

## 检测蛋白酶活性的双向凝胶电泳技术

刘清岱 刘竹芸 任岩 朱晔荣 王勇\*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

## A Two-dimensional Gel Electrophoresis for Detecting Protease Activity

LIU Qing-Dai, LIU Zhu-Yun, REN Yan, ZHU Ye-Rong, WANG Yong\*

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

**摘要** 介绍了双向凝胶电泳技术和蛋白酶活性检测相结合的蛋白酶电泳检测方法。第一向采用等电聚焦, 第二向采用明胶-SDS-PAGE, 经氨基黑染色后, 可以得到清晰的蛋白酶活性斑点。文中对紫萍半叶状体衰老前后蛋白酶活性和种类的变化作了探讨。

**关键词** 明胶-SDS-PAGE; 双向凝胶电泳; 蛋白酶; 衰老

蛋白酶是一类降解蛋白质的水解酶, 在生物体蛋白质周转中起作用<sup>[1]</sup>。因此, 如何检测细胞生命活动过程中蛋白酶的活性和种类的变化很重要。测定细胞中蛋白酶的总活性变化比较容易, 只要测定粗酶液与底物的反应即可<sup>[2]</sup>。但是分离并测定某种蛋白酶的活性则较复杂, 过去常采用各种层析技术, 即将目标蛋白酶分离, 然后再测定活性<sup>[3]</sup>。这种方法步骤较繁琐。1993年, Michaud等<sup>[4]</sup>报导了明胶-SDS-聚丙烯酰胺凝胶(gelatin-SDS-PAGE)的蛋白酶活性分析方法, 此法可直接在电泳胶上准确地鉴定出具有蛋白酶活性的蛋白带, 从而了解其特性。此法具有灵敏度高、结果直观、检测方便等优点, 因而得到广泛的应用, 并不断被改进。如后来有人采用非变性梯度凝胶电泳法, 蛋白酶检测的灵敏度显著增加<sup>[5~7]</sup>。

植物的衰老涉及到蛋白质的降解, 已证明不少蛋白酶与植物的衰老相关<sup>[8,9]</sup>。Jiang等<sup>[10]</sup>用明胶-SDS-PAGE方法检测到与欧芹衰老相关的丝氨酸蛋白酶。Wang等<sup>[11]</sup>用此方法研究了与椰菜衰老相关的蛋白酶。我们用此法也研究了紫萍半叶状体衰老过程中蛋白酶的活性和种类变化, 发现在半叶状体的衰老过程中, 新表达的蛋白酶很难用传统的单向电泳分离开, 为此, 我们对这一方法作了改进, 得到比较满意的结果, 现报道如下。

### 材料与amp;方法

#### 1 实验材料

实验材料为浮萍科(Lemnaceae)紫背浮萍属的紫萍[*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid.] P143品系。

具体培养方法参见文献12。将生长一致的叶状体横切为两半, 留下无根和囊的半叶状体放在培养液上, 于长日照条件下培养。培养10 d后, 半叶状体的叶绿素含量下降至新鲜叶片的一半, 光合能力较低, 此时的半叶状体作为衰老处理材料。收集样品, 进行蛋白酶分析, 同时以新鲜的半叶状体作为对照。关于本衰老体系详见文献13。

#### 2 主要仪器和药品

仪器有BI0-RAD微型电泳仪。Ampholyte (两性载体电解质)的pH范围为3.0~9.5和4.0~6.0, 为军事医学科学院生产, 其他电泳试剂购自上海生工生物公司。

#### 3 可溶性蛋白含量测定

称取0.5 g紫萍半叶状体, 立即用液氮冷冻。加入2倍体积的蛋白提取缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5)充分研磨匀浆后以13 000×g于4℃下离心20 min, 取上清液备用。蛋白质含量测定参照Bradford<sup>[14]</sup>方法, 以牛血清清蛋白作标准曲线。

#### 4 总蛋白酶活性测定

按Chrispeels和Boulter<sup>[15]</sup>的方法, 以偶氮酪蛋白(azocasein)为底物测定可溶性蛋白中总蛋白酶的活性。酶反应在pH 7.5的Tris-HCl缓冲液中进行。

#### 5 明胶-SDS-PAGE检测蛋白酶种类和活性

按文献16的方法, 采用10%的分离胶和5%的浓缩胶, 样品处理液中不含β-巯基乙醇(β-

收稿 2005-06-09 修定 2005-10-13

资助 国家自然科学基金(39970077)。

\*通讯作者(E-mail: wangyong@nankai.edu.cn, Tel: 022-23504388)。

ME), 并在分离胶中加入 0.4% 的明胶。电泳完成后, 将分离胶在复性缓冲液(2% Triton X-100, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5)中充分浸泡30 min, 除去 SDS, 置于 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.5) 中, 于 37°C 下进行 8 h 的酶反应, 然后用氨基黑染色 30 min 后脱色。经脱色的凝胶背景为蓝黑色, 蛋白酶反应部位颜色消失, 凝胶中呈现出白色的蛋白酶条带。

