

牛小脑肌醇磷脂激酶 PI (4) K 高产率纯化与特征*

乐加昌 盖丽云

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家实验室, 北京 100101)

摘要 对牛小脑膜区肌醇磷脂激酶进行了 11 500 倍纯化, 过程包括: TritonX-100 抽提, 硫酸铵沉淀, 阳离子交换层析 (phosphocellulose), 亲和层析 (Heparin Sepharose CL-6B) 和阴离子交换层析 (DEAE10, FPLC) 等. 纯化程度可达 95% 以上, 对 SDS-PAGE 电泳结果进行扫描分析测其分子质量为 56 ku. 纯化的肌醇磷脂激酶的特异性活性为 450 nmol/mg·min, 动力学性质表现为 ATP 的表现 K_m 值为 7.9×10^{-7} mol/L, PI 的表现 K_m 值为 6.6×10^{-7} mol/L. 腺嘌呤核苷是该酶的有效抑制剂, 3.5×10^{-7} mol/L 腺嘌呤核苷可使该酶活力降低约 50%, 而 TritonX-100 对该酶活力具有刺激作用, 0.5% TritonX-100 可使该酶表现为最高活力.

关键词 信号传导, 牛小脑, 肌醇磷脂激酶, 纯化方法

学科分类号 Q735

肌醇磷脂激酶 (phosphatidylinositol (4) kinase, E. C. 2. 7. 1. 67) 在肌醇磷脂循环过程中起着关键作用. 当细胞受刺激后激活 PI (4) K, 使肌醇磷脂在肌醇环的 4 位上磷酸化产生 PIP, 并且在 PIP 激酶的作用下进一步合成 PIP₂. 然后在 PLC 作用下将 PIP₂ 分解成 IP₃ 和 DAG, 从而激活了细胞内双信使系统即由 IP₃ 释放内质网中的钙库产生第二信使作用; 而 DAG 激活 PKC 产生一系列信号传导^[1].

现已发现 PI (4) K 在多种哺乳动物组织中广泛分布包括: 脑, 肝, 肺, 血浆以及酵母和植物体等. 该酶在细胞中主要分布在质膜、溶酶体、高尔基体、囊泡、线粒体膜和核区. 目前虽然从多种组织中得到 PI (4) K 纯化研究报告, 然而报道的方法仅仅是允许纯化少量的 PI (4) K (小于 70 μg). 因此有关该酶的催化机理及酶活性与功能的研究受到限制. 为此, 改进 PI (4) K 纯化方法对于该酶的催化机理研究具有十分重要的意义^[2,3]. 本文采用了一种新的纯化路线可以从牛小脑皮层中得到高产率 (1 mg 以上) PI (4) K, 并对该酶的催化基本特征进行了初步的研究.

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜的牛小脑取自屠宰场, [γ -³²P] ATP (7.4×10^{13} Bq/mol) 购自北京市亚辉生物医学工程公司, 腺嘌呤核苷 (Adenosine) 和 PI 为 Sigma 产品, ATP 为 SERVA 产品, PMSF 和 TLC 硅胶板为 Merck 产品, SDS-PAGE 试剂和分子质量标准

来自 BIO-RAD, Phosphocellulose (P-11) 为 Whatman 公司产品; Heparin Sepharose CL-6B 为 Pharmacia 产品, DEAE-10, FPLC 柱来源于 BIO-RAD. 其他均为国产分析纯产品.

1.2 肌醇磷脂激酶活力的测定

按文献 [4] 方法并作修改. 将酶样品 10~15 μl 与酶测活缓冲液 (20 mmol/L Tris·HCl, 10 mmol/L DTT, 50 μmol/L ATP, 0.5% TritonX-100) 25 μl 及 0.2 g/L PI 于 0~4℃ 混匀, 然后加入 [γ -³²P] ATP (7.4×10^4 Bq) 及 10 mmol/L MgCl₂ 并开始启动反应, 最后总反应体积为 50 μl, 20 min 后反应用 0.4 ml 1 mol/L HCl 终止反应, 加 0.6 ml 氯仿: 甲醇 (2:1), 充分振荡 20 s, 离心 (6 000 r/min, 2 min) 后吸去上相, 下相加 0.4 ml 甲醇: 盐酸 (1:1) 洗二次, 同样离心后吸去上相, 下相待自然干燥后用氯仿溶解以 TLC 方法分离产品 PIP 并且在液体闪烁仪上进行契伦科夫方法计数. 所有样品均设平行样, 一个酶活力单位为在 30℃ 条件下每毫克蛋白质每分钟催化形成 1 nmol PI (4) P.

