

表3 温度对安培滴定值的影响

温度(°C)	终 点 0.005N KIO ₃ (ml)	安培滴定值
2.0	0.71	4.23
14.5	0.70	4.29
17.5	0.70	4.29
21.5	0.71	4.23
28.0	0.71	4.23
45.0	无突变点	—
51.5	无突变点	—

表4 样品脱脂与不脱脂测定结果比较

品种名称	直链淀粉* %		不脱脂与脱脂 相差(%)
	脱 脂	不 脱 脂	
庚湘	21.6	17.1	-4.5
朝阳早 107	18.3	6.0	-12.6
桂朝 2 号	21.0	6.1	-14.9
广陆矮	17.7	6.2	-11.5
珍珠矮	18.3	11.0	-7.3
广解 9 号	18.0	6.2	-11.8

* 两次测定的平均值

明: 在实验范围内, 糊精、支链淀粉对直链淀粉安培滴定值没有明显影响。同时选用了六个水稻品种, 研磨

烘干, 其中一份脱脂, 分别测定样品中直链淀粉含量(表4)。可以看出, 不脱脂样品中直链淀粉含量显著低于脱脂样品, 这是因为谷物脂肪中的软脂酸、油酸、亚油酸等能与直链淀粉形成比较稳定的复合物, 相应降低了直链淀粉测得量。

4. 甘汞电极的寿命

简易的安培滴定装置, 操作方便。但由于甘汞电极多为多孔陶瓷微孔结构、易沾附淀粉碘复合物, 引起电流值减小, 使用几次就要重新更换。我们将甘汞电极放在 0.5N 热氢氧化钠溶液中浸泡数分钟, 用蒸馏水洗净, 电极立即恢复原有性能。

5. 安培滴定结果的稳定性和准确性

在每次测定时, 由于旋转铂电极的搅拌速度不同, 电流增值发生明显变化, 速度愈快, 增值愈大, 但突变点不变, 滴定终点一致, 保证了测定结果的稳定性及准确性。

参 考 文 献

- [1] Williams, P. C. et al.: *Cereal Chem.*, **47**, 411, 1970
- [2] Bruce, L. et al.: *Analytical Chemistry*, Vol. **25**(5), 803, 1953.
- [3] Bates, L. F. et al.: *Am. Chem. Soc.*, **65**, 142, 1943.
- [4] 何照范等: 《生物化学与生物物理进展》, 1, 70, 1981。

[本文于 1983 年 11 月 1 日收到]

两种 3', 5'-环核苷酸磷酸二酯酶的制备*

尚克进 凌启阔 李翠凤 曹 兢 胡卫鲤

(南开大学生物化学教研室, 天津)

3', 5'-环核苷酸磷酸二酯酶 [EC3.1.4.17] (以下简称 PDE) 首先从牛心中分离得到^[1,2]。PDE 在生物体中有重要功能, 它水解环核苷酸为 5'-核苷酸, 与核苷酸环化酶共同维持细胞内环核苷酸水平。

根据性质不同, PDE 可分为多种形式。其中主要的两种为: 依赖于 Ca²⁺ 的 PDE, 可以被钙调节蛋白(简称 CaM) 激活。另一种是不依赖于 Ca²⁺ 的 PDE, 不被钙调节蛋白激活。开展对环核苷酸、钙调节蛋白、某些药物药理作用、某些激素作用原理的研究, 以及筛选某些抗肿瘤药物, 均迫切需要分离制备这两种不同形式的 PDE。作者参照 Ho^[3] 和 Sharma 等^[4] 的方法, 并加以适当改进, 更为简便地同时制备出两种 PDE。

材 料 和 方 法

一、试剂与材料

DEAE-纤维素, DE-32(Whatman)

钙调节蛋白 (Sigma, 或按 Sharma 等^[4] 法制备)
EGTA (Sigma)
cAMP (上海生化制药厂)
眼镜蛇毒 (广西医学院)
牛血清白蛋白 (上海生物化学研究所)
牛心 (天津第三食品厂)
其它试剂均采用二级品

