

超声法重组细菌 HCG 受体的研究*

王德恭 陈曼玲 邱明均 雷幼导

李光容 干德全 蓝天鹤

(华西医科大学基础医学院,成都)

提 要

用超声法将嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) HCG 受体进行重组,经电镜及结合实验证明该法是可行的,作者对 pH 及金属离子对重组的影响进行了初步探讨。

近年来,利用纯化的膜蛋白于脂质体 (Liposome) 上重组,来研究该膜蛋白的功能及与类脂的相互关系等,已有不少报道。

研究发现,嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) 有人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 结合物,此物与大鼠黄体细胞 HCG 受体有相似的 HCG 结合特性,故称该结合物为细菌 HCG 受体。为了进一步研究此受体的特性,我们以大豆磷脂为材料制备脂质体,用超声法将纯化的细菌 HCG 受体^[1]重组于脂质体上,通过电镜观察和结合反应等,来考察该受体在脂质体上的重组情况,并初步观察了一些因素对重组的影响。

材 料 和 方 法

一、材料

大豆磷脂 (北京南苑植物油厂出品) 纯化,按杨福愉等方法^[2]。细菌 HCG 受体提取,按陈曼玲等方法^[1]。¹²⁵I-HCG 标记 (见另文)^[3]

二、方法

1. 细菌 HCG 受体的重组

在 25mg 纯化大豆磷脂中,加入 1ml 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH7.5, 溶胀后加入受体蛋白 1mg,待受体蛋白溶解后,在不断充 N₂ 情况下用超声波发生器 (MSE 150 型,

振幅 14 micron) 在冰浴中超声 10 分钟,超声悬液加入上述缓冲液洗涤,离心 (22,000 × g 1 小时) 沉淀加入 1ml 上述缓冲液稀释得脂蛋白体悬液。

2. 受体蛋白定量

Lowry 法,测定时加入 1% SDS 0.1ml。

3. 受体结合反应

在康氏试管内加入含 50 μg 受体蛋白的脂蛋白体,¹²⁵I-HCG 10 ng,标准 HCG0—1500 Iu, 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 pH7.5, 补足体积到 0.5ml。恒温振荡水浴 30℃ 保温 2 小时。加入上述冷缓冲液 1ml 终止反应,再加入 0.42% γ-球蛋白 0.2ml 及 7% 聚乙二醇 1ml, 放置 30 分钟,离心 (3500 rpm) 15 分钟测各管总放射性 (T) 后吸弃上清液,再测沉淀放射性 (B)。

4. 电镜观察

常规冰冻蚀刻技术 (但不加固定剂) 制片。

结 果

一、电镜观察

重组前后脂质体冰冻蚀刻电镜观察如图 1.2。

* 中国科学院科学基金资助的课题。

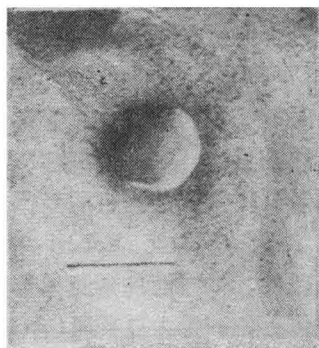


图1 重组前冰冻蚀刻照片($\times 60,000$)
线段表示 250nm

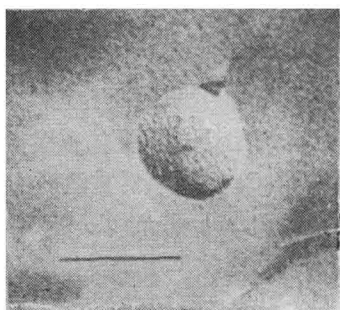


图2 重组后冰冻蚀刻照片($\times 60,000$)
线段表示 250nm.

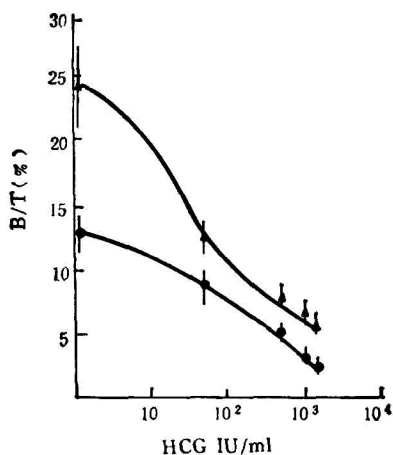


图3 重组前后细菌 HCG 受体结合抑制曲线比较
●—●重组前 ▲—▲重组后

重组前脂质体呈球形表面光滑。重组后脂质体表面不光滑,有蛋白质嵌入颗粒,脂质体直径亦有扩大,经测定蛋白嵌入率为 47%。

二、HCG 结合活性

重组前后受体结合抑制曲线比较如图 3。

重组前后之最大结合率分别为 12.4% 及 24%, 曲线落差分别为 10.8% 及 19.1%。

重组前受体结合容量为 $3.3 \times 10^{-6} \text{ mol/ug}$, K 值为 $10.64 \times 10^{-9} \text{ mol}$ 。重组后受体结合容量为 $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol/ug}$, K 值为 $6.58 \times 10^{-9} \text{ mol}$ 。Scatchard 分析如图 4, 作平均亲和力轮廓比较 (图 5) 表明两者 K 值均随 Y 值的增加而下降, 曲线表现为负协同效应, 重组后最低亲和力 K 值较重组前降低。

