

工业芳香族化合物环保的可能性. 进一步做此酶的氨基酸序列分析, 对分别来自 *Co.* 与 *Ps.* 两菌属的 MOB4-HOase 与 MOB6-HOase 组成、结构、性质做比较, 这对揭示 *Co.* 和 *Ps.* 菌株的起源、进化的奥秘有重要的意义.

致谢 对日本林原生物化学研究所为我们大量培养细菌表示感谢. 我们的课题得到日本川崎医科大学资助和两备圣园纪念财团助成金, 在此一并感谢.

参 考 文 献

- 1 Hosokawa K, Sato K, Nigo Y *et al.* Protein structure and genetic engineering, Proceeding 23rd seminar on science and technology. Tokyo: Tokyo press, 1994: 69~90
- 2 Wang L-H, Hamzah R Y, Yu Y *et al.* Biochemistry, 1987; **26**: 1099
- 3 Oishi N, Hosokawa K. Seikagaku, 1988; **60**: 655
- 4 Rajasekharan S, Rajasekharan R, Vaidyanathan C S. Arch Biochem Biophys, 1990; **278**: 21
- 5 Premkumar R, Subba Rao P V, Sreeleela N S *et al.* Can J Biochem, 1969; **47**: 825
- 6 Hosokawa K, Stanier R Y, J Biol Chem, 1966; **241**: 2453
- 7 Laemmli U K. Nature (London), 1970; **227**: 680
- 8 Hesp B, Calvin M, Hosokawa K. J Biol Chem, 1969; **244**:

5644

Purification and Partial Characterization of meta-Hydroxybenzoate Hydroxylase. Chen Rui (Department of Biochemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China); Keiichi Hosokawa (Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School, Kurashiki 701-01, Japan).

Abstract The m-hydroxybenzoate hydroxylase (MOB4-HOase) with 62 000 relative molecular mass from *Comamonas testosteroni* was purified to homogeneity upon SDS-PAGE by using sonic crushing, ammonium sulfate fractionation, molecular sieve chromatography, calcium phosphate gel chromatography and ion exchange chromatography. MOB4-HOase has been purified about 21 fold in specific activity with about 30% yield. This enzyme is a FAD-monooxygenase to catalyze m-hydroxybenzoate to protocatechuic acid.

Key words meta-hydroxybenzoate4-hydroxylase, purification, characterization, *Comamonas testosteroni*

67 ku 胃蛋白酶原的分离纯化及性质研究*

肖志坚 杨希震 蒋孟军 黄旭荃

(江苏省原子医学研究所, 核医学国家重点实验室, 无锡 214063)

摘要 用 DEAE-52 阴离子交换层析, 高压液相凝胶过滤层析两步法, 从人胃粘膜中分离纯化到分子质量为 67 ku 的胃蛋白酶原. 此蛋白具有较强的抗碱性, 水解活性在 pH 10.8 处理后仍无明显变化, 其水解活性的最适 pH 为 1.8, 比活性为 5.96 U/mg.

关键词 胃蛋白酶原, DEAE-52 层析, 高压液相层析

国外许多研究表明, 人胃粘膜能分泌多种胃蛋白酶原 (pepsinogens)^[1,2]. Samloff^[1] 根据它们不同的电泳迁移率分别命名为 Pg1~Pg7, 其中 Pg2~Pg5 定为 PG I, Pg6~Pg7 定为

PG II, 两者分子质量接近, 均为 40 ku 左右^[3]. 而分子质量较大的 Pg1 由于在粘膜中

*江苏省科委基础研究课题资助.

收稿日期: 1995-09-27, 修回日期: 1995-12-14

含量较少, 纯化较为困难, 所以对其生化特性研究不多. 我们采用阴离子交换层析, 制备型高压液相层析, 从人胃粘膜中提纯了 Pg1, 并对其最适 pH、抗碱性等进行了研究.

