

技术与方法

牛脑神经特异性烯醇化酶的大规模制备和结晶

陈惠鹏 孙志贤 党进军 姜国芝

(军事医学科学院放射医学研究所,北京)

提 要

本文建立了一种包括硫酸铵分级,二次 DEAE-Sephadex A-50 柱, Ultrogel 柱和 DEAE-Sephacel 柱层析的方法,从牛脑中大规模制备神经特异性烯醇化酶,每千克牛脑可得 50mg 纯酶。该酶是富含 Glu, Asp, 等电点是 4.7 的酸性蛋白,分子量 50 kD 左右。在含硫酸铵的 0.05 mol/L 咪唑-盐酸缓冲液 (pH 7.8) 中得到针状结晶。

神经特异性烯醇化酶 (Neuron-Specific Enolase, 简称 NSE) 是糖酵解酶烯醇化酶 (E. C. 4. 2. 1. 11.) 的一种同工酶。它主要定位于哺乳动物的神经元和神经内分泌的 APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) 细胞系中^[1]。NSE 是烯醇化酶中最为酸性的同工酶,通常 NSE 是由二个相同的 γ 亚基组成,亚基分子量 50kD 左右^[2,3]。但是牛脑中的 NSE 不含亚基结构,分子量也是 50 kD^[4]。存在于脑中其它形式的烯醇化酶同工酶是 $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ 同工酶^[5,6]。然而,该同工酶的细微结构差别和功能之间的关系及其意义有待于进一步研究。Ish-ioka 等人也得到牛脑 NSE 的结晶^[7]。NSE 是神经分化,神经内分泌肿瘤(包括肺小细胞癌)的特异性标记物^[8],牛脑的 NSE 与人的 NSE 的抗体有很强的交叉免疫反应活性^[9]。从牛脑中获得大量高纯度的 NSE 及其抗体,是有实际意义的工作。为此,本实验室建立了一种大规模制备和结晶牛脑 NSE 的方法。

通过硫酸铵分级,二次 DEAE-Sephadex A-50 柱, Ultrogel 柱和 DEAE-Sephacel 柱层析的步骤可以从牛脑中分离到纯的 NSE。纯酶在含有硫酸铵的 0.05 mol/L 咪唑-盐酸缓冲液中可结晶出来。每千克牛脑可得 50 mg 的针

状结晶的 NSE。

材 料 与 方 法

一、材料

从屠宰场得到新鲜的牛脑,于 -30°C 速冻; DEAE-Sephadex A-50 (40—120 μm , Lot. No. 1835), DEAE-Sephacel (45—165 μm , Lot. No. 32147), 电泳用标准分子量试剂盒 (Lot. No. 9015) 考马斯亮兰 R-250 (Lot. No. 8061) 等来自 Pharmacia 公司; Ultrogel ACA 44 (60—140 μm , Lot. No. 4154) 和两性电解质载体 (pH3—10, pH3.5—5.5; Lot. No. 1809—101) 购自 LKB 公司; 2-磷酸-甘油酸 (Lot. No. 105865) 来自 Boehringer Mannheim 公司;其它试剂均是国产分析级。

二、方法

酶活力的测定和定义: 采用 Winstead 方法^[10]测定酶活力,在 1.2 ml 0.125 mol/L 咪唑-盐酸缓冲液 (pH 6.8), 0.6 ml 0.005 mol/L 2-磷酸-甘油酸, 1.2 ml 重蒸水中,加入样品开始反应,测定 $\text{OD}_{240\text{nm}}$ 的增值,吸收值每增加 0.100OD 相当于 0.226 μmol 底物的改变。定义在 1 分钟内催化 1 μmol 2-磷酸-甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸所需的酶量为一个活力单

位。具体计算方法如下:

$$\text{单位活力 (U/ml)} = \frac{0.226 \times \text{OD}_{240} \text{ 增值/分}}{0.100 \times \text{加入酶量(ml)}}$$

蛋白浓度的测定采用改进的 Lowry 法^[11]。以牛血清白蛋白为标准蛋白。

SDS-12.6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检查提纯酶的纯度以及测定亚基分子量^[12]; 4%—30%聚丙烯酰胺梯度胶电泳测定酶的分子量^[13]。

用等电聚焦电泳方法测定 NSE 的等电点^[14]。两性电解质载体的 pH 3.5—5.5, 用 pH 表面电极测定 pH 值。

采用改进的 O'Farrell 的双向电泳技术验证 NSE 结晶的纯度^[15]。以含尿素和中性去污剂的凝胶等电聚焦电泳 (Ampholine 的 pH 值 3—10) 为第一向, SDS-8%—15% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳为第二向。

