

The Effects of Electroendosmosis in Agarose on Electrophoresis. GUO Yaojun, LI Xinhui, FANG Yong (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract The effects of gel or electrode buffer strips using agarose with different electroendosmosis of 0, 0.03, 0.08, 0.20 mr on electrophoresis were studied. It was shown that only

agarose without electroendosmosis can be used for isoelectric focusing. The electrode buffer strips with different electroendosmosis did not affect SDS PAGE significantly but they affect Native PAGE in certain extent. The higher the electroendosmosis was, the more difficultly it ran.

Key words agarose, electroendosmosis, semi-dry electrophoresis, electrode buffer strips

^{15}N 标记蛋白 GAL4 (62) 的 2D NMR 实验*

涂光忠¹⁾ 张日清 赵南明

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 利用自编的脉冲程序, 采用预饱和和自旋锁定对水峰进行双重抑制的方法, 得到了 ^{15}N 标记蛋白 GAL4 (62) 的 2D ^1H - ^{15}N HSQC、HSQC-NOESY、HSQC-TOCSY 谱, 并对这几个谱在蛋白质 ^1H 谱的归属中所起的作用进行了讨论.

关键词 异核去偶, HSQC, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY

近年来, 多维异核脉冲技术得到了迅速的发展, 与此同时, 用同位素标记蛋白在实践中也获得了成功, 两者相结合, 大大地提高了用核磁共振来研究蛋白质溶液构象的能力.

目前, 利用基因表达的方法, 我们可以获得 ^{15}N 标记蛋白. ^{15}N 标记不仅可以克服 ^1H 谱中峰重叠现象, 而且还可以建立起一种独立的有利于谱峰归属的途径, 同时, ^{15}N 标记也大大地促进了脉冲技术的发展, 从而为异核标记 NMR 技术的形成及应用打下了良好的基础.

^{15}N 标记样品的 ^1H - ^{15}N 相关实验的引入对于蛋白质的多维核磁共振研究的发展有很大的作用. 由于 ^{15}N 的磁旋比较小, 所以所得到的相关峰的线宽相对比较窄. 又 ^{15}N 共振峰的化学位移比较分散, 实践中, 对于许多大于 20 ku 的大蛋白质, 在给定的条件下, 大部分蛋白质的 ^1H - ^{15}N 相关峰都是可以分辨的. 而且在设计多维实验时, 简并的现象还可以大大

减少. 另外, 由于弛豫速度一般比 ^1H - ^{15}N 自旋偶合 ($\sim 90\text{Hz}$) 要慢得多, 所以对于分子质量低于 40 ku 的蛋白质来说, 相关交叉峰不会因为弛豫而明显减弱^[1].

由 ^1H - ^{15}N 异核相关实验 (2D 和 3D) 可得到蛋白质 ^1H 谱的归属和序列的指认. 由 ^1H - ^{15}N 相关得到很高的分辨率可以很大程度上消除酰胺 ^1H 的简并现象. 实际上, 对一些分子质量小于 20 ku 的蛋白质, 只用 ^{15}N 标记就可以很有效地进行序列的指认. 最常用的 2D ^1H - ^{15}N 异核相关实验有 HSQC、HSQC-TOCSY、HSQC-NOESY^[2]. 本文利用异核去偶, 在 Bruker AM-500 型超导核磁共振波谱仪上实现了 ^{15}N 标记蛋白 GAL4 (62) 的异核相关实验.

* 国家自然科学基金资助项目 (39330070).

¹⁾ 北京微量化学研究所, 北京 100091.

