

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, Zecherl 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

高 ATP 水解活性. 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 为电泳纯.

关键词 肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶, 反应红-120 琼脂糖, 亲和层析

肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶是肌肉细胞肌质网膜上含量最多 (65%), 且分子量较大 (105 000) 的一种内嵌蛋白. 它通过水解 ATP 提供的能量将胞浆中的 Ca^{2+} 转运到肌质网中, 以维持细胞浆中 Ca^{2+} 离子的低浓度水平, 并参与肌细胞的收缩-舒张过程^[1]. 由于 Ca^{2+} -ATP 酶在 Ca^{2+} 调节中的重要作用, 人们对它进行了大量的研究. 但迄今为止, ATP 水解和 Ca^{2+} 转运的偶联机制仍无定论^[2]. 为深入研究 Ca^{2+} -ATP 酶的结构及功能的关系, 有必要对 Ca^{2+} -ATP 酶进行结晶以了解其三维结构. 而高纯度, 高活性并具有较好可溶性的 Ca^{2+} -ATP 酶样品是获得合适晶体的首要条件. 目前提纯 Ca^{2+} -ATP 酶的方法很多, 其基本原理是用各种去污剂溶解肌质网膜囊泡, 再通过梯度离心去分离纯化 Ca^{2+} -ATP 酶. 但这些方法一则耗时长, 二则所得产物或纯度不高, 或为沉淀形式, 很难溶解, 故都不适用于结晶. 反应红-120 琼脂糖 (reactive red-120 agrose) 亲和层析纯化 Ca^{2+} -ATP 酶是 80 年代中期兴起的一种新的纯化方法^[3,4]. 其原理是利用肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶与染料 reactive red 之间的亲和作用进行分离. 产物

纯度高, 但所用试剂价格昂贵. 我们在国外报导的方法基础上, 进行了一些改进, 并尽量用国产产品替代进口产品, 不仅缩短了时间而且大幅度降低了成本, 产物的纯度及活性也都与国外的方法相近, 很适合于晶体生长的要求.

1 材料与方法

1.1 材料

雄性大白兔一只, 由生物物理所动物房提供. C_{12}E_8 (辛乙烯-乙二醇-十二烷基醚) 由上海华东师范大学杨丽萍老师赠送. Reactive red-120 agrose, DDT, 1, 4-哌嗪-N, N' -双(乙磺酸) (PIPES), N-2-(羟乙基) 哌嗪-N' -(丙磺酸) (EPPS), 胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor), 苯甲脒 (benzamidine) 和 ATP 均为 Sigma 公司产品. 其余为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 肌质网的提取: 主要参考 MacLennan 等的方法^[5].

1.2.2 亲和层析纯化 Ca^{2+} -ATP 酶: 按 Coll 等^[3]的方法进行了较大的改进, 其基本步骤如图 1 流程所示.

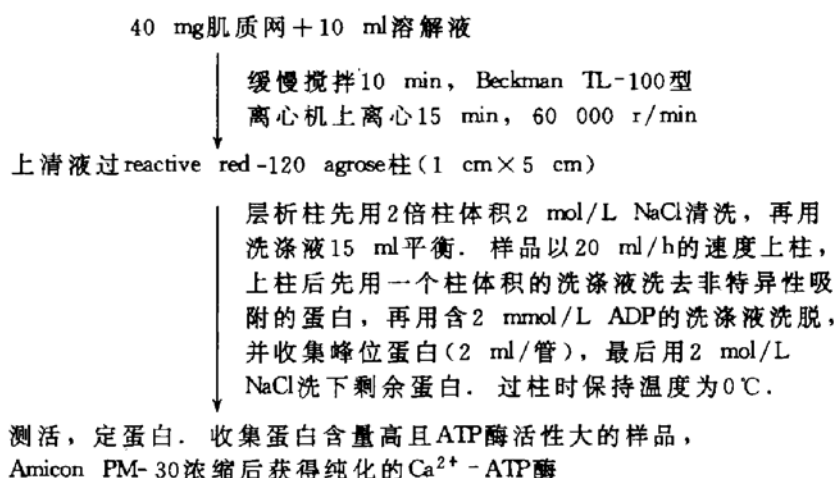


图 1 亲和层析纯化肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶的流程

溶解液: 100 g/L C_{12}E_8 , 8 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L PIPES (pH 7.0), 20% 甘油, 1 mmol/L DTT, 1 mg 胰蛋白酶抑制剂, 3 mg 苯甲脒. 洗涤液: 1 g/L C_{12}E_8 , 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 20 mmol/L EPPS (pH 8.0), 20% 甘油, 1 mmol/L DTT, 5 g/L 胰蛋白酶抑制剂, 0.15 g/L 苯甲脒.

