

金项目的资助, 谨此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 石体仁, 雷淑萍, 刘春梅. 中华老年医学杂志, 1986; 5 (2): 114
- 2 Jain S K, Mohandas N, Clark M R *et al.* Bri J Haematology, 1983; 53: 247
- 3 陈建文, 张兰萍, 宋剑陶等. 生物物理学报, 1992; 8 (3): 582
- 4 Perussi J R, Tinto M H, Nascimento O R *et al.* Anal Biochem, 1988; 173 (2): 289
- 5 Sharom J F, Ross T E. Biochim Biophys Acta, 1986; 854 (2): 287
- 6 程龙生, 唐 祥, 郑建华等. 生物化学与生物物理学报, 1988; 20: 155
- 7 张锦楠, 阎淑莲, 刘永利等. 见: 中国生理学会等编. 生理通讯, 增刊 3. 第一届全国神经科学学术会议, 上海, 1992, 北京:《生理通讯》编辑部, 1992: 180
- 8 张保林, 卢景雾, 王文清等. 生物物理学报, 1992; 8 (3): 539
- 9 程 时, 谢一琳, 华 钊. 生物物理学报, 1992; 8 (1): 104

ESR Study on Conformation of Membrane Proteins of Cerebral Cortex Neurons. Zhang

Qian, Wu Benjie, Yu Guifen (*Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*); Lu Jingfen (*National Laboratory of the Nature and Biomimetic Drugs, Medical University of Beijing, Beijing 100083, China*).

Abstract Maleimide was used as spin label for studying the effect of hypoxia on rat cerebral cortex neurons. Results showed that hypoxia induced the lipid peroxidation in cerebral cortex cells and increased the formation of LPO. By comparing the characteristics of ESR spectra, it was found that values of τ_c were significantly higher in hypoxic group than that in control ($P < 0.01$). The increase in the ratio of h_0/h_{-1} was well correlated with the enhance in hypoxia group. It was also found that MT could inhibit the lipid peroxidation in cerebral cortex cells.

Key words cerebral cortex, neuron, electron spin resonance techniques, spin label, hypoxia, metallothionein

聚乙二醇修饰对酶活性和稳定性的影响

杨 隼

(Center for Biotechnology and Bioengineering, Department of Chemical Engineering,
University of Pittsburgh, Pittsburgh PA 15219, USA.)

摘要 经氰尿酸氯和对硝基苯碳酸酯活化过的甲氧基聚乙二醇分别用来对枯草杆菌蛋白酶进行化学修饰. 修饰后的酶在水溶液和有机溶剂中均保持活性. 酶在水溶液里的 k_{cat} 增加, K_m 不变. 酶对温度和 pH 的稳定性都显著升高, 但最佳反应温度不变.

关键词 枯草杆菌蛋白酶, 聚乙二醇, 酶活性, 酶稳定性

由于聚乙二醇具有与蛋白质相容的特性, 用其对蛋白质进行化学修饰已经成为医学和生物工程领域的热门课题, 得到了广泛的研究和应用^[1]. 例如, 聚乙二醇与蛋白质分子的共价结合可降低蛋白质的免疫性和抗原性, 促进了蛋

白质和酶在临床上的应用^[2]. 聚乙二醇也可用于对酶和似酶催化剂的重新设计. 比如, 可以通过聚乙二醇长链把一个脱氢酶分子与其辅助

因子 NAD^+ 相连^[3], 具有催化活性的金属卟啉可与已用聚乙二醇修饰过的牛血清白蛋白结合, 成为在有机介质中显催化活性的杂化催化剂^[4]. 聚乙二醇的两亲性还可使酶分子经过修饰后能够溶解在有机溶剂中并保持催化活性, 有利于对非水介质中有机合成 (如肽合成和酯基转移反应) 的均相催化^[5]. 另外, 经聚乙二醇修饰后的酶可以进一步形成单链或交联的高分子^[6], 这也是酶固定化的一个新方法. 还有, 研究化学修饰对酶活性和稳定性的作用可以帮助对酶催化行为的加深了解^[7].

