

luridum. Monomerization mostly results in the disappearance of characteristic absorption peak 650nm, and in the changes in relative intensities and positions of Raman bands of phycocyanobilin chromophores. As a result, in the monomeric allophycocyanin, the chromophores adopt cyclohelical conformations, which close to these of free chromophores *in vitro*; and in the trimeric allophycocyanin, fully extended conformations of the chromophores can be marked by the main Raman peak around 1645 cm^{-1} , the behaviour of which is in good agreement with the $A_{\text{vis}}/A_{\text{uv}}$ absorption ratio.

Key words allophycocyanin, resonance Raman spectrum

破伤风毒素 B 片段在人工膜上形成单离子通道的特性

雷 殿 良

杉本央 松田守弘

(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

(大阪大学微生物病研究所,日本)

提 要

用高效蛋白层析柱纯化破伤风毒素的 B 片段,用膜片箝(patch clamp)技术证明纯化的 B 片段于人工磷脂膜上能够形成离子通道。在中性和酸性 pH 时形成离子通道的几率很小,在有 pH 梯度存在的情况下却较容易测到通道活性。形成的离子通道的电导系数为 2.3pS。B 片段形成的离子通道允许 K^+ 双向通过。离子通道打开的持续时间一般在 20—120ms 之间,多为 20—40ms 和 100—120ms; 闭合持续时间一般在 20—40ms 间,多为 20ms。表明通道的开和闭非常频繁。

关键词 破伤风毒素, B 片段, 单离子通道

近年来关于破伤风毒素的研究集中在毒素的作用原理,即毒素是如何进入靶细胞内和如何作用于靶细胞而抑制神经递质的释放。毒素的 BC 和 C 片段可以与受体结合,并可将毒素逆向转移到中枢神经系统^[1]。A 片段能够抑制牛 chromafin 细胞的儿茶酚胺的释放,表明 A 片段是毒素的活性片段^[2]。最近我们从毒素中分离出了 B 片段,并证明它可以形成离子通道^[3]。然而无论是毒素还是其片段均未发现有任何酶活性^[4]。尽管大部分人认为中枢神经系统是破伤风毒素的作用部位^[5],然而其分子水平的作用机制还有待进一步去研究。毒素可以在人工磷脂膜上形成离子通道^[3,6-9]。在酸性 pH 的情况下,可以增加毒素插入到磷脂膜中的几率^[6-9]。此结果与肉毒毒素和白喉毒素导入到细胞内的原理极为相似^[3]。

破伤风毒素是由 A, B, C 三部分组成的,

其片段 A, B, C 以及 AB 和 BC 均得到了分离纯化^[3,10]。本文应用膜片箝技术(patch clamp)于人工磷脂膜上测定 B 片段形成离子通道的活性,并对形成的单一离子通道进行了分析。

1 材料和方法

1.1 毒素及 AB 片段的纯化

按我们以前报道的方法制备纯化的毒素及 AB 片段^[10,11]。

1.2 B 片段的纯化

按前次报道的方法提纯 B 片段^[3,12]。将纯化的 AB 片段用 DTT 还原并用尿素处理,用高效蛋白层析系统(FPLC)的 Mono Q 柱,浓度梯度为 0—0.5mol/L 的 NaCl 洗脱制备 B 片段。

