DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.015
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0747-03

论著

大鼠脾脏20S蛋白酶体的分离纯化及电镜观察

李蓉芬,倪 兵,李渝萍,周建新 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 分离纯化正常大鼠脾脏20S蛋白酶体,并观察其形态特征。方法 采用分级盐析、离子交换层析及凝胶过滤方法,分离纯化了正常大鼠脾脏20S蛋白酶体,并进行透射电镜观察。结果 所制备的20S蛋白酶体纯度较高,非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)显示1条带,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示8条带,分子量为(19.8~31.7)×10^3;电镜观察显示,脾脏20S蛋白酶体呈现典型的圆筒状,具有同其它细胞20S蛋白酶体一样的形态特征。结论 这为进一研究20S蛋白酶体结构与功能的关系奠定了基础。

关键词:20S蛋白酶体;蛋白质纯化;蛋白质电镜
中图法分类号:R322.21;R345 文献标识码:A

Isolation, purification and observation of 20S proteasome from rat spleen

LI Rong-fen, NI Bing, LI Yu-ping, ZHOU Jian-xin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To isolate and purify 20S proteasome from normal rat spleen and observe its morphologic features. Methods 20S proteasome was isolated and purified with salt fraction, anion exchange column chromatography and gel filtration methods and its morphologic features were observed with transmission electron microscopy. Results The high purity of isolated 20S proteasome was confirmed with PAGE showing 1 band. The enzyme was depolymerized into 8 subunits with molecular weight of (19.8—31.7)×10^3 with SDS-PAGE. A typical cylinder shape was demonstrated under transmission electron microscope just as the morphological feature of 20S proteasome from other cells. Conclusion This study founds a basis for the further study on the structure and functions of 20S proteasome.

Key words: 20S proteasome; purification of protein; electron microscope of protein

20S蛋白酶体(20S proteasome)又称多催化功能蛋白酶体(Multicatalytic protease complex, MPC),于1983年首次由Wilk和Orlowski[1]从脑垂体中分离得到,它具有糜蛋白酶样和胰蛋白酶样等活性,其沉降系数为20S,分子量为694.4×10^3。这种酶体存在于所有被检真核细胞的胞核和胞浆中,占胞内可溶性蛋白质的1%左右[2]。20S蛋白酶体是分子量更大的26S蛋白酶体的催化中心[1],后者催化能量依赖的、非溶酶体蛋白质降解途径,主要降解胞内泛素化(Ub化)蛋白[3],是细胞内蛋白质降解的主要途径之一,对细胞的生命活动具有重要作用。为进一步研究其结构与功能,我们分离纯化了正常大鼠脾脏20S蛋白酶体,并进行了电镜观察。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar健康大鼠,雌雄不拘,体重200~300 g,由本校动物所提供。

1.2 主要材料和试剂

合成三肽 Carbobenzyloxy-Val-Gly-Arg-4-nitroanilide acetate (Sigma), DE-52(Whatman进口分装), Sephadex G-200(Pharmacia),低分子量标准蛋白、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等购自华美公司。

作者简介:李蓉芬(1963—),女,安徽省宿州市人,硕士,实验师,主要从事蛋白酶体的结构与功能方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752261

收稿日期:2000-03-11;修回日期:2000-05-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 方法

1.3.1 大鼠脾脏20S蛋白酶体的分离纯化及活性测定 参见倪兵等[4]的方法进行，改进之处在于其中采用Sephadex G-200凝胶过滤，以利缩短分离纯化的周期。

1.3.2 蛋白质定量 按Bradford法[5]进行，以250 μg/ml牛血清白蛋白作标准。

1.3.3 电泳鉴定 分别采用6% PAGE和12% SDS-PAGE电泳鉴定纯度及分子量。

1.3.4 电镜观察 纯化的大鼠脾脏20S蛋白酶体，采用醋酸铀酰负染制样，JEM-2000EX透射电镜观察摄片。

2 结果

2.1 大鼠脾脏20S蛋白酶体的提取、纯化

大鼠脾脏经第1步匀浆、离心，第2步$(NH_4)_2SO_4$分级盐析后得粗提物，然后进行DE-52阴离子交换柱层析，用含0.15～0.4 mol/L NaCl的梯度缓冲液Ⅱ洗脱，经20S蛋白酶体活性测定，确认活性峰为含0.2 mol/L NaCl缓冲液Ⅱ的洗脱峰，见图1。最后进行Sephadex G-200凝胶过滤，用缓冲液Ⅱ进行洗脱，经20S蛋白酶体活性测定结果显示，洗脱第1峰为活性峰，见图2。

