30% ~ 35%。棉铃虫中肠匀浆差速离心上清液 PEG20000 沉淀的最佳浓度为 25% ~ 30% ; 棉铃虫脂肪体匀浆差速离心上清液 PEG20000 沉淀的最佳浓度为 20% ~ 25%。

由于棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液硫酸铵沉淀和 PEG 沉淀所需时间较长 , 所以在操作过程中存在失活现象 , 从而造成所测比活力比实际的比活力要低。利用蛋白质沉淀剂(硫酸铵、PEG10000 和 PEG20000)对棉铃虫中肠和脂肪体匀浆差速离心上清液进行了纯化对比研究 , 发现 PEG10000 和 PEG20000 的纯化效果优于硫酸铵。但是硫酸铵、PEG10000 和 PEG20000 的存在对 GST 的活性的影响还有待于研究。

参 考 文 献 (References)

Bradford MM , 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* , 72 : 248 – 254.

Chein C , Dauterman WC , 1991. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa zea* . *Insect Biochem.* , 21(8) : 857 – 864.

Habig WH , Pabst MJ , Jakoby WB , 1976. Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* , 175 : 710 – 716.

Ku CC , Chiang FM , Hsin CY , Yao YE , Sun CN , 1994. Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. *Pest Biol. Physiol.* , 50 : 191 – 197.

Pang ZJ , Chen Y , Zhou M , 1997. Regulation of glutathione S-transferase gene expression. *Prog. Biochem. Biophys.* , 24(5) : 401 – 405.[庞战军 , 陈瑗 , 周玫 , 1997. 谷胱甘肽硫转移酶基因表达的调控. 生物化学与生理物理进展 , 24(5) : 401 – 405]

Tang ZH , Bi Q , 2003. Molecule Behavior on Function of Insecticide. Shanghai : Publishing House of the Far East of Shanghai. 675pp.[唐振华 , 毕强 , 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海 : 上海远东出版社. 675 页]

Yawetz A , Koren B , 1984. Purification and properties of the Mediterranean fruit fly glutathione S-transferase. *Insect Biochem.* , 14 : 663 – 670.

Yu SJ , 1989. Purification and characterization of glutathione transferases from five phytophagous lepidoptera. *Pest Biol. Physiol.* , 35 : 97 – 105.

Yu SJ , Huang SW , 2000. Purification and characterization of glutathione S-transferases from the German cockroach , *Blattella germanica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* , 67 : 36 – 45.

(责任编辑 : 黄玲巧)