

研究简报

大熊猫脑钙调素的纯化及性质研究

张燕红 张庭芳¹⁾

(北京大学生命科学院, 北京 100871)

摘要 以大熊猫脑为材料, 经提取、热处理、Phenyl Sepharose CL-4B 疏水柱和快速液相分子筛层析, 分离纯化得到 CaM。经 SDS-PAGE、PAGE 和 IEF 鉴定, 得到的 CaM 为一条带。经测定, 大熊猫脑 CaM 的分子质量为 19 ku, 等电点为 3.8。酶活性实验表明大熊猫脑 CaM 对牛心磷酸二酯酶有激活作用。氨基酸组成分析结果与其他来源 CaM 相近。

关键词 钙调素, 大熊猫, 环核苷酸磷酸二酯酶, 疏水层析

学科分类号 Q51

钙调素 (CaM) 是真核生物细胞中普遍存在的一种热稳定的、酸性的、结构高度保守的低分子质量钙结合蛋白。钙调素在许多钙依赖的生理过程中起调控作用, 如肌肉收缩、细胞增殖、代谢调节以及基因表达调控等^[1~4]。本实验室王采芹和申雪菲分别以赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 和大熊猫子宫为材料纯化了 CaM^[5,6], 在此基础上本文用 Phenyl Sepharose CL-4B 疏水柱等纯化了大熊猫脑 CaM, 并对其进行了生化特性的研究, 实验结果进一步验证了 CaM 分子的保守性。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大熊猫脑为潘文石教授惠赠; Phenyl Sepharose CL-4B、SDS-PAGE 标准蛋白购自 Pharmacia 公司; 磷酸二酯酶 (PDE)、cAMP、EGTA、蛇毒购自 Sigma 公司; 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 为 E. Merck 产品, 咪唑为 Fluka 产品; 其他试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 大熊猫脑 CaM 的制备: 参照 Gopalakrishna 等^[7]的方法加以改进。

a. 提取: 称取 100 g 大熊猫脑, 室温部分冻融、剪碎, 加 2 倍体积预冷缓冲液 A, 匀浆 3 min, 15 000 g 离心 30 min。残渣用缓冲液 A 再次提取, 离心后, 合并上清液。

b. 热处理: 将上步得到的上清液置沸水浴中

迅速升温至 90 °C, 持续 3 min, 再迅速冷却至 10 °C 以下。热处理过的样品于 4 °C, 15 000 g 离心 30 min, 取上清。

c. 疏水层析: 将上步得到的上清液调钙离子浓度达到 5 mmol/L, 4 °C 搅拌 1 h, 过滤。滤液上 Phenyl Sepharose CL-4B 柱。该柱预先用缓冲液 B 平衡。上样完毕后再用缓冲液 B 淋洗至基线, 之后用含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 B 淋洗, 最后用缓冲液 C 洗脱, 收集蛋白峰, 用 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.5 透析除盐, 冷冻干燥。

d. 快速液相色谱 (FPLC) 进一步纯化: 将 CaM 样品, 用 FPLC-Sepharose 6H 分子筛进一步纯化。层析缓冲液: 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 6.5。

缓冲液 A: 50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L PMSF, pH 7.5。缓冲液 B: 50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L CaCl₂, pH 7.5。缓冲液 C: 50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L DTT, 2 mmol/L EGTA, pH 7.5。

1.2.2 CaM 活性的测定: 根据 CaM 对 PDE 的激活作用, 通过测 PDE 活性来测定 CaM 的活性。按照叶正华等^[8]的反应体系, 用定磷方法测定^[9]。

1.2.3 电泳鉴定及分子质量的测定: SDS-PAGE, PAGE^[9]均采用 Tris-HCl 缓冲系统, 用 15% 的分离

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1997-10-27, 修回日期: 1998-02-28

胶, 3%的浓缩胶. 等电聚焦 (IEF) 电泳采用常规方法.

1.2.4 氨基酸组成分析: Trp 的测定用 4 mol/L 甲基磺酸水解, Cys 先用过甲酸氧化, 再用 5.7 mol/L 的盐酸水解, 其他氨基酸测定均用 5.7 mol/L 的盐酸水解, 水解后的样品用 121MB 型氨基酸自动分析仪分析.

