

电鳗 (*Electrophorus electricus*) 肌肉中两种微白蛋白的氨基酸序列

朱德煦

(南京大学生物系)

Nobuyo Maeda

(美国 Wisconsin 大学遗传学系, 麦迪逊)

Walter. M. Fitch

(美国 Wisconsin 大学生理化学系, 麦迪逊)

摘 要

本文用 Sephadex G-50 凝胶过滤和 DEAE-52 离子交换柱层析提纯了电鳗 (*Electrophorus electricus*) 肌肉中的两种微白蛋白 (parvalbumin)。350 g 新鲜肌肉可提取 100—150 mg 纯的微白蛋白 I, 等电点为 4.25。微白蛋白 II 的含量约为组份 I 的 1/5, 它的等电点为 3.85。根据胰蛋白酶水解所得肽段和溴化氰裂解片段的氨基酸序列, 以及微白蛋白一级结构的同源性确定了两种微白蛋白的氨基酸全序列。微白蛋白 I 和微白蛋白 II 的序列有 22 个氨基酸残基差异, 但和 Ca^{++} 离子结合有关的氨基酸残基并无变异。

肌肉微白蛋白具有高溶解度, 低分子量的特点。这一类蛋白质至少和另外两类蛋白质即肌钙蛋白 $\text{c}^{[1-3]}$ 和肌球蛋白碱性轻链的氨基酸序列具有同源性^[3,5]。某些微白蛋白的三度空间结构已经阐明^[3-7]。一个时期以来曾经认为微白蛋白只存在于低等脊椎动物的肌肉中, 但最近报道已从某些羊膜动物的骨骼肌中分离并鉴定出几种微白蛋白^[8]。上述各点说明利用微白蛋白这一类蛋白质的一级结构研究系统发育 (phylogenetic), 具有重要意义。

一、材料和方法

电鳗得自新泽西州 Ardsley 的世界科研动物社。苯异硫氰、三氟乙酸和三乙胺为 Pierce 产品。DEAE-52 纤维素为 Whatman 产品, Sephadex 为 Pharmacia Fine Chemicals 产品。硅胶铝箔 60 F₂₅₄ 为 E. Merk 和 Eastman 产品。肽和蛋白质的氨基酸分析用单柱法^[9], 样品用 5.7 N HCl 在抽真空下封管后 110℃ 水解, 通常 24h。半胱氨酸转变成 S-吡啶乙基化衍生物^[10]或半胱氨酸^[11]后测定。

Edman 降解这两种蛋白质不能测出 N-末端, 封闭的 N-端残基以 N-乙酰丙氨酸为标准对照, 经高压电泳后用 1% 特丁基次氯酸显色鉴定, 并从纸电泳上回收 N-端残基, 常规条件下水解后做氨基酸分析鉴定。

C-端残基用羧肽酶 Y 鉴定。取 25 nmole 样品溶于 pH 6.5, 0.05 M 磷酸缓冲液中, 加入 10 μ l 羧肽酶 Y 溶液 (100 μ g/100 μ l), 37°C 下保温 90 min, 反应混合物直接上氨基酸分析仪。等电点用 Vesterberg 和 Svenson^[12] 的等电聚焦法测定。微白蛋白溶液的紫外吸收光谱用 Cary 118 型自动记录式分光光度计测定。

1. CNBr 裂解 肽或蛋白质样品溶于 70% 甲酸中, 配成 1% 溶液, 加入等量 CNBr, 在室温下过夜, 反应混合物用蒸馏水稀释 20 倍后冷干, 冷干样品溶于 0.2 M 醋酸中上 Sephadex G-50 柱 (1.8 $\times$ 95cm) 进行凝胶过滤。

2. 酶解 蛋白质或肽溶于 pH 8.0, 0.2 M NH_4HCO_3 中, 配成 1%—2% 溶液, 加 TPCK-胰蛋白酶 (2% w/w) 或嗜热菌蛋白酶 (0.5%, w/v), 在 37°C 下水解 6h。

3. 肽分离 胰蛋白酶水解得到的可溶性肽先上 Sephadex G-25 柱 (1.25 $\times$ 150 cm) 进行凝胶过滤, 用 0.05 M NH_4HCO_3 洗脱, 含有较大的肽的组份用 DE-52 纤维素离子交换层析进一步分离, 柱长 1.8 $\times$ 20 cm, 0.01 M NH_4HCO_3 平衡后用 NH_4HCO_3 梯度洗脱。制备性高压纸电泳在 pH 1.8 (87 ml 冰醋酸和 27.6 ml 88% 甲酸) 或 pH 6.5 (10 ml 冰醋酸, 200 ml 吡啶和 2700 ml 水) 下进行。除个别肽 (微白蛋白 I 的 T3, T11, T12, T13) 用薄板层析分离 (溶剂系统为丁醇: 乙酸: 水 = 4:1:2) 外, 大多数肽都用高压电泳分离 (微白蛋白 I 的 T8 和 T9, 微白蛋白 II 的所有胰蛋白酶水解肽, 除 T1 和 T7 例外)。

