

鸡心线粒体肌酸激酶的分离纯化

邹晓明 王帆 陈显川 王希成 周海梦

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

提 要

线粒体肌酸激酶(Mi-CK)的分离纯化采用了制备线粒体、低渗胀破线粒体外膜、磷酸盐抽提出线粒体肌酸激酶后再经硫酸铵分级、DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换层析、FPLC Mono-S 阳离子交换层析的方法,从鸡心中分离出纯度大于99%的 Mi-CK,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和醋酸纤维素薄膜电泳鉴定均为一条带,收率为15.3%,比活力为60U/mg.

关键词 线粒体, 肌酸激酶, 纯化, 同工酶

肌酸激酶是动物体内参与能量代谢的一个重要的激酶,它可逆地催化肌酸与 ATP 之间转磷酸基反应^[1],除了胞浆中的三种肌酸激酶:肌肉型(MMCK)、脑型(BBCK)、杂化型(MBCK)^[2],另一种肌酸激酶同工酶线粒体肌酸激酶(Mi-CK)也广泛存在于骨骼肌、脑、心脏组织及精子和视网膜感光细胞内,Mi-CK位于线粒体内膜外侧,与 ATP/ADP-translocator 偶联作用催化生成磷酸肌酸^[3].

由于 Mi-CK 是位于膜上的蛋白质,在氨基酸组成、DNA 序列及免疫特性上与胞浆的三种同工酶有着显著不同,同时又因其在磷酸肌酸穿梭机制中的重要作用,近年来受到重视.研究多集中在它的多聚体形式和它与膜的相互作用上,现倾向于认为天然 Mi-CK 是八聚体形式.八聚体与二聚体的相互转换在体内具有生理意义、是起调控作用的^[4].Muller 等人指出心磷脂是 Mi-CK 在线粒体内膜上的受体^[5].Cheneval 等则进一步研究了 Mi-CK 上结合心磷脂的部位^[6],但和已被深入研究的胞浆肌酸激酶相比,Mi-CK 在结构上,在与膜相互作用等方面尚待进一步研究.作为工作的基础我们首先着手于 Mi-CK 的纯化方法.

线粒体肌酸激酶的纯化是较困难的.早期的工作往往采用完整的线粒体来进行^[7],纯化结果中常含有污染的胞浆肌酸激酶及其它杂蛋

白^[8],近年来才成功地从狗心、人心、鸡心、鸡脑中纯化出均一的 Mi-CK^[9],我们参照 J. Schlegel 等人的方法^[10],作了一些适于我们的条件的改进后也纯化出了电泳纯的 Mi-CK.

1 材料与方法

1.1 实验材料

DEAE Sepharose Fast Flow 为 Pharmacia 产品;硫酸铵为国产分析纯经二次重结晶后使用.ATP,HEPES 为 Boehringer Mannheim 公司产品; β -巯基乙醇为 E. Merck 产品,兔肌肌酸激酶为本实验室制备,酶的比活力为 $150\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 线粒体肌酸激酶的纯化

1.2.1 从线粒体内膜上抽提 Mi-CK

250g 鸡心肌悬浮于2500ml 冷 MSH 缓冲液(220mmol/L 甘露醇,70mmol/L 蔗糖,10mmol/L Hepes, 0.2mmol/L EDTA, 1mmol/L β -巯基乙醇,1mmol/L NaN_3 用 KOH 溶液滴定至 pH7.4)匀浆,匀浆液于600g 离心10min,取上清液再于14 000g 离心30min,所得沉淀即为差速离心制备的粗线粒体.

粗线粒体用少量冷蒸馏水悬浮后,再加入

10倍体积冷蒸馏水缓慢搅拌, 体积约为300ml. 冰浴15min 胀破线粒体外膜, 27 500g 离心90min, 沉淀即为 mitoplast (外膜胀破只剩下内膜包围的线粒体). 1:1加冷蒸馏水把沉淀悬浮, 再按1:1比例加入磷酸钠抽提缓冲液 (50mmol/L 磷酸钠, 10mmol/L β -巯基乙醇, pH9.0), 抽提液体积约为300ml, pH 为8.3. 于4℃下缓慢搅拌抽提过夜.

