

研究简报

鱼肝中蛋白磷酸酶的分离纯化

徐立红 张甬元 陈国胜 徐盈

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

原田健一

(日本名城大学药学部)

ISOLATION AND PURIFICATION OF FISH PROTEIN PHOSPHATASE

Xu Lihong, Zhang Yongyuan, Chen Guosheng and Xu Ying

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Kenichi Harada

(Faculty of Pharmacy, Meijo University, Nagoya 468, Japan)

关键词 鱼, 蛋白磷酸酶, 纯化, 抑制

Key words Fish, Protein phosphatase, Purification, Inhibition

蛋白磷酸酶是细胞中重要的调节酶, 广泛存在于细胞中, 细胞内蛋白的磷酸化水平依赖于蛋白激酶和蛋白磷酸酶的相对活力。研究表明, 蛋白磷酸化水平与肿瘤的促进作用密切相关, 激活蛋白激酶C(丝氨酸蛋白磷酸化酶)和抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(Protein phosphatase, 简称 PP)的物质都对肿瘤形成起促进作用, 这两种类型促肿瘤物质的典型代表是豆蔻酸乙酸大戟二萜酯(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 简称 TPA)和大田软海绵酸(okadaic acid), 其中, 大田软海绵酸仅对 PP 中的 PP1 和 PP2A 型有强烈抑制作用。近期对天然有毒物微囊藻毒素作用机理的研究发现, 这类物质对 PP1 和 PP2A 的抑制比大田软海绵酸更强, 因而是迄今最强的大田软海绵酸类的促肿瘤剂。对 PP1/PP2A 具极强抑制作用的物质的发现有重要意义, 从酶学研究来看, 由于这类物质对酶抑制作用专一和灵敏, 因而可作为很理想的分子探针用于对生物体内各类 PP 的研究; 从生态毒理学研究考虑, 由于 PP 抑制程度可反映一类具有相同作用机理物质的总量, 因而可用来定量检测环境中促肿瘤物的量以及用来评价化学品的潜在促肿瘤作用。

研究促肿瘤物对蛋白磷酸酶作用的报道中, 均是用哺乳动物作为材料, 关于鱼体蛋白磷酸酶的报道很少。由于作用机制相同, 且材料易得, 所以鱼的 PP1, PP2A 在水生态毒理学研究中具有重要的意义, 本实验研究了鱼肝蛋白磷酸酶分离纯化的方法, 以及丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶强抑制剂对几种酶制备

国家自然科学基金资助, 编号 39400024; 淡水生态与生物技术国家重点实验室资助。

1995年5月17日收到。

物的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 蛋白磷酸酶的分离纯化 取鲤鱼肝脏, 加含 0.25mol/L 蔗糖的缓冲溶液 A (50mmol/L Tris, pH7.4, 含 EDTA, EGTA, PMSF, 疏基乙醇和甘油), 匀浆, 经离心 (4500r/min, 30min) 和超速离心 (27000r/min/h), 上清液过 DEAE 纤维素 (DE 52) 柱(已用缓冲液 A 平衡), 用同样的缓冲液洗脱, 至紫外检测无吸收, 用含不同浓度 NaCl 的缓冲液 A 分别洗下 PP1 和 PP2A, 经超滤脱去小分子蛋白并浓缩, 分装, 贮存于 -20℃。

1.2 糖原磷酸化酶 b 的磷酸化 将一定量的糖原磷酸化酶 b, 糖原磷酸化酶激酶, γ -³²P-ATP 混合保温, 反应产物用饱和硫酸铵沉淀、离心, 用缓冲溶液洗数次, 超滤脱去未反应的 γ -³²P-ATP, 贮于冰箱中, 用时稀释至蛋白浓度 500μg/ml。

1.3 酶活力测定 反应系统包括 50μl H₂O (对照)或抑制剂, 30μl 缓冲液 B (170mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 含 EDTA, 疏基乙醇, 咖啡因和牛血清白蛋白), 10μl 底物, 10μl 酶 (PP1 或 PP2A), 于 30℃ 保温 10min, 用 50% TCA 终止反应, 冰浴中放置一定时间, 15000r/min 离心 5min, 取 150μl 上清用液体闪烁器计数。

2 结果与讨论

2.1 洗脱组分活力检测及稀释比的测定

洗脱组分相对活力以反应产生的 γ -³²P_i 占加入的底物的总 γ -³²P 计数的百分比来表示。对含 0.1mol/L NaCl 及含 0.2 mol/L NaCl 的缓冲液 A 洗脱的各组分测定脱磷酸化活力, 表明这两个组分均有酶活力, 用 ultrafree 超滤膜对两个组分分别进行浓缩, 浓缩组分进行酶活力测定, 在稀释倍数为 16, 8, 4, 2, 1 时, 测定对糖原磷酸化酶 a 脱磷酸化的活力, 结果见图 1。