1.3 离子通道活性的测定

应用膜片箝技术测定 B 片段在人工磷脂膜

上形成离子通道的活性^[3]。大豆卵磷脂 (asolectin) 悬浮于 10mmol/L pH4.0 含 150mmol/L KCl 的醋酸钾缓冲液中, 大豆卵磷脂的浓度为 9mg/ml。等体积的磷脂悬液与 B 片段 (0.05mg/ml) 37°C 超声混合 2min。将 0.1ml 超声混合液加在 0.4ml 醋酸钾缓冲液中, 使其在液体表面形成脂单层。当吸起混合液并重新滴到液体表面时, 有液滴在液面上滚动则表明已形成了脂单层。装有 10mmol/L pH7.0 的 HEPES-KOH 缓冲液 (含有 150 mmol/L KCl) 的毛细管微电极 (patch pipet) 与电压调节器相联。按 Suarez-Isla 等描述的方法在毛细管顶端孔上制备脂双层^[4]。首先将毛细管插入已形成脂单层的液面中, 测定其电阻一般为 7—30MΩ。在毛细管内存有一定负压的情况下, 将毛细管慢慢提出液面, 在毛细管顶端形成了脂单层, 在毛细管内存有一定正压的情况下, 再次将毛细管插入已形成脂单层的液面中, 在毛细管的顶端孔上形成脂双层 (见图 1)。此时毛细管上脂双层的电阻一般为 1—30GΩ, 即毛细管微电极顶端孔的电阻增高了约 1000 倍左右。通过增高毛细管微电极的电位, 使一定的电流通过脂双层, 记录通过脂双层的电流。根

据电流的变化来测定是否有离子通道的形成。如果所记录到的电流图的轨迹成阶梯式增长或成矩形, 则表明有离子通道活性; 如果记录的电流轨迹为直线形, 则表示没有离子通道的活性。

1.4 离子通道的 pH 依赖性

在中性 (HEPES-KOH pH7.0) 和酸性 (醋酸-KOH pH4.0) 缓冲液系统中测定 B 片段形成离子通道的几率, 此时毛细管微电极内和磷脂悬液为同一缓冲液系统。将上述结果与在有 pH 梯度时的结果进行比较, 以测定形成的离子通道的 pH 依赖性。

2 结 果

2.1 破伤风毒素 B 片段的纯化

纯化的破伤风毒素为单一的蛋白质, 分子量为 15 万, 从木瓜蛋白酶裂解的毒素中制备 AB 片段, 其分子量为 98000。再经 DTT 还原和尿素处理, 用 FPLC 的 Mono Q 柱纯化 B 片段。纯化的 B 片段为 2 种形式, B₁ 和 B₂, 其分子量相同均为 48000, 然而等电点却不同, 分别为 7.3 和 6.7。在以下试验中我们分别测定了 B₁ 和 B₂ 片段的活性, 在活性上两者没有区别, 因此均标为 B 片段。

2.2 B 片段形成离子通道的 pH 依赖性

应用膜片箝技术测定 B 片段形成离子通道的活性。当磷脂膜两侧均为中性时 (pH7.0), B 片段形成离子通道的几率很小, 较难记录到离子通道的活性; 当膜两侧为酸性时 (pH4.0), B 片段形成离子通道的几率增大, 但也不太容易记录到形成的离子通道的活性; 当膜两侧存在 pH 梯度时 (毛细管内 pH7.0, 管外 pH4.0), 比较容易测到离子通道的活性。本实验中测试了 146 根毛细管电极, 有 19 根 (13%) 记录到了离子通道活性。在电流的记录中, 电流升高表示通道的打开, 电流降低则表示通道的闭合。

2.3 单离子通道活性的测定

图 2 是一例 B 片段形成的单离子通道及对该离子通道特性的分析。膜内电极的电位是 150mV (即箝制电压为 150mV)。上图是通过

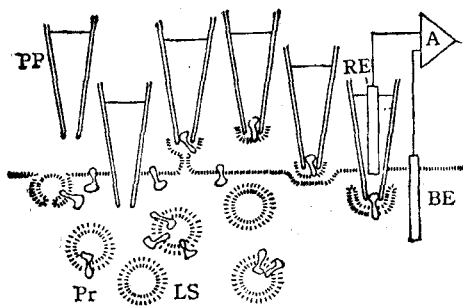


图 1 在毛细管微电极顶端制备脂双层的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of making lipid bilayer membrane of asolectin at the tip of patch pipette

PP: 毛细管微电极, Pr: 蛋白质, LS: 脂质体,
patch pipette, protein, liposome,
RE: 记录电极, BE: 参考电极,
record electrode, bath electrode,
A: 电流放大器
patch clamp amplifier