4. 序列分析 由于所有酶解肽段相对都比较小, 因此采用手工操作法^[13]进行 Edman 降解。常规条件为: 样品 100—150 nmoles, 偶联试剂为 10% 苯异硫氰, 30% 三乙胺和 50% 吡啶混合液, 反应后偶联试剂用己烷/乙酸乙酯 2:1 (v/v) 洗涤 2 次, 再用苯洗涤 2 次。在冲氮条件下用三氟乙酸进行裂解。噻唑啉酮衍生物用苯/乙酸乙酯 1:1 (v/v) 抽提, 并用 1N 甲醇-HCl 在 50°C 下反应 5 min 转化成 PTH-氨基酸。PTH-氨基酸用薄板层析鉴定^[13], 并按 Smithies 法^[14]碱水解回转成自由氨基酸上氨基酸分析仪重复鉴定。

5. 肽的命名 用胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶水解得到的肽分别加以前缀 T 和 Th, 其后的数字指肽在蛋白质结构中从氨基到羧基端的线性排列顺序。

二、结果和讨论

电鳗肌肉 (350 g) 切碎, 加 1.5 倍体积的抽提溶液 (0.01 M Tris/HCl 缓冲液, pH 8.5, 内含 1mM KCN 和 1mM CaCl_2) 置均浆器中打成均浆。均浆在 10,000 $\times$ g 下离心 30 min, 上清液加固体硫酸铵到 55% 饱和, 4°C 下搅拌 2 h 后离心, 上清液对抽提缓冲液透析过夜, 并用 PM 10 超滤膜浓缩到 40 ml, 浓缩液上 Sephadex G-75 柱 (2.5 $\times$ 95cm), 用抽提缓冲液洗脱, 结果如图 1 所示。将含有微白蛋白的组份超滤浓缩后上 Sephadex G-50 柱 (1.8 $\times$ 90cm) 分离微白蛋白和肌红蛋白, 洗脱条件为 0.01 M Tris/HCl 缓冲液, pH 8.4, 内含 10mM CaCl_2 , 结果见图 2。收集图 2 中的 P3 组份, 用 UM-2 膜超滤浓缩后上 DEAE 纤维素柱 (1.8 $\times$ 30cm) 进一步纯化并分离两种微白蛋白, 柱子用 pH 8.3, 内含 1mM CaCl_2 的 0.01 M Tris/HCl 缓冲液平衡, 梯度洗脱, 两个贮液瓶内洗脱液体积均为 100ml, NaCl 浓度为 0.01—0.1M, 结果见图 3。起初实验所用洗脱条件为 NaCl 直线梯度 0.01—0.2 M, Edman 降解 5 步的结果证明, 在此洗脱条件下微白蛋白 I 中仍杂有少量肌红蛋白。因此对 CNBr 裂解后的片段再进一步纯化 (见补充材料图 2 和图 3)。

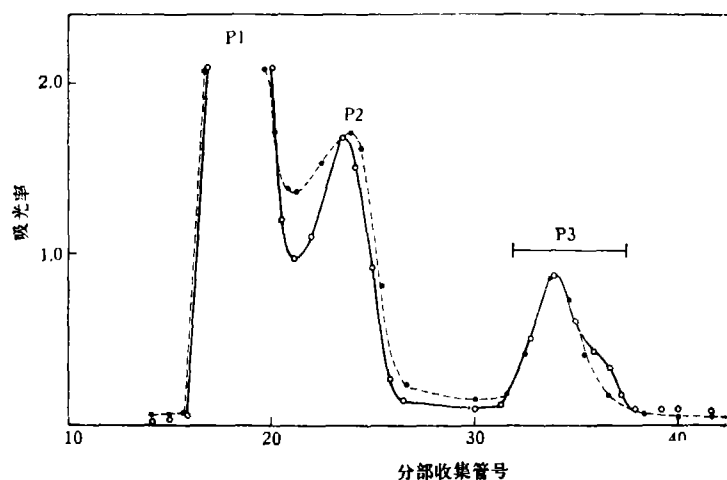


图1 电鳗肌肉抽提液在 Sephadex G-75 柱上的典型层析图

[浓缩的肌肉抽提液 10 ml (相当于 9g 肌肉) 上 Sephadex G-75 柱 (2.5×95 cm), pH 8.5 内含 1mM CaCl_2 的 0.01 M Tris/HCl 缓冲液洗脱, 流速 20 ml/h. ●.....● 280nm 处的吸光率, ○——○ 260nm 处的吸光率, ———— 表示含微白蛋白的收集部分]

表1 电鳗两种微白蛋白的氨基酸组成

	微白蛋白 I	微白蛋白 II
Asx*	16.00(16)	16.00(16)
Thr ^a	4.60(5)	5.91(6)
Ser ^a	5.81(6)	5.61(6)
Glx	8.91(9)	12.41(12)
Gly	8.80(9)	9.23(9)
Ala	18.21(18)	14.03(14)
Val ^b	4.91(5)	7.03(7)
Met	0.93(1)	0.88(1)
Ile ^b	4.41(5)	3.86(4)
Leu	7.90(8)	7.30(7)
Phe	10.21(10)	9.04(9)
Lys	12.71(13)	13.71(14)
His	1.20(1)	1.10(1)
Arg	1.10(1)	1.09(1)
Cys ^c	0.93(1)	0.88(1)

括号中的数值得自序列测定结果。

* 氨基酸残基数作为计算时的参考值。

a. 根据 24, 48 和 72h 水解的数据外推到 0 时的数据。

b. 72 h 水解的数值。

c. 测定半胱氨酸所得数值。

电鳗肌肉中两种微白蛋白的氨基酸组成列在表 1 中, 和其它来源的微白蛋白相同, 这两种蛋白质中都不含有脯氨酸、酪氨酸和色氨酸, 苯丙氨酸的比例高而恒定 (108 个氨基酸残基中分别具有 9 个和 10 个苯丙氨酸残基), 这一组成上的特点在电鳗肌肉微白蛋白 I 和 II 中是很典型的, 这和它们具有典型的微白蛋白紫外吸收光谱^[8]是一致的。电鳗微白蛋白 I 和 II 的等电

