

# 人肝脏辅酶 II 依赖性视黄醇脱氢 / 还原酶的表达与细胞内定位

刘戈飞<sup>1</sup> 黄东阳<sup>2\*</sup> 杜晶<sup>1,4</sup> 崔泽实<sup>3</sup> 宋今丹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室, 细胞生物学教研室, 沈阳 110001; <sup>2</sup>汕头大学医学院, 汕头 515031; <sup>3</sup>中国医科大学实验技术中心, 沈阳 110001; <sup>4</sup>上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心, 上海 200030)

**摘要** 应用杆状病毒蛋白表达系统在 Sf9 细胞中对人肝脏辅酶 II 依赖性视黄醇脱氢 / 还原酶(NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase, NRDR)进行表达。以纯化的重组蛋白质为材料, 分析 NRDR 的催化活性和酶促反应性质。结果证实, 人肝脏 NRDR 具有视黄醛还原酶活性, 在辅酶 II 存在条件下其催化视黄醛还原成视黄醇的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别(2.8±0.24)  $\mu\text{M}$  和(0.468±0.036)  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。构建删除和不删除羧基端过氧化物酶体定位信号 SRL 序列的 NRDR 绿色荧光蛋白报告基因表达载体。转染 HeLa 细胞后, 应用免疫荧光双染色的方法分析 NRDR 细胞内定位。结果表明 NRDR 定位在细胞内过氧化物酶体。羧基端 SRL 序列对 NRDR 定位到过氧化物酶体是必需的, 删除 SRL 序列的 NRDR 分布在细胞质中。因此, 人肝脏 NRDR 是存在于过氧化物酶体中的辅酶 II 依赖性视黄醛还原酶。

**关键词** 视黄醇脱氢 / 还原酶; 活性; 过氧化物酶体

全反式视黄酸(*all-trans-retinoic acid*)是脊椎动物体内重要的生理活性物质, 对细胞生长、分化、胚胎发育等许多生理活动过程起重要的调节作用<sup>[1,2]</sup>。动物体内维甲酸的合成是以全反式视黄醇为起始物, 经过两步受严格调控的氧化反应完成<sup>[3]</sup>。其中第一步由全反式视黄醇转换成全反式视黄醛的反应是可逆反应, 也是维甲酸合成的限速反应。黄东阳等<sup>[4]</sup>在兔肝脏中发现并纯化了一种新的辅酶 II 依赖性视黄醇脱氢/还原酶(NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase, NRDR), 其催化视黄醛还原成视黄醇的活性非常强, 高于迄今为止报道的催化视黄醛还原的酶, 且广泛分布在兔的各种组织中, 对兔体内维甲酸代谢可能起到重要的调控作用。

兔肝脏 NRDR 在人肝脏中同源体 cDNA 已被克隆(NCBI 索引号:AB045131)。cDNA 序列分析表明, 人肝脏 NRDR 是典型的短链醇脱氢 / 还原酶 (short chain alcohol dehydrogenase/reductase, SDR), 具有 SDR 家族 TGXXXGXG 和 YXXXK 保守模序(分别是 NADPH 结合位点和催化活性位点)和功能结构域(短链醇脱氢酶 adh\_short, pfam00106), 可能具有催化视黄醛还原成视黄醇的活性。但目前对人肝脏

NRDR 的催化活性仅仅是序列上的推断, 尚未有直接实验研究证实。另外, 从序列分析知, 人肝脏 NRDR 羧基端具有过氧化物酶体定位信号 SRL 序列 (Ser-Lys-Leu)。目前发现的参与视黄醇类物质代谢的酶大多分布在细胞质基质中<sup>[5-8]</sup>, 尚未有从细胞内定位和活性分析两方面对过氧化物酶体中存在参与视黄醇类物质代谢的酶进行研究的报道。本研究采用杆状病毒蛋白表达系统表达人肝脏 NRDR 以确定其功能, 并对其细胞内定位进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

