

析测试中心帮助, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 Bowers C Y, Reynolds G A, Momany F A *et al.* *Endocrinology*, 1981; **106**: 663
- 2 Momany F A, Bowers C Y, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1984; **114**: 1531
- 3 郭春远, 刘传弟, 盛树力等. 首都医学院学报, 1990; **11** (4): 289
- 4 Bowers C Y, Sartor A O, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1991; **128**: 2027
- 5 Bowers C Y, Momany F A, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1984; **114**: 1537
- 6 Croom Jr W J, Leonard E S, Barker P K *et al.* *J Anim Sci*, 1984; **59** (suppl): 109
- 7 Kandan S H, Kannappan V, Cyril Y B. *Biochem Biophys Research Commun*, 1991; **178** (1): 31
- 8 Sartor O, Bowers C Y, Reynolds G A *et al.* *Endocrinology*, 1985; **117**: 1441
- 9 Sartor O, Bowers C Y, Chang D. *Endocrinology*, 1985; **116**: 952
- 10 Cheng K, Wanda W, Chan S *et al.* *Endocrinology*, 1989; **124**: 2791
- 11 Richard F W. *Life Science*, 1990; **47**: 29
- 12 施新猷. 医学动物实验方法. 北京: 北京人民出版社, 1980: 48
- 13 中国科学院生物化学研究所多肽应用组. 中国科学, 1975;

3: 279

The Synthesis of Growth Hormone Releasing Peptide (GHRP) and Its Activity of Enhanced Growth on Mice. Hu Xiaoyu, Wang Qin, Wang Rui, Gao Liwei, Shen Jianmin, Wang Yongqian (*Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*).

Abstract Growth hormone releasing peptide (GHRP) was synthesized. It is an exogenous hormone promoting pituitary to release growth hormone. The amino acid sequence of GHRP is His-D-Trp-Ala-D-Phe-Lys-NH₂. The synthesis was carried out with SPPS and Boc strategy. The amino acid composition was found in agreement with its calculated values. The purity was 97.7%. The bioassays showed that it enhanced the growth of young mice significantly and this effect depends on the dosage of injection. GHRP is more sensitive to the younger mice.

Key words growth hormone releasing peptide (GHRP), solid phase synthesis, mice, growth enhancement

人脑神经元特异性烯醇化酶的纯化方法*

郭 健¹⁾ 张世明 周润琦²⁾ 陈石根²⁾ 韩一平

(长海医院呼吸内科, 上海 200433)

摘要 采用改良的 Grace 层析方法, 经一次 DEAE-Sephadex A50 柱层析即从人脑中纯化了神经元特异性烯醇化酶, 比活力为 92.1 U/mg, 纯化倍数为 59.4. 该酶纯化后, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白质谱带. 此外, 还测定了其部分理化性质, 其亚单位分子量为 45 000, 等电点 *pI* 为 4.7, 氨基酸组成分析表明其作为一种酸性蛋白质; 对 2-磷酸甘油酸的 *K_m* 值为 5.6×10^{-4} mol/L.

关键词 神经元特异性烯醇化酶, 纯化, 理化性质

* 国家自然科学基金资助项目. ¹⁾ 现在地址: 江苏常州 102 医院内科, 常州 213003. ²⁾ 复旦大学生物化学系, 上海 200433.

收稿日期: 1994-12-24, 修回日期: 1995-02-26

神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, E. C. 4. 2. 1. 11, NSE) 是一种特异地定位于神经元和神经内分泌细胞中的烯醇化酶, 是由两个相同的 γ 亚基组成的二聚体. 在结构、功能、生物学特性和免疫学性质等方面, NSE 均不同于其已知的 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 和 $\beta\beta$ 型同工酶, 是不同基因的表达产物^[1]. 近年, 国外的研究表明, NSE 对 APUD 细胞系肿瘤特别是小细胞肺癌具有重要的临床意义. 而血清 NSE 的检测需要有一定量和一定纯度的 NSE 作抗原. 本文对 Grace 法^[2]加以改进, 主要是增大洗脱体积, 结果经一次 DEAE-Sephadex A50 柱层析即将 NSE 与脑型肌酸激酶 (creatine-kinase BB isoenzyme, CK-BB) 分别提纯, 经鉴定两者均达到电泳纯, 从而使纯化过程大为简化.

