

调控中的作用, 尚需对其基因的结构与功能等方面进行深入研究.

总之, 对肝再生过程中基因选择性表达的研究, 不仅有助于人们理解肝再生调控机理, 而且为进一步探讨真核细胞的增殖调控与癌变提供良好的体内模型, 同时也为各种肝病的治疗提供新的思路.

参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~ 971
- 2 Bauer D, Muller H, Reich J *et al.* Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (18): 4272~ 4280
- 3 Higgins G M, Anderson R M. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931, **12**: 186
- 4 Guimaraes M J, Lee F, Zlotnik A *et al.* Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (10): 1832~ 1833
- 5 Shoham N G, Arad T, Rosin Abersfeld R *et al.* Differential display assay and analysis. *Bio/Techniques*, 1996, **20** (2): 182~ 183
- 6 Mou L, Miller H, Li J *et al.* Improvement to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **199** (2): 564~ 569
- 7 Callard D, Lescure B, Mazzolini L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Bio/Techniques*, 1994, **16** (6): 1096~

1103

- 8 Gerhard H. In: Lesch R eds. *Liver regeneration after experimental injury*. New York: SIMBC, 1975. 340~ 346
- 9 Bucher N R. Liver regeneration: An overview. *J Gastroenterology and Hepatology*, 1991, **6**: 615~ 624

Studies on Regulation of Liver Regeneration by mRNA Differential Display. QIU Zhaohua, HE Fuchu (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing* 100850, China).

Abstract Regeneration of liver after hepatectomy is a complex process. It has been thought that there might be some growth factors and genes which play important roles in this process. In order to understand the regulatory mechanism of liver regeneration at molecular level, the changes in gene expression of regenerating liver have been demonstrated by mRNA differential display. As a result, four candidate cDNA fragments were obtained, including one down-regulated and three up-regulated. DNA sequencing demonstrated that all of them were novel. These sequences have been assigned the database accession numbers in EMBL as below: X95721, X95722, X95723, X97973.

Key words regulation of liver regeneration, mRNA differential display, gene cloning, sequencing of DNA

GM3 与 Ca^{2+} -ATP 酶的重建及其 冷冻断裂电镜观察*

王丽华

杨小毅

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 应用生物膜的分离与重建技术, 将 GM3、大豆磷脂与肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶共同重建在脂质体上, 酶活力明显增加. 经负染、冷冻断裂复型后电镜等形态学方法证实形成的脂酶体囊泡封闭性好, 脂酶体上 Ca^{2+} -ATP 酶蛋白颗粒均匀、直径增大.

关键词 Ca^{2+} -ATP 酶, 神经节苷脂 GM3, 重建, 冷冻断裂

* 生物大分子国家重点实验室课题资助. 收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-01-20

本实验室曾报道肌质网膜脂中确实存在微量的糖脂成分即以 GM3 (单唾液酸乳糖神经酰胺) 为主的神经节苷脂, 并且 GM3 可能通过激活肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶调节 Ca^{2+} 的跨膜转运, 从而维持细胞内的 Ca^{2+} 平衡^[1]. 但肌质网膜与其他天然生物膜一样是一个复杂的多分子体系, 膜蛋白-膜脂相互作用非常复杂, 干扰因素较多, 难以准确地阐明糖脂及神经节苷脂的特殊生物学作用与分子机制. 将纯化的膜蛋白重建在人工脂质体上是从分子水平上研究膜蛋白 (包括酶) 的结构与功能的重要手段. 近年来, 已有一些作者用胆酸盐透析法^[2]、超声法^[3]或 Sephadex G50 法^[4]将纯化的肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶重建于磷脂脂质体上, 但是同时将糖脂、磷脂和膜蛋白共同重建于脂质体上尚未见报道. 本工作应用生物膜的拆离与重建技术, 将分离、提纯的肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶与神经节苷脂 GM3、磷脂共同重建到人工膜上, 形成一种类似于肌质网的、以大豆磷脂为脂双层主要成分并含有少量 GM3 的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体; 并用负染和冷冻断裂电镜等形态学方法加以证实. 为研究膜糖脂及神经节苷脂对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶功能的调节机制建立了一种较合适的分子模型.

1 材料与方法

1.1 材料

GM3 参照文献 [5] 的方法制备, 正辛基葡萄糖苷 (octyl glucoside, OG)、反应红-120 琼脂糖 (reactive red-120 agarose) 和大豆磷脂 (soybean phospholipids, SPL) 为 Sigma 产品, Sephadex G50 为 Pharmacia 产品, 其余均为国产分析纯.