1 材料与方法

1.1 胃粘膜收集

取手术切除胃的正常胃粘膜, 用 100 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.3 漂洗后, 剥离胃粘膜层, -70°C 保存.

1.2 试剂及仪器

DEAE-52 为 Whatman 公司产品, 高速低温离心机为 Beckman J2-HS 型, 高压液相仪为 Bio-Rad 5000 系列, 高压液相层析柱为 Bio-Sil SEC 125 (600 mm \times 21.5 mm), 毛细管电泳仪为 Bio-Rad Biofocus 3000, 垂直平板电泳仪为 Bio-Rad Mini-Protein II.

牛血红蛋白和低分子量标准蛋白均为中国科学院上海生物化学研究所产品. 其余试剂为分析纯试剂.

1.3 方法

1.3.1 匀浆: 胃粘膜组织用滤纸吸干, 称重, 每克组织加入 4 ml 100 mmol/L 的磷酸缓冲液, pH 7.3, 捣碎匀浆, 刀速 15 000 r/min, 每次 3 min, 共 3 次. 18 000 g 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用原 1/4 体积的磷酸缓冲液重悬, 再次离心, 上清即为粗提液.

1.3.2 DEAE-52 阴离子交换层析: 粗提液对 20 mmol/L 的磷酸缓冲液, pH 7.1 透析过夜, 加入已用上述缓冲液预平衡的 DEAE-52 层析柱 (2.5 cm \times 35 cm), 用含 100 mmol/L NaCl 的上述缓冲液洗脱杂蛋白直至 280 nm 吸收值为 0. 继用含 800 mmol/L NaCl 的上述缓冲液洗脱胃蛋白酶原活性峰. 超滤浓缩, 透析后冷冻干燥, -30°C 保存.

1.3.3 制备型高压液相凝胶过滤层析: 取冻干品 15 mg, 用 1 ml 50 mmol/L 的磷酸缓冲液, pH 6.7 (含 50 mmol/L Na_2SO_4) 溶解, 一次性自动进样, 用上述缓冲液洗脱, 流速 3.0 ml/min, 压力 8 kPa, 吸收值量程为 0.5.

1.3.4 胃蛋白酶原含量测定: 蛋白总量用 Lowry 法测定, 以 BSA 为标准.

1.3.5 胃蛋白酶原活性测定: 取 0.5 ml 适当稀释样品, 加入 2.5 ml 血红蛋白底物 (2 ml 2.5% 牛血红蛋白 + 0.5 ml 200 mmol/L HCl, pH 2), 28°C 温育 30 min, 加入 5.0 ml 300 mmol/L 三氯醋酸终止反应, 过滤消化液, 测 280 nm 吸收值. 1 单位酶活性相当于单位时间内酶分解底物产生 1 μmol 酪氨酸量^[3].

2 结 果

2.1 胃蛋白酶原的纯化

图 1 为 DEAE-52 柱层析分离胃蛋白酶原的洗脱曲线. 第一峰为 20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.1 (含 100 mmol/L NaCl) 洗脱的杂蛋白峰, 第二峰为 20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.1 (含 800 mmol/L NaCl) 的洗脱峰, 即为蛋白水解活性峰.

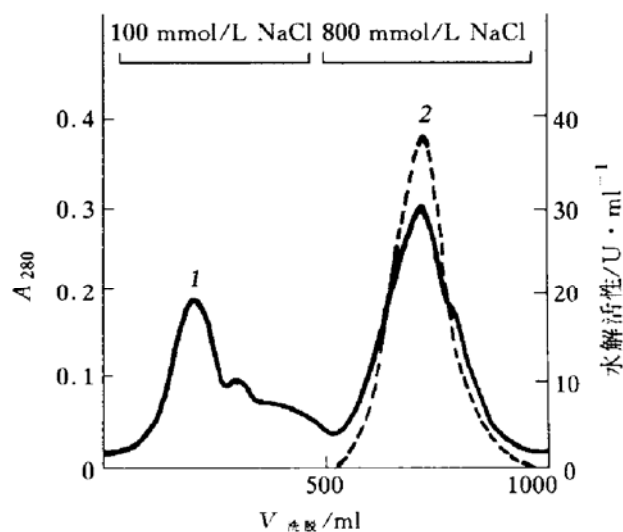


图 1 胃蛋白酶原 DEAE-52 柱层析图

—: A_{280} ; ---: 水解活性.

图 2 为高压液相层析分离 Pg1 的图谱. Pg1 的保留时间为 36~40 min, 随后是 PG I 和 PG II, 保留时间为 41~60 min. 在含量上, Pg1 较后两者低, 其峰面积占 2%.

2.2 Pg1 纯度鉴定

一定 pH 值下, 蛋白质分子在电场中的迁移速率与其净电荷数成正比, 与质量成反比. 不同蛋白质由于等电点和质量的不同, 在毛细

管中的迁移速度也不相同,从而达到高效分离不同蛋白质的效果.图3为Pg1的电泳图谱,只出现一个峰,说明高压液相分离所得的Pg1是均一的.

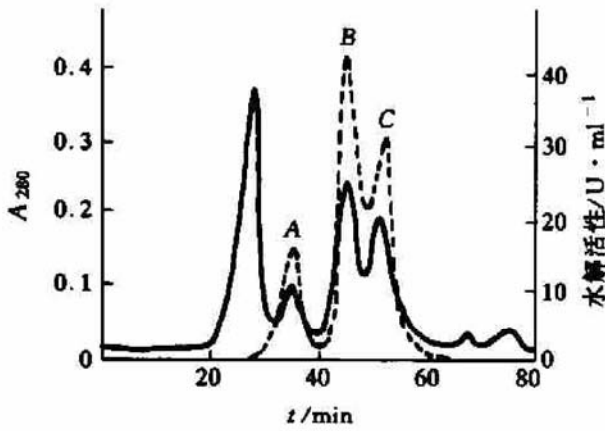


图2 Pg1的高压液相层析分离图

●—: A_{280} ; ---: 水解活性. A: Pg1; B: PG I; C: PG II.

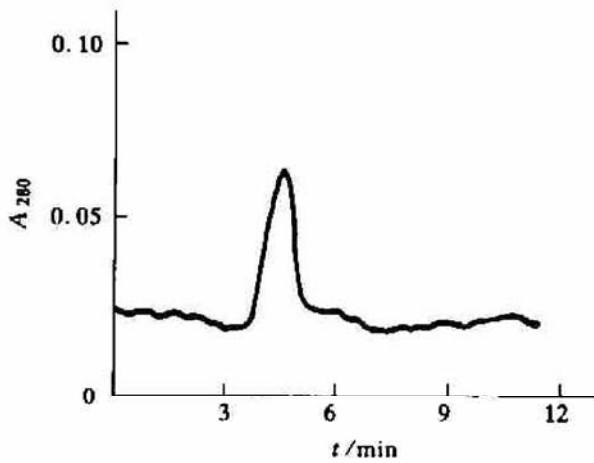


图3 Pg1毛细管电泳图

电泳条件: 进样方式为压力进样, 进样量为 30 Psi·s (压力×时间), 电压 10 kV, 电泳缓冲液为 300 mmol/L 硼酸缓冲液, pH 8.5. 毛细管为熔氧化硅涂层的 BioFocus 24 cm×25 μ m.

过滤消化液, 测 280 nm 吸收值. 结果见图 5. 从图 5 中可看出, Pg1 蛋白水解活性的最适 pH 为 1.8, 此时 Pg1 的比活性为 5.96 U/mg.

