

# 细胞质体尾部乳糖-6磷酸受体 及其被酶磷酸化的特点

沈 辉

Thomas Braulke

(无锡轻工大学食品学院,无锡 214036) (德国哥廷根大学分子生物学 生物化学研究所)

**摘要** 研究了大白鼠 L-细胞质体尾部“300 kD乳糖-6磷酸受体(MPR 300-CT)”在细胞内及细胞膜上的分配、分子结构及其被酪蛋白激酶II磷酸化的特点。“MPR 300-CT”由抗“MPR 300-CT”体免疫沉淀、分离,并被纯化为均一体。采用 SDS-PAGE测定“MPR 300-CT”,结果显示:其分子结构是单一的多肽,磷酸化分子的分子量约为  $23 \times 10^3 \sim 25 \times 10^3$ 。在细胞自然生长和实验状态下,“MPR 300-CT”能被酪蛋白激酶II有效磷酸化。放射性同位素  $^{32}\text{P}$  标记显示:在细胞内及细胞膜上的“MPR 300-CT”的比率是 1:1.3,而且“MPR 300-CT”中的丝氨酸(可能还有苏氨酸及酪氨酸)被酪蛋白激酶II磷酸化。

**关键词** 乳糖-6磷酸受体;酪蛋白激酶II;磷酸化;蛋白寡肽;丝氨酸;苏氨酸;酪氨酸

**中图分类号** Q26

## 0 前 言

细胞质体“乳糖-6磷酸受体(MPR)”是一种生物蛋白质,与“胰岛素样生长因子II(IGF-II)”相似。在人类 IGF-II 受体的分子结构中有 80% 与 MPR 的部分 CDAN 序列相同<sup>[1,2]</sup>。而且,表达在卵母细胞的人类 IGF-II 受体能被 MPR 抗体所承认,人肝脏 MPR 与 IGF-II 可特异结合<sup>[1,3]</sup>。细胞质体“300 kD乳糖-6磷酸受体(MPR-300)”存在于生物体内高尔基体网(TGN)和内质体之间,在细胞膜与内质体之间循环,这样可将含有腺体的 MPR 从 TGN 及细胞膜输送到内质体<sup>[4]</sup>。

MPR 由 4 个区域组成<sup>[5]</sup>: 1) 44 个氨基酸残基的胺基末端单一序列; 2) 2 269 个残基的外质体区域; 3) 23 个残基的转移膜区域; 4) 163 个残基的羧基末端质体尾部区域。

尤为重要,质体尾部 MPR-300(MPR 300-CT)是 MPR-300 在细胞内循环所必需的<sup>[6]</sup>。“MPR 300-CT”是一个大分子量的蛋白复合物,它与细胞浆中一种 35 kD 的蛋白质相互作用,而且这种作用依赖于酪蛋白激酶II(CK-II)催化的“MPR 300-CT”的磷酸化作

用<sup>[7]</sup>。

为了研究“MPR 300-CT”在细胞内及细胞膜上的分配、分子结构及其在自然和实验状态下被 CK-II 磷酸化的特点,作者以大白鼠 L 细胞“MPR 300-CT”为研究对象,并采用来源于微生物 *Escherichia coli* 的 CK-II 对其磷酸化修饰

## 1 实验方法与材料

### 1.1 实验材料

[<sup>32</sup>P]正磷酸, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, “彩色标准蛋白质” AMERSHAM 公司; 纤维素簿板 MERCK 公司; 蛋白 A (Pansorbin) PHARMACIA 公司; 牛血清白蛋白 SIGMA 公司; 胰蛋白酶 SIGMA 公司; 纯品“MPR 300-CT”制备<sup>[8]</sup>。

### 1.2 CK-II 的制取

CK-II 来源于微生物 *Escherichia coli*, 制取方法见文献 [13, 14]。

### 1.3 大白鼠 L 细胞<sup>32</sup>P 标记及培育

L 细胞在 135mm 培养皿中培育, 培养液为: Eagle 最少必需培养液 (MEM), 外加 5% (体积分数) 小牛血清、青霉素、链霉素, 在 37°C 培养。

L 细胞<sup>32</sup>P 标记, 是在不含磷酸的 MEM 中加入放射强度为  $8.88 \times 10^7$  Bq 的 [<sup>32</sup>P]磷酸和 0.5% BSA, 在 37°C 培养 6 h。

### 1.4 大白鼠 L 细胞磷酸化“MPR 300-CT”免疫沉淀、分离、纯化

实验方法见 [8]。

### 1.5 大白鼠 L 细胞膜上磷酸化“MPR 300-L”测定

清洗<sup>32</sup>P 标记的 L 细胞后, 再加入含有 3% 抗“MPR 300-CT”体和 0.5% BSA 的 MEM, 在 37°C 培养 90 min. 方法见文献 [7, 8]。

### 1.6 大白鼠 L 细胞内磷酸化“MPR 300-CT”测定

同 1.5 方法, L 细胞膜上“MPR 300-CT”免疫沉淀、分离、纯化后, 再免疫沉淀、分离、纯化 L 细胞内“MPR 300-CT”。

### 1.7 CK-II 对“MPR 300-CT”的磷酸化

CK-II 以“MPR 300-CT”和 ATP 及具有放射性的 ATP ([ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP) 为底物, 在温度 30°C pH8 的缓冲液中催化“MPR 300-CT”磷酸化。示踪物——放射性同位素<sup>32</sup>P 由闪烁测定仪测定。放射量以“CPM”表示。

### 1.8 磷酸化“MPR 300-CT”的电泳及电泳区带图谱显示

采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (簿板) 电泳 (SDS-PAGE, 4%~10% polyacrylamide) 测定磷酸化“MPR 300-CT”分子结构和分子量。标准蛋白混合溶液为: Myosin 220 kD; Phosphorylase b 97 kD; Bovin Serum Albumin 66 kD; Ovalbumine 46 kD; Carbonic Anhydrase 30 kD; Trypsin Inhibitor 21.5 kD; Lysozyme 14.3 kD。

电泳结束后, 真空烘干电泳簿板胶, 再采用 Kodak X-Omat 胶片在暗盒、-70°C 条件下对其放射区带进行自显影 (2~8 h), 胶片经冲洗便得“MPR 300-CT”的电泳区带图谱。

### 1.9 磷酸化寡肽的酶法制取及纯化

将电泳胶上磷酸化“MPR 300-CT”区带切割下来, 溶于 50 mol/L 碳酸氢铵溶液 (pH8.5) 中, 并用胰蛋白酶 (0.1 g/L) 将磷酸化“MPR 300-CT”消化、水解、切割成寡肽。水

解液经超速离心 (45 000 r/min)、清洗、冷冻 ( $-70^{\circ}\text{C}$ )、低温真空干燥等,便得到磷酸化寡肽纯品

### 1.10 磷酸化寡肽的指纹图谱

纤维素薄膜双向电泳-层析,参照文献 [8]及 1.8 方法

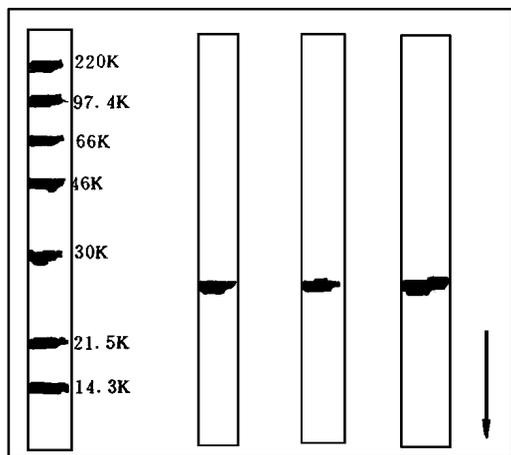
### 1.11 磷酸化寡肽的高效液相色谱 (HPLC) 分析

选用“URPC C<sub>18</sub> SC 2/10”柱 (Pharmacia LKB),用紫外双波 (210, 280 nm) 检测器监测;流动相为 20 mol/L  $\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.1),梯度洗脱液是 Acetonitrile (梯度洗脱 % ~ 100%). HPLC 流速是 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,每 400  $\mu\text{l}$  搜集一管。用闪烁测定仪对被分离、收集的磷酸化寡肽的放射量进行测定,并结合紫外检测器的测定结果,确定来源于磷酸化“MPR 300-CT”的被磷酸化的寡肽

## 2 结果与讨论

### 2.1 纯化并经磷酸化的“MPR 300-CT”分子特性

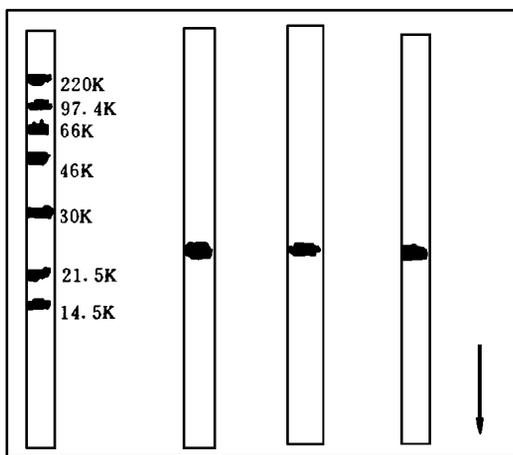
大白鼠 L 细胞经  $^{32}\text{P}$  标记及培育 (自然状态下的磷酸化) 后,“MPR 300-CT”经免疫沉淀、生化分离、纯化成纯品。选用 SDS-PAGE (4%) 法对其分子结构和分子量进行研究;对经提纯而非磷酸化的“MPR 300-CT”,先采用 CK-II 对其磷酸化,再采用 SDS-PAGE (10%) 对其分子结构和分子量进行平行研究。结果见图 1 和图 2。



“MPR 300-CT”在天然条件下被酶磷酸化

图 1 SDS-PAGE “MPR 300-CT”的纯度及分子结构

A 标准蛋白混合溶液  
B, C, D 磷酸化“MPR 300-CT”  
→ 电泳方向



“MPR 300-CT”在实验条件下被酶磷酸化

图 2 SDS-PAGE “MPR 300-CT”的纯度及分子结构

A 标准蛋白混合溶液  
B, C, D 磷酸化“MPR 300-CT”  
→ 电泳方向

据图 1 结果,大白鼠 L 细胞经  $^{32}\text{P}$  标记及培育后,“MPR 300-CT”经免疫沉淀、生化分离,被纯化为均一体。“MPR 300-CT”分子在 4% SDS-PAGE 中仅显示为一条多肽的区带,无任何亚基;其分子量约是  $23 \times 10^3$ 。这与 Olaf 等以来源于人的皮肤细胞的“MPR 300-CT”为对象的研究结果<sup>[7]</sup>相近,但与从来源于大白鼠 L 细胞的“MPR 300-CT”为对象的研究结果<sup>[8]</sup>略有差异。

由图 2 可知,实验条件下,非磷酸化的“MPR 300-CT”被 CK-II 磷酸化后,其分子在 10% SDS-PAGE 中也显示为一条多肽的区带,无任何亚基;其分子量约是  $25 \times 10^3$ . 这与 Olaf 等人的研究结果<sup>[7,8]</sup>接近.

### 2.2 “MPR 300-CT”在细胞内及细胞膜上的分配特点

经测定,“MPR 300-CT”在细胞内及细胞膜上的分配情况见表 1.

表 1 “MPR 300-CT”在细胞内及细胞膜上的分配

“MPR 300-CT”	数量 (CPM)	占总体 “MPR 300-CT” (%)	细胞内与细胞膜上 “MPR 300-CT”比率
细胞内	3 884	43.64	1.0: 1.3
细胞膜上	5 015	56.36	

由表 1 可知“MPR 300-CT”在大白鼠 L 细胞内及细胞膜上的分配是不均匀的,细胞膜上的“MPR 300-CT”明显多于细胞内的“MPR 300-CT”.

### 2.3 “MPR 300-CT”被 CK-II 磷酸化的特点

“MPR 300-CT”磷酸化混合寡肽的指纹图谱和高效液相色谱分离图谱见图 3,图 4,图 5,图 6.

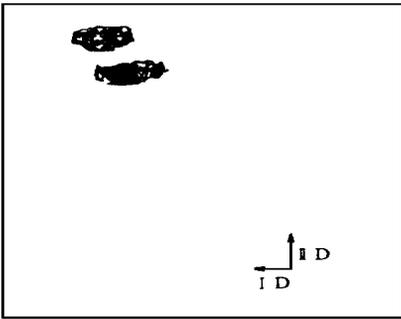


图 3 天然条件下磷酸化“MPR 300-CT”寡肽的指纹图谱

I D 第一电泳方向  
II D 第二层析方向

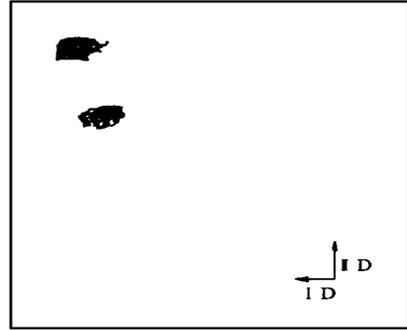


图 4 实验条件下磷酸化“MPR 300-CT”寡肽的指纹图谱

I D 第一电泳方向  
II D 第二层析方向

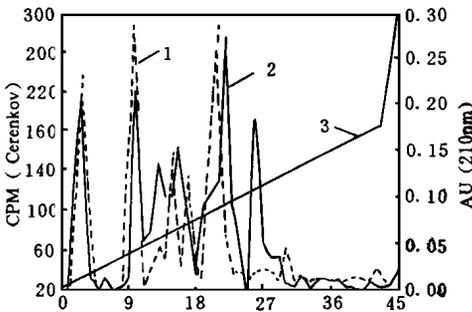


图 5 HPLC 天然条件下磷酸化“MPR 300-CT”的寡肽

1- AU CV 210 nm 下吸光值;  
2- CPM 同位素 <sup>32</sup>P 的放射量值;  
3- 梯度洗脱线. 收集部分为 42

时梯度洗脱浓度达到 60%

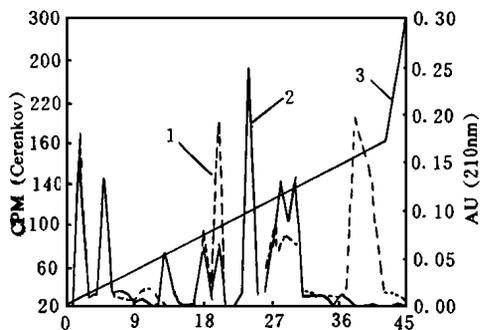


图 6 HPLC 实验条件下磷酸化“MPR 300-CT”的寡肽

1- AU CV 210 nm 下吸光值;  
2- CPM 同位素 <sup>32</sup>P 的放射量值;  
3- 梯度洗脱线. 收集部分为 42

时梯度洗脱浓度达到 60%

众所周知,胰蛋白酶能从蛋白多肽“N 末端”起始,专一性地切割 水解蛋白多肽中赖氨酸与其它氨基酸相连接的酰胺键,并专一性地切割 水解蛋白多肽中精氨酸与其它氨基酸相连接的酰胺键。在作者的实验中,胰蛋白酶将“M PR 300-C T”切割 水解成(按“N→C”末端序列): ETVISK, SSNVSYK, YSK, SVK, ALSSLHGDDQDSEDEV LT IPEV K, V HSGR, GAGAESSHDV R, NAQSNALQER, SSSAQK, TVSSTK, LVSEHDDSDEDLLHI 共 11 种含有丝氨酸的寡肽<sup>[8]</sup>。

据图 3和图 4,“M PR 300-C T”在自然条件下和实验条件下被 CK II 磷酸化后,磷酸化混合寡肽的指纹图谱基本相同——都各为两个指纹斑点。这与 Olaf 的“M PR 300-C T”在自然条件下被磷酸化的实验结果不同,但与其在实验条件下被 CK II 磷酸化的结果基本相同<sup>[8]</sup>。但是,Olaf 认为<sup>[8]</sup>这两个指纹斑点是仅有的两个被磷酸化的寡肽 LVSEHDDS<sup>157</sup>DEDLLHI 和 ALSSLHGDDQDS<sup>82</sup>EDEV LT IPEV K 的放射性指纹图谱,即“M PR 300-C T”在被胰蛋白酶切割、水解后生成的寡肽中,仅有这两个寡肽——寡肽中 Ser(S)<sup>157</sup>和 Ser(S)<sup>82</sup>被磷酸化了。