1.2 Ca^{2+} -ATP 酶的纯化

参考 Banerjee^[6] 和 Coll^[7] 的方法, 并加以修改^[8]. 将经差速离心制备的兔肌质网, 用缓冲液 A (0.25 mol/L 蔗糖, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L KCl, pH 7.4) 稀释至 5 g/L, 并加入正辛基葡萄糖苷使最终浓度为 20 mmol/L, 在冰浴中充分搅拌 40 min, 离心

150 000 $\times$ g, 50 min, 沉淀用缓冲液 A 匀浆后再离心 150 000 $\times$ g, 30 min, 沉淀即为初步纯化的 Ca^{2+} -ATP 酶; 再进行 Reactive red-120 agarose (1 cm $\times$ 5 cm) 亲和层析, 用含 2 mmol/L ADP 的缓冲液 A 洗脱, 收集 ATP 酶活力高的组分, 分装后于 -25 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

1.3 单纯用大豆磷脂重建 Ca^{2+} -ATP 酶

主要参考 Gould^[4] 和屠亚平等^[9] 的方法.

1.4 GM3、大豆磷脂与 Ca^{2+} -ATP 酶的重建

将纯化的大豆磷脂 45 mg 用氮气吹干, 真空抽 2 h, 溶于 600 μl 缓冲液 A 中, 加入 OG 5 mg, 氮气下冰浴超声至澄清. 将 GM3 与磷脂以不同摩尔比混合, 加至已处理的大豆磷脂中, 混合后超声至澄清.

将上述纯化的蛋白和脂混合后上 Sephadex G50 柱, 2 000 r/min 离心 25 s, 洗脱液再上另一根柱子, 流出的乳白色液以 100 000 $\times$ g 离心 30 min, 沉淀悬浮于测活液 (40 mmol/L Hepes-KOH, 5 mmol/L MgSO_4 , 1.01 mmol/L EGTA) 中, 得到含不同 GM3/SPL 比例的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体.

1.5 Ca^{2+} -ATP 酶活力测定

按文献 [4] 的方法, 通过偶联酶反应连续检测 NADH 因氧化而在 366 nm 和 550 nm 处的差光谱变化, 从而测定 Ca^{2+} -ATP 酶的水解活力, 测定温度 30 $^{\circ}\text{C}$.

2.5 ml 测定体系含 40 mmol/L Hepes-KOH, 5 mmol/L MgSO_4 , 1.01 mmol/L EGTA, pH 7.2, 2.1 mmol/L ATP, 0.42 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP), 0.15 mmol/L NADH, 加入 5 μl 丙酮酸激酶 (PK), 10 μl 乳酸脱氢酶 (LDH), 样品适量 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 加 25 μl 100 mmol/L Ca^{2+} , 启动反应, 在日立 557 型分光光度计上测定光吸收 (366~550 nm) 的变化.

1.6 脂酶体的负染和冷冻断裂电镜观察

1.6.1 负染: 将纯化的脂酶体点样于有膜的铜网上, 用 4% 的醋酸双氧铀负染色后用 JEM-100CX 电镜观察.

1.6.2 冷冻断裂: 将制备好的脂酶体 5 μl 滴

在样品台上, 迅速掷入液氮中冷冻并转入 BAF400D 型冷冻蚀刻仪中. 当真空度达到 1×10^{-4} Pa, 样品温度为 -120°C 时, 将样品断裂, 随即按常规方法制成铂-碳复型. 复型经次氯酸钠腐蚀和重蒸馏水清洗后捞至 400 目裸网上, 采用 JEM-100CX 电镜观察, 工作电压为 80 kV.

2 结果和讨论

2.1 Ca^{2+} -ATP 酶的纯化及其重建

肌质网膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶是一种膜结合疏水蛋白, 约占肌质网膜蛋白的 70%~80%, 本实验用非离子去污剂正辛基葡萄糖苷在高盐浓度下增溶肌质网膜, 然后用亲和层析分离纯化得到 Ca^{2+} -ATP 酶, 经 7.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳表明制备的 Ca^{2+} -ATP 酶呈单一条带. 这与屠亚平等^[8]报道相一致.