PCR Cloning System with Gateway™ Technology、Baculovirus Expression System with Gateway™ Technology、Cellfectin® Reagent、LipofectAMINE® 2000、Plus™ Reagent、ProBond™ Purification System、Platinum Pfx 高保真 Taq 酶、rTEV 蛋白酶购自 Invitrogen 公司。QIAprep Midi 质粒纯化试

收稿日期: 2004-06-14 接受日期: 2004-06-20

广东省自然科学基金项目资助(No.021221)

\* 通讯作者。E-mail: huangdy@stu.edu.cn

剂盒、Ni<sup>2+</sup>-NTA Resin 购自 Qiagen 公司。TNM-FH 昆虫细胞培养基、RPMI-1640 培养基、优等胎牛血清购自 Hyclone 公司。INDIA™ HisProbe-HRP(Ni<sup>2+</sup> 偶联的 HRP)、SuperSignal® 化学发光试剂购自 Pierce 公司。Cy3 标记羊抗鼠抗体购自 Chemicon 公司。鼠抗人过氧化氢酶单克隆抗体、Protein Inhibitor Cocktail、视黄醛、视黄醇、NADPH、DAPI 等化学试剂购自 Sigma 公司。

## 1.2 菌株、质粒、细胞株

DH5 $\alpha$ ™ Cells、MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac Competent Cells、Sf9 cells、Gateway 系统供体质粒 pDONR™201 购自 Invitrogen 公司，人肝脏 NRDR 全长 cDNA、HeLa 细胞为卫生部细胞生物学重点实验室保存。

## 1.3 Gateway 系统入门克隆的构建

根据 NRDR 编码区序列设计羧基端删除和不删除过氧化物酶体定位信号 SRL 序列的 attB 重组位点修饰引物，见图 1。以纯化的带有 NRDR 全长 cDNA 的质粒为模板，用 Platinum Pfx 高保真 Taq 酶进行 PCR 扩增，反应条件为：94 °C，1 min → 94 °C，30 s；55 °C，30 s；72 °C，30 s，30 个循环 → 72 °C，5 min。回收扩增出的片段。在 1.5 ml 离心管中按试剂说明进行 BP 重组反应，将 NRDR 编码区构建到供体载体 pDONR™201 中，形成 Gateway 系统的入门克隆(entry clone)。将重组反应产物转化 DH5 $\alpha$ ™ 感受态菌，扩增筛选出的阳性克隆，纯化质粒。应用引物 5'-TCGCG TTAAC GCTAG CATGG ATCTC-3' 和 5'-GTAAC ATCAG AGATT TTGAG ACAC-3' 测序，确定重组反应的正确性。

## 1.4 重组杆状病毒的构建

按试剂说明将获得的 NRDR 入门克隆(未删除羧基端过氧化物酶体定位信号)与 Gateway 系统杆状病

毒表达载体 pDEST10 进行 LR 重组反应并筛选出 NRDR-pDEST10 表达克隆，可表达出氨基端 6 × His-tag 融合蛋白。将 NRDR-pDEST10 转化 MAX Efficiency<sup>®</sup> DH10Bac 感受态菌，扩增筛选出的阳性克隆，纯化 NRDR 重组杆状病毒 DNA(Bacmid DNA)。使用 Cellfectin<sup>®</sup> 转染试剂将 NRDR 重组杆状病毒 DNA 导入对数生长期的 Sf9 细胞中，待细胞出现明显病毒感染症状并开始从培养皿壁脱落时(约 5~6 天)，收集细胞培养上清液。经过两级扩增获得重组病毒贮存液。使用 12 孔板，每孔接种 4 × 10<sup>5</sup> 个细胞，终点滴定法(end-point dilution assay, EPDA)测定重组病毒贮存液的滴度。