1.3 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度按 Lowry 方法^[5]测定, 以 BSA 做标准蛋白绘制标准曲线.

1.4 肌醇磷脂激酶的纯化过程

本实验所有操作均在 0~4℃ 进行.

1.4.1 匀浆: 新鲜的牛小脑皮层大约 300 g, 将按

* 国家自然科学基金 (39730130) 和中国科学院 (951-81-609) 资助项目.

收稿日期: 1998-08-10, 修回日期: 1998-12-11

1: 4 (质量体积比) 匀浆, 匀浆液为缓冲液 A (25 mmol/L Tris · HCl, 2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L β-巯基乙醇, 10% 蔗糖 pH 7.4) 匀浆时间为 2 min; 将匀浆液离心 23 000 g × 30 min, 然后再用同样缓冲液及离心条件洗 2 次, 取沉淀。

1.4.2 盐析: 用缓冲液 B (25 mmol/L Tris·HCl, 2 mmol/L EDTA, 1 mol/L KCl, 0.1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L β-巯基乙醇 pH 7.4) 按 1: 1 (体积比) 溶解, 并搅拌 1 h, 然后 100 000 g × 30 min, 取沉淀为膜初提物。

1.4.3 提取膜蛋白: 用缓冲液 C (50 mmol/L Tris · HCl, 4% TritonX-100, 150 mmol/L KCl, 2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF, 4 mmol/L β-巯基乙醇 pH 7.4) 按 1: 1 (体积比) 溶解膜初提物; 并搅拌 1 h 后离心 100 000 g × 30 min, 取 TritonX-100 抽提上清作为膜提取物。

1.4.4 硫酸铵沉淀与透析: 用 40% (NH₄)₂SO₄ 饱和度沉淀并搅拌 1 h 后离心 10 000 g × 30 min, 用缓冲液 D (10 mmol/L 磷酸缓冲液, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1% TritonX-100, 0.1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L β-巯基乙醇 pH 7.4) 溶解并透析 24 h, 中间换液两次后作为上样品。

1.4.5 阳离子交换层析 (P-11): 预先用平衡液 (同缓冲液 D) 将阳离子交换柱 (5 cm × 20 cm) 平衡至 pH 7.4, 然后准备上样, 接下来用 0~0.4 mol/L NaCl 300 ml 进行梯度洗脱, 流速为 1.5 ml/min, 最后用 0.4 mol/L NaCl 洗脱直至将所有蛋白质全部洗下为止, 收集具有活性的样品。

1.4.6 亲和层析 (Heparin Sepharose CL-6B): 收集阳离子交换层析 (P-11) 洗脱峰, 透析 (透析液为缓冲液 D) 除盐后进行亲和层析 (2.5 cm × 10 cm Heparin Sepharose CL-6B), 预先用含 0.05% TritonX-100 的缓冲液 D 平衡, 上样后, 同样缓冲液洗 5 倍柱体积以除去部分杂蛋白, 然后用 0~

0.6 mol/L NaCl 100 ml 进行梯度洗脱, 最后用 0.6 mol/L NaCl 将所有蛋白质全部洗下, 流速为 1 ml/min, 同样根据洗脱峰取样品。

1.4.7 阴离子交换柱 (DEAE-10, FPLC): 收集亲和层析 (Heparin Sepharose CL-6B) 洗脱具有 PI (4) K 蛋白激酶活性峰的样品, 透析去盐后过阴离子交换柱 (DEAE-10, FPLC), 平衡及洗脱缓冲液同上, 上样后用 0~0.3 mol/L NaCl 100 ml 进行梯度洗脱, 流速为 1 ml/min, 再根据洗脱峰取样, 最后可得到纯度达到 95% 以上的肌醇磷脂激酶。

1.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE 按 Laemmli 方法^[6], 用 4% 浓缩胶和 12% 分离胶于 200 V 条件下进行电泳, 然后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

