维普资讯 http://www.cqvip.com

322-325

第21卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.4
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

# 鼠肾和人肝癌组织中GGT的分离纯化和鉴定

临床生化教研室 司维柯* 王霞文 蒋纪恺

**提 要** 鼠肾(或人肝癌)组织经匀浆、超速离心、Triton X－100提取、硫酸铵沉淀、脱氧胆酸钠处理、硫酸铵沉淀、木瓜酶处理后再经硫酸铵沉淀、经DEAE－Cellulose 52 离子交换柱层析、Sephadex G200凝胶柱层析，最后获得GGT的纯制备物，比活性分别为117μ/mg(鼠肾)和15.1μ/mg(人肝癌组织)。经鉴定达到了电泳纯的均质化程度，该纯化程序较其它方法简便、价廉，一般实验室均能开展，可用于哺乳动物组织中GGT的分离纯化，特别是分离提纯原发性肝癌组织中的GGT。

**关键词** γ－谷氨酰转移酶;分离提纯;免疫;鉴定
**中图分类号** Q555.3

γ－谷氨酰转移酶(GGT)是临床实验室中诊断肝胆胰疾病较灵敏的指标，但特异性不高。后采用电泳法分离检测"肝癌特异性GGT"同工酶，提高了检测的特异性，但方法繁琐费时。1985年日本学者[1]成功地建立了检测"肝癌GGT"的ELISA法，并应用于临床，证明有很大的诊断价值。该方法的建立首先是纯化原发性肝癌组织中的GGT。关于GGT的纯化，国外早在50年代就开始摸索，因GGT结合在膜上且易失活的特性，使分离纯化难度大。本文参考Suresh和Rekacca等[2,3]的方法，结合实验室的条件，建立了一套切实有效的分离程序，应用该程序分离纯化出了鼠肾和人肝癌组织中的GGT。

## 1 材料和试剂

1.1 **材料** 大鼠肾脏，取自300g左右的成年Wistar大鼠。人肝癌组织系重庆医科大学附一院外科之原发性肝癌切除标本。

1.2 **试剂** Papain(木瓜酶)、Triton X－100、DEAE－Cellulose 52,Sephadex G200 均为Sigma公司产品，其余试剂均为国产分析纯以上试剂。

## 2 方法和结果

2.1 **GGT提取物蛋白含量测定** 以酚试剂法和紫外分光光度法测蛋白含量。

2.2 **GGT提取物酶活性测定** 以重氮试剂法测定酶活性，用γ－谷氨酰－α－萘胺作底物，以双甘肽作接受体。

2.3 **GGT的分离纯化** 经下列七个主要步骤将GGT逐步纯化出。

2.3.1 匀浆的制备 4℃下将鼠肾53g剪碎后，加入约3倍体积的0.01mol/L、pH8.0的Tris－HCl缓冲液(内含0.15mol/L Nacl)，于玻璃匀浆器中制成匀浆。

2.3.2 Triton X－100提取 匀浆在25±2℃下搅拌30min后，经100,000×g离心60min，收集沉淀。将沉淀悬浮在0.01mol/L、pH8.0的Tris－HCl缓冲液250ml中，于25±2℃下搅拌2h，再16,000×g离心60min，收集上清液。

2.3.3 丙酮沉淀、脱氧胆酸钠处理 将上清液约210ml，加固体$(NH_4)_2SO_4$ 79.8g使达50%饱和度(奥氏饱和度)，边加边搅拌，避免

* 现在第三军医大学临床检验教研室(630038)

维普资讯 http://www.cqvip.com

起泡沫，于4℃放置60min后，在4℃4000r/min离心10min。小心转移出上层漂浮的浅咖啡色半固体物质，用0.01mol/L，pH8.0的Tris－HCl缓冲液100ml溶解，4℃下混合等体积的－15℃的丙酮约150ml，边加边轻轻搅拌，立即在4℃下，16，000×g离心30min。得到的沉淀紧密并斜靠管壁。用含有1%脱氧胆酸钠的上述Tris－HCl缓冲液100ml溶解沉淀，先用少量缓冲液加入沉淀中，用匀浆器将沉淀团块研细，使充分分散在缓冲液中。该混合液在4℃下搅拌18h，再16，000×g离心60min，收集上层棕色透明液体95ml，定容至100ml。

2.3.4 硫酸铵沉淀 收集的上清液中加固体 $(NH_4)_2SO_4$ 38g，使达50%的饱和度，边加边搅拌。4℃下放置30min后，4000r/min离心10min，获漂浮在上层的浅咖啡色固体状物。收集该物于透析袋中，在总体积为3L的0.05mol/L，pH7.5的磷酸钾缓冲液（内含1mmol/L EDTA）中，4℃下搅拌透析18h，其间分三次更换透析缓冲液，直到纳氏试剂检查无$NH_4^+$为止。透析后制备物为浅棕色透明液体，为27ml。