用聚乙二醇修饰蛋白质首先必须将聚乙二

醇活化, 即接上一个活性端基, 使其可以与蛋白质分子上的某些功能团 (如赖氨酸残基的 ϵ -氨基) 结合. 在本文中, 用于修饰酶的聚乙二醇分别经过氰尿酸氯 (cyanuric chloride, CC) 和对硝基苯碳酸酯 (p-nitrophenyl carbonate, NPC) 的活化 (图 1), 对化学修饰前后的酶活性和稳定性进行了比较. 选用枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin Carlsberg), 是因为作为丝氨酸蛋白酶的代表之一, 它的催化机理已经得到充分研究^[8], 而且蛋白酶在食品工业和洗涤剂工业用途广泛. 此酶分子量为 27 400, 含有 9 个赖氨酸.

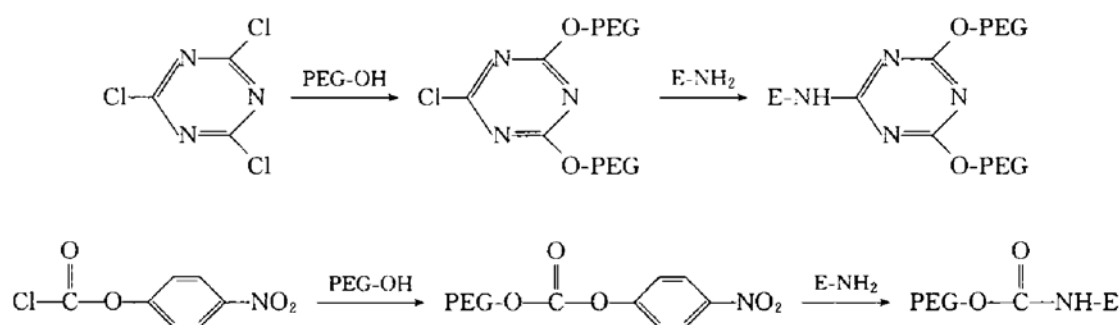


图 1 用聚乙二醇修饰酶的方法

1 材料与方法

1.1 材料

枯草杆菌蛋白酶, 甲氧基聚乙二醇 (methoxy polyethylene glycol, PEG, $\text{CH}_3\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{OH}$, 平均分子量 5 000), 及所用其它化学药品均购自 Sigma 化学公司.

1.2 酶修饰

聚乙二醇分别用氰尿酸氯 (CC) 和对硝基苯碳酸酯 (NPC) 进行活化, 方法参照文献 [9, 10]. 然后在带塞小试管中加入 10 mg 枯草杆菌蛋白酶和活化过的聚乙二醇 (40 mg CC-PEG 或 20 mg NPC-PEG). 加入 5 ml 硼酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 9.0) 混合后, 溶液在室温下磁力搅拌 3 h, 后在 1 L 磷酸缓冲液 (20 mol/L, pH 6.0) 中透析 24 h (换缓冲液 3 次). 将溶液 pH 值调至 7.5 后, 冷冻干燥 48 h. 所得产物的

蛋白质含量用 Bradford 方法^[11]测得是 4%.

1.3 酶活性测定

1.3.1 水溶液中的活性: 用催化 N-琥珀酰-L-丙氨酰-L-丙氨酰-L-脯氨酰-L-苯丙氨酰对硝基苯胺的水解来测定. 5 μl 酶溶液 (溶解在 20 mmol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 修饰过和未修饰的酶浓度分别是 1 g/L 和 0.02 g/L) 加入装有 2 ml 底物溶液 (0.01~2 mmol/L 在 20 mmol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中) 的比色皿中, 立即移入紫外可见分光光度计 (Perkin-Elmer, Lambda 3) 在 412 nm 下跟踪产物对硝基苯胺的生成 (其摩尔吸光系数为 $8.48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 反应温度由循环水浴控制. 酶的 K_m 、 $V_{\max}$ 由计算机软件 "Enzfit" 计算得到. 对酶反应速度随温度变化的测定, 底物浓度为 0.02 mmol/L, 反应温度控制在 10~80°C. 活化能根据 Arrhenius 公式算得.

