

615 小鼠血红蛋白珠蛋白 α 链的分离 纯化及氨基酸组成

武金霞 张贺迎 潘延云 周艳芬 王建平

(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-末端氨基酸为缬氨酸。615 小鼠珠蛋白 α 链含有 141 个氨基酸残基,其中含 19 个亮氨酸残基,10 个组氨酸残基,9 个缬氨酸残基,上述三种氨基酸残基的数目与文献中亲本不同。

关键词:615 小鼠;血红蛋白;纯化;氨基酸组成

中图分类号:Q516 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)02-33-05

第一作者介绍 武金霞,女,34岁,讲师,硕士;从事生物大分子分离纯化工作;

收稿日期:1999-12-22,修回日期:2000-07-20

The Purification and Amino Acid Composition of α Chain of Hemoglobin of 615 Mice

WU Jin-Xia ZHANG He-Ying PAN Yan-Yun ZHOU Yan-Fen WANG Jian-Ping

(College of Life Science, Hebei University Baoding 071002, China)

Abstract: The α chain of hemoglobin of 615 mice was isolated and purified by CM-cellulose-23 column chromatography method. The N-terminal amino acid of α chain was determined with DABITC/PITC method and it was valine. The amino acid composition was determined and it was different from the parent's (C57BL) in the literature on the number of leucine residue, Histine residue and Valine residue.

Key words: 615 mice; Hemoglobin; Purification; Amino acid composition

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及氨基酸组成分析是研究血红蛋白一级结构、分子病防治及基因突变与表达的重要基础。615小鼠是我国首次培育成功的近交系鼠系,其亲本为C57BL小鼠和昆明种小鼠。有人对615小鼠血红蛋白做过遗传学分析^[1],证明其血红蛋白类型与亲本C57BL相同,皆为I型,但其珠蛋白链的性质未见报道。本文介绍了一种大量纯化615小鼠珠蛋白链的方法,测定了 α 链的N-末端氨基酸及氨基酸组成,为填补国内空白,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 615小鼠由中国医学科学院血液学研究所提供,醋酸纤维素薄膜和聚酰胺膜为浙江黄岩化工厂产品;CM-cellulose-23, DABITC(4,N,N-对二甲胺基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯);PITC(异硫氰酸脂)为Whatman公司产品;高速冷冻离心机(美国Bekman公司);氨基酸自动分析仪(日本,日立835-50)。

1.2 方 法

1.2.1 615小鼠珠蛋白的制备 参照文献[2]加以改进,在去除血红素过程中充氮气,以保证完全去除血红素,制备出白色的珠蛋白干粉。

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,pH 6.4的磷酸盐缓冲液

溶解615小鼠珠蛋白为10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,以微量进样器在已浸膜的醋酸纤维素薄膜的粗糙面距正极端1.5 cm处,点样1.5 μl ,平衡15分钟后电泳,电压为1.8 V/cm,电流为1 mA,pH 6.4,电泳2.5小时取出薄膜,染色,脱色,制干。

1.2.3 615小鼠珠蛋白链的分离纯化 参照文献[3]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,使其电导率小于 $0.14 \times 10^{-4} \mu\Omega/\text{cm}$,用此溶液配制起始缓冲液和梯度缓冲液,将经过解链的615小鼠珠蛋白样品,上用起始缓冲液溶胀并平衡好的CM-cellulose-23层析柱,待样品进入柱床后,先用起始缓冲液平衡再用起始缓冲液和梯度缓冲液各50 ml构成的线性梯度缓冲液洗脱,收集对应于各峰的洗脱液。

1.2.4 615小鼠珠蛋白 α 链的脱盐 将615小鼠珠蛋白 α 链洗脱液碘乙酸化以保护还原性巯基,抑制肽链聚合^[3],再用0.8%甲酸溶液溶胀并平衡的Sephadex G-25分子筛柱脱盐,以0.8%甲酸溶液洗脱,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 链干粉。

1.2.5 615小鼠珠蛋白 α 链的N-末端氨基酸的双偶合降解 参照文献[4]。称取0.6 mg 615小鼠 α 链,于带塞试管中加入200 μl DABITC吡啶液,通氮气,盖塞混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温45分钟,加入PITC再通氮气,盖塞混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温30分钟,分别用100 μl 提取液(正庚烷/乙酸乙酯=