2.3.5 木瓜酶处理、硫酸铵沉淀 制备物中含蛋白97.79mg，加木瓜酶5.8674mg，使木瓜酶浓度达0.06mg/mg蛋白，加巯基乙醇0.02ml，使其终浓度达10mmol/L。混合物在37℃下搅拌60min，4℃下加$(NH_4)_2SO_4$ 14.36g，使达70%的饱和度，充分混匀，4℃下放置60min后，4000r/min离心10min，沉淀溶解于0.01mol/L，pH7.5的磷酸钾缓冲液10ml中，并转移至透析袋内，用同种缓冲液在4℃下搅拌透析18h。间隔3－4h更换一次透析液，检查至无$NH_4^+$为止。透析后的制备物总体积为13.5ml，在真空冷冻干燥器中抽干，使体积浓缩成6ml。

2.3.6 DEAE－cellulose 52 离子交换层析 将处理好的DEAE Cellulose 52 装1.5×10cm的柱，用0.01mol/L pH7.5的磷酸缓冲液平衡、洗涤柱，直到流出液与缓冲液的A280值接近（A 280＝0.06）。将GGT制备液6ml沿管壁加样，注意床面不可冲裂，待样品液全部进入柱床后，用0.01mol/L，pH7.5磷酸缓冲液洗脱，流速控制在6ml/10min，以2ml/管收集。同时在UV 260紫外分光光度仪上测定每管蛋白含量。并测每管酶活性，收集酶活性高的第6－10管。收集液约10ml，在真空干燥器中抽干，加6ml重蒸水溶解抽干物。

2.3.7 Sephadex G200 凝胶柱层析 将处理好的Sephadex G200凝胶装柱（2×90cm），用0.1mol/L pH8.0的Tris－HCl缓冲液充分平衡。将上述提取液上柱，用同种缓冲液洗脱，流速控制在4ml/10min，以2ml/管收集。同时测每管的蛋白含量和酶活性，收集酶活性峰第9－15管，将收集的洗脱液浓缩至约6ml，移入透析袋中，在4℃下于0.01mol/L，pH8.0的Tris－HCl缓冲液中透析。获得透析后的GGT纯化物即为最终纯化的GGT，比活性417u/mg，分装在安瓿中，於－20℃冰箱保存。每步分离纯化效果见表1。人原发性肝癌组织（约70g）用同样的方法纯化，得到GGT比活性为15.1u/mg。

2.4 GGT纯化物的鉴定

2.4.1 免疫双扩散试验 1%的融化琼脂糖4ml制板（2×6cm），冷凝后打孔，中央孔加GGT纯化物，周围孔加不同稀释度的纯化了的GGT抗血清[4]（抗血清的制备和纯化见另篇报道），放于湿盒中，室温12－24h后观察结果。见图1为GGT纯化物与纯化的抗血清的双扩试验结果，可见纯化的GGT与纯化的抗血清间出现单一沉淀线。

2.4.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 常规方法进行聚丙烯酰胺园盘电泳，分别作鼠肾粗提物和最终纯化物的电泳，结果见图2。可见纯化物仅出现一条蛋白带，结合纯化过程中酶比

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 鼠肾中GGT的分离纯化

| 步骤 | 体积 | 蛋白质 | | GGT | | | 纯化倍数 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ml | mg/ml | mg | u | u/mg | Yield% | |
| 1.匀浆制备 | 160 | 30.2 | 4830.7 | 4091 | 0.84 | 100 | 1 |
| 2.Triton X－100提取 | 210 | 15.2 | 3193.8 | 3756.8 | 1.18 | 91.8 | 14 |
| 3.丙酮沉淀.脱氧胆酸钠处理 | 100 | 2.2 | 220.64 | 3256 | 12.4 | 79.59 | 14.8 |
| 4.硫酸铵沉淀 | 27 | 3.6 | 97.79 | 1676.7 | 17.14 | 41 | 20.4 |
| 5.木瓜酶处理.硫酸铵沉淀 | 13.5 | 0.7 | 9.4 | 986.3 | 104.8 | 24 | 125 |
| 6.DEAE Cellulose 52 离子交换层析 | 10 | 0.304 | 3.04 | 513.0 | 169 | 12.5 | 201.2 |
| 7.Sephadex G200 柱上层析 | 6 | 0.19 | 1.15 | 480 | 417.4 | 11.73 | 497 |

