

小熊猫、黑熊、狗与大熊猫乳酸脱氢酶同工酶 M_4 一级结构比较研究

梁 宋 平 张 龙 翔

(北京大学生物学系)

摘 要

本文用亲和层析纯化制得的小熊猫、黑熊和狗的乳酸脱氢酶同工酶 M_4 , 经实验测定和对比, 它们的 N-末端、C-末端与亚基分子量和大熊猫 LDH-M 亚基完全相同。分析对比经胰蛋白酶水解后的 HPLC 肽谱, 发现三种动物 LDH-M 亚基的大多数肽段与相应的大熊猫 LDH-M 亚基的肽段有相同的保留时间和氨基酸组成。对其中的差异肽段进行了序列测定。通过对差异氨基酸残基的分析, 发现大熊猫 LDH-M 亚基一级结构在四种动物中有明显的独特性, 因而有理由把大熊猫在食肉目中列为独立的一科。

蛋白质的酶解肽谱是研究不同种属来源的同源蛋白质一级结构的差异较为简捷有效的方法。过去常用的方法是在蛋白质经特异性蛋白水解酶作用后用薄层电泳-层析双向指纹图谱法, 但从 70 年代初期 HPLC 应用于肽和蛋白质的分离与结构分析以后, 越来越多的实验室用之代替双向指纹图谱法研究蛋白质的种属差异。HPLC 肽谱的主要优点是分辨率高、快速、灵敏和一定的重复性, 而且在选择适宜的层析条件下, 分离出的肽段可以直接进行序列测定。

在文献[1]初步确定了大熊猫 LDH-M 亚基一级结构以后, 对研究与大熊猫种系演化相关的其它动物 LDH-M 亚基的一级结构便有所依据。关于大熊猫进化与分类学地位的讨论中, 争议较多的是它更接近于熊(属熊科 Ursidae) 还是小熊猫(属浣熊科 Procyonidae)。为此, 我们分别分离纯化了小熊猫 (*Ailurus fulgens*)、黑熊 (*Selenarctos thibetanus*) 与狗 (*Canis familiaris*) 的 LDH- M_4 , 对它们的 TPCK-胰蛋白酶水解肽进行了 HPLC 肽谱分析, 并对一些差异肽段进行了序列测定。选择狗作为分析对象是因为它也是食肉目中很重要的一个种属, 而且分类学的研究表明, 它与大熊猫、黑熊、小熊猫都有一定程度的种系关系。

一、材料和方法

1. 材料 大熊猫骨骼肌取自两只大熊猫, 一只为广州动物园猝死的 24 龄雌性大熊猫; 另一只为在四川自然保护区摔撞致死的成年雌性大熊猫。实验材料冰冻后运回北京。小熊猫

和黑熊骨骼肌、狗骨骼肌都是在动物处死后立即取四肢肌肉深冻保存备用。

所用试剂均见文献[1]。

2. 方法 小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₄ 的分离纯化完全按照大熊猫 LDH-M₄ 的纯化方法进行^[2], 使用同一根 8-(6-氨基己基)-氨基-5'-AMP Sepharose 4 B 亲和层析柱。

聚丙烯酰胺凝胶电泳, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, N-末端和 C-末端测定, 氨基酸组成分析, LDH-M₄ 的胰蛋白酶水解条件和 HPLC 系统层析的实验条件均见文献[1,2]

肽段的序列测定用应用生物系统公司 470 A 型蛋白质序列仪进行。

二、实验结果

1. 小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₄ 的分离纯化、鉴定与部分性质

上述三种动物的 LDH-M₄ 均用本实验室合成的 8-(6-氨基己基)-氨基-5'-AMP Sepharose 4 B 亲和层析柱进行分离、纯化。由此得到的 LDH 混合同工酶, 再用 DEAE-Sephadex A50 离子交换层析分离得到纯的 LDH-M₄ 同工酶。分离纯化过程每一步的结果见表 1。

纯化后的小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₄ 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检查均为一条区带, 它们的亚基的分子量与大熊猫和猪的 LDH-M 亚基分子量是相同的, 见图 1。聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳也是一条区带。

小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₄ 的 N-末端用有色 Edman 法 (DABITC) 测定, 结果均未能鉴定出明显的 PTH 氨基酸衍生物。用对照样品胰岛素 A 链和 B 链, 可以明显地分别测出 N-末端为 Gly 和 Phe。估计和大熊猫一样, 这三种动物的 LDH-M₄ 的 N-末端也是封闭的。用羧肽酶 A 测定小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₄ 的 C-末端, 结果三种动物同样都是 Phe 释放最快。

表 1 小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₄ 的纯化

动物	纯化步骤	体积 (ml)	总活力(单位)	总蛋白质含量(mg)	比活(单位/mg)	回收率%
黑熊	肌肉提取液	2000	35282	5980	5.9	100
	AMP-Sepharose 亲和层析	510	31753	174.9	181.5	90
	DEAE-Sephadex 柱层析	115	15558	38.1	408.5	44
小熊猫	肌肉提取液	2000	51408	6120	8.4	100
	AMP-Sepharose 亲和层析	505	47295	256.3	184.5	92
	DEAE-Sephadex 柱层析	130	25539	61.1	418.0	50
狗	肌肉提取液	2800	65588	8631	7.6	100
	AMP-Sepharose 亲和层析	810	59029	336.9	175.2	90
	DEAE-Sephadex 柱层析	165	30695	73.8	415.9	47

