

高活性组织蛋白酶 C (二肽酰氨基肽酶) 的制备

江苏新医学院生化教研组

组织细胞中有各种肽酶, 已知的有组织蛋白酶 A、B、C、D、E、氨基肽酶和二肽酶等。它们是溶酶体中的重要成分。其中工作做得较多的是组织蛋白酶 C。1948 年 Gutmann 和 Fruton 在猪肾发现组织蛋白酶 C 以后, Tallan 等 (1952) 从牛脾分离了这种酶。但组织蛋白酶 C 的提纯比较困难, 自发现到接近提纯经过了近 20 年时间。1959 年 de la Haba 等从牛脾得到了纯度稍高的组织蛋白酶 C 制品, 其水解比活性为 29 单位/毫克, 报道超速离心分析显示组织蛋白酶 C 所在的重成分占 25%。以后 Planta 和 Gruber (1961) 曾得到比活性为 36 单位/毫克的制品, 徐 (1965) 从牛脾得到比活性 117 单位/毫克, 超速离心分析只有重成分的制品。1966 年 Mettrione 等^[1] 从牛脾制得高活性组织蛋白酶 C, 其活性为 de la Haba 制品的 9 倍。同时我们也从猪脾制得比活性超过 300 单位/毫克的制品。1969 年 Mc Donald 又从大鼠肝脏制得高活性的组织蛋白酶 C。

牛脾组织蛋白酶 C 的分子量为 210,000^[1], 或 197,000, 由 8 个亚基组成^[2]。

组织蛋白酶 C 的特异性较宽, 能从肽键的 N 端连续裂下二肽, 直到遇到精氨酸或赖氨酸, 或含有脯氨酸的肽键为止。所以组织蛋白酶 C 也称二肽酰氨基肽酶, 是蛋白质结构分析上的一个有用的试剂。并且组织蛋白酶 C 的粗制品比较稳定, 据报道浓缩液至少可以冷藏 7 个月而活性没有明显下降^[3]。

组织蛋白酶 C 有许多重要的生理作用。 β 促肾上腺皮质激素、高血糖素、高血压素、胃泌激素、肠促胰激素等都能被组织蛋白酶 C 分解而失活, 另外组织蛋白酶 C 还能活化凝血酶

元^[4,5]。

继得到高活性的组织蛋白酶 C 以后, 我们曾做过一段猪胰组织蛋白酶 C 的制备工作。开始曾有多批制品没有活性。鉴于组织蛋白酶 C 能受巯基化合物的活化, 以及它不耐冰冻干燥的性质, 我们对所用试剂全部处理精制, 并且应用了一个简单的浓缩方法, 得到了比活性稳定在 300 单位/毫克以上的制品。

一、酶活性的测定

分离过程中用转肽反应测定活性。最终产物用 Conway 扩散法测定水解比活性。底物用甘氨酸酪氨酰胺或甘氨酸苯丙氨酰胺, 系由苯氧羰法合成。

1. 转肽反应活性

溶液 I: 0.04 M 巴比士缓冲液, pH 7.2 135 毫升 6.9 N 氢氧化钠 5 毫升

溶液 II: 临用前配制, 每份检样用盐酸半胱氨酸 3 毫克

溶液 I 1.40 毫升

2 M 盐酸羟胺 0.20 毫升

配成溶液的 pH 为 7.2。

方法: 试管中加底物 (甘氨酸酪氨酰胺) 5 毫克, 溶液 II 1.60 毫升。在 37°C 水浴中预温 3 分钟 (待底物溶解), 吸入酶溶液 0.1 毫升 (含蛋白质 5—200 微克)、准确保温 10 分钟, 加入 20% 三氯乙酸 0.5 毫升停止反应。然后加水 3 毫升, 5% 三氯化铁 0.5 毫升。15 分钟后测 E_{500} 。以光密度作为酶活性。空白同时进行, 但不加酶溶液。

2. 水解反应活性

酶溶液用 pH 5.0 的 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液

配制,每 0.1 毫升含酶量在 2—3 微克之间。蛋白质质量用 Lowry 法测定^[6],用结晶牛清蛋白做标准。

试管中称入甘氨酸苯丙氨酸胺(醋酸盐) 1.40 毫克(0.005 mM),半胱氨酸 0.3 毫克。将此带有底物的试管放入 37℃ 水浴,然后加入 0.1 毫升酶溶液,在 37℃ 保温 60 分钟,将此反应液移入 Conway 皿。

