

protocol was designed and tested which included one more time phase of reaction: 94°C 1min, 37°C 6—8min, 1—3 cycles, with 5'-primer but no 3'-primer. Conventional PCR cycles started after 3'-primer was supplemented. As a result, all 10 variable region

cDNAs were successfully amplified. This novel protocol was named "single primer pre-incorporation PCR".

Key words PCR, antibody, variable region gene, primer

Ca²⁺对蝮蛇蛇毒溶血毒素构象的影响

郑乐 冯波 周元聪 阮康成

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 利用荧光光谱学对 BPLA₂ 和 Ca²⁺ 相互作用的研究表明, Ca²⁺ 在 BPLA₂ 中十分重要. 在 Ca²⁺ 存在时, 底物与 BPLA₂ 的结合使酶中色氨酸残基周围的环境变得较为疏水, 荧光发射谱蓝移达 9nm, 而无 Ca²⁺ 存在时却无此现象发生; 实验证明 BPLA₂ 分子中有一较强的疏水区, Ca²⁺ 可明显增强这一区域的疏水性; 另外, 我们还发现 Ca²⁺ 与酶的结合与酶中唯一的 His 残基有关.

关键词 溶血毒素, 荧光光谱, 构象

近来, 我们^[1,2]在研究中性及酸性磷脂酶 A₂ 的基础上, 用荧光光谱学方法研究了蝮蛇蛇毒溶血毒素即碱性磷脂酶 A₂ (BPLA₂), 发现 Ca²⁺ 与 BPLA₂ 的构象及功能明显有关, 且与我们在酸性和中性磷脂酶 A₂ 的研究中观察到的结果显著不同, 也与 Ohno 等在研究来自黄绿烙铁头蛇 (*Trimeresurus flavoviridis*) 的磷脂酶 A₂ 有明显不同, 现特作简要报导如下:

研究中所用的 BPLA₂ 系按武祥福等^[3]报道的方法从江浙产蝮蛇 (*Agkistrodon halys Pallas*) 蛇毒中分离, 经 RP-HPLC、毛细管电泳及分析型等电聚焦鉴定为一高纯度蛋白. 用 NBS 滴定的方法测得 BPLA₂ 分子中含 2 个 Trp. 荧光测定系在 Hitachi F-4010 上进行.

1 在 Ca²⁺ 存在时, BPLA₂ 的底物卵磷脂与酶的结合明显改变酶的内源荧光特性 (图 1), 使其荧光发射谱最大值从 348nm 移至 339nm, 表明在此条件下 BPLA₂ 中色氨酸残基周围的环境变得较为疏水; 而无 Ca²⁺ 或只有 Ca²⁺ 而无卵磷脂时, 则没有上述现象发生 (图

中没有给出). 这表明底物卵磷脂与 BPLA₂ 的

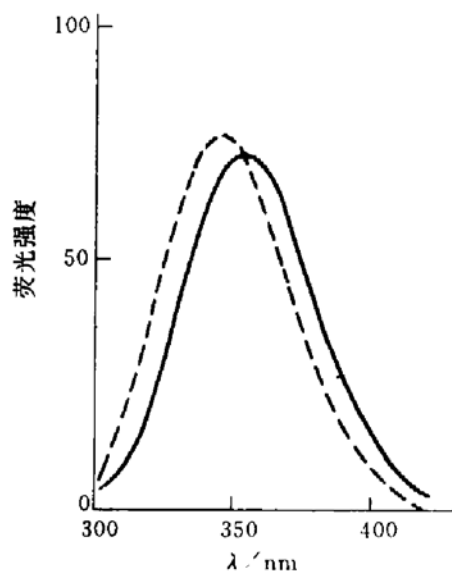


图 1 卵磷脂对 BPLA₂ 荧光谱的影响

——: 无卵磷脂, ---: 含卵磷脂, BPLA₂ 浓度: 7.1 μmol/L, Ca²⁺ 浓度: 10 mmol/L, 激发光波长: 295 nm.

结合引起的酶构象的变化, 与 Ca^{2+} 的存在有关. 在酸性 PLA_2 的研究中无此现象发生, 而在黄绿烙铁头蛇毒 PLA_2 中, 则无需底物的存在也可观察到 Ca^{2+} 对酶中 Trp 残基荧光特性的改变.