1.2.5 蛋白质含量测定: 采用 Folin-酚法, 以牛血清白蛋白为标准.

2 结果与讨论

2.1 分离纯化

100 g 大熊猫脑经提取、热处理、phenyl-sephrose CL-4B 疏水柱层析、FPLC 分子筛进一步纯化, 便可得到纯品 CaM. 疏水层析图谱见图 1.

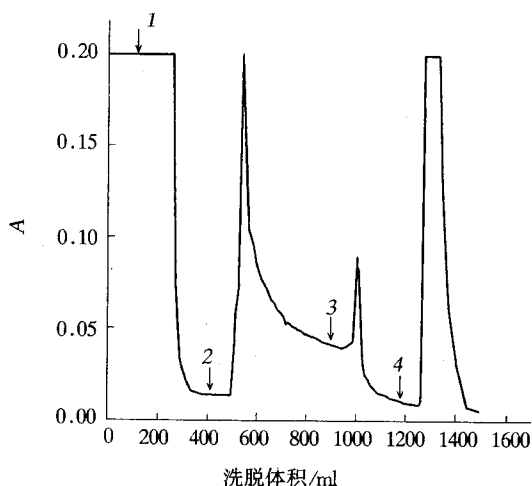


图 1 大熊猫脑 CaM 的 Phenyl-Sepharose CL-4B 疏水层析
1: 缓冲液 B; 2: 含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 B; 3: 缓冲液 C; 4: H₂O; 流速 1 ml/min; 峰 3 含 CaM.

2.2 电泳鉴定

分离得到的 CaM 进行了电泳鉴定, 其 SDS-PAGE、PAGE、IEF 均为一条带, 证明样品已经提纯. SDS-PAGE 图谱见图 2. 根据 SDS-PAGE 图谱上的迁移率计算, 大熊猫脑 CaM 的分子质量为 19 ku. CaM 具有钙离子效应, 在同 Ca²⁺ 结合后, α 螺旋增加, 疏水基团外露, 分子变得更为紧密, 在 SDS-PAGE 中迁移率增加. PAGE 图谱显示 (图 3), 大熊猫脑 CaM 同钙离子结合后, 其负电荷被中和, 迁移率变小. 经测定大熊猫脑 CaM 的等电点为 3.8.

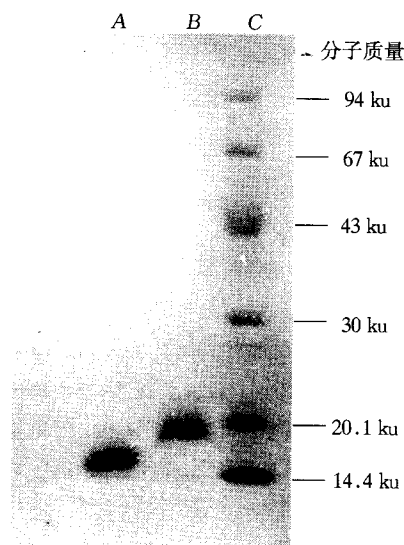


图 2 大熊猫脑 CaM 的 SDS-PAGE 图谱
A: CaM+Ca²⁺; B: CaM+EGTA; C: 标准蛋白.
(Ca²⁺ 与 EGTA 浓度均为 30 μ mol/L).



图 3 大熊猫脑 CaM 的 PAGE 图谱
A: CaM+Ca²⁺; B: CaM+EGTA. (Ca²⁺ 与 EGTA 浓度均为 30 μ mol/L).

2.3 酶活性鉴定

从图 4 可以看到, 大熊猫脑 CaM 具有激活环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 的作用. 从激活曲线看到, 大熊猫脑 CaM 对 PDE 的半激活量为 0.08 μ g, 最大激活量为 1.0 μ g.

2.4 氨基酸组成

大熊猫脑 CaM 氨基酸组成分析见表 1. 由表 1 可以看出, 大熊猫脑 CaM 酸性氨基酸含量很高, 不含 Cys 和 Trp, 而且存在高 Phe/Tyr 比 (6:2).

