

文献综述

硒蛋白及其分离分析

陈汉杰 欧阳政 蔡端仁

(暨南大学化学系, 广州, 510632)

1957年 Schwarz 等^[1]证明硒是人体必需的微量元素之后, 国内外开展了许多总硒及其生物化学作用的研究。大量事实表明硒与多种疾病相关^[2], 我国用补硒方法防治克山病获得成功^[3], 进一步证实了硒的营养作用。近年来, 有关硒的生物医学作用的研究已逐渐从总硒转向对有机硒化合物的研究, 后者主要集中于含硒氨基酸、含硒多肽、含硒蛋白和近几年才提出的含硒核酸^[4]。

就整个生物界来看, 动物、植物和微生物中均发现有硒蛋白存在。在已发现的硒酶中, 硒主要以硒半胱氨酸(SeCysH)形式存在于蛋白质的多肽链中^[5]。因此, 分离和分析生物体内的硒蛋白, 研究其结构和功能的关系, 对于从分子水平上阐明某些疾病的发病机理有重要意义。刘元方等^[6]对动物和细菌硒蛋白作了综述, 但未涉及植物硒蛋白。本文综述动、植物和微生物中的硒蛋白, 并重点综述硒蛋白的分离和分析。

一、硒蛋白的来源

(一) 动物硒蛋白

在 Schwarz 发现硒的营养作用的同一年^[1], Mills 等^[7]从红细胞中分离得到一种以谷胱甘肽(GSH)为氢供体, 使 H₂O₂、RCOOH 还原为水的酶, 由于当时分离分析技术的限制, 人们对该酶的物化性质了解甚少。直到 1972 年, 经过 Rotruck 等^[8]的反复研究, 发现

硒是此酶的一个重要组分, Flohe 等^[9]将从牛红细胞分离得到的谷胱甘肽酶命名为谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)或硒酶(selenoenzyme)。GSH-Px 是迄今为止从哺乳动物中发现的唯一的含硒酶。它广泛地存在于机体的各种组织中。前人还先后从羊^[10]人红细胞^[11]、鼠肝、牛晶状体^[13]和兔肝^[14]等动物组织中分离得到纯度很高的 GSH-Px。近十几年来, 又陆续从羊、鼠体内分离出一些硒蛋白(参见表 1)。

表 1 某些新近发现的动物硒蛋白

来源	分子量	参考文献
羊羔心脏	10,000	[15]
大鼠睾丸	16,000	[16]
大鼠精子尾	17,000	[17]
大鼠肝	83,000	[18]
Yellowfin Tuna 肝	2,000	[19]

(二) 微生物硒蛋白

早在 1954 年 Pinsent^[20]就发现大肠杆菌中的甲酸脱氢酶的活性与硒有关, 但直到 1972 年, 甲酸脱氢酶才被正式鉴定为硒酶^[21]。迄今为止, 至少已经有七种细菌蛋白被鉴定为硒酶(参见表 2)。微生物已经成为硒蛋白的丰富来源。1985 年, 刘曼西等^[22]从硒酵母中初步分离得到硒蛋白, 每克蛋白含硒量达 450μg。由于从动、植物获得的蛋白量有限, 因此, 从微生物提取硒蛋白具有十分广泛的前景。

(三) 植物硒蛋白

表 2 一些细菌硒蛋白的来源^[6]

种类	分子量	硒数(摩尔 Se / 摩尔蛋白)	来源
甲酸脱氢酶	600,000	4	E. Coli., Clostridium thermoacetium
甘氨酸还原酶			Clostridio
烟酸羟化酶			Clostridium barkeri
黄嘌呤脱氢酶	300,000		C. acidurici
硫酶	160,000		Clostridium Kluyveri
含硒氢化酶	340,000	3.8	Methanococcus vannielii
含钨甲酸脱氢酶	340,000	2	Clostridium thermoacetium

植物硒的研究要追溯到上个世纪^[23]。1880 年,

Cameron 根据硒对植物生长的影响的实验结果, 提出

了一个重要的见解^[24],由于植物中的硫和硒性质相似,硒可以部分乃至全部取代硫。这种认识直接影响后来人们对植物硒的研究,由于硒化合物的不稳定性,早期鉴定硒在植物中的存在形式遇到了一定的困难,离子交换色谱的发展有力地推动了硒化合物的研究。越来越多的证据显示植物硒蛋白中含有硒蛋

酸和硒半胱氨酸^[25,26]。最近,王卫真等^[27]从大蒜中初步分离出硒蛋白,纸色谱证实蛋白中含有硒蛋氨酸和硒半胱氨酸。表3列示了一些高等植物中存在的主要有机硒化合物。

二、硒蛋白的分离纯化

表3 高等植物中存在的主要有机硒化合物^[28]

硒化合物	结构式	植 物
Se-甲基硒代半胱氨酸	$\text{CH}_3-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Astraglus spp
硒代胱氨酸	$(\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{Se})_2$	Brome grass
硒代蛋氨酸	$\text{CH}_3-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Wheat
硒多肽		Astraglus spp
二甲基二硒醚	$\text{CH}_3-\text{Se}-\text{Se}-\text{CH}_3$	Astraglus racemosus
硒代高胱氨酸	$(\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_2-\text{Se})_2$	Astraglus crotalariae
硒代半胱氨酸亚硒酸	$\text{HO}_2-\text{Se}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Trifolium pratense
Se-丙烯基硒代半胱氨酸氧化物	$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{Se}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Allium cepa

早期分离天然硒氨基酸和硒蛋白遇到下列困难:

(1)硒化合物和硫化合物的纸色谱、电泳行为相似,难以分开;(2)硒化合物不稳定。六十年代以来,随着现代分离分析技术的发展,特别是高分辨电泳、凝胶电泳和离子交换色谱的普遍应用,为硒蛋白的分离开拓了前景,根据硒蛋白的性质,可采用下列各种方法加以分离和提纯:(1)依据离子特性不同:沉淀、电泳和离子交换色谱;(2)依据吸附性能不同:吸附及亲和色谱;(3)依据粒子大小不同,凝胶电泳、透析、超滤及超速离心等。

(一)分级沉淀^[12,15]

利用盐析作用将硒蛋白在不同中性盐浓度下,从蛋白质混合液中析出,从而达到初步分离的目的。通常使用硫酸铵作沉淀剂,经过盐分级后的硒蛋白含有硫酸铵,必须透析除盐,对那些对温度敏感的硒蛋白,还必须控制操作温度,象 GSH-Px 全部操作均须在 4℃ 下进行。

(二)凝胶电泳

自六十年代葡聚糖应用于柱色谱,特别是琼脂糖及聚丙烯酰胺的应用,已使凝胶电泳法成为分离纯化蛋白质的重要方法之一。目前已经分离和纯化的若干种硒蛋白,诸如谷胱甘肽过氧化物酶^[12]、甲酸脱氢酶等,均使用凝胶电泳法。常用于分离纯化硒蛋白的凝胶有: Sephadex G-(100, 150 或 200), Bio-Gel A、Octyl-Sepharose、Phenyl-Sepharose 和 Valine-Agarose 等。

(三)离子交换色谱

早在 1958 年, Mills 等^[29]就应用 DEAE-纤维素柱来分离 GSH-Px, 现在, DEAE-纤维和 DEAE-葡聚糖凝胶离子交换色谱已成为硒蛋白分离纯化的有效方法, Nakamura 等^[12]应用 Sephadex-G200 和多次 DEAE-Sephadex A-50 柱色谱,得到了电泳匀一的 GSH-Px。常用于硒蛋白分离纯化的离子交换剂还有: 羧甲基纤维素(CM-纤维素)、二乙氨基纤维素(DEAE-纤维素)、二乙基(2-羟丙基)氨基纤维素(QAE-纤维素)以及 DEAE-Agarose, CM-Sephadex 等。其中以 DEAE、CM、QAE 葡聚糖应用最广。

(四)电泳

目前在硒蛋白的分离和纯化中主要利用聚丙烯酰胺电泳来检测纯度和亚基的测定^[12]。某些情况下也作硒蛋白的微量分析^[27]。近年来,一些新的电泳技术的应用,丰富了分离纯化硒蛋白的手段。Syliva 等^[19]将等电聚焦技术应用于硒蛋白的分离,而免疫吸附法的建立和发展开辟了纯化天然物质的新途径^[30],是一种非常优良的蛋白分离分析方法,若将此法应用于硒蛋白质分离纯化,必然会大大推动硒蛋白的研究。

三、硒蛋白的分析

近三十年来,随着现代分析技术的发展及其在生物化学领域的广泛应用,硒蛋白的分析获得了长足的进步,离子交换法及以此为基础发展起来的氨基酸自

动分析仪成为氨基酸分析的里程碑。薄层色谱(TLC)仍是鉴定硒蛋白的有效方法。值得一提的是,高效液相色谱(HPLC)已经应用于硒蛋白的分析^[31],能直接用于微量硒蛋白的分析和分离,是一种很有前途的方法。此外,气相色谱^[32]红外光谱^[33],质谱^[34]和X射线分析法^[35]均已用于硒蛋白的分析研究。总的来看,硒蛋白的分析已取得相当进展,但由于其在生物体内往往是微量组分,且水解过程不稳定,给分析工作带来一定难度,特别是无法准确的定量分析。今后应着重发展:(1)快速准确的水解法;(2)非水解法直接测定硒蛋白组分,尤其是应用气相色谱法测定硒半胱氨酸和硒胱氨酸;(3)联合使用各种分析技术重点解决功能清楚的硒蛋白的结构分析。

(一) 硒蛋白的水解

传统酸水解法(5.7mol/L HCl, 110°C, 7hr)易使硒蛋白遭到破坏,而酶水解法往往不完全,使准确度下降,且时间冗长。早在五十年代,就有人对硒氨基酸的水解进行研究,Whithead^[36]认为在除氧传统酸水解条件下,硒蛋氨酸稳定;1969年,Shepherd^[37]认为在上述条件下,硒蛋氨酸完全分解,显然,这是两个矛盾的结论。1981年,Beilstein^[38]认为在惰性气氛中,游离态的硒半胱氨酸的回收率常量、微量达到80—90%,但此结论是否适合硒蛋白中结合态硒氨基酸还有待进一步确证。1985年,刘曼西^[22]认为改变传统水解法,采用低酸度、低温度、长时间条件,可提高硒氨基酸的回收率,1986年,Syliva等^[19]认为加入还原剂并通N₂,可提高硒蛋白的稳定性;1988年,谢丽琪、欧阳政^[39]在上述基础上提出除氧改良水解法,该法对结合态硒氨基酸的回改率达84%,是目前准确度较高的水解法。近年还采用衍生化提高Se-CysH的稳定性^[40]。

(二) 氨基酸分析

氨基酸自动分析仪的发展成功地解决了常规氨基酸的快速分析(参见表4)。但是,对硒氨基酸的分析包括使用离子交换色谱、反相HPLC和薄层色谱等方法,均只能获得定性或半定量的结果。直到1988年,吴江、欧阳政^[32]在前人的基础上提出非水解的CNBr-气相色谱法,才较成功地解决了硒蛋白中硒蛋氨酸的定量分析。1989年,翟萍萍、欧阳政^[42]应用气相色谱测定了硒酵母中硒蛋氨酸的光学构型,至此,硒蛋氨酸的定性定量分析基本解决。但是,另外两个重要的硒氨基酸——硒半胱氨酸和硒胱氨酸的准确定量分析还未解决。解决这个问题一个途径是将硒半胱氨酸(或硒胱氨酸)甲基化(或还原后甲基化)再用CNBr-气相色谱法分析,但首先必须保证衍生

反应的定量进行。目前这方面的工作已获解决。

表4 不同来源的GSH-Px的常规氨基酸组成^[41]

氨基酸	牛红细胞			大鼠肝
	A	B	C	D
Cys	2	2	?	2
Met	2	—	2	3
Asp	16	16	16	14
Glu	18	18	12	15
Trp	—	—	2	1
Tyr	4	—	4	5
Phe	13	8	13	7
Gly	16	16	19	13
Ala	12	11	19	10
Val	13	10	15	11
Leu	21	17	20	15
Ile	7	5	7	8
Ser	9	8	9	9
Thr	10	8	8	8
His	2	—	2	4
Arg	14	9	9	7
Lus	7	5	6	11
Pro	13	—	13	10

参 考 文 献

[1] K. Shwarz et al., J. Am. Chem. Soc., 79, 3292(1957).
 [2] 吴德才译, 职业医学, 11, 250(1984).
 [3] Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Science et al., Chinese Med. J., 92, 471 (1979).
 [4] 吴有能, 生命的化学, 7(3), 36(1987).
 [5] R. A. Sunde, J. Am. Oil Chem. Soc., 61 (12), 1891 (1984).
 [6] 刘元方等, 生物科学动态, 1, 9(1985).
 [7] G. C. Mills, J. Biol. Chem., 229, 180(1957).
 [8] J. T. Rotruck et al., Fed. Proc., 31, 691(1972).
 [9] L. Flohe et al., FEBS Lett., 32, 132(1973).
 [10] J. T. Rotruck et al., Science., 179, 588(1973).
 [11] Y. C. Awasthi et al., J. Biol. Chem., 250, 5144(1975).
 [12] W. Nakamura et al., Biochim. Biophys. Acta, 358, 251 (1974).
 [13] N. J. Holmberg, Exp. Eye Res., 7, 570(1968).
 [14] 韩珉等, 生物化学与生物物理学报, 18 (5), 438 (1986).
 [15] P. D. Wanger et al., Bioinorg. Chem., 2, 33(1972).
 [16] J. R. Prohaska et al., Chem Biol. Inter., 18, 253 (1977).
 [17] H. I. Calvin, J. Exp. Zool., 204, 445 (1978).
 [18] R. F. Burk et al., Arch. Biochem. Biophys., 213, 73

(1982).

[19] B. G. Syliva et al., *Comp. Biochem. Biophys.*, 83C(1), 13(1986).