1 材料和方法

1.1 材料

DEAE-Sephadex A50 和 pH 3~10 两性电解质载体为 Pharmacia 产品; 聚丙烯酰胺电泳系统试剂为 Fluka 产品; 牛血清白蛋白及分子量标准蛋白质为上海东风试剂厂产品; 其余试剂均为分析纯或化学纯. 人脑为意外死亡 2 h 内获得, -80°C 保存 2 个月.

1.2 方法

1.2.1 NSE 的纯化: 整个纯化过程均在 4°C 下进行. 脑组织用含 5 mmol/L 巯基乙醇的 pH7.5, 50 mmol/L Tris-HCl (Tris 液) 制成匀浆, 然后经 31 000 g 离心 15 min 后, 弃沉淀, 得上清液 I; 在磁搅拌下, 缓缓滴入预冷的 95% 乙醇至乙醇浓度为 50%, 继续搅拌 30 min, 然后 3400 g 离心 15 min, 得上清液 II; 再加入乙醇至最后浓度达 70% 后, 3400 g 离心 15 min, 弃去上清液 III, 取沉淀加 Tris 液搅拌均匀后, 再 31 000 g 离心 15 min, 得上清液 IV. 上清液 IV 于 Tris 液中透析 1 h 后, 行 DEAE-Sephadex A50 柱 (2.6 cm $\times$ 40 cm) 层析, 流速 15 ml/h. 样品上柱后, 先用 Tris 液洗涤至 $A_{280} < 0.01$, 再用含 100~450 mmol/L NaCl 的 Tris 液 1000 ml 梯度洗脱, 分别合并 NSE 以及

CK-BB 峰值管, 置 Tris 液中透析 24 h, -80°C 保存.

1.2.2 酶活力测定: NSE 酶活力测定根据文献 [3] 进行; CK-BB 活力根据 Rosalki 法^[4]进行测定.

1.2.3 蛋白质含量测定: 采用 Bradford 法^[5]. 以牛血清白蛋白为标准蛋白质.

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 按照 Laemmli 方法^[6]进行.

1.2.5 等电点测定: 采用圆盘等电聚焦电泳进行. 两性电解质载体范围为 pH 3~10.

1.2.6 氨基酸组成分析: 采用酸水解法, 使用美国 Beckman 119 型氨基酸自动分析仪进行测定.

2 结果和讨论

文献报道的 NSE 纯化方法^[2,7~10]一般均需 2 次或 2 次以上的柱层析才能纯化 NSE, 且多有耗时长、操作过程较繁琐或需特殊设备等缺点. 我们曾多次重复羟基磷灰石法^[2]、蓝色葡聚糖凝胶层析法及 Grace 法^[3], 均未取得理想的分离效果, 主要是不能很好地把电荷性质和分子量大小与其相近的 CK-BB 分离开来. 经过反复摸索和试验, 我们对 Grace 法^[3]的层析条件加以改进, 主要有两方面, 一是加大盐洗脱液体积至 1000 ml, 使洗脱梯度的陡度变平, 二是控制流速为 15 ml/h, 结果经一次 DEAE-

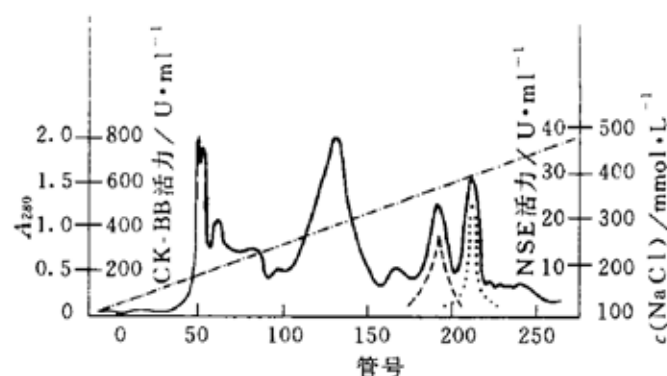


图1 DEAE-Sephadex A50 柱层析盐洗脱图谱

—: A_{280} ; ----: CK-BB 活力; ····: NSE 活力; ·—·: NaCl 浓度.

