

钙调素亲和层析柱的制备及其应用*

叶正华 孙大业** 郭季芳

(中国科学院植物研究所,北京)

提 要

钙调素琼脂糖亲和层析柱是研究和纯化钙调素结合蛋白的理想工具。本文介绍了牛脑钙调素的提取以及利用牛脑钙调素制备钙调素琼脂糖亲和层析柱的方法。用钙调素琼脂糖亲和层析,可以使牛脑钙调素依赖的 PDE 的纯度提高 18 倍;发现在小麦细胞壁中存在 9 种钙调素结合蛋白或亚基。

钙调素 (Calmodulin, 简称 CaM) 是一种在进化上高度保守的钙调节蛋白,存在于所有真核生物中,它作为第二信使钙的受体蛋白,通过调节各种靶酶的活性从而发挥重要的生理功能。现已在动植物中发现多种 CaM 结合蛋白或靶酶。由于 CaM 具有在有钙和缺钙时与 CaM 结合蛋白可逆结合的特性,因此可将 CaM 偶联到琼脂糖上,制备成钙调素琼脂糖亲和层析柱,它是进一步寻找新的 CaM 结合蛋白及提取纯化已知 CaM 靶酶和 CaM 抗体的理想工具。

材 料 和 方 法

一、试剂和材料

苯基琼脂糖 4B (Phenyl-sepharose 4B, Pharmacia) CNBr 活化的琼脂糖 4B (CNBr-activated-sepharose 4B, Pharmacia) 新鲜牛脑。

二、方法

1. 牛脑 CaM 的制备^[1]:

新鲜牛脑 500g, 加入 4 倍体积的缓冲液 A (50m mol/L Tris-HCl, 1m mol/L EGTA, 0.5 m mol/L PMSF, 1m mol/L 巯基乙醇, pH7.5), 用高速组织捣碎机充分捣碎, 10,000g 离心 30 分钟, 取上清液用 3% TCA 沉淀蛋白质。10,000 g 离心 30 分钟。取沉淀溶于约 400ml 缓冲液 A 中, 调节 pH 至 7.5。然后将溶液在 90℃ 加热处理 3 分钟。14,000g 离心 30 分钟。取上清

液调节 Ca^{++} 浓度为 5m mol/L, 14,000g 离心 30 分钟。以上步骤均在 4℃ 下进行。以下层析过程在室温下进行。取上清液通过用缓冲液 B (50m mol/L Tris-HCl, 0.1m mol/L CaCl_2 , 1m mol/L 巯基乙醇, pH 7.5) 平衡的 Phenyl-Sepharose 4B 亲和层析柱 (1.5 × 15cm)。上样后分别用缓冲液 B 和含 0.5mol/L NaCl 的缓冲液 B 淋洗, 最后用缓冲液 C (50m mol/L Tris-HCl, 1m mol/L EGTA, 1m mol/L 巯基乙醇, pH 7.5) 洗脱, 收集蛋白质高峰管, 浓缩后上 Sephadex-G75 柱 (2.5 × 80 cm), 收集 CaM 高峰管, 透析, 浓缩后, 置 -20℃ 下保存。用 SDS-PAGE 和紫外吸收扫描鉴定 CaM 的纯度。

2. 牛脑 PDE 的提取参照文献[2]的方法。

3. CaM 的活性测定用 PDE 法^[3]。

4. 小麦黄化胚芽鞘细胞壁蛋白的提取参照 Birecka 等^[4]的方法。在上 CaM-Sepharose 4B 亲和层析柱前, 需去除内源 CaM。将细胞壁蛋白质溶液通过经缓冲液 A (20m mol/L Tris-HCl, 1m mol/L 咪唑, 1 m mol/L MgCl_2 , 1 m mol/L EGTA, 10m mol/L 巯基乙醇, pH7.0) 平衡的 DEAE-纤维素柱, 收集流出液和含 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液 A 的洗出液, 合并后留作下一步提取 CaM 结合蛋白用。

5. CaM 和 CNBr 活化的 Sepharose 4B 的

* 国家自然科学基金资助项目。 ** 河北师范大学生物系。

偶联^[5]:

5g CNBr 活化的 Sepharose 4B 用 1m mol/L HCl 溶液溶胀后,分别用 1m mol/L HCl 溶液和 0.2mol/L 碳酸氢钠缓冲液 (pH9.5) 洗涤,然后悬浮于同一缓冲液中。取 60mg CaM 和 Sepharose 4B 溶液混合,室温下搅拌 8 小时后,继续在 4℃ 下搅拌 18 小时。加 1g 甘氨酸于混合液中,室温下搅拌 6 小时。将凝胶溶液装入层析柱中,分别用蒸馏水和缓冲液 A (20m mol/L Tris-HCl, 1m mol/L 咪唑, 1m mol/L MgCl₂, 0.1m mol/L CaCl₂, 10m mol/L 巯基乙醇, pH 7.0) 充分淋洗。用 PDE 法测定溶液中未结合的 CaM 含量和 CaM-Sepharose 4B 中 CaM 的活性。将 CaM-Sepharose 4B 悬浮于缓冲液 A 中,置 4℃ 下保存。

6. CaM-Sepharose 4B 亲和层析提取 CaM 结合蛋白:

将用 DEAE-纤维素层析制备的 PDE 溶液或去除内源 CaM 的小麦细胞壁蛋白溶液调至 Ca⁺⁺ 浓度为 0.1m mol/L, 对缓冲液 A (20m mol/L Tris-HCl, 1m mol/L 咪唑, 1m mol/L MgCl₂, 0.1m mol/L CaCl₂, 10m mol/L 巯基乙醇, pH7.0) 透析 12 小时后,再调节 Ca⁺⁺ 浓度至 2m mol/L。上样前 CaM-Sepharose 4B 柱用牛血清蛋白溶液 (1mg/ml) 处理,并用缓冲液 A 平衡。然后将样品通过 CaM-Sepharose 4B 亲和层析柱 (1.0 × 20cm)。上样后,分别用缓冲液 A, 含 0.2mol/L NaCl 的缓冲液 A 和缓冲液 A 淋洗,最后用缓冲液 B (20m mol/L Tris-HCl, 1m mol/L 咪唑, 1m mol/L MgCl₂, 1m mol/L EGTA, 10m mol/L 巯基乙醇, pH 7.0) 洗脱得到 CaM 结合蛋白,透析浓缩后,置 -20℃ 下保存。CaM-Sepharose 4B 柱的再生: 分别用含 1.5 mol/L NaCl 的缓冲液 B 和蒸馏水淋洗,然后用缓冲液 A 平衡后可作下一次提取 CaM 结合蛋白用。若短时间内不使用,可加入 0.2% 的叠氮化钠,置 4℃ 下保存。

7. 电泳: 按 Laemmili^[6] 法用 SDS-PAGE 分离小麦细胞壁 CaM 结合蛋白,聚丙烯酰胺胶浓度为 10%。

8. 蛋白质测定: 按 Bradford^[7] 法测定蛋白质含量,用牛血清蛋白作标准。

结果和讨论

一、CaM 的制备

CaM 在进化上具有高度的保守性,如牛脑 CaM 和芹菜 CaM 只有 13 个氨基酸的差异,因此不管是动物 CaM 还是植物 CaM 都既可以激活动物 CaM 靶酶也可以激活植物 CaM 靶酶。在动物组织中容易大量提取 CaM。1 公斤新鲜牛脑一般可提取 120mg 纯化的 CaM,而 1 公斤小麦黄化胚芽鞘一般只能得 8mg CaM,所以我们采用新鲜牛脑提取 CaM 作制备 CaM-Sepharose 之用。这样制备的牛脑 CaM-Sepharose 4B 柱既可用于提取动物 CaM 结合蛋白也可用来提取植物 CaM 结合蛋白。

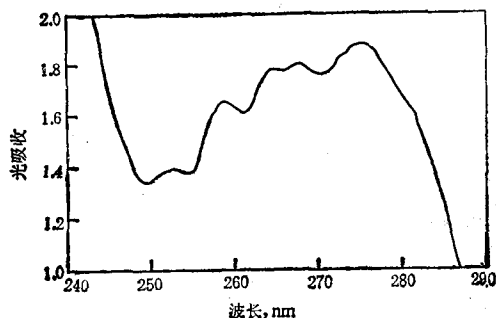


图 1 牛脑 CaM 的紫外吸收光谱

牛脑 CaM 经 SDS-PAGE 鉴定呈单一区带,有 EGTA 存在时 SDS-PAGE 测定 CaM 的表观分子量为 17,000 左右。图 1 为牛脑 CaM 的紫外吸收扫描图谱,呈现五个特征吸收峰。