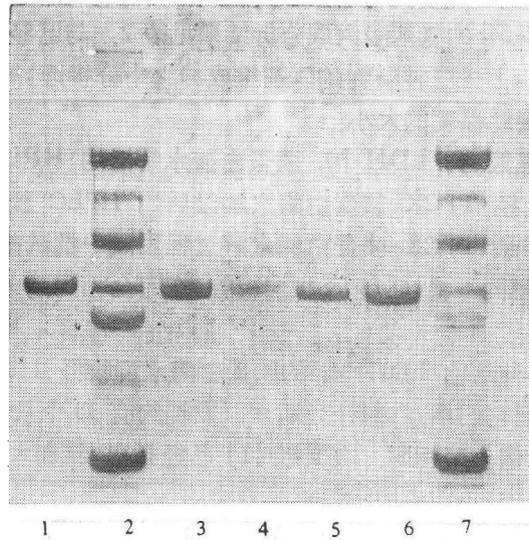


图 1 大熊猫、小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₄ 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
(1——猪 LDH-M₄; 2, 7——标准蛋白质; 3——大熊猫 LDH-M₄; 4——小熊猫 LDH-M₄;
5——黑熊 LDH-M₄; 6——狗 LDH-M₄)

表 2 小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₄ 的氨基酸组成

氨基酸	小熊猫 LDH-M ₄		黑熊 LDH-M ₄		狗 LDH-M ₄		大熊猫 LDH-M ₄ 个数/亚基**
	Mol%	个数/亚基*	Mol%	个数/亚基*	Mol%	个数/亚基*	
Asp	10.44	34.58	10.59	35.05	10.86	35.97	35
Thr	4.25	14.06	3.93	13.00	3.73	12.36	13
Ser	6.78	22.44	7.05	23.34	6.62	21.90	23
Glu	8.81	29.17	8.57	28.36	9.46	31.30	30
Pro	3.44	11.40	3.19	10.56	3.87	12.81	12
Gly	7.80	25.83	8.79	29.10	8.10	26.87	25
Ala	5.71	18.88	6.41	21.21	6.13	20.29	19
Cys	1.35	4.48	1.50	4.98	1.50	4.98	5
Val	10.61	35.14	11.30	37.47	10.66	35.30	36
Met	2.48	8.20	2.46	8.14	2.28	7.55	8
Ile	7.46	24.70	6.82	22.59	6.02	19.96	23
Leu	11.40	37.74	10.55	34.92	10.55	34.92	37
Tyr	2.09	6.92	1.94	6.41	2.09	6.92	7
Phe	2.12	7.01	1.93	6.39	1.98	6.55	7
Lys	8.03	26.61	7.82	25.91	7.86	26.01	26
His	2.39	7.94	2.43	8.04	2.50	8.29	8
Arg	3.40	11.26	3.03	10.01	3.32	10.98	11
Trp	1.62	5.35	1.62	5.35	1.76	5.82	6
Totals	100.0	331.72	100.0	331.32	100.0	331.54	331

* 数值为两次测定的平均值并根据 LDH-M 亚基分子量为 35900 计算所得。

** 数值根据序列分析。

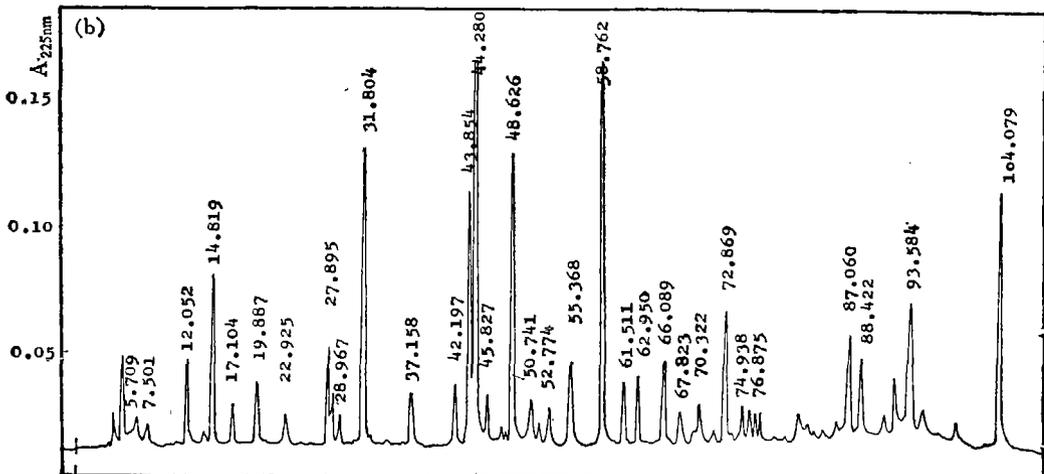
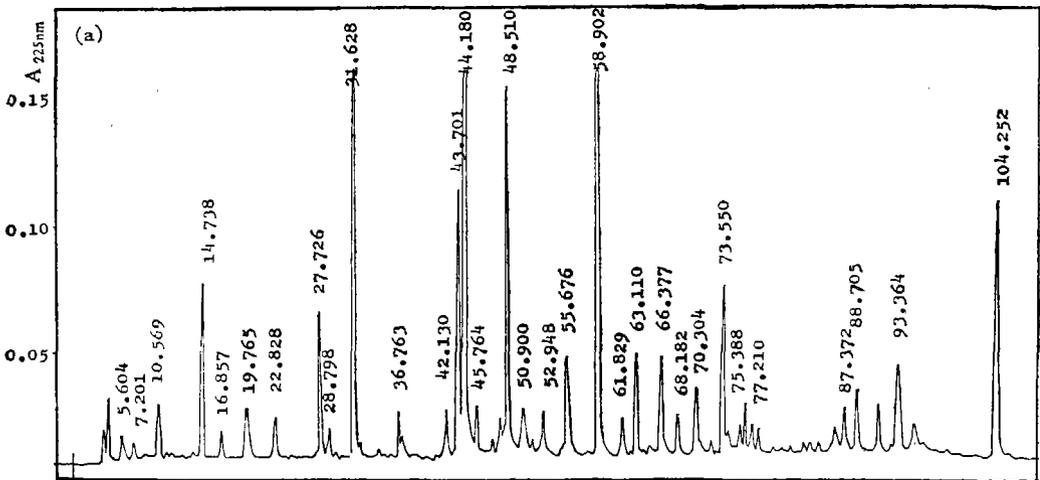
因而同大熊猫一样, C-末端均为 Phe.