收稿日期: 1996-07-29, 修回日期: 1997-03-20

1 实验仪器及方法

¹⁵N 均一标记蛋白 GAL4 (62) 通过基因表达获得, 它含有 62 个氨基酸残基, 其序列为 Met1-Lys2-Leu3-Leu4-Ser5-Ser6-Ile7-Glu8-Gln9-Ala10-Cys11-Asp12-Ile13-Cys14-Arg15-Leu16-Lys17-Lys18-Leu19-Lys20-Cys21-Ser22-Lys23-Glu24-Lys25-Pro26-Lys27-Cys28-Ala29-Lys30-Cys31-Leu32-Lys33-Asn34-Asn35-Trp36-Glu37-Lys38-Arg39-Tyr40-Ser41-Pro42-Lys43-Thr44-Lys45-Arg46-Ser47-Pro48-Leu49-Thr50-Arg51-Ala52-His53-Leu54-Thr55-Glu56-Val57-Glu58-Ser59-Arg60-Leu61-Glu62. 样品溶于 0.2 ml 90% H₂O-10% D₂O 中, 浓度约

4.5 mmol/L, 置于直径为 5 mm 的样品管中. 所有的实验都在 Bruker AM-500 型超导核磁共振谱仪 (配有 5 mm 宽带反转探头) 上获得, 实验温度为 27 ℃. 由 ASPECT 3 000 采集的数据通过 INCA-TCPLink 2.0 传送到 SGI 工作站上, 使用 UXNMR 软件进行谱图处理. ¹⁵N 和 ¹H 的化学位移以残基 Ser41 的化学位移 ($\delta(^{15}\text{N}) = 121.2$, $\delta(^1\text{H}) = 9.03$) 为标准 (参考文献 [3]).

2D ¹H-¹⁵N HSQC、¹H-¹⁵N HSQC-TOCSY 和 ¹H-¹⁵N HSQC-NOESY 谱都为纯相吸收模式, 即通过施加 TPPI^[4] 于 ϕ_1 而在 F1 维得到正交检测, 其脉冲序列见图 1. 所有的实验 F2 (¹H) 和 F1 (¹⁵N) 维的谱宽分别为

