



一种 α -半乳糖苷酶的凝胶电泳活性染色方法

亓珊 苏悌之

(北京营养源研究所, 北京 100054)

摘要 介绍一种快速、简便鉴定 α -半乳糖苷酶凝胶电泳带的坚固蓝 B 活性染色方法。采用此方法, 可直接将粗酶制品上样进行凝胶电泳。电泳完成后, 只需将凝胶放在反应液中浸泡 5min, 然后再在 pH 为 7.8, 温度为 4℃ 的条件下染色 1min, 即可将凝胶中的酶分子定位带显示出来。这种坚固蓝 B 的活性染色方法与考马斯亮蓝染色相比, 节省了大量时间。

关键词 活性染色, α -半乳糖苷酶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

α -半乳糖苷酶是一种水解 α -半乳糖苷的酶类, 广泛存在于动、植物及微生物体中^[1]。含生色糖苷配基的糖类已被广泛用于糖苷水解酶类的酶测定和组织学染色^[2]。其中 6-溴-2-萘- α -D-半乳糖苷可用于鉴定动植物组织中的 α -半乳糖苷酶^[3]。其染色原理是酶解后的产物可与坚固蓝 B 盐反应, 生成水不溶性的紫色物质。然而, 对 α -半乳糖苷酶聚丙烯酰胺凝胶电泳的活性染色方法迄今未见报道。我们参照组织化学染色方法, 对其进行改进, 找到了一种快速、简便的鉴定 α -半乳糖苷酶凝胶电泳带的活性染色方法。

1 材料和方法

1.1 材料

反应液: 将 5mg 6-溴-2-萘- α -D-半乳糖苷 (Sigma 公司) 溶于 1.0ml 95% 乙醇后, 加 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液 9.0ml。

染色液: 将 2mg 坚固蓝 B 盐溶于 1ml 0.1mol/L 的 Tris-HCl 冷缓冲液 (pH 为 7.8, 4℃), 使用前临时制备。

酶液: 本实验室用微生物发酵法^[4], 从发酵液中提取的 α -半乳糖苷酶及购自 Sigma 公司的 α -半乳糖苷酶。

1.2 方法

聚丙烯酰胺凝胶电泳: 采用常规 disc-

PAGE 法^[5]。酶活测定: 参照 Schmitt^[6] 法, 以对硝基苯 α -半乳糖苷 (PNPG) 为底物, 但改用 pH 为 7.5 含 38mmol/L 巯基乙醇的 0.1mol/L 磷酸缓冲液, 在日立 330 型分光光度计比色杯内保温进行反应, 自动记录吸光度。

光密度测定: 切取染色后凝胶块, 在 722 型分光光度计上测定 OD_{630nm} 吸收值。

活性染色程序: 电泳后将凝胶立即放入反应液中, 37℃ 保温 5min, 然后用蒸馏水洗涤, 再放入新配制的冷染色液内, 4℃ 染色 5min, 取出用蒸馏水洗涤 2—3 次, 放置在水中保存。

2 结果与讨论

2.1 染色温度

由于坚固蓝 B 盐在溶液中极易分解, 产生絮状不溶物, 室温放置 2min 即开始分解, 随着温度升高分解速度加快。经实验表明, 最佳染色温度为 4℃。

2.2 pH 对染色的影响

α -半乳糖苷酶与 6-溴-2-萘- α -D-半乳糖苷的产物呈酸性, 在酸性溶液中产物与染料不易结合; 若在碱性溶液中, 染料坚固蓝 B 盐分解速度加快, 对染色不利。染色光密度与染液 pH 有密切关系。染色最佳 pH 值为 7.8。

1994-09-07 收稿

2.3 染色时间

坚固蓝 B 盐配成试剂后, 随放置时间增长形成的沉淀物随之增多, 不仅与水解后产物的结合能力明显下降, 而且其分解后产生的棕色絮状物易吸附在凝胶上, 使凝胶背景呈棕黄色, 极不易洗脱, 电泳带的分辨力下降, 所以一般应将染色时间控制在 5min 为宜。

2.4 电泳后凝胶在反应液放置时间的选择

凝胶中酶与 6-溴-2-萘- α -D-半乳糖苷反应速度很快, 当上样酶活在 1000u/ml 时, 反应 5min, 足以用染色液染出清晰的电泳带。延长反应时间, 由于反应产物的扩散, 使凝胶背景也显淡紫色。

2.5 凝胶的贮存

染色后的凝胶, 应放在蒸馏水或 7% 乙酸

中保存。切忌将凝胶放在碱性溶液中, 以免凝胶变形和电泳带消失。

此方法省时、简便, 可使凝胶中该酶的定位带迅速显示出来。本方法也适用于 β -半乳糖苷酶的活性染色。

参 考 文 献

- [1] 刘波, 彭万霖. α -半乳糖苷酶. 见: 张树政主编, 酶制剂工业 下册. 北京: 科学出版社 1984, 780—794.
- [2] Dey P M, Pridham J B. Adv Enzymol, 1972, 36: 91—130.
- [3] Szmigielski S. J Lab Clin Med, 1966, 67: 709.
- [4] 苏锦之, 元珊, 运文慧, 等. 微生物学通报, 1989, 16 (2): 83—87.
- [5] 北京大学生化教研室编. 生化实验指导. 北京: 人民教育出版社. 1980, 107.
- [6] Schmitt R, Schmid K. Eur J Biochem, 1976, 67, 95—104.