2 在测定 BPLA_2 的活性时, 我们发现, Ca^{2+} 为酶活性所必需, 且随着 Ca^{2+} 浓度的增加, BPLA_2 水解卵磷脂的活力上升, 当溶液中 Ca^{2+} 浓度为 10mmol/L 时, 酶活力达到最大. 这与酸性磷脂酶 A_2 的情况不同^[2]. 只要有 Ca^{2+} 的存在, 卵磷脂引起的 Trp 荧光谱变化与 Ca^{2+} 浓度基本无关.

3 用荧光探针 bis-ANS 研究 BPLA_2 的结果表明 BPLA_2 中有一较强的疏水区; Ca^{2+} 的存在使该疏水区的疏水性增强, 表现为结合于酶上的 bis-ANS 荧光峰的蓝移和荧光强度的明显增加 (见图 2). 我们还发现, 蓝移程度与

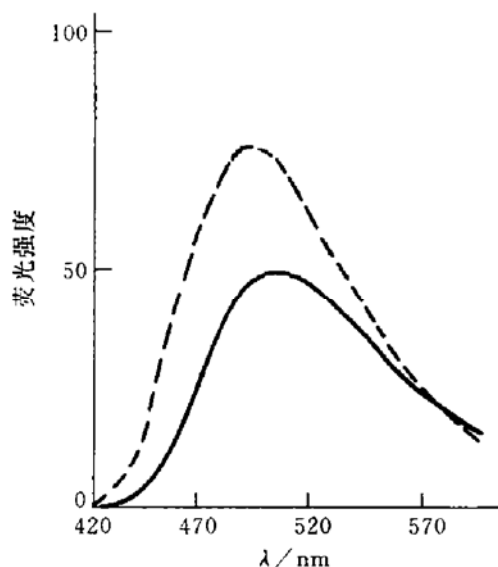


图 2 Ca^{2+} 对 bis-ANS 荧光谱的影响

——: 无 Ca^{2+} , ---: 含 Ca^{2+} 10mmol/L ,
 BPLA_2 浓度: $7.1\mu\text{mol/L}$, bis-ANS 浓度:
 $8.64\mu\text{mol/L}$, 激发光波长: 400nm .

Ca^{2+} 浓度呈正相关性, 当溶液中 Ca^{2+} 浓度为 10mmol/L 时, 蓝移程度最大, 达 10nm . 这一现象以前似无报导. 结合上述 2 中所述 Ca^{2+} 浓度与 BPLA_2 活性的关系, 可推测该疏水区的疏水性强弱与酶活性密切相关, Ca^{2+} 可能正是

通过改变其疏水性的强弱来影响酶的活性.

bis-ANS 的研究结果还表明, 酶分子中的 His 残基可能与该疏水区有关. 我们发现当 His 残基被 PBPB 修饰后 (酶活力丧失), 该酶上 bis-ANS 结合区的疏水性变弱, 其 bis-ANS 荧光峰与天然酶中的相比红移了 11nm , (对照实验表明 PBPB 对 bis-ANS 荧光特性无影响). 有意思的是, 此时加入 Ca^{2+} , 上述 3 中观察到的蓝移现象不再发生, 这又暗示 Ca^{2+} 与酶的结合可能与 His 残基有关.

参 考 文 献

- 1 郑 乐, 林南琴, 钱 峰等. 生物物理学报, 1993; 9: 34
- 2 张 翔, 郑 乐, 林南琴等. 生物化学杂志, 1994; 10 (3): 330
- 3 武祥福, 陈远聪. 动物学研究, 1981; 2 (4): 增刊: 13

Effect of Calcium Ion on the Conformation of the Hemolytic Toxin from the Venom of *Agkistrodon halys Pallas*. Zheng Le, Feng Bo, Zhou Yuanchong, Ruan Kangcheng (Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract The study on the interaction of BPLA_2 with Ca^{2+} by fluorescence spectroscopy indicated that Ca^{2+} was very important to BPLA_2 . In the presence of Ca^{2+} , the environment around the Trp residue in BPLA_2 became more hydrophobic upon the binding of the substrate to the enzyme, resulting in 9nm blue shift of the Trp fluorescence emission spectrum. But such a phenomenon was not observed in the absence of Ca^{2+} . The experiment indicated that there was a hydrophobic region in BPLA_2 molecule. Ca^{2+} might increase the hydrophobicity of this region. Further, it was also found that the binding of Ca^{2+} to the enzyme was related to the single His residue of the enzyme.

Key words hemolytic toxin, fluorescence spectroscopy, conformation