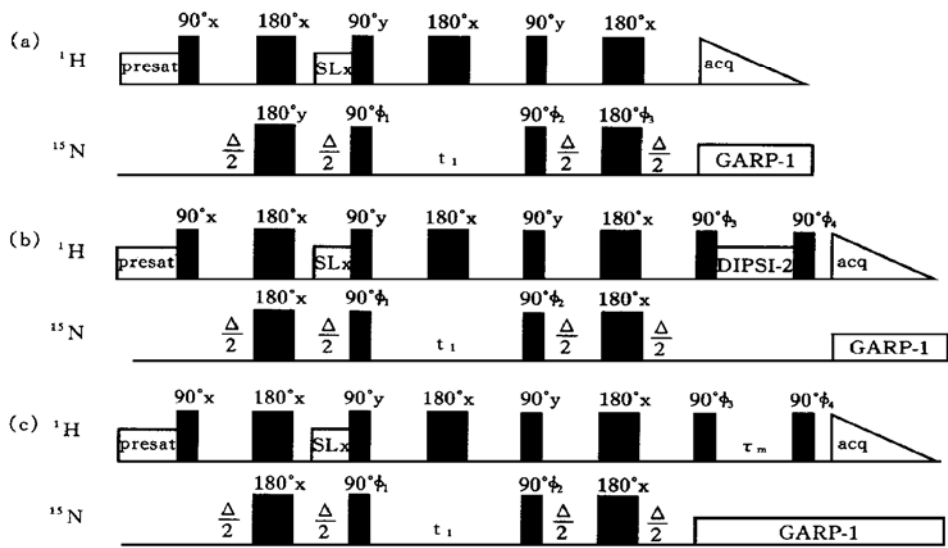


图 1 2D ¹H 检测异核 ¹H-¹⁵N HSQC, HSQC-TOCSY 和 HSQC-NOESY 实验的脉冲序列

(a) 用于 ¹H 检测异核 ¹H-¹⁵N HSQC 实验的脉冲序列. 所用的相循环为 $\phi_1 = 2(x, -x)$; $\phi_2 = 2(x, x, -x, -x)$; $\phi_3 = 4(x) + 4(-x)$ 和接收相为 $2(x, -x, -x, x)$. (b) 2D ¹H 检测异核 ¹H-¹⁵N HSQC-TOCSY 实验的脉冲序列. 其相循环为 $\phi_1 = 4(x, -x)$; $\phi_2 = 2(x, x, -x, -x)$; $\phi_3 = 4(x) + 4(-x)$; $\phi_4 = 8(x) + 8(-x)$ 和接收相为 $(x, -x, -x, x) + 2(-x, x, x, -x) + (x, -x, -x, x)$. (c) 2D ¹H 检测异核 ¹H-¹⁵N HSQC-NOESY 实验的脉冲序列. 相循环 $\phi_1, \phi_2, \phi_3, \phi_4$ 和接收相与 (b) 相同.

8064.52 Hz 和 3 000 Hz. 氢谱的载频置于溶剂 (H₂O) 的共振峰上以利于水峰抑制, ¹⁵N 的载频置于酰胺氮化学位移的中心. 水峰通过预饱

和自旋锁定 purge 脉冲^[5] 而得到抑制. 其自旋锁定脉冲长度 (spiral lock pulse length, SL_x) 为 0.5 ms. ¹H-¹⁵N J¹ 耦合演化和重聚焦时间

$\Delta/2$ 设定为 2.7 ms. 采样过程中的¹⁵N 去偶使用 BFX-5 宽带放大器通过 GARP-1^[6] 相调制获得. ¹⁵N 的去偶 $\pi/2$ 脉冲宽度为 120 μ s. 在 2D ¹H-¹⁵N HSQC-TOCSY 实验中采用脉冲序列 DIPSI-2^[7] 替代 MLEV-17 用于 ¹H 的自旋锁定.

2 结果和讨论

所有实验用的脉冲程序都是我们根据以上脉冲序列而编写的. 从脉冲序列可看出, ¹H 检测异核单量子相干 HSQC 实验实质上是在两个 INEPT 系列之间夹杂着一个演化期 (evolution period). 第一个 INEPT 序列把 ¹H

初始的磁化强度 (magnetization) 转移给 ¹⁵N 产生单量子相干, 这个相干在 t_1 时期得到演化, 最后由第二个 INEPT 序列转移给 ¹H 而被检测. 演化期 (t_1) 中间的 ¹H 180 ° 脉冲的作用是聚焦所有的异核标量偶合演化于 ¹H. 异核单量子相干与异核多量子相干 (HMQC) 相比有几个显著的优点^[2]. 单量子相干能得到比较好的 F1 (¹⁵N) 分辨和较长的横向弛豫时间. 这两点在异核相关实验用于蛋白质的研究时尤为重要.