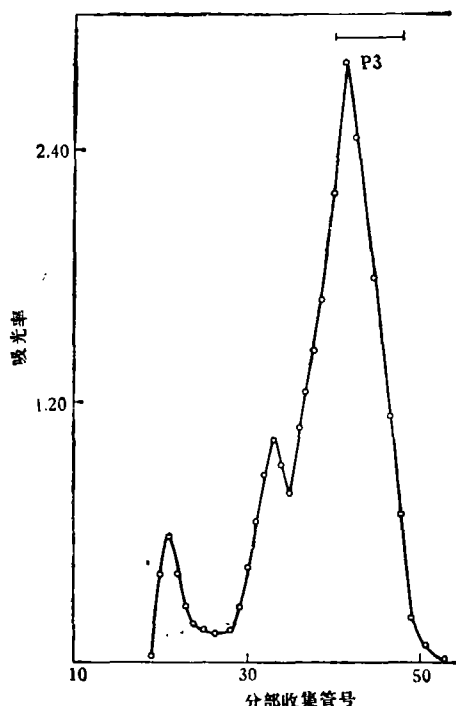


图 2 图 1 中的 P3 在 Sephadex G-50 柱上的层析图

(浓缩的 P3 5ml 上 Sephadex G-50 柱 (1.8×95cm), pH8.4, 内含 10 mM CaCl₂ 的 0.01M Tris/HCl 缓冲液洗脱。流速 6ml/h, 260nm 下测吸光率。——表示收集部分)



图 4 电鳗微白蛋白 I 的氨基酸顺序 (→表示用 Edman 降解确定的残基; —表示根据氨基酸组成估计的残基; +表示 Edman 降解后对剩余部份氨基酸分析确定的残基。↑为 CNBr 裂解点, ↑为胰蛋白酶的作用点, ↓为嗜热菌蛋白酶的作用点)

点分别为 4.25 和 3.85。

两种微白蛋白的氨基酸序列总结在图 4 和图 5 中。肽的分离和氨基酸组成见补充材料。

微白蛋白 II 经胰蛋白酶水解后进行 Sephadex G-25 凝胶过滤可得到 5 个组份 (见附录图 6), 其中之一用高压电泳可分离出 6 个肽, 其中 T13 和 T13' (见补充材料表 IV) 具有完全相

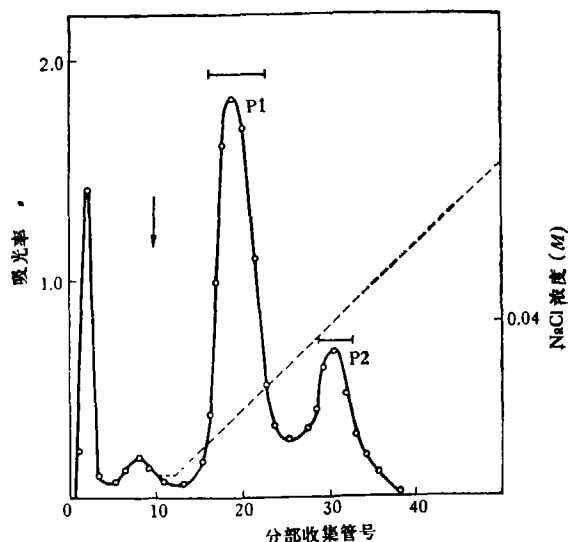


图 3 DEAE 纤维素分离电鳗肌肉 2 种微白蛋白的层析图

(按图 2 收集的微白蛋白部分浓缩后上 DEAE 纤维素柱 (1.8×30cm), 柱子用 pH 8.4, 内含 1mM CaCl₂ 的 0.01M Tris/HCl 缓冲液平衡, 箭头示 0.01—0.1M NaCl 直线梯度开始。流速 30 ml/h, 每管收集体积为 3.8 ml, 260 nm 下测吸光率)

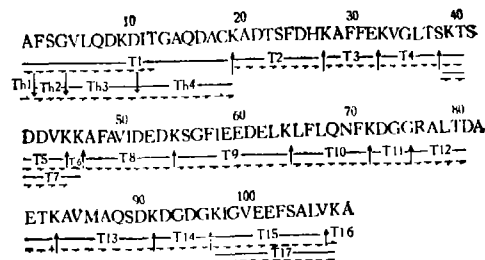


图 5 电鳗微白蛋白 II 的氨基酸顺序 (说明与图 4 相同)

同的氨基酸组成,但在 pH 6.5 下进行电泳,相对于酚红的移动度却分别为 0 和 +40%。一种可能的解释是肽 T13 中 Asp-90 在肽 T13' 中是以酰胺形式存在。90 到 92 位残基的顺序是 Asp₉₀-Lys₉₁-Asp₉₂, 在这种情况下,胰蛋白酶对 91 和 92 之间肽键的水解是很困难的,但事实上胰蛋白酶却能定量地水解这一肽键,这一事实也支持 Asp-90 可能是操作过程中形成的矫作物。为了证明这一可能性,我们避开胰蛋白酶水解,直接用 CNBr 片段测定顺序,但所得结果仍显示 90 位残基是 Asp 而不是它的酰胺形式。考虑到 90 位残基的保守性(已知的微白蛋白顺序这一残基位置都是 Asp)和 T13 的得率是 T13' 的 8 倍,因此我们的结论仍认为 90 位残基是 Asp,但产生 T13' 肽的原因仍不清楚。