## 6 双向凝胶电泳检测蛋白酶种类和活性

电泳采用平板系统。第一向为等电聚焦(iso-electric focusing, IEF), 按 Damerl 等<sup>[17]</sup>的方法进行。PAGE 浓度为 5%, 含 8 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素和 2% Ampholyte。蛋白质上样量为 15 μg。于室温、150 V 下电泳 30 min, 再在 300 V 下电泳 1.5 h, 最后于 600 V 下电泳 1 h。然后, 取出凝胶, 纵向切成 1 条宽约 1 mm 的胶条并将其放置于平衡缓冲液(不含 β-ME)中平衡 30 min 以上。第二向电泳按前述明胶-SDS-PAGE 法进行, 平衡后的胶条置于含 0.4% 明胶的分离胶上进行电泳。电泳在温度为 4~8°C 的冰箱中进行。然后, 按明胶-SDS-PAGE 进行蛋白酶的复性、酶反应、染色和脱色。脱色的凝胶呈现出白色的蛋白酶斑点。为了确定蛋白酶的分子量, 切取长约 1 cm 的空白凝胶块, 置于煮沸的蛋白质标记中共涡旋 10 min 作为蛋白质标记胶。然后将蛋白质标记胶块与平衡后的样品胶条一起在降低明胶含量至 0.1% 的 SDS-PAGE 中分析。在此条件下, 负染的酶斑点和正染的蛋白质标记可同时显现出来。

## 实验结果

### 1 紫萍半叶状体衰老过程中总蛋白酶活性的变化

紫萍半叶状体衰老过程中, 蛋白质含量减少, 蛋白酶活性增加。由图 1 可见, 切片衰老处理 10 d 后, 半叶状体中可溶性蛋白质含量下降为新鲜叶状体的 83%, 蛋白酶的水解活性增加 13 倍。

### 2 明胶-SDS-PAGE 方法检测蛋白酶

由图 2 可见, 衰老的紫萍半叶状体比新鲜的具有更多更亮的蛋白酶带, 但只能清晰地鉴定出 1 个蛋白酶, 其他蛋白酶都聚集在一起。这是由于衰老过程中, 出现了较多种类的蛋白酶, 而且它们分子量比较接近, 所以当酶反应完成后, 负染的蛋白酶带大多交叠在一起, 不易分辨。同样, 新鲜材料的带也无法分开。因此, 此法对含

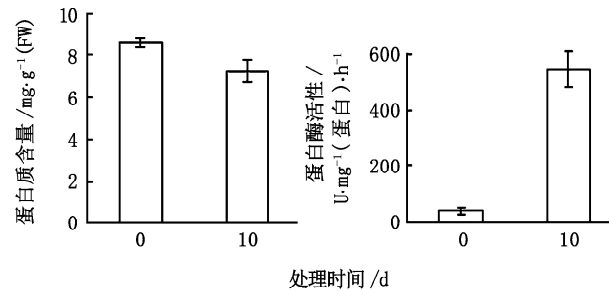


图1 紫萍半叶状体衰老过程中可溶性蛋白质含量和蛋白酶活性的变化

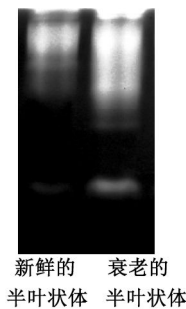


图2 传统明胶-SDS-PAGE 检测衰老的紫萍半叶状体中蛋白酶的活性

有较复杂蛋白酶样品的分析鉴定有一定的局限性。

### 3 双向凝胶电泳方法检测蛋白酶

先选择宽范围 pH 值 (3.0~9.5) 的条件下进行 IEF, 然后再进行明胶-SDS-PAGE。不同蛋白酶经由 2 次电泳分离后, 检测分辨率大大提高。图 3 显示, 用改进的方法至少在衰老的紫萍半叶状体中可检测到并分离出 14 种不同的蛋白酶 (EP1~14), 在正常生长的半叶状体中检测到 4 种蛋白酶 (EP2、EP5、EP6、EP7)。

### 4 蛋白酶分子量的确定

如图 4 所示, 通过在第二向电泳中降低明胶的含量至 0.1% (质量体积比), 可以使正染的标记蛋白条带和负染的蛋白酶斑点同时显现出来, 从而确定蛋白酶的表征分子量。经计算, 检测到的蛋白酶 EP1、EP6、EP7、EP2、EP8 分子量分别为 35、45、50、51 和 91 kD。

## 讨论

明胶-SDS-PAGE 方法以其结果直观、检测方便等优点在检测蛋白酶活性中得到广泛应用。但无法满足对复杂样品中蛋白酶的检测, 如本文采用此方法研究衰老的半叶状体时仅仅能鉴定出 1

