

研究简报

GM3 掺入肌质网膜及其对 Ca^{2+} -ATP 酶的正向调节*

王丽华¹⁾ 杨小毅 屠亚平 崔肇春¹⁾

(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 用微量提取和高效薄板层析方法研究了外源性神经节苷脂 GM3 掺入兔肌质网膜的动力学过程. 将掺入量分别相对于掺入浓度、时间和温度作图, 显示掺入曲线均呈抛物线形式. 当掺入体系中 GM3 浓度为 $8\ \mu\text{mol/L}$ 、掺入时间为 90 min、掺入温度为 $35\ ^\circ\text{C}$ 时, 其掺入量达到最大值, 约为掺入体系中 GM3 量的 50%. 上述结果表明外源性 GM3 对肌质网膜的作用不仅仅是一种简单的水相反应, 而是一个依赖于掺入浓度、时间和温度, 并具有一定的饱和度的掺入到肌质网膜脂双层中的动力学过程. 进一步的实验表明外源性 GM3 的掺入能明显增加肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶的活力. 这为从分子水平上研究糖脂对细胞内膜系统的结构与功能的调节作用提供了重要的基础.

关键词 神经节苷脂 GM3, Ca^{2+} -ATP 酶, 肌质网膜, 掺入

外源性神经节苷脂 (ganglioside, Gls) 掺入膜脂技术是研究 Gls 对膜蛋白的结构与功能影响的重要手段. 但文献上所报道的观察外源性 Gls 掺入对质膜蛋白功能影响的经典方法^[1,2], 通常只是以反应体系中外加 Gls 的工作浓度作为其剂量标准, 而在这种反应体系中的外源性 Gls 究竟以多大的实际浓度掺入、以何种方式发挥作用? 并且 Gls 能否象掺入质膜一样掺入肌质网膜脂? 目前均不清楚. 因此精确地了解外源性 Gls 掺入到膜脂中的比例、数量和动力学过程是阐明膜糖脂成分对膜蛋白功能影响的分子作用机制的重要前提.

本文通过 Gls 的微量提取及高效薄板层析方法, 研究外源性 GM3 掺入兔肌质网膜的动力学过程及温度、时间等因素对掺入量的影响, 并研究了外源性 Gls 掺入 SR 膜脂对膜蛋白 Ca^{2+} -ATP 酶活力的调节作用. 为从分子水平上研究膜糖脂对亚细胞器膜蛋白结构与功能的调节作用提供了重要的方法学参数.

1 材料与方法

1.1 材料

掺入用 GM3 系本实验室参照文献 [3] 从狗红细胞膜提取, 为薄板层析纯; GM3 标准品、标准唾液酸、硫代巴比妥酸和间苯二酚均购自 Sigma 公司; Sep-Pak C18 反相层析柱为美国 Waters Associates 产品; 高效薄层层析 (HPTLC) 板为 Merck 公司产品.

1.2 肌质网囊泡 (SR) 的分离

按 MacLennan^[4] 的方法从大白兔后腿肌肉中提取, 制得的肌质网囊泡悬浮在缓冲液 A ($0.25\ \text{mol/L}$ 蔗糖、 $10\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl, pH 7.4) 中, $-25\ ^\circ\text{C}$ 保存, 蛋白质测定按常规 Lowry 法.

* 生物大分子国家重点实验室基金资助课题.
¹⁾ 大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027.
收稿日期: 1996-10-08, 修回日期: 1996-12-31

1.3 肌质网中 GIs 的提取与纯化

将掺入 GM3 前、后的 SR 分别在 78 000 $\times$ g 离心 30 min, 去除含游离 GM3 的上清, SR 沉淀再用缓冲液 A 洗涤, 每次洗涤的上清和沉淀分别按参考文献 [5] 提取纯化 GIs.

1.4 GM3 掺入前后兔 SR 中 GM3 含量的测定

将纯化的 GIs 样品用 HPTLC 进行鉴定, 展开剂为氯仿-甲醇-0.25% CaCl_2 (60: 40: 9, 体积比) 混合液, 喷雾显色, 显色液为间苯二酚 (resorcinol) -HCl 试剂, 含 10 ml 2% 间苯二酚, 80 ml 浓盐酸, 0.25 ml 0.1 mol/L CuSO_4 .