氨基酸组成分析: NSE 在含 6 mol/L 盐酸的真空管中 110℃ 水解 20 小时后, 采用 3 AR/8/10/A 树脂; 在 Carl Enba 3 A 30 型氨基酸分析仪上(意大利制造)测定。

整个层析纯化过程均于 4℃ 条件下进行。

结 果

一、NSE 的分离提纯

抽提和硫酸铵分级: 1kg 的牛脑洗干净后, 用刀切碎, 按重量体积比 1:3 加入 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.1, 含 0.003 mol/L MgSO_4 , 0.001 mol/L EDTA, 以下简称 KPB-1) 进行组织打碎, 匀浆。6000 r/min 离心 60 分钟取其上清液在冰浴下搅拌加入固体硫酸铵至 40% 饱和度, 然后于 6000 r/min 离心 40 分钟后, 弃沉淀。继续向上清液补加固体硫酸铵至 85% 饱和度, 用浓磷酸调至 pH 4.70, 搅拌半小时, 6000 r/min 离心 40 分钟, 取沉淀溶于小体积的 KPB-1 中, 对 KPB-1 充分透析除盐。

第一次 DEAE-Sephadex A-50 柱层析: 将透析过的酶液上至用 KPB-1 平衡好的 DEAE-Sephadex A-50 柱 (6 cm ID × 40 cm), $\alpha\alpha$ 同工酶不被柱体吸附随 KPB-1 流出, 继之用含 0.10 mol/L KCl 的 KPB-1 洗脱包括 $\alpha\gamma$

同工酶在内的杂蛋白; 再用含 0.17 mol/L KCl 的 KPB-1 洗涤杂蛋白。最后用含 0.40 mol/L KCl 的 KPB-1 洗脱 NSE 蛋白峰, 收集具有 NSE 活性的蛋白峰 (如图 1 所示)。将该活性峰对 KPB-1 充分透析除盐。

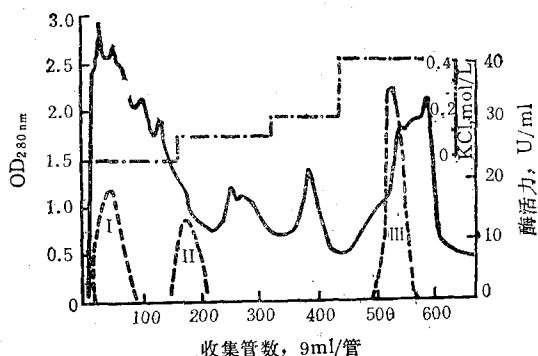


图 1 牛脑抽提液的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析图谱

洗脱流速 60 ml/h, I 是 $\alpha\alpha$ 同工酶活性峰; II 是 $\alpha\gamma$ 同工酶活性峰; III 是 NSE 活性峰。

— OD_{280nm} 蛋白吸收曲线; - - - 盐梯度曲线; ···· 酶活力曲线

第二次 DEAE-Sephadex A-50 柱层析: 将上述 NSE 活性峰上至用 KPB-1 平衡的 DEAE-Sephadex A-50 柱 (2.6 cm ID × 30 cm), 分别用含 0.17 mol/L KCl 和 0.22mol/L

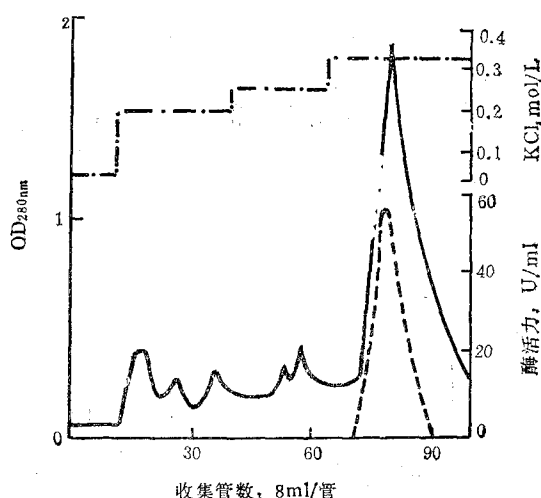


图 2 牛脑 NSE 经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析纯化

洗脱流速 30 ml/h, — 蛋白吸收曲线; - - - 盐梯度曲线; ···· 酶活力曲线

KCl 的 KPB-1 洗除杂蛋白后,用含 0.32mol/L KCl 的 KPB-1 洗脱 NSE 蛋白,收集 NSE 活性峰(如图 2),加固体硫酸铵至 85% 饱和度,接着用磷酸调至 pH 4.70,沉淀 NSE 蛋白,6000 r/min 离心 40 分钟收集沉淀,溶于较小体积的 0.025 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.1, 含 0.003 mol/L $MgSO_4$, 0.001 mol/L EDTA, 简称 KPB-2) 中,对 KPB-2 透析除盐。

