

$A_{260} = 0.87$, $A_{270}:A_{260} = 1.03$, $A_{280}:A_{260} = 1.01$, $A_{290}:A_{260} = 0.68$, 碱水解后得 Gp:C=0.99:1。峰3为 GpGpC(纯度 69%), 需经 pH2.7 电泳进一步纯化, 纯化后样品纸层析 R_f 0.60, 纸电泳 R_m 0.56, 光谱比值 (pH2): $A_{250}:A_{260} = 0.92$, $A_{270}:A_{260} = 0.88$, $A_{280}:A_{260} = 0.81$, $A_{290}:A_{260} = 0.54$, 碱水

解后得 Gp:C = 1.87:1。

72 毫克 G > p 铵盐(0.2 毫克分子), 16 毫克尿苷(0.067 毫克分子)、66 单位(22 微升) N_1 酶在 0.2 毫升 0.1M 磷酸缓冲液中 30℃ 反应 4 天, 也能得到较好的 GpU 连接产率。结果见表 2。

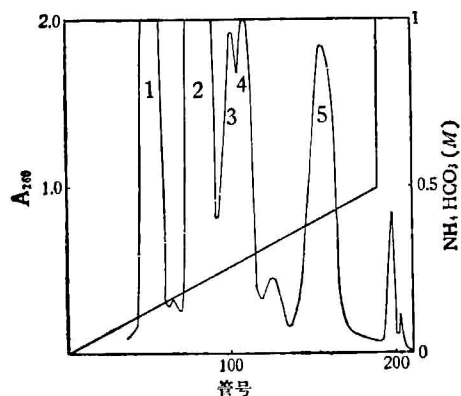


图 4 GpC 和 GpGpC 的柱层析分离

DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (HCO_3^- 型, 1×30 厘米)。先用 0—0.5M NH_4HCO_3 直线梯度 (500 毫升对 500 毫升) 洗脱, 再用 1M NH_4HCO_3 洗脱。流速为 5 毫升/15 分钟, 峰 1 为 GpC, 峰 2 为 Gp, 峰 3 为 GpGpC, 峰 4 为异常的 (Gp)₂, 峰 5 为 GpGp。

参 考 文 献

- [1] Koike, T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **190**, 257, 1969.
- [2] Uchida, T. et al.: *J. Biochem.*, **81**, 1237, 1977.
- [3] Koike, T. et al.: *J. Biochem.*, **70**, 55, 1971.
- [4] 中国科学院生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 第 10 期, 第 127 页。
- [5] 中国科学院生物物理研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理进展》, 1980 年, 第 5 期, 第 40 页。
- [6] Podder, S. K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 569, 1969.
- [7] Omori, A. et al.: *J. Biochem.*, **76**, 117, 1974.
- [8] Fikus, M.: *Acta Biochem. Polonica*, **21**, 145, 1974.
- [9] 中国科学院生物化学研究所二室核酸合成组:《生物化学与生物物理学报》, 1980 年, 第 12 期, 第 29 页。
- [10] Smith, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6204, 1958.

[本文于 1980 年 3 月 3 日收到]

猪肾的二种碱性磷酸酶

费如珍

(南京中医学院)

徐 愤

(南京医学院)

碱性磷酸酶是免疫酶技术中应用方便的一种酶制剂。我们从猪肾分离出碱性磷酸酶; 并证明猪肾中碱性磷酸酶有 A 和 B 两种。

材 料 和 方 法

1. 猪肾浸出液 宰后的新鲜猪肾, 立刻在冰下剥去包膜和脂肪组织。选取肾实质 3 公斤, 加蒸馏水 1 升, 分批捣碎, 加正丁醇 1 公斤, 再混匀, 10℃ 下放置过夜。第二天将匀浆 2000 转离心 45 分钟, 约得浸出液 1 升。肾残渣 -15℃ 冻存。

2. OH 型 DEAE 纤维素 DEAE 纤维素

装进层析柱, 依次用 0.5N NaOH 和蒸馏水洗净。用过的 DEAE 纤维素依次用 0.1N HCl、蒸馏水, 0.5N NaOH 和蒸馏水洗涤后可连续使用。

3. NaCl 平衡的 DEAE 纤维素 将 OH 型 DEAE 纤维素用 0.5 M NaCl 充分平衡, 再用蒸馏水洗去 NaCl。

4. 酶活性 洗出液的酶活性, 按照 King 和 Wootton^[1] 的方法检查, 即 0.10M Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲液 (pH10) 1.0 毫升与 0.01M 磷酸酐二钠 1.0 毫升混和, 在 37℃ 水浴中平衡 3 分钟后加洗出液(用水 1:20 稀释)0.05 毫升, 混