2 实验结果

2.1 纯化结果

PI (4) K 是膜内周蛋白, 需要去污剂进行溶解, 本研究用含 4% Triton X-100 的缓冲液几乎可以使磷脂酰肌醇激酶全部从牛小脑的细胞膜上溶解下来, 通过高速离心, 硫酸铵沉淀及层析技术使该酶逐步得到纯化. 研究表明, PI (4) K 与阳离子交换层析柱 (phosphocellulose, 图 1a) 具有高度的亲和能力通过该层析柱样品被纯化大约 300 倍; 样品进一步用亲和层析柱 (Heparin Sepharose CL-6B, 图 1b) 总活力减少很大, 蛋白质损失大约 90%, 但是比活力和纯度大大增加纯化倍数大约 1 500 倍. 最后经过阴离子交换层析 (DEAE-10) 收集具有酶活力的洗脱峰是在 0.2~0.3 mol/L NaCl 之间 (图 1c), 经 SDS-PAGE 对该酶纯度进行鉴定, 纯化程度达 95% 以上 (图 1d), SDS-PAGE 分析其分子质量为 56 ku. 纯化倍数为 11 500 倍, 产率为 18%, 特异活性为 450 nmol/mg·min. 纯化过程总结在表 1.

表 1 牛小脑中纯化 PI (4) K 过程总结

| | 蛋白质/mg | 特异活力 / nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹ | 总活力 / nmol·min ⁻¹ | 纯化倍数 | 产率/% |
|--|--------|--|---------------------------------|--------|------|
| 匀浆液 | 62 500 | 0.039 | 2 438 | 1 | 100 |
| Triton X-100 | 3 788 | 0.51 | 1 932 | 13 | 79 |
| 40% (NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 | 418 | 3.90 | 1 630 | 50 | 67 |
| Phosphocellulose | 108 | 14.20 | 1 534 | 182 | 63 |
| Heparin Sepharose CL-6B | 12 | 72.00 | 864 | 1 846 | 35 |
| DEAE10 (HPLC) | 1 | 450.00 | 450 | 11 538 | 18 |

