

植物细胞单体及多聚态肌动蛋白的选择测定:DNase I 抑制法

金仕萍 凌 俊 张伟成

(中国科学院上海植物生理研究所,上海 200032)

提 要

本文利用单体 actin 可专一性抑制 DNase I 活性的原理,建立了一套简便、准确的测定 actin 含量及其状态的生化方法。并对 actin 抑制 DNase I 的动力学特征进行了初步研究。

关键词 肌动蛋白, DNase I 抑制法, 小麦胚乳

植物肌动蛋白(actin)的研究,历史虽不长,但其在细胞结构与功能中的作用却引起了人们的极大兴趣。它不仅是细胞骨架及其收缩系统的主要成分^[1],与细胞分裂、分化、细胞质环流、叶绿体、线粒体等细胞器的空间排布关系密切^[2],而且与细胞间大分子物质的转移有关^[3]。近来还发现 actin 参与蛋白质合成^[4]及糖酵解酶活力的调节^[5]。另外,由于 actin 可很容易地在体外进行聚合与拆分,是研究蛋白质组装的理想材料。为了检测诸多生理生化过程中的 actin 含量及状态的变化,如经电泳或纯化后再进行定量则是很难实现的。为此我们根据单体 actin 可专一性抑制 DNase I(脱氧核糖核酸酶 I)的活性的原理^[6],以小麦胚乳为材料,通过反复试验与摸索,以期建立一套简便、快速、准确地测定细胞单体 actin (G 型)及多聚态 actin (F 型)含量的生化方法。

材 料 与 方 法

1. 以小麦正灌浆中颖果的胚乳为材料提取植物 actin、(参见 Margaret 的方法)^[7]。

2. DNase I (E.C.3.1.4.5.) 及标准兔肌 actin 均为 Sigma 产品, DNA 为上海牛奶公司产品。

3. DNase I 活性测定参照 Lindberg 的方法^[8]。以 0.004% (W/V) DNA 为底物,加入

一定量的 DNase I 于 25℃ 下读取 A_{260nm} 的变化,以每分钟 A_{260nm} 变化 0.001 为 1 个酶单位。酶动力学测定等参照 Dixon 等的方法^[9]。

实 验 结 果

1. DNase I 标准测活系统的建立

在常规的 DNase I 测活基础上,为了适当测定 actin 抑制效应的需要,我们对实验条件进行了进一步摸索。做出 DNase I 的米氏曲线(如图 1),从中求出 K_m 值为 $6.25 \mu g/ml$ 。由图 1 亦可见当 DNA 浓度大于 $10 \mu g/ml$ 时,酶反应趋于饱和。故我们在标准测活系统中采用过量的底物浓度: $40 \mu g/ml$ 。

DNase I 的用量也十分重要。多了,由于样品中的 actin 一般很少,抑制效应不够明显;少了,酶活性低也不适宜测定。在 DNA 过量的情况下,加入不同浓度的 DNase I,得到图 2 之结果。在 $1-10 \mu g/3ml$ 的范围内, v 与 DNase I 量成正比,故我们采用每 3ml 反应体系中加入 $2 \mu g$ DNase I,这样活性适中也有利于 actin 抑制效应的测定。

由于样品中除了 G-actin 外, F-actin 在较长时间后也可抑制 DNase I 的活性,而 G-actin 与 DNase I 的结合则是一个快速反应,在几秒钟内完成。所以控制反应时间是这一方法选择性的关键。故我们进一步测定了 V_0 与 T

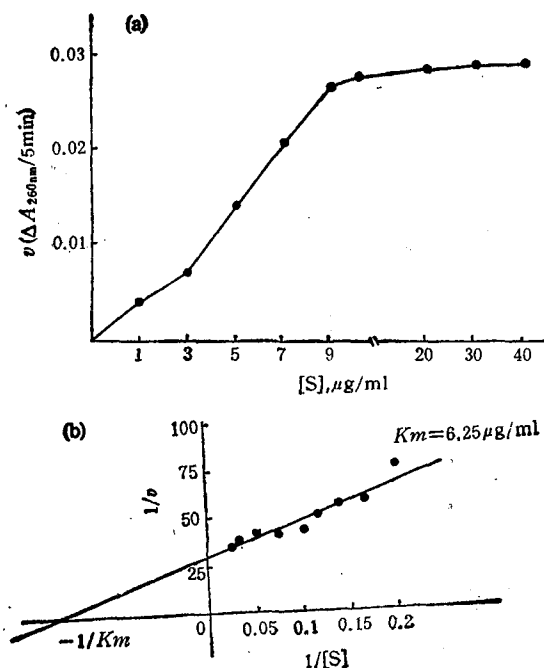


图1 DNase I 的米氏曲线 (S:底物 DNA)