如何把糖脂、磷脂和酶蛋白共同重建于一个脂质体中, 选择合适的去垢剂 (detergent) 是重建成功的关键. Javier 等^[10]用单纯磷脂或大豆磷脂与 Ca^{2+} -ATP 酶重建时都是选用胆酸盐为去垢剂, 但胆酸盐是一种离子型去垢剂, 能强烈影响膜蛋白的结构, 有需加胆固醇保护膜蛋白功能的缺点, 不适于含糖脂成分的脂酶体形成, 又不易去除干净. 因此, 本实验选用纯化 Ca^{2+} -ATP 酶时增溶肌质网膜的非离子型去垢剂正辛基葡萄糖苷 (OG) 进行重建, 其具

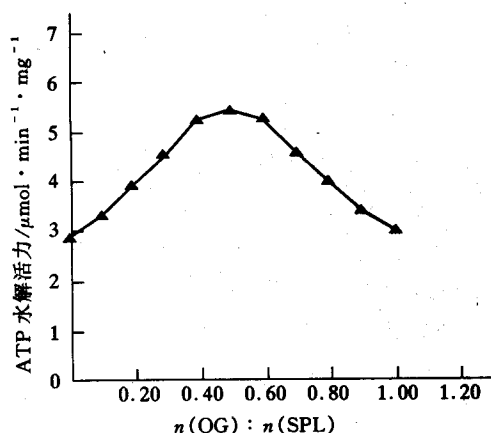


图1 不同去垢剂/脂质比重建 Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响

有较高的临界微团浓度, 作用温和, 既有利于磷脂和糖脂的共增溶, 又不致于破坏糖脂的结构. 从不同脂质/去污剂比例对重建 Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响曲线 (图 1) 可见, 脂质/去污剂比例为 0.65 最合适, 此时既保证磷脂充分溶解, 糖脂成分不被破坏, 酶蛋白活力及构象不受影响, 而且重建率高, 脂酶体完整、封闭性好. 在加正辛基葡萄糖苷后超声溶解时, 相应地延长超声时间, 氮气封闭和低温冰浴并间断超声, 可以保证脂质的完全溶解和防止重建所用脂类的氧化.

2.2 重建脂酶体负染、冷冻断裂电镜观察

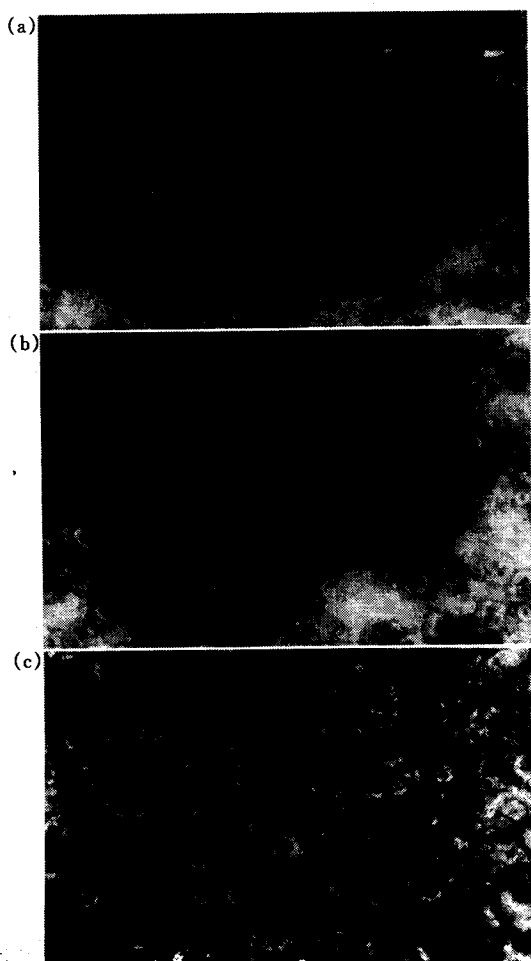


图2 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体的负染电镜照片
(a) 单纯 SPL 脂质体; (b) 单纯 SPL 重建的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体; (c) GM3/SPL 重建的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体 ($\times 28\,500$).

