

一种来源于酵母 *Y. Lipolytica* 的新型蛋白质激酶 ——酪蛋白激酶 II 的制取、纯化、分子结构及特性

沈 辉 Thierry Chardot Chantal Burghoffer J. C. Meunier

(无锡轻工大学) (法国国家农业科学院)

(法国国立农业大学)

摘要 培育了酵母菌种 *Y. Lipolytica* (wild W-29), 并从中制取、纯化了一种蛋白质激酶——酪蛋白激酶 II (CK-II)。这种酶是一个四聚体 $\alpha_2\beta_2$, 其分子量为 158kD。

主题词 酵母菌属; 蛋白激酶; 纯化; 磷酸化作用 / *Y. Lipolytica*; 酪蛋白激酶 II;

中图分类号 TS201.25

0 前 言

酪蛋白激酶 II (CK-II) 是一种多功能、既不受钙又不受环状 AMP (c-AMP) 调节的蛋白质激酶, 它能专一地对蛋白质中的丝氨酸 (Ser.) 和苏氨酸 (Thr.) 进行磷酸化^[1,2]。酪蛋白激酶 II 对食用蛋白质的磷酸化, 能显著改善蛋白质的食用功能性质, 使其质量得到提高。此外, 纯的酪蛋白激酶 II 还能被广泛应用于医药等行业。这种酶存在于大部分的动、植物和微生物中。Hataway^[3]等首先从兔子血液中提取了它; Vanio Mitev 等^[4]从牛脑中制取了 CK-II。还有的科学家从大麦^[5]、豌豆^[6]、果蝇^[7]等生物中制取了 CK-II。

纯的 CK-II 的分子结构是一个四聚体, 由 $\alpha\beta$ 或 $\alpha\alpha'$ 两种 (4 个 $\alpha_2\beta_2$, 或 $\alpha_2\alpha'_2$) 亚基组成^[7]。其亚基 α 或 α' 的分子量为 36~44kD, 亚基 β 的分子量约为 41kD^[1]; 整个分子的分子量是 120~160kD^[8,1]。CK-II 在对其底物的催化反应中, 亚基 $\alpha\alpha'$ 起催化作用, 亚基 β 起调节作用^[9,10], 使底物蛋白质一级结构序列 Ser/Thr-X-X-Asp/Glu 中的 Ser. 和 Thr. 磷酸化^[10]。

自然界中酵母的种类很多, 其中许多种能被广泛应用于食品、医药、农业等领域。*Yarrowia Lipolytica* (*Y. Lipolytica*) 是一种酵母, 其名称由 Van der Walt 等命名^[11], 并已被批准应用于食品工业。这种菌种, 经过法国国家农业科学院 (INRA) 生物工程技术中心 (CBAI) 的遗传变异选育, 能高产酪蛋白激酶 II 和磷酸酶^[12]。

1 实验方法与材料

1.1 酵母菌种的培育

酵母菌种 *Yarrowia Lipolytica* (souch W-29), 由法国国家农业科学院生物工程技术中

收稿日期: 1995-08-28

心微生物及遗传实验室提供。

选用三种液体培养基(Medium I, II, III)作对比;这三种培养基都主要由酵母提取物(Life Technology LTD, U. K.),生物蛋白胨(DIFCO Laboratory, U. S. A.)和D(+)-葡萄糖(SIGMA)——又称YPD组成。但是,与Medium I相比,Medium II强化了葡萄糖,Medium III强化了无机磷酸盐。

首先将菌种接种到固体培养基上,在28℃条件下培养数个小时,然后将其接种到液体培养基上,在28℃恒温振荡条件下培养数小时,再将其稀释接种到液体培养基上,在28℃恒温振荡条件下培养计时。

1.2 细胞的计数

使用分光光度计(BECKMAN),在波长570nm处测定酵母菌种*Yarrowia Lipolytica*在培养液中的浓度,与标准相对应,从而间接得知单位体积培养液中菌种细胞的数量。也可使用细胞计数器(Cellule de Mallassez),并借助于显微镜直接计数。