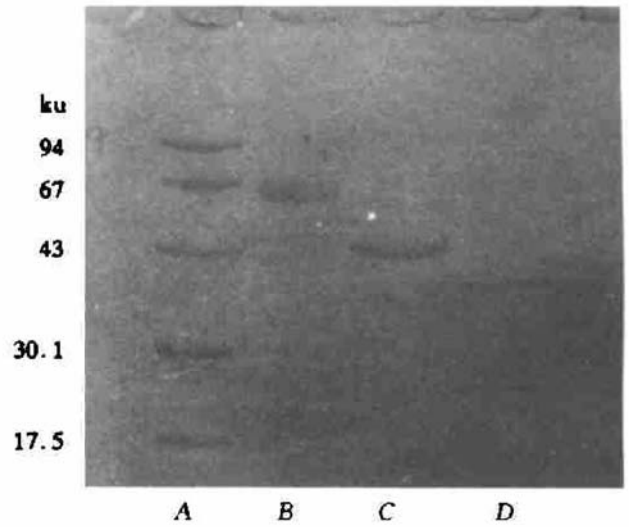


图4 Pg1的SDS-PAGE

A: 蛋白质分子质量标准; B: Pg1; C: PG I; D: PG II.

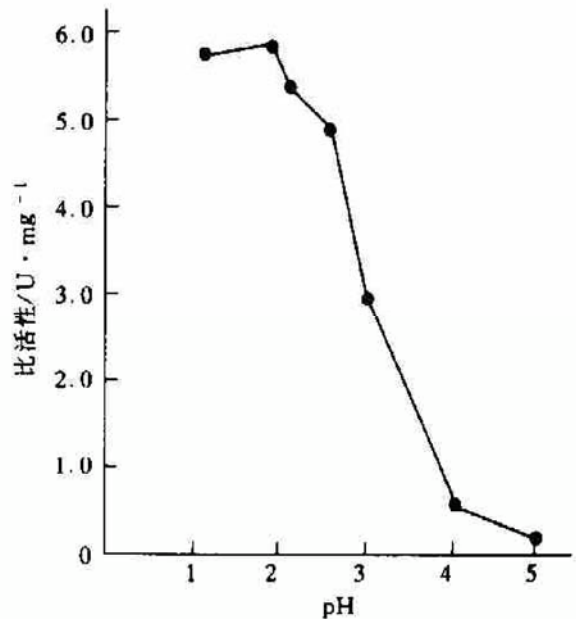


图5 Pg1的最适 pH

2.3 分子质量测定

SDS-PAGE 测得 Pg1 分子质量为 67 ku (图 4).

2.4 pH 与 Pg1 水解活性的关系

分别配制 pH 为 1.0、1.8、2.0、2.5、3.0、4.0 和 5.0 的牛血红蛋白底物溶液各 2.5 ml, 每管加入 500 μ l 0.36 g/L 的 Pg1, 28 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 再加三氯醋酸终止反应,

2.5 抗碱性

分别配制 100 mmol/L, pH 为 7.0、8.0、9.0、10.0 和 10.8 的不同缓冲液, 各取 500 μ l, 每管加入 100 μ g Pg1 冻干品, 溶解后, 25 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 再分别用 200 mmol/L HCl 调至测水解活性的最适 pH 1.8, 移入同为 pH 1.8 的 2.5 ml 牛血红蛋白底物中, 28 $^{\circ}$ C 温育

30 min, 然后按方法中叙述的步骤测定其水解活性. 以最高 280 nm 吸收值为 100% (图 6), 结果表明, 当 pH 达 10.8 时, Pg1 仍不失活.