Sephadex A50 柱层析即成功地将 NSE 与包括 CK-BB 在内的其他蛋白质峰分离开来 (图 1), 并一举获得了经 SDS-PAGE 鉴定为单一蛋白质谱带的 NSE 和 CK-BB 两种电泳纯之纯酶 (图 2), 省却了原方法中 pH9.0 条件下的再次 DEAE-Sephadex A50 柱层析, 从而使纯化步骤大为简化.

表 1 为人脑 NSE 各步纯化的结果, 其中包括 CK-BB 的活力测定结果. 由表 1 可见, 最终纯化的 NSE 样品无 CK-BB 活性, 而 CK-BB 样品亦无 NSE 活性. NSE 比活力为 92.1 U/mg, 纯化倍数为 59.4 倍.

纯化的 NSE 经 SDS-PAGE 鉴定为单一带 (图 2), 根据相对迁移率测得的亚基分子量约为 45 000; 而等电聚焦电泳示纯化的 NSE 为一条极细的电泳带, 通过表面微电极直接测得的 pI 为 4.7 左右, 与文献 [1] 报道的结果基本一致. 氨基酸组成分析结果 (表 2) 表明 NSE 为

一种由 30% 酸性氨基酸组成的酸性蛋白质. 新测得的 NSE 相对底物 2-磷酸甘油酸的 K_m 值为 5.6×10^{-4} mol/L, 这与 Marangos^[4]、孙志贤等^[5]报道的结果一致.

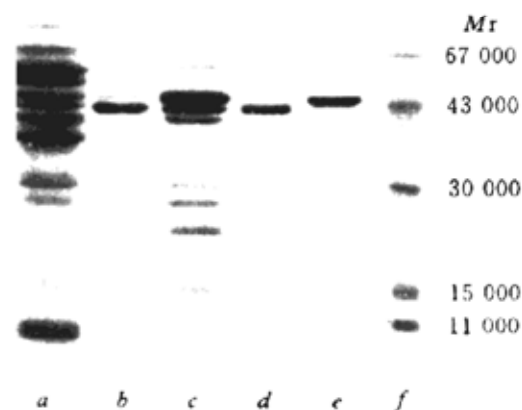


图 2 NSE 层析各步样品之 SDS-PAGE 结果
a: 上清液 I; b: 上清液 II; c: 上清液 IV; d: CK-BB 峰; e: NSE 峰; f: 分子量标准蛋白质.

表 1 人脑 NSE 的纯化结果

	总蛋白 /mg	总酶活性/U		比活力 NSE/U · mg ⁻¹	纯化倍数 NSE
		NSE	CK-BB		
组织匀浆液	13410.0	21805.2	63565.1	1.6	—
上清液 I	2562.1	18579.5	48107.2	7.2	4.7
上清液 II	1014.5	12718.9	39208.5	12.5	8.1
上清液 IV	215.4	6057.4	14176.1	28.1	18.1
层析后液	51.2	4714.6	0.0	92.1	59.4

表 2 人 NSE 的氨基酸组成

			%
Lys	6.63	Pro	3.58
His	1.38	Ala	10.21
Arg	4.62	Val	6.75
Asp	12.20	Met	0.90
Thr	4.77	Ile	5.64
Ser	5.30	Leu	9.52
Gly	6.31	Tyr	2.47
Gln	11.90	Phe	4.17
Trp	1.65		