上述三种动物 LDH-M₁ 的氨基酸组成分析结果见表 2. 与已经测定序列的大熊猫 LDH-M₁ 的氨基酸组成相比较, 上述三种动物的氨基酸组成与之十分接近, 但仅从氨基酸分析结果, 难于判断这四种动物相互接近程度的大小.

2. 大熊猫、小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₁ 胰蛋白酶水解后的 HPLC 肽谱比较

四种动物 LDH-M₁ 经 TPCK-胰蛋白酶水解以后的 HPLC 肽谱分析结果见图 2. 所有四种动物的 LDH-M₁ 样品 TPCK-胰蛋白酶水解过程用同一批试剂, 在完全相同的条件下进行; HPLC 肽谱分析亦用同一根 C 18 反相层析柱, 在完全相同的条件下完成, 因此结果是可比的.

从图 2 可以看出, 四种动物 LDH-M₁ 的胰蛋白酶水解物经 HPLC 分析, 在图谱中都显现出大约 36 个吸收峰, 把它们相互进行比较, 可以发现约有 30 个肽段的吸收峰不仅保留时间相同, 而且峰形和峰高比例也都相同. 在文献 [1] 已经指出, 猪和大熊猫 LDH-M₁ 的 HPLC



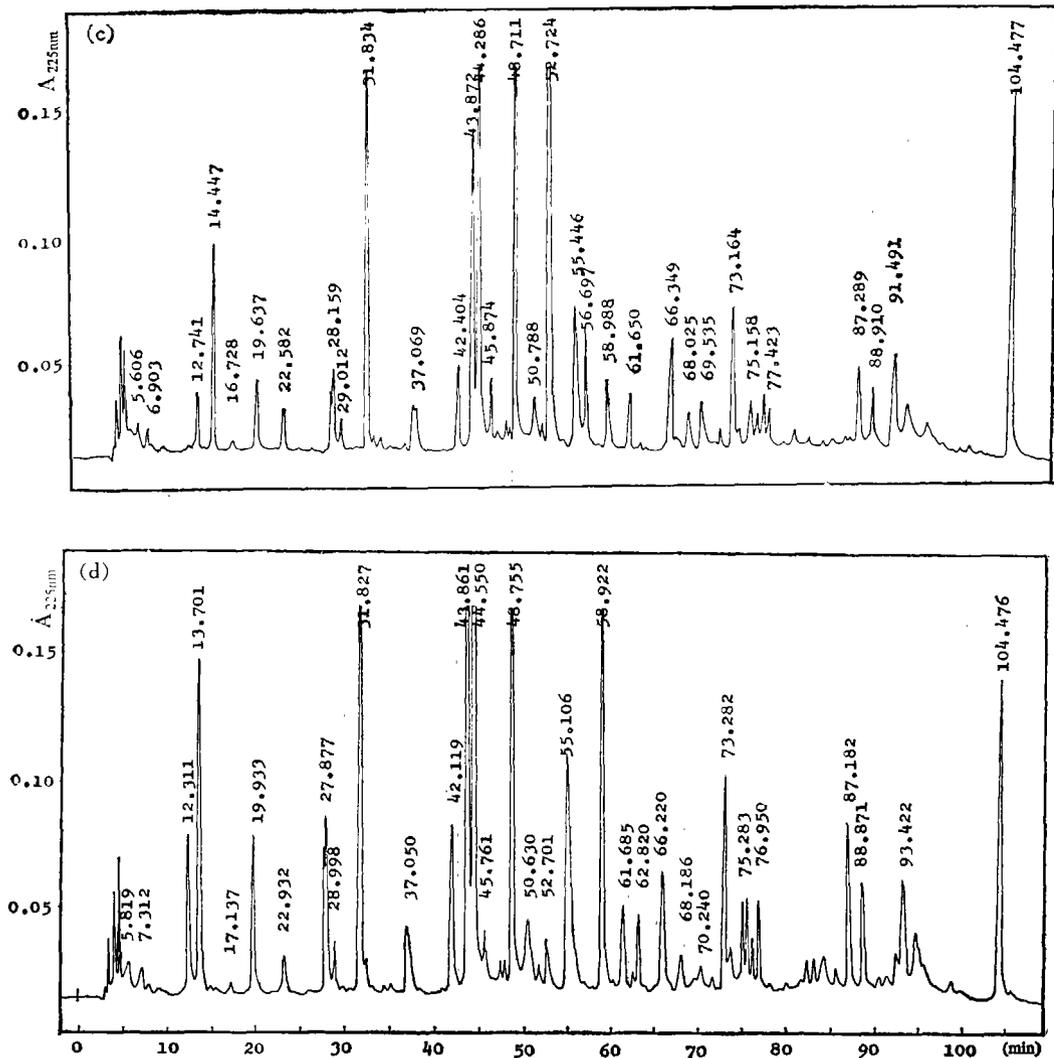


图 2 (a) 小熊猫、(b) 黑熊、(c) 大熊猫和(d) 狗LDH-M₁胰蛋白酶水解后的 HPLC 肽谱

(柱: 填料 YWG-C18, 5 μ m, 4 \times 300mm; 温度: 45 $^{\circ}$ C; 流速: 0.8ml/min; 衰减: 128;
层析流动相: 溶剂 A, 0.01 mol/L 乙酸铵缓冲液, pH 5.8, 溶剂 B, 100% 乙醇)

肽谱中,有 22 个肽段相同,有 13 个肽段存在差别。图 2 的结果表明上述四种动物的 LDH-M₁ 的一级结构相同的程度更大。

在四种动物 LDH-M₁ 中,大熊猫 LDH-M₁ 胰蛋白酶水解肽的进一步分离与各肽段的氨基酸组成分析已见文献[1]。为了进一步确定小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₁ 的胰蛋白酶水解肽中与大熊猫 LDH-M₁ 相差异的肽段,对前三种动物肽谱中的所有肽吸收峰分别收集,全部冰冻干燥;对其中分离不好的肽段用薄层指纹图谱法进行再次分离,或用 HPLC 在不同条件下进行再层析。对分离到的小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₁ 的各个肽段进行了氨基酸组成分析,分析结果见表 3,表 4 和表 5。

表中各肽段的氨基酸组成是经 6N 盐酸在 110 $^{\circ}$ C 水解 24h 后分析得到的结果。Cys 和

表 3 小熊猫 LDH-M₁ 胰蛋白酶水解肽的氨基酸组成

肽 段 (min)	氨 基 酸 组 成																总数
	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	
T 5.604		0.9			1.0									1.0			3
T 7.201											1.1			1.0			2
*T 10.569				1.0			0.8							1.0	0.9		4
T 14.738	1.0	0.9		2.9	0.9									1.0	0.8		8
T 16.857	1.0															1.0	2