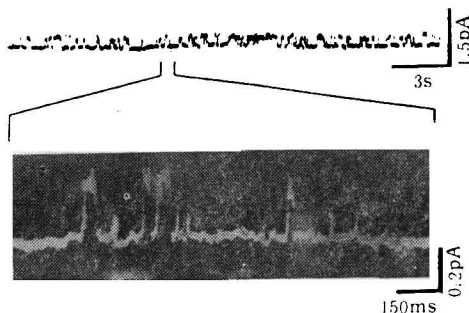


图 2 B 片段形成的离子通道的电流记录
Fig. 2 Record of the membrane current obtained from an asolectin bilayer with incorporated fragment B

毛细管微电极的电阻为 $15\text{M}\Omega$, 脂双层的电阻为 $12.5\text{G}\Omega$, 箝制电压为 150mV

The resistance of the patch pipette and the asolectin bilayer on the tip of the pipette were $15\text{M}\Omega$ and $12.5\text{G}\Omega$ respectively. Holding potential was 150mV

毛细管微电极上脂双层的电流记录, 下图为进一步放大的分析图。图 2 的电流记录的轨迹可见, 电流轨迹的升高和降低均成直角, 当电流突然地升高或降低时, 为离子通道的开和闭。B 片段形成此通道的电导系数为 $2.3 \pm 0.2\text{pS}$ 。

为了进一步分析离子通道活性与箝制电压的关系, 记录并分析了同一个单离子通道在不同箝制电压时的通道活性。图 3 是一个离子通道在不同电位差时活性记录。磷脂膜内微电极的电位从 $+150\text{mV}$ 变到 $+100\text{mV}$, $+50\text{mV}$, -50mV , -100mV (参考电极的电位为

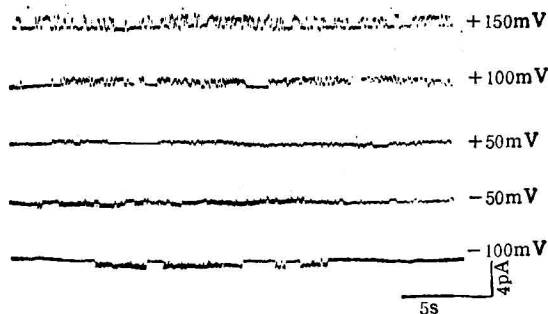


图 3 B 片段形成的离子通道在不同箝制电压时的电流记录
Fig. 3 Record of the membrane current of a single channel formed by fragment B at different holding potentials

微电极上脂双层的电阻为 $15\text{G}\Omega$
The resistance of the lipid bilayer was $15\text{G}\Omega$

0mV), 都可以记录到通道的活性。但在箝制电压为 $+50$ — -50mV 之间时未能记录到离子通道的活性, 可能是离子通道的电导系数太小, 通过脂双层的电流太低而不能记录显示所造成。

同时我们还分析了离子通道打开和闭合时

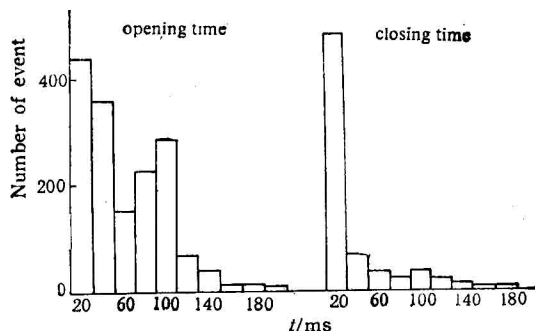


图 4 B 片段形成的单离子通道的打开和闭合持续时间的矩形图

Fig. 4 Histogram of opening-time and closing-time of the single channel formed by fragment B

横轴表示持续时间 (ms), 纵轴表示统计数
Abscissa gives the lasting time in millisecond.
Ordinate gives the number of event during recording

间的分布情况。图 4 给出了 B 片段在箝制电压为 150mV 时所形成的离子通道的打开和闭合时间的分布图。从图 4 中可知离子通道打开的持续时间一般在 20 — 120ms 之间。大多在 20 — 40ms 和 100 — 120ms 。在较低的箝制电压时, 有较长时间的打开; 有时可达 1 秒至数秒钟。从图 4 中可知 B 片段形成的离子通道闭合时间一般在 20 — 40ms , 大多集中在 20ms , 但