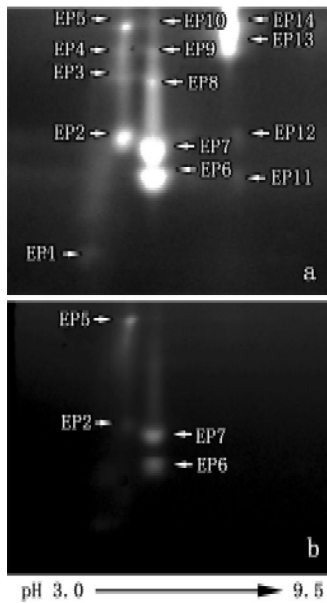


图3 双向凝胶电泳检测的紫萍半叶状体中蛋白酶活性  
a: 衰老的半叶状体; b: 新鲜的半叶状体。

条蛋白酶带, 而其他的蛋白酶带呈现纵向亮带, 这可能是大量分子量相近的蛋白酶无法得到更好的分离所致(图2)。也就是说, 仅仅依靠分子量一种条件来分离复杂蛋白酶样品是远远不够的。用本文介绍的双向凝胶电泳可有效地将各种蛋白酶分开, 并在第二向电泳后检测到活性。此方法稳定、可靠、重复性好, 改变不同 pH 范围的两性电解质还可以增加蛋白酶斑点的分辨率。此外, 在酶反应液中加入蛋白酶的抑制剂可以方便地了解蛋白酶的类型(结果待发表), 降低凝胶中底物明胶的含量可以估测主要蛋白酶的分子量(图4)。

采用本文方法应注意以下问题: (1) 选择适当范围的两性电解质; (2) 经 IEF 后, 胶条平衡的时

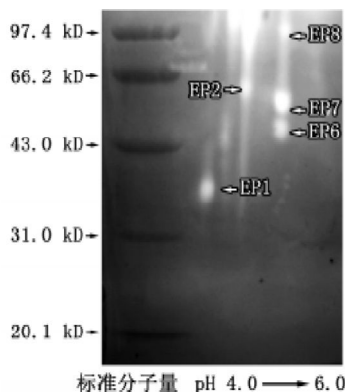


图4 蛋白酶分子量的确定

间不宜过长, 平衡缓冲液中不含  $\beta$ -ME, 以免使一些对  $\beta$ -ME 敏感的蛋白酶丧失活性; (3) 第一向 IEF 应该在室温下进行, 而第二向电泳在较低温度 ( $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ ) 下进行; (4) 适当延长蛋白酶的复性时间和酶反应时间, 这样可以使更多的蛋白酶斑点出现。

### 参考文献

- 1 Vierstra RD. Protein degradation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 385~410
- 2 高玲, 叶茂炳, 张荣铤等. 小麦旗叶老化期间的内肽酶. *植物生理学报*, 1998, 24(2): 183~188
- 3 Chen Y, Ma YT, Rando RR. Solubilization, partial purification, and affinity labeling of the membrane-bound isoprenylated protein endoprotease. *Biochemistry*, 1996, 35(10): 3227~3237
- 4 Michaud D, Faye L, Yelle S. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. *Electrophoresis*, 1993, 14: 94~98
- 5 芮琪, 徐朗莱. 用凝胶电泳法研究小麦叶片衰老期间的内肽酶同工酶. *南京农业大学学报*, 2002, 25(3): 85~88
- 6 Zhang ZG, Rui Q, Xu LL. Relationship between endopeptidase and  $\text{H}_2\text{O}_2$  during wheat leaves aging. *Acta Bot Sin*, 2001, 43: 127~131
- 7 Distefano S, Palma JM, Gómez M et al. Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochem J*, 1997, 327: 399~405
- 8 袁政, 张大兵. 植物叶片衰老的分子机制. *植物生理学通讯*, 2002, 38(4): 417~422
- 9 Lohman KN, Gan S, John MC et al. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994, 92: 322~328
- 10 Jiang WB, Lers A, Lomaniec E et al. Senescence-related serine protease in parsley. *Phytochemistry*, 1999, 50: 377~382
- 11 Wang YT, Wang CY, Chen YT et al. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(7~8): 663~670
- 12 Wang Y, Kandeler R. Promotion of flowering by a tumor promoter. *J Plant Physiol*, 1994, 144: 710~713
- 13 Li WM, Liu QD, Xiong Y et al. Significant role of cytokines in maintaining the life of fronds in *Spirodela polyrhiza*. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2003, 29(3): 215~220
- 14 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- 15 Chrispeels MJ, Boulter D. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of endopeptidase. *Plant Physiol*, 1975, 55: 1031~1037
- 16 周相娟, 姜微波, 赵玉梅等. 香菜叶片衰老相关63 kD蛋白酶的分析鉴定. *科学通报*, 2002, 47(9): 693~696
- 17 Damerval C, De Vienne D, Zivy M et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seeding proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52~54