T 19.765a													0.9			1.0	2
T 19.765b	1.2										0.9					1.0	3
T 22.828			0.8			0.9	0.9							1.0			5
T 27.726a			0.9	4.1		1.1				0.9						1.0	7
T 27.726b	3.1	0.8	0.9				1.0	0.8				0.8		1.1			9
T 28.798		0.9					1.0				1.0			1.0			4
T 31.629		1.6		3.1	0.9		1.0	0.8			1.2					0.8	10
T 36.793a				2.1							1.0		1.0				4
T 36.793b	1.2		0.9		1.1							0.8		1.0			5
T 42.130				2.2										1.0			3
T 43.701				1.1		1.0		0.8			1.2	0.9				1.0	6
T 44.180	4.3	0.8		2.1	0.9	1.1	1.0				1.9			2.1	0.9		15
T 45.764	2.2		1.6			2.1	1.0	0.8		1.0	1.1					1.0	11
T 48.510	0.9		0.8	1.9			1.0	2.7		0.8		0.7		1.2			11
T 50.900			0.7		0.9	1.2				0.8			0.8	1.0			6
T 52.948	1.0			1.2				0.8			2.2					1.0	6
T 55.672						2.1				0.9	1.1	0.8		1.0			6
*T 58.902a	1.1	0.8	0.7	1.2		1.1	1.0			0.9	0.9			1.1			9
T 58.902b	2.1						0.9			0.9			0.8	1.0			6
T 61.829	2.0			2.3						0.8	3.1			1.0			9
*T 63.110	2.8			2.8		2.0		1.7		0.9	3.2			1.0			15
T 66.377		0.9	0.9		0.8			0.8	0.7	1.8				1.0	0.9		9
T 68.182		0.7				1.1	2.0	0.9		1.7	1.1					1.0	9
T 70.304		0.8	0.9		0.8			0.8	0.9	1.9				1.0	0.8	0.9	10
T 73.550	1.0		0.8	2.1		2.2			1.7		3.3		0.8		0.9	1.0	14
T 75.388	0.9		0.6	2.2		2.3			1.6		4.1		0.8	0.9	0.7	1.0	16
T 77.210	4.3		1.6	1.0	0.9	1.9		3.5		1.6	2.1		0.7	1.0			20
T 87.372	2.1		4.5	1.1	0.9	5.8	2.1	6.5			4.1			1.0	2.8		32
*T 88.705	1.1				1.0			0.8		2.6			0.8	1.0			8
T 93.364	1.2	0.7	2.5	1.0		2.0	3.3	1.2	0.6	1.6	1.8	0.7		1.0			19
*T 104.252	2.1	0.9	0.9		0.8		1.0	3.6		0.8	2.9	0.8		1.0			16