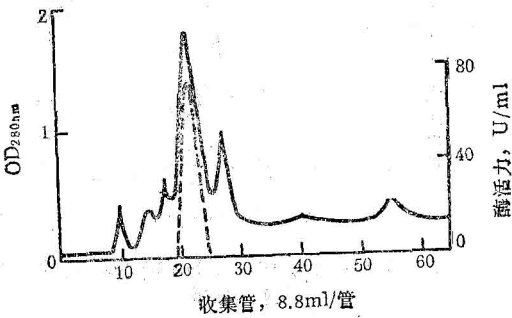


图 3 牛脑 NSE 经 Ultrogel 柱层析纯化
洗脱流速 30 ml/h。—— OD_{280nm} 蛋白吸收曲线;
---- 酶活力曲线

Ultrogel 柱层析纯化: 将浓缩的 NSE 活性峰上至用 KPB-2 平衡的 Ultrogel 柱 (3cm ID $\times$ 90cm), 用 KPB-2 进行洗脱 (如图 3), 收集 NSE 活性峰。

DEAE-Sephacel 柱层析纯化: 上述的活性峰直接上至用 KPB-2 平衡的 DEAE-Sephacel 柱 (2.6cm ID $\times$ 10cm), 以含 0.10 mol/L KCl 的 KPB-2 洗脱尚未除尽的杂蛋白后,再用含

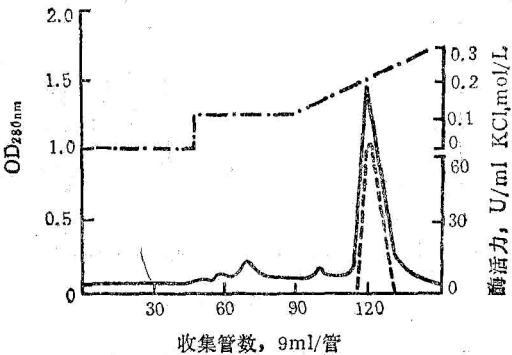


图 4 牛脑 NSE 的 DEAE-Sephacel 柱层析纯化
洗脱流速 30 ml/h; —— OD_{280nm} 蛋白吸收曲线;
---- 酶活力曲线; -.-.- 盐梯度曲线

0.10 mol/L—0.30mol/L KCl 的 KPB-2 进行线性梯度洗脱,得到具有 NSE 活性的蛋白峰(如图 4)。

表 1 牛脑 NSE 的纯化步骤

提纯步骤	总活 (U)	总蛋白量 (mg)	比活 (U/mg)	提纯倍数	总活回收率 (%)
DEAE-Sephadex A-50 (I)	6092	967	6.3	1.0	100
DEAE-Sephadex A-50 (II)	5181	513	10.1	1.6	85
Ultrogel	4226	72	58.7	9.3	69
DEAE-Sephacel	3978	51	78.0	12.2	65

经过上述层析分离和纯化程序提取的牛脑 NSE,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,双向电泳为单一染色点。如此分离提纯的 NSE 的比活为 78 U/mg,总活回收率是 65% (详细各项参数见表 1),每 1000 g 牛脑可得 50mg 纯酶。

二、NSE 的结晶

向上述收集的 NSE 活性峰加固体硫酸铵至 85% 饱和度,然后用磷酸调 pH 4.70; 6000 r/min 离心 40 分钟收集 NSE 蛋白沉淀。将该沉淀溶于 1.5ml 0.05 mol/L 咪唑-盐酸缓冲液 (pH 7.80); 离心弃除不溶物后,收集上清液约 2.5ml (蛋白浓度约 20 mg/ml),在冰浴中缓慢向上清液滴加饱和硫酸铵溶液;小心搅拌,直至刚刚出现浑浊即刻停加;马上下 6000 r/min 离心 40 分钟弃去沉淀,将上清收集置于一 30℃ 中冷冻,10—15 小时之后;于室温 (约 15℃) 下,令其自然融化,NSE 的结晶就慢慢生长出

