

Characterization of Single ion Channels Formed by Fragment B of Tetanus Toxin in an Artificial Lipid Bilayer

Lei Dianliang

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing, 100050)

N. Sigimoto M. Matsuda

(Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan)

ABSTRACT

The ion channel formation of fragment B of tetanus toxin in an artificial lipid bilayer was described. Fragment B with a molecular weight of 48000 was purified by fast protein liquid chromatography. The channel activities were recorded from an asolectin bilayer membrane by patch clamp technique. It rarely formed ion channels at neutral or acidic pHs. In contrast, with pH gradient the channel activities of fragment B were easily recorded. By analysis of single channels formed by fragment B, the conductance of the channel was 2.3pS. At different holding potentials (-100 — $+150$ mV) the channels gave same conductance, it indicated that "the fragment B channel" passed K ion in both directions. The opening-time of the channel was maintained at 20—40 and 100—120ms, and the closing-time of it was main at 20ms. These results indicated that the channel of fragment B was rapidly flickering between the states of opening and closing.

Key words tetanus toxin, fragment B, single ion channel

鸭血清胆碱酯酶的纯化及性质研究

郭胜清* 曹树桂 程玉华

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

提 要

首次采用新技术双水相萃取方法作为鸭血清胆碱酯酶 (EC. 3.1.1.8 CHE) 纯化的第一步, 后经 DEAE-Sephadex A50, Sephadex G200 柱层析, 获得电泳纯鸭血清胆碱酯酶, 提纯倍数 1018 倍, 酶活力回收 43.4%, 比活 274.9U/mg。鸭血清胆碱酯酶性质研究表明: 此酶是糖蛋白和酸性蛋白水解酶, 等电点 4.2 左右, 最适 pH 7.5 左右; 对底物碘化硫代丁酰胆碱的 $K_m = 9.8 \times 10^{-5}$ mol/L; SDS-PAGE 电泳和聚丙烯酰胺梯度电泳表明, 鸭血清胆碱酯酶以相同亚基组成的不同聚合体形式存在, 亚基分子量 78000, 具有完整的酶活性。不同聚合体带电状态相同。

关键词 胆碱酯酶, 双水相萃取, 胆碱酯酶的分离纯化

* 现工作于总参防化研究院。

收稿日期: 1991-12-21 修回日期: 1992-03-16

利用胆碱酯酶 (CHE) 被有机磷化合物所抑制的特性, 将胆碱酯酶做成酶片、酶电极应用于农业、环境、军事等领域检测有机磷化合物; 并且在医学上可以做成试剂盒用于临床诊断。自 1935 年 Stedman^[1] 首次从马血清中分离获得胆碱酯酶以来, 从血清中分离纯化胆碱酯酶的方法, 近年来往往采用 DEAE-纤维素离子交换柱层析作为纯化的第一步^[2,3], 酶活力损失较多。我们采用双水相萃取作为纯化的第一步, 利用血清中各种蛋白质组分在两相中分配系数不同, 实现不同物质间的分离。这种方法简便、快速、活力回收高, 且可大批生产。综观国内外文献报道, 有关电鳗电器官和人血清胆碱酯酶的性质研究比较深入^[4,5], 未见对鸭血清来源的胆碱酯酶的有关报道。本文对鸭血清胆碱酯酶 (CHE) 的基本性质做了系统研究。

1 材料与方法

1.1 材料

聚乙二醇 2000 (PEG 2000) (进口分装), DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia 进口分装), Sephadex G200 (上海长征制药厂产品), 碘化硫代丁酰胆碱 (BuSChI) (Aldrich Chem. Co. 产品), 牛血清白蛋白 (中科院生物物理研究所中生公司产品), Calibration Kits HMW 和 LMW (Pharmacia 产品), 考马斯亮蓝 R250, G250 (Fluka 进口分装), 两性电解质 pH 3.5—6.5 (Pharmacia 产品)。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶活力测定 按 Ellman^[6] 方法。1mmol/L BuSChI 水溶液和 1% (W/V) 5, 5'-二巯基-2, 2'-二硝基苯甲酸 (DTNB)-0.1mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲液等体积混合, 37℃ 保温。0.5ml 酶液加 4.5ml 底物混合液, 37℃ 反应 5min, 加 1ml 3% SDS 终止反应, 于 412nm 测吸光值。在测定条件下, 每分钟转化 1μmol/L 底物的酶量为一个酶活力单位 (U)。我们的实验吸光度 A 为 10.8 相当于一个酶活力单位。