2:1)抽提4次,每次抽提均通氮气,离心,小心移去有机相,将下层水相真空干燥。水相干燥后加100 μl 无水三氟醋酸,通氮气,盖塞混匀,于50 $^{\circ}\text{C}$ 保温15分钟,离心真空干燥。加入100 μl 重蒸水,分别用100 μl 乙酸乙酯抽提2次,将2次酯相合并,离心真空干燥。酯相干燥后,加入80 μl 50%三氟醋酸溶液,通氮气,盖塞混匀50 $^{\circ}\text{C}$ 反应50分钟,真空干燥,以35 μl 无水乙醇溶解,为DABTC与615小鼠珠蛋白 α 链N-末端氨基酸结合的衍生物,记作DABTH-6 α N-1。

1.2.6 聚酰胺膜双向层析鉴定615小鼠珠蛋白 α 链N-末端氨基酸 参照文献[5]。用毛细管将DABTH-6 α N-1在聚酰胺膜的左下角1 cm处点样,以DABTH-乙醇胺(E)和DABTH-二乙胺(D)为标记物, I向(垂直)展层剂为33%乙酸, II向(水平)展层剂为甲苯:正己烷:冰乙酸=2:2:1,展层后将膜吹干,用浓盐酸蒸气显色,即可显示出蓝色的标记物E、D和红色的DABTH-aa斑点,对照标准DABTH-aa的层析图谱及样品点到标记物的相对距离,即可判断出待鉴定的DABTH-6 α N-1。

1.2.7 615小鼠珠蛋白 α 链的氨基酸组成测定 参照文献[6]。

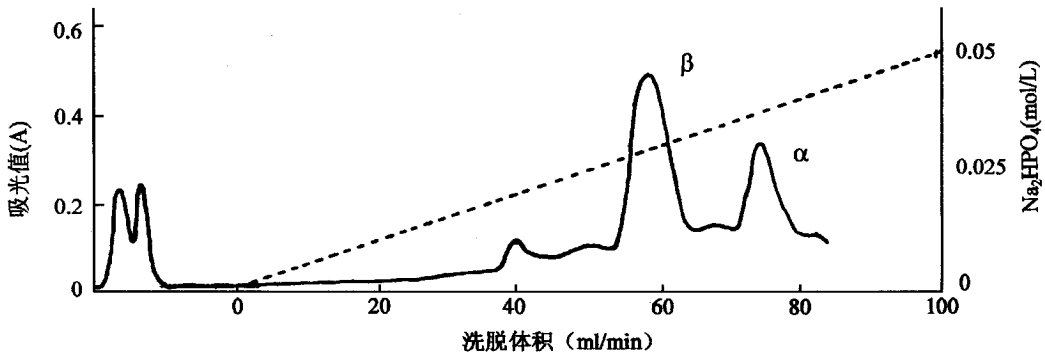


图2 615小鼠珠蛋白链的CM-cellulose-23柱层析图谱

(温度:20 $^{\circ}\text{C}$;柱型号:1.0 cm \times 15 cm;柱床高:10 cm,洗脱速度:0.5 ml/分钟;检测波长:280 nm;量程:0.2 A;起始缓冲液:用8 mol/L 脲配制含0.05 mol/L α -巯基乙醇,pH 6.7,0.005 mol/L 磷酸盐缓冲液。梯度缓冲液:用8 mol/L 脲配制含0.05 mol/L α -巯基乙醇,pH 6.7,0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液)

2.3 615小鼠珠蛋白 α 链的N-末端氨基酸测定 采用DABIC/PITC双偶合法裂解615小鼠珠蛋白 α 链的N-末端氨基酸,以聚酰胺膜双向

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 血红蛋白由血红素和珠蛋白构成,去除血红素后的珠蛋白经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,结果见图1。

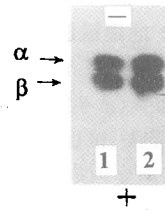


图1 615小鼠珠蛋白链的醋酸纤维素薄膜电泳图谱

1. 亲本C57BL珠蛋白; 2. 615珠蛋白
(电泳条件:1.8 V/cm,1 mA,2.5小时,pH 6.4)

2.2 CM-cellulose-23柱层析分离纯化615小鼠珠蛋白 α 链 615小鼠珠蛋白解链后经过CM-cellulose-23柱层析, α 链和 β 链能得到较好的分离,在用起始缓冲液平衡时,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,结果见图2。