本实验采用预饱和和自旋锁定的方法对水峰进行双重抑制. 由于 HN 与水分子中的质子存在着交换, 所以抑制水峰的功率应尽可能

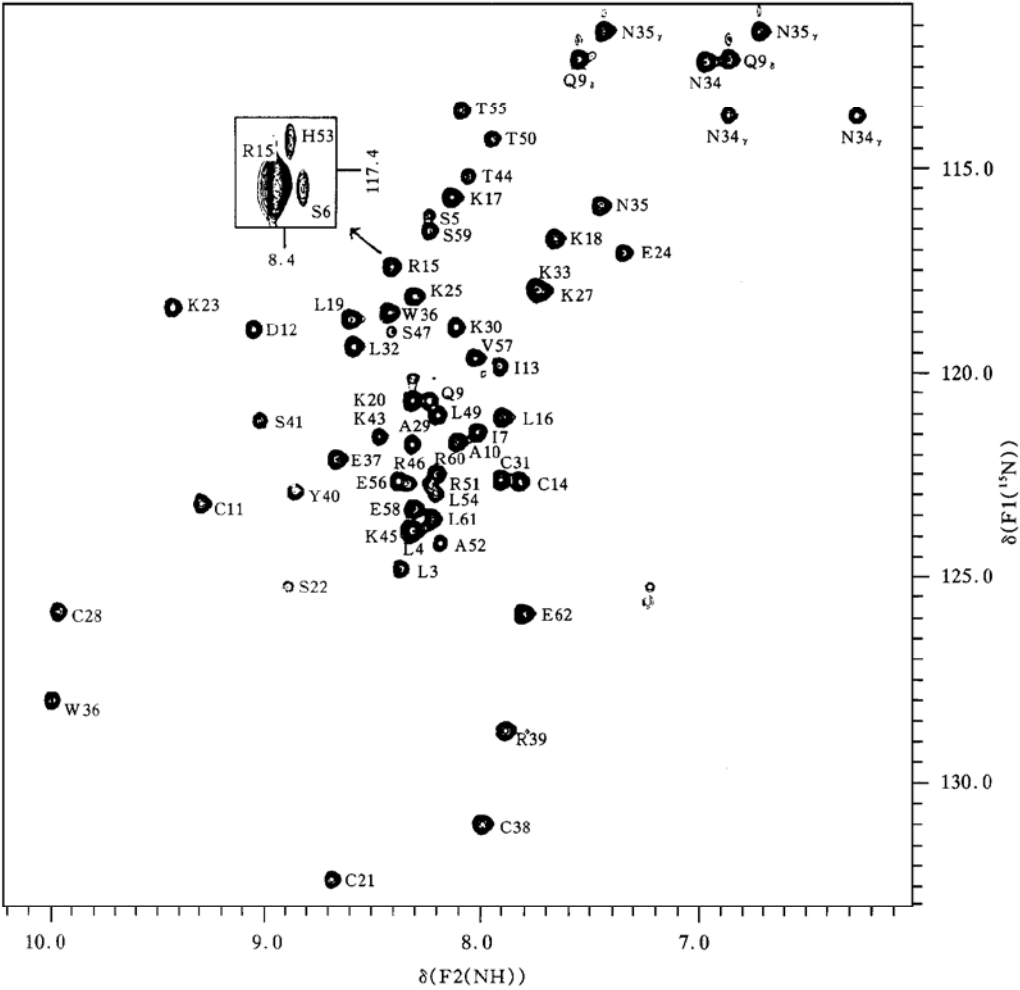


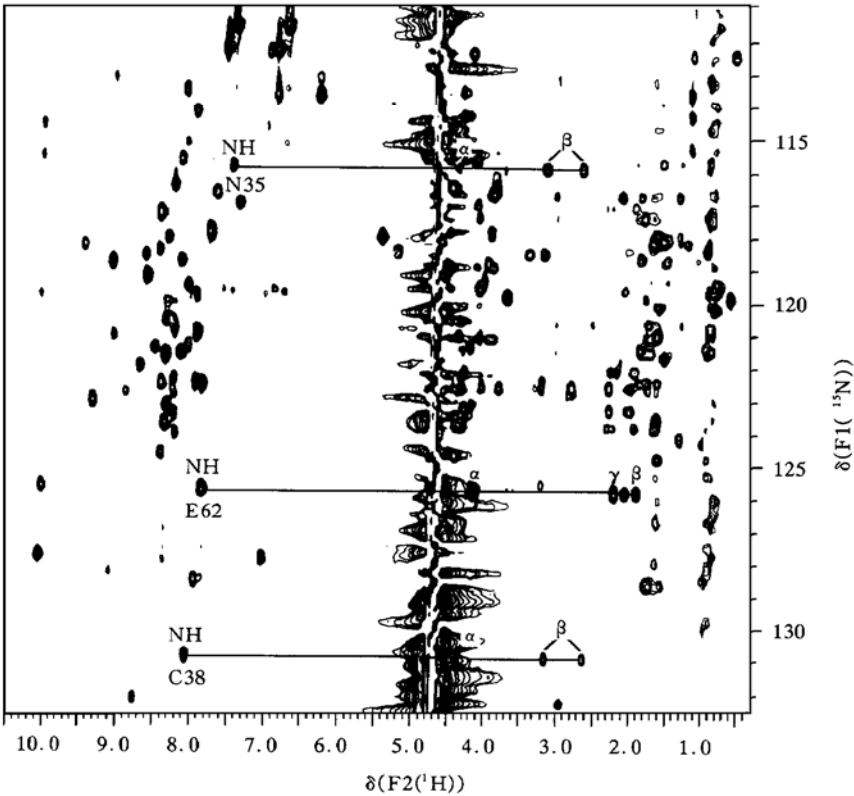
图 2 27 °C 时均-¹⁵N 标记蛋白 GAL4 (62) 的 500MHz ¹H 检测 ¹H-¹⁵N HSQC 谱