1.2.2 蛋白浓度测定 以牛血清白蛋白为标准, 用考马氏亮蓝方法^[7]测定。

1.2.3 酶活力染色 聚丙烯酰胺梯度电泳后, 胶条放入 0.03ml/L α -萘酚乙酯溶液中, 10min 后, 用水冲洗胶, 浸入 0.1% (W/V) 重氮盐溶液中显色至红色带出现。

1.2.4 酶纯度、分子量及亚基分子量测定

1.2.4.1 聚丙烯酰胺梯度电泳 胶浓度 4%—30%, 电泳 400V/h, 4℃, 5h 后固定、染色、脱色。以 LKB Calibration Kits HMW 为标准蛋白。

1.2.4.2 SDS-PAGE 均一胶电泳 按 Weber 和 Osborn 方法, 7.5% 胶浓度, 电压 120V, 20℃, 以 LKB Calibration Kits LMW 为标准蛋白。

1.2.5 酶等电点测定 采用分析型薄层等电聚焦电泳^[8], 以 LKB 两性电解质 pH3.5—6.5, 聚焦 2h, 以 LKB 表面电极测定距离阳极的 pH。

1.2.6 糖含量测定 用苯酚-硫酸法测糖。以甘露糖为标准, 不同浓度甘露糖, 加 5ml 浓硫酸, 2.5% 苯酚 1ml, 摇匀, 静止 10min, 30℃ 反应 20min, 测 λ_{490nm} 的吸光度, 得糖浓度标准曲线。

糖含量 = 糖浓度 / 蛋白浓度 $\times 100\%$

1.2.7 氨基酸组成分析 纯酶 (200μg/ml) 加等体积 12mol/L HCl, 封管, 于 110℃ 水解 24h, 水解后反复蒸干 3 次, 加 1ml 蒸馏水将其溶解, 上氨基酸自动分析仪分析。

1.2.8 色氨酸含量测定 纯酶液 0.5ml, 加 0.2mol/L NaOH 0.5ml, 30℃ 静止 3h, 于 294.4nm 和 280nm 测其吸光度, 按下式计算色氨酸含量:

$$\frac{M_{(\text{Tyr})}}{M_{(\text{Trp})}} = \frac{(0.592A_{294.4} - 0.263A_{280}) \times 10^{-3}}{(0.263A_{280} - 0.170A_{294.4}) \times 10^{-3}}$$

1.2.9 K_m 值测定 以 0.1mol/L pH7.8 磷酸盐缓冲液配制不同底物浓度的溶液, 37℃, 酶与底物-DTNB, 混合液反应 5min, SDS 终止反应后测 λ_{412nm} 的吸光度, 按 Hanes-Woolf 作图法求 K_m 值。

2 结果与讨论

2.1 胆碱酯酶分离提纯

2.1.1 双水相萃取

经实验条件的摸索, 确定双水相萃取的条件为 20% 聚乙二醇 2000 (PEG 2000), 16% $K_2HPO_4-H_3PO_4$, pH 7.0, 0.05mol/L NaCl, 粗酶液 1ml, 萃取体系重 5g, 混合均匀, 3000 r/min 离心 10min. 胆碱酯酶 (CHE) 分配在下相, 酶活力回收 93.8%, 提纯倍数 50.3.

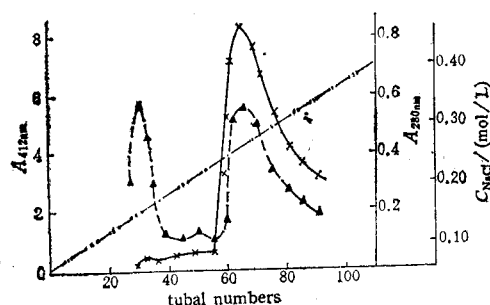


图 1 CHE 经 DEAE-Sephadex A50 的洗脱图谱

Fig. 1 Elution profiles of the CHE on DEAE-Sephadex A50

▲---▲ 蛋白浓度 (protein concentration);
×---× 酶活力 (enzyme activity);
●---● 盐浓度 (salt concentration)

影响双水相萃取成相平衡因素很多, 主要有聚合物的种类、浓度、成相盐的种类和浓度、离子强度、pH 值等。我们的实验表明, CHE 在 pH 7.0 的 PEG 2000/磷酸盐双水相中, 当 PEG 浓度小于 16%, 分相不明显, PEG 浓度高于 22% 时, 虽然酶活力回收较高, 但提纯倍数较低, 这是因为有更多杂蛋白进入下相所致。