层析鉴定其DABTH化衍生物,结果见图3。

由图3可知,615小鼠珠蛋白 α 链的N-末端氨基酸为缬氨酸,与文献中C57BL小鼠珠蛋

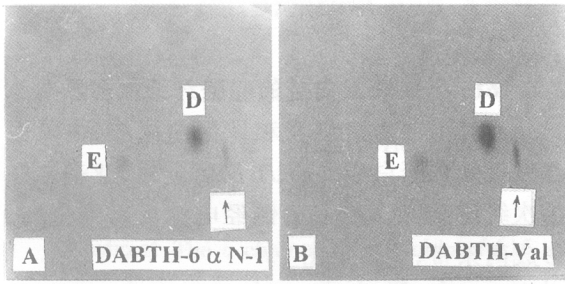


图3 DABTH-6 α N-1 的聚酰胺膜层析图谱

A: DABTH-6 α N-1; B: DABTH-Val

(I 向(垂直): 33% 乙酸, II 向(水平): 甲苯: 正己烷: 冰乙酸 = 2:2:1, 显色剂: 浓盐酸蒸气)

白 α 链的 N-末端氨基酸一致^[7], 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 氨基酸组成分析 将纯净的 615 小鼠珠蛋白 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, 这与 Popp 报道的 C57BL 小鼠相同。但 615 小鼠珠蛋白 α 链中有些氨基酸残基的 nmol 数与报道不同, 即 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

表 1 615 小鼠珠蛋白 α 链的氨基酸组成

氨基酸	校正 nmol 数	残基数目	C57BL α 链 ^[7]
Asp	7.6	12	12
Thr	4.4	7	7
Ser	7.0	13	13
Glu	3.24	5	5
Gly	7.1	11	11
Ala	13.1	20	20
Cys	0.6	1	1
Val	5.9	9*	10*
Met	0.51	1	1
Ile	1.3	2	2
Leu	12.4	19*	17*
Tyr	1.6	3	3
Phe	4.4	7	7
Lys	7.0	11	11
His	6.5	10*	11*
Arg	1.9	3	3
Pro	4.2	6	6
Trp	0.61	1	1
Total		141	141

注: Trp 残基数目由碱水解法测得

组氨酸残基, 而 C57BL 小鼠珠蛋白 α 链含有 17 个亮氨酸残基, 10 个缬氨酸残基, 11 个组氨酸残基。

3 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, 一次可分离 170 ~ 200 mg 珠蛋白干粉; N-末端氨基酸分析表明, 其 α 链 N-末端氨基酸为缬氨酸; 氨基酸组成表明, 该链含有 141 个氨基酸残基。以上结果与 Popp 报道的 C57BL 小鼠珠蛋白 α 链相同, 但是在 Leu、Val 和 His 残基数目上与 Popp 报道不同^[7]。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 小鼠进行了研究, 发现二者的电泳性质、柱层析分离特性、N-末端氨基酸及整条链的氨基酸组成完全相同, 且均在 Leu、Val、His 残基数目上与 Popp 报道不同。其原因可能是 C57BL 小鼠作为一种国际上通用的实验小鼠, 在长期的传代过程中其血红蛋白 α 链的基因发生了突变, 导致 α 链的氨基酸组成发生了变化, 而 615 小鼠获得了 C57BL 小鼠发生突变的基因, 因此二者珠蛋白 α 链的性质完全相同。由于发生突变的氨基酸在构成血红蛋白的结构上可能不处于关键位置, 因此二者血红蛋白的生物学功能并未发生改变。615 小鼠珠蛋白 α 链的氨基酸顺序及突变位置有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王立. 615 近交系小鼠血红蛋白遗传学分析. 动物学报, 1986, 32(3): 220 ~ 225.
- [2] 曾溢滔. 在中国发现的异常血红蛋白化学结构研究. 生物物理与生物化学学报, 1984, 16(3): 270 ~ 275.
- [3] Clegg, J. B. Abnormal human hemoglobins, separation and characterization of the α and β chains by chromatography and the determination of two new variants Hb Chesapeake and Hb J. J. Mol. Biol., 1966, 19: 92 ~ 96.
- [4] Wu, Pan-Guang, Chen Zhi-Tian. Analysis of amino acid components of the ovulation-inducing bioactive protein in seminal plasma of bactrican camel. China Agriculture Science, 1997, 30 (4): 83 ~ 87.

- [5] Chang, J. Y. *et al*. High-sensitivity sequence analysis of peptides and proteins by 4-N, N-Dimethylaminoazobenzene-4'-Isothiocyanate. *Biochem. J.*, 1977, **16**(3): 517 ~ 520.
- [6] 徐秀璋. 蛋白质顺序分析技术. 北京: 科学出版社, 1988. 34, 40.
- [7] Popp, R. A. The amino acid sequence of α and β chains of C57BL mice. *J. Biol. Chem.*, 1965A, **240**: 2 863 ~ 2 869.