1.2.3 肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶活性测定: 0.8 ml 反应液 (40 mmol/L PIPES, pH 7.2, 5 mmol/L MgSO_4 , 1.01 mmol/L EGTA) 中加入酶 100 μg , C_{12}E_8 4 g/L, CaCl_2 1 mmol/L, ATP 2 mmol/L, 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 0.4 mmol/L, 丙酮酸激酶 (PK) 10 U, 30℃ 反应 10 min 后加入 0.5% 钼酸铵 1 ml 中止反应, 再加入 10% SDS 50 μl , 10% 维生素 C 50 μl , 30℃ 反应 5 min 后用冰浴中止反应, 于 750 nm 测吸收值并与标准磷曲线对照算出 Ca^{2+} -ATP 酶 ATP 水解活性. 以测活液中不加 1 mmol/L Ca^{2+} 为空白对照.

1.2.4 电泳检测蛋白纯度: 采用不连续的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 5% 的浓缩胶, 7.5% 的分离胶.

2 结 果

图 2 为 Reactive red-120 agarose 亲和层析纯化兔肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶的层析图谱. 为保

量的 Ca^{2+} -ATP 酶, 而由 ADP 洗出的蛋白峰 II 具有较高的 ATP 水解活力, 峰 III 则基本无活力. 值得注意的是由于在将 Ca^{2+} -ATP 酶从肌质网上溶解下来时用了高浓度的 C_{12}E_8 (100 g/L), Ca^{2+} -ATP 酶周围的磷脂基本上被清除, 在测活时外加磷脂或去垢剂 C_{12}E_8 非常重要. 图 3 所示为纯化后的 Ca^{2+} -ATP 酶对 C_{12}E_8 的浓度依赖性. 可以看出当测活液中无 C_{12}E_8 时 Ca^{2+} -ATP 酶 (100 mg/L) 活力较低, 这可能是由于在洗脱 Ca^{2+} -ATP 酶时, 洗涤液中的 C_{12}E_8 浓度仅为 1 g/L, 不足以维持 Ca^{2+} -ATP 酶的最适构象. 因此随着测活液中 C_{12}E_8 浓度的增高, 酶分子结构趋向最适状态, 酶水解 ATP 的活力也逐步增大, 在 C_{12}E_8 : 酶的质量比为 20:1 时基本达到平衡. 故一般在测定 Ca^{2+} -ATP 酶活力时测活液中加 4 g/L 的 C_{12}E_8 . 同样, 若在测活液中加入磷脂也可得到与上述类似结果.

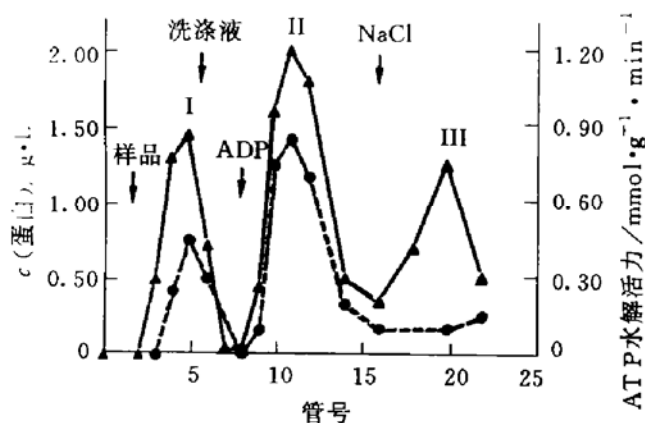


图 2 反应红-120 琼脂糖亲和层析图

—▲—, 蛋白浓度; —●—, Ca^{2+} -ATP 酶活力.

证 Ca^{2+} -ATP 酶能充分与亲和层析柱结合, 上柱的肌质网是过量的, 故有一部分未结合的 Ca^{2+} -ATP 酶夹杂在不能与层析柱相结合的蛋白中先流出来 (峰 I), 再通过 ADP 与 reactive red-120 竞争性的结合而将结合在柱上的 Ca^{2+} -ATP 酶洗下来 (峰 II), 最后用高浓度的盐 (2 mol/L NaCl) 将其他吸附在柱上的杂蛋白都洗下 (峰 III), 酶活测定结果表明峰 I 中含有少