Conway 皿的内室存 1 毫升 2% 硼酸。酶反应到达规定时间时,取出试管,在试管中加 0.4 毫升水,用吸管移入 Conway 皿外室,试管再分别用 0.5 毫升水洗二次,每次照样移入 Conway 皿,然后立即在外室加入 0.5 毫升 75% 碳酸钾,在室温扩散 4 小时,用 0.005 N 盐酸滴定,指示剂用 0.1% 溴甲酚绿-甲基红(5:1)。

每份检样都做双份。空白用 0.005 mM 底物,0.3 毫克半胱氨酸,0.1 毫升 pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液,保温后移入 Conway 皿,同样操作。

每一单位组织蛋白酶 C 是指上述条件下相当于在 1 分钟内能水解 1% 底物的酶量。

二、分离步骤

猪脾 5 公斤(已剥去脂肪和筋膜),在 -15℃ 冻硬,切成小块,用绞肉机绞碎,摊在盘中,在室温融化后放进 -15℃ 冰箱过夜冻硬,再在室温融化。如此反复冻融共四次。然后将冻脾糜与 10 升冰冷的蒸馏水混合,在 0—4℃ 浸泡半天,冷却下磨碎。匀浆用盐酸酸化到 pH 4.0 (用 2.2 N 盐酸<重蒸馏>约 250 毫升)。1 小时后用双层纱布滤去粗渣,再在冷处用滤纸过滤,得棕黄色滤液 8000 毫升。滤液的 pH 为 4.01,含蛋白质约 2.5%。

每升滤液中加硫酸铵粉末 560 克沉出蛋白质。在冷处过滤。将沉淀刮下,在 0℃ 离心压紧。然后将沉淀用二倍容积的 pH 4.0 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液溶解,离心得抽提液 720 毫升(含蛋白质 6.25%)。测定其中硫酸铵浓度后,加饱和硫酸铵溶液(pH 4.0)到 50% 饱和。在 0℃ 过滤,得滤液 850 毫升,再加入硫酸铵粉末到 70% 饱和(每 1000 毫升滤液加硫酸铵 224 克)。

放置 2 小时后在 0℃ 离心,收集沉淀。此沉淀是 50—70% 饱和硫酸铵部分。计算硫酸铵的饱和度时,以每升溶液含硫酸铵 700 克作为饱和。

将 50—70% 饱和硫酸铵部分溶在少量 3% 氯化钠中,少量分批(每次不超过 5 毫升)放在锥形瓶中,在 60℃ 水浴中加热 20 分钟。加热后立即用冰水浴冷却。在 0℃ 离心,得上清液 44 毫升,其中蛋白质浓度为 6.25%,加硫酸铵粉末沉淀出蛋白质,这时的沉淀为加热部分。

将 DEAE 葡聚糖凝胶 A-50(氯化型)悬于 pH 5.6 的 0.02 M 磷酸钠缓冲液中,反复漂去细粒部分后,用留下的粗粒部分装柱(2.2 × 15 厘米)。把加热部分对上 pH 5.6、0.02 M 磷酸钠缓冲液,在 0℃ 透析平衡过夜,得透析溶液 20 毫升,分加在三根 DEAE 葡聚糖凝胶柱上,溶液渗入柱中后,用 pH 5.6、0.02 M 磷酸钠缓冲液洗脱。分段收集滤出液,测定各管中蛋白质浓度。集合第一峰的各管溶液,共得 40 毫升。加硫酸铵沉淀出蛋白质(DEAE 部分)。层析是在 0℃ 进行,用过的层析柱用 10% NaCl 冲洗,待移动的黄色层带洗下后,挖去顶部褐色的一段。其余经缓冲液洗去氯化钠后留待下次应用。

将 6 克葡聚糖凝胶 G 200 悬于 pH 4.0 的 0.005 M 柠檬酸钠缓冲液,待胀开后装入柱中(2.5 × 50 厘米),放入冰箱,将上述 DEAE 部分的硫酸铵沉淀对冰冷的 pH 4.0、0.005 M 柠檬酸钠缓冲液透析,制得溶液 4 毫升,加在葡聚糖凝胶 G 200 柱上,待溶液渗入柱表面时,继续用 pH 4.0、0.005 M 柠檬酸钠展开。在 0℃ 进行层析。分段收集滤出液,测蛋白质浓度。收集第一个峰的部分(图1),得溶液共 20 毫升(含蛋白质约 30 毫克)。比活性 214 单位/毫克。加硫酸铵粉末沉淀出蛋白质。在 0℃ 离心,收集沉淀块(pH 4.0 凝胶过滤部分)。