但作者认为,在此实验条件下用纤维素薄膜双向电泳—层析的方法很难将磷酸化混合寡肽完全分离。这是因为,胰蛋白酶将“M PR 300-C T”切割 水解成的 11 种含有丝氨酸的寡肽其分子量小,且彼此间差距不大,用纤维素薄膜双向电泳—层析的方法很难将它们分离。必须采用高效液相色谱来分离、测定,并辅以闪烁测定仪对标记上的放射性同位素<sup>32</sup>P 进行测定。

据图 5和图 6, L 细胞“M PR 300-C T”的磷酸化混合寡肽完全被高效液相色谱分离开了,而且紫外检测(CV-210 nm)结果与放射性同位素<sup>32</sup>P 测定结果吻合。因此可认为这 11 种“M PR 300-C T”的寡肽中的 Ser 或 Thr 或 Tyr 被 CK II 磷酸化了,这与 Chardot 等<sup>[9]</sup>及作者以前的研究结果<sup>[10]</sup>一致。“M PR 300-C T”在自然条件下除了被 CK II 磷酸化外,还有可能被 PKA(蛋白激酶 A), PKC(蛋白激酶 C)和 CMK(依赖于钙离子的激酶)磷酸化<sup>[7,8]</sup>。因此,“M PR 300-C T”在自然条件下和在实验条件下被酪蛋白激酶 II 磷酸化的结果,表现在图谱中稍有差异。

### 参 考 文 献

- 1 Morgan D O, Edman J C, Standing D N, et al. Nature 1987, 329: 301~ 307
- 2 Lobel R, Dahms N M, Breitmeyer J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84: 2233~ 2237
- 3 Causin C, Waheed A, Bräulke T, et al. Biochem J, 1987
- 4 Dahms N M, Lobel P, Kornfeld S. J Biol Chem, 1989, 264: 12115~ 12118
- 5 Stuart Kornfeld. Annu. Rev Biochem, 1992, 61: 307~ 330

- 6 Johnson K F, Chan W, Kornfeld S. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 87: 10010- 10014
- 7 Olaf R, Olaf-Georg I, Thomas Braulke. Biochem J, 1993, 292: 833- 838
- 8 Olaf R, Gottfried M, Olaf-Georg I, et al. J Biol Chem, 1993, 268: 21470- 21473
- 9 Chardot T, Shen Hui, Meunier J C. C. R. Acad Sci Paris, Sciences de la vie/Life sciences, 1995, 318: 937- 942
- 10 SHEN Hui. Thesis of Doctorat of Pierre & Marie Curie University ( Paris VI ), 1994

## The Cytoplasmic Tail of the Mouse L-Cell 300K. Da Mannose 6-Phosphate Receptor and it's Enzymatic Phosphorylation

Shen Hui      Thomas Braulke

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** The Cytoplasmic Tail of the Mouse L-Cell 300K. Da Mannose 6-Phosphate Receptor (MPR 300-CT), its contribution both on and in the cell membranes, as well as the molecular structure and the enzymatic phosphorylation have been studied. In our study, it has been separated and purified to a homogeneity by the immunoprecipitation of "MPR 300-CT" antibody with "MPR 300-CT". The results of SDS-PAGE show that its molecular structure is a poly-peptide, and the phosphorylated molecular weight is ca. 23- 25 kDa. By the <sup>32</sup>P-labeled, the ratio of the "MPR 300-CT" on and in the cell membranes is 1: 1.3. Moreover, the "MPR 300-CT" has been successfully phosphorylated both in vitro and in vivo by a casein kinase II. The results show that the serines, perhaps with the Threonines and the Tyrosines in the "MPR 300-CT", have been phosphorylated.

**Key words** mannose 6-phosphate receptor; phosphorylation; casein kinase II; oligo-peptides; serines; threonines; tyrosines

(责任编辑: 秦和平)