匀后在 37℃ 保温 15 分钟,加 0.5N NaOH 0.8 毫升停止酶反应,再加 0.5M NaHCO₃ 1.2 毫升,0.6% 氨基安替比林 1.0 毫升,混匀后加 2.4% K₃Fe(CN)₆ 1.0 毫升。测定 510 毫微米波长的消光度。以释放 1 毫克酚的酶量定做 1 个单位。

5. 蛋白质浓度 用 Lowry 等法^[2]测定。层析洗脱液中蛋白质的相对浓度用 500 毫微米消光度表示。

6. ¹²⁵I-碱性磷酸酶 照以下的步骤制备,除 ¹²⁵I-NaI 外,所有溶液都用 pH7.5 0.10M 磷酸钠缓冲液配制。

碱性磷酸酶 B 125 微升(250 微克)

固相乳过氧化物酶 0.05 毫升(相当乳过氧化物酶 5 微克)

¹²⁵I-NaI(无载体) 20 微升(0.5 毫居里)

H₂O₂ 2 × 10⁻³M 25 微升

在冰浴中搅拌 30 分钟,加 NaI 和 NaN₃ 溶液 50 微升(每毫升含 NaI 6 毫克,NaN₃ 1 毫克)。然后转移到葡聚糖凝胶 G-25 柱上分离

¹²⁵I-碱性磷酸酶 B。

结果与讨论

1. 碱性磷酸酶 A 猪肾浸出液 1000 毫升,加固体硫酸铵 600 克,溶解后放置过夜。离心收集沉淀,然后对蒸馏水透析到电导度为 1 毫姆欧/厘米,离心弃去沉淀物。将上清液调节到 pH7.0,共得 680 毫升,全部通过 30 克 OH 型 DEAE 纤维素柱,(装在 3 × 80 厘米层析管中)。按流速 9 毫升/15 分钟,分段收集流出液,待溶液全部进入 DEAE 纤维素柱时,继续用蒸馏水冲洗,然后用盐浓度梯度洗脱。梯度混和器的下室装蒸馏水 500 毫升,上室为 1 M NaCl。检查各管收集溶液的酶活性,pH 和导电度。加样时有一个酶活性部分洗脱下来,盐浓度梯度洗脱时又有一个酶峰洗下。

将第 1 个酶洗脱峰混和共得 230 毫升,再次通过 DEAE 纤维素柱(OH 型,柱体积 60 毫升),然后用盐浓度梯度洗脱。梯度混和器的下室装蒸馏水 300 毫升,上室装 1 M NaCl。结

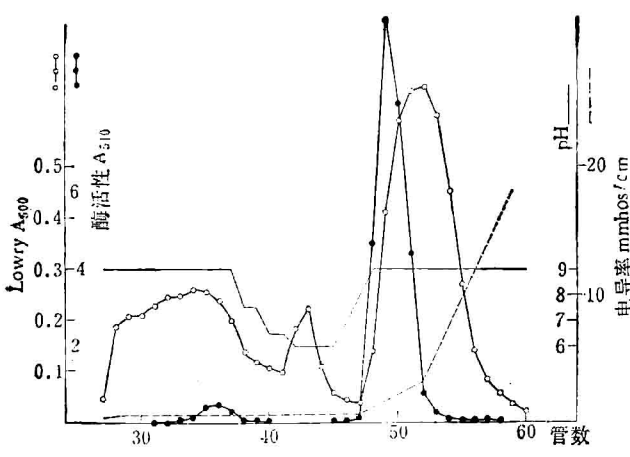


图 1 碱性磷酸酶的 DEAE 纤维素层析
加样过程中出现一个酶活性峰,溶液 pH 为 9,梯度洗脱时的主峰溶液的 pH 也是 9。

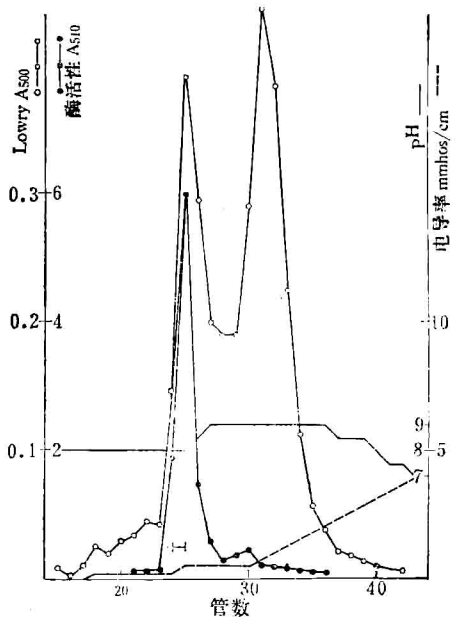


图 2 碱性磷酸酶 A 的第三次 DEAE 纤维素层析
柱体积 60 毫升,加样 80 毫升,盐浓度梯度条件
1M NaCl
H₂O 300 毫升 流速每小时 18 毫升,按 15 分钟分段收集洗出液。