小. 我们曾尝试过单用自旋锁定的方法来抑制水峰, 但只有当自旋锁定时间很长时, 水峰才能得到较好的抑制, 可是这时谱的灵敏度变得非常低. 因此本实验采用预饱和和自旋锁定双重抑制的方法, 这样用较小的预饱和功率和较短的自旋锁定时间, 水峰就能得到较好的抑制.

图 2 是 GAL4 (62) 的 HSQC 谱 (谱峰的归属参照文献 [3]). 从图 2 中可以看出除 Met1, Lys2, Glu8 和三个脯氨酸没有出 ^1H - ^{15}N 相关峰外, 其他残基的相关峰都能得到较好的分辨. 其中残基 Ser6 和 His53 的相关峰比较弱, 通过降低显示高度才能看见 (见图 2

中箭头所指的放大部分).

图 3 是 GAL4 (62) 的 2D ^1H - ^{15}N HSQC-TOCSY 谱 (混合时间 $\tau_m = 70\text{ ms}$). 2D HSQC-TOCSY 谱可以起到 3D TOCSY-HSQC 的作用. 在图 3 中可以看出, 从 ^1H - ^{15}N 交叉峰出发, 作 F2 轴的平行线 (如图 3 中连线所示), 从这条线上就能够找到一个残基的偶合系统. 图 3 中显示了 3 个残基 C38、N35、E62 的偶合系统. 由 2D ^1H - ^{15}N HSQC-TOCSY 能归属大部分 ^1H 的化学位移. 当然, 由于谱峰重叠的存在, 要归属所有的残基的偶合系统还得结合同核 2D DQF-COSY、TOCSY 和 3D TOCSY-HMQC 谱等.



3 27 °C 时均— ^{15}N 标记样品 GAL4 (62) 的 500Hz 2D ^1H 检测 ^1H - ^{15}N HSQC-TOCSY 谱
混合时间 $\tau_m = 70\text{ ms}$.

2D ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY 谱可以用于蛋白质的序列指认^[8]. 图 4 是 GAL4 (62) 的 2D ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY 谱 (混合时间 $\tau_m =$

150 ms) 的局部放大图. 从图 4 中我们可以找到许多由四个交叉峰所组成的矩形 (如图 4 中连线所示), 矩形中两个较强的对角峰是 ^1H -

¹⁵N 直接相关峰，两个较弱的对角峰是序列上相邻的两个残基的 NH 之间产生的 NOESY 峰。由这些峰，结合 2D 同核 NOESY 谱和 3D NOESY-HMQC 谱，我们就可以得到序列的指

