维普资讯 http://www.cqvip.com

云 南 植 物 研 究 2001, 23 (2): 236~238
Acta Botanica Yunnanica

常规聚丙烯酰胺凝胶电泳快速检测胰蛋白酶抑制剂的方法*

桑玉英，胡金勇，曾 英**
(中国科学院昆明植物研究所植物生物技术室，云南 昆明 650204)

关键词 明胶，聚丙烯酰胺凝胶电泳；大豆胰蛋白酶抑制剂；波叶青牛胆粗提胰蛋白酶抑制剂

中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700(2001)02-03

A Fast Method for the Detection of Trypsin Inhibitors Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SANG Yu-Ying, HU Jin-Yong, ZENG Ying
(*Laboratory of Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Key words: Gelatin; Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE); Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI); *Tinospora crispa* Trypsin Inhibitor (TCTI)

SDS-PAGE-明胶电泳是检测蛋白酶抑制剂的常用方法，基本原理为：聚丙烯酰胺凝胶中加入SDS和明胶，SDS使蛋白酶抑制剂发生可逆变性。电泳完毕，用Triton X-100恢复凝胶板中蛋白酶抑制剂的活性，凝胶板置于蛋白酶溶液里保温，含蛋白酶抑制剂部位的明胶不被蛋白酶水解而呈现蛋白染色带. SDS-PAGE-明胶电泳检测蛋白酶抑制剂时，在同一块凝胶板上可同时检测酸性、碱性及中性的蛋白酶抑制剂，但电泳后处理（包括复性，酶解，漂洗和染色）时间长（约20 h），而且对于同一样品中分子量相近的蛋白酶抑制剂用该方法得不到很好的分离和检测. 因此，我们发展了常规PAGE-明胶电泳检测法。本方法不必复性，电泳后处理时间大为缩短（约3 h），在一定程度上也提高了检测灵敏度，尤其适于检测在SDS-PAGE-明胶电泳中得不到很好分离的蛋白酶抑制剂样品.

1 材料与方法

波叶青牛胆（*Tinospora crispa*）采自西双版纳，置-20℃冷藏待用；大豆胰蛋白酶抑制剂（Soybean Trypsin Inhibitor）、Acrylamide（Acr）为Sigma产品；N, N'-Methylene-bis-acrylamide（Bis）为Fluka产品；其余试剂均为国产分析纯.

SDS-PAGE：按Laemmli（1970）的方法进行.

* 云南省自然科学基金资助项目（1999C0077M）
** 通讯作者
收稿日期：2000-05-09，2000-06-20接受发表

维普资讯 http://www.cqvip.com

SDS－PAGE－明胶电泳：采用 Jatinder（1983）等的方法，凝胶板在胰蛋白酶溶液（140 BAEE units/mL）中保温 16 h，复性，清洗，染色等其它步骤约需 4 h。

常规 PAGE－明胶电泳：

1）PAGE－明胶电泳　根据 Pharmacia（1984）方法进行，略作改动。

碱性 PAGE－明胶系统（适于检测中性或酸性的蛋白酶抑制剂）：分离胶含 7% Arc、0.2% Bis 和 0.75mg/mL 明胶，pH 8.8；浓缩胶含 4% Arc 和 0.1% Bis，pH 6.8。酸性 PAGE－明胶系统（适于检测碱性的蛋白酶抑制剂）：分离胶含 14% Arc、0.1% Bis 和 0.75 mg/mL 明胶，pH 4.3；浓缩胶含 4% Arc 和 0.1% Bis，pH 6.8。

2）酶解　根据 Rosenberg（1996）的方法进行。电泳完毕，将凝胶板置于 0.1mg/mL（220 BAEE units/mL）胰蛋白酶溶液中，37℃下保温 1 h。室温下用 50 mmol/L Tris－HCl，pH 7.5（内含 0.2 mol/L NaCl，0.01 mol/L $CaCl_2$，0.01% $ZnCl_2$，0.02% NaN_3）的反应基质溶液漂洗酶解过的凝胶板 1 h 并多次更换溶液，在摇床上进行。胰蛋白酶溶液由反应基质溶液配制而成。

3）显色　漂洗完毕，染色 1 h 后脱色至背景清晰。染色液：0.1%（w/v）氨基黑 10B、30%（v/v）甲醇、10%（v/v）乙酸。脱色液：40%（v/v）甲醇、10%（v/v）乙酸。

2 结果与讨论

SDS－PAGE－明胶电泳是检测蛋白酶抑制剂的常用方法。Jatinder（1983）等的 SDS－PAGE－明胶检测法耗时长，凝胶板与蛋白酶溶液（140 BAEE units/mL）的保温时间为 16～18 h，复性等其它处理约需 4 h，电泳后处理过程总共需要 20 h 左右。用这种方法检测大豆胰蛋白酶抑制剂（Soybean Trypsin Inhibitor，SBTI）和波叶青牛胆粗提胰蛋白酶抑制剂（*Tinospora crispa* Trypsin Inhibitor，TCTI），结果见图 1：a，b。经过改进，我们提高了蛋白酶溶液的浓度，将凝胶板与蛋白酶溶液（220 BAEE units/mL）的保温时间缩短为 1 h，其它步骤同 Jatinder 的方法，电泳后处理过程只需 5 h（图 1：c，d）。比较分析电泳图谱发现：第一，电泳后处理过程所用时间越长（图 1：a，b），不同蛋白酶抑制剂显示的染色轮廓越不清晰，其原因可能是蛋白酶抑制剂在长时间的处理过程中发生扩散，使得同一泳道中不同抑制剂之间的界限模糊不清；第二，图 1 中 a 和 c 的上样量相同，但 c 的染色结果却比 a 多了一条带，分析其原因可能是在长时间的处理过程中，该抑制剂由于分子量较小而更易扩散，直至从凝胶中消失，最终未表现出抑制效果；还有可能是在复杂的处理过程中丧失了其抑制活性。而短时间的处理（图 1：c，d）减少了蛋白酶抑制剂发生扩散和抑制活性丧失的可能性，从而可清晰辨认不同抑制剂显示的染色轮廓，在一定程度上提高了灵敏度。