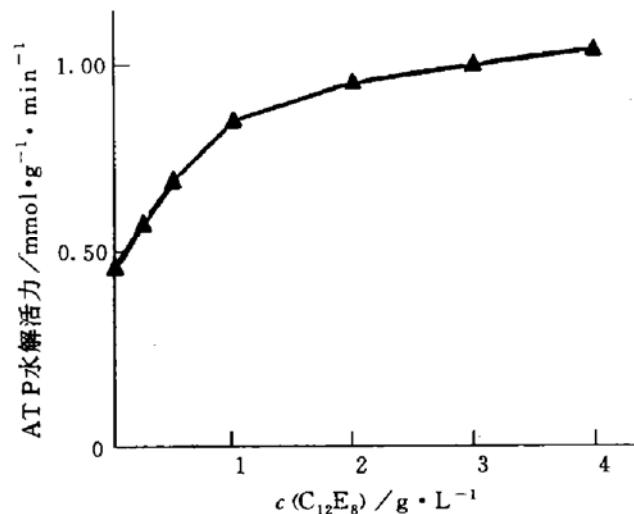


图 3 纯化的 Ca^{2+} -ATP 酶活力对 C_{12}E_8 的浓度依赖性

表 1 则为经 reactive red-120 agarose 层析

表 1 亲和层析后 Ca^{2+} -ATP 酶含量以及比活的变化

	总蛋白 /mg	Ca^{2+} -ATP 酶 /%	比活 /mmol · g ⁻¹ · min ⁻¹
肌质网	40	60	0.35
纯化后	10	99	0.90

后 Ca^{2+} -ATP 酶含量及比活的变化. 结果表明亲和层析后, 蛋白回收率为 25%, 而 Ca^{2+} -ATP 酶比活则提高了约 2 倍.

不连续的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 (图 4) 表明, 由 ATP 洗出的蛋白峰为均一成分的 Ca^{2+} -ATP 酶, 其含量超过 99%.

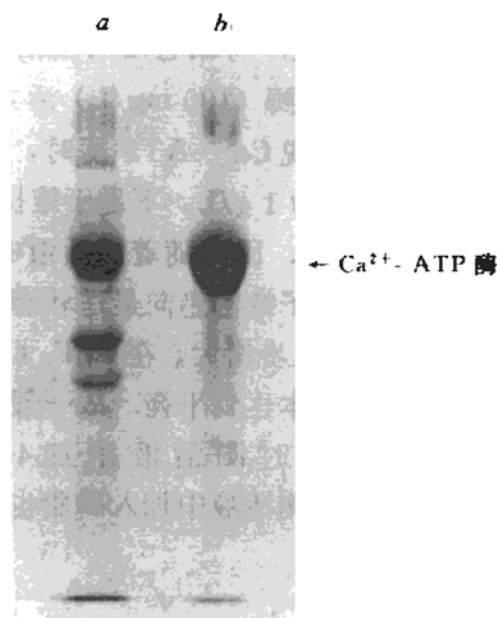


图 4 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

a: 肌质网蛋白组分; b: 纯化的 Ca^{2+} -ATP 酶.

3 讨 论

肌质网是肌肉细胞收缩舒张的主要调节者, 而执行这一功能的是肌质网上的 Ca^{2+} -ATP 酶. 要阐明肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶的调控机理, 最终还需获得高分辨率的三维蛋白晶体. 膜蛋白结晶生长的最大难题是选择合适去污剂替代膜蛋白周围的磷脂, 本文用中性去污剂 C_{12}E_8 部分取代了 Ca^{2+} -ATP 酶周围的磷脂, 这样不仅使 Ca^{2+} -ATP 酶具有可溶性, 而且保持了较高的 ATP 水解活性, 因此很适合蛋白晶体生长的要求. 值得注意的是纯化后的 Ca^{2+} -ATP 酶具有 C_{12}E_8 浓度依赖性. 这是由于纯化的 Ca^{2+} -ATP 酶周围磷脂基本上被清除, 而洗涤液中的 C_{12}E_8 浓度又不足于维持 Ca^{2+} -ATP 酶的最适构象, 因此外加一定浓度的 C_{12}E_8 对于

Ca^{2+} -ATP 酶呈现较适构象和表现较高活力是非常重要的. 这一点对在结晶过程中如何选择合适浓度的 C_{12}E_8 可能具有一定的意义. 此外与原文献报导的方法相比本文还在以下两个方面有所改进.

一是在分离纯化肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶时, 我们外加了胰蛋白酶抑制剂和苯甲脒. 这一点很重要, 若不加则纯化的 Ca^{2+} -ATP 酶在电泳图谱虽仍为一条带, 但分子量只有 60 000 左右, 且基本无活性. 这可能是由于粗品中残留的水解酶将 Ca^{2+} -ATP 酶水解掉了.