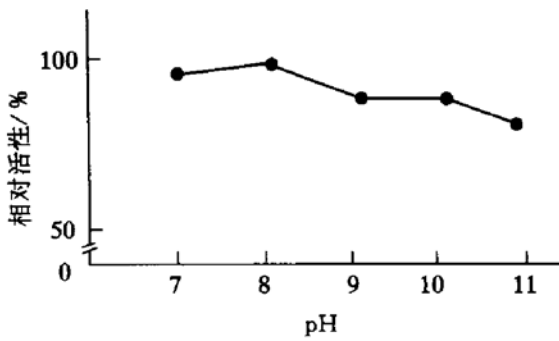


图 6 Pg1 的抗碱性

3 讨 论

pH 近中性时, 胃蛋白酶原在 DEAE-52 上吸附较强, 用 20 mmol/L 的磷酸缓冲液, pH 7.1 (含 100 mmol/L NaCl) 洗脱, 可去除大部分的杂蛋白. 凝胶过滤 HPLC 是一种快速高效的分离 Pg1 的方法, 特别在使用 Bio-Sil SEC 125 (600 mm × 21.5 mm) 层析柱时, 对 Pg1 分离效果较好, 如图 2 所示. 且一次上样量可达 10~100 mg 蛋白, 体积为 1 ml.

胃蛋白酶原在 pH 2 左右的酸性条件下, N 端约 25 个氨基酸残基从蛋白链上分解下来, 这样胃蛋白酶原就被激活成了胃蛋白酶, 因此, 胃蛋白酶原只有在酸性条件下才显示出它潜在的水解活性. 本文利用不同酸性 pH 的牛血红蛋白底物测得 Pg1 水解活性的最适 pH 为 1.8, 当 Pg1 分泌入胃腔时, 可迅速激活成胃蛋白酶参与消化活动.

Samloff 等^[1,4]的早期研究发现, 胃蛋白酶原能在碱性溶液中存在较长的一段时间, 而不丧失其水解活性. 因此抗碱性一直作为鉴定胃蛋白酶原的特性之一. Pg1 的抗碱性说明它确实是胃蛋白酶原的组分.

胃蛋白酶原是胃液中蛋白分解酶“胃蛋白酶”的基础物质, 大部分分泌至胃中, 但仍有少量进入血液中^[5]. 胃蛋白酶原分泌量的多少与胃粘膜的功能有直接的关系, 而且不同的

胃蛋白酶原在胃粘膜上的分布位置是不同的, Pg1 位于胃底部^[6]. 因此可通过检测血清中胃蛋白酶原的含量来反映胃粘膜的功能情况, 这是一个非侵入性指标, 当血清胃蛋白酶原低于某一极限时, 就有发生胃癌的危险^[7,8], 我们得到了 Pg1 纯品, 有助于进一步对其生化特性及其临床价值进行研究.

由于分离上的困难, 文献报道中对 Pg1 研究不多. 我们在得到 Pg1 后, 发现其含量虽少, 但水解活性较高, 故引起我们关注, 并加以深入研究. 我们正在免疫新西兰纯种兔, 制备抗血清, 建立放射免疫分析方法, 研究它与胃部疾患的关系.

参 考 文 献

- 1 Samloff M. *Gastroenterology*, 1969; **57**: 659
- 2 Peter H W, Veronica K N, Luciano C. *Biochem Physiol*, 1978; **61B**: 491
- 3 Samloff M. *Gastroenterology*, 1982; **82**: 26
- 4 Furihata C. *Eur J Biochem*, 1980; **105**: 43
- 5 Samloff M. *Gastroenterology*, 1970; **58**: 462
- 6 Shih C H, Kazumasa M, Junjiro S *et al.* *Jpn J Cancer Res*, 1988; **79**: 1139
- 7 Yamaguchi T. *Jpn J Surg*, 1990; **20** (1): 70
- 8 Yamaguchi T. *Cancer*, 1991; **68** (4): 906

Purification and Characterization of the Pepsinogen with 67ku Mass of Molecular. Xiao Zhijian, Yang Xizhen, Jiang Mengjun, Huang Xuquan (*Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, State Key Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China*).

Abstract The pepsinogen with higher molecular weight was purified from human gastric mucosa. The procedure included DEAE-52 ion-exchange chromatography and gel filtration HPLC. This 67 ku pepsinogen resists alkalization up to pH 10.8. The optimal pH of the pepsinogen is 1.8 and its specific proteolytic activity is 5.96 U/mg.

Key words pepsinogen, DEAE-52, HPLC