

研究简报

胆碱脱氢酶的 N 端氨基酸序列测定*

傅晓红 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳及电转移方法, 将增溶的鼠肝线粒体胆碱脱氢酶进一步纯化, 且去掉增溶线粒体胆碱脱氢酶 (CDH) 中所包含的大部分磷脂、去垢剂、辅基 FAD 等. 对进一步纯化的 CDH 进行了 N 端氨基酸序列测定, 得到 CDH N 端 10 个氨基酸残基序列为 VAAAAGGGKD, 这一部分序列与小鼠 CO5 蛋白 (即补体 C5 的前体蛋白)、大鼠腺苷酰 (基) 环化酶 (adenylyl cyclase)、人甾体结合蛋白 (oxysterol binding protein) 有很高同源性, 但与大肠杆菌 CDH 并无明显的同源性.

关键词 胆碱脱氢酶, 电转移, 一级结构, 同源性

虽然随着氨基酸自动序列仪的出现以及分子遗传技术的发展, 越来越多的蛋白质一级结构得到阐明, 但是膜固有蛋白质一级结构的研究却相对滞后, 线粒体胆碱脱氢酶 (EC 1.1.99.1, CDH) 是一种典型的膜蛋白, 广泛存在于动物的肝、肾、脑等组织中. 某些微生物原生质中也有 CDH.

1991 年 Lamark 等^[1]曾报道过原核生物 CDH 的一级结构, 但关于真核生物 CDH 的序列, 文献上尚未有报道. 我们对按文献提纯的 CDH 予以进一步的纯化, 使其适用于氨基酸序列分析仪进行序列测定, 并得到了鼠肝线粒体 CDH 的 N 端 10 个氨基酸残基序列, 同时报道了与这一 N 端片段具有较高同源性的几种蛋白质.

1 材料和方法

1.1 材料

Lubrol WX、3-环己胺-1-丙磺酸 (3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, CAPS)、丽春红 S (Ponceau S) 为 Sigma 公司产品; MOPS、2-巯基乙醇、甲叉丙烯酰胺为 Fluka 公司产品; SDS 为 Serva 公司产品; TEMED

为 Merck 公司产品; Tris 为 Boehringer 产品; 丙烯酰胺、Coomassie Blue R-250 为 BDH 产品; PVDF 膜购自 Amersham 公司; 其余试剂均为国产分析纯级试剂.

1.2 方法

1.2.1 胆碱脱氢酶的提纯: 按文献 [2], 纯化到 DEAE-Sephrose CL 6B 离子交换柱一步, 将洗脱液超滤浓缩.

1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化胆碱脱氢酶: 采用 4.0% 的浓缩胶与 10% 的分离胶 (以 0.1% SDS, 0.12 mol/L 及 0.38 mol/L Tris-HCl 缓冲液配制, pH 分别为 6.8 和 8.8). 用上样缓冲液 (含 4% SDS, 2% 2-巯基乙醇, 20% 甘油, 0.04% 溴酚蓝及 100 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8) 将 CDH 溶液稀释 1 倍, 样品置沸水浴中保温 5 min, 在 10 V/cm 电压下电泳 3 h 左右.

1.2.3 电转移: 分离后的蛋白质用 10% 甲醇、10 mmol/L CAPS (pH 11.0) 缓冲液浸泡 5 min, 将经甲醇和 CAPS 缓冲液预处理过的二张 PVDF 膜置于二张定量滤纸上, 再将

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1996-03-21, 修回日期: 1996-06-26

胶置于膜上, 盖两张定量滤纸 (定量滤纸预先亦于 CAPS 缓冲液中浸湿), 装好转移“三明治”, 安装好半干式电转移仪, 用 150 mA 恒流转移 18 min. 转移完毕后取下 PVDF 膜用 0.2% 丽春红 S、1% 醋酸溶液染色 50 s, 显示出红色的蛋白质条带. 所得条带可直接用蛋白质/多肽氨基酸序列分析仪测定 N 端氨基酸序列. 用全湿式电转移仪转移, 采用 30 min、0.5 A 恒流条件, 转移缓冲液含 25 mmol/L Tris、192 mmol/L 甘氨酸及 20% 甲醇 (pH 8.3), 其他步骤同前述.

1.2.4 N 端氨基酸序列的测定: 利用蛋白质/多肽自动序列分析仪 (Beckman 1F 3200 Protein/Peptide Sequencer) 进行序列分析.

2 结果和讨论

膜蛋白的提纯及测序过程中肽段的连续降解, 与可溶性蛋白质相比都存在很多困难. 例如在纯化过程中, 不饱和脂肪酸有可能会自氧化, 产生过氧化物等活性物质, 而它们会氧化蛋白质中的甲硫氨酸、半胱氨酸和色氨酸等残基; 采用有机溶剂脱脂常使蛋白质更难溶解, 且必须事先去除过氧化物的污染; 非离子型去垢剂也常含有氧化剂的污染; 膜蛋白抽提过程中, 微粒体中的蛋白酶也常伴随脂质团粒被纯化, 随着去垢剂的增溶而被释放出来, 从而可能引起膜蛋白的降解; Edman 降解反应中常用的溶剂极少能溶解疏水肽段等等.