二、方法

1. 制备方法

新鲜牛心切去结缔及脂肪组织后, 于 -20℃ 保存备用, 三个月内未见 PDE 活性损失。

(1) 两次层析法 冰冻组织 500 克, 加入 2.5 倍体积的缓冲液 A (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5), 部分解冻后用高速组织捣碎机捣碎。10,000g

* 中国科学院科学基金会资助项目。

离心 30 分钟, 取上清液用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析, 饱和度为 55%。10,000g 离心 30 分钟, 取沉淀溶于约 50ml 缓冲液 B (20 mM Tris-HCl, 1 mM 咪唑, 1 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $10\mu\text{M}$ CaCl_2 , 10mM 巯基乙醇, pH7.0) 中。对缓冲液 B 透析过夜。105,000g 离心 60 分钟。取上清液以 0.5ml/min 的流速通过以缓冲液 B 平衡的 DEAE-纤维素柱 ($2.5 \times 50\text{cm}$)。样品进入后, 用两倍体积含 0.08M NaCl 的缓冲液 B 淋洗, 然后用含 0.08M NaCl 和 0.4M NaCl 的缓冲液 B 各 900ml 梯度洗脱。分部收集洗脱液, 通过电导率检测 NaCl 浓度, 280nm 检测蛋白, 并测定各分部的 PDE 活性。第一次层析后得到相互分离的两种 PDE 活性洗脱峰。分别合并两个峰, 对缓冲液 C (20 mM Tris-HCl, 1mM 咪唑, 1mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0.1mM EGTA, 10mM 巯基乙醇, pH7.0) 透析过夜。分别用两个以缓冲液 C 平衡的 DEAE-纤维素柱 ($2.5 \times 50\text{cm}$) 进行再层析。上样后用两倍柱体积含 0.08M NaCl 的缓冲液 C 淋洗, 然后用含 0.08M 和 0.4M NaCl 的缓冲液 C 各 450 ml 进行梯度洗脱。分部收集洗脱液, 得到进一步纯化的两种 PDE。合并高峰管, 分装后置 -20°C 下保存。

(2) 一次层析制备 PDE 样品只通过一次 DEAE-纤维素柱, 缓冲液直接使用含有 EGTA 的缓冲液 C, 梯度洗脱用含 0.08M NaCl 和 0.4M NaCl 的缓冲液 C 各 800ml。其它操作过程同上。

整个制备过程在 4°C 下进行。

2. 活性分析

(1) 样品活性分析 采用二步温育法^[2]。在冰浴下, 将适量待测样品加入分析液中, 分析液含 Tris-HCl 40mM (pH7.5), 咪唑 40mM, 醋酸镁 5mM, 氯化钙 0.1 mM, 钙调节蛋白 50ng, cAMP 1.2mM, 终体积为 0.9 ml, 混匀后开始第一次温育, 30°C 水浴保温 30 分钟后, 置沸水浴煮沸 2.5 分钟, 终止反应, 冷却后加入蛇毒 (1mg/ml) 0.1ml, 在 30°C 下第二次温育 10 分钟, 温育终了, 加入 55% TCA 0.1ml。3000 rpm 离心 20 分钟, 取上清液按 Fiske 和 Subbarow 法^[3]定磷, 生成的蓝色在 660nm 下比色。以沸水浴灭活的样品做为空白。

(2) Ca^{2+} 依赖性测定 在上述活性测定反应体系中, 以 0.1mM EGTA 代替 0.1 mM CaCl_2 作对比, 比较样品在有 Ca^{2+} 和无 Ca^{2+} 条件下的活性, 以确定样品对 Ca^{2+} 的依赖性。

(3) PDE 的激活曲线 在活性测定反应体系中, 加入 0.012—0.016U 的 PDE, 各管依次加入不同数量 (0—0.2 μg) 的 CaM, 用上述活性分析法测定 PDE 在不同量 CaM 下的活性。以 CaM 用量对 PDE 活性作图, 绘制激活曲线。