a. 表中最左一行 T 字后边的数字是 HPLC 肽谱中每个肽段的保留时间。

b. 蛋白质用 6N 盐酸在抽气后 110°C 水解 24h。

c. Trp 和 Cys 未经测定。

d. 用 * 号标明的肽段表示这些肽段在氨基酸组成或保留时间上与大熊猫 LDH-M₁ 的相应肽段不同。

Trp 未进行测定, 因为由四种动物 LDH-M₁ 全蛋白质氨基酸组成测定, 已知它们的 LDH-M₁ 亚基中 Cys 和 Trp 残基数基本一致。

表 4 黑熊 LDH-M₁ 胰蛋白酶水解肽的氨基酸组成

肽 段 (min)	氨 基 酸 组 成															总数	
	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His		Arg
T 5.950		0.8			0.9									1.0			3
T 7.501											1.0			1.0			2
T 12.052				1.1				0.8						1.0	0.9		4
T 14.819	1.1	0.8		3.0	0.8									1.0	0.8		8
T 17.104	1.0															1.0	2
T 19.887 a													0.9			1.0	2
T 19.887 b	1.1										0.9					1.0	3
T 22.925			0.9			1.1		0.9		0.9				1.0			5
T 27.895 a			0.8	4.2		1.3										1.0	7
T 27.895 b	3.1	0.9	0.9				1.0	0.8				0.8		1.2			9
T 28.967		0.9					1.0				1.0			1.0			4
T 31.804		1.6		3.2	1.1		1.0	0.7			1.1					1.1	10
T 37.158 a				2 2							1.0		0.9				4
T 37.158 b	0.9		0.7		0.8							0.8		1.0			5
T 42.197				1.9										1.0			3
T 43.854				1.2		1.2			0.7		1.1	0.9				1.0	6
T 44.280	4.2	0.9		2.2	1.1	1.0	1.0				2.2			2.2	0.9		15
T 45.827	1.9		1.7			2.1	1.0	0.8		0.9	1.2					1.0	11
T 48.626	1.3		0.8	1.9			1.0	2.6		0.8		0.8		1.1			11
T 50.741			0.8		0.9	1.2				0.9			0.7	1.0			6
T 52.774	1.0			1.1				0.8			2.1					1.0	6
*T 55.368						1.9				0.8	1.2	0.9		1.0			6
T 58.762 a	0.9	0.8	0.8	1.2		1.1	1.0			0.7	1.0			1.1			9
T 58.762 b	2.1							0.8		1.0			0.7	1.0			6
T 61.611	2.3			2.1						0.8	3.1			1.0			9
*T 62.950	3.1			2.8		2.1		1.8		0.9	3.1			1.0			15
T 66.089		0.8	0.9		1.0			0.9	0.8	1.7				1.0	1.0		9
T 67.823		1.0				1.1	2.0	0.6		1.6	1.2					1.0	9
T 70.322		0.6	0.8		0.8			0.9	0.7	1.6				1.0	0.8	0.9	10
T 72.869	1.1		0.7	1.9		2.0			1.5		3.1		0.8		0.9	1.0	14
T 74.938	1.1		0.8	2.0		2.2			1.6		4.3		0.9	1.1	0.8	1.0	16
T 76.875	3.9		1.7	1.1	1.0	2.0		3.6		1.8	2.0		0.8	1.0			20
T 87.060	2.0		4.6	1.0	0.9	6.2	2.0	6.4			4.2			1.0	2.9		32
T 88.422	1.0				0.8			0.9		2.7			0.9	1.0			8
*T 93.584	1.1	0.8	2.6	1.1		2.3	3.1	0.9	0.7	1.8	2.1	0.5		1.0			19
T 104.079	2.0	0.9	1.0		1.0		1.0	3.7		0.8	3.1	0.9		1.0			16

* 说明同表 3。

结合肽谱和氨基酸组成分析可以看出,四种动物的 LDH-M₁ 肽谱中绝大多数保留时间及峰形和峰高比例相同的肽段也具有相同的氨基酸组成。小熊猫的 T 28.798', 黑熊的 T 28.967', 和狗的 T 28.998' 肽段与大熊猫的 T 1 肽(即 T 29.012') 具有完全相同的氨基酸组成,而后者已证实^[1]与已知 N 端乙酰化的猪 LDH-M 亚基的 T 1 肽氨基酸组成与保留时间完全相同,因而可以推断小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₁ 的 N-端也是乙酰化的,而且 N-端四肽的序列也应