二、CaM-Sepharose 4B 柱的制备

通过测定凝胶溶液中游离 CaM 的含量,计算出每毫升 CNBr 活化的琼脂糖凝胶可与 3mg CaM 共价结合。CaM-Sepharose 4B 复合物保持激活 PDE 的能力,说明与琼脂糖凝胶结合的 CaM 仍具有生物活性。CaM-Sepharose 4B 在有 0.2% NaN₃ 存在时 4℃ 下保存 5 个月未见其结合能力丧失。

三、利用 CaM-Sepharose 4B 柱进一步纯化 PDE

PDE 是人们发现的第一个 CaM 靶酶,在

取得到 CaM 结合蛋白,而且其 CaM 结合蛋白

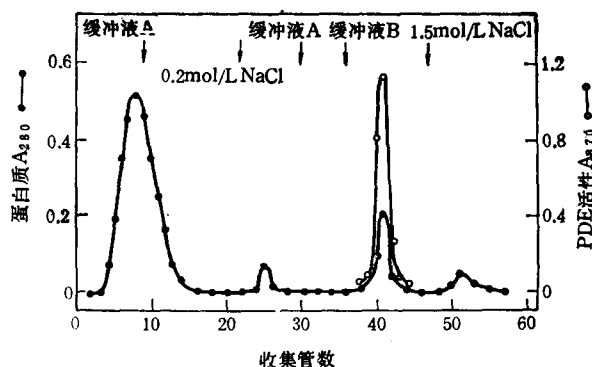


图2 利用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化 CaM 依赖的 PDE

取各管溶液 50 μ l, 在 0.1mmol/L Ca^{++} 和 0.5 μ g CaM 存在下, 分别测定 PDE 活性。

开展对环核苷酸、钙调素和某些激素作用原理的研究中, 都需要分离制备 PDE。一般情况下, 通过组织匀浆、55% $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀及 DEAE-纤维素层析, 制备得到的 CaM 依赖的 PDE 可以满足研究需要。但为了某些特殊的用途, 需进一步纯化 PDE。利用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化 PDE 是一种简便有效的手段。图 2 为 PDE 在 CaM-Sepharose 4B 柱上的层析图谱。通过一步亲和层析, PDE 的纯度可提高 18 倍(表 1)。

四、利用 CaM-Sepharose 4B 柱寻找小麦细胞壁 CaM 结合蛋白

寻找新的 CaM 结合蛋白, 是深入研究 CaM 生理功能的重要途径。应用 (^{125}I) CaM 胶覆盖分析技术, 已在寻找动植物 CaM 结合蛋白工作中作了许多研究。但 ^{125}I 半衰期短, 又具有放射性污染, 给研究工作带来许多不便。利用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析, 不仅可以提

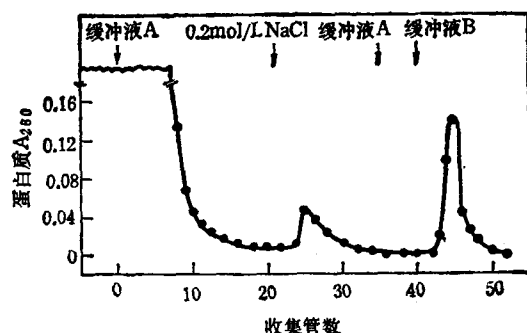


图3 利用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析柱制备小麦细胞壁 CaM 结合蛋白

具有生物活性, 这样可以加上有关酶的底物, 检测其中是否存在该种酶。另外还可以结合其它分离技术, 进一步分离纯化其中的 CaM 结合蛋白, 因而具有许多优越性。

我们在研究小麦黄化胚芽鞘细胞壁蛋白时发现存在 CaM, 为了进一步了解细胞壁 CaM 的生理功能, 我们试图寻找细胞壁 CaM 结合蛋白。应用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析(图 3), 将 EGTA 洗脱下来的蛋白进行 SDS-PAGE, 发现在小麦细胞壁中存在九种 CaM 结合蛋白或亚基(图 4 见图版 IV)。

五、操作中需注意的问题

CaM 亲和层析提取 CaM 结合蛋白, 是通过琼脂糖上的 CaM 和提取液中的 CaM 结合蛋白专一性疏水结合的特性而达到分离目的。因此如果提取液中存在内源 CaM, 则 CaM 结合蛋白和内源 CaM 结合, 无法达到分离纯化的目的。因此提取液在上 CaM-Sepharose 4B 柱前需去除内源 CaM, 一般可用 Phenyl-Sepharose 4B 或 DEAE-纤维素层析方法。为了提

表 1 牛脑 CaM 依赖的 PDE 的纯化 (30g 新鲜牛脑)

步 骤	总蛋白 (mg)	活性 (μ mol/Lml $^{-1}$ min $^{-1}$)	总活性 (U)	比活 (U/mg)	产率 (%)	纯化倍数
粗提取液	697	1.16	153	0.22	100	/
55% $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀	359	2.01	117	0.33	76	1.5
DEAE-纤维素层析	9.8	1.02	20	2.04	13	9.3
CaM-Sepharose 4B 层析	0.51	1.12	19	37.25	12	169.3

E. coli tRNA^{Leu} 的提纯

黄守廷 张星岳 李 冰 林胜祥

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

提 要

本文报道一种 *E. coli* tRNA^{Leu} 简便而稳定的纯化方法。粗 tRNA 经过 BD-Cellulose 柱层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳两个步骤即可得到亮氨酸接受能力为 1400 pmol/A₂₆₀ 单位的 tRNA^{Leu}。

随着对核酸研究的不断深入, 从原核生物到真核生物的各种 tRNA 提纯方法越来越多。反相柱层析利用 tRNA 连接上或不连接上氨基酸的亲层析, 各种柱层析, HPLC 以及聚丙烯酰胺凝胶电泳等都已成为纯化 tRNA 的有效手段。这些方法的专一性不尽相同, 而有些方法, 如亲和层析, 往往不能对各种氨基酸专一的 tRNA 都有满意的结果。在 tRNA 的提纯中, 我们采用了简便而结果稳定的两步提纯法。

高产率, 用 Agarose-Haemoglobin (AGHEM™, Pharmacia) 除去提取液中的蛋白酶。

上样前, 用牛血清蛋白溶液处理 CaM-Sepharose 4B 柱, 可封闭非特异性吸附。上样后, 用含 0.2mol/L NaCl 的缓冲液淋洗, 可加强 CaM 结合蛋白和 CaM 的结合, 并进一步洗去非特异性的结合。

去污剂 (如 1% Triton X-100) 对 CaM 和 CaM 结合蛋白的结合无影响, 可用 CaM-Sepharose 4B 柱提取 CaM 依赖的细胞膜蛋白。

由于细胞内含有多种 CaM 结合蛋白, 所以采用 CaM-Sepharose 4B 亲和层析提取得到的是多种 CaM 结合蛋白的混合物。如需进一步纯化其中某种 CaM 结合蛋白, 可与其它分离技术结合进行。

当提取液中存在 CaM 靶酶底物时, 在

一、BD-Cellulose 柱层析

粗 tRNA 用苯酚抽提方法^[1]制备。从 100 克大肠杆菌中提取了 170 毫克粗 tRNA。70 毫克粗 tRNA 溶解在 12ml 缓冲液 I (0.1 mol/L KAc-HAc, pH4.5, 0.35mol/L NaCl, 10mmol/L MgCl₂) 中, 上 BD-Cellulose 柱 (1.5 × 24 cm)。该柱预先用缓冲溶液 I 平衡, 然后用同样溶液洗柱至 A₂₆₀ 读数小于 0.1, 改用 NaCl 梯度

CaM-Sepharose 4B 上就可能形成 CaM-Ca⁺⁺-CaM 靶酶-底物复合物, 因此 EGTA 洗脱得到的 CaM 结合蛋白溶液中, 往往会存在 CaM 靶酶的底物, 该底物可能也是一种蛋白, 用 SDS-PAGE 鉴定 CaM 结合蛋白时需考虑到这一点。

参 考 文 献

- [1] Gopalakrishna, R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, 104, 830.
- [2] Ho, H. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 429, 461.
- [3] Wallace, R. W. et al.: *Methods in Enzymology*, 1983, 102, 39.
- [4] Birecka, H. et al.: *Plant Physiol.*, 1974, 53, 569.
- [5] Sharma, R. K. et al.: *Methods in Enzymology*, 1983, 102, 201.
- [6] Laemmli, U. K.: *Nature*, 1970, 227, 680.
- [7] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.