X 光衍射研究已证明微白蛋白具有两个 Ca⁺⁺ 离子结合中心,即 S1 和 S2,位于两个螺旋区(A 和 B)之间的转角上,因此具有 A1-S1-B1-L-A2-S2-B2 这种二单元形式的结构,其中 L 是联合区^[5]。和钙离子结合的残基涉及 S1 中的 Asp-51, Asp-53, Ser-55, Phe-57, Glu-59, S2 中的 Asp-90, Asp-92, Asp-94, Lys-96 和 Gly-98,所有这些位置上的残基都是严格保守的。构成关键性的疏水接触的残基例如 S1 中的 Ile-58, B1 中的 Leu-65, Phe-66, Leu-67, Phe-70, A2 中的 Thr-82, Phe-85 (或 Val), S2 中的 Leu-97 以及 B2 中的 Val-99, Phe-102, Leu-105, 和 Val-106 在电鳗的两种微白蛋白序列中都被保留,但是 Leu-88 和 Thr-103 分别被 Met 和 Ser 所置换

关于电鳗肌肉中这两种微白蛋白的氨基酸序列在进化中的意义将在另文中讨论^[15]。

本工作为美国国家科学基金 DEB78-04291 和 DEB78-14197 所资助。美国 Wisconsin 大学生理化学系的 R. L. Niece 博士和 K. M. Hanson 在氨基酸分析技术上的帮助,在此一并致谢。

附 录

用 DEAE-纤维素离子交换柱层析纯化微白蛋白 I

经 Sephadex G-50 凝胶过滤收集得到的含有微白蛋白的部分用超滤(UM-2 超滤膜)浓缩到 10ml, 上 DEAE-52 纤维素柱(1.8×14cm), 柱子用 pH 8.4, 含有 1mM CaCl₂ 的 0.01 M Tris/HCl 缓冲液平衡。洗脱梯度为 200 ml Tris/HCl 缓冲液对 200 ml 0.2M NaCl 溶液(用相同缓冲液配制)。洗脱图形见图1。|—| 标记为收集部分,其中仍含有少量肌红蛋白,进一步纯化用溴化氰裂解片断进行。

溴化氰裂解电鳗微白蛋白 I

微白蛋白 I (约 30 mg, 含有少量肌红蛋白) 溶于 70% 甲酸中配制成 1% 溶液, 加入等重量的 CNBr 在室温下反应 16 h。冷冻干燥后样品溶解在 0.25 M 乙酸中, 上 Sephadex G-50 柱(1.8×95cm) 进行凝胶层析, 结果示于图 2 中。标记|—|为收集部分。组份 4 (CNBr 2) 是 22 个氨基酸残基的纯肽, 它和 CNBr 1 片段的氨基酸组成列于表 1 中。组份 2 用 DEAE 纤维素进一步纯化, 结果见图 3。图 2 中的组份 1 是未裂解的蛋白质, 组份 3 来自肌红蛋白。

酶解

用 pH 8.0, 0.2 M NH₄HCO₃ 溶解一定量的 CNBr 1 片段或热变性(20 min, 100℃ 水浴中)蛋白质, 配成 1% 溶液, 加入 2% TPCK-胰蛋白酶(w/w) 或 0.5% 嗜热菌蛋白酶(w/v), 37℃ 下水解 6h 酶解后的可溶性肽首先进行 Sephadex G-25 凝胶过滤(1.2×150cm, 0.05 M NH₄HCO₃), 洗脱图形见图 4 到图 6。含有较大肽段的组份进一步用 DEAE 纤维素离子交换柱层析分离, 柱长 1.8×20 cm, 用 0.01M 到 0.3M NH₄HCO₃,

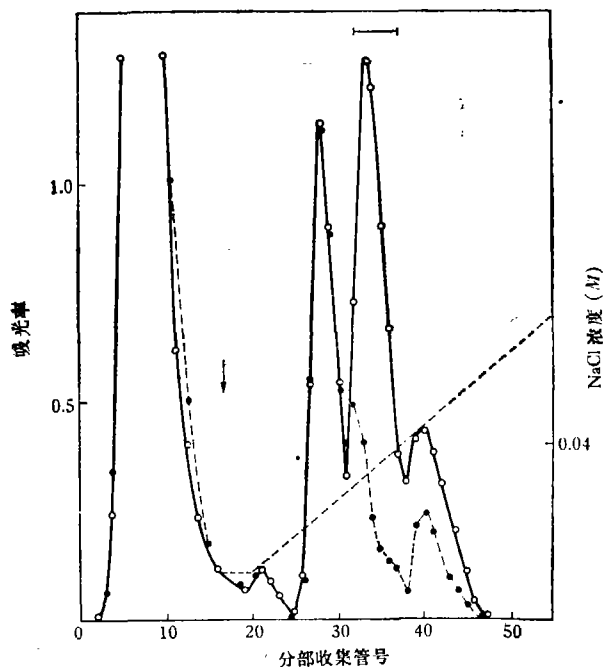


图 1 DE-52 纤维素柱纯化电鳗微白蛋白 I
[正文图 2 中的 P3 部分上 DE-52 柱(1.8×14cm), 柱子用 pH 8.4, 内含 1mM CaCl₂ 的 0.01 M Tris/HCl 缓冲液平衡. 箭头处为 0.01—0.2 M NaCl 直线梯度开始 (各 200ml). 每管收集体积 3.0 ml, 流速 30ml/h. ●.....● A₂₈₀, ○—○ A₂₆₀]