1.3 CK-Ⅱ的制取

1.3.1 细胞的破碎及离心分离 在低温(液体二氧化碳)条件下,酵母细胞于破碎缓冲液中,加入球型固体微粒(Glasperlen,直径0.12~0.18mm),超高速振荡破碎。破碎液于超高速低温离心机(SIGMA,JA 20)内,在转速18500r/min、温度4℃条件下离心分离。收集离心液。

1.3.2 离心液中CK-Ⅱ的分离、浓缩、纯化 首先将层析需用的磷酸纤维素(Whatman Corp., Fibrous Cation Exchanger, P11)用酸、碱、缓冲液洗涤,活化。然后将其装入层析柱(600cm)内,用缓冲液平衡。加入上述离心液于层析柱中,通入缓冲洗脱液,对CK-Ⅱ进行梯度洗脱分离。用自动分步收集器定量收集洗脱液于各试管中,并对各试管中CK-Ⅱ活力和蛋白质含量进行测定。保留CK-Ⅱ活力较高的部分,继续进行以下实验。

将以上样液装入透析膜Tuyau(20kD, POLYLABO)内,在低温去离子水(Milli Q, 0~4℃)中、于搅拌条件下透析一夜。

使用高效液相色谱仪(PHARMACIA),清洗、平衡配用的Hi-Trap Heparine(Heparine-Sepharose, PHARMACIA)柱,然后加入上述透析液于柱中,通入梯度缓冲洗脱液,对CK-Ⅱ进行浓缩、分离。用自动分步收集器定量收集洗脱液于各试管中,并对各试管中CK-Ⅱ活力和蛋白质含量进行测定。保留CK-Ⅱ活力较高的样液部分,继续进行以下实验。

清洗、平衡高效液相色谱仪的Superdex-200柱,然后加入上述样液于柱中,通入缓冲洗脱液,对CK-Ⅱ进行纯化、分离。用自动分步收集器定量收集洗脱液于各试管中,并对各试管中CK-Ⅱ活力和蛋白质含量进行测定。保存CK-Ⅱ溶液的部分。

将纯品CK-Ⅱ溶液储存于-20℃、密封的条件下备用。

1.4 CK-Ⅱ的活力测定和对蛋白质的磷酸化

由于这一实验使用放射性同位素³²P作标记,故在防辐射实验室内进行。

CK-Ⅱ以经过酶促脱磷酸的牛酪蛋白(SIGMA)、ATP及具有放射性的ATP([³²P]-ATP, BIOTECHNOLOGIE)为底物,在温度20℃、pH8的缓冲液中催化蛋白质磷酸化。示踪物——放射性同位素³²P——由闪烁测定仪(KONTRON)测定,放射量的大小以CPM表示。

CK-Ⅱ的活力,是以单位时间(min)内、催化单位数量(mol/L)ATP的磷酸基,结和到单

位质量(μg)牛酪蛋白质上来定义的。CK-Ⅰ活力的大小与 CPM 的量成正比。

CK-Ⅰ的一个活力单位(u)为:一分钟内、催化 10^{-12}molATP 的磷酸基结和到 $25\mu\text{g}$ 牛酪蛋白质上(0.5mg/ml),所需酶的量。

1.5 蛋白质含量的测定

选用 BRADFORD 法^[13]。

1.6 CK-Ⅰ纯度、分子结构及分子量的确定

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(薄板)电泳(SDS-PAGE, NOVEX Pre-Cast, gradient 4%~20% polyacrylamide)和高效液相色谱法(SHEN Hui, 1994)。

2 结果与讨论

2.1 酵母的培育

2.1.1 培育时间的影响 酵母 *Yarrowia Lipolytica* 于培养基中在 28°C 恒温条件下,培养 2h 后,定时取样,用上述两种方法同时测定酵母细胞在不同培养时间的数量,结果见图 1。