果见图 1。

图 1 中的主酶峰部分混和得 25 毫升,加蒸馏水稀释到电导度为 1 毫姆欧/厘米,并调节 pH 到 7.0,再加在 DEAE 纤维素上层析。为了消除 OH 型 DEAE 纤维素的碱化影响,层析前将 OH 型 DEAE 纤维素用 0.5M NaCl 充分平衡,再用蒸馏水洗去 NaCl。结果见图 2。碱性磷酸酶在 pH8 处被洗脱下来,而在 pH9 洗脱的是杂质峰。将酶峰的上升部分混和冻干得碱性磷酸酶 A 制剂 40 毫克。其比活性为每毫克冻干样品 37 单位。

2. 碱性磷酸酶 B 用 OH 型 DEAE 纤维素层析分离碱性磷酸酶 A 时,出现二个酶活性峰,并且均在 pH9 时出现,第二个酶峰深棕色。为了确定它到底是一种碱性磷酸酶,还是层析的矫作物,又补充了如下实验。

冻存的肾组织渣在 -15℃ 和室温下经反复冻融后,挤出浸出液 850 毫升,加 510 克硫酸铵沉淀蛋白质。离心收集的沉淀再对蒸馏水透析,得 440 毫升;用蒸馏水稀释到 820 毫升(电导度为 1.9 毫姆欧/厘米, pH 6.5) 然后通过 30 克 OH 型 DEAE 纤维素柱,再用盐浓度梯度洗脱,得如前二个酶活性峰。然后将二个酶峰混和,透析得 140 毫升,测电导度为 0.27 毫姆欧/厘米, pH 6.5, 经 NaCl 平衡的 DEAE 纤维素层析,出现二个酶峰,二个峰之间的 pH 没有变化。

将第二个酶峰部分混合,对水透析到电导度为 0.25 毫姆欧/厘米,再通过 NaCl 平衡的 DEAE 纤维素柱,重复层析二次,结果见图 3 和图 4。将图 4 中酶蛋白峰的前半部对水透析后冻干得 15 毫克。

3. ¹²⁵I 标记实验 为了进一步证实猪肾中确有第二种碱性磷酸酶,于是将酶 B 用 ¹²⁵I 标记,然后把分离出的两种碱性磷酸酶和 ¹²⁵I-碱性磷酸酶 B 混和,再经 DEAE 纤维素柱层析分离,观察 ¹²⁵I 在二个酶活性峰间的分布。

DEAE 纤维素 (CL 型) 柱,体积 15 毫升,用 0.005M Tris 缓冲液, pH 7.5, 充分平衡。

将碱性磷酸酶 A 2 毫克,碱性磷酸酶 B 3.6

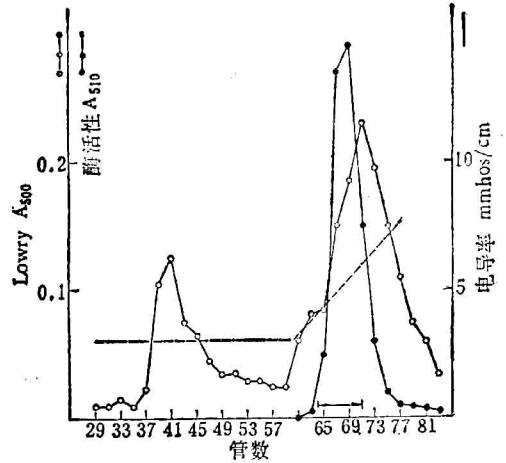


图 3 碱性磷酸酶 B 的 DEAE 纤维素柱层析

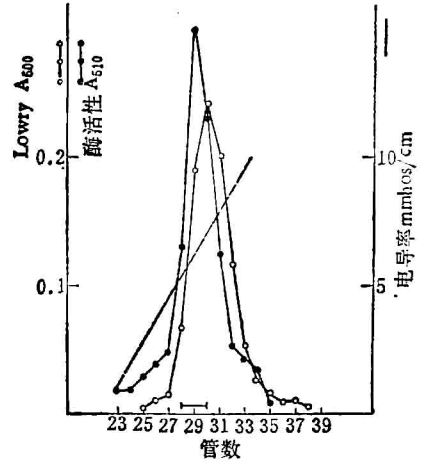


图 4 碱性磷酸酶 B 的 DEAE 纤维素再层析

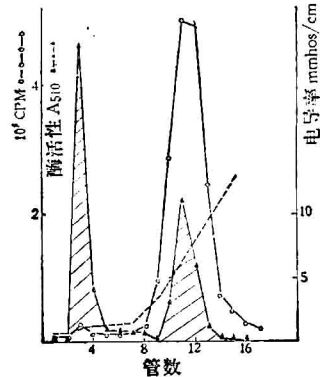


图 5 碱性磷酸酶 A、B 和 ¹²⁵I-碱性磷酸酶 B 混合物的 DEAE 纤维素柱层析
(阴影部分是酶活性峰)