1.3.2 有机溶剂中的活性:用催化N-乙酰-L-苯丙氨酸乙酯和甲醇的酯基转移反应来测定. 带塞反应瓶中装有2 ml 含0.25 g/L 用聚乙二醇修饰过的酶. 30 mmol/L N-乙酰-L-苯丙氨酸乙酯和1.2 mol/L 甲醇的甲苯溶液(甲苯和甲醇均经分子筛干燥过), 加入1 μ l 蒸馏水或0.5 g 磷酸钠盐的水合物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)使反应开始. 反应瓶置于控温摇床中(30 $^\circ\text{C}$, 150 r/min). 产物N-乙酰-L-苯丙氨酸甲酯的生成用气相色谱(Hewlett Packard 5890II)跟踪^[12].

1.4 酶稳定性测定

1.4.1 对温度的稳定性:2 ml 酶溶液(溶解在20 mmol/L, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 对修饰过和未修饰的酶分别是1 g/L 和0.04 g/L) 静置于恒温箱中(30~60 $^\circ\text{C}$). 10 μ l 酶溶液被定时取出, 加入2 ml 含0.02 mmol/L 底物(见1.3.1) 的 Tris-HCl (20 mmol/L, pH8.0) 缓冲液中, 反应温度控制在30 $^\circ\text{C}$, 反应速度测定如1.3.1 所述.

1.4.2 对pH 的稳定性:2 ml 酶溶液(溶解在20 mmol/L, pH6.5~9.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 酶浓度同上) 静置于30 $^\circ\text{C}$ 的恒温箱中, 取样和酶活性测定同上.

2 结 果

2.1 酶的聚乙二醇修饰

与活化聚乙二醇反应过的酶, 在有机溶剂中溶解与否可以用来判断酶是否与聚乙二醇共价结合了, 因为未修饰的酶是不溶于除二甲亚砜外的有机溶剂的. 将干酶制剂溶于氯仿中, 所得上清液蒸干溶剂后测定其蛋白质含量, 表明至少有67%的酶蛋白被聚乙二醇修饰了. 经CC-PEG 和NPC-PEG 修饰过的枯草杆菌蛋白酶能溶于苯、甲苯、氯仿、四氯化碳、四氢呋喃等溶剂中, 其在室温下甲苯里的溶解度分别为2 g/L 和1 g/L. 此外, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳也证实聚乙二醇与酶共价结合了. 两种修饰过的酶均在大约分子量40 000 的位置显一谱带, 表明每个酶分子连结2~3 个聚乙二醇分

子.

经CC-PEG 和NPC-PEG 修饰后, 枯草杆菌蛋白酶的比活性分别保持原来的87.5%和92.3% (所用透析缓冲液浓度为20 mmol/L). 酶经NPC-PEG 修饰后的比活性在修饰反应、透析、和冷冻干燥各步之后分别保持未反应前的95.3%、94.6%和93.1% (所用透析缓冲液浓度为10 mmol/L). 这说明整个酶修饰过程并没有导致酶的严重失活. 酶活性在修饰反应后的略微下降可能是由于活化剂(CC 或NPC) 的存在和因高pH 值(pH9.0) 使蛋白酶的自溶程度升高而引起的.

2.2 酶活性

枯草杆菌蛋白酶在水溶液里催化N-琥珀酰-L-丙氨酸-L-丙氨酸-L-脯氨酸-L-苯丙氨酸对硝基苯胺的水解. 酶在PEG 修饰前后的米氏常数(K_m). 催化速度常数(k_{cat}) 和专一性常数(k_{cat}/K_m) 见表1. 两种修饰过的酶的 k_{cat} 均比未经修饰前增加近一倍, 而 K_m 保持不变, 使酶的专一性常数明显增加, 未经修饰的酶在透析后和冷冻干燥后, 均与未经这两步处理的原酶具有相近的 k_{cat} 和 K_m , 从而排除了酶活性的提高是由于制备过程中透析和冷冻干燥引起的可能性.