由图 1 可知,随着培养时间的增长,8h 后,酵母细胞的数量显著增加,但培养到 24h 后不再增加,表明此时培养基中的养分几乎被消耗殆尽,不能再维持细胞的生长、繁殖。

2.1.2 培养基的影响 酵母 *Yarrowia Lipolytica* 于三种不同培养基中,在 28°C 恒温条件下培养,定时取样,测定酵母细胞在不同培养时间内的数量及所含 CK-Ⅰ的活力大小,结果见图 2,表 1。

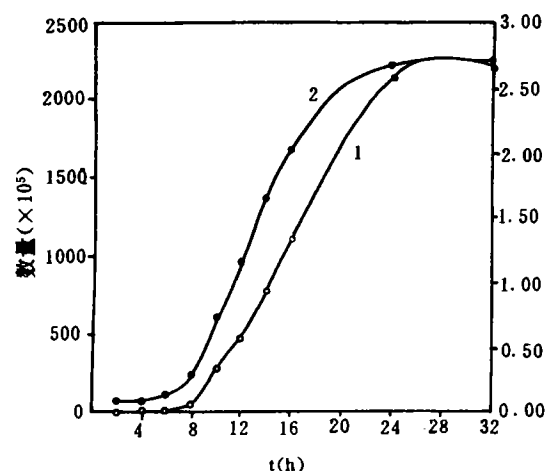


图 1 酵母菌种培育时间对细胞数量的影响

1 数量 2 DO

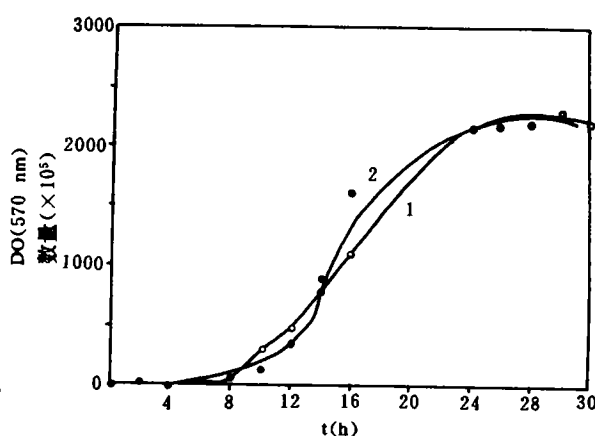


图 2 酵母菌种培养基对细胞数量的影响

1 Medium I 2 Medium II

图 2 结果表明,对于酵母的生长、繁殖,培养基 I 与 II 的效果无多大差异。因此,葡萄糖在培养基中的含量为 10g/L 已足够。

但是,由表 1,图 3 可知,酵母在 Medium II 及 III 中的生长、繁殖有较大的差异:在 Medium II 中,培养时间在 27h 内时,细胞繁殖的数量和所含 CK-Ⅰ的活力,都明显高于在 Medium III 中培养的酵母。这可能是由于 Medium III 中添加的无机磷酸盐减少了酵母中磷酸脂酶的生成^[14],进而影响了 CK-Ⅰ的生成及活力。再之,酵母在 Medium II 及 III 中的生长、繁殖

中,细胞繁殖的数量和所含 CK-Ⅰ 的活力都随着培养时间的增加而增高,并在 20h 时都达到最高值,20h 后细胞数量不再增加,CK-Ⅰ 的活力降低。因此,此酵母旺盛繁殖生长并产出高活性 CK-Ⅰ 的较佳条件是:在培养温度为 28℃(1)条件下,选用 YPD 液体 Medium Ⅰ,培养时间 20h。

表 1 培养基对酵母生长和 CK-Ⅰ 的影响

时间(h)	14	16	18	20	23	25/27
细胞数 ($\times 10^7$)	8* 4**	15 14	18 16	19 17	19 17	— —
CK-Ⅰ 活性 (u)	0.70* 0.16**	0.89 0.89	1.94 1.34	3.15 1.4	1.62 0.74	2.21 1.38
CK-Ⅰ 活性 (u/mg 细胞)	93* 17**	80 84	215 137	95 103	120 50	74 52