1.2.2 硫酸铵沉淀 Mi-CK

抽提液经100 000g 离心50min, 得270ml 上清, 向其中加入30%硫酸铵, 静置2h 后, 27 500g 离心15min 取上清, 再补加硫酸铵至55%浓度, 静置2h 后离心, 27 500g, 30min, 得沉淀, Mi-CK 在这步被沉淀下来, 沉淀用少量 DEAE-Sephrose 缓冲液 (25mmol/L 磷酸钠, 0.2mmol/L EDTA, 1mmol/L β -巯基乙醇, pH8.4) 溶解, 再对此缓冲液透析.

1.2.3 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换柱层析

预先用上述缓冲液平衡好 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱 (1.5cm×10cm). 透析后的溶液约15ml, 以3—4ml/10min 的流速上柱, 收集穿过峰, 对 FPLC 缓冲液 (25mmol/L 磷酸钠, 0.2mmol/L EDTA, 1mmol/L β -巯基乙醇, 50mmol/L NaCl, pH7.0) 透析, 透析后溶液体积约为30ml.

1.2.4 FPLC Mono-S 阳离子交换层析

使用 Mono-S HR5/R 柱预先用上述 FPLC 缓冲液平衡好, 每份上样2ml, 每次上样3—4份后用5.0ml FPLC 缓冲液冲洗后再用50mmol/L 至480mmol/L NaCl 梯度洗脱, Mi-CK 在 NaCl 浓度为190—240mmol/L 时洗脱出来.

1.3 Mi-CK 活性测定

测活采用 pH-比色法^[11], 底物中加入1 μ g/ml 的寡霉素 (oligomycin) 以抑制 ATPase 的活性.

1.4 蛋白质浓度测定

采用消光系数法, 测定溶液在280nm 处的光吸收值, 混合蛋白质平均消光系数取 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10.0$, Mi-CK 消光系数取 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 11.7$ ^[12]. 含膜蛋白的样品测定前用1%SDS 溶液溶解至透明.

1.5 酶纯度和分子量的电泳鉴定

采用 SDS-PAGE 测定样品纯度和 Mi-CK 分子量, SDS-PAGE 按 Laemmli 方法^[13]进行.

1.6 醋酸纤维素薄膜电泳

电极缓冲液使用50mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0, 含5mmol/L EDTA), 5—10 μ l 样品加在纤维素条中间, 恒电压150V (电流约为0.8mA/cm) 电泳1h 后考马斯亮蓝染色观察.

2 结 果

纯化过程按实验方法中所述进行, 纯化结果列于表1中. FPLC Mono-S 阳离子交换柱层析结果见图1. 纯化过程的电泳图见图2. 可见在 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换这一步吸附上柱的杂蛋白质很多, 而含线粒体肌酸激酶的穿过峰中杂蛋白质种类不多, 在 Mono-S FPLC 穿过峰中含有这几种杂蛋白. 从 Mono-S 柱上 NaCl 梯度洗脱下来的 Mi-CK 活性峰中线粒体肌酸激酶纯度已大于99%, SDS-PAGE 电泳上一条带, 从250g 鸡心肌中得到0.5mg Mi-CK, 25℃下用比色法测定酶比活达到60U/mg.

表1 Mi-CK 的纯化结果

步 骤	总蛋白质 /mg	酶的总活力 /U	酶的比活力 /(U/mg)	产率 /%
全部 mitoplasts	4871	2808 ¹⁾	0.58	
磷酸钠抽提后上清液	488	190	0.40	100
30—55%硫酸铵分级	78	60 ²⁾	0.77	31
DEAE Sepharose FF 层析	5.9	71	12	36
Mono-S FPLC 收集液	0.50	30	60	15.3

1) 该值为 Mi-CK 和 BBCK 活力之和

2) 由于仍有微量硫酸铵存在, 抑制了 Mi-CK 的活力, 因而所示活力不准确

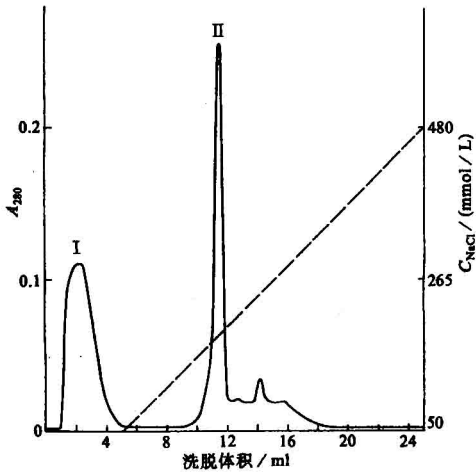


图1 Mono-S FPLC 阳离子交换柱层析纯化
Mi-CK 图

DEAE Sepharose FF 层析后酶液以 0.5ml/min 的流速上样至 Mono-S FPLC 柱 pH7.0, 图中实线(—)代表 A₂₈₀ 监测值, 峰 I: 杂蛋白, 峰 II: Mi-CK; 虚线(---)代表 NaCl 梯度, 从 50mmol/L 至 480mmol/L