重建的脂酶体经过负染后在透射电子显微镜下 (图 2), 可见用 GM3/SPL 重建的脂酶体为大小均一, 封闭性好, 直径为 100 nm 左右的双分子层脂酶体囊泡。

将大豆磷脂脂酶体重组的 Ca^{2+} -ATP 酶的脂酶体和含 GM3/大豆磷脂脂酶体经冷冻断裂复型后电镜观察 (图 3) 发现, 重组的 Ca^{2+} -ATP 酶的脂酶体大小均一, 封闭性好 (图 3a), 对照组单纯的大豆磷脂重组的 Ca^{2+} -ATP 酶的脂酶体膜的外表面即 EF 面 (endoplasmic

face) 和内表面 PF 面 (plasma face) 上可见到许多均匀分布的蛋白颗粒 (图 3b)。而用 GM3 和 大豆磷脂重组的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体的颗粒比单纯用大豆磷脂重组的 Ca^{2+} -ATP 酶的脂酶体要多, 直径要大 (图 3c)。 Ca^{2+} -ATP 酶蛋白是一种分子质量为 15 ku 的跨膜蛋白, 其疏水跨膜部分由 10 个 α 螺旋结构组成, 冷冻样品经过膜脂双层结构的疏水中心撕开, 膜镶嵌蛋白暴露于两个单层的撕裂面上, 故可在脂酶体的 PF 面和 EF 面上看到许多大小均匀的颗粒, 因此这些形态学结果一方面说明用本法将 Ca^{2+} -ATP 酶重组到糖脂和/或大豆磷脂的脂质体上是成功的。另一方面, Verkleij 等^[11]曾报道经鞘磷脂酶作用后的红细胞膜冰刻结果显示, 膜内在蛋白颗粒因膜脂排列的改变呈现颗粒聚集的图象。因此很有可能当大豆磷脂中加入 GM3 后膜脂物理状态发生改变, 使重建在脂质体上的 Ca^{2+} -ATP 酶蛋白因聚集而呈现出较大的颗粒图象。

2.3 GM3 或/和 SPL 重建的 Ca^{2+} -ATP 酶活力比较

将从天然膜体系中纯化得到的膜蛋白重建到人工脂质体上, 并表达出较高的活力是衡量脂质体重建是否成功的重要标准。由表 1 可见

表 1 GM3、SPL 或 GM3/SPL 重建的 Ca^{2+} -ATP 酶活力的比较

	比活力/ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
肌质网	0.5
纯化的 Ca^{2+} -ATP 酶	3.1
单纯 SPL 脂酶体	4.2
GM3/SPL (1/40) 脂酶体	7.5
GM3 脂酶体	3.5

注: 脂/蛋白 (100:1, $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$)。

重建后的 Ca^{2+} -ATP 酶活力远高于纯化的肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶, 用 GM3/磷脂重建的脂酶体 Ca^{2+} -ATP 酶的水解活力又远高于单纯大豆磷脂重建的脂酶体, 而单纯 GM3 组成的脂酶体, 则远不及单纯大豆磷脂和有一定浓度 GM3 的大豆磷脂脂酶体的酶活力高。说明尽

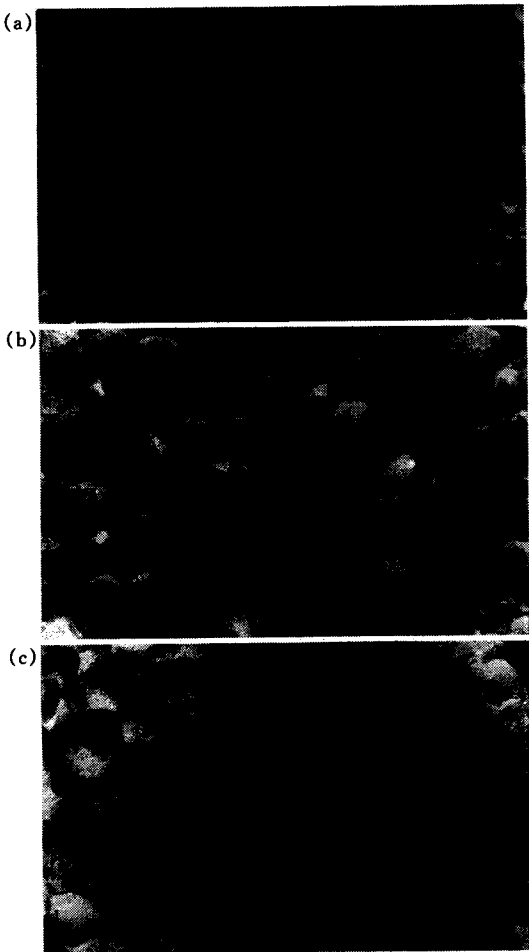


图 3 经冷冻断裂复型的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体电镜照片

(a) 大小均一的重建 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体 ($\times 28\,500$); (b) 单纯 SPL 重建的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体 ($\times 57\,000$); (c) GM3/SPL 重建的 Ca^{2+} -ATP 酶脂酶体 ($\times 57\,000$)。