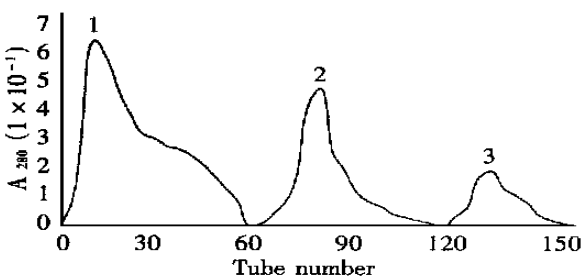


图1 **DE-52**离子交换柱层析图谱

Fig 1 DE-52 anion exchange column chromotography of the proteasome

1: 0.15 mol/L NaCl elution peak; 2: 0.2 mol/L NaCl elution peak (activity peak); 3: 0.25 mol/L NaCl elution peak

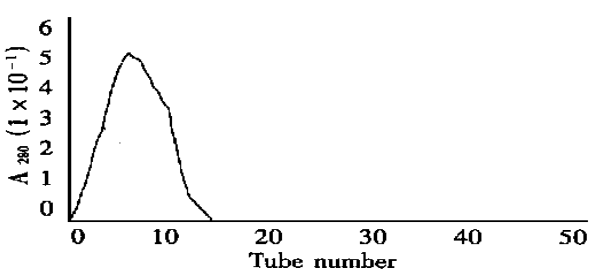


图2 **Sephadex G-200**凝胶过滤层析图谱

Fig 2 Sephadex G-200 gel filtration of the proteasome

2.2 酶纯度鉴定

将纯化好的酶体进行PAGE电泳，银染法染色，结果显示1条带，见图3。SDS-PAGE电泳，考马斯亮蓝染色，结果同本室采用改进前方法提取的大鼠骨骼肌20S蛋白酶体类似，但脾脏20S蛋白酶体出现不同的亚基分布，见图4右侧箭头所示。



图3 **Sephadex G-200**凝胶过滤洗脱峰的**PAGE**电泳结果(银染法染色)

Fig 3 Results of PAGE of the first elution peak from Sephadex G-200 gel filtration (Silver staining)

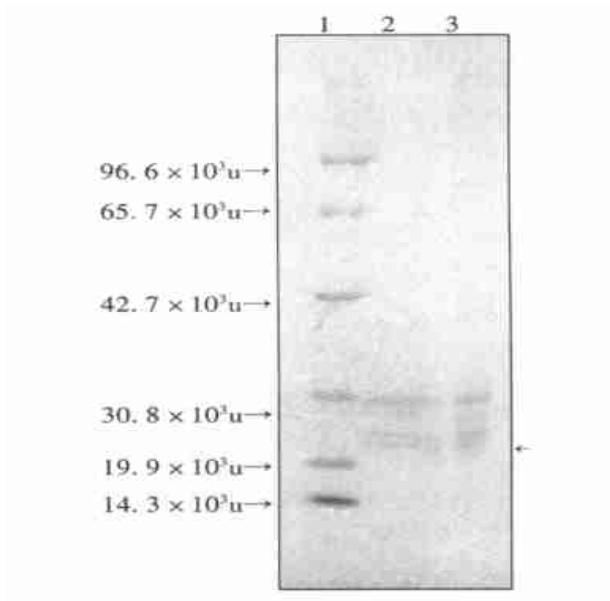


图4 **Sephadex G-200**凝胶过滤峰的**SDS-PAGE**电泳结果 (考马斯亮蓝染色)

1: 蛋白质分子量标准; 2: 大鼠骨骼肌20S蛋白酶体; 3: 大鼠脾脏20S蛋白酶体

Fig 4 Results of SDS-PAGE of activity peak from Sephadex G-200 gel filtration (Coomassie Brilliant blue staining)

1: Protein marker; 2: 20S proteasome from normal rat skeletal muscle; 3: 20S proteasome from normal rat spleen

2.3 大鼠脾脏20S蛋白酶体的电镜观察

当放大倍数为50 000倍、电压80 kV时，电镜观察到脾脏组织呈现典型的20S蛋白酶体形态特征，即正面像为圆环状，中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