认。2D HSQC-NOESY 谱在¹⁵N 标记蛋白质溶液构象的研究中用得非常普遍，它在¹⁵N 标记蛋白质序列的归属和空间结构的确定中起着重要的作用。

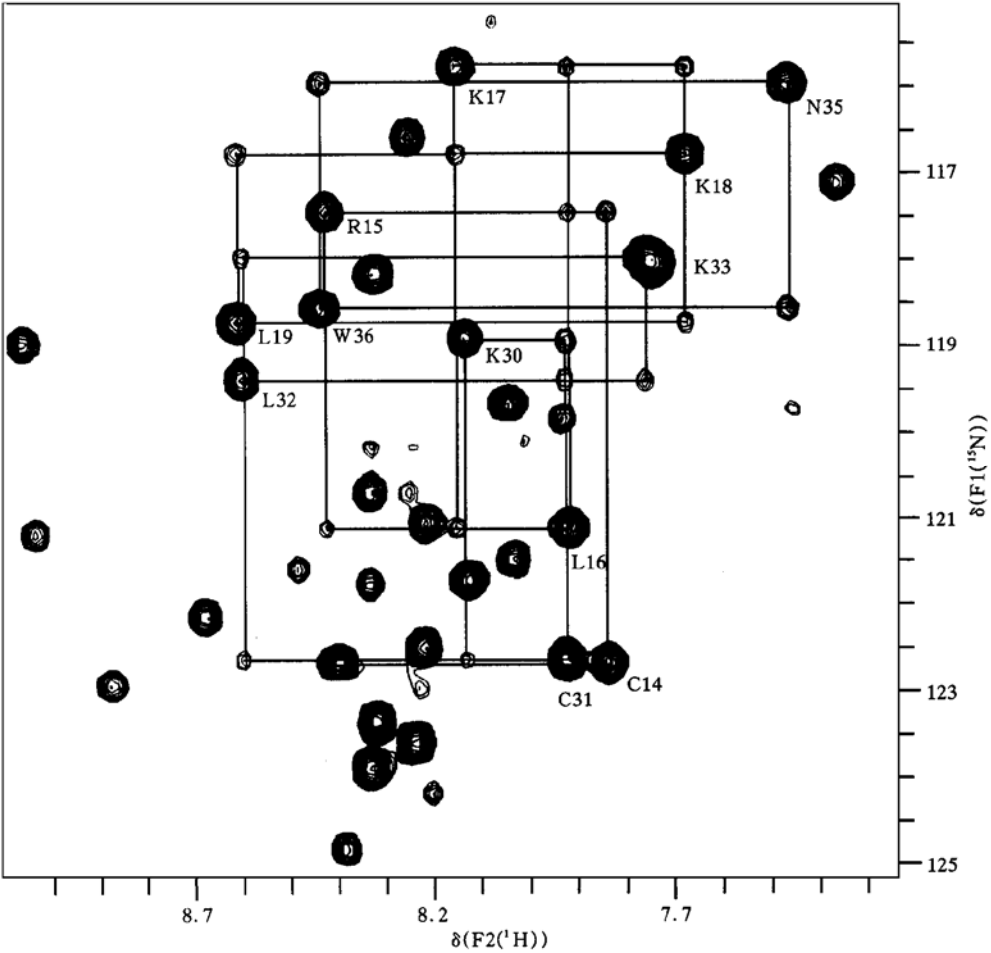


图 4 27℃时均一¹⁵N 标记样品 GAL4 (62) 的 500MHz 2D ¹H 检测¹H-¹⁵N HSQC-NOESY 谱的区间
混合时间 $\tau_m = 150$ ms.

致谢 衷心感谢日本奈良先端科学技术大学的 Masahiro shirakawa 先生提供¹⁵N 标记样品并在脉冲程序的编写方面给予大力帮助。并感谢中国医学科学院药物研究所核磁共振实验室提供 BFX-5 异核去偶器。

参 考 文 献

1 LeMaster D M. Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis. Prog NMR Spectrosc,

1994, 26: 371~ 419
2 Norwood T J, Boyd J, Heritage J E *et al.* Comparison of techniques for ¹H-detected heteronuclear ¹H-¹⁵N spectroscopy. J Magn Reson, 1990, 87: 488~ 501
3 Shirakawa M, Fairbrother W J, Serikawa Y *et al.* Assignment of ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonances, identification of elements of secondary structure and determination of the global fold of the DNA-binding domain of GAL4. Biochemistry, 1993, 32: 2144~ 2153

(下转第 280 页, Continued on page 280)

- 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, Wuthrich 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^{glc} 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