表 5 狗 LDH-M₁ 胰蛋白酶水解肽的氨基酸组成

肽段 (min)	氨基酸组成																总数
	Asx	Thr	Ser	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	
T 5.819		0.9			0.9									1.0			3
T 7.312											1.1			1.0			2
T 12.314				1.2				0.9						1.0	0.8		4
*T 13.701	2.8			2.1	0.9									1.0	0.9		8
T 17.137	1.1															1.0	2
T 19.933 a													0.9			1.0	2
T 19.933 b	1.0										1.2					1.0	3
T 22.932			0.8			1.1		0.9		0.9				1.0			5
T 27.877 a			0.9	4.3		1.1										1.0	7
T 27.877 b	3.2	0.8	0.7				1.0	0.9					0.8	1.0			9
T 28.998		0.9					1.0				1.0			1.0			4
T 31.827		1.7		2.9	1.1		1.0	0.8			1.2					1.2	10
T 37.050 a				1.9							1.0		0.8				4
T 37.050 b	0.9		0.9		1.0							0.9		1.0			5
T 42.119				2.2										1.0			3
T 43.861				1.0		0.9			0.8		1.2	0.8				1.0	6
T 44.550	4.1	0.6		2.1	0.8	0.9	1.0				1.9			2.1	0.8		15
T 45.761	2.2		1.6			1.9	1.0	0.9		0.9	1.0					0.9	11
T 48.755	1.0		0.9	2.1			1.0	2.7		1.0		0.8		1.0			11
T 50.630			0.8		0.8	1.1				0.8			0.7	1.0			6
T 52.701	0.9			1.1				0.9			2.0					1.0	6
T 55.106						1.9				0.8	1.1	0.8		1.0			6
*T 58.922 a	1.1	0.7	0.9	0.9		1.1	1.0			0.9	1.1			1.1			9
T 58.922 b	2.2							0.9		0.7			0.8	1.0			6
T 61.685	2.1			2.3						0.9	3.2			1.0			9
*T 62.820	3.1			3.2		1.9		1.7		0.7	3.1			1.0			15
T 66.220		0.9	0.8		0.9			0.8	0.7	1.8				1.0	1.1		9
T 68.186		0.8				1.1	2.2	0.8		1.8	1.1					1.0	9
T 70.240		0.8	0.8		1.0			0.9	0.8	1.7				1.0	1.1	0.9	10
T 73.282	1.0		0.9	1.9		2.3			1.8		3.3	0.8			1.1	1.0	14
T 75.283	0.8		0.8	2.2		2.1			1.6		3.9	0.8	1.1	0.9	1.0		16
T 76.950	4.1		1.7	1.1	1.0	1.9		3.5		2.2	2.3	0.9	1.0				20
T 87.182	2.1		4.6	1.0	1.8	6.2	1.0	6.5			4.3			1.0	2.7		32
T 88.871	1.0				0.9			0.6		2.6			0.8	1.0			8
*T 93.422	1.3	0.8	2.7	1.1		2.2	3.2	0.8	0.7	1.8	2.2	0.7		1.0			19
T 104.476	2.0	0.8	1.0		1.1		1.0	3.6		0.9	3.0	0.9		1.1			16

* 说明同表 3。

与猪和大熊猫一样。小熊猫的 T 36.793'a, 黑熊的 37.158'a 和狗的 37.050'a 肽段与大熊猫的 T 37 肽 (即 T 37.069'a) 保留时间相同, 氨基酸组成相同, 而且薄层指纹图谱上的位置也相同, 它们应是 C-末端肽, 其序列应当同猪和大熊猫 LDH-M 亚基一样为 -Glu-Leu-Gln-Phe。这与前面提到的三种动物 LDH-M₁ C-末端测定为 Phe 的结果相符合。

从肽谱分析中还可以看出, 小熊猫的 T 45.764', 黑熊的 T 45.827' 和狗的 T 45.761' 肽

段与大熊猫的 T 20 肽(即 T 45.874')保留时间与氨基酸组成均相同。这一肽段即为不少学者单独分离与研究过的所谓“第六 Arg 肽”,也即含有活性中心残基 Cys 165 (由于不同作者采用的序列编号不同,在本文序列编号中应为 Cys 162)的肽段。三种动物 LDH-M 亚基这一段肽的序列看来也同大熊猫的相同。

结合肽谱和各肽段的氨基酸组成分析,在大熊猫、小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₄ 的胰蛋白酶水解肽中也发现了为数不多的互有差别的肽段。

小熊猫 LDH-M₄ 的胰蛋白酶水解肽中的 T 58.902'a, T 63.110', T 93.364' 与大熊猫 LDH-M₄ 水解肽中的 T 36 (即 T 52.724'a), T 5 (即 T 56.697'), T 29 (即 T 91.491') 不仅在肽的保留时间上不同,氨基酸组成也分别相差一个氨基酸。小熊猫 LDH-M₄ 肽谱中的 T 10.569' 与大熊猫的 T 26 (即 T 12.741')氨基酸组成相同,但肽的保留时间相差较大;肽谱中的 T 87.372' 与大熊猫的 T 23 (即 T 87.286')虽然保留时间基本相同,但氨基酸组成有一个残基的差异。

黑熊 LDH-M₄ 的胰蛋白酶水解肽中 T 58.762'a, T 62.950', T 93.584' 与大熊猫 LDH-M₄ 的 T 36 (即 T 52.724'a), T 5 (即 T 56.697'), T 29 (即 T 91.491') 氨基酸组成各有一个残基的差异,肽的保留时间也明显不同。

狗 LDH-M₄ 的胰蛋白酶水解肽中, T 13.701' 与大熊猫 LDH-M₄ 肽谱中的 T 3 (即 T 14.447') 在氨基酸组成上有两个残基的差异,肽的保留时间也不相同。狗 LDH-M₄ 肽谱中的 T 58.922'a, T 62.820', T 93.422' 与大熊猫的 T 36 (即 T 52.724'a), T 5 (即 T 56.697'), T 29 (即 T 91.491') 氨基酸组成与保留时间均各有差异。