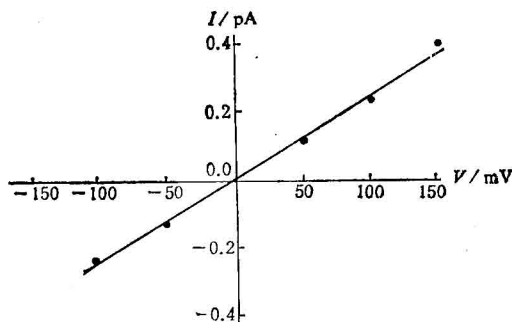


图 5 B 片段形成的离子通道的电流电压关系
Fig. 5 Current-voltage relationship of a fragment B channel obtained from a patch of lipid bilayer membrane

也有数秒甚至数分的闭合时间。由此可见 B 片段形成的离子通道的开和闭非常频繁。

B 片段形成的离子通道的电流与箝制电压之间的关系给出了。结果与图 3 为同一毛细管上的离子通道, 在不同箝制电压时分别统计约 50 个电流值。表明 B 片段形成的离子通道在不同箝制电压时的电导系数相同, 均为 $2.3 \pm 0.2 \text{ pS}$ 。通过离子通道打开时的电流与箝制电压成直线关系和在箝制电压为正或负时均成一条直线的结果表明 B 片段形成的离子通道允许钾离子双向通过, 即向毛细管内流和向毛细管外流。

3 讨 论

关于破伤风毒素及其片段 AB 和 BC 形成的离子通道已有叙述^[6-9, 11-13], 并对其离子通道的特性进行了分析。我们已报道了 B 片段可以于人工磷脂膜上形成离子通道^[3, 12]。但对于 B 片段形成的单离子通道特性的分析还未见报道, 本文分析了破伤风毒素 B 片段于人工磷脂膜上形成的离子通道, 并对单离子通道的特性进行了分析。膜片箝技术是一种研究和分析单离子通道较理想的方法, 因为在拉制的毛细管微电极顶端的孔径很小, 一般为 $0.2-1 \mu\text{m}$ ^[15], 在如此小的孔径上形成的脂双层比较容易获得单一的离子通道^[15]。

近年来形成离子通道的特性已被认为是毒素及蛋白质的一个生物学特性^[13]。离子通道的形成及特性得到了广泛的应用。离子通道的形成使胞内离子如 Ca^{2+} , K^{+} 或/和 Na^{+} 等通过离子通道而释放, 由于这些离子的释放及其刺激作用, 从而发挥了生物学功能。对于毒素而言, 一般认为当毒素与靶细胞的受体结合后, 通过形成的离子通道, 将其活性片段导入到靶细胞内, 在靶细胞内部发挥生物学功能。已知神经节苷脂是破伤风毒素的受体之一^[1], 在 BC 或 C 片段的作用下与之结合, 由于神经细胞的去极化作用, 而使毒素形成的离子通道被激活, 通过形成的离子通道或形成离子通道的这一过程, 将毒素或其活性片段导入到靶细胞内, 抑制神经递质的释放, 导致典型的破伤风临床症状。

