

# 猪脑突触体膜 ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase 的 分离纯化与性质\*

范晓轩 张旭家\*\*

(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** 以猪脑为材料, 经匀浆、差速离心、蔗糖密度梯度离心分离突触体, 低渗破膜得到突触体膜. Triton X-100 增溶后, 经钙调蛋白亲和层析可得去脂的质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. 用大体积亲和柱和大体积低  $\text{Ca}^{2+}$  淋洗液淋洗, 可得产率、纯度和活性均较高的质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. 与大豆磷脂保温后, 去脂的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的水解活力可恢复达  $3.32 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ . SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显示单一蛋白质带, 分子质量约为 140 ku, 纯度在 90% 以上. 不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显影响酶的活力.

**关键词** 质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 纯化, 钙调蛋白亲和层析

**学科分类号** Q71

**A**

正常细胞的胞内游离钙浓度一般在  $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$ , 因此在生理条件下, 细胞需要有效的机制将过量的胞质钙转运出质膜或转运入亚细胞器<sup>[1]</sup>. 在非肌肉细胞中, 质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) 在调节胞质钙浓度过程中发挥重要作用; 在肌肉细胞中, 含量丰富的肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  交换器则起主要作用<sup>[1]</sup>. 目前对肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的结构与功能已经进行了大量研究, 而在分子水平研究质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的主要障碍是其在膜上含量极低, 虽然从不同细胞克隆表达了质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 但表达蛋白均无活性. 因此从天然细胞膜上分离纯化质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 对从分子水平上研究其结构与功能具有重要意义.

1979 年, Niggli<sup>[2]</sup> 用钙调蛋白亲和层析的方法纯化出红细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 但由于产率较低, 取材困难, 不适用于大量制备. Salvador 等<sup>[3]</sup> 报道了从突触体膜中纯化质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 但酶的活力与蛋白质产量不高. 本文对其方法进行了重要改进, 纯化的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 在产率、纯度以及水解活力等方面均有明显提高. 这对于进一步研究膜脂影响质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的活性与构象, 并为开展质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的二维结晶及其结构的电子晶体学研究都提供了良好基础.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

新鲜猪脑购自北京市第三肉联厂. Calmodulin-Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司, HEPES 为 Boehringer Mannheim 产品, 丙酮酸激酶 (PK)、

NADH 购自 Serva 公司, ATP 为 Sigma 公司产品, 乳酸脱氢酶 (LDH)、磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 为中国科学院生物物理研究所中生公司产品. 其他试剂均为国产分析纯.

### 1.2 方 法

**1.2.1 猪脑突触体膜的制备:** 猪脑突触体膜基本上按 Michaelis 等<sup>[4]</sup> 的方法制备. 新鲜猪脑 60 g, 在  $4^{\circ}\text{C}$  下加入 5 倍体积的缓冲液 A (10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4, 0.32 mol/L 蔗糖, 0.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 20 mg/L 苯甲基氟硫酸 (phenyl-methylsulfate fluoride, PMSF), 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)), 电动匀浆器 900 r/min 匀浆 6 次. 1 500 g 离心 10 min, 取上清, 20 000 g 离心 30 min, 沉淀用 30 ml 缓冲液 A 匀浆后进行 40%~20% 不连续蔗糖密度梯度离心, 63 000 g 离心 1 h. 于界面处吸出突触体, 用 25 倍体积的 10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4 清洗, 20 000 g 离心 30 min, 沉淀用 10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4 和 0.32 mol/L 蔗糖匀浆至体积约为 25 ml, 倒入 100 倍体积的缓冲液 B (10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA-KOH, 0.5 mmol/L DTT),  $4^{\circ}\text{C}$  搅拌 45 min 破膜. 20 000 g 离心 30 min, 沉淀用 25 ml 的 10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4 和 0.32 mol/L 蔗糖匀浆, 于  $-70^{\circ}\text{C}$

\* 中国科学院重大项目 (KJ951-B1-609) 和国家自然科学基金重点资助项目 (3970130).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888517, E-mail: xjzhang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-01-28, 接受日期: 2000-03-31

保存备用。

**1.2.2 猪脑突触体膜的增溶:** 将突触体膜用缓冲液 C (10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4, 300 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20 mg/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT) 稀释至蛋白质浓度为 6 g/L, 滴加 TritonX-100 至终浓度 0.6%, 4℃ 搅拌 20 min. 130 000 g 离心 45 min, 取上清。

**1.2.3 亲和层析:** 基本参照 Carafoli 纯化血影膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的方法<sup>[5]</sup>, Calmodulin-Sepharose 4B 亲和层析柱 (8 ml 柱体积), 用缓冲液 D (300 mmol/L KCl, 20 mmol/L HEPES, 100 μmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.6% Triton X-100, 15% 甘油, 2 mmol/L DTT) 平衡。增溶后的样品上柱, 流速 0.27 ml/min. 用缓冲液 E (300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 50 μmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.06% Triton X-100, 15% 甘油, 2 mmol/L DTT) 洗 30 个柱体积, 缓冲液 F (2 μmol/L CaCl<sub>2</sub>, 其余同缓冲液 E) 洗 5 个柱体积, 流速 0.4 ml/min. 用缓冲液 G (以 2 mmol/L EDTA 替代缓冲液 E 中的 CaCl<sub>2</sub>) 洗脱出蛋白质峰, 流速 0.12 ml/min. 向有 ATPase 活力的管中分别补加 MgCl<sub>2</sub> 和 CaCl<sub>2</sub> 至终浓度 1 mmol/L 和 100 μmol/L. 分装后 -70℃ 冻存备用。

**1.2.4 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 水解活力的测定:** 偶联酶法测定 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的活力<sup>[2]</sup>, 将水解 ATP 的反应通过与丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的偶联转变成与 NAD (P)<sup>+</sup> 变化有关的反应, 利用分光光度计测定 NAD (P)<sup>+</sup> 与 NAD (P) H 的互变来计算 ATP 酶的水解活力。纯化的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 与大豆磷脂 (1:1, 质量比) 在 37℃ 预保温 5 min, 1.0 ml 反应体系 (30 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.4, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L EDTA-KOH, 1 mmol/L ATP, 0.5 mmol/L PEP, 0.2 mmol/L NADH) 中加入 2 U PK, 5 U LDH, 10 μg 样品, 37℃ 保温 5 min, 加入 25 μl 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 启动反应, 在

Shimadzu 2010 分光光度计上测定 340 nm 吸光值的变化。计算公式:  $v = (k_2 - k_1) \cdot N / (A_{\text{initial}} \cdot m)$  其中  $v$  为 ATP 酶的水解速率,  $k_1$ 、 $k_2$  分别为 Ca<sup>2+</sup> 启动反应前后吸光值变化的斜率,  $N$  表示 NADH 的摩尔数,  $A_{\text{initial}}$  为吸光值的初始值,  $m$  表示 ATP 酶的质量。

**1.2.5 蛋白质浓度测定:** 蛋白质浓度的测定采用 Bradford 方法<sup>[6]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准。

**1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE):** 按照 Laemmli<sup>[7]</sup> 的方法, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 7.5%, 银染法染色。

## 2 结 果

### 2.1 质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的纯化

60 g 猪脑匀浆后经差速离心可去除 80% 以上的蛋白质, 蔗糖密度梯度离心收集到突触体, 突触体质膜用 TritonX-100 增溶, 再经钙调蛋白亲和层析获得纯化的质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase, 表 1 示纯化结果。可以看出, 用 0.6% 的 TritonX-100 可将 64% 的突触体膜蛋白增溶下来, 上清用于钙调蛋白亲和层析, 84% 的蛋白质和 16% 的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活力可随 Ca<sup>2+</sup> 的缓冲液淋洗下来。用 EDTA 缓冲液洗脱时, 可获得非常清晰的单一峰 (图 1), 得到 2 mg 的质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase。当纯化的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 与大豆磷脂保温后, 比活力可恢复达 3.32 μmol/(mg·min), 总活力为增溶后总 (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase 活力的 7%。在分离纯化过程中可检测到 Mg<sup>2+</sup> 依赖、Ca<sup>2+</sup> 不依赖的 ATPase 活力, 但在钙调蛋白亲和层析后可完全去除。

### 2.2 纯化的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的 SDS-PAGE 分析

图 2 示纯化过程中所得样品的 SDS-PAGE 电泳图谱经银染的结果。可以清楚看出经钙调蛋白亲和层析后, 绝大多数杂蛋白被 Ca<sup>2+</sup> 缓冲液淋洗下来 (图 2c), 质膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 最终由 2 mmol/L EDTA 洗脱出来 (图 2d), 电泳结果显示单一蛋白质带, 分子质量约为 140 ku, 与血影膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的分子质量相近<sup>[2]</sup>。

Table 1 Balance sheet: isolation of Ca<sup>2+</sup>-ATPase

	Total protein/mg	Protein yield/%	Total activity/μmol·min <sup>-1</sup>	Specific activity/μmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
Synaptosome vesicles	544	100	—	—
Triton X-100 solubilized protein	348	64	97.4	0.28 <sup>1)</sup>
Peak eluted with Ca <sup>2+</sup> buffer	296	54	15.6	0.053 <sup>2)</sup>
Peak eluted with EDTA buffer	2.0	0.37	6.64	3.32 <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> solubilized in 0.6% Triton X-100; <sup>2)</sup> solubilized in 0.06% Triton X-100.

是 Triton X-100 增溶后形成的微团中含有  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 和杂蛋白, 微团通过  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 结合在亲和层析柱上. 当不含蛋白质的微团流过亲和层析柱时, 杂蛋白很可能在层析柱上结合的微团与流动的微团之间发生缓慢的交换, 从而去除杂蛋白. 本文进一步分别以  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  缓冲液和  $1 \mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  缓冲液两个阶段进行淋洗, 在低  $\text{Ca}^{2+}$  浓度条件下有利于杂蛋白与钙调蛋白解离, 洗脱下来, 从而使蛋白质纯度提高并缩短了淋洗时间.

在增溶突触体膜时, 曾尝试用不同浓度的 OG 和 Triton X-100. 用 0.6% 的 Triton X-100 所得的增溶产物, 蛋白质含量与比活力均较高. 因此, 0.6% 的 Triton X-100 对于从突触体膜增溶  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 具有较高的选择性.

亲和层析上样时采用慢流速, 使质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 有足够的时间与亲和柱上的钙调蛋白结合, 利于提高产率. 尽管从理论上 1 ml 柱胶可结合 8 mg 质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 但由于杂蛋白与钙调蛋白的非特异性结合, 占据了质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的结合位点, 会使一部分  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 在上样时流失. 在以往的实验中用 2 ml 柱胶, 纯化所得酶仅占突

触体膜总蛋白的 0.19%, 在采用 8 ml 的亲和柱后, 蛋白质回收率增高至 0.37%, 尽管有更多的杂蛋白结合到亲和柱上, 仍可经大体积淋洗而加以去除, 从而得到纯度和活性较高的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

### 参 考 文 献

- 1 Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 395~433
- 2 Niggli V, Penniston J T, Carafoli E. Purification of the ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem*, 1979, **254** (20): 9955~9958
- 3 Salvador J M, Mata A M. Purification of the synaptosomal plasma membrane ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase from pig brain. *Biochem J*, 1996, **315** (pt1): 183~187
- 4 Michaelis E K, Michaelis M L, Chang H H, *et al.* High affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J Biol Chem*, 1983, **258** (10): 6101~6108
- 5 Gazzotti P, Carafoli E. Purification and reconstitution of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of red blood cells. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1994, **6**: 3~10
- 6 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~254
- 7 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680~685

## Purification and Properties of Plasma Membrane ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase from Synaptosomes of Pig Brain\*

FAN Xiao-Xuan, ZHANG Xu-Jia\*\*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Synaptosomes were isolated from pig brain by homogenization, differential centrifugation and sucrose gradient centrifugation. After synaptosome lysis in hypoosmotic buffer, the plasma membrane vesicles were collected. Following the solubilization of plasma membrane vesicles in Triton X-100, the solubilized protein was applied to calmodulin affinity chromatography column, and the delipidated plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase was purified to nearly homogeneity. The novel feature of this purification is the use of large affinity column and heavy washing to facilitate the purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase with higher activity and protein yield. The specific activity of the purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase was recovered to a maximum of  $3.32 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  after incubation with asolectin. Silver staining of SDS-PAGE revealed a single protein band around  $M_r$  140 000, showing the purity was over 90%. Different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations dramatically affect the specific activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

**Key words** plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, purification, calmodulin affinity chromatography

\* This work was supported by a grant from Key Research Programs of the Chinese Academy of Sciences (KJ951-B1-609) and National Natural Sciences Foundation of China for Key Program (3970130).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-64888517, E-mail: xjzhang@sun5.ibp.ac.cn

Received: January 28, 2000 Accepted: March 31, 2000

是 Triton X-100 增溶后形成的微团中含有  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 和杂蛋白, 微团通过  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 结合在亲和层析柱上. 当不含蛋白质的微团流过亲和层析柱时, 杂蛋白很可能在层析柱上结合的微团与流动的微团之间发生缓慢的交换, 从而去除杂蛋白. 本文进一步分别以  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  缓冲液和  $1 \mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  缓冲液两个阶段进行淋洗, 在低  $\text{Ca}^{2+}$  浓度条件下有利于杂蛋白与钙调蛋白解离, 洗脱下来, 从而使蛋白质纯度提高并缩短了淋洗时间.

在增溶突触体膜时, 曾尝试用不同浓度的 OG 和 Triton X-100. 用 0.6% 的 Triton X-100 所得的增溶产物, 蛋白质含量与比活力均较高. 因此, 0.6% 的 Triton X-100 对于从突触体膜增溶  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 具有较高的选择性.

亲和层析上样时采用慢流速, 使质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 有足够的时间与亲和柱上的钙调蛋白结合, 利于提高产率. 尽管从理论上 1 ml 柱胶可结合 8 mg 质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, 但由于杂蛋白与钙调蛋白的非特异性结合, 占据了质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的结合位点, 会使一部分  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 在上样时流失. 在以往的实验中用 2 ml 柱胶, 纯化所得酶仅占突

触体膜总蛋白的 0.19%, 在采用 8 ml 的亲和柱后, 蛋白质回收率增高至 0.37%, 尽管有更多的杂蛋白结合到亲和柱上, 仍可经大体积淋洗而加以去除, 从而得到纯度和活性较高的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

### 参 考 文 献

- 1 Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 395~433
- 2 Niggli V, Penniston J T, Carafoli E. Purification of the ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem*, 1979, **254** (20): 9955~9958
- 3 Salvador J M, Mata A M. Purification of the synaptosomal plasma membrane ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase from pig brain. *Biochem J*, 1996, **315** (pt1): 183~187
- 4 Michaelis E K, Michaelis M L, Chang H H, *et al*. High affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J Biol Chem*, 1983, **258** (10): 6101~6108
- 5 Gazzotti P, Carafoli E. Purification and reconstitution of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of red blood cells. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1994, **6**: 3~10
- 6 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~254
- 7 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680~685

## Purification and Properties of Plasma Membrane ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase from Synaptosomes of Pig Brain\*

FAN Xiao-Xuan, ZHANG Xu-Jia\*\*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** Synaptosomes were isolated from pig brain by homogenization, differential centrifugation and sucrose gradient centrifugation. After synaptosome lysis in hypoosmotic buffer, the plasma membrane vesicles were collected. Following the solubilization of plasma membrane vesicles in Triton X-100, the solubilized protein was applied to calmodulin affinity chromatography column, and the delipidated plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase was purified to nearly homogeneity. The novel feature of this purification is the use of large affinity column and heavy washing to facilitate the purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase with higher activity and protein yield. The specific activity of the purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase was recovered to a maximum of  $3.32 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  after incubation with asolectin. Silver staining of SDS-PAGE revealed a single protein band around  $M_r$  140 000, showing the purity was over 90%. Different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations dramatically affect the specific activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

**Key words** plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, purification, calmodulin affinity chromatography

\* This work was supported by a grant from Key Research Programs of the Chinese Academy of Sciences (KJ951-B1-609) and National Natural Sciences Foundation of China for Key Program (3970130).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-64888517, E-mail: xjzhang@sun5.ibp.ac.cn

Received: January 28, 2000 Accepted: March 31, 2000