[20] J. Pinsent, *J. Biochem.*, 57, 10(1954).

[21] A. C. Shum et al., *J. Bacteriol.*, 110, 447(1972).

[22] 刘曼西等, *华中工学院学报*, 13(3), 115(1985).

[23] D. L. Klayman, "Organic Selenium Compounds; Their Chemistry and Biology", Wiley-Interscience, P. 764, 1973.

[24] C. A. Cameron, *Sci. Proc. Roy. Dnblin Soc.*, 2, 231 (1980).

[25] K. J. Jenkins et al., *Can. J. Biochem.*, 45, 1027(1967).

[26] O. E. Olson et al., *Phytochemistry.*, 9, 1181(1970).

[27] 王卫真等, *生物化学杂志*, 5(3), 229(1989).

[28] D. L. Klaymam, "Organic Selenium Compounds; Their Chemistry and Biology", Wiley-Interscience, P. 786, 1973.

[29] G. C. Mills, *J. Biol. Chem.*, 234, 502(1958).

[30] B. Volesky et al., *CRC Critical Rev.*, 12, Issue 2, P. 119, 1985.

[31] M. X. Sliwkowski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (2), 368(1988).

[32] Wu Jiang et al., *Anal. Biochem.*, 178, 77 (1989); *Biomedical Chromatogr.*, 2(6), 258(1988).

[33] 徐辉碧等, *华中工学院学报*, 12(3), 81(1984).

[34] J. W. Forstrom et al., *Biochemistry*, 17, 2639(1978).

[35] L. Flohe, *Free Radicals in Biology*, Academic Press Inc., P. 227, 1982.

[36] E. I. Whitehead., *Proc. S. Dakoto., Acad. Sci.*, 34, 52 (1955).

[37] L. Shepherd et al., *Can. J. Biochem.*, 47, 877(1969).

[38] M. A. Beilstein et al., *J. Inorg. Biochem.*, 51(4), 89 (1981).

[39] 谢丽琪等, *色谱*, 8(4), 250(1990).

[40] T. C. Stadtman, *Methods in Enzymology*, 107, 39 (1984).

[41] 徐辉碧, *《生物微量元素》*, 华中工学院出版社, P. 92, 1984.

[42] 翟萃萍等, 暨南大学化学系 89 级硕士论文。

(收稿日期:1990年1月10日)

新型高效液相色谱固定相——多孔石墨化碳

张昌鸣

(中国科学院山西煤炭化学研究所, 太原, 030001)

高效液相色谱(HPLC)诸多固定相中,作为一独特分支的多孔石墨化碳(PGC),经历了近十年的开发,显示了新颖的、有生命力的特点。这方面,我国虽是空白,但碳素及色谱学科水平已具备开发条件,为此,笔者综述了有关 PGC 的发展历程、制备工艺, PGC 的 X-光衍射、扫描等特性表征及其在 HPLC 中应用,以期在我国推动这方面的工作。

一、PGC 应用于 HPLC 发展历程

碳质色谱填料中,应用石墨化炭黑(GCB)已有很久历史,早在 1969 年 Kiselev 等^[1,2],将其制成的 GCB 用作气相色谱柱填料,已可分离相当复杂的化合物。七十年代中期,我国已将碳质小球用于气相色谱,现有产品市售。

随着碳质填料的开发,其应用开始转向 HPLC 方面。理论研究表明,石墨化碳(GC)适用于作 HPLC 柱料。其中,热解碳(PC)易石墨化,可形成单质碳材料,避免了类似活性炭那样极不稳定的多活性端基的多

相表面的弊病。早在六十年代,活性炭就已被用作经典液体色谱的低压、大颗粒吸附剂^[3],但用作 HPLC 固定相,多数学者认为是是不可能的,原因就在于它的多相的杂原子表面,曾有某些活性炭表面改性的研究,但改效甚微^[4]。GCB 表面虽较活性炭均一,但机械性能差,难以承受 HPLC 的高压操作,也不能实际应用。1976 年 Colin 等^[5]以惰性气体中热解苯,生成热解炭黑(GCB)。此种碳材料虽能承受高压,但颗粒性已发生了巨变,表面积减少,活性端基增多,用于 HPLC 时,因填料的活性化而使溶质峰呈明显拖尾,形成很高的容量因子。

1981 年 Cicciooli 等^[6]从另一途径开发 HPLC 的碳质固定相,将用于气相色谱的石墨化炭黑 Carbo-pack B 的 80-100 目进行筛分;并以丙酮冲洗,以降低颗粒间的凝聚力;多次筛选,获得粒径为 25-33 μ m, 33-45 μ m, 75-88 μ m 的三个筛分,并将各筛分以干法装于玻璃柱中,考察了不同粒度、塔板高度、线速间的关系,并用于增塑剂的分析,取得较好结果。