## 1.5 人肝脏 NRDR 在 Sf9 细胞中的表达和纯化

使用含 10% 优等胎牛血清的 TNM-FH 培养基在 100 ml 三角瓶中对 Sf9 细胞进行悬浮培养。培养温度 27 °C，培养体积 20 ml，转速 90 r/min。在细胞生长达到对数期，细胞生长密度为 2.0 × 10<sup>6</sup> 个/ml 时，分别用感染复数(multiplicity of infection, MOI)5、7、10 的病毒量对细胞进行感染。先间隔 24 h 取样，初步确定蛋白质表达时间后，再间隔 12 h 取样确定蛋白质表达时间。每次取样 1 ml，800 g 离心 5 min 沉淀细胞，20 mM PBS 洗细胞 3 次，重悬细胞。根据细胞数调整 PBS 体积(200~400  $\mu$ l)，使重悬后细胞悬液的蛋白质浓度一致。每 200  $\mu$ l 细胞悬液加入 1  $\mu$ l Protein Inhibitor Cocktail、液氮和 42 °C 水浴冻融 3 次，裂解细胞，40 000 g 离心 40 min，收集上清液和沉淀。以未被病毒感染正常生长细胞做对照，样品同时进行 SDS-PAGE 分析和 Western 印迹分析确定重组蛋白质的表达及表达形式。

将细胞培养体积扩大到 100 ml，于 500 ml 三角瓶中进行培养。按以上实验确定的感染复数和蛋白质表达时间感染、收集细胞。使用 40 ml 20mM PBS 重悬细胞，加入蛋白酶抑制剂。将细胞悬液分 8 管，每管 5 ml，冻融法裂解细胞。0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除去细胞碎片。使用 ProBond™ Purification System 以非变性的方式纯化重组人肝脏 NRDR 蛋白，加入纯化柱的细胞裂解液体积与纯化柱柱床体积的比为 5:2。Bradford 法测定洗脱液蛋白质浓度。以 20  $\mu$ g 重组蛋白质对 10 单位 rTEV 蛋白酶的比例，30 °C 温育 4 h 进行酶切。然后与 Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂充分混匀，除去重组蛋白质氨基端的 His-tag。超滤浓缩，加入终浓度为 10% 的甘油，调整重组蛋白质浓度为 1 mg/ml，-20 °C 贮存。

(1) sense primer with Kozak sequence

5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-<sup>Lys Lys</sup>AAA-AAA-GCA-GGC-TTC-ACC-<sup>Kozak</sup>ATG-GCC-AGC-TCC-GGG-ATG-A  
attB1 recombinant site gene specific sequence

(2) antisense primer with PTS1

5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTC-TCA-GAG-GCG-GGA-CGG-GGT-TCC  
attB2 recombinant site gene specific sequence

(3) antisense primer without PTS1

5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTC-TCA-GAG-GGT-TCC-TCC-ACC-CAG-CA  
attB2 recombinant site gene specific sequence

图 1 NRDR 入门克隆构建引物

## 1.6 催化活性

在 100  $\mu$ l 20 mM PB (pH 7.2) 中依次加入 1  $\mu$ g 纯化的重组蛋白质, 1  $\mu$ l 100 mM NADPH 溶液和 1  $\mu$ l 30 mM 的视黄醛 DMSO 溶液。以加入视黄醛为反应起始, 37  $^{\circ}$ C 振荡温育 10 min, 加入 100  $\mu$ l 甲醇-正丁醇混合液(甲醇/正丁醇=5/95, 含 100  $\mu$ g/ml BHT) 终止反应。充分混合后, 10 000 g 离心 1 min, 分离出有机相(上清液)。使用 Waters 公司高压液相色谱系统及 Symmetry C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (4.6 mm  $\times$  150 mm) 色谱柱, 以 85% 乙腈和 30 mM 乙酸胺混合液为流动相, 检测波长 340 nm, 流速为 1 ml/min, 上样量 20  $\mu$ l, 进行分析。