央有着色黑点, 侧面像为圆盘堆积的圆筒状, 见图 5。

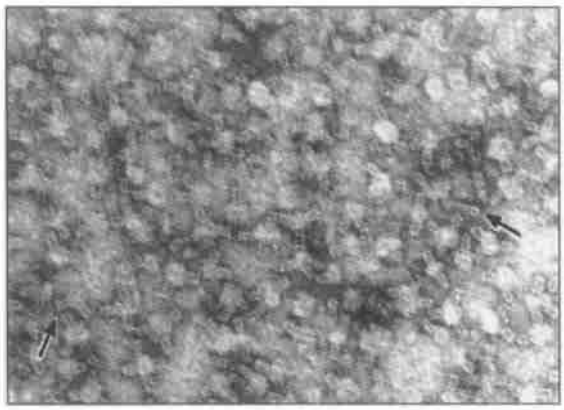


图 5　透射电镜显示大鼠脾脏 **20S** 蛋白酶体　箭头示正、侧面像　(× 50 000)

Fig 5　Transmission electron microscope revealed 20S proteasome from normal rat spleen　Arrow showing face and profile　(× 50 000)

3　讨论

本研究中采用的 20S 蛋白酶体分离纯化方法是综合国外许多学者的各种方法, 在本室沿用的改进方法[4] 基础上又作了进一步的改进。由于 20S 蛋白酶体分子量为 694.4× 10^3, 改用 Sephadex G-200 凝胶过滤, 可一次性将 20S 蛋白酶体与 595.2× 10^3 以下的杂蛋白分开, 从而大大缩短了分离纯化的周期。结果表明, 此法简单易行、稳定可靠。

Cardozo 等[6] 的工作证实, 从牛脑垂体、肺和肝提取的 MPC 具有明显不同的亚基组成和催化活性。Eleuteri 等[7] 的实验表明, 在牛的脾脏 20S 蛋白酶体亚基组成上, 出现了明显的亚基取代现象, 即受干扰素诱导的 LMP_7、LMP_2 和 $MECL_1$ 亚基取代了常在许多组织中表达的 X、Y、Z 亚基, 因此有人称之为"免疫蛋白酶体"[8]。本实验也观察到脾脏 20S 蛋白酶体较之于骨骼肌, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果出现了不同的亚基分布, 证实了大鼠脾脏 20S 蛋白酶体也存在明显的亚基取代现象。这种迁移率的不同可能是由于转录后修饰的结果, 如磷酸化或糖基化, 也有可能是由于限制性的蛋白质水解引起亚基分子量的改变。LMP_7 和 LMP_2 是 MHC Ⅱ类基因产物, 其氨基酸序列与 MPC 的 X、Y亚基的序列相关, 这两个基因在抗原的早期加工提呈中, 以及将胞浆蛋白质变成短肽的过程中起作用, 因此 MPC 在抗原的加工提呈方面发挥了重要作用, 而脾脏高活性的 20S 蛋白酶体, 更利于抗原的加工提呈。Adams 等[9] 通过电镜及图像分析, 观察到 20S 蛋白酶体正面像为圆环状, 中央腔有明显着色, 侧面像显示构成蛋白酶体的亚基呈堆积的圆筒状。但是, 有亚基替换的脾脏 20S 蛋白酶体基本结构是否有改变, 至今无文献报道, 也未见大鼠脾脏 20S 蛋白酶体电镜观察的报道, 为此, 我们将分离纯化的大鼠脾脏 20S 蛋白酶体进行了电镜观察, 结果显示, 脾脏组织呈现出同 Adams 等[9] 描述的 20S 蛋白酶体一样的形态特征。

参考文献:

[1] Wilk S, Orlowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex[J]. J Neurochem, 1983, 40(3): 842－849.

[2] Tanaka K, Li K, Ichihara A, *et al*. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. Purification, enzymological properties, and tissue distribution[J]. J Biol Chem, 1986, 261(32): 15 197－15 203.

[3] Ciechanover A. The ubiqutin-proteasome proteolytic pathway[J]. Cell, 1994, 79(1): 13－21.

[4] 倪　兵, 周建新, 董燕麟, 等. 大鼠骨骼肌多催化功能蛋白酶的提取、鉴定及其抗血清的制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(6): 736－741.

[5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(7): 248－254.

[6] Cardozo C, Eleuteri A M, Orlowski M. Differences in catalytic activities and subunit pattern of multicatalytic proteinase complexes (proteasomes) isolated from bovine pituitary, lung, and liver. Changes in LMP7 and the component necessary for expression of the chymotrypsin-like activity[J]. J Biol Chem, 1995, 270(38): 22 645－22 651.

[7] Eleuteri A M, Kohanski R A, Cardozo C, *et al*. Bovine spleen multicatalytic complex (proteasome)[J]. J Biol Chem, 1997, 272(18): 11 824－11 831.

[8] Tanaka K. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing[J]. J Leukoc Biol, 1994, 56(5): 571－575.

[9] Adams G M, Falke S, Goldberg A L, *et al*. Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes[J]. J Mol Biol, 1997, 273(3): 646－657.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net