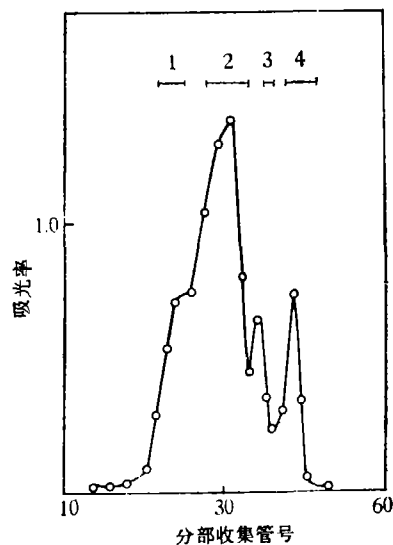


图 2 微白蛋白 I CNBr 裂介肽在 Sephadex G-50 柱上的凝胶过滤图
(每管收集体积为 3.6ml, 流速 6 ml/h. 吸光率在 230nm 处测定)

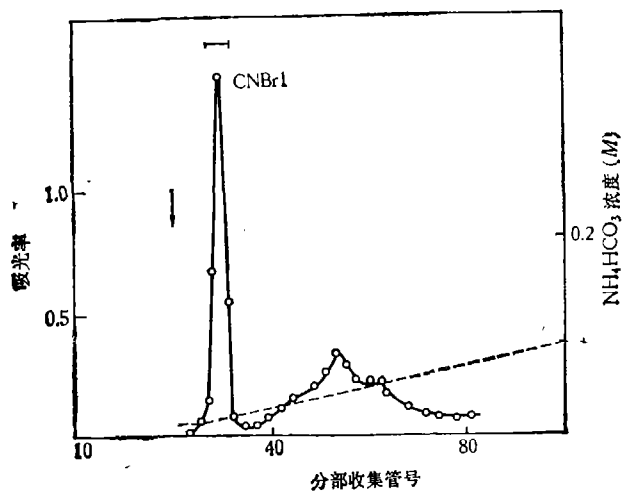


图 3 DE-52 纯化图 2 中的组份 2

[组份 2 上 DE-52 柱(1.8×20cm). 柱子用 0.01M NH₄HCO₃ 平衡, 箭头处为直线梯度开始. 混合瓶中为 0.01 M NH₄HCO₃, 贮液瓶中为 0.3 M NH₄HCO₃ (各 150 ml), 流速 30 ml/h, 吸光率在 230nm 处测定]

表 1 微白蛋白 ICNBr 裂解片段的氨基酸组成, 括号中的数值得自序列测定的结果

	CNBr 1	CNBr 2
Asx*	12.81(13)	3.00(3)
Thr	3.90(4)	0.91(1)
Ser	4.92(5)	1.03(1)
Glx	7.10(7)	2.30(2)
Gly*	5.00(5)	4.22(4)
Ala	14.92(15)	3.11(3)
Val	3.22(3)	2.23(2)
Met	(1)	
Ile	3.20(4)	1.09(1)
Leu	7.30(7)	1.08(1)
Phe	8.83(9)	0.91(1)
Lys	10.21(10)	3.02(3)
His	1.32(1)	
Arg	1.10(1)	
Cys**	0.93(1)	

* 氨基酸残基数作为计算时的参考值。

** 测定半胱氨酸所得数值。

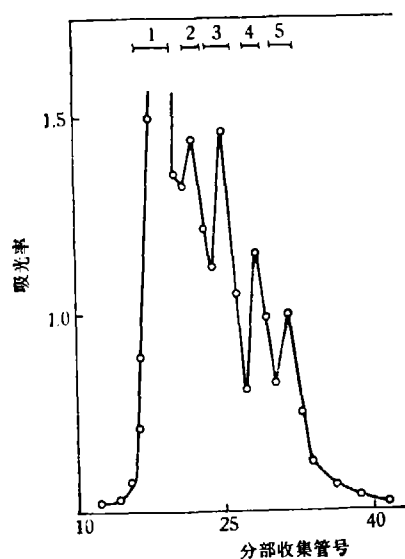


图 4 胰蛋白酶水解CNBr1(图 3)在Sephadex G-25 柱上的凝胶过滤图

[水解液上 Sephadex 柱 (1.25×150cm), 用 0.05 M NH_4HCO_3 洗脱。每管收集体积 4.0ml, 流速 12 ml/h, 吸光率在 230nm 处测定]

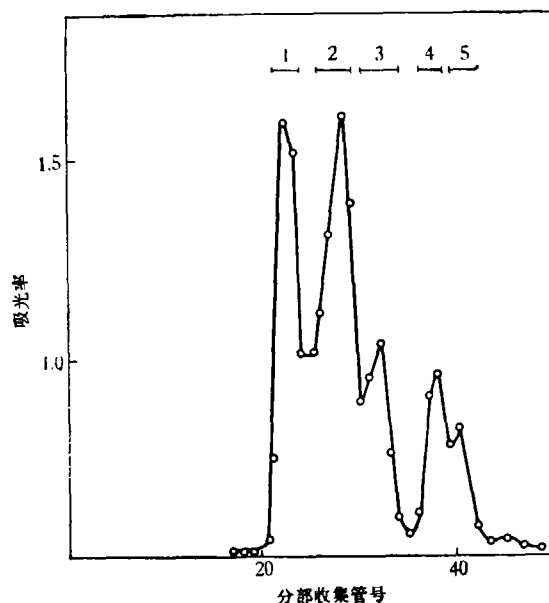


图 5 胰蛋白酶水解微白蛋白 I 在 Sephadex G-25 柱上的凝胶过滤图

(详细说明见图 4)