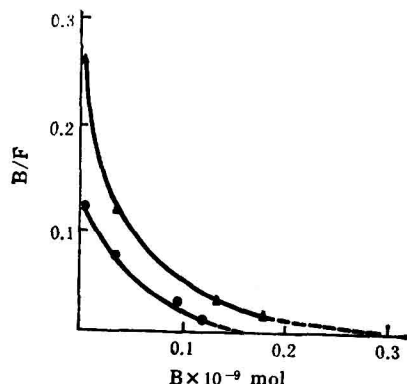


图4 受体特异性结合的 Scatchard 作图比较
●—●重组前 ▲—▲重组后

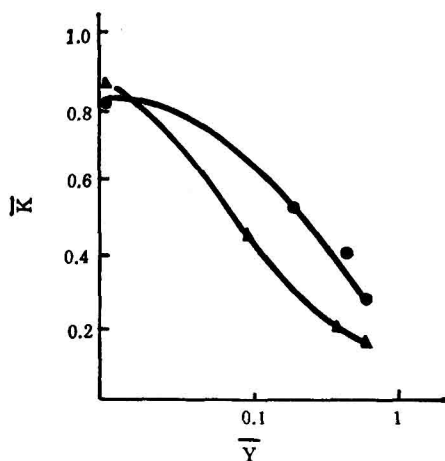


图5 重组前后受体平均亲和力轮廓的比较
●—●重组前 ▲—▲重组后

三、影响重组的条件

1. pH 值对重组的影响

重组前后,当 pH 为 7.5 时受体结合率上升达最高峰,但结合率重组前较重组后低。

2. 离子对重组的影响

在重组反应液中,分别加入 10mmol/L KCl, NaCl、CaCl₂ 和 1mmol/L EDTA。

结果发现,不同离子对重组有不同影响(图 6),Mg²⁺ 可使蛋白嵌入量及结合率增加,EDTA 可使结合率下降,10mmol/L 的 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 在超声后发生结絮现象。

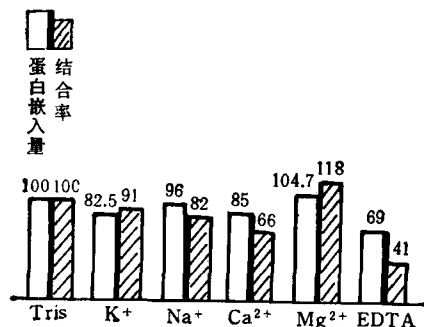


图 6 不同离子对重组的影响

讨 论

七十年代初 Racker 等^[4]用超声法重组膜蛋白成功,相继研究发现,采用超声-冻融的方法可以减少超声对蛋白变性的影响,更有利于重组。我们采用超声法重组细菌 HCG 受体,通过电镜观察及重组后脂质体上受体蛋白的定量及受体结合反应,证明重组是成功的。同时发现,在超声 10 分钟的情况下,受体结合率没有下降,说明该受体对超声有一定的抵抗力。

从重组前后的 Scatchard 作图分析可知,

重组后的结合容量(即结合位点)增加,而平均亲和力($\bar{K}$)下降。前者可能因为受体蛋白回到脂膜上时有更多的结合位点暴露;而因分离纯化脱离膜脂后、可能发生构象改变,减少结合部位。后者则可能因为重组后受体负协同效应增强所致。这一现象与 Robert 等^[5]的实验有一定的相似性。他将胰岛素受体重组在两种不同的脂质体上,一为大豆磷脂(含 43% 的不饱和脂肪酰基)形成的脂质体;一为二肉豆蔻磷脂酰胆碱(含 82% 饱和脂肪酰基)形成的脂质体。其结果是前一情况的胰岛素受体有较大的结合容量,较小的亲和力。

在功能膜蛋白重组中已发现某些离子对重组有促进作用^[6,7]。我们的研究表明 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 对细菌 HCG 受体重组促进作用不显著,但发现 Ca²⁺Mg²⁺ 对重组后的脂蛋白体有结絮作用。Papahadjopoulos^[8]观察到 Ca²⁺ 促进酸性磷脂形成的单层脂质体融合产生絮状沉淀,我们使用的大豆磷脂含酸性磷脂, Ca²⁺、Mg²⁺ 是否也有促进脂蛋白体融合的作用? 另外,EDTA 对重组后受体结合率有抑制作用,虽与已有报告相符,但是什么原因还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈曼玲等:《生物化学杂志》,1987,3(6),520。
- [2] 杨福愉等:《生物化学与生物物理学报》,1980,12(2),193。
- [3] 雷幼导等:《四川医学院学报》,1985,16(2),89。
- [4] Racker, E. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, **55**, 224.
- [5] Robert, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 477.
- [6] Sone, N. et al.: *J. Biochem.*, 1977, **81**, 519.
- [7] 杨福愉等:《中国科学》,1981,1,85。
- [8] Papahadjopoulos, D. et al.: *Methods. Membrane Biol.*, 1979, **10**, 1.

[本文于 1987 年 6 月 22 日收到]