对于这一假设尚需进一步加以证实。关于破伤风毒素的插入和导入尚未发现直接的证据, 而且毒素是如何抑制神经递质的释放, 是通过酶促作用(磷脂酶或蛋白激酶 C)还是其它非酶促功能还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Bizzini B, Grob P, Akert K. Papain-derived fragment IIc of tetanus toxin: its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport. *Brain Res*, 1981; 210: 291
- 2 Ahnert-Hilger G, Weller U, Dauzenroth M *et al.* The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis *FEBS Lett*, 1989; 242: 245
- 3 Matsuda M, Lei D L, Sigimoto N *et al.* Isolation, purification and characterization of fragment B, the N-terminal half of the heavy chain of tetanus toxin. *Infect Immun*, 1989; 57: 3588
- 4 Weller U, Dauzenroth M, Meyer D *et al.* Chains and fragments of tetanus toxin: Separation, reassociation and pharmacological properties. *Eur J Biochem*, 1989; 182: 649
- 5 Simpsom L L. Molecular pharmacology of botulinum and tetanus toxin. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1986; 26: 427
- 6 Gamble F, Montal M. Characterization of the channel properties of tetanus toxin in planar lipid bilayers. *Biophys J*, 1988; 53: 771
- 7 Boquet P, Duflot E. Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 7614
- 8 Hoch D H, Romero-Mira, Ehrlich *et al.* Channel formed by botulinum, tetanus and diphtheria toxin in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 1692
- 9 Borochov-Neori H, Yavin E, Montal M. Tetanus toxin forms channels in planar lipid bilayer containing gangliosides. *Biophys J*, 1984; 45: 83
- 10 雷殿良, 松田守弘. 破伤风毒素及其片段的纯化. 中国生物制品学杂志, 1990; 3: 53
- 11 雷殿良, 松田守弘. 破伤风毒素 AB 片段的纯化及其特性. 生物化学与生物物理学报, 1991; 23: 384
- 12 雷殿良, 松田守弘. 破伤风毒素 B 片段的纯化. 中华微生物学免疫学杂志, 1991; 11: 310
- 13 雷殿良, 松田守弘. 破伤风毒素的纯化及其形成离子通道的特性. 中国生物制品学杂志, 1990; 3: 148
- 14 Suarez-Isla B A, Wan K, Lindstrom J *et al.* Single channel recordings from purified acetylcholine receptors reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipets. *Biochemistry*, 1983; 22: 2319
- 15 Sakmann B, Neher E. Geometric parameters of pipettes and membrane patches. In: Sakmann B *et al.* eds, *Single channel recordings*. Plenum Press, 1984: 37

Characterization of Single ion Channels Formed by Fragment B of Tetanus Toxin in an Artificial Lipid Bilayer

Lei Dianliang

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing, 100050)

N. Sigimoto M. Matsuda

(Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan)

ABSTRACT

The ion channel formation of fragment B of tetanus toxin in an artificial lipid bilayer was described. Fragment B with a molecular weight of 48000 was purified by fast protein liquid chromatography. The channel activities were recorded from an asolectin bilayer membrane by patch clamp technique. It rarely formed ion channels at neutral or acidic pHs. In contrast, with pH gradient the channel activities of fragment B were easily recorded. By analysis of single channels formed by fragment B, the conductance of the channel was 2.3pS. At different holding potentials (-100 — $+150$ mV) the channels gave same conductance, it indicated that "the fragment B channel" passed K ion in both directions. The opening-time of the channel was maintained at 20—40 and 100—120ms, and the closing-time of it was main at 20ms. These results indicated that the channel of fragment B was rapidly flickering between the states of opening and closing.

Key words tetanus toxin, fragment B, single ion channel

鸭血清胆碱酯酶的纯化及性质研究

郭胜清* 曹树桂 程玉华

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

提 要

首次采用新技术双水相萃取方法作为鸭血清胆碱酯酶 (EC. 3.1.1.8 CHE) 纯化的第一步, 后经 DEAE-Sephadex A50, Sephadex G200 柱层析, 获得电泳纯鸭血清胆碱酯酶, 提纯倍数 1018 倍, 酶活力回收 43.4%, 比活 274.9U/mg。鸭血清胆碱酯酶性质研究表明: 此酶是糖蛋白和酸性蛋白水解酶, 等电点 4.2 左右, 最适 pH 7.5 左右; 对底物碘化硫代丁酰胆碱的 $K_m = 9.8 \times 10^{-5}$ mol/L; SDS-PAGE 电泳和聚丙烯酰胺梯度电泳表明, 鸭血清胆碱酯酶以相同亚基组成的不同聚合体形式存在, 亚基分子量 78000, 具有完整的酶活性。不同聚合体带电状态相同。

关键词 胆碱酯酶, 双水相萃取, 胆碱酯酶的分离纯化

* 现工作于总参防化研究院。

收稿日期: 1991-12-21 修回日期: 1992-03-16