* Medium Ⅰ ** Medium Ⅱ

2.2 CK-Ⅰ 的制取、纯化

2.2.1 酵母细胞的破碎及超速离心分离 在低温(液体二氧化碳)条件下,酵母细胞于破碎缓冲液中与球形固体微粒超高速振荡破碎。经过破碎,细胞内含物(包括 CK-Ⅰ)被释放出来,溶于缓冲液中。然后,破碎液于超速低温离心机内,在转速 18500r/min、温度 4℃ 条件下离心分离,收集离心液。

2.2.2 磷酸纤维素柱层析 在低温实验室(4℃)中,加入上述离心液于层析柱中,通入缓冲液洗脱液,对 CK-Ⅰ 进行梯度(0.2~1.0mol/L NaCl)洗脱分离。用自动分步收集器定量收集洗脱液(0.5ml)于各试管中,并对各试管中 CK-Ⅰ 活力和蛋白质含量进行测定,保留 CK-Ⅰ 活力较高的部分。结果如图 3。

图 3 结果表明,在磷酸纤维素柱层析分离 CK-Ⅰ 过程中,随着洗脱液洗脱体积的增加(NaCl 浓度升高——梯度升高),收集到的蛋白质的量减少;而 CK-Ⅰ 的量趋于增加,并在梯度达到约 0.7mol/L NaCl 时,最大量的 CK-Ⅰ 被分离、洗脱出来。这一结果与 Vanio Mitev 从牛脑^[4]、Shuqun Zhang 从豌豆^[15]中用磷酸纤维素柱层析制取、分离 CK-Ⅰ 的结果相似。但是,磷酸纤维素柱层析对 CK-Ⅰ 只是初步的粗的分离和纯化,尚需使用高效液相色谱仪进一步对 CK-Ⅰ 进行纯化。

2.2.3 高效液相色谱(HPLC)层析 将以上经过磷酸纤维素初步分离、纯化的样液,用透析膜透析,去除 NaCl 等杂质,然后使用高效液相色谱仪分离、纯化 CK-Ⅰ。先用 Hi-Trap Heparine (Heparine-Sepharose, PHARMACIA)柱对透析液中的 CK-Ⅰ 进行浓缩、分离(结果见图 4)。用自动分步收集器定量收集洗脱液于各试管中,并对各试管中 CK-Ⅰ 活力和蛋白质含量进行测定,保留 CK-Ⅰ 活力较高的样液部分。再用 Superdex-200 柱对 CK-Ⅰ 进行纯化,收集洗脱液于各试管中,对 CK-Ⅰ 活力和蛋白质含量进行测定,保留 CK-Ⅰ 活力较高的样液,结果见图 5。

由图 5 可知,CK-Ⅰ 已被高效液相色谱仪的 Hi-Trap Heparine (Heparine-Sepharose, PHARMACIA)柱有效地浓缩、分离。同时对蛋白质含量进行测定,保留 CK-Ⅰ 活力较高的样液再经高效液相色谱仪的 Superdex-200 柱的层析(结果见图 5),CK-Ⅰ 被高度纯化,经测定其相对活力达到 1085u/mg,比酵母的破碎离心液提高了 960 倍。经计算,用以上方法,2.8g 酵母蛋白质可产出 1μg 的 CK-Ⅰ,总活力的得率为 58%。

2.3 CK-Ⅰ 的纯度及分子特性

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(薄板)电泳和高效液相色谱法,对制取、纯化的 CK-Ⅰ 的纯度及分子特性进行了测定、研究,结果见图 5,图 6。从图 5 和图 6 可知,CK-Ⅰ 已被纯化均