2.1.2 DEAE-Sephadex A50 柱层析

多次双水相萃取酶液, 透析、超滤至一定体积, 上经 0.05mol/L NaCl-0.02mol/L pH 7.8 磷酸盐缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A50 柱 (2.0cm × 30cm), 平衡洗脱 2—3 柱体积, 有两个无酶活力蛋白峰, 后经 0.05mol/L—0.35mol/L NaCl-0.02mol/L pH 7.8 磷酸盐缓冲液洗脱, 流速 20ml/h. 洗脱图谱如图 1.

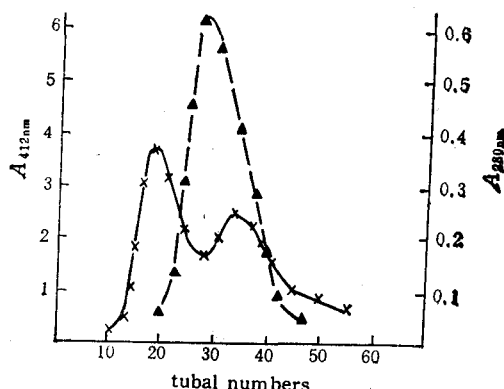


图 2 CHE 经 Sephadex G200 纯化洗脱图谱

Fig. 2 Elution profiles of the CHE on Sephadex G200

▲---▲ 酶活力 (enzyme activity);
×---× 蛋白浓度 (protein concentration)

由图可知, 当盐浓度在 0.20—0.28mol/L 时有大量酶蛋白洗脱下来。

2.1.3 Sephadex G200 凝胶层析

合并 DEAE-Sephadex A50 高酶活力组分, 稀释超滤除盐, 浓缩一定体积, 上 0.1mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液平衡的 Sephadex G200 柱 (1.2cm × 30cm), 平衡液洗脱, 流速 1.5ml/h.

表 1 鸭血清胆碱酯酶纯化的步骤和结果

Table 1 The procedures and results of purifying duck serum CHE

纯化步骤 Procedures	活力回收 Activity recovery (%)	比活 Specific activity (U/mg)	提纯倍数 Times of purification
粗 CHE Crude CHE	100	0.27	1
双水相萃取 Two phase extraction	93.5	13.6	50.3
DEAE-Sephadex A50	60.8	94.9	351.5
Sephadex G200	43.4	274.9	1018.1

结果如图 2 所示。

图中第一蛋白峰几乎无酶活力。Sephadex G200 根据酶分子量大小不同达到分离目的。胆碱酯酶以相同亚基组成的多聚体形式存在。由图中可见第二蛋白峰与酶活力峰重合不很好,在蛋白两峰低谷处酶活力较高。这可能是由于胆碱酯酶的不同聚合体表现出对底物水解速度的不同,这方面有待于进一步的证实。在实验中从 22 管—31 管作为第一组分收集,第 32 管—38 管作为第二组分收集,两组分 SDS-PAGE 电泳结果是相同的。

2.1.4 酶纯度鉴定

经 Sephadex G200 纯化的 CHE 透析后,用 1% SDS, 5% 巯基乙醇处理,上样量为 50 μ l

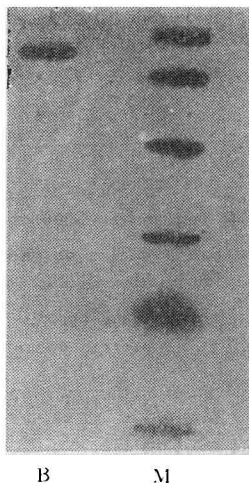


图 3 CHE 的 SDS- 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig. 3 SDS- 7.5% acrylamide gel electrophoresis of purified serum CHE in 1% SDS, 5% mercaptoethanol

CHE 用 1% SDS 和 5% 巯基乙醇处理
M. 标准蛋白 (standard proteins);
B. CHE 亚基 (subunit of CHE)

(0.5mg/ml), SDS-PAGE 电泳出现一条蛋白染色带,表明分离的 CHE 为纯品(图 3)。

2.2 胆碱酯酶的基本性质

2.2.1 酶分子及亚基分子量

按方法 1.2.4, 用半对数坐标纸, 以分子量对其迁移率 R_f 作图得标准曲线, 根据电泳后酶蛋白染色和活力染色带的 R_f 求酶分子量分别为 625000, 360000, 165000, 78000, 如图 3,