上面凝胶过滤的得样中含有柠檬酸钠缓冲液以及少量葡聚糖凝胶的分解产物,这些杂质可以再用葡聚糖凝胶 G 200 过滤除去,将 1 克葡聚糖凝胶 G 200 悬于水中,待胀开后装入柱

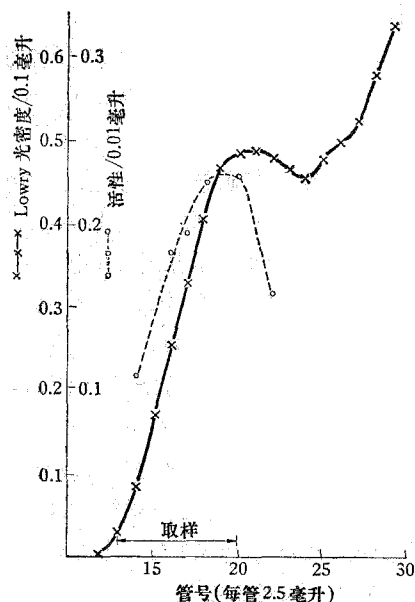


图1 葡聚糖凝胶 G200 过滤 (pH 4.0)

中(1.2 × 40 厘米),放入冰箱。将 pH 4.0 凝胶过滤部分的沉淀对冰冷的蒸馏水透析,得溶液约 0.8 毫升,加在 G 200 柱上,在 0℃ 用蒸馏水展开。分段收集滤出溶液,测蛋白质浓度,采集第一峰部分(图 2),得溶液约 10 毫升(每毫升含蛋白质 2.14 毫克),并测定比活性,共得量约 20 毫克,比活性 310 单位/毫克。

三、讨 论

组织蛋白酶 C 是一种巯基酶,因此要制得高活性的酶制品,首先是要把试剂中毒害巯基的杂质除净,硫酸铵是大量应用的试剂,因此只要含有少量重金属杂质,就会严重影响结果。开始我们用化学纯级硫酸铵,得出的制品几乎没有活性;后来用重结晶的硫酸铵,有不少改进,但制品的活性仍不高;最后用 H_2S 处理硫酸铵等试剂,才得到了高活性制品。

用 H_2S 处理硫酸铵的方法如下:硫酸铵(化学纯)配成浓溶液,通入 H_2S 到饱和,放置过夜,用滤纸过滤,溶液在瓷蒸发皿中浓缩结晶,吸滤收集结晶,在 100℃ 烘干。其他试剂都用同样方法处理。

冰冻干燥,尤其是在有盐存在时,能引起组织蛋白酶 C 变性失活,下面是一次实验的结果。

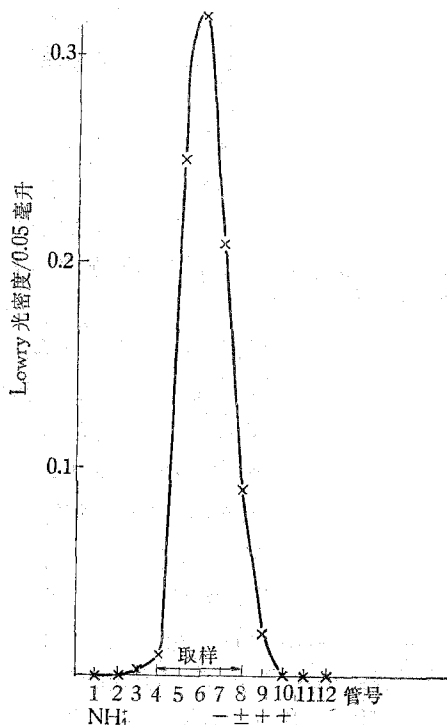


图2 葡聚糖凝胶 G200 脱盐

处	理	转肽比 活 性
原样品的水溶液		5.75
同上,冰冻干燥		3
同上 1 毫升 + 0.005 M 柠檬酸钠缓冲液,冰冻干燥		2.2
同上 1 毫升 + 0.9% NaCl 0.5 毫升,冰冻干燥		0.9
同上 1 毫升 + 0.9% NaCl 1 毫升,冰冻干燥		0.25

冰冻干燥是浓缩蛋白质溶液比较常用的方法,这曾给分离组织蛋白酶 C 带来许多困难,我们用硫酸铵沉淀结合透析的方法来浓缩蛋白质溶液。方法如下:

将 DEAE 层析或凝胶过滤等收集的溶液用冰浴冷却,加入硫酸铵粉末到 80% 饱和沉出蛋白质,在 0℃ 离心,收集沉淀。这种条件下每毫升母液中约丢失蛋白质 0.25 毫克。

要把硫酸铵沉淀制成浓溶液,必须除去沉淀中的硫酸铵才能达到目的。脱盐采取以下的方法:在互相可以套叠的有机玻璃圆筒中间箍入透析纸,在漏斗中放平。漏斗架放在烧杯上,烧杯中放水或其他合适的缓冲液,液面高度以刚触及透析纸为度。在冰箱中冷却。将离心管

中的沉淀刮下,放在透析纸上,对烧杯中的溶液透析。待沉淀溶解后,再用滴管将蛋白溶液移回离心管中把沉淀悬起,再移入透析器中透析。如此反复几次,可以把沉淀中的大部分硫酸铵除去,得到浓缩的蛋白质溶液。脱盐装置见图3。

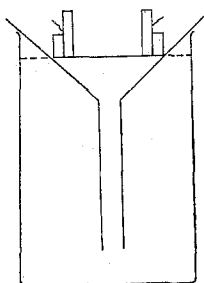


图3 脱盐装置

以往 de la Haba 等是在 pH5.4 进行电泳分析和超速离心鉴定,二者的结果很不一致,因此 pH 5.4 时电泳分析不能作为制品纯度的指标, pH 4.0 时电泳可将粗制组织蛋白酶 C 分成 6 个成分,这个条件可以作为引导组织蛋白酶 C 提纯的指标,在凝胶过滤时我们也采用了 pH 4.0 的条件。

我们用同法做了二批高活性猪脾组织蛋白酶 C,它们的水解比活性分别为每毫克 320 单位和 310 单位。它们的脱盐样品在冰冻干燥后,做淀粉胶电泳分析都是单一成分,但有明显的弥散现象,这种脱盐的干燥制品很不稳定,在冰箱中储存一天后再做电泳,弥散现象就很显著,已呈明显的变性迹象。

参 考 资 料

- [1] Mettrione, R. M., et al.: *Biochem.*, **5**, 1597, 1966.
- [2] Mettrione, R. M., et al.: *ibid*, **9**, 2427, 1970.
- [3] Huang, F. L., et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **268**, 527, 1972.
- [4] Purcell, G. M., et al.: *ibid.*, **78**, 800, 1963.
- [5] Johnston, M. F. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3987, 1972.
- [6] Lowry, O. H., et al.: *ibid.*, **193**, 265, 1951.

[本文于 1975 年 9 月 24 日收到]

(上接第 54 页)

青蛙之类比较低等的动物,其视网膜感受野分化成各种特性检查器,其行为犹如一架自动机,只能识别有限数目的图形,进一步“学习”的可能性又不大,因此,这些低等动物识别简单图形的能力,估计它的神经结构起着很大作用。至于比较高等的动物,情况就大不相同了。它们的视觉系统的中枢部分比较发达,行为反应也比较复杂多样,学习的可能性也比较大,一些实验表明,即便象“方向检查器”这样的基本感受单元,在猫的视系中,也与环境经验有着紧密的联系。而人对于抽象符号、文字等等的识别,必须经过学习,这是毋庸置疑的了。

4. 随着视觉系统的研究的深入,特别是感受野的研究工作,积累了大量的资料,从而为进一步进行理论研究提供了基础,因此关于感受野的数学模型研究,近年来越来越多。此外,感

受野的电子模型也开展起来。不论是数学模型还是电子模拟,不外是两个目的,其一,是为了更好地了解生物原型,了解视觉系统的功能。人们构造各种模型(或假设),然后用实验加以检验修改,使其日益完善。其二,建立模型以后,为进一步应用提供了基础。特别是文中介绍的一些电子模型,都是为了工程上的需要而进行的。因此,研究视觉系统,特别是感受野的研究,对于工程系统的研制(尤其是图象识别系统),提供了参考线索。

反之,工程技术的发展,特别是图象识别装置的研制,也为视觉系统的研究,提供了许多新观点和技术(信息加工理论,空间滤波概念,预加工,电子计算机等等)。这些新观点和技术,对于视觉系统的研究,开创了一个生动活泼的局面。这二个不同的研究领域,今后必然会有更多的交流和相互促进。