表1 枯草杆菌蛋白酶修饰前后的动力学常数

	原酶	CC-PEG 修饰酶	NPC-PEG 修饰酶
$K_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.19	0.21	0.19
k_{cat}/s^{-1}	182	335	340
$(k_{cat}/K_m)/(\mu\text{mol} \cdot \text{L} \cdot \text{s})^{-1}$	0.96	1.60	1.79
活化能/ $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	16.1	12.5	13.9

在各反应温度下对酶反应速度的测定表明, 不论枯草杆菌蛋白酶是否被PEG 修饰过, 其反应最佳温度均保持不变(60 $^\circ\text{C}$). 但酶反应的活化能却略有下降(见表1). 这实际上与 k_{cat} 的升高是一致的.

在水溶液中, 枯草杆菌蛋白酶的酶活性随pH 值的变化反映了酶活性中心His 64 的电离

情况. 对 pH 5~8 范围内的酶活性而言, 宏观 pK_a 实际上是由 His 64 的微观 pK_a 控制的^[7]. 因此, 研究经 PEG 修饰过的枯草杆菌蛋白酶的酶活性随 pH 值的变化, 有助于了解酶活性中心的静电作用是否因化学修饰而有所改变. 本实验中测定酶 pK_a 值和最佳 pH 值的方法同文献 [12]. 结果表明, 酶的 pK_a 值和最佳 pH 值 (8.2 ± 0.1) 均没有因 CC-PEG 或 NPC-PEG 的修饰而改变. 经过这两种 PEG 修饰的酶在三种离子强度的缓冲液 (0.01、0.5、1.0 mol/L) 中的 pK_a 分别为 6.47、6.99、7.09, 与未经修饰的酶的 pK_a 值相似^[12], 而且也随缓冲液的离子强度增加而增加, 后者是因为离子强度的增加抑制了 His 64 电离的缘故.

用聚乙二醇对酶进行化学修饰的一个重要用途是使酶在有机溶剂中溶解并催化在有机介质中发生的化学反应. 对于枯草杆菌蛋白酶, 我们用其催化的 N-乙酰-L-苯丙氨酸乙酯和甲醇的酯基转移反应来检测其在有机溶剂中的催化活性. 和未经修饰的枯草杆菌蛋白酶一样, 经 CC-PEG 和 NPC-PEG 修饰过的酶在干燥的甲苯中均不显活性, 但一旦加入水或盐水合物 (后者向体系中释放水分以控制体系的水活度^[12]), 均能催化上述的酯基转移反应. 表 2 列出了三种酶 (均在 pH 7.5 下冷冻干燥得到) 在甲苯中的活性. 结果表明, 经 PEG 修饰后, 酶

表 2 PEG 修饰前后枯草杆菌蛋白酶在甲苯中催化酯基转移反应的初始速度

盐水合物	30℃下的 聚乙二醇修饰过的酶 ¹⁾				原酶 ¹⁾
	水活度	CC-PEG	NPC-PEG		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.85	0.64	0.58		0.53
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.65	0.17	0.16		0.15
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.52	0.13	0.12		0.02
1 μl H_2O		0.07	0.06		0.07

¹⁾ 反应速度所用单位为 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

的活性稍有提高或与修饰前的酶活性相当. 比较而言, 经 CC-PEG 修饰的酶的活性要比经 NPC-PEG 修饰的酶略高. 与未经修饰的酶一

样, 两种修饰后的酶在甲苯中的活性均随体系的水活度的增大而增大.

与原酶^[12]相同, 经 CC-PEG 和 NPC-PEG 修饰的枯草杆菌蛋白酶在氯仿中均几乎不显活性. 若把这两种酶分别溶于氯仿中, 再蒸发掉溶剂后向残渣加入缓冲液使其溶解并测其酶活性, 就会发现剩余的酶活性分别只有未接触氯仿前的 9.0% 和 5.5%. 但是如果换用甲苯作同样处理, 则剩余酶活力分别可达 83.8% 和 60.9%. 上述实验说明, 用有机溶剂处理会给修饰过的酶造成不同程度的失活, 而氯仿起的作用要比甲苯大得多. 另外, 由于无论修饰与否, 枯草杆菌蛋白酶经氯仿处理后均显极低活性, 我们有理由认为, 酶的失活是由于氯仿对酶活性中心的直接作用引起的, 而不是因为酶分子与聚乙二醇的共价结合所导致的. 有趣的是, NPC-PEG 修饰的酶似乎比 CC-PEG 修饰的酶对有机溶剂更敏感些.