确定蛋白质催化活性后, 使用浓度范围在 1~30 mM 的视黄醇溶液各 10  $\mu$ l 绘制视黄醇定量曲线。在 0.5 ml 20 mM PB (pH 7.2) 中, 使用 1  $\mu$ g 重组蛋白质和 0.3 mmol NADPH, 分别测定在视黄醛浓度为 2  $\mu$ M、4  $\mu$ M、8  $\mu$ M、10  $\mu$ M 时视黄醇的生成。加入视黄醛使反应起始, 37  $^{\circ}$ C 振荡温育 2 min, 加入 0.5 ml 甲醇-正丁醇混合液终止反应。充分混合后, 分离出有机相。加入 5 ml 己烷, 充分混合后, 分离出己烷, 使用氮气风干, 将剩余物溶解于 50  $\mu$ l 甲醇-正丁醇混合液。取 20  $\mu$ l 按上述方法测定视黄醇的生成。实验重复 3 次, 使用双倒数法计算催化反应的动力学常数。

## 1.7 细胞内定位

将删除和不删除过氧化物酶体定位信号的 NRDR 入门克隆与 Gateway 系统的 pDEST53 载体进行 LR 重组反应, 产生 NRDR-pDEST53 表达载体, 可以在哺乳动物细胞中表达出氨基端 GFP 融合的 NRDR 蛋白。

将对数生长期的 HeLa 细胞接种 35 mm 平皿, 每个平皿接种  $8 \times 10^5$  个细胞。待细胞贴壁完全后, 取 2  $\mu$ g NRDR-pDEST53 质粒, Plus<sup>TM</sup> Reagent 和

LipofectAMINE2000 试剂进行转染。转染后每隔 8 h 使用 Olympus IX 51 多功能显微镜进行观察, 待细胞内出现明显绿色荧光时, 按 Recalcati 等<sup>[9]</sup>方法进行过氧化物酶体免疫荧光染色和细胞核复染, 确定 GFP 融合的 NRDR 蛋白分布。其中鼠抗人过氧化氢酶单克隆抗体使用浓度为 20  $\mu$ g/ml, Cy3 标记羊抗鼠抗体使用浓度为 5  $\mu$ g/ml, DAPI 使用浓度为 0.5  $\mu$ g/ml。

## 2 结果

### 2.1 重组杆状病毒制备

使用设计的引物扩增 NRDR 编码区获得到 PCR 产物如图 2 所示。NRDR 编码区为 782 bp, 使用 attB 重组位点引物修饰后增加 67 bp, 扩增的结果与预期相符合。由于反应使用的引物序列较长, 因而设置了不加模板的引物对照, 以排除引物自身扩增造成的影响。构建的入门克隆经测序后确定重组位点正确, 成功构建删除和不删除羧基端 SRL 序列的

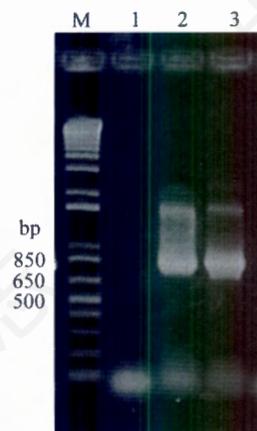


图 2 NRDR 编码区扩增结果

1: 引物对照, 未加模板; 2: 图 1 中引物 1 和引物 2 扩增结果; 3: 图 1 中引物 1 和引物 3 扩增结果; M: marker.