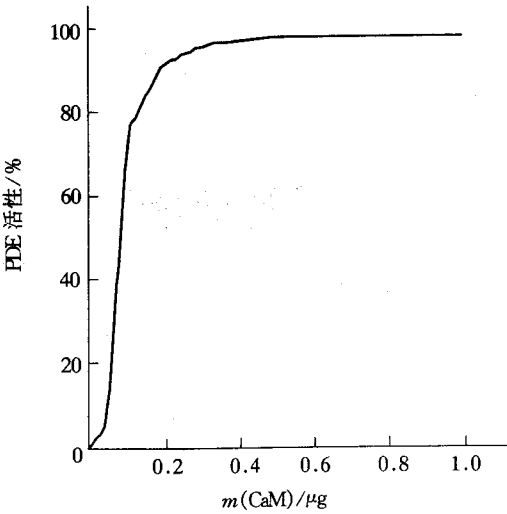


图 4 大熊猫脑 CaM 对 PDE 活性的影响

表 1 大熊猫脑 CaM 的氨基酸组成

氨基酸	牛脑 CaM	大熊猫脑 CaM	大熊猫子宫 CaM ^[6]
Asx	23	23	23
Thr	12	8	11
Ser	4	6	6
Glx	27	25	29
Pro	2	2	2
Gly	11	15	13
Ala	11	10	11
Cys	0	0	0
Val	7	4	6
Met	9	6	8
Ile	8	6	6
Leu	9	8	9
Tyr	2	2	2
Phe	8	6	8
Lys	7	7	7
His	1	1	1
Arg	6	5	6
Trp	0	0	0
Tm-Lys ¹⁾	1	ND ²⁾	ND ²⁾

1)Tm-Lys: 三甲赖氨酸; 2)ND: 没有测定.

由表 1 还可看出, 大熊猫脑 CaM 与大熊猫子宫 CaM 以及牛脑 CaM 的氨基酸组成相近, 说明 CaM 是高度保守的蛋白质.

从分离纯化方法到电泳行为、分子质量、等电点、对 PDE 的激活作用测定及氨基酸组成分析的研究结果, 我们可以看到大熊猫脑 CaM 与其他来源

CaM 的性质相一致, 说明 CaM 结构的高度保守性.

参 考 文 献

1 Cheung W Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science, 1980, **207** (4426): 19~27

2 Davis T N. What' s new with calcium. Cell, 1992, **71** (4): 557~564

3 Bachs O. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. Biochim Biophys Acta, 1992, **1113** (2): 259~270

4 Rasmussen C D, Means A R. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. EMBO J, 1989, **8** (1): 73~82

5 王采芹, 张庭芳 (Wang C Q, Zhang T F). 蚯蚓钙结合蛋白的分离纯化及性质研究. 北京大学学报 (自然科学版) (Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis), 1996, **32** (6): 741~748

6 申雪菲, 张庭芳 (Shen X F, Zhang T F). 大熊猫子宫钙调素的分离纯化和性质的研究. 生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal), 1993, **9** (6): 748~754

7 Gopalakrishna R, Anderson W B. Ca²⁺-induced hydrophobic site calmodulin: Application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. Biochem Biophys Res Commun, 1982, **104** (2): 830~836

8 叶正华, 郭季芳, 孙大业 (Ye Z H, Guo J F, Sun D Y). 应用磷酸二酯酶定量测定植物钙调素. 植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications), 1990, (1): 54~56

9 张龙翔, 张庭芳, 李令媛 (Zhang L X, Zhang T F, Li L Y). 生化实验方法和技术 (Experimental Methods and Techniques in Biochemistry). 北京: 高等教育出版社 (Beijing: Higher Education Press), 1981. 102~223

Studies on Purification and Some Properties of Calmodulin from Giant Panda Brain. ZHANG Yan-Hong, ZHANG Ting-Fang (College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract Giant panda brain CaM was purified by Phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography and FPLC. The results of SDS-PAGE, PAGE and IEF indicate that the protein has been purified. The molecular weight and PI of CaM are 19 ku and 3.8, respectively. Giant panda brain CaM shows calcium ion effect in SDS-PAGE and PAGE. It can activate bovine heart PDE. The result of amino acid composition of giant panda brain CaM is similar to CaMs from other sources.

Key words calmodulin, giant panda, cyclic nucleotide phosphodiesterase, hydrophobic chromatography