

研究简报

615 小鼠血红蛋白 α 链的氨基酸组成
及个别肽段的氨基酸序列

武金霞* 张贺迎 王建平 吴经才

(河北大学生命科学学院, 保定 071002)

摘要 用 CM-Cellulose 23 柱层析分离纯化了 615 小鼠珠蛋白 α 链, 测定其 N 端氨基酸残基为缬氨酸。615 小鼠珠蛋白 α 链含有 141 个氨基酸残基, 其中 19 个亮氨酸残基, 10 个组氨酸残基, 9 个缬氨酸残基, 上述氨基酸残基的数目与文献中其亲本 C₅₇BL 不同。用胰蛋白酶水解 615 小鼠珠蛋白 α 链, 发现有不溶性的‘核心’和可溶性的酶解片段。其中一个酶解肽段从 N 端数第 8 位氨基酸残基发生了突变, 由亲本的缬氨酸变为亮氨酸。

关键词 615 小鼠, 珠蛋白, 氨基酸组成, 氨基酸序列

学科分类号 Q51

血红蛋白是较早测定出一级结构的蛋白质, 珠蛋白链的快速分离纯化、氨基酸组成及氨基酸序列分析是研究生物进化、分子病防治、基因突变及基因与表达的重要基础^[1]。615 小鼠是我国首次培育成功的近交系小鼠, 其亲本是 C₅₇BL 小鼠和昆明种小鼠。有人对 615 小鼠血红蛋白作过遗传学分析^[2], 但其珠蛋白链的生化性质未见报道。本文介绍了一种大量纯化血红蛋白珠蛋白链的方法, 测定了 α 链的 N 端氨基酸残基、氨基酸组成及个别肽段的氨基酸序列, 为积累 615 小鼠的鉴定资料提供一些依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

615 小鼠 (中国医学科学院血液学研究所提供), CM-Cellulose 23 (浙江黄岩化工厂), 4, N, N'-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯 (DABITC) 和异硫氰酸酯 (PITC) (Whatman 公司产品), 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司), 氨基酸自动分析仪 (日本日立 835-50)。

1.2 方法

1.2.1 615 小鼠珠蛋白链的制备: 参考文献 [3] 并加以改进, 在去除血红素的过程中充氮气, 保证血红素去除完全及珠蛋白不被氧化。

1.2.2 615 小鼠珠蛋白链的醋酸纤维素薄膜电泳: 用含有 9 mol/L 脲的 pH 6.4 磷酸盐缓冲液溶解 615 小鼠珠蛋白为 10 g/L, 以微量进样器在浸膜过

的醋酸纤维素薄膜的粗糙面距正极端 1.5 cm 处点样 1.5 μ L, 平衡 15 min 后电泳, 电压为 1.8 V/cm, 电流为 1 mA, 缓冲液为 pH 6.4, 电泳 2.5 h 后取出薄膜, 染色, 脱色, 制干。

1.2.3 615 小鼠珠蛋白链的分离纯化: 参考文献 [4] 加以改进。将 8 mol/L 脲通过 732 阳离子交换树脂柱和 717 阴离子交换树脂柱去离子, 使溶液的电导率小于 $0.14 \times 10^{-4} \mu\text{Q/cm}$, 用此溶液配制缓冲液, 将已解链的 615 小鼠珠蛋白样品上预先用起始缓冲液平衡好的 CM-Cellulose 23 柱, 待样品进入柱床后, 分别以起始缓冲液和线性梯度缓冲液洗脱。

1.2.4 615 小鼠珠蛋白 α 链的脱盐: 将上述洗脱液碘乙酸化以保护还原性的巯基, 抑制肽链聚合^[5], 将样品上以 0.8% 甲酸溶胀并平衡好的 Sephadex G-25 柱脱盐, 以 0.8% 甲酸洗脱, 收集对应于肽链吸收峰的洗脱液, 冷冻干燥, 即为无盐的珠蛋白 α 链粉末。