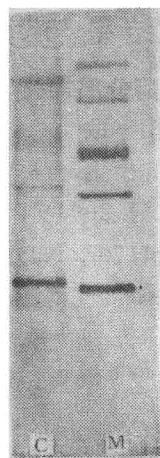


图 4 CHE 的 4%—30% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig. 4 4%—30% polyacrylamide gel electrophoresis of purified serum CHE

M. 标准蛋白 (standard proteins);
C. CHE 的不同聚合体 (different polymers of CHE)

4 所示。

从上述结果可见, 鸭血清胆碱酯酶以相同亚基不同聚合体形式存在, 且主要以单体和八聚体形式存在; 酶活力染色表明单亚基也具有酶活性, 其分子量为 78000。

2.2.2 酶等电点

按方法 1.2.5, 测定 CHE 等电点 pI 为 4.2。

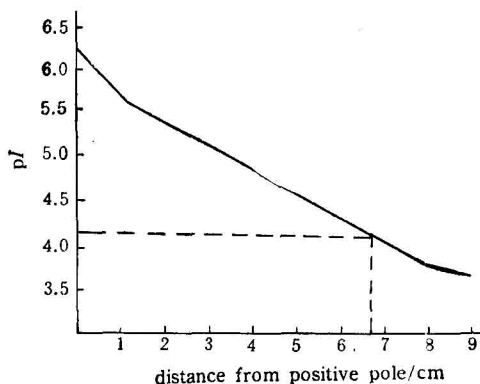


图 5 分析型薄层等电聚焦电泳
Fig. 5 Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gel

如图 5。等电点测定有一条酶活力带出现, 表明鸭血清 CHE 不同聚合体形式带电状态相同。

2.2.3 对底物 BuSchI 的 K_m 值

按方法 1.2.9, 以 Hanes-Woolf 作图法求对 BuSchI 的 K_m 值为 9.8×10^{-5} mol/L, 如

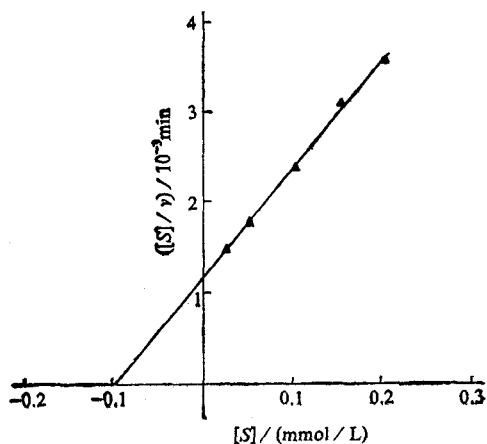


图 6 天然 CHE 与底物 BuSchi 的 K_m 值
Fig. 6 The K_m value of native CHE on BuSchi

图 6 所示。

2.2.4 氨基酸组成

按方法 1.2.7, 测定结果见表 2 所示。

表 2 鸭血清胆碱酯酶氨基酸组成
Table 2 Amine acid composition of duck serum CHE

氨基酸 Amine acid	百分含量 Percent (%)	氨基酸 Amine acid	百分含量 Percent (%)
Asp (Asn)	8.18	Ile	3.71
Thr	5.68	Leu	5.72
Ser	14.82	Tyr	1.94
Glu (Gln)	9.67	Phe	7.50
Gly	14.73	Lys	4.27
Ala	4.39	His	3.05
Val	5.31	Arg	4.46
Met	1.46	Pro	3.56
Trp	2.25	Cys	2.39