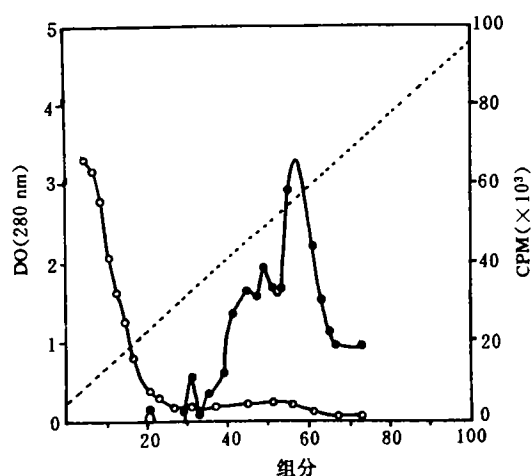


图3 磷酸纤维素层析柱对 CK-Ⅱ 的分离纯化

1 DO 2 CPM

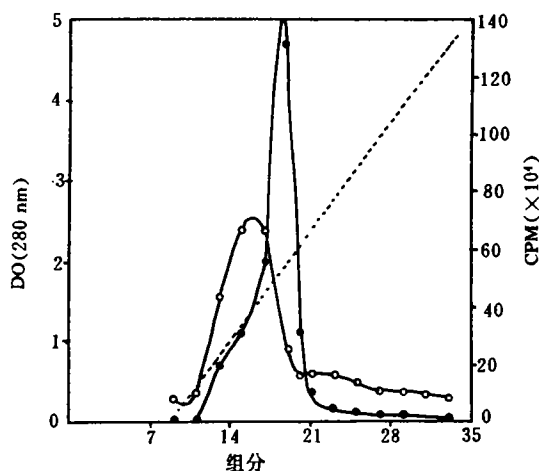


图4 高效液相色谱对 CK-Ⅱ 的分离纯化(1)

1 DO 2 CPM

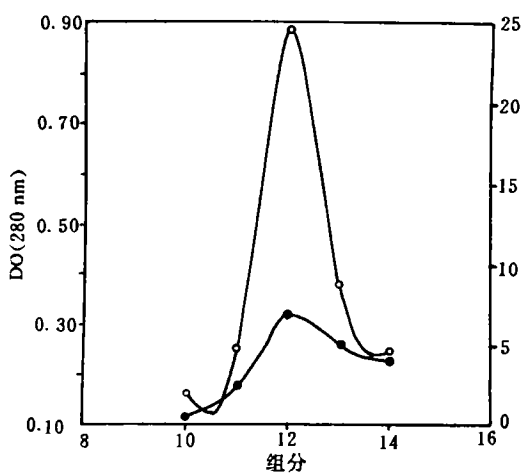


图5 高效液相色谱对 CK-Ⅱ 的分离纯化(2)

1 CPM 2 DO

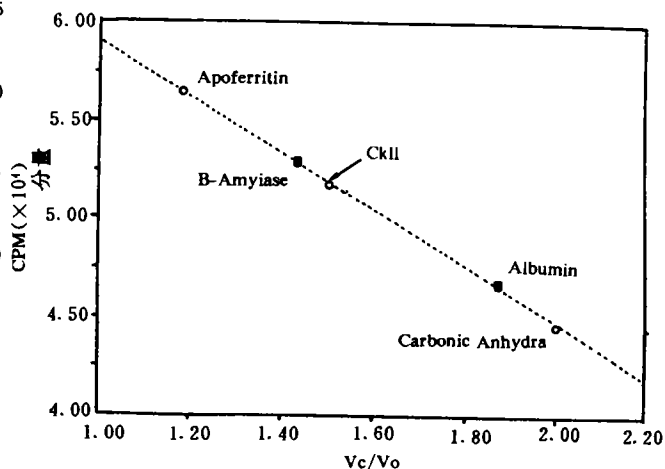


图6 HPLC CK-Ⅱ 分子量

一体,这种酶是一个四聚体 $\alpha_2\beta_2$,由 $\alpha\beta$ 两种(4个)亚基组成,其分子量为 158kD.