根据文献报道, 纯化的 PP1 和 PP2A 的相对活力在百分之三十以内时, 酶蛋白量与活力呈线性关系, 而组织匀浆液中存在着干扰物质, 使酶蛋白量与活力呈线性关系的相对活力的值更小一些。从图 1 看出, PP2A 的相对活力低于百分之三十五时, 酶蛋白量与活力呈线性关系, 蛋白量 0—0.8μg; 6000g 上清的相对活力低于百分之三十时, 酶蛋白量与活力呈线性关系, 蛋白量 0—10μg; PP1 的活力很低, 即使用浓缩酶样活力也未达到百分之三十, 蛋白量 0—13μg。PP1 的活力比 PP2A 的要低得多, 这与哺乳动物中的一致。6000g 上清液包括了各种磷酸酶, 根据所采用的反应系统条件, 测出的应是 PP1 与 PP2A 活力的总和。

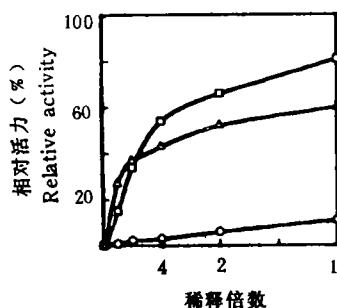


图 1 酶浓度与相对活力的关系

Fig. 1 Relationship between enzyme concentration and relative activity.

□ PP2A; △ 6000g 上清; ○ PP.

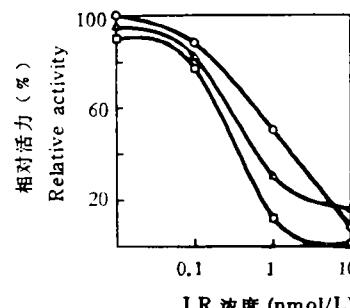


图 2 LR 对几种酶制备物的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of LR to enzyme preparations

酶抑制实验中，PP1 采用原浓缩酶样，PP2A 由浓缩样稀释 8 倍后用于实验，6000g 上清稀释 16 倍后用于实验。

2.2 抑制剂作用的研究

酶抑制实验中用不加抑制剂时的酶活力作为百分之百，测定不同抑制剂浓度时的酶的相对活力。用迄今发现的最强的大田软海绵酸类的促肿瘤剂微囊藻毒素 LR 对三种酶制剂进行抑制实验，结果见图 2。

由此图计算出 LR 对三种酶的半抑制浓度 IC_{50} 分别为，PP2A，0.28 nmol/L，PP1，1 nmol/L，6000g 上清，0.45 nmol/L。表 1 列出了 LR 对一些哺乳动物或鸟类蛋白磷酸酶的 IC_{50} ，本文所报导的结果与这些非常接近。

表 1 LR 对蛋白磷酸酶的半抑制浓度
Tab. 1 IC_{50} of LR to protein phosphatase

酶类型 Enzyme type	半抑制浓度 IC_{50} (nmol/L)	参考文献 Reference
鸡前脑，500g，10min，上清	0.33	[1]
鼠皮肤，PP2A	0.8	[2]
鼠脑，PP2A	0.28	[3]
兔骨骼肌，PP1	1.7	[4]
鱼肝，6000g，30min，上清	0.45	本文
鱼肝，PP2A	0.28	本文
鱼肝，PP1	1	本文

由图 2 可见，酶相对活力对 LR 浓度的对数作图呈典型的 S 形曲线，本研究结果与其它用哺乳动物作材料的研究报道是类似的。本研究所得出的几种酶制备物的 IC_{50} 以 PP2A 的最低，即对 LR 的反应最灵敏，而 6000g 上清的介于 PP1 与 PP2A 两者之间，这反映了总的蛋白磷酸酶活力对 LR 的反应。

本研究结果与用哺乳动物研究的结果一致，因而可用鱼的蛋白磷酸酶进行大田软海绵酸类促肿瘤物质检测的研究。由于 6000g 上清的 IC_{50} 与 PP2A 的无数量级差别，因此，在作用模式相同的前提下，用 6000g 上清作为酶制备物研究促肿瘤作用将更为方便。

参 考 文 献

- [1] Alistair T R, et al. Protein Phosphatase activity in cyanobacterial: consequences for microcystin toxicity analysis. *Toxicol.*, 1993, 31 (9): 1179—1186.
- [2] Matsushima R, et al. In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and Nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem. Biophys Res Commun.*, 1990, 171 (2): 867—874.
- [3] Noshiwaki-Matsushima R, et al. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Jpn J Cancer Res* 1991, 82: 993—996.
- [4] Honkanen R E, et al. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatase. *J Biol Chem*, 1990, 265 (32): 19401—19404.