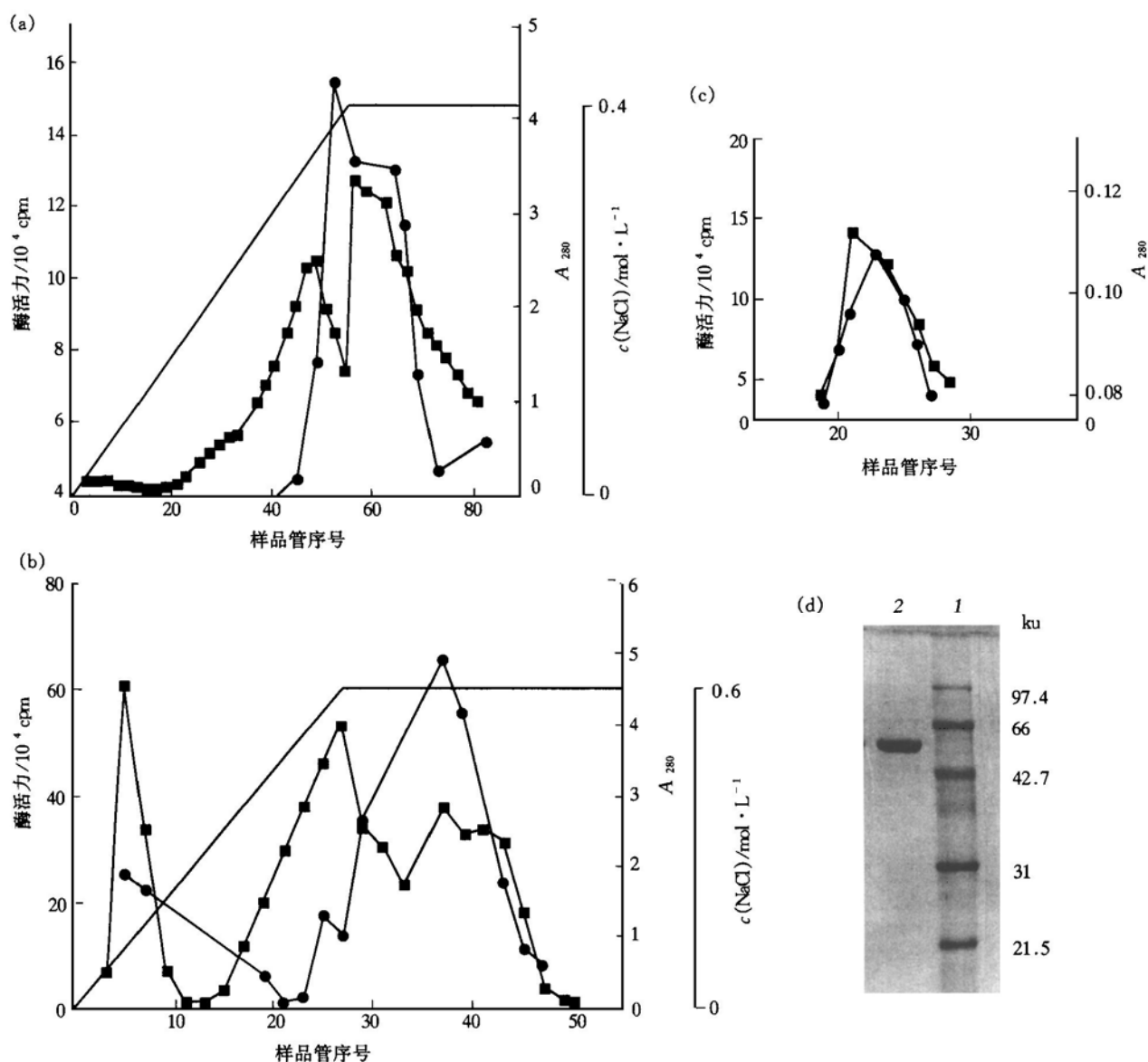


图1 PI(4)K的纯化

(a) Phosphocellulose (P11) 纯化 PI(4)K 流程图。100 ml 样品上到 P11 柱 (5 cm × 20 cm), 然后用 300 ml 梯差缓冲液 (150 ml 20 mmol/L 磷酸缓冲液, 0 mol/L NaCl pH 7.4 和 0.4 mol/L NaCl) 以 1 ml/min 的流速将样品收集到 5 ml 样品管中, 将有活力的部分作 Heparin Sepharose CF-6B 柱层析。(b) PI(4)K 亲和层析 (Heparin Sepharose CF-6B) 流程图。将 P11 层析中具有活力部分经透析后上样到 Heparin Sepharose CF-6B 柱 (2.5 cm × 10 cm), 然后用梯差缓冲液, 以 1 ml/min 的速度收集样品, 样品以 3 ml 收集管收集并将有活力的部分作为 FPLC 进一步纯化。(c) FPLC (DEAE10) 纯化 PI(4)K 流程图。(d) PI(4)K 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。1: 标准分子质量; 2: 纯化的 PI(4)K。●—●: cpm 值; ■—■: A₂₈₀ 值。

2.2 酶学特征

2.2.1 催化参数: 该酶在标准测定条件下并通过 Lineweaver-Burk 作图可测得其 PI 和 ATP 的表现 K_m 值分别为 6.6×10^{-7} mol/L 和 7.9×10^{-7} mol/L (图 2a, 图 2b)。

2.2.2 Adenosine 和 TritonX-100 作用: 图 3 为 adenosine 的作用对于酶活力的影响。从图 3 可以

看到大约 4×10^{-7} mol/L Adenosine 则使该酶活性受到抑制酶活力降低 50%。另外, 测定系统中去污剂的浓度对该酶活力也有明显影响, 当 Triton X-100 浓度为 0%~0.5% 范围增加时酶活力随去污剂浓度增加而上升, 当去污剂的浓度为 0.5% 时最高, 进一步增加去污剂的浓度酶的活力下降, 实验结果见图 4。