小熊猫、黑熊、狗 LDH-M₄ 肽谱中的大多数其余肽段,根据保留时间与氨基酸组成,与大熊猫 LDH-M₄ 的相应肽段的保留时间与氨基酸组成相一致,可以认为这些肽段与后者具有相同的氨基酸序列。

3. 四种动物 LDH-M₄ 肽谱中部分差异肽段的序列分析

在前述的差异肽段中(表 3, 4, 5 中用星号*标明),对小熊猫的 T 10.569', T 87.372' 及 T 93.364'; 黑熊的 T 58.762'a, T 93.584' 以及狗的 T 13.701', T 62.820' 用 470 A 蛋白质序列仪进行了序列测定。由于狗的 T 93.422' 与小熊猫的 T 93.364' 的保留时间与氨基酸组成相同;小熊猫的 T 63.110' 与黑熊的 T 62.950' 都与狗的 T 62.820' 保留时间与氨基酸组成相同,故推测它们之间的序列是相同的。同样的原因,狗的 T 58.922'a 与小熊猫的 T 58.902'a, 推测与黑熊的 T 58.762'a 的序列也是相同的。与上述各肽段相对应的大熊猫 LDH-M₄ 的肽段的序列测定结果已在文献[1]中叙述。由肽谱分析和序列测定而发现的四种动物 LDH-M₄ 的相互差异肽段的序列见图 3。

从图 3 所揭示的大熊猫与小熊猫、黑熊、狗 LDH-M 亚基一级结构上差异的氨基酸残基数目来看,大熊猫 LDH-M 亚基与黑熊 LDH-M 亚基相差 3 个氨基酸残基,而与小熊猫和狗 LDH-M 亚基相比,都相差 5 个氨基酸残基。如果只从这一点考虑,那么大熊猫与小熊猫、黑熊、狗在种系演化的关系上似乎与黑熊更接近一些;它与小熊猫的差距则同与狗的差距一样远。但如果仔细考察大熊猫 LDH-M 亚基与另外三种动物 LDH-M 亚基一级结构中氨基酸残基差异的性质和部位时,特别值得注意的是它与黑熊相差异的三个残基,即 Ile 53, Met 262 与 Glu 324, 也同样存在于它与小熊猫和狗的差异中。更为有趣的是上述三个位置的氨基酸

		14	21
大熊猫	T 14.447'	EEHTPQNK	
小熊猫	T 14.738'	(EEHTPQNK)	
黑熊	T 14.819'	(EEHTPQNK)	
狗	T 13.701'	EDHNPQNK	
		228	231
大熊猫	T 12.741'	QVHK	
小熊猫	T 10.569'	EVHK	
黑熊	T 12.052'	(QVHK)	
狗	T 12.311'	(QVHK)	
		42	56
大熊猫	T 56.697'	DLADELALVDVIEDK	
小熊猫	T 63.110'	(DLADELALVDVMEDK)	
黑熊	T 62.950'	(DLADELALVDVMEDK)	
狗	T 62.820'	DLADELALVDVMEDK	
		177	189
大熊猫	T 87.289'	LGVHPLSCHGWVL-	
小熊猫	T 87.372'	LGVHALSCHGWVL-	
黑熊	T 87.060'	(LGVHPLSCHGWVL-)	
狗	T 87.182'	(LGVHPLSCHGWVL-)	
		245	264
大熊猫	T 91.491'	GYTSWAIGLSVADLAESMMK	
小熊猫	T 93.364'	GYTSWAIGLSVADLAESIMK	
黑熊	T 93.584'	(GYTSWAIGLSVADLAESIMK)	
狗	T 93.422'	(GYTSWAIGLSVADLAESIMK)	
		318	327
大熊猫	T 52.742'a	SADTLWEIQK	
小熊猫	T 58.902'a	(SADTLWGIQK)	
黑熊	T 58.762'a	SADILWGIQK	
狗	T 58.922'a	(SADTLWGIQK)	

图3 大熊猫、小熊猫、黑熊和狗 LDH-M₁ 的差异肽段
(括弧内序列由肽的氨基酸组成与保留时间推知)

残基, 在小熊猫、黑熊和狗 LDH-M 亚基的一级结构序列中出人意外地都是由相同的 Met 53, Ile 262 与 Gly 324 所取代。换句话说, 在四种动物 LDH-M 亚基一级结构序列中, 上述三个位置的氨基酸残基是大熊猫所独有的。

三、讨 论

作为小熊猫、黑熊、狗与大熊猫四种动物 LDH-M 亚基一级结构比较的依据是大熊猫 LDH-M 亚基的全部序列测定。在文献[1]中已经报道为了测定大熊猫 LDH-M 亚基的一级结构, 首先对胰蛋白酶水解后所得到的全部 35 个肽段进行了序列测定。在全部大熊猫 LDH-M₁ 可能产生的胰蛋白酶水解肽中, 只有 T 1 (第 1 至 4 位, N-端为乙酰基封闭), T 4 (第 22 至 41 位, 在 HPLC 肽谱中未出现) 以及第 317 位的 Lys 没有从胰蛋白酶水解肽的序列测定中得到 Edman 降解的信息。在此基础上对大熊猫 LDH-M₁ 的糜蛋白酶水解肽和溴化氰切割肽进行了序列测定, 不仅大部分胰蛋白酶水解肽测定的序列得到验证, 而且它们的拼接通过重叠肽段的序列得到确立。此外, 第 32 至 40 位的序列得到了 Edman 降解的直接证据, 第