1.2.5 615 小鼠珠蛋白 α 链的 N 端氨基酸的测定: 参考文献 [6]。

1.2.6 615 小鼠珠蛋白 α 链的氨基酸组成测定: 参考文献 [7]。

1.2.7 615 小鼠珠蛋白 α 链个别肽段的氨基酸序列分析: 参考文献 [6]。

* 通讯联系人。

Tel: 0312-5020127, E-mail: wj666hy.@163.net

收稿日期: 2000-02-25, 接受日期: 2000-05-29

2 结果与讨论

2.1 615 小鼠珠蛋白链的醋酸纤维素薄膜电泳

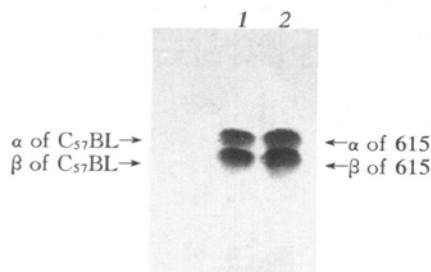


Fig.1 Cellulose acetate membrane electrophoresis of the globin of 615 mouse

1 : C₅₇ BL ; 2 : 615 mouse . Voltage : 1.8 V / cm , Current : 1 mA, Buffer: pH 6.4.

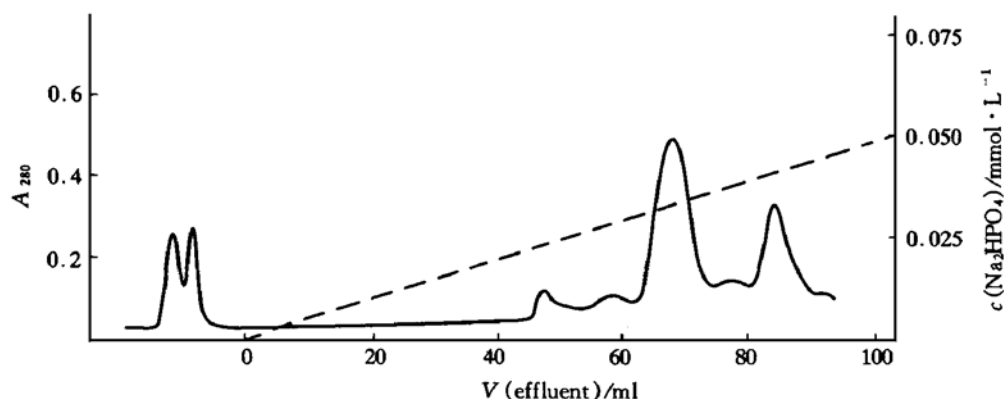


Fig.2 The chromatography on CM-Cellulose-23 column of globin of 615 mouse

Starting buffer: pH 6.7, 0.005 mol/L buffer, containing 0.05 mol/L mercaptoethanol and 8 mol/L urea, Gradient buffer: pH 6.7, 0.03 mol/L buffer, containing 0.05 mol/L mercaptoethanol and 8 mol/L urea. Eluent rate : 0.5 ml/min ; Monitor wave: 280 nm; Sensitivity range: 0.2 A; Temperature: 20°C; Column type: 1.5 cm×20 cm.

2.3 615 小鼠珠蛋白 α 链的 N 端氨基酸测定

采用 DABITC/PITC 双偶合法测定 615 小鼠珠

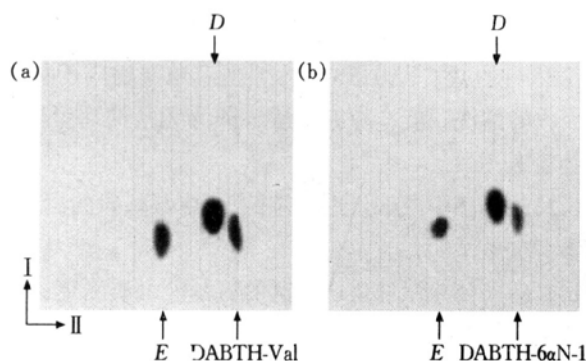


Fig. 3 Polyamide membrane chromatography of DABITC derivant from the N-terminal of α chain of 615 mouse

(a) DABTH-6αN-1 and DABTH-Val; (b) DABTH-6αN-1. I phase: 33% acetic acid; II Phase: toluene : hexane : acetic acid = 2 : 1 : 1; Developing agent : Vapor of hydrochloric acid. D : DABTH - diethylamine ; E : DABTH-ethanolamine.