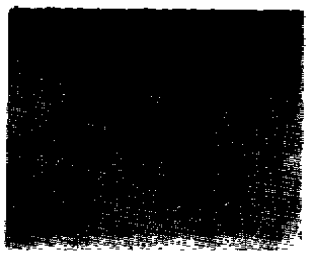


图1 GGT纯化物鉴定(双扩散试验)
中央孔为纯化抗原。1－6孔为1:2－64稀释的纯化抗血清.抗原抗体间出现单一沉淀线。

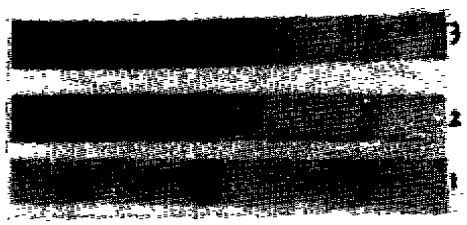


图2 GGT纯化物的聚丙烯酰胺圆盘电泳
1.为GGT纯化物;2.为GGT粗提物(第5步);3.为GGT粗提物(第2步)。

活性逐步提离，可肯定该单一带为GGT蛋白带，说明GGT纯化物达到了均质化程度。

## 3 讨论

分离纯化GGT的方法较多，有的虽方法简便、快速，但分离效果差。有的方法分离效果好，但太繁琐且价格昂贵，如亲和层析法[3]，本文介绍的方法是取Suresh和Rebacca的方法之长，结合自己实验室的条件加以改进而建立的。其中免去了亲和层析的步骤，而以较之价廉、简便的非亲和层析法进行分离;试剂中以木瓜酶取代菠萝酶，以Triton x－100取代Lubrol Wx这些不易得且价格昂贵的试剂;同时反复摸索最佳层析条件，最后认为可不用梯度洗脱，以简便的等度洗脱可得到满意的结果(见另篇报道);同时还在一些小的方法作了简化步骤。减少试剂用量和种类等方面的改进等。现在建立的方法与其它分离提纯GGT的方法相比，具有简便、经济、快速、分离效果好的优点，是现今国内外非亲合层析方法中较好的方法。纯化得到的肝癌GGT为研制早期诊断肝癌的

维普资讯 http://www.cqvip.com

ELISA试剂盒.测得GGT的真实含量(g/L).比酶活力法更准确。因GGT在血清中有活性型和非活性型两种，酶活力法只能测到活性型。得到的肝癌GGT和其抗体还可用于组织化学染色，有助于肝癌的诊断。

## 参 考 文 献

1.Taniquchi N. JNCl 1985;75(5):841
2.Suresh S J Biol Chem 1975;250:4619
3.Rebacca P,et al. J Biol Chem 1976;251:7863
4.李成文.主编.现代免疫化学技术。上海科学技术出版社.1992.
5.Joris R,et al. Clin chim Acta 1987;162:311

(收稿日期 1996－05－29)

# PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF r－GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE IN RAT KIDNEY AND HUMAN HEPATOCARCINOMA TISSUES

*Si Weike*,et al

Faculty of Medicial Laboratory Sciences

After rat kidney (or human hepatocarcinoma tissues) homogenate was ultracentrifuged,γ－Glutamyl transpeptidase(GGT) was purified from the preparation by a procedure involving Triton X－100 extraction,ammonium sulfate fractionation,acetone precipitation,treatment with sodium deoxycholate,ammonium sulfate fractionation,treatment with papain,then ammonium sulfate fractionation again.Column chromatography on DEAE－cellulose 52 and sephadex $G_{200}$ were used.The specific activity of the final preparation,which was apparently homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis,was 417u/mg (rat kidney) and 15.1u/mg (human hepatocarcinoma tissues)respectively.This method is convenient and cheap when compared with others and is suitable for common laboratory use.It can be used to separate and purify the GGT from other mammalian tissues.

**KET WORD**: Sγ－Glutamyl transpeptidase; Separation and Purification;Immunity;Identification

(上接第317页)

# A STUDY ON THE CHANGES OF ACTIVATION OF RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM AND PHARMACEUTIC INTERVENTION IN CHILDREN WITH HEART FAILURE

*Qian Yongru,et al.*

Dept. of Paediatrics,Children Hospital

The role of renin angiotensin system and the efficacies of angiotensin converting enzyme inhibitor(ACEI) were observed in 30 children with heart failure.A group of 18 cases were administrated ACEI(Benazepril) and B group of 12 cases only given regular treatment.The results after treatment with ACEI showed an improvement in cardiac function,a decrease in cardiothoratic ratio,in left ventricular mass index,in levels of angiotensin II and angiotensin converting enzyme and increase in ejecting fraction ($P<0.05$,$<0.05$,$<0.001$,$<0.01$ and $<0.05$ respectively,compared with the regular treatment group).These results suggest that inducing process of ventricular remodelling was resisted by ACEI.The study provide theroretic evidence and effective measurement for the treatment in children with refractory heart failure.

**KEY WORDS** Renin angiotensin system;Congestive heart failare;Angiotensin converting enzyme inhibitor