直线梯度洗脱。分离结果见图 7 到图 10。

大多数肽在 pH1.8 或 pH6.5 下用制备性高压纸电泳分离。个别肽用纤维素薄层层析分离, 所用溶剂系统为丁醇/乙酸/水 (4:1:2 v/v)。

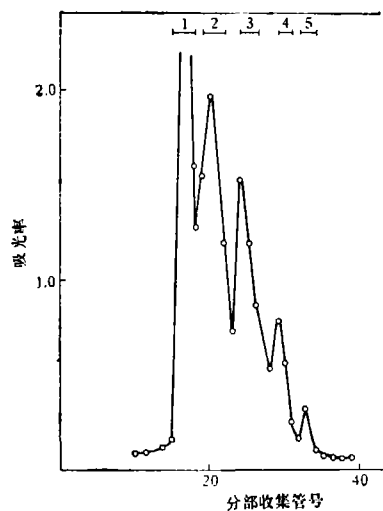


图 6 胰蛋白酶水介微白蛋白 II 在 Sephadex G-25 柱上的凝胶过滤图
(详细说明见图 4)

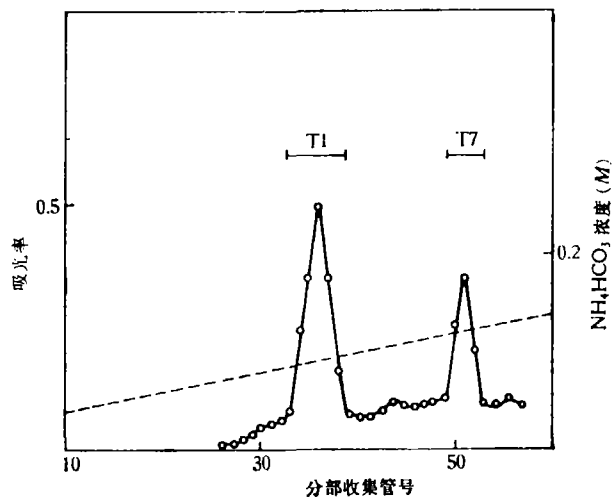


图 7 DE-52 纯化组份 I
(见图 5 微白蛋白 I)
(详细说明见图 3)

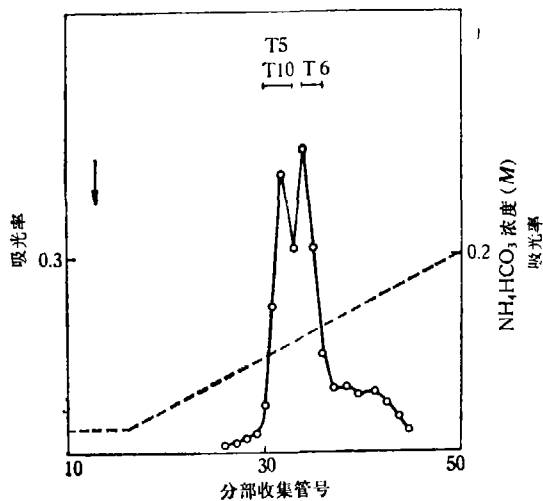


图 8 DE-52 纯化组份 2
(图 4 微白蛋白 I)
(详细说明见图 3)

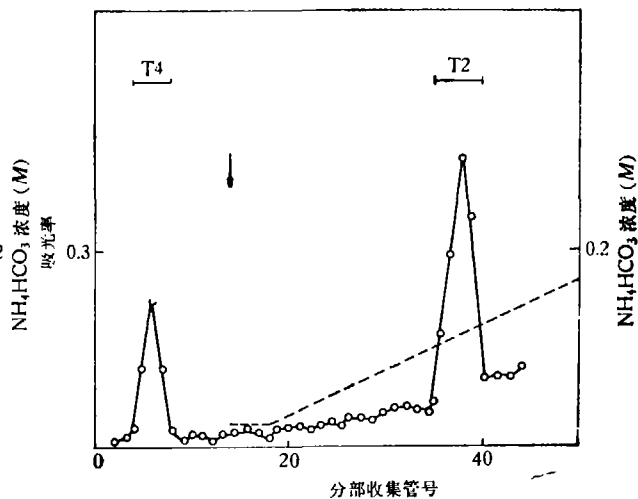


图 9 DE-52 纯化组份 3
(图 4 微白蛋白 I)
(详细说明见图 3)

氨基酸分析

肽样品用 5.7 N HCl, 在 110℃ 下水解 20 h. 水解液的氨基酸含量用 Technicon TSM 分析仪测定. 本工作中各个肽的氨基酸分析数据列于表 2 到表 5 中.