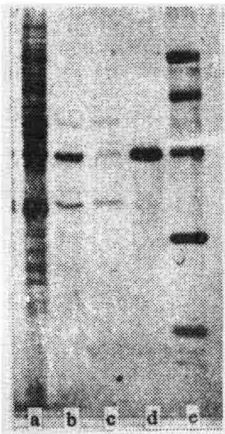


图2 纯化过程 SDS-PAGE 电泳图
考马斯亮蓝染色

a. 30%—55% 硫酸铵分级; b. DEAE-Sepharose FF 层析穿过峰; c. Mono-S FPLC 穿过峰(见图1峰 I); d. Mi-CK 洗脱峰(见图1峰 II); e. 标准蛋白, 分子量为: 磷酸化酶 b 94000, 牛血清白蛋白 67000, 肌动蛋白 43000, 碳酸酐酶 30000, TMV 外壳蛋白 17500

SDS-PAGE 测定 Mi-CK 分子量结果见图 3. 除标准蛋白外, 还同时进行了已知亚基分子量的兔肌肌酸激酶的电泳. 从图中看到 Mi-CK 的亚基分子量与 MM 型兔肌肌酸激酶相似, 也

约为 42000.

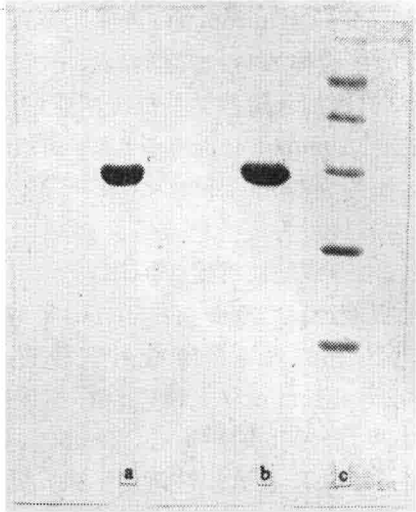


图3 SDS-PAGE 测定 Mi-CK 分子量
12.5% SDS-PAGE 凝胶, 考马斯亮蓝染色后观察. a. 兔肌 MMCK; b. 鸡心 Mi-CK; c. 标准蛋白, 分子量为: 磷酸化酶 b 94000, 牛血清白蛋白 67000, 肌动蛋白 43000, 碳酸酐酶 30000, TMV 外壳蛋白 17500

肌酸激酶同工酶的醋酸纤维素薄膜电泳结果见图 4. 显示出尽管 Mi-CK 和 MMCK 分子量相近, 但它们的等电点很不相同的. pH7.0 时, Mi-CK 走向阴极, 而 MMCK 由于 pI 接近 7.0 几乎不泳动(稍微偏向阳极), 可通过醋酸纤维素薄膜电泳将肌酸激酶同工酶清楚分开.

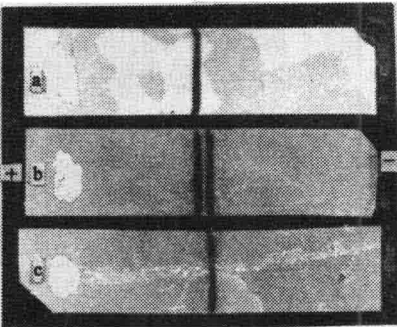


图4 肌酸激酶同工酶的醋酸纤维素薄膜电泳
箭头所示为样品上样处. a. 兔肌 MMCK; b. Mi-CK+MMCK; c. 鸡心 Mi-CK

3 讨 论

在肌酸激酶同工酶中, Mi-CK 由于其含量少, 稳定性差, 所以其纯化一直很困难. 近年来, 一些研究者采用快速温和的方法, 才成功地纯化出了 Mi-CK. 我们参照 J. Schlegel 等人的方法^[10]在现有的条件下进行了一些改变后, 也成功地纯化出了该酶.

鸡心中富含 BBCK^[14], 所以尽管使用磷酸盐可直接从细胞匀浆液中抽提出 Mi-CK, 我们还是先制备线粒体, 然后胀破线粒体外膜制备出 mitoplasts 再使用磷酸盐抽提 Mi-CK, 这样可除去大部分的 BBCK. 少量污染的 BBCK 则通过 DEAE-Sephrose 层析步骤除去. 由于 Mi-CK 的等电点很高, 在 pH8.4 情况下仍不吸附上柱, 而 BBCK 和绝大部分杂蛋白均挂柱, 所以这一步骤最后除去了 BB 型肌酸激酶和大部分杂蛋白, 并使酶比活大大提高, 再经 FPLC Mono-S 阳离子交换后就可得到线粒体肌酸激酶纯品.

和 J. Schlegel 方法相比, 我们尽管也采用了制备 mitoplasts 的方法, 但省去了清洗线粒体和 mitoplasts 等步骤, 减少了离心工作量, 加快了纯化速度, 由此带来的较多的杂蛋白, 在阴离子交换层析这步也基本除去, J. Schlegel 使用了 35%—55% 硫酸铵分级, 我们考虑到有文献^[15]报导 35% 的硫酸铵已导致线粒体肌酸激酶沉淀, 所以改为 30%—55% 硫酸铵分级. J. Schlegel 方法中很重要的一步是在硫酸铵分级后进行了 Blue-Sephrose CL-6B 亲和层析, 但因 Blue-Sephrose CL-6B 不易得到, 且洗脱时使用 ADP, 成本较高, 我们省去了亲和层析步骤, 而改用 DEAE-Sephrose 阴离子交换层析, 取得了亲和层析基本相同的效果.

Mi-CK 作为一种线粒体内膜的外周蛋白, 它在膜上是很稳定的. 但从膜上抽提下来后则极易失活. 我们使用的鸡心中既有新鲜的鸡心也有一 20℃ 冷冻保存 60 天的鸡心, 结果发现, 冷冻保存后尽管胞浆肌酸激酶失活很多, Mi-CK 则基本不失活, 但纯化后 Mi-CK 在溶液状态易

失活, 4℃ 保存几天后活力就大为减少.

由于 Mi-CK 易失活, 纯化过程中应十分注意保持低温, 另外所有缓冲液体系中均含有巯基乙醇以保护酶活性, 硫酸铵对酶活性伤害也较大^[9], 尤其是其中含有的重金属离子对 Mi-CK 更是致命的. 所以我们把国产分析纯的硫酸铵二次重结晶后才使用. 尽管这样, 硫酸铵分级这步酶活力损失还是较大的. 由于 Mi-CK 的不稳定性, 我们尽量采用少量快速的纯化步骤, 整个纯化过程在 3d 内完成.

鸡心 Mi-CK 的活力在鸡的生理温度 42℃ 下最高, 所以在 25℃ 下测得酶比活力较低, 这与文献报导的相符^[10].

线粒体肌酸激酶的纯化为今后进一步研究此酶的结构及其与膜的相互作用打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Kenyon G L, Reed G H. *Advances in enzymology and related areas in molecular biology*. New York: J Wiley & Sons, 1983; Vol 54:367—425
- 2 Caplan A I, Fiszman M Y, Eppenberger H M. Molecular and cell isoforms during development, *Science*, 1983; 221:921—927
- 3 Wallimann T, Schnyder T, Schlegel J et al. *Muscle energetics*. New York: Alan R. Liss Inc., 1989:159—176
- 4 Schlegel J, Wyss M, Eppenberger H M et al. Functional studies with the octameric and dimeric form of mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem*, 1990; 265:9221—9227
- 5 Muller M, Moser R, Cheneval D et al. Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase *J Biol Chem*, 1985; 260:3839—3843
- 6 Cheneval D and Carafoli E. Identification and primary structure of the cardiolipin-binding domain of mitochondrial creatine kinase. *Eur J Biochem*, 1988; 171:1—9
- 7 Jacobus W E, Lehninger A L. Creatine kinase of rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, 1973; 248:4803—4810
- 8 Lapin E, Maker H S and Lehrer G M. Multiple dishgel bands of mitochondrial creatine kinase. *J. Neurochem*, 1974; 22:11—14
- 9 Wyss M, Schlegel J, James P et al. Mitochondrial creatine kinase from chicken brain. *J Biol Chem*, 1990; 265:15900—15908