参 考 文 献

- 1 Marangos P J, Goodwin F K. J Neurochem, 1977; 28: 1097
- 2 Grace A, Roberts R. Clin Chim Acta, 1982; 123: 59
- 3 Baranowshi T, Wolna E. Methods Enzymol, 1975; 42: 335
- 4 Rosalki S B. J Lab Clin Med, 1969; 4: 697
- 5 Bradford M M. Anal Biochem, 1976; 72: 248
- 6 Laemmli U K. Nature, 1970; 227: 680
- 7 Gerbitz K D, Deufel T, Summer J et al. Clin Chim Acta, 1983; 133: 233
- 8 Marangos P J, Zis A P, Clark P L et al. Brain Res, 1978; 150: 117

- 9 孙志贤, 党进军, 陈惠鹏等. 生物化学杂志, 1989; 5: 423
- 10 Suzuki F, Umeda Y, Kato K. J Biochem, 1980; 87: 1587

A Convenient Method for the Purification of Neuron Specific Enolase. Guo Jian, Zhang Shiming, Zhou Runqi*, Chen Shigen*, Han Yiping (*Department of Respiratory, Chang Hai Hospital, Shanghai 200433, China; *Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract A simple and convenient method for the purification of neuron specific enolase

(NSE) from human brain is described through only one DEAE-Sephadex A50 chromatography. The specific activity is 92.1 U/mg and increase of purity 59.4 fold. Certain biophysical and biochemical features were also studied. The molecular weight of the subunit of NSE is 45 000 and *pI* is 4.7. Amino acid composition analysis showed that NSE is an acidic protein.

Key words neuron specific enolase, purification, biophysical and biochemical features

谷氨酸棒状杆菌尿素传感器的研究*

雷呈宏 包雅芳 邓家祺

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 基于脲酶催化尿素分解产生氨, 以氨气敏电极为基础电极, 用含脲酶丰富的谷氨酸棒状杆菌研制成测定尿素的微生物传感器. 在 30℃、pH8.0、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 该传感器的线性范围为 $1.1 \times 10^{-4} \sim 1.4 \times 10^{-2}$ mol/L, 斜率为 51.2 mV/decade, 检测下限为 1.0×10^{-5} mol/L, 寿命可达 45 d. 考察了传感器响应初速和底物浓度之间的关系, 测定了微生物膜中脲酶的表现米氏常数 K_m 及最大响应初速 v_m .

关键词 谷氨酸棒状杆菌, 尿素, 脲酶, 微生物传感器

自从 Divies^[1]和 Rechnitz 等^[2]分别研制成功第一支电流型和电位型微生物传感器以来, 众多学者竞相研究, 测定组氨酸^[3]、丝氨酸^[4]、酪氨酸^[5]、谷氨酸^[6]、苯丙氨酸^[7]、蔗糖^[8]等的微生物传感器相继出现. 这不仅因为微生物作为生物催化材料, 可以随时培养, 克服了纯酶价格昂贵、难以保存的缺点, 而且和纯酶相比, 微生物酶由于没有失去其依存的细胞生理环境和辅助因子, 因而可以较长时间地保持活性, 其催化底物进行某些生化反应的效果会更好. 文献[9]曾对谷氨酸微生物传感器和酶生物传感器进行了比较研究. 但微生物体内往往含有多种酶, 寻找到含有某种酶, 并能够研制成对其

相应底物有较高灵敏度和较好选择性的传感器的微生物, 并非易事. 近 20 年来, 微生物酶传感器陆续有报道, 但并不多, 到目前为止, 对微生物传感器动力学响应机理仍不清楚.

尿素的测定在临床和其他许多领域均具有重要意义. 尿素可以被脲酶分解而放出氨气, 根据这个原理, 以氨气敏电极为基础电极, 可以制作间接测定尿素的传感器. 谷氨酸棒状杆菌是氨基酸发酵工业中常用的菌株之一, 生长迅速, 使用安全. 使用谷氨酸棒状杆菌作为生

*国家自然科学基金及中国科学院长春应用化学研究所电分析化学开放实验室资助课题.

收稿日期: 1995-01-25, 修回日期: 1995-05-08