血红蛋白由血红素和珠蛋白构成, 去除血红素之后的珠蛋白经 9 mol/L 脲解链后, 亚基之间的次级键破坏, α 链和 β 链经电泳后得到分离, 形成两条带 (图 1)。

2.2 柱层析分离纯化 615 小鼠珠蛋白 α 链

615 小鼠珠蛋白链的柱层析图谱见图 2, 由图 2 可知, 615 小鼠珠蛋白解链后经过 CM-Cellulose-23 柱层析, 其 α 链和 β 链能得到很好的分离, 在用起始缓冲液洗脱时, 有杂质峰出现, 为未除尽的血红素, 随着洗脱液离子强度的增加, 先有少量杂蛋白洗下, 随之 615 小鼠珠蛋白的 β、α 链先后被洗脱下来。

蛋白 α 链的 N 端氨基酸, 其 N 端氨基酸的 DABTH 化衍生物的聚酰胺膜层析图谱见图 3。

由图 3 可知, 615 小鼠珠蛋白 α 链 N 端氨基酸为缬氨酸, 与文献中其亲本 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链的 N 端氨基酸一致^[8]。同时证明了本实验制备的 615 小鼠珠蛋白 α 链是纯净的, 可进行下面的研究。

2.4 615 小鼠珠蛋白 α 链的氨基酸组成分析

将纯净的 615 小鼠 α 链经酸水解后测定氨基酸组成 (表 1)。由表 1 可知, 615 小鼠珠蛋白 α 链含有 141 个氨基酸残基, 与 Poop 报道^[8]的 C₅₇BL 小鼠相比较, 该链的氨基酸总数与亲本一致, 但在某些氨基酸残基的数目上不同^[8], 615 小鼠珠蛋白 α 链中含有 19 个亮氨酸残基, 9 个缬氨酸残基, 10 个组氨酸残基, 而文献中 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链中含有 17 个亮氨酸残基, 10 个缬氨酸残基, 11 个组氨酸残基。

Table 1 Amino acid composition of the α chain of 615 mouse

Name of amino acid	Elibrated nmol	Number of residue	α chain of C ₅₇ BL
D	7.6	12	12
T	4.4	7	7
S	7.0	13	13
E	3.2	5	5
G	7.1	11	11
A	13.1	20	20
C	0.6	1	1
V	5.9	9 ²⁾	10 ²⁾
M	0.51	1	1
I	1.3	2	2
L	12.4	19 ²⁾	17 ²⁾
Y	1.6	3	3
F	4.4	7	7
K	7.0	11	11
H	6.5	10 ²⁾	11 ²⁾
R	1.9	3	3
P	4.2	6	6
W ¹⁾	0.61	1	1
Total		141	141

¹⁾The number of tryptophan (W) residues was reached by alkali hydrolysis method. ²⁾The difference in valine (V), leucine (L), and histine (H) residue of α chain between 615 and C₅₇BL mouse.

2.5 615 小鼠个别肽段的氨基酸序列

文献报道 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链有 13 个胰蛋白酶切位点, 但有一个胰蛋白酶不能水解的疏水‘核心’, 在 α T11~ α T13 之间^[8]. 将 615 和 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链在同样条件下用胰蛋白酶水解, 发现二者均含有胰蛋白酶不溶性核心, 以沉淀形式存在于离心管底. 由此推论, 615 小鼠珠蛋白 α 链的酶解上清液应包括 α T1~ α T10 和 α T14 这些肽段. 将酶解上清液经薄层层析和高压电泳分离之后, 进行氨基酸组成分析, 找到了与 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链的 α T1、 α T2、 α T3、 α T4、 α T5、 α T6、 α T7、

α T8 和 α T14 相对应的肽段, 其中与 α T1、 α T2、 α T3、 α T4、 α T5、 α T7、 α T8、 α T14 相对应肽段的氨基酸组成及 N 端氨基酸与亲本完全一致, 因此暂不作氨基酸序列分析^[3]. 只有与 α T6 相对应的肽段的氨基酸组成不同于亲本, 进一步对此肽段作 N 端和氨基酸序列分析. 结果发现, 该肽段的 N 端氨基酸与 C₅₇BL 的 α T6 相同, 都是苏氨酸, 但从 N 端数第 8 位氨基酸残基为亮氨酸, 而亲本 C₅₇BL 的 α T6 肽段相应位置的氨基酸残基为缬氨酸^[8]. 对比如下: α T6 (C₅₇BL): Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Val-Ser (His, Gly, Ser, Ala, Gln, Val) Lys;

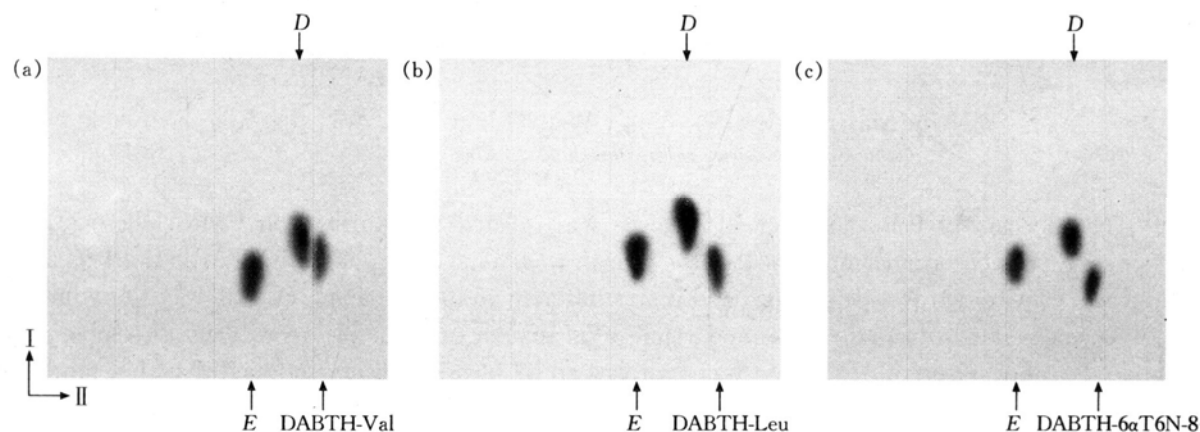


Fig.4 Polyamide membrane chromatography of DABITC derivant from the N-8 residue of α T6 of 615 mouse and C₅₇BL mouse

(a) DABTH-DL-Val; (b) DABTH-L-Leu; (c) DABTH-6 α T6N-8. I phase: 33%acetic acid; II phase: toluene:hexane:acetic acid=2:1:1;

Developing agent: vapor of hydrochloric acid. D: DABTH-diethylamine; E: DABTH-ethanolamine.

α T6(615): Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu^{*}-Ser (His, Gly, Ser, Ala, Gln, Val) Lys. 该肽段的第8位氨基酸残基的聚酰胺薄膜层析图谱见图4.

2.6 讨论

采用改进的 CM-Cellulose 23 柱层析分离纯化 615 小鼠珠蛋白 α 链, 可一次上样 170~200 mg, 且制得的 615 小鼠珠蛋白 α 链为纯净的, N 端氨基酸为缬氨酸; 氨基酸组成表明, 该链含有 141 个氨基酸残基, 用胰蛋白酶水解该链时, 也发现有胰蛋白酶不能水解的疏水‘核心’, 以上结果与 Poop 报道的其亲本 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链相同. 但是 Leu、Val 和 His 残基在整条链中所占比例与亲本不同, 且其中一条胰蛋白酶解肽段的氨基酸组成有变化, 即对应于亲本 C₅₇BL 小鼠珠蛋白 α 链的 α T6 的肽段, 从 N 端数第 8 位氨基酸残基由亲本的缬氨酸变为亮氨酸. 需要说明的是, 作者在研究 615 小鼠珠蛋白 α 链的性质时, 同时对中国医学科学院血液学研究所提供的 C₅₇BL 小鼠作了研究, 发现二者的柱层析分离特性、N 端氨基酸、整条链的氨基酸组成及对应于 α T6 肽段的氨基酸序列完全相同. 其可能的原因是 C₅₇BL 小鼠作为一种常用的实验小鼠, 经过多年培育, 其血红蛋白 α 链的基因发生了突变. 如果珠蛋白 α 链基因上编码第 48 位氨基酸的三联体核苷酸中胞嘧啶 C 突变为鸟嘌呤 G, 则对应于 DNA 的密码子就会由缬氨酸的密码子 GUX (X 为 A, U, C, G) 变为亮氨酸的密码子 CUX, 在肽链合成过程中, 当肽链延伸到第 48 位氨基酸时, 就发生了亮氨酸取代缬氨酸. 615 小鼠获得了发生了已突变的 C₅₇BL 小鼠的珠蛋白 α 链

基因, 由于发生突变的氨基酸的位置在构成血红蛋白的空间构象上可能不处于关键位置, 或者由于亮氨酸与缬氨酸的结构很相似, 因此这种突变未引起血红蛋白的生物学功能发生变化.

615 小鼠珠蛋白 α 链有胰蛋白酶不溶性核心, 需要用其他的蛋白酶对该链进行水解, 再进行酶解片段的分离、各片段的氨基酸组成及氨基酸序列分析. 从 615 小鼠珠蛋白链的氨基酸组成来看, 该链尚存在其他的突变位点. 这些问题有待进一步研究.

参考文献

- 1 International Hemoglobin Information Center. Variant of Hemoglobin. Hemoglobin, 1983, 15 (7): 331~340
- 2 王立, 李洲, 黄丽华. 615 近交系小鼠血红蛋白遗传学分析. 动物学报, 1986, 32 (3): 220~225
Wang L, Li Z, Huang L H. Acta Zoology, 1986, 32 (3): 220~225
- 3 曾溢涛, 黄淑幀. 在中国发现的异常血红蛋白化学结构研究. 生物化学与生物物理学报, 1984, 16 (3): 270~275
Zeng Y T, Huang S Z. Acta Biochem Biophys, 1984, 16 (3): 270~275
- 4 Clegg J B. Abnormal human hemoglobin separation and characterization of the α and β chains by chromatography and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). J Mol Biol, 1966, 19 (1): 91~108
- 5 Wu P G. Analysis of amino acid components of the ovalation-inducing bioactive protein in seminal plasma of bactrian camel. China Agriculture Science, 1997, 30 (4): 83~87
- 6 徐秀璋. 蛋白质顺序分析. 北京: 科学出版社, 1988. 34~40
Xu X Z. Protein Sequence Analysis Technology. Beijing: Science Press, 1988. 34~40
- 7 Chang J Y. High-sensitivity sequence analysis of peptides and proteins by 4-N, N-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate. Biol Chem J, 1977, 16 (3): 517~520
- 8 Poop R A. The amino acid sequence of α and β chains of C₅₇BL mice. Biol Chem J, 1965, 240 (8): 2863~2869

Amino Acid Composition of the α Chain of Hemoglobin and Amino Acid Sequence of its Particular Peptide Fragment From 615 Mouse

WU Jin-Xia*, ZhANG He-Ying, WANG Jian-Ping, WU Jing-Cai
(College of life science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract The α chain of hemoglobin of 615 mouse was isolated and purified on CM-Cellulose 23 column chromatography. The N-terminal amino acid of the α chain was valine determined with DABITC/PITC method. The amino acid composition was determined and it was different from the parent (C₅₇BL) in literature on the number of leucine residue, histine residue and valine residue. An undissoluble ‘core’ and dissoluble peptides were found when the α chain of 615 mouse was hydrolysed by trypsin and it was found that the eighth amino acid residue from N-terminal of one particular peptide fragment mutated from valine (C₅₇BL) to leucine.

Key words 615 mouse, hemoglobin, amino acid composition, amino acid sequence

* Corresponding author. Tel: 86-312-5020127, E-mail: wj666hy.@163.net

Received: February 25, 2000 Accepted: May 29, 2000