管 GM3 本身作为一种脂类物质, 可以为酶蛋白提供必要的脂环境, 提高酶的活力, 但并非最适脂。而在以大豆磷脂为基础的脂环境中, 加入糖脂 GM3 后, Ca^{2+} -ATP 酶活力明显增强, 提示 GM3 可能以其特有的结构, 即插入脂双层的神经酰胺部分和游离于膜表面的含唾液酸的糖链部分, 使 Ca^{2+} -ATP 酶的脂环境和物理状态发生改变, 使其更有利于 Ca^{2+} -ATP 酶以较合适的构象呈现较高的酶活力。

本工作以正辛基葡萄糖苷为去污剂, 通过 Sephadex G50 离心过滤法, 成功地将糖脂 GM3、大豆磷脂与肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶共同重建在脂质体上, 不仅重建率高, 而且经负染、冷冻断裂复型后电镜等形态学方法证实形成的脂酶体囊泡封闭性好, 脂酶体上 Ca^{2+} -ATP 酶蛋白颗粒均匀, Ca^{2+} -ATP 酶活力也比单纯磷脂重建的脂酶体高, 这为进一步从分子水平研究糖脂对 Ca^{2+} -ATP 酶功能和构象的调节提供了良好的分子模型。

致谢 本工作是在杨福愉教授、崔肇春教授指导下完成, 电镜观察得到鲁琦喆教授的帮助, 在此致以衷心地感谢。

参 考 文 献

- 1 王丽华, 屠亚平, 崔肇春等. 神经节苷脂 GM3 对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶活力的调节. 生物化学杂志, 1996, 6: 56~60
- 2 Wang C. Correlation of ultrastructure of reconstituted sarcoplasmic reticulum membrane vesicles with variation in phospholipid to protein ratio. J Biol Chem, 1979, 254: 9209~9219
- 3 Racker E. Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified Ca^{2+} -adenosin triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. J Bio Chem, 1972, 247: 8198~8200
- 4 Gould G W, Mcwhirter J M, East J M *et al.* Uptake of Ca^{2+} mediated by the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in reconstituted vesicles. Biochim Biophys Acta, 1987, 904: 6~44
- 5 崔肇春, 张新波, 朱正美等. GM3 对人单核样白血病 J6-2 细胞中磷脂代谢的影响, 生物化学杂志, 1992, 8

(6): 724~729

- 6 Banerjee R. A new method of preparing Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: extraction with octylglucoside. Membr Biochem, 1979, 2: 283
- 7 Coll R J, Murphy A J. Purification of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum by affinity chromatography. J Biol Chem, 1984, 259: 14249~14254
- 8 屠亚平, 徐 红. 亲和层析纯化肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶, 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (4): 345~349
- 9 Tu Y P, Yang F Y. Transmembrane Ca^{2+} gradient mediated modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196 (2): 561~568
- 10 Javier N, Maris T, Efraim R. Voltage-dependence of Ca^{2+} -uptake and ATP hydrolysis of reconstituted Ca^{2+} -ATPase vesicles. Biophys J, 1984, 46: 709~717
- 11 Verkleij A J, Zwaal R F A, Roelofsen B *et al.* The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane, a combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. Biochim Biophys Acta, 1973, 323: 178~193

The Freeze-fracture Study of Ca^{2+} -ATPase Proteoliposomes Reconstituted with Ganglioside GM3 and Soybean Phospholipids. WANG Lihua (Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116027, China); YANG Xiaoyi (National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China).

Abstract Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase proteoliposomes were reconstituted with ganglioside GM3 and soybean phospholipid by addition of detergent, sonication and chromatography. It was observed that GM3 may enhance the activity of Ca^{2+} -ATPase in proteoliposomes and increase the diameter of uniform protein particles in sealed-well proteoliposomes vesicles which was evidenced by the negative-staining microscopy and freeze-fracture replica.

Key words Ca^{2+} -ATPase, ganglioside GM3, reconstitution, freeze-fracture