用 CAMAG 双波长扫描仪对 GIs 的 HPTLC 图谱进行扫描, 扫描波长 550 nm, 积分求出各组分的相对百分含量.

根据 HPTLC 图谱中标准 GM3 的点样量、样品与标准 GM3 条带的扫描面积比值, 求出不同条件下 GM3 掺入 SR 的含量.

1.5 GIs 中脂结合唾液酸含量的测定

由于 GIs 中的唾液酸 (LBSA) 含量是固定的, 因此可以表示 GIs 的总量. 采用改良 Aminoff 法^[6], 利用过碘酸盐及硫代巴比妥测定 GIs 中 LBSA 的含量.

1.6 Ca^{2+} -ATP 酶活力的测定

按参考文献 [8] 的方法测定 GM3 掺入前后 Ca^{2+} -ATP 酶水解和转运活力.

2 结果和讨论

2.1 GM3 掺入肌质网 GIs 的 HPTLC 图谱

将所提 SR 用缓冲液 A 稀释至蛋白浓度为 1 g/L, 在不同条件下掺入 GM3 的 SR, 用缓冲液 A 多次洗涤, 每一步离心后的沉淀和上清分别测 LBSA. 结果观察到, 本实验条件下, 洗涤三次以后, 上清中已测不到 LBSA, 而 SR 沉淀中的 LBSA 量趋于稳定的水平, 提示此时体系中游离的 GM3 已被离心去除, 所测到的 GM3 实际上反映的是已掺入 SR 膜脂中的 GM3 量.

SR 在 10 $\mu\text{mol/L}$ GM3 的缓冲体系中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 分别保温 0、30、60、90、120 min 其

所含 GIs 组分的 HPTLC 图谱见图 1. 结果表明, 与 GM3 保温后, SR 中的 GM3 含量明显增多, 且随保温时间的延长, GM3 掺入量逐渐增加, 保温时间为 30 min 时, 增多尚不明显, 到 90 min 时达到最大值. 说明兔肌 SR 本身含有少量的 GM3, 外源性的 GM3 也能够掺入, 且与掺入时间成正比关系, 但有一定的饱和度.

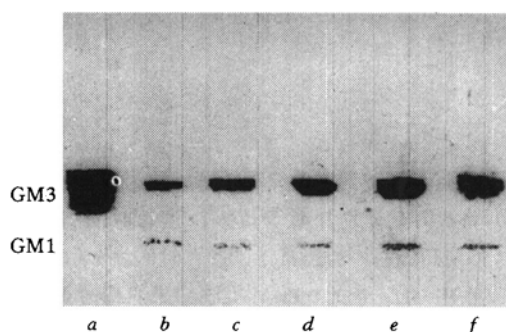


图 1 不同保温时间对神经节苷脂掺入肌质网膜的影响

a: 标准 GM3 (100 nmol); b: 0 min; c: 30 min; d: 60 min; e: 90 min; f: 120 min.

进一步将 SR 与 0、2、4、8、10、16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 GM3 在 30 $^{\circ}\text{C}$, 保温 60 min 后取出分析 GM3 的掺入量, 其 HPTLC 图谱见图 2. 可见 SR 中 GM3 的掺入量随介质中

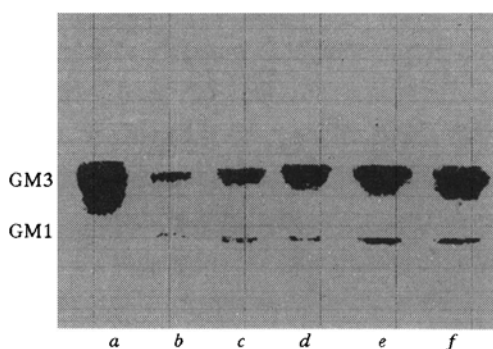


图 2 不同 GM3 浓度对神经节苷脂掺入肌质网膜的影响

a: 标准 GM3 (100 nmol); b: 0 $\mu\text{mol/L}$; c: 2 $\mu\text{mol/L}$; d: 4 $\mu\text{mol/L}$; e: 8 $\mu\text{mol/L}$; f: 16 $\mu\text{mol/L}$.

GM3 的浓度的增大而增多, GM3 为 8 $\mu\text{mol/L}$ 时, 掺入量已达平台, 继续增加 GM3 的浓度, 掺入量不再增加.