在 pH7.5, 30°C 的标准条件下, 酶被充分激活时, 每分钟水解 1 微克分子 cAMP 所需的酶量定义为一个 PDE 活力单位。根据此定义求出未激活时和最大激活

时的活力单位数。二者相除即得到激活倍数。

3. 蛋白质测定

层析过程, 根据蛋白质对 280nm 的吸收进行监测。

由于所用缓冲液中含有巯基乙醇, 采用 Ross 等^[6]的方法进行蛋白质定量测定, 用过量的碘代乙酸盐消除巯基化合物对 Lowry^[7] 法的影响。

蛋白质标准曲线用牛血清白蛋白制作。

结果与讨论

一、两次层析制备 PDE

1. 第一次层析

样品经过用缓冲液 B (含有 Ca^{2+}) 平衡的 DEAE-纤维素柱层析, 得图 1 所示洗脱曲线。在 NaCl 为 0.15M 和 0.21M 时得到相互分离的二个 PDE 活性峰 (PDE-I 和 PDE-II), 活性峰与 280nm 蛋白质吸收峰不重合。

Ho 等^[3]在有 Ca^{2+} 存在下, 进行第一次层析时, 两个活性峰未能分开, 仅得到一个较宽的活性峰。采用本文所述方法, 在第一次层析时即获得两种不同形式 PDE 的分离, 有利于进一步分离纯化。

2. 第二次层析

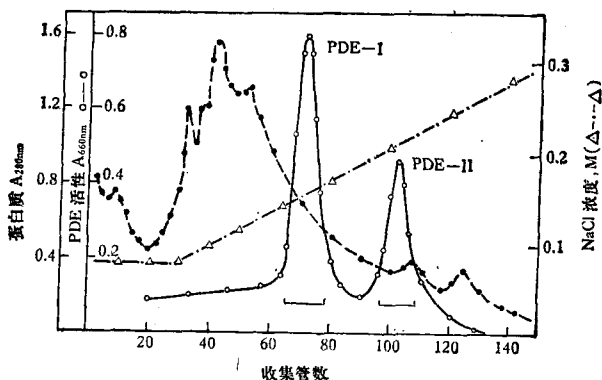


图 1 第一次 DEAE-纤维素柱层析分离

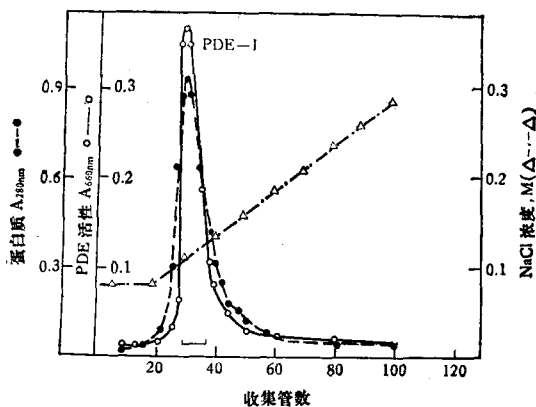


图 2 PDE-I 第二次层析洗脱曲线

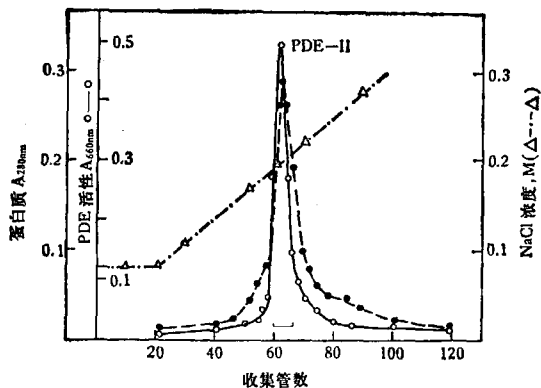


图3 PDE-II 第二次层析洗脱曲线

将第一次层析所得PDE-I和PDE-II的活性高峰管分别合并,各自通过一个用缓冲液C(含有EGTA)平衡的DEAE-纤维素柱进行再层析,得到图2、图3所示的洗脱曲线。