交瘤技术,获得六株稳定分泌特异 Lp (a) 单抗杂交瘤细胞株 a_1 — a_6 , 其酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 效价分别为 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-7} , 10^{-7} , 亲和力常数分别为 6.1×10^{-9} , 2.0×10^{-9} , 1.1×10^{-10} , 2.6×10^{-9} , 2.5×10^{-10} , 3.3×10^{-10} , a_1 , a_2 免疫球蛋白亚类为 IgG_{2a}, a_3 — a_6 为 IgG₁, 除 a_1 外, 其余五株与 LDL, 载脂蛋白 B (apo B), 纤溶酶原 (Plg) 无交叉反应。

2 测定方法 经过选择, 将 a_2 单抗以 1:10 000 稀释, 包被到 40 孔聚苯乙烯塑料板中 (浙江黄岩化塑厂), 每孔 0.1ml, 4℃ 过夜; 洗涤后, 加入系列稀释的标准品及 1:2000 稀释的血清标本, 每孔 0.1ml, 37℃ 1h; 洗涤后, 加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的 a_3 单抗, 每孔 0.1ml, 37℃ 1h; 洗涤后, 加入邻苯二胺-H₂O₂ 底物溶液, 每孔 0.1ml, 37℃ 20min; 加入 2mol/L 硫酸 0.05ml 终止反应, 在 λ_{492} (浙江省建德生化仪器厂 MB-5000) 处测得光密度值, 在标准曲线上查得相应测值。

3 方法考核

a. 特异性: 在一混合血清中分别加入 5mg/ml 的 LDL, apo B 和 Plg (Sigma) 纯品, 以建立的方法检测各管 Lp (a) 含量, 结果增加率分别为 -2.16%, -2.16% 和 -2.50%, 提

示本法特异性强。

b. 重复性: 3 份不同标本, 用本法测 10 次, 批内变异系数平均为 2.6%, 在不同检测日测 5 次, 批间变异系数平均为 8.1%。

c. 灵敏度: 本法最低可检测出 Lp (a) 0.15—0.30ng/孔, 标本稀释 2000 倍, 相当于原血清 Lp (a) 浓度 0.3—0.6mg/dl。

d. 回收试验: 在已知 Lp (a) 含量 (瑞典 Biopool AB 试剂盒 ELISA 测值) 的三份血清中, 分别加入 2.5, 40.0mg/dl 的参考血清进行回收试验, 结果回收率在 85.9%—108.7%, 平均 98.6%。

e. 相关性: 本法标准曲线与瑞典 Biopool AB 试剂盒 (灵敏度 0.08ng/孔) 标准曲线形态一致, 两种方法测值 ($n=80$) 相关系数 $r=0.848$ 。

4 初步应用 应用本法检测 40 位正常人和 40 例冠心病患者, 测值分别为 19.04 ± 17.22 mg/dl 和 30.26 ± 25.38 mg/dl, 差别显著 ($P<0.05$)。

总之, 利用自制单抗, 在国内首次建立的 Lp (a) 双单抗夹心 ELISA 测定方法具有特异, 准确, 灵敏度高, 重复性好, 可以与国外同类试剂盒相比, 适宜在国内推广应用。

(上接第 387 页)

- 10 Schlegel J, Zurbriggen B, Wyss M *et al.* Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. *J Biol chem*, 1988; **263**: 16942—16953
- 11 姚启智, 邹承鲁. pH-比色法测定肌酸激酶活力. 生物化学与生物物理进展, 1981; (3): 52—56
- 12 Blum H E, Deus B, Gerok W. Mitochondrial creatine kinase from human heart muscle: purification and characterization of the crystallized isoenzyme. *J Biochem*, 1983; **94**: 1247—1257
- 13 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; **227**: 680—685
- 14 Wallimann T, Kuhn H J, Pelloni G *et al.* Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. *J Cell Biol*, 1977; **75**: 318—325
- 15 Hall N, Addis P, Deluca M. Mitochondrial creatine kinase: physical and kinetic properties of purified enzymes from beef heart. *Biochemistry*, 1979; **18**(9): 1745—1751