兔肌 SR 与 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 GM3, 分别在 0℃、15℃、30℃、35℃、45℃ 水浴中, 保温 60 min 后, 其 Gls 组分变化的结果显示, 随着温度的升高, SR 中的 GM3 掺入量逐渐增多, 在 35℃ 时, GM3 的掺入量最大 (图 3). 这说明 GM3 的掺入与掺入温度也有关系.

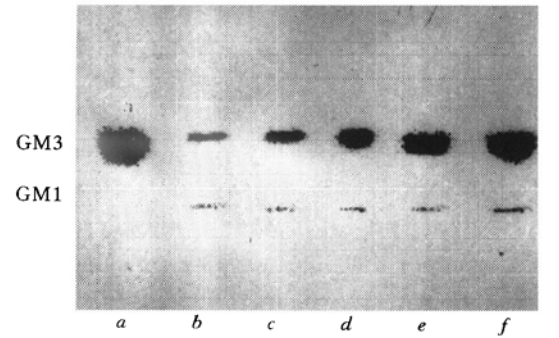


图 3 不同保温温度对神经节苷脂掺入肌质网膜的影响
a: 标准 GM3 (100 nmol); b: 0℃; c: 15℃; d: 30℃; e: 35℃; f: 40℃.

将 GM3 在不同条件下对 SR 的掺入量分别相对于掺入时间、浓度和温度作图 (图略), 曲线均呈抛物线, 开始掺入量随掺入浓度的增加、掺入温度的升高和时间的延长而增加, 几乎成正比线性关系, 当掺入浓度为 8 $\mu\text{mol/L}$, 掺入时间为 90 min, 掺入温度为 35℃ 时, 其掺入量达到最大值. 由此看出, 外源性 GM3 对肌浆网膜的掺入是有一定的饱和度的动力学过程.

2.2 GM3 对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响

为了解外源性 GM3 掺入肌质网膜后对肌质网膜蛋白功能的影响, 我们测定了 GM3 在最适掺入条件下 (即掺入浓度为 8 $\mu\text{mol/L}$, 掺入时间为 90 min, 掺入温度为 35℃) 对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶水解和 Ca^{2+} 转运活力的影响, 由表 1 可见外源性的 GM3 掺入肌质网膜后能明显增加肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶的活力.

表 1 外源性 GM3 掺入对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响			
	对照	加 GM3	增加百分率/%
ATP 水解活力/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	0.42±0.05	1.11±0.01	162
Ca^{2+} 转运活力/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	0.45±0.07	1.22±0.02	171

注: Ca^{2+} 转运初速度; $n=4$, $x\pm s$.

综上所述, 用 Gls 微量提取法对外源性 GM3 掺入肌质网膜后的 Gls 含量和组成进行分析, 并将其在不同的 GM3 掺入浓度和不同的掺入时间、温度下, 外源性 GM3 掺入肌质网膜中的含量作比较, 结果发现, 外源性的 GM3 不仅能够掺入到肌质网膜中, 并且其掺入量也依赖于掺入体系中外源 GM3 的浓度, 与掺入时的温度和掺入时间也有关系. 这说明外源性 GM3 掺入肌质网膜不是一种简单的“全或无”过程, 而是一个依赖于掺入时间、浓度和温度的动力学过程. 并且外源性 GM3 掺入对肌质网膜蛋白 Ca^{2+} -ATP 酶具有明显正向调节作用.

Dyatlovitskaya^[7]曾指出, Gls 本身在整个膜脂中虽然含量很低, 但可以因为聚集 (cluster together) 作用使局部浓度很高, 在质膜外层中约占膜脂 30%~60%. 因此这种膜脂微量组分调节膜蛋白功能的特殊方式, 是非常符合生理调节进化规律的, 这可能也是微量存在的 Gls 及其代谢产物 (如 ceramide) 发挥其强有力的信息传递作用的调节方式之一. 因此有理由认为, 本实验所阐明的外源性 Gls 掺入 SR 膜脂的动力学变化规律, 不仅为从分子水平上研究膜糖脂对亚细胞器膜蛋白结构与功能的调节作用提供了重要的方法学参数; 而且对采用外源性 Gls 掺入膜脂的方法, 研究糖脂对细胞功能活动和其他非肌质网膜蛋白生物学作用的影响也具有较大的参考价值.