毫克, ¹²⁵I-碱性磷酸酶 B 约 200 微克混和, 加在 DEAE 纤维素柱上, 用 0.005M Tris 缓冲液将样品洗入柱中, 再用 NaCl 浓度梯度洗脱, 分段

收集;分别测定各管的酶活性和放射性(见图5)。 ^{125}I 放射性集中在碱性磷酸酶B峰处,说明分离出的二种碱性磷酸酶确是不同的成分。

有关从各种动物脏器中提取碱性磷酸酶的方法各异^[3-6],但均未提到猪肾中碱性磷酸酶的同功酶问题。本文中直接用正丁醇处理肾组织匀浆,比 Morton^[4]的方法简便。我们在 DEAE 纤维素层析的不同条件中见到有洗脱性质不同的二个碱性磷酸酶存在,并用同位素标记得到了证实。

参 考 文 献

- [1] King, E. J. et al.: *Micro-analysis in Medical Biochemistry*, 3rd. ed., Churchill. London, 85, 1956.
- [2] Lowry, O. H et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [3] Morton, R. K.: *Biochem. J.*, 57, 595, 1954.
- [4] Mathies, J. C.: *J. Biol. Chem.*, 233, 1121, 1958.
- [5] Binskey, F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 228, 559, 1957.
- [6] Binskey, F.: *J. Biol. Chem.*, 236, 735, 1961.

[本文于1980年6月5日收到]

猪心线粒体可溶性腺三磷酸酶($\text{F}_1\text{-ATPase}$)冷敏感性的研究

赵 云 鵬 张 淑 秀

(中国科学院生物物理研究所)

从猪心线粒体中分离出来的可溶性、高纯度腺三磷酸酶($\text{F}_1\text{-ATPase}$ 以下简称 F_1),既是线粒体内膜中 $\text{H}^+\text{-ATP}$ 酶的活性部位,又是线粒体能量转换过程中重要的偶联因子。

可溶性腺三磷酸酶通过柄部(OSCP)与嵌入膜内的基部(F_0)相联接形成腺三磷酸酶复合物。在复合物中呈结合状的 F_1 具有对能量转移抑制剂(寡霉素、芸香霉素)敏感及冷稳定的特性。但是,一旦 F_1 从复合物中分离下来,就变得对寡霉素不敏感及冷不稳定了。如将 F_1 于 $0-2^\circ\text{C}$ 放置较短时间,酶的水解活性及偶联活性就明显下降^[1]。从酵母、大肠杆菌、鼠肝等不同来源获得 F_1 都具有同样特性^[2]。

A. Bruni 等^[3]认为膜上 F_1 的冷失活与腺三磷酸酶抑制剂有关。Penefsky^[1]等认为可溶性腺三磷酸酶冷失活是由于酶遇冷分解所致。但是,如何分解,以及酶的冷失活与酶分解的关系等问题还有待研究。

本文介绍一种分离可溶性腺三磷酸酶 F_1 的较简便方法,并就此酶冷失活的机理及几种醇类对 F_1 冷失活的保护作用进行初步的探讨。

材 料 及 方 法

一、材料: 新鲜猪心,取自北京市食品公司。

二、方法:

1. 线粒体制备: 除了肉糜洗涤液改为 0.125M 氯化钾、 0.001M EDTA ($\text{pH}7.5$) 以外,其余步骤基本按 Green^[4]方法操作。所得线粒体悬浮于 0.10M 蔗糖、 10mM Tris-SO_4 , 0.001M EDTA $\text{pH}7.4$ 的介质中,冷冻保存。

2. F_1 的制备 按改进的方法^[5],用 Triton X-100 提取低渗的线粒体,然后经超声(频率 $21\pm 1\text{Kc}$,功率 600瓦),硫酸铵分部沉淀及 65°C 热处理后制得 F_1 溶液,保存在 0.55 饱和度硫酸铵, 1mM ATP $\text{pH}7.2$ 溶液中。

3. F_1 的冷敏感性测定 取 F_1 的 0.55 饱和度和硫酸铵溶于 $14,000\text{rpm}$, 0°C , 离心 20 分钟,得 F_1 沉淀,将它溶于 50mM Tris-SO_4 $\text{pH}7.4$ 缓冲液中,放置于 $0-2^\circ\text{C}$ 冷处理 $2-3$ 小时。测定处理前后 F_1 活性等的变化。

4. 醇类的保护实验: 将 10% 甲醇、乙