2.3 酶的稳定性

酶修饰前后的热力学稳定性是通过测定各 pH 值下的酶溶液在各温度下恒温一段时间后的剩余活力及其半衰期 (即酶失活一半所需的时间) 来进行比较的. 为利于比较, 各实验中所用的蛋白质浓度必须相同. 因为蛋白质浓度越高, 则蛋白酶的自溶程度越大, 自然会引起酶的稳定性下降.

酶的稳定性随温度而变化. 从表 3 可以看到, 在 pH 8 的缓冲液里, 从 30℃ 到 60℃, 无

表 3 修饰前后的枯草杆菌蛋白酶在 pH8.0 各温度下的半衰期

温度/℃	d		
	原酶	CC-PEG 修饰酶	NPC-PEG 修饰酶
30	1.3	11.7	37.1
40	1.1	9.52	7.65
50	0.12	0.93	0.83
60	0.07	0.21	0.22

论修饰与否, 酶的半衰期均迅速下降. 比较而言, 两种用聚乙二醇修饰过的酶稳定性相当

(除了在 30℃ 时 NPC-PEG 修饰的酶比 CC-PEG 修饰的酶稳定性高 2.2 倍), 但它们在各温度下均比未修饰的酶要稳定得多 (大约 3~28 倍).

酶的稳定性也随缓冲液的 pH 变化而变化. 从表 4 可以看出, 在 30℃ 时所有 3 种酶的半衰期都随 pH 值升高而下降; 但在整个 pH 范围内 (pH 6.5~9.5), 两种被 PEG 修饰的酶均比原酶稳定得多, 其中 NPC-PEG 修饰的酶稳定性比 CC-PEG 修饰的酶要高.

表 4 各 pH 值下修饰前后的枯草杆菌蛋白酶
在 30℃ 时的半衰期

pH	d						
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
原 酶	2.0	1.9	2.1	1.3	1.2	1.3	1.0
CC-PEG 修饰酶	20.3	17.6	13.9	11.7	10.0	9.3	7.6
NPC-PEG 修饰酶	42.8	40.5	37.1	37.1	31.8	30.0	26.5

为了证明以上实验所得到的酶的高稳定性是因为与聚乙二醇的共价结合而不是由于制备过程中透析、冷冻干燥和与聚乙二醇共存引起的, 我们对未经修饰的枯草杆菌蛋白酶 (0.1 g/L) 分别混合进行了透析、冷冻干燥和加入 10 g/L 甲氧基聚乙二醇 (未经活化) 的处理 (表 5). 结果表明, 经以上处理的酶 (A~E) 活力与未经任何处理的酶 (F) 相当, 稳定性并未因此而得到提高.

表 5 透析、冷冻干燥和加入聚乙二醇对酶稳定性的影响 (30℃)

酶 样	A	B	C	D	E	F
透析	✓	✓				
前处理 冷冻干燥	✓		✓		✓	
加入 10 g/L PEG				✓	✓	
第一天	100	100	100	100	100	100
第二天	28.2	30.3	28.0	34.0	33.0	25.0
第三天	17.0	18.6	17.8	23.2	21.1	16.9
第四天	12.6	14.3	12.6	15.9	15.7	12.2

3 讨 论

在水溶液中, 枯草杆菌蛋白酶经化学修饰后使反应活化能下降, 酶活力提高, 但这并不意味着聚乙二醇的结合引起了酶活性中心的改变. 酶的 pK_a 值, 最佳 pH 值和 K_m 值未因化学修饰而改变就是一个很好的证明. 事实上, 活性中心保持不变是合理的, 因为聚乙二醇长链只是与酶分子表面赖氨酸残基的 ϵ -氨基结合, 并未牵涉到酶的活性中心, 而且也不会引起蛋白质内部分子构型的改变. 当然, 这种结合会使蛋白质的表面电荷分布引起某种程度的变化.