其次, 文献报导的方法中所用试剂价格昂贵, 不适用于大量制备 Ca^{2+} -ATP 酶. 我们在实验中尽量用国产产品替代进口产品, 用价格低廉的试剂替代昂贵试剂. 例如用上海华东师大提供的 C_{12}E_8 替代进口产品, 用价格较低的 ADP 替代价格昂贵的 AMP-PNP, 替代之后效果良好, 使这一方法可用于制备膜蛋白结晶所需的大量样品. 目前有关肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶结晶研究正在进行中.

参 考 文 献

- 1 de Meis L. In: Bittar E ed. Transport in the life science. New York; John Wiley and Sons, 1981; 12: 1
- 2 Yu X, Hao L, Inesi G. J Biol Chem, 1994; 269: 16656
- 3 Coll R J, Murphy A J. J Biol Chem, 1984; 259: 14249
- 4 Stokes D L, Green N M. Biophysical J, 1990; 57: 1
- 5 MacLennan D H. J Biol Chem, 1970; 245: 4508

Purification of Ca^{2+} -ATPase from Sarcoplasmic Reticulum by Affinity Gel Chromatography. Tu Yaping, Xu Hong (National Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China).

Abstract Ca^{2+} -ATPase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles was solubilized by nonionic detergent C_{12}E_8 and purified in a reactive red-120 agarose affinity column. Determined by 7.5% SDS-PAGE, the purity of Ca^{2+} -ATPase was increased from

65% to 99% and the purified Ca^{2+} -ATPase exhibited higher ATP hydrolysis activity.

Key words sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -

ATPase, reactive red-120 agrose, affinity gel filtration

北寄生凝集素的分离和性质研究

李格娥 刘 庆 袁小妹

(防化研究院, 北京 102205)

摘要 采用酸处理 Sepharose 6B 亲和层析和 Sephacryl S-200 凝胶过滤, 首次从中药北寄生中分得一种有毒凝集素, 称为北寄生凝集素 (*Viscum coloratum* lectin, VCL), 是一种高毒性的植物毒蛋白, 对小鼠静脉给药的 LD_{50} 为 $4.4 \mu\text{g}/\text{kg}$, 其粗提物 also 具有很强的毒性, 对小鼠腹腔给药的 LD_{50} 为 $0.2 \text{ g}/\text{kg}$, 分子量 52 000, 等电点 10.5.

关键词 北寄生, 槲寄生, 有毒凝集素

北寄生 (*Viscum coloratum*, Beijisheng) 是桑寄生科槲寄生属植物, 枝、叶、茎入药, 能祛风湿、补肝肾、强筋骨, 并有降压和抗肿瘤作用, 用于风湿脾痛、高血压和癌症等疾病的治疗.

1981年, Franz从欧洲槲寄生 (*V. album*) 中分得凝集素 (mistletoe lectin) I、II、III, 分子量分别为 115 ku、60 ku、50 ku, 它们的糖专一性不同^[1]. 1982年 Olsnes 从欧洲槲寄生分得一种有毒蛋白质槲寄生毒素 (viscumin), 分子量 60 ku, 其性质与蓖麻毒素相似^[2].

北寄生与桑寄生 (*Loranthus parascticus*) 是不同属植物, 所含成分不同, 但中医临床将两者混用, 均未见中毒报道. 我们从北寄生中分得一种高毒性凝集素 (*Viscum coloratum* lectin, VCL), 并对其性质进行了初步分析.

1 材料和方法

1.1 材料

北寄生生长在大果榆 (*Ulmus macrocarpa*) 树上, 由辽宁省中药研究所孙传奇同志协助采集. Serharose 6B、Sephacryl S-200 和 Pharma-

lyte 3~10, pharmacia 公司产品. 三羟甲基氨基甲烷、考马斯亮蓝 R250, Fluka 公司产品. 低分子量标准蛋白, 购自上海生化所东风生化试剂厂. 其它试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 分子量测定: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 按 Faibanks 等^[3]方法进行. 凝胶浓度为 6%.

1.2.2 等电点测定: 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳, 参照 Wrigley 方法^[4]进行. 蛋白质样品和两性电解质载体聚合于 7.5% 的凝胶中. 正极电泳液为 5% 磷酸, 负极电泳液为 5% 乙醇胺^[5], 恒压 160 V, 聚焦约 1.5 h, 电流接近零.

1.2.3 含糖量测定: 参照酚-硫酸法^[6]进行, 以甘露糖为其计算标准.

1.2.4 氨基酸组成分析: 由中国医学科学院北京药物研究所仪器分析室分析. 样品 ($0.65 \text{ g}/\text{L}$) 于玻璃封管中用 $6 \text{ mol}/\text{L}$ HCl 在 110°C 水解 24 h, 加样量 $10 \mu\text{l}$, 用日立 L-8500 型氨基酸自动分析仪进行分析.

1.2.5 毒性测定: 样品溶于生理盐水中, 将