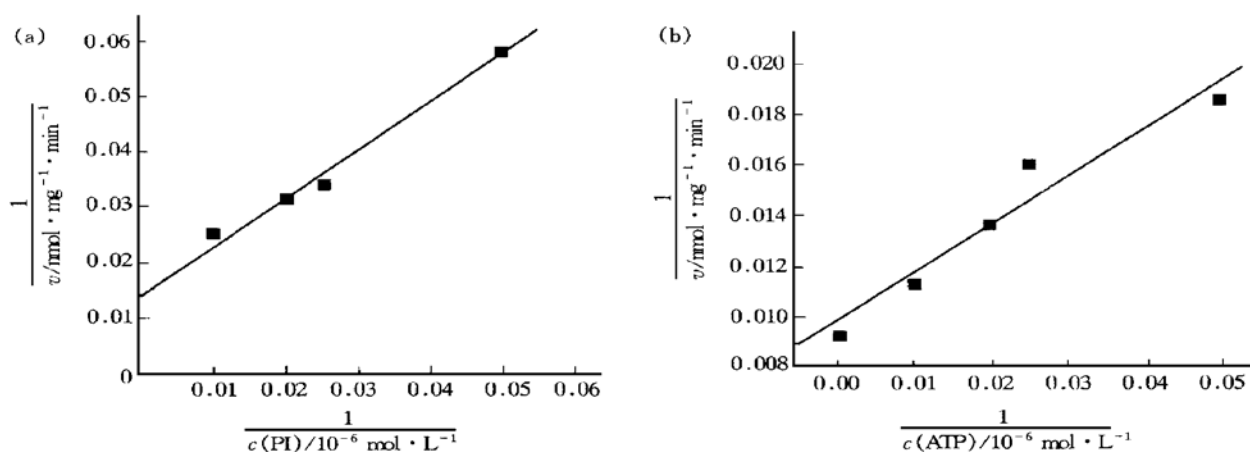


图2 Lineweaver-Burke 曲线测定表观 PI (a) 和 ATP (b) 的 K_m 值

(a) 在标准条件下测定 PI 的表观 K_m 值(在饱和 ATP 条件下变化 PI 的浓度). (b) 在标准条件下测定 ATP 的表观 K_m 值.

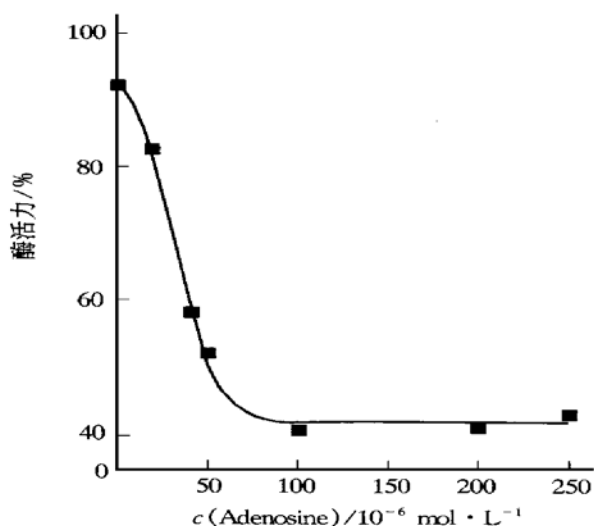


图3 Adenosine 浓度的变化抑制 PI (4) K 活力

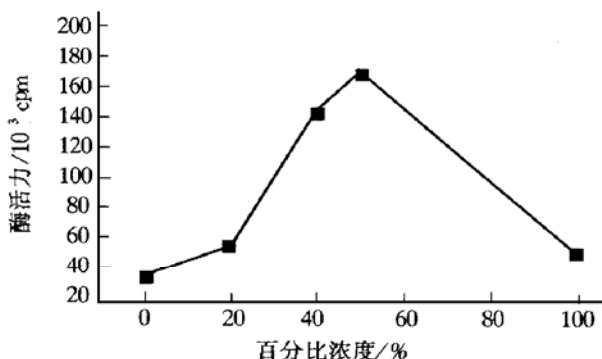


图4 去污剂 (Triton X-100) 对于 PI (4) K 活力的影响

它在细胞生长和增殖过程中起重要作用^[7]. 本研究中采用改进的纯化方法, 使牛小脑中与膜结合的 PI (4) K 得到很好的纯化, 从 300 g 牛小脑中可纯化得到约 1 mg 纯度达 95% 以上且具有较高酶活力的产品, 该方法明显优于以前的其他纯化 PI (4) K 方法, 据文献 [3] 报道从脑组织提取 PI (4) K 一般需要进行 7~8 步的层析柱, 如羊脑, 牛脑和鼠脑; 由于实验周期长导致产率很低, 对于进一步研究该酶结构及催化机理受到了限制. 本方法的明显优点是: 操作程序比较简单; 时间短, 只用三步柱层析即可得到高产量, 高纯度, 且具有较高活力的 PI (4) K.

到目前为止, 已确认有三种不同类型的 PIK^[8]. 类型 I 是 PI (3) K, 分子质量大约 195 ku, 该酶与 ATP 具有较高的亲和性, 并且酶的活性可被非离子型去污剂抑制; 类型 II (55 ku) 和类型 III (230 ku) 是属于 PI (4) K, 它们都能被非离子型去污剂激活, 但类型 II PIK 与 ATP 具有较高的亲和性, 能被 adenosine 抑制, 而类型 III PIK 与 ATP 和 adenosine 亲和性都很低. 根据文献分类标准和本实验从牛小脑中纯化的 PI (4) K 的特征, 即分子质量为 56 ku, 与 ATP 具有较高亲和性, 能被 adenosine 竞争性抑制及其活力受 TritonX-100 激活, 因此, 归类于类型 II PI (4) K.