[本文于 1987 年 8 月 31 日收到]

刘永明等：“胎儿血红蛋白 G_γ 与 A_γ 电泳区带的双波长扫描法定量”一文的图 1

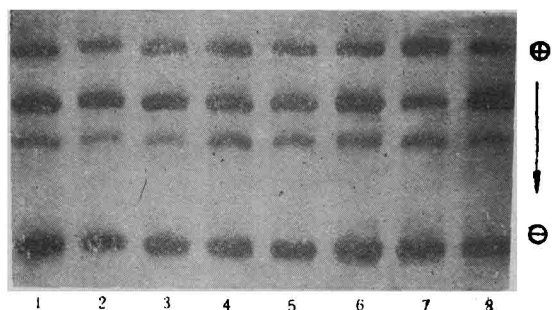


图 1 脐血 Hb 解链样品的电泳图谱
1—8 为 8 例脐血样品的板电泳结果

叶正华等：“钙调素亲和层析柱的制备及其应用”一文的图 4

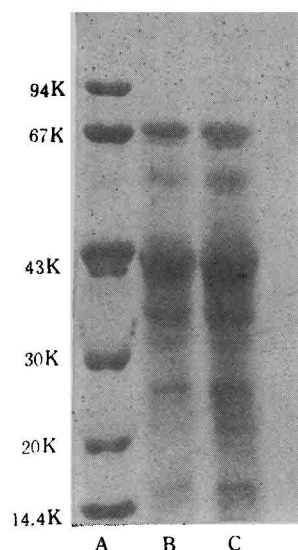


图 4 小麦细胞壁 CaM 结合蛋白的 SDS 电泳分析
A 为标准蛋白；B 和 C 为两次分别提取的小麦细胞壁 CaM 结合蛋白

王华岩：“一种简单快速回收 DNA 片段的方法”一文的图 1—2

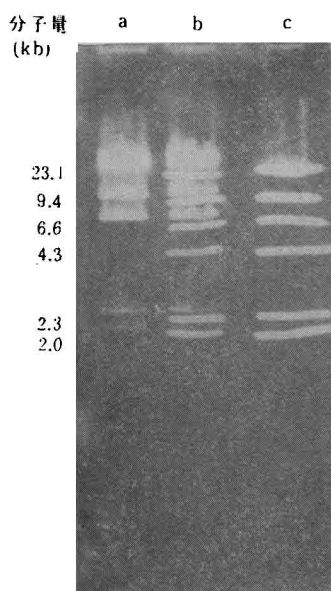


图 1 $1.4\mu\text{g}\lambda$ DNA-Hind III 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离

a. 1.5 小时后 DNA 带分开；b, 把 DE-81 滤纸片插在 DNA 带前；
c. 继续电泳后 10 分钟，DNA 转移到滤纸上

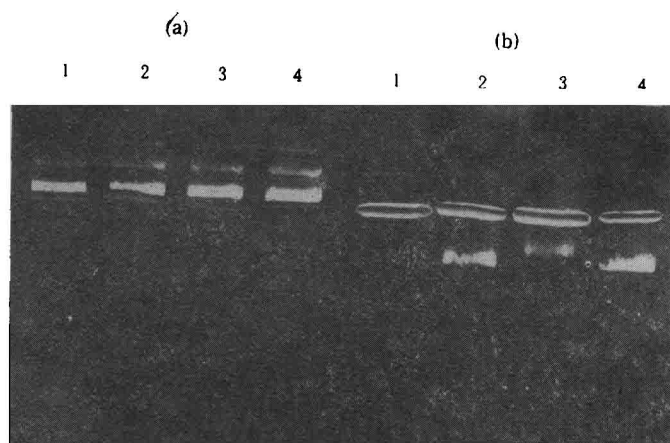


图 2 不同滤纸回收 DNA 的比较

(a) 质粒 pUC19 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，三条带分别为超螺旋、线性和开环的质粒 DNA。将滤纸插入超螺旋带前沿。1—4 分别为 DE-81，新华滤纸，Whatman 3MM，硝酸纤维滤纸。
(b) 继续电泳 20 分钟后，四种滤纸吸附 DNA 的情况