(a) v - $[S]$ 曲线 (b) Lineweaver-Burk 双倒数曲线

的曲线 (图 3)。发现当 DNase I 量大于 2 μg 时, 酶反应的 v_0 基本上一致。而在 5min 内, v_0 与 T 明显呈正比, 故我们将反应时间定为

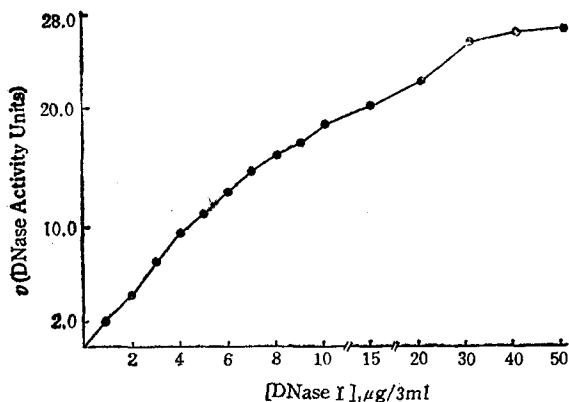


图2 底物饱和情况下不同酶浓度对酶活性的影响

1 unit = $0.001 \Delta A_{260nm}/min$

5min, 这样就确定了适用于测定 actin 含量的标准 DNase I 测活体系: DNA (40 $\mu g/ml$): 3 ml; DNase I (0.1 $\mu g/\mu l$): 20 μl ; 反应温度: 25 $^{\circ}C$; 反应时间: 5 min。

2. actin 对 DNase I 的抑制效应

以兔肌 actin 为标准, 测定 actin 抑制

DNase I 的标准曲线, 重复 3 次取平均值, 结果如图 4。由此我们即可从抑制百分率求出样品 actin 的含量。

由于我们的样品提取液中存在着 DTT, (二巯基苏糖醇), ATP, GuHCl (盐酸胍) 等本身在 260nm 有吸收的化合物, 为排除干扰, 我们发现经 80 $^{\circ}C$ 热处理 60min 后, 样品提取

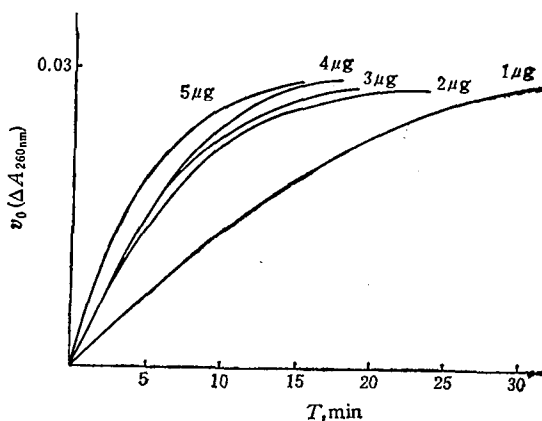


图3 酶反应速度与反应时间的关系

*不同的 DNase I 量 (此图由记录结果绘制而出)

液中的 actin 完全失活(对 DNase I 无抑制作用), 可作为很好的对照。

另外, 我们以胚乳样品代替 DNase I 测活, 结果毫无反应, 这表明植物样品本身没有 DNase I 活性, 不会干扰 actin 的测定。

3. 植物细胞单体及多聚态 actin 的测定

我们先以缓冲液 A (0.5% Triton X-100, 0.15mol/L NaCl, 2mmol/L MgCl, 0.5mmol/

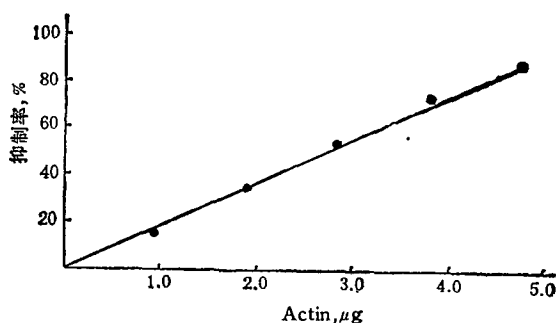


图4 actin 抑制 DNase I 活性的标准曲线

L ATP, 0.2mmol/L DTT, 0.5mmol/L PMSF, 50mmol/L Tris-HCl pH7.5)。从胚乳提取样

品,测得 actin(G-actin) 的含量。再将此样品与缓冲液 B(1mol/L GuHCl, 1mol/L NaAc, 0.5mmol/L ATP, 0.5mmol/L CaCl₂, 0.2mmol/L DTT, 0.5mmol/L PMSF, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5) 等量混合, 在 0°C 保温 30min, 让 GuHCl 充分解离 F-actin, 由此测得总 actin 的含量。两者相减即得到 F-actin 的含量。也可由此求出 actin 在体内的聚合程度。我们在具体测定时发现样品的用量以抑制酶活力的 20—70% 较好。一般加 20—80 μ l。对小麦胚乳的测定结果是, G-actin: 90.9 μ g/mg 蛋白, F-actin: 159.1 μ g/mg 蛋白。

4. actin 抑制 DNaseI 的动力特性

在不同的 DNaseI 浓度下,同时改变 actin 的用量,得出系列酶反应 v_0 , 作图如下(图 5),从中可知 actin 对 DNaseI 的抑制属于可逆抑制。再在不同的 DNA 浓度下,加不同的 actin, 测酶反应 v_0 , 并以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图(图 6), 结果发现其属于可逆型中的竞争型抑制。并求得 K_i 值为 0.5 μ g/ml

$$\left(K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \right)$$

这样便加深了我们对 actin 抑制 DNaseI 活性的机制的理解。

讨 论

这一方法的关键在于通过控制加样顺序及反应时间来提高测定的选择性与重复率。我们的经验是先将 DNaseI 加入比色杯底,再加入 actin 快速混合后,立即(2—4s)加入 DNA, 于分光光度计中反应,连续观察 A_{260nm} 的变化。由于 A_{260nm} 值的变化较小,我们将分光光度计与记录仪连接,提高了灵敏度。通过观察峰高来计算 A_{260nm} 的变化更为准确方便。

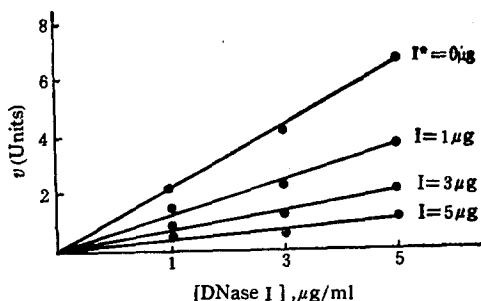


图5 actin 对不同酶浓度下反应速度的影响
*I = actin

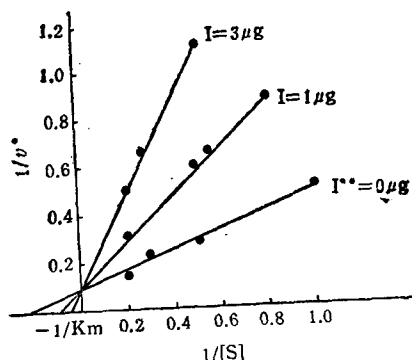


图6 不同 actin 浓度下的 $1/v-1/[S]$ 曲线
* 是酶活性单位的倒数; **I = actin

参 考 文 献

- 1 Lloyd C W. In: Lloyd C W ed, *The cytoskeleton in plant growth and development*, London: AP, 1982
- 2 Frammer S R. In: Shay J W ed, *Cell and molecular biology of the cytoskeleton*, New York: Plenum Press 1986: 131—149
- 3 Zhang W C et al. *Scientia Sinica* (B), 1985; 28(11): 1175—1183
- 4 Nielsen P et al. *Cell Biol Intern Rep*, 1983; 7: 245—252
- 5 Poglazov B F et al. *Mol Biol*, 1976; 107: 175—181
- 6 Lindberg U. *Biochem*, 1967; 6: 323—335
- 7 Margaret V et al. *Plant Physiol Biochem* 1987; 25(6): 689—696
- 8 Lindberg U. *Biochim Biophys Acta*, 1964; 82: 237—246
- 9 Dixon M et al. In: Dixon M ed, *Enzyme*, 3rd Ed 1979

[本文于1989年10月26日收到]