3 讨论

在细胞信号传导过程中, PI (4) K 是第一个参与肌醇磷脂 PI 合成到 PIP 磷酸化的激酶. 因此,

致谢 杨福愉教授对本文详细审阅并提出修改意见.

参 考 文 献

- 1 Jenkins G H, Sabrahnamy G, Anderson R A, *et al.* Purification and reconstitution of phosphatidylinositol 4-kinase from human erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, **1080** (11): 11~ 18
- 2 Yamakawa A, Takenawa T. Phosphatidylinositol 4-kinase from bovine brain. *Methods in Neuroscience*, 1993, **18** (1): 93~ 99
- 3 Scholz G, Barritt G J, Kwok F. Purification and chemical modification of a phosphatidylinositol kinase from sheep brain. *Eur J Biochem*, 1991, **201** (1): 249~ 255
- 4 Macdonal M L, Mack K F, Glomser J A. Regulation of phosphoinositide phosphorylation in Swiss 3T3 cells stimulated by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, 1987, **262** (3): 1105~ 1110
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1): 265~ 275
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, **227** (3): 680~ 685
- 7 Carpenter C L, Cantley L C. Phosphoinositide kinases. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996, **8** (2): 153~ 158
- 8 Pike L J. Phosphatidylinositol 4-kinases and the role of polyphosphoinositides in cellular regulation. *Endocrine Review*, 1992, **13** (4): 4692~ 4706

High Yield Purification and Characterization of Membrane-associated Phosphatidylinositol 4-Kinase from Bovine Cerebella Cortex. YUE Jia-Chang,

GAI Li-Yun (*National Biological Macromolecule Laboratory, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract A membrane-bound phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) has been purified approximately 11 500-fold from bovine cerebella cortex. The purification procedure involves: solubilisation of the membrane fraction with TritonX-100, ammonium sulfate fractionation and cation-exchanger chromatography on phosphocellulose followed by affinity chromatography on heparin-sepharose CL-6B. The enzyme was further purified through DEAE-10 FPLC chromatography at last. The purified enzyme exhibited a final specific activity of 450 nmol/mg·min. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 56 ku by SDS-PAGE. Kinetic measurements showed that the apparent K_m value of PI kinase for the utilization of PtdIns is 6.6×10^{-7} mol/L and for ATP 7.9×10^{-7} mol/L. In addition adenosine was found to be a strong inhibitor, Enzymatic activity was found to be stimulated by Triton X-100.

Key words phosphatidylinositol 4-kinase, bovine cerebellar, purification

Rb、P₅₃调控平滑肌细胞 c-fos 和 c-jun 基因表达*

王 抒 唐蔚青 黎 健

(卫生部北京医院老年医学研究所, 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730)

摘要 为研究外源性 Rb 和 P₅₃ 基因导入血管平滑肌细胞后对 c-fos 和 c-jun 基因表达的调控作用, 将 Rb 基因或 P₅₃ 基因重组腺病毒载体转染人脐动脉血管平滑肌细胞, 应用 RT-PCR 和免疫组化法检测 c-fos、c-jun 的 mRNA 及蛋白质表达水平, 以 DNA 琼脂糖凝胶电泳和 β-半乳糖苷酶染色分别观察细胞凋亡和细胞衰老。结果显示, 野生型 P₅₃ 基因导入可诱导平滑肌细胞凋亡, c-fos 和 c-jun mRNA 及蛋白质表达水平显著增高。外源性 Rb 基因导入能促进细胞衰老, 下调 c-fos 基因表达, 但对 c-jun 基因表达没有明显影响。

关键词 抑癌基因, 原癌基因, 基因调控, 平滑肌细胞

学科分类号 Q753

c-Fos 和 c-Jun 蛋白是原癌基因 c-fos 与 c-jun 编码的核蛋白。它们作为转录因子在细胞周期、细胞增殖、分化及肿瘤发生等生理病理过程中发挥重要作用^[1]。c-Fos 和 c-Jun 易被多种因素诱导表达, 参与基因表达的复杂调控网络^[2]。据报道, 凋亡细胞的 c-fos 和 c-jun 基因表达增加^[3], 相反, 衰老

细胞的 c-fos 基因表达被抑制^[4]。但其调控机制尚不清楚。我室曾用腺病毒载体介导野生型 P₅₃ 基因和 Rb 基因转入平滑肌细胞。结果显示, P₅₃ 基因可诱导细胞凋亡^[5], 而外源性 Rb 基因导入可促进细

* 国家自然科学基金资助项目 (39570775)。

收稿日期: 1998-08-24, 修回日期: 1998-12-15