在有机溶剂中, 酶经 PEG 修饰后活性也比未修饰的酶稍高, 这是因为酶与 PEG 结合后可以溶解在有机介质中, 更有效地接触溶剂中的底物分子, 但与未经修饰的酶^[12]一样, 经 CC-PEG 和 NPC-PEG 修饰的酶都需要一定的水使酶活化, 而且酶活性随体系中的水活度增大而增大. PEG 修饰的胰凝乳蛋白酶也有类似的现象^[13], 在苯中的水分从 0.04% 增至 0.18% 可使酶活性提高 275 倍.

在所有测试用到的温度 (30~60℃) 和 pH (6.5~9.5) 下, 两种经 PEG 修饰的枯草杆菌蛋白酶均比未经修饰的酶具有更高的稳定性. 这是因为酶蛋白分子表面连结上一条或多条 PEG 长链后使酶分子在水溶液中更具刚性, 从而更好地避免了蛋白质分子结构的展开而使酶的稳定性得到提高. 另外, Gaertner 和 Puigserver^[7]用胰蛋白酶催化胰凝乳蛋白酶原活化的实验证明, 经 PEG 修饰后, 酶水解蛋白质的活力是原来的 1/10, 说明经 PEG 修饰过的酶因其较高的刚性造成接触象蛋白质这样的多肽大分子底物的空间位阻, 从而降低其水解蛋白质 (包括自身) 的能力.

总而言之, 本文用两种活化聚乙二醇对枯草杆菌蛋白酶进行了化学修饰, 使酶在活性和稳定性方面都得到了提高. Gaertner 和 Puigserver^[7]也对用 NPC-PEG 修饰的胰蛋白酶进行了类似的报道. 这些结果在生物化学和

生物技术方面无疑都是很有参考价值的。值得一提的是, 不论用 CC-PEG 还是 NPC-PEG 对酶进行修饰, 枯草杆菌蛋白酶的活性和稳定性均没有很大的变化。这说明聚乙二醇的活化基团对酶催化性质的影响似乎不大。

参 考 文 献

- Harris J M. Poly (ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press, 1992
- Harris J M. In: Harris J M ed. Poly (ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press, 1992: 1
- Nakamura A, Urabe I, Okada H. J Biol Chem, 1986; **261**: 16792
- Yoshinaga K, Ishida H, Hagawa T *et al.* In: Harris J M ed. Poly (ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press, 1992: 103
- Inada Y, Takahashi K, Yoshimoto T *et al.* Trends Biotechnol, 1986; **7**: 190
- Yang Z, Williams D, Russell A J. Biotechnol Bioeng, 1994; **45**: 10
- Gaertner H, Puigserver A. Enzyme Micro Technol, 1992; **14**: 150
- Fersht A. Enzyme structure and mechanism, 2nd. New York: W. H. Freeman and Company, 1985: 17
- Imito T, Yamada H. In: Creighton ed. Protein function: A practical approach. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1989: 247
- Veronese F M, Boccu R L E, Benassi C A *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 1985; **11**: 141
- Bradford M. Anal Biochem, 1976; **72**: 248
- Yang Z, Zeche D, Russell A J. J Am Chem Soc, 1993; **115**: 12251
- Gaertner H, Puigserver A. Eur J Biochem, 1989; **181**: 207

Effect of Polyethylene Glycol-Modification on Enzyme's Activity and Stability. Yang Zhen (Center for Biotechnology and Bioengineering, Department of Chemical Engineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA 15219, USA).

Abstract Methoxypolyethylene glycol (M_r 5000), activated by cyanuric chloride and nitrophenol carbonate respectively, was used to modify subtilisin Carlsberg. The enzyme after PEG-modification maintained its catalytic activity both in aqueous solution and in organic solvents, and an enhancement in activity and stability in aqueous solution was achieved; the k_{cat} increased accompanied with a lower activation energy, while K_m was not changed; the stability of the enzyme against both temperature and pH was greatly enhanced, but the optimal reaction temperature was unchanged. The pH dependence of the modified and unmodified subtilisin has also been compared.

Key words subtilisin, polyethylene glycol, enzyme activity, enzyme stability

亲和层析纯化肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶*

屠亚平 徐 红

(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 建立了一种亲和层析纯化肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶的方法。用非离子型去污剂 $C_{12}E_8$ 溶解肌质网, 再通过反应红-120琼脂糖亲和层析柱使肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶纯度从粗品中的 65% 提高到 99%, 并具有较