两个PDE峰分别经过第二次层析后,280nm蛋白吸收峰与活性峰基本重合,得到较纯的两种PDE。

通过外源CaM激活实验及 Ca^{2+} 依赖性实验(表1)证明:PDE-I和PDE-II为两种不同形式的PDE。PDE-I可被外源CaM激活,并且激活作用依赖于 Ca^{2+} 的存在;而PDE-II不被外源CaM激活,不具对 Ca^{2+} 的依赖性。

PDE-I经过第二次层析后,层析位置前移,在0.11M NaCl时被洗脱,因为在含有 Ca^{2+} 的第一次层析中, Ca^{2+} 的存在促使PDE-I与内源CaM结合,复合物带较

表1 PDE-I、PDE-II活性与外源CaM、 Ca^{2+} 的关系

	活性 (A_{660nm})	
	PDE-I	PDE-II
Ca^{2+}	0.081	0.33
CaM + Ca^{2+}	0.65	0.33
CaM + EGTA	0.08	0.32

表2 第二次层析前后PDE-I Ca^{2+} 依赖性, 被激活倍数比较

	PDE-I 活性 (A_{660nm})	
	第一次层析后	第二次层析后
Ca^{2+}	0.29	0.081
CaM + Ca^{2+}	0.36	0.65
激活倍数	1.2	8.0
CaM + EGTA	0.09	0.08

多负电荷、与DEAE结合紧密,因此要在较高的盐浓度下才被洗脱。而在无 Ca^{2+} ,有EGTA的第二次层析中,PDE-I与CaM分离,故在较低盐浓度下便被洗脱。经第二次层析,由于分离除去了内源CaM,使PDE-I被外源CaM激活的倍数由第一次层析后的1.2倍,提高为8倍。(表2)

PDE-II在第二次层析中,仍在0.21M NaCl下被洗脱。

各纯化步骤的效果见表3。经二次层析后PDE-I的比活为0.278U/mg蛋白,相对于匀浆液纯化了

表3 各纯化步骤的纯化效果

分 部	总活力(U)	总蛋白(mg)	比活(U/mg)	活力回收(%)	纯化倍数(倍)
匀浆液	85	33800	0.0025	100	
离心上清液	66	7900	0.0080	77.6	3.2
盐析沉淀	47	1080	0.044	55.3	17.6
DEAE-纤维素柱					
PDE-I	15	54	0.278	17.6	111.2
层析洗脱液	5	23	0.217	5.9	86.8

表4 本样品与Sigma产品比较

		比活(U/mg)	激活倍数	收 率 (%)
依赖 Ca^{2+} 的 PDE	样 品	0.278	6—8	17.6
	Sigma 产 品	0.05—0.2	3—4	5
不依赖 Ca^{2+} 的 PDE	样 品	0.217	<0.17	5.9
	Sigma 产 品	0.08	0.20	1—5

表5 一次含 EGTA 柱层析与二次柱层析比较

		比活 (U/mg)	激活倍数(倍)	回收率(%)	产率 (U/kg)
依赖于 Ca^{2+} 的 PDE	一次 EGTA 柱层析	0.25	4—5	35	70
	二次柱层析	0.278	6—8	17.6	36
不依赖于 Ca^{2+} 的 PDE	一次 EGTA 柱层析	0.20	<0.2	12	25.2
	二次柱层析	0.217	<0.17	5.9	12.6