表 2 微白蛋白 T1 胰蛋白酶水解肽的氨基酸组成

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
D	4.00*(4)	1.84 (2)			1.94 (2)		2.01 (2)	1.98 (2)
T	1.01 (1)			0.79 (1)				
S		0.94 (1)		0.84 (1)	0.84 (1)		0.91 (1)	
E			1.00*(1)					1.00*(1)
G	1.05 (1)	1.06 (1)		1.10 (1)				
A	5.60 (6)	1.00*(1)	0.88 (1)		1.00*(1)		1.00*(1)	2.14 (2)
V	1.09 (1)			1.00*(1)	1.05 (1)		0.98 (1)	
M								
J	1.10 (1)							2.20 (2)
L	1.97 (2)			0.89 (1)				
F	0.97 (1)	0.94 (1)	2.21 (2)					1.24 (1)
K	1.10 (1)	1.10 (1)	1.30 (1)	1.06 (1)	1.03 (1)	1.00 (1)	2.20 (2)	1.40 (1)
H		1.21 (1)						
R								
C	0.90 (1)							
总残基数	19	8	5	6	6	1	7	9
位置	1-19	20-27	28-32	33-38	39-44	45	39-45	46-54
在 pH 1.8 下** 的移动度					+110%	+400%+	+17%	
得率%	50	19	8	38	19	25	10	21

	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17
D	1.00*(1)	1.00*(1)		0.86 (1)		3.00*(3)			
T				1.91 (2)		0.91 (1)			
S	0.97 (1)		0.93 (1)				0.91 (1)		0.89 (1)
E		1.25 (1)		1.00*(1)			1.82 (2)		2.01 (2)
G	1.30 (1)		1.20 (1)			3.30 (3)	0.82 (1)		0.92 (1)
A			1.00*(1)	1.97 (2)	1.00*(1)	1.03 (1)	0.94 (1)	1.00 (1)	1.93 (2)
V							1.99 (2)		2.21 (2)
M					0.32 (1)				
J	0.91 (1)						1.01 (1)		0.97 (1)
L	1.04 (1)	1.70 (2)		0.93 (1)			1.00*(1)		1.00*(1)
F	1.20 (1)	1.73 (2)			0.92 (1)		0.90 (1)		0.94 (1)
K	1.10 (1)	0.91 (1)		1.14 (1)	1.01 (1)	0.99 (1)	1.08 (1)		0.98 (1)
H									
R			0.96 (1)						
C									
总残基数位置	10	7	4	8	4	9	11	(1)	12
在 pH 1.8 下** 的移动度	55-64	65-71	72-75	76-83	84-87	88-96	97-107	108	97-108
得率%		+80%	+150%	+90%			+70%	+450%	+60%
	56	18	20	21	10	20	15	40	20

* 这些氨基酸的残基数作为计算时的参考值。

** 肽相对于酚红的移动度, +号为碱性肽, -号为酸性肽, 括号中的数值得自序列测定结果。

T1 和 T13 得自蛋白质, 其它肽得自 CNBr 1 片段。T15 和 T17 用 TLC 分离。

+ pH6.5 下的移动度。

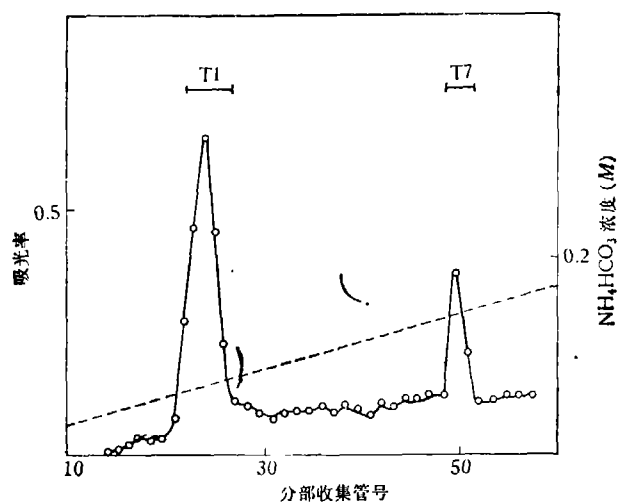


图 10 DE-52 纯化组份 I (图 6 微白蛋白 II)
(详细说明见图 3)

表 3 微白蛋白 I T1 肽段的嗜热菌蛋白酶水解肽的氨基酸组成

	Th1	Th2	Th3	Th4	Th5
D			2.80 (3)		0.99 (1)
T				0.89 (1)	
S					
E					
G		1.01 (1)			
A	1.00 (1)	1.00*(1)	1.00*(1)	2.10 (2)	0.98 (1)
V			1.22 (1)		
M					
I				1.00*(1)	
L			1.11 (1)		0.91 (1)
F		0.95 (1)			
K					1.10 (1)
H					
R					
C					0.82 (1)
总残基数	1	3	6	4	5
位 置	1	2—4	5—10	11—14	15—19
移动度	-260% (pH 6.5)	0 (pH 6.5)	-105% (pH 6.5)	0 (pH 6.5) +102 (pH 1.8)	0 (pH 6.5)
得率%	50	23	18	20	26