317 位 Lys 的序列也得到确立。因此, 全部大熊猫 LDH-M 亚基 331 个残基的序列中, 有 316 个残基是由 Edman 降解直接确定的, 余下的 15 个残基是根据氨基酸组成并参考一级结构已知的猪 LDH-M 亚基的序列而推测的。因此, 以大熊猫 LDH-M 亚基的一级结构为依据, 来对比分析小熊猫、黑熊和狗 LDH-M 亚基的一级结构是有较为可靠的基础的。

前面已经提到, 在分析大熊猫、小熊猫、黑熊与狗 LDH-M 亚基相互间的差异时, 发现大熊猫与黑熊的 LDH-M 亚基之间有 3 个残基的差异, 大熊猫与小熊猫和狗之间分别有 5 个残基的差异。值得注意的是大熊猫与黑熊 LDH-M 亚基相差异的 3 个残基, Ile 53, Met 262, 与 Glu 324, 在小熊猫、黑熊和狗, 甚至猪的 LDH-M 亚基一级结构的相应序列中, 彼此都是相同的, 都由 Met 53, Ile 262, 与 Gly 324 所替代。由此看来, 大熊猫 LDH-M 亚基的一级结构在四种动物的 LDH-M 亚基中确有一定的独特性。如果以 LDH-M 亚基的一级结构所提供的分子信息作为大熊猫种系演化与分类性状的特征, 则有理由把大熊猫在食肉目中列为独立的一科。而且所得的实验结果也支持这样的观点, 即大熊猫要早于黑熊、小熊猫与狗从原初的食肉类族中分化出来。

Wurster-Hill 和 Bush^[3]对大熊猫与有关动物的染色质带形研究所得出的结论, 与本文的上述论点相似。他们在研究中发现大熊猫的染色质带形与熊和小熊猫的相比较, 同形的都极少, 它本身具有明显的独特性, 因而认为不应把大熊猫归入熊科或浣熊科, 而应把大熊猫在食肉目中列为独立的一科。他们还认为大熊猫要比熊科、犬科和浣熊科更早从原初的食肉类族中分化出来。

当然, 大熊猫的进化与分类学地位问题, 不能期望通过它的某一个单一的特征来作出结论, 也不能期望通过某一个实验的结果而最终解决。但本文研究工作所确定的大熊猫乳酸脱氢酶的一级结构以及和其它相关食肉动物的同源蛋白质一级结构的对比, 由此得到的分子信息首次为这一问题的解决提供了新的证据。

对大熊猫 LDH-M 亚基的序列分析也支持下列观点: 某种蛋白质分子在进化过程中的变化速率, 即蛋白质分子在进化中发生一个残基变异的时间是近乎恒定的。在文献 [1] 中已经提到从猪和大熊猫 LDH-M 亚基相差 17 个残基以及偶蹄目和食肉目分化的年代, 推算出 LDH-M 亚基在进化中的变化速率是每 880 万年改变一个残基。从已知的猪和鸡 LDH-M 亚基一级结构的比较, 两者相差 45 个氨基酸残基^[4]。哺乳类动物与鸟类的分化大约在 2 亿年前的三叠纪^[5]。由此推算出 LDH-M 亚基的变化速率是每 890 万年改变一个残基。从不同物种推算出来的 LDH-M 亚基的变化速率的互相吻合看来并不是偶然的, 这一事实正好说明乳酸脱氢酶如同细胞色素 c 一样, 在进化过程中具有恒定的变化速率, 而且它的变化速率要比细胞色素 c 快得多。因此利用变化速率较快的乳酸脱氢酶来研究亲缘关系较近的大熊猫、小熊猫、黑熊等哺乳类动物的种系演化看来也是适当的。

众所周知, 蛋白质序列是基因表达的结果, 遗传信息由 DNA 转录到 RNA, 然后再由 RNA 翻译成蛋白质序列。基因即 DNA 分子中的遗传密码决定蛋白质的序列与结构。在漫长的进化过程中, 生物体不断发生突变。最初的突变是发生在基因也即 DNA 分子上的, 然后这种变化表达在蛋白质分子上, 最后反映到生物的整体水平上。为了进一步验证从蛋白质序列分析所得到的分子信息和深入地研究分子进化, 测定乳酸脱氢酶基因的核苷酸序列将是有益的。

潘文石副教授为本实验提供的大熊猫、小熊猫和黑熊的生物材料,杨端副教授对蛋白质的序列分析给予的指导,刘兆乾副教授对 HPLC 分析工作给予的指导与支持,袁洪生同志为本实验进行的大量的氨基酸组成分析,作者在此特致衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 梁宋平、杨端、张龙翔, 中国科学 B 辑, 1987, 1: 43—53.
- [2] 梁宋平、张龙翔, 生物化学杂志, 2(1986), 67—74.
- [3] Wurster-Hill, D. H. & Bush, M., *Cytogenet. Cell Genet.*, 27(1980), 147—154.
- [4] Eventoff, W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977), 2677—2681.
- [5] Young, J. Z., *The Life of Vertebrates*, Third Edition, Clarendon Press, Oxford, 1981, 73—74.