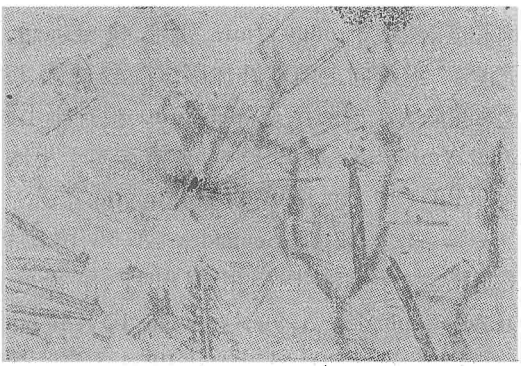


图 5 牛脑 NSE 结晶的显微照片 (10 $\times$ 10 倍)

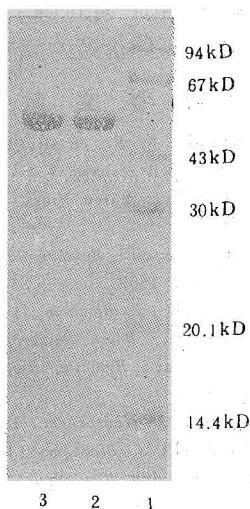


图6 牛脑 NSE 结晶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1.标准蛋白 2. NSE (20 µg) 3. NSE (25 µg)

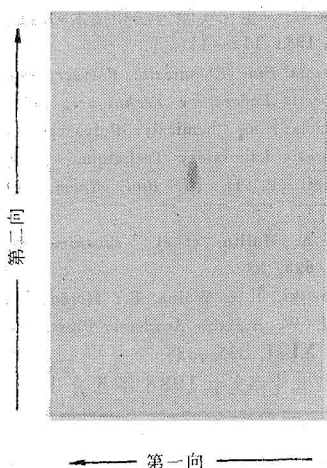


图7 牛脑 NSE 结晶的双向电泳图谱

第一向,等电聚焦电泳。第二向, SDS-4%—30% 聚丙烯酰胺梯度胶电泳

来(光镜下可见针状结晶,见图5)。

三、NSE 结晶的理化性质

NSE 结晶在 pH 8.3 中作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝 R 250 染色,显现一条区带(如图6)。在无变性剂存在下作双向电泳,用考马斯亮蓝 R250 染色,也仅显示一个斑点(如图7),这表明了 NSE 结晶是高度纯化的酶制剂。

牛脑 NSE 结晶经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(pH 8.3, 1% SDS)测定,它的亚基分子

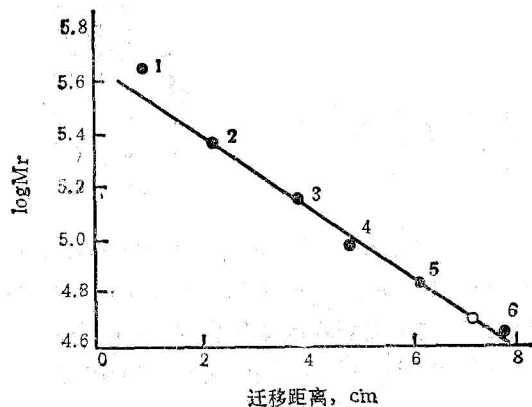


图8 4%—30% 聚丙烯酰胺梯度胶电泳测定牛脑 NSE

(O)的分子量是 50,000 道尔顿。1. Ferritin (Mr = 440000), 2. Catalase (Mr = 232000), 3. Dehydrogenase (Mr = 140000), 4. Phosphorylase b (Mr = 94000), 5. Albumin (Mr = 67000), 6. Ovalbumin (Mr = 43000)

表2 牛脑 NSE 结晶的氨基酸组成

氨基酸	牛脑 NSE*	鼠脑 NSE**	人脑 NSE***
Asp	43	47	50
Thr	21	16	16
Ser	21	20	22
Glu	43	41	44
Pro	14	16	14
Gly	31	38	34
Ala	37	46	42
Val	23	28	26
Cys	4	6	—
Met	4	4	6
Ile	22	22	22
Leu	36	39	34
Tyr	12	5	12
Phe	21	13	13
Lys	24	26	27
His	7	6	6
Arg	18	19	18