* 这些氨基酸的残基数作为计算时的参考值。

表 4. 微白蛋白 II 胰蛋白酶水解肽的氨基酸组成

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
D	2.81 (3)	1.86 (2)			2.01 (2)		1.89 (2)	2.00 (2)	1.16 (1)
T	0.75 (1)	0.70 (1)		0.82 (1)	0.89 (1)		0.72 (1)		
S	0.74 (1)	0.76 (1)		0.84 (1)					0.85 (1)
E	2.02*(2)		0.92 (1)					0.94 (1)	3.00 (3)
G	2.02 (2)			1.00*(1)					1.00*(1)
A	2.80 (3)	1.00*(1)	1.00*(1)		1.00*(1)		1.00*(1)	2.00*(2)	
V	0.98 (1)			1.02 (1)	0.93 (1)		0.93 (1)	1.01 (1)	
M									
I	1.00 (1)							0.97 (1)	0.95 (1)
L	0.91 (1)			1.02 (1)					0.99 (1)
F	0.99 (1)	0.75 (1)	1.81 (2)					0.95 (1)	1.04 (1)
K	1.83 (2)	0.86 (1)	1.19 (1)	1.00 (1)	1.01 (1)	1.00 (1)	1.94 (2)	0.91 (1)	1.04 (1)
H		1.04 (1)							
R									
C	0.85 (1)								
总残基数	19	8	5	6	6	1	7	9	10
位置	1—19	20—27 —42%	28—32 0	33—38 +60%	39—44 +130%	45 +400%	39—45 +180%	46—54 —80%	55—64
移动度	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 1.8)	(pH 6.5)	(pH 1.8)	(pH 6.5)	
得率%	56	22	15.4	21	24	25	20	16	48

	T10	T11	T12	T13	(T13')	T14	T15	T16	T17
D	1.10 (1)	1.09 (1)	1.15 (1)	1.08 (1)	1.07 (1)	2.09 (2)			
T			1.70 (2)						
S				0.88 (1)	0.71 (1)		0.89 (1)		0.78 (1)
E	1.00*(1)		1.11 (1)	1.00*(1)	1.00*(1)		1.99 (2)		2.02 (2)
G		2.00*(2)				2.00*(2)	1.00*(1)		1.00*(1)
A			2.00*(2)	1.97 (2)	1.96 (2)		0.96 (1)	1.00 (1)	2.05 (2)
V				0.91 (1)	0.83 (1)		1.98 (2)		1.89 (2)
M				0.60 (1)	0.81 (1)				
I							0.88 (1)		1.00 (1)
L	1.85 (2)		1.00 (1)				1.10 (1)		1.05 (1)
F	1.71 (2)						1.02 (1)		0.86 (1)
K	0.99 (1)		1.05 (1)	1.00 (1)	0.99 (1)	0.99 (1)	0.98 (1)		0.94 (1)
H									
R		0.99 (1)							
C									
总残基数	7	4	8	8	8	5	11	1	12
位置**	65—71 +40%	72—75 +200%	76—83 —45%	84—91 +90%	84—91 +40%	92—96 —80%	97—107 +75%	108 +450%	97—108 +64%
移动度	(pH 6.5)	(pH 1.8)	(pH 6.5)	(pH 1.8) 0 (pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 1.8)	(pH 1.8)	(pH 1.8)
得率%	20	20	24	32	4	20	8	20	20

* 这些氨基酸的残基数作为计算时的参考值。

** 肽相对于酚红的移动度, 十号为碱性肽, 一号为酸性肽。括号中的数值得自序列测定结果。

表 5 微白蛋白 IIT1 肽段的嗜热菌蛋白酶水解肽的氨基酸组成

	Th1	Th2	Th3	Th4
D			2.00*(2)	1.00*(1)
T				0.87 (1)
S		0.81 (1)		
E			1.07 (1)	1.03 (1)
G		1.00*(1)		0.89 (1)
A	1.00 (1)			1.96 (2)
Y			1.00 (1)	
M				
I				0.96 (1)
L			0.94 (1)	
F		0.98 (1)		
K			1.20 (1)	0.95 (1)
H				
R				
C				0.76 (1)
总残基数	1	3	6	9
位置	1	2—4	5—10	11—19
移动度	—290%	0	—55%	+82%
	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 6.5)	(pH 1.8)
得率%	42	22	23	27

* 这些氨基酸的残基数作为计算时的参考值。

参 考 文 献

- [1] Pechere, J. F. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **236**(1971), 391—408.
- [2] Demaille, J. et al., *Calcium binding proteins*, Drabikowski (Ed., Elsevier Publishing Company), Amsterdam, London, New York, 1974.
- [3] Collins, J. H., *Symp. Soc. Esp. Biol.*, Calcium in Biological System, **30**(1976), 303—334, Cambridge University Press, London.
- [4] Kretsinger, R. H. and Nockolds, C. E., *J. Biol. Chem.*, **248**(1979), 3313—3326.
- [5] Weeds, A. G. and McLachlan, A. D., *Nature*, **252**(1974), 646—649.
- [6] Moews, P. C. and Kretsinger, R. H., *J. Mol. Biol.*, **91**(1975), 201—228.
- [7] Tufty, R. M., Kretsinger, R. H., *Science*, **187**(1975), 167.
- [8] Blum, H. E. et al., *J. Biol. Chem.*, **252**(1977), 2834—2838.
- [9] Niece, R. L., *J. Chromatogr.*, **103**(1975), 25—32.
- [10] Hermodson, M. A., et al., *Biochemistry*, **12**(1973), 3146—3153.
- [11] Moore, S., *J. Biol. Chem.*, **238** (1963), 235—237.
- [12] Vesterberg, O. and Sevensson, H., *Acta Chem. Scand.*, **20**(1966), 820.
- [13] Tarr, G. E., *Anal. Biochem.*, **63**(1975), 361—370.
- [14] Smithies, O., et al., *Biochemistry*, **10**(1971), 4912—4921.
- [15] Maeda, N., Zhu, D. and Fitch, W. M., *Molecular Biology and Evolution*, in press.