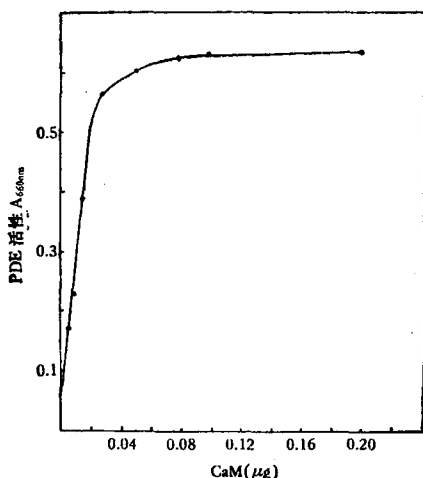


图4 PDE-I 激活曲线

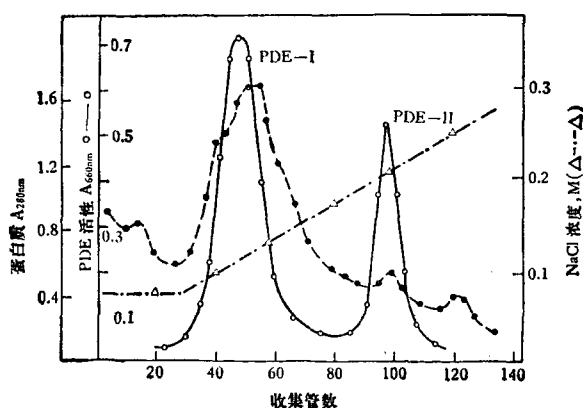


图5 一次含 EGTA 柱层析分离

111.2 倍。活力回收 17.6%。PDE-II 比活为 0.217U/mg 蛋白, 相对于匀浆液纯化 86.8 倍, 活力回收 5.9%。

3. 样品分析

从表 1、表 2 及图 4 的激活曲线可见, 用二次层析法制备的 PDE-I 能被外源 CaM 激活 8 倍, 激活具明显的对 Ca^{2+} 的依赖性。其它各项指标均超过美国 Sigma 公司的同类产品(表 4)。

二、一次层析制备 PDE

1. 一次含 EGTA 柱层析

样品只通过用含 EGTA 的缓冲液 C 平衡的 DEAE-纤维素柱, 进行一次层析, 两种 PDE 即相互分离, 得图 5 所示洗脱曲线。两种 PDE 分别在 0.11M 和 0.21M NaCl 浓度下被洗脱。活性峰与 280nm 蛋白吸收峰不重合。

含有 EGTA 的层析(图 5)与含有 Ca^{2+} 的层析(图 1)相比较, 由于 EGTA 的存在, PDE-I 的层析位置前移, 未能避开杂蛋白峰。而有 Ca^{2+} 层析的优点恰恰可以避开杂蛋白峰。如果在一含 EGTA 层析中改变层析条件, 使 PDE-I 活性峰避开杂蛋白峰, 则分离效果可望提高。

2. 一次层析与二次层析比较

一次层析制备的 PDE-I 具有对 Ca^{2+} 依赖性, 激活曲线与图 4 基本相同, 但激活倍数较低, 可被 CaM 激活 4—5 倍。完全能满足使用要求。PDE-I 的比活为 0.25 U/mg 蛋白, 活力回收为 35%, PDE-II 比活为 0.20U/mg 蛋白, 活力回收 12%。本法产率较高, 制备周期缩短 1/3。两种制备方法的比较见表 5。

在实验中我们观察到 PDE 在 Ca^{2+} 环境中稳定性差, 因此直接用含 EGTA 的 DEAE-纤维素层析可减少活力损失。

参 考 文 献

- [1] Sutherland, E. W. et al.: *J. Biol. Chem.* **232**, 1065, 1958.
- [2] Butcher, R. W., et al.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1244, 1962.
- [3] Ho, H. C., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 461, 1976.
- [4] Sharma, R. K.: *Adv. in Cyclic Nucleotide Res.*, **10**, 187, 1979.
- [5] Fiske, C. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
- [6] Ross, E.: *Anal. Biochem.*, **54**, 304, 1973.
- [7] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.

[本文于 1983 年 11 月 21 日收到]