* 以分子量为 50000 计算。

** 由参考资料[1]中摘得以亚基计算氨基酸组成。

*** 由参考资料[17]中摘得,以亚基计算氨基酸组成。

量 50000 道尔顿(如图6), 4%—30% 聚丙烯酰胺梯度胶电泳分析确定它的分子量为 50000 道尔顿(如图8)。表明牛脑 NSE 是由单一肽链所组成的。用 pH 表面电极测定等电聚焦电泳胶带的 pH 梯度,由标准曲线查出该酶的等电点是 4.7。如表2的氨基酸组成分析结果,表

明牛脑 NSE 的氨基酸组成中富含 Asp, Glu, 与其它来源的 NSE 的氨基酸组成相似。以 2-磷酸-D-甘油酸为底物测得牛脑 NSE 结晶的比活是 78 U/mg。

讨 论

用硫酸铵分级,二次 DEAE-Sephadex A-50 柱, Ultrogel 柱和 DEAE-Sephacel 柱层析纯化,建立了大规模制备牛脑 NSE 的方法。这种方法程序比较简单,免去昂贵的等电聚焦层析的繁杂步骤,可以得到纯度高,产率好的牛脑 NSE, 其产率为 50 mg/kg; 比活为 78U/mg。

通过向牛脑 NSE 溶液滴加饱和硫酸铵溶液,以及冻融的方法成功地制备了牛脑 NSE 的结晶。该方法较简单,重复性好,能够进行大规模结晶。我们得到牛脑 NSE 的结晶是针状的(如图 5); 从而区别于长棒棱状或板状的肌肉烯醇化酶同工酶结晶^[16]。牛脑 NSE 结晶在双向电泳上仅显示一个斑点。

牛脑 NSE 是由分子量为 50000 道尔顿的单一肽链组成的分子,富含 Asp, Glu, 是等电点为 4.7 的酸性蛋白,这些性质与文献所报道的 NSE 的性质相似^[1-6]。

采用我们设计的纯化方法可以很方便地获得大量的牛脑 NSE 纯酶,为进行抗体制备,人

脑 NSE 抗体的纯化,进行同工酶的结构与功能的研究,提供了高纯价廉的酶制剂。

参 考 文 献

- [1] Zomzely-Neurath, C. E. et al.: in *Proteins of the Neurons System* (Bradshaw, R. A. & Schneider, D. M., eds.) 2nd Ed., Rafen. Press, New York, 1980, 1—57.
- [2] Marangos, P. J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, **68**, 1309.
- [3] Suzuki, F., et al.: *J. Biochem.*, 1980, **87**, 1587.
- [4] Alfonso, G. et al.: *Brain Research*, 1977, **124**, 497.
- [5] Rider, C. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1974, **365**, 285.
- [6] Kato, K. et al.: *J. Neurochem.*, 1981, **37**, 998.
- [7] Ishioka, N. et al.: *J. Biochem.*, 1984, **95**, 611.
- [8] Marangos, P. J.: *Ann. Rev. Neurosci.*, 1987, **10**, 269.
- [9] Marangos, P. J. et al.: *Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology.*, 1980, **4**, 212.
- [10] Winstead, J. A. et al.: *Biochem. Prep.*, 1966, **11**, 31.
- [11] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》人民教育出版社, 北京, 1981, 164—165 页。
- [12] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》人民教育出版社, 北京, 1981, 112—116 页。
- [13] Pharmacia Fine Chemicals: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis Laboratory Techniques*, 1983, 13—20.
- [14] Pharmacia Fine Chemicals: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis Laboratory Techniques*, 1983, 31—36.
- [15] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 1975, **250**(10), 4007.
- [16] David A. Hullin. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1980, **628**, 98.
- [17] Baranowski, T. & Wolna, E.: *Methods in Enzymology* (Wood, W. A. ed.) Academic Press, Inc. New York. 1975, **XLII**, 335—338.

[本文于 1988 年 5 月 16 日收到]

食用色素生产技术

——北京市星火技术研究所提供(5090号)

内容有柠檬黄、桔黄、苏丹黄、大红、胭脂红、杨梅红、苋菜红、樱桃红、靛蓝、亮蓝等食用染料的生产 and 红曲米、紫胶、甜菜红、姜黄素、红花黄 β -胡萝卜素、叶绿素铜钠、焦糖、栀子黄等食用天然色素生产技术。资料

费 20 元。

汇款及通讯处: 北京 867 信箱 20816 组李群, 邮政编码: 100024。