综之,我们培育了酵母菌种 *Y. Lipolytica* (wild W-29),并从中制取、纯化了一种蛋白质激酶——酪蛋白激酶Ⅱ(CK-Ⅱ).在研究中发现,此酵母繁殖生长并产出高活性酪蛋白激酶Ⅱ的较佳条件是:1)选用 YPD 液体培养基;2)培养时间 20 小时;3)培养温度为 28℃.在低温 4℃条件下,采用细胞破碎、高速离心、柱色谱层析、膜透析、高效液相色谱等方法,提取、分离、纯化了 CK-Ⅱ.经研究发现,这种酶是一个四聚体 $\alpha_2\beta_2$,由 $\alpha\beta$ 两种(4个)亚基组成,其分子量为 158kD.

参 考 文 献

- 1 Pinna L A. Casein kinase 2: an eminence gris in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta*. 1990,1054:267~284
- 2 Tuazon P T, Traugh J A. Casein kinase I and II -multipotential serine protein kinase: structure, function and regulation, *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1991,23:123~164
- 3 Hataway G M, Traugh J A. Cyclic Nucleotide- independent Protein Kinases from Rabbit Reticulocytes; Purification of Casein Kinase, *J. Biol. Chem.* 1979,254: 762~768
- 4 Vanio Mitev, Alain Pauloin, and Louis- Marie Houdebine, Purification and Characterization of Two Casein Kinase Type I Isozymes from Bovine Brain Gray Matter, *Journal of Neurochemistry*. 1994,63(2)
- 5 Pereverzeva I N, Selivankina S Y. Calcium-Dependent and Phospholipid-Dependent Protein Kinase from Barley Leaves-Isolation, Cross-Reactivity, and Properties, *Russian Journal of Plant Physiology*, 1994,41:3
- 6 Li H, Roux S J. Purification and characterization of a casein kinase I type protein kinase from pea nuclei, *Plant Physiology*, 1992,99:686~692
- 7 Glover C V C, Shelton E R, Brutlag D L. Purification and characterization of a type I casein kinase from *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.* 1983, 285:3258~3265
- 8 Matsumura S, Murakami N and Tashiro Y, et al. Identification of calcium-independent myosin kinase with casein kinase I, *Arch. Biochem. Biophys.* 1983,227: 125~135
- 9 Lin W-J, Tuazon P T, Traugh J A. Characterization of the catalytic subunit of casein kinase I expressed in *Escherichia coli* and regulation of activity, *J. Biol. Chem.* 1991,266: 5664~5669
- 10 Meggio F, Pinna L A. Subunit structure and autophosphorylation mechanism of casein kinase-TS (type-2) from rat liver cytosol, *Eur. J. Biochem.* 1984,145:593~599
- 11 Van der Walt J P, Von Arx J A. The Yeast Genus *Yarrowia* Gen. Nov., *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol.* 1980,46:517~521
- 12 SHEN Hui, Thesis of Doctorat of Pierre & Marie Curie University (Paris VI), 1994
- 13 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.* 1976,72:248~254
- 14 Galabova V, Tuleva B, Balasheva M. Phosphatase activity during growth of *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 109:45~48
- 15 Shuqun Zhang, Jin C D, Roux S J. Casein Kinase I - Type Protein Kinase from Pea Cytoplasm and Its Inactivation by Alkaline Phosphatase in Vitro, *Plant Physiol.* 1993,103: 955~962

A new Protein Kinase-Casein Kinase II from Yeast *Y. Lipolytica*

Shen Hui (Wuxi University of Light Industry)

Thierry Chardot (Institut National de la Recherche Agronomique)

Chantal Burghoffer J. C. Meunier (Institut National Agronomique Paris-Grignon)

Abstract The yeast *Yarrowia. Lipolytica* (wild W-29) has been used to produce one kind of protein kinases — Casein Kinase II (CK-II) for improving the functional properties of the food proteins. The conditions for growing the yeast *Y. Lipolytica* have been investigated. Moreover the molecular structure of CK-II is a tetramer of about 158kD. molecular weight.

Subject-words Saccharomyces; Protein kinase; Purification; Phosphorylation / *Y. Lipolytica*; Casein Kinase II