按文献 [2] 方法提纯的 CDH 以酶-去垢剂-磷脂复合物形式存在, 每个复合物中含一条多肽链, 单体相对分子质量为 61 000, 每 mg 酶蛋白含 0.23 mg 磷脂, 每 mol 酶含 1 mol 非共价结合的辅基 FAD^[3]. 为了使纯化的 CDH 适合于氨基酸自动序列分析仪的测定, 去掉酶复合物中的 FAD、磷脂、去垢剂等非蛋白组分是必不可少的, 我们曾尝试过电洗脱、TCA 沉淀、丙酮抽提、冷冻干燥、FPLC 等方法, 其中以 SDS-PAGE 电泳与电转移结合的方法最为有效, 且可以省略 CDH 的最后几步纯化步骤, 直接以 DEAE-Sepharose CL 6B

离子交换柱的 CDH 洗脱液作为样品进行电泳.

1987 年 Paul 首次将蛋白质转移至 PVDF 膜上进行 N 端序列测定^[4], 近 10 年来已有大量的蛋白质经此纯化方法得到了 N 端氨基酸序列. 我们发现 CDH 经 SDS-PAGE 分离后, 无论是采用全湿式电转移仪还是半干式电转移仪, 均能很好地从胶上转移至 PVDF 膜, 得到满意的结果, 说明尽管 CDH 是膜蛋白, 在天然条件下有很强的疏水区, 但增溶 CDH 经 SDS-PAGE 电泳后却有较好的溶解性, 这可能是由于 CDH 构象上的变化造成的.

图 1 为转移后经丽春红 S 染色的 PVDF 膜, 从图 1 可见转移的条带. 切下 CDH 条带经 Beckman 1F 3200 序列分析仪测定, 得到胆碱脱氢酶 N 端 10 个氨基酸残基的序列: Val-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys-Asp.

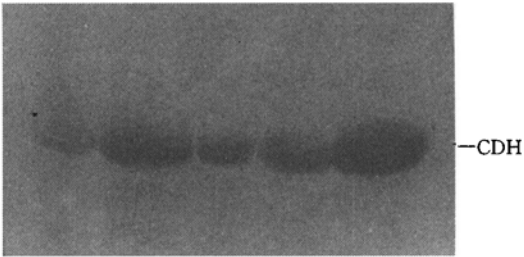


图 1 转移后的 PVDF 膜

我们曾发现 CDH 具有抗胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶酶解的性质, 因此这里测得的 N 端应是真实的 N 端, 不可能是 CDH N 端封闭而水解出来的 N 端. 从得到的一段氨基酸序列看, 前 8 个都是疏水氨基酸, 这一氨基酸组成

表 1 CDH 氨基酸组成和含量

氨基酸	含量/%	氨基酸	含量/%	氨基酸	含量/%
Asp(Asn)	10.5	Thr	5.0	Ile	4.4
Glu(Gln)	10.6	Met	0	Pro	1.9
Lys	5.8	Gly	9.3	Phe	4.7
Arg	4.7	Val	7.5	Trp	1.9
His	1.3	Ala	8.9	Tyr	7.1
Ser	5.9	Leu	8.8	Cys	1.3

比例高于 CDH 的整体氨基酸组成^[3]. 根据许多膜蛋白的结构特点推测, CDH 的 N 端可能亦埋藏于脂双层中. 表 1 为 CDH 的氨基酸组成, 从表 1 中可见 CDH 中甘氨酸与丙氨酸含量较高, 从我们得到的这一段 N 端序列中亦得到一定体现.

1937 年 Mann 和 Quastel^[5] 首次发现 CDH, 早期由于纯化上的困难, 人们对 CDH 的性质及结构与功能的了解甚少, 自吴如丹等^[2]获得了电泳纯制剂以来, 才开展了一系列的研究, 但一直未能在分子水平上深化. 阐明 CDH 的一级与高级结构是从分子水平上了解 CDH、解释一些现象的根本原因所必不可少的, 这种结构信息有益于: a. 比较不同种属来源 CDH 的一级结构并推测判定它的活性中心. 对于任一蛋白质来讲, 要确定它的活性位点、了解其作用的分子机制, 必须知道它的一级结构. 而不同种属、不同细胞来源的 CDH 一级结构比较则可以判定它们是否为相同家族的蛋白质, 如果不同来源的 CDH 都有一相似的活性位点则可以从氨基酸序列比较中得到证明. b. 阐明 CDH 催化反应的分子机制. c. 了解蛋白质与膜的相互作用关系.

目前有关 CDH 的一级结构仅在 *E. coli* 中

得到阐明, Lamark 等^[1]以 *E. coli* 为材料, 测定了大肠杆菌 bet 基因的全部核苷酸序列, 这个基因编码了包括胆碱脱氢酶在内的共 4 个与胆碱代谢传送有关的蛋白质, 4 个不同的阅读框架决定了这几种蛋白质的表达和调控, 他们由此推出 CDH 的一级结构^[1]. Douglas^[6]认为 *E. coli* 中的 CDH 因与酵母甲醇氧化酶等具有高同源性而属于同一家族, 他称之为葡萄糖-甲醇-胆碱 (glucose-methanol-choline, GMC) 氧化还原酶家族, 这几个酶和其他黄素蛋白相似, 都具有结合腺嘌呤核苷二磷酸 (ADP) 的 $\beta\alpha\beta$ -fold 结构.

其他来源的 CDH 的一级结构至今尚无报道. 我们得到了鼠肝线粒体胆碱脱氢酶 N 端的 10 个氨基酸残基序列, 发现它与 *E. coli* CDH 的氨基酸序列并无明显的同源性, 与鼠肝线粒体中的甘油-3-磷酸脱氢酶等其他几种脱氢酶也无明显的同源性, 却和小鼠 CO5 蛋白 (即补体 C5 的前体蛋白)、大鼠腺苷酰 (基) 环化酶 (adenylyl cyclase)、人甾体结合蛋白 (oxysterol-binding protein) 有较高的同源性 (表 2). 鼠肝线粒体 CDH N 端序列与 *E. coli* CDH 无明显的同源性, 可能与后者是可溶性蛋白, 因而不需 N 端一段疏水插膜序列有关.

表 2 鼠肝线粒体 CDH N 端序列与几种蛋白质的同源性比较

蛋白质	来源	氨基酸序列
CDH	大肠杆菌	1
		MQFDYIHGAGSAGN
CDH	大鼠	1
		VAAAAGGGKD
甾体结合蛋白	人	56
		ASGTV VAAAAGG PGPGA
腺苷酰(基)环化酶	大鼠	21
		AEAAA AAAAGGG EGLQR
CO5	小鼠	632
		LGCGAGGGHD

随着 DNA 重组技术的发展, 基于 DNA 测序的快速、方便等特点, 蛋白质的一级结构很多是由 cDNA 序列判定, 鉴于此, 这里测定的 CDH N 端序列为全序列的测定提供了一个

可行的方向与有利的前提条件.

致谢 夏其昌教授, 屠红 , 徐来根及李彤先生给予极大支持与帮助, 特此感谢.

参 考 文 献

1 Lamark T, Kaasen I, Eshoo M W *et al.* DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1991, **5**: 1049

2 吴如丹, 林其谁. 鼠肝线粒体胆碱脱氢酶的提纯. 生物化学与生物物理学报, 1985, **17**: 624

3 吴如丹, 林其谁. 胆碱脱氢酶的性质. 生物化学与生物物理学报, 1985, **17**: 643

4 Paul M. Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto PVDF membranes. J Biol Chem, 1987, **262**: 10035

5 Mann P J G, Quastel J H. The oxidation of choline by rat liver. Biochem J, 1937, **31**: 869

6 Douglas R C. GMC oxidoreductases: a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. J Mol Biol, 1992, **223**: 811

Amino Terminal Sequence of Choline Dehydro-

genase. FU Xiaohong, LIN Qishui (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*).

Abstract Solubilized rat liver mitochondrial choline dehydrogenase was further purified by the SDS-PAGE and electroblotting methods. Both the lipids and detergents etc. were removed during the process of purification. The amino terminal sequence of the purified CDH was determined, it was: VAAAAGGGKD. Although the sequence showed high homology with mouse CO5 protein, rat adenylyl cyclase and human oxysterol-binding protein, there was no similarity with CDH of *E. coli*.

Key words choline dehydrogenase, electroblotting, primary sequence, homology

(上接第 135 页, Continued from page 135)

13 Kao J P Y, Alderton J M, Tsien R Y *et al.* Active involvement of Ca^{2+} in miaroric progression of Swiss 3T3 fibroblasts. J Cell Biol, 1990, **111**: 183~ 196

14 Gilroy S S, Tead N D, Trewavas A J. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphated initiates stomatal closure. Nature (London), 1990, **346**: 769~ 771

15 Buchet R, Jona I, Martonosi A. Ca^{2+} release from caged Ca^{2+} alters the FTIR spectrum of sarcoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta, 1991, **1069**: 209~ 217

16 Adams S R, Tsien R Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. Ann Rev Physiol, 1993, **55**: 755~ 784

Photorelease Technique of Ca^{2+} and Its Applications in Cell Studies. XU Jianhua, QU Anlian, KANG Huaguang (*Institute of*

Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China).

Abstract Photorelease technique of Ca^{2+} can manipulate intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) by photolyzing specific photosensitive Ca^{2+} chelator in the cell to change its affinity with Ca^{2+} . This technique is especially useful in elucidating the intracellular messenger role of Ca^{2+} in cell functions such as electrical excitability, muscle contraction and secretion, etc.

Key words photosensitive chelators, intracellular Ca^{2+} concentration, photorelease