Trp 含量测定: Tyr:Trp = 1.0:1.4, 求得 Trp 含量为 2.25%。

由表 2 可见, 酸性氨基酸占 17.8%, 碱性氨基酸为 8.7%, 其余为中性。

2.2.5 糖含量

按方法 1.2.6, 测定鸭血清 CHE 糖含量为 12.7%。

2.2.6 天然 CHE 的最适 pH

0.1ml 纯酶, 加 0.4ml 不同 pH 的磷酸盐缓冲液, 测定酶活力, 得酶活力-pH 变化曲线 (见图 7), 天然酶最适 pH 在 7.5 左右。

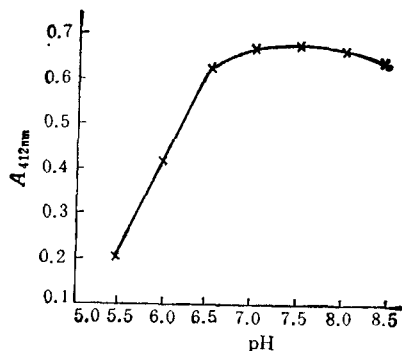


图 7 天然酶活力随 pH 变化曲线
Fig. 7 Effect of pH on the activity of CHE

2.2.7 内源荧光光谱

鸭血清 CHE, 最大激发波长为 281.1nm, 从 300~400nm 扫描发射光谱, 最大吸收峰在 335nm, 说明有 Trp 存在 (见图 8)。

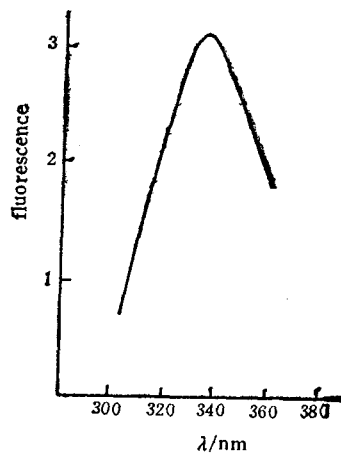


图 8 天然 CHE 荧光光谱
Fig. 8 The intrinsic fluorescence spectra of native CHE

激发波长 281.1nm

Excitation wavelength is 281.1nm

2.3 讨论

以聚乙二醇/磷酸盐双水相萃取作为鸭血清 CHE 纯化第一步的最佳条件为 20% PEG 2000, 16% 盐浓度, pH 7.0. 这种方法简便快速, 酶活力回收高, 可以大批量生产。

鸭血清 CHE 以相同亚基不同聚合体存在, 主要以单体和八聚体存在, 亚基分子量为 78000, 并且具有完整的 CHE 酶活性, 八聚体

分子量为 625000。

鸭血清 CHE 是一种糖蛋白和酸性蛋白水解酶,糖含量 12.7%,酸性氨基酸占 17.9%,碱性氨基酸为 8.7%。

鸭血清 CHE 的多种聚合体带电状态相同。

参 考 文 献

- 1 Stedman E, Easson L H. Choline-esterase an enzyme present in the blood-serum of the horse. *Biochem J*, 1932; **121**: 177
- 2 Shaji T G, Aiylam S B. The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *Eur J Biochem*, 1981; **121**: 177
- 3 Rathanam B, Aiylam S B. A peptidase activity exhibited by human serum pseudocholinesterase. *Eur J Biochem*,

1987; **162**: 191

- 4 Helmut M, Heinz-Werner G, Akira Y. Human serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. *Eur J Biochem*, 1976; **70**: 217
- 5 Leuzinger W, Baker A L. Acetylcholinesterase, I. Large-scale purification, homogeneity, and amino acid analysis. *Pro Nat Acad Sci USA*, 1967; **57**: 446
- 6 Ellman G L, Courtney K D, Andres V *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961; **7**: 88
- 7 Bradford M M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976; **72**: 248
- 8 Davies H. In: Arbuthnott J P *et al.* eds, *Thin layer gel isoelectric focusing, isoelectric focusing*. London: Butter worths, 1975: 97

Studies on the Purification and Properties of Duck Serum Choline Esterase

Guo Shengqing Cao Shugui Cheng Yuhua

(National Laboratory of Enzymic Engineering, JiLin University, Changchun 130023)

ABSTRACT

The method of PEG/phosphate salt two phase extraction as the first step of purification to prepare duck serum choline esterase was first used in this paper. The procedure was not only simple, rapid but also high in the activity recovery of the choline esterase. The purified choline esterase with specific activity 279.9 U/mg was followed by DEAE-sephadex A50 and sephadex G200 chromatography. The choline esterase was purified 1018-fold and the activity recovery of 43.4 per cent was obtained. Studies on the properties of the choline esterase showed that it was a kind of glycoproteins and acid hydrolases. The isoelectric point of 4.2 and the optimum pH of 7.5 were obtained. The K_m of 9.8×10^{-5} mol/L with butyryl-thiocholine iodide was determined. SDS and polyacrylamide gel electrophoresis showed that the choline esterase existed in the different polymers composed of the same subunit. The molecular weight of subunit was 78000, and the subunit had the activity of the whole choline esterase.

Key words choline esterase, two phases extraction, purification