样品中经常会含有多种蛋白酶抑制剂。如果这些蛋白酶抑制剂具有较大的分子量差异，那么用 SDS－PAGE－明胶电泳检测法可以较好地检测到各抑制剂的活性。但是如果这些抑制剂具有十分相近的分子量（如波叶青牛胆粗提胰蛋白酶抑制剂），SDS－PAGE－明胶电泳对其就不能进行很好的分离和检测。图 2 显示波叶青牛胆粗提胰蛋白酶抑制剂在 SDS－PAGE－明胶和常规 PAGE－明胶电泳中的检测结果并与不含明胶的电泳结果进行比

维普资讯 http://www.cqvip.com

较，得知：波叶青牛胆粗提抑制剂在 SDS－PAGE 和 SDS－PAGE－明胶中显示 3 条活性蛋白带（图 2：a、d）；在碱性 PAGE 中显示 4 条蛋白染色带（图 2：b），而碱性 PAGE－明胶电泳检测发现其中 3 条具有胰蛋白酶抑制活力（图 2：e）；在酸性 PAGE 中显示 6 条带（图 2：c），而酸性 PAGE－明胶电泳检测结果是其中 4 条具抑制活力（图 2：f）。另外，比较 SDS－PAGE－明胶与常规 PAGE－明胶电泳（图 2：d，e，f），发现前者的上样量虽是后者的 5 倍，但其蛋白染色带明显浅于后者，说明常规 PAGE－明胶电泳的检测灵敏度比较高。

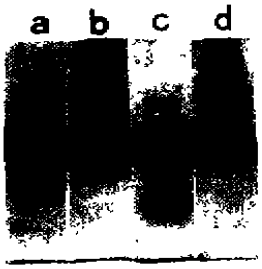

图 1 SDS－PAGE－明胶电泳检测大豆胰蛋白酶抑制剂和波叶青牛胆粗提胰蛋白酶抑制剂的抑制活力各浓度的上样量均为 10μg。a 和 c 为大豆胰蛋白酶抑制剂，b 和 d 为波叶青牛胆粗提抑制剂。a 和 b 的电泳后处理时间为 20 h，c 和 d 的为 5 h。

Fig. 1 Inhibitory activity of SBTI and TCTI detected against trypsin using gelatin in the SDS－PAGE gels. a and c, SBTI (10μg); b and d, TCTI (10μg). After electrophoresis a and b were treated for 20 h, while c and d for 5 h.

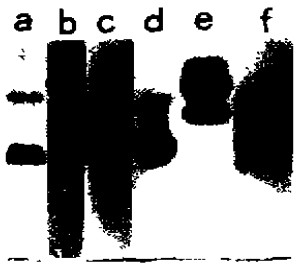

图 2 波叶青牛胆粗提胰蛋白酶抑制剂的电泳检测结果：a（14μg），b（8μg）和 c（7μg）分别为粗提胰蛋白酶抑制剂在 SDS－PAGE、碱性 PAGE 和酸性 PAGE 中的电泳结果；d（5μg）、e（1μg）和 f（1μg）分别为粗提胰蛋白酶抑制剂在 SDS－PAGE－明胶、碱性 PAGE－明胶和酸性 PAGE－明胶电泳中的检测结果。电泳后处理时间均为 3 h。

Fig. 2 Analytical electrophoresis of TCTI. a, b and c (14, 8, and 7μg) were electrophoresed in the SDS－PAGE, Anodic－PAGE and Cathodic－PAGE respectively; d, e and f (5, 1, and 1μg) were detected against trypsin using gelatin in the SDS－PAGE, Anodic－PAGE and Cathodic－PAGE respectively. After electrophoresis d, e and f were treated for 3 h.

以上实验结果表明，仅用 SDS－PAGE－明胶电泳尚不足以完全检测到样品中的蛋白酶抑制活性。在检测分子量相近而电荷密度不同的蛋白酶抑制剂样品时，常规 PAGE－明胶电泳检测法要比 SDS－PAGE－明胶电泳具有明显的优势，表现在步骤简单，电泳后处理时间大为缩短，蛋白染色带轮廓清晰，灵敏度较高等多个方面。

〔参考文献〕

Jatinder S H, Gilhan B B, Peter G, 1983. Detection of protease inhibitors using substrate－containing sodium dodecyl sulfate－polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Analytical Biochemistry*, **132**: 288－293.

Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, **277** (7): 680－685.

Pharmacia, 1984. Polyacrylamide gel eletrophoresis [M]., Sweden: Uppsala, 121－123.

Rosenberg I M, 1996. Protein Analysis and Purification [M]. Boston: Birkhauser, 92－93.