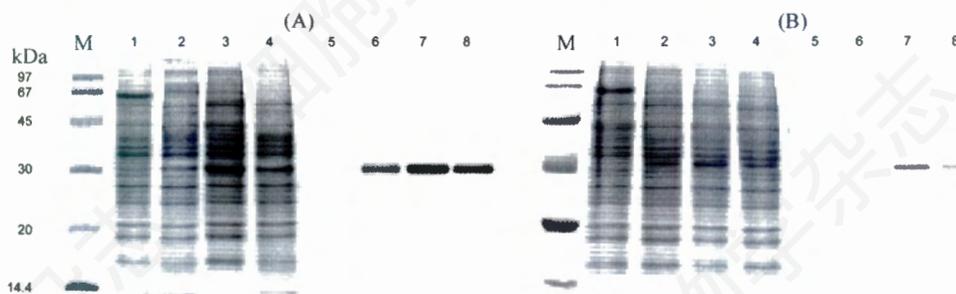


图 4 NRDR 表达条件和表达形式确定

NRDR 重组病毒感染复数为 7。图 A 和 B 分别为感染后细胞裂解液可溶部分和不可溶部分蛋白质 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析结果。1: 培养 72 h, 未被感染 Sf9 细胞; 2: 感染后 48 h; 3: 感染后 60 h; 4: 感染后 72 h。5~8: 1~4 相应样品 Western 印迹分析结果; M: marker。

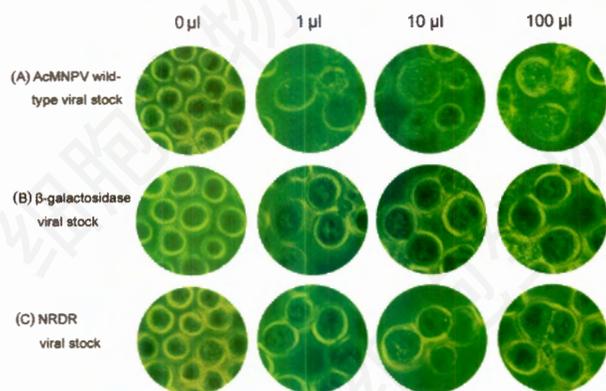


图3 NRDR 重组病毒贮存液滴度测定

以野生型 AcMNPV 病毒和  $\beta$ -半乳糖苷酶重组病毒为对照。 $\beta$ -半乳糖苷酶重组病毒组培养液中加入终浓度为 150  $\mu\text{g/ml}$  的 Blue-gal。(A)野生型 AcMNPV 病毒组细胞中出现多角体蛋白结晶。(B) $\beta$ -半乳糖苷酶重组病毒组细胞变蓝。(C)NRDR 重组病毒组细胞出现膨胀等病毒感染症状,其中 1  $\mu\text{l}$  病毒液与 100  $\mu\text{l}$  病毒液处理组感染症状未见区别。

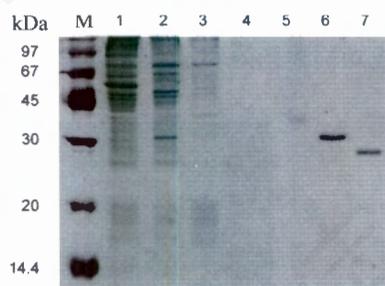


图5 重组 NRDR 纯化过程

1: 培养 60 h 未感染细胞裂解液; 2: 感染后培养 60 h 细胞裂解液; 3: 过柱液; 4: 第 1 次洗柱液; 5: 第 2 次洗柱液; 6: 洗脱液; 7: rTEV 酶切后 NRDR; M: marker。

NRDR 入门克隆。

构建的重组杆状病毒具有生物学活性,可以感染培养的 Sf9 细胞。经终点滴定法测定知 NRDR 重组杆状病毒贮存液的滴度是  $4 \times 10^8$  pfu/ml,如图 3 所示。

## 2.2 人肝脏 NRDR 在 Sf9 细胞中的表达和纯化

使用 NRDR 重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后,在 30 kDa 的位置出现新的蛋白质表达条带。经 Western 印迹分析确定,为氨基端 His-tag 融合的 NRDR 表达。NRDR 的理论分子量为 27.6 kDa,表达载体使表达的分子量蛋白质增加 2.6 kDa,因此表达的蛋白质与预期的相符。用不同的感染复数和感染后培养不同时间检测蛋白质表达,确定 NRDR 在 Sf9 细胞的最佳感染复数为 7,感染后 60 h NRDR 蛋白表达达到峰值。NRDR 蛋白表达时间和 Western 印

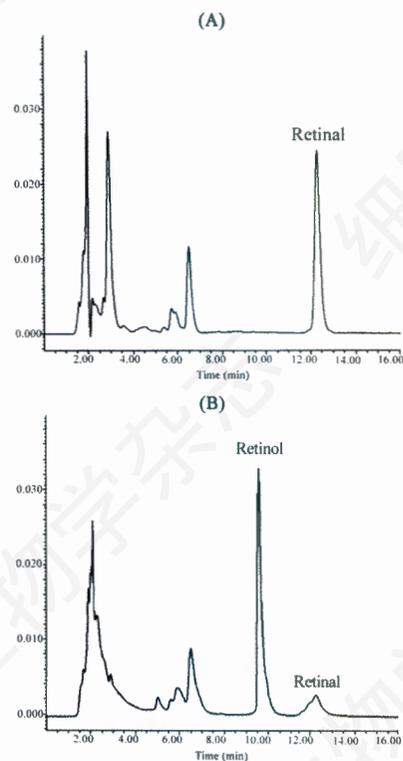


图6 NRDR 催化活性确定

实验条件下视黄醛和视黄醇的洗脱时间分别为 12.25 min 和 9.77 min。A: 对照,加入 BSA; B: 重组 NRDR 催化反应产物 HPLC 分析结果。

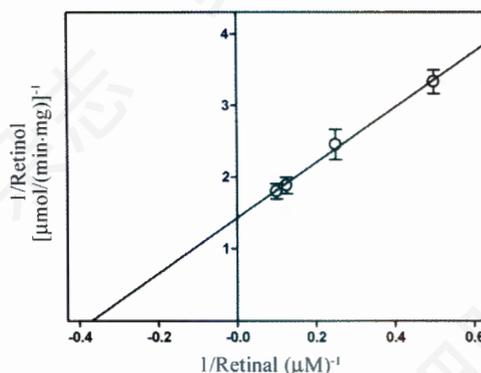


图7 NRDR 催化反应动力学分析

双倒数法测定 NRDR 催化视黄醛还原反应的  $K_m$  值为  $(2.8 \pm 0.24)$   $\mu\text{M}$ ,  $V_{\text{max}}$  值为  $(0.468 \pm 0.036)$   $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

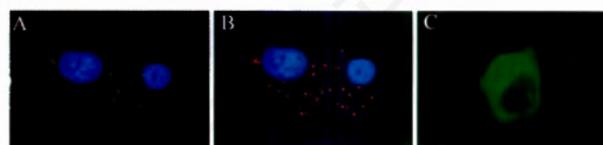


图8 NRDR 细胞内定位分析

A: 氨基端融合 GFP 在 HeLa 细胞内的分布; B: HeLa 细胞中过氧化氢酶的分布; C: 羧基端删除 SRL 的 NRDR 在细胞内分布。

迹分析结果如图 4 所示。由结果可知, NRDR 在 Sf9 细胞中主要以可溶的形式表达, 细胞裂解液的不溶部分存在 NRDR 蛋白, 但含量较少。

使用基于  $\text{Ni}^{2+}$  离子亲和层析技术的 ProBond™ Purification System 可以对 Sf9 细胞表达的氨基端 His-tag 融合蛋白质进行有效的纯化。纯化后重组蛋白质的 His-tag 可以被 rTEV 酶切除去。rTEV 由于本身带有 His-tag, 可以通过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 树脂从反应液中清除。纯化过程如图 5 所示。

### 2.3 人肝脏 NRDR 催化活性

使用视黄醇、视黄醛(均为全反式)按所述方法确定它们在色谱柱的驻留时间分别为 9.77 min 和 12.25 min。在反应体系中加入重组 NRDR 后, 可以检测出明显的视黄醛的消耗和视黄醇的生成, 反应结果如图 6 所示。因此, 重组 NRDR 蛋白具有视黄醛还原酶活性, 可以催化视黄醛还原成视黄醇。使用不同浓度视黄醛测定初始反应速度, 进行双倒数做图得重组 NRDR 催化视黄醛还原的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别  $(2.8 \pm 0.24) \mu\text{M}$  和  $(0.468 \pm 0.036) \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。结果如图 7 所示。

### 2.5 细胞内定位

NRDR 细胞内定位研究结果如图 8。NRDR 蛋白定位在细胞质中, 呈点状分布(图 8A), 与细胞的过氧化氢酶分布一致(图 8B)。因为过氧化氢酶是过氧化物酶体的标志酶, 因此 NRDR 定位于细胞内的过氧化物酶体。删除 SRL 序列的 NRDR 不能定位到过氧化物酶体, 而分布于细胞质中(图 8C)。

## 3 讨论

本研究应用杆状病毒蛋白表达系统在草地夜蛾卵巢细胞 Sf9 中对人肝脏 NRDR 进行了功能性表达, 证明人肝脏 NRDR 具有视黄醛还原酶活性, 并通过细胞内定位研究, 证明 NRDR 定位于过氧化物酶体。

NRDR 属短链醇脱氢 / 还原酶(SDR)家族。SDR 家族成员的特点是一级结构同源性低, 一般只有 15%~30%, 但它们的功能结构域和三维结构却非常相似<sup>[10]</sup>。SDR 家族首先在果蝇细胞中确定<sup>[11]</sup>, 其成员在昆虫细胞中有获得功能性表达的报道<sup>[12]</sup>。因此, 我们在使用大肠杆菌蛋白表达系统没有获得可溶性 NRDR 后(数据未显示), 选用了杆状病毒蛋白表达系统在 Sf9 中对 NRDR 进行表达。结果表明, 杆状病毒蛋白表达系统对 NRDR 是比较理想的蛋白

质表达系统, 具有表达蛋白质量相对高、表达蛋白可溶、为功能性表达等特点。

通过催化反应动力学分析知, NRDR 催化视黄醛还原的  $K_m$  值为  $(2.8 \pm 0.24) \mu\text{M}$ , 这表明 NRDR 对视黄醛具有较高的亲和性, 可以在较低浓度范围内清除视黄醛。这对避免视黄醛积累, 而产生对组织或细胞的毒性具有重要生理意义<sup>[13]</sup>。NRDR 催化视黄醛还原  $V_{max}$  值为  $(0.468 \pm 0.036) \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , 比兔肝脏 NRDR 催化视黄醛还原的活性低。这表明 NRDR 在人肝脏和兔肝脏中生理功能存在差异, 但也有可能由重组蛋白质表达系统造成。细胞内定位研究表明, 羧基端存在 SRL 序列是 NRDR 定位到过氧化物酶体所必需的, 且 SRL 序列对 NRDR 的定位效率非常高。羧基端带有 SRL 序列时 NRDR 完全定位到过氧化物酶体, 羧基端删除 SRL 序列时的 NRDR 全部分布在细胞质中。目前证实的视黄醇脱氢 / 还原酶大多只催化与细胞质中与细胞视黄醇结合蛋白 (cellular retinol binding protein, CRBP) 结合的视黄醇 / 醛发生氧化 / 还原反应<sup>[7]</sup>, 而本研究结果表明 NRDR 可以催化游离形式的视黄醛还原成视黄醇。因此 NRDR 可以在过氧化物酶体基质中发挥其催化活性。

视黄醇和视黄醛间的转换反应即是体内视黄酸合成的关键步骤, 又是肝脏中视黄醇类物质代谢的重要调节步骤<sup>[14]</sup>。NRDR 存在于肝脏中, 定位于细胞过氧化物酶体, 具有辅酶 II 依赖性视黄醛还原酶活性, 因此我们推测 NRDR 具有以下生理意义: (1) 迅速还原由食物来源的胡萝卜素裂解产生的视黄醛。