参 考 文 献

1 Ranwel C. Activation of deoxycholate solubilized adenosine

- triphosphatase by ganglioside and asialoganglioside preparation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, **74** (3): 1046
- 2 Leon A, Faci L. Activation of Na^+ , K^+ -ATPase by nanomolar concentration of GM1 % ganglioside. *J Neurochem*, 1981, **37**: 350
 - 3 崔肇春, 张新波, 汤乃梅. GM3 对人单核样白血病 J6-2 细胞中磷脂代谢的影响. *生物化学杂志*, 1992, **8** (6): 724~ 729
 - 4 Tu Y P, Yang F Y. Transmembrane Ca^{2+} gradient-mediated modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **196** (2): 561~ 568
 - 5 张新波, 汤乃梅. 一种微量神经节苷脂纯化法. *生物化学与生物物理学报*, 1993, **25** (2): 187~ 190
 - 6 Aminoff D. The determination of free sialic acid in the presence of the bound compound. *Biochem J*, 1971, **246**: 430~ 435
 - 7 Dyatlovitskaya E V, Bergelson L D. Glicosphingolipids and antitumor mmunity. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **907**: 125~ 143
 - 8 王丽华, 屠亚平, 崔肇春等. 神经节苷脂 GM3 对肌质网 Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响. *生物化学杂志*, 1996, **6**: 308~ 312

Incorporation of GM3 into the Lipid Bilayer of Sarcoplasmic Reticulum and Its Regulation on Ca^{2+} -ATPase. WANG Lihua¹⁾, YANG Xiaoyi, TU Yaping, CUI Zhaochun¹⁾ (*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences,*

Beijing 100101, China); (¹⁾ *Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116027, China*).

Abstract The kinetic study of the incorporation of exogenous ganglioside GM3 into the lipid bilayer of rabbit sarcoplasmic reticulum (SR) was carried out by trace extraction of GIs and high performance TLC. The results showed that the amount of incorporation is related to GM3 concentration, incubation temperature and time. The optimum incorporation was observed when 8 $\mu\text{mol/L}$ GM3 was incubated with SR vesicles for 90 min at 35 °C. The obtained results suggested that the effect of exogenous ganglioside GM3 on SR membrane is not only a simple aqueous phase reaction, but also a kinetic course of the incorporation into the lipid bilayer of SR. Furthermore, the incorporation of GM3 can markedly increase the activity of SR Ca^{2+} -ATPase. This provides basic experimental data to study the role of gangliosides in intracellular membranes.

Key words ganglioside GM3, Ca^{2+} -ATPase, sarcoplasmic reticulum membrane, incorporation

(上接第 276 页, Continued from page 276)

- 4 Marion D, Wüthrich K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, **113** (3): 967~ 974
- 5 Messerle B A, Wide G, Otting G *et al.* Solvent suppression using a spin lock in 2D and 3D NMR spectroscopy with H_2O solutions. *J Magn Reson*, 1989, **85**: 608~ 613
- 6 Shaka A J, Barker P B, Freeman R. Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J Magn Reson*, 1985, **64**: 547~ 552
- 7 Rucker S P, Shaka A J. Broadband homonuclear cross polarization in 2D NMR using DIPSI-2. *Molecular Physics*, 1989, **68** (2): 509~ 517
- 8 Fairbrother W J. Polypeptide backbone resonance assignments and secondary structure of bacillus subtilis enzyme III^{gk} determined by two-dimensional and 3D heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 1991, **30**: 6896~ 6907

2D NMR Experiments of ^{15}N -Labeled Protein GAL4 (62). TU Guangzhong, ZHANG

Riqing, ZHAO Nanming (*Biomembrane and Biomembrane Engineering National Laboratory, Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*).

Abstract Using the pulse microprogram edited 2D ^1H - ^{15}N HSQC, HSQC-NOESY, HSQC-TOCSY spectra of the ^{15}N -labeled protein GAL4 (62) were obtained, while solvent suppression was achieved by presaturation during the relaxation delay and by the use of spin-lock purge pulses. The important role of those 2D experiments in ^1H assignments of ^{15}N -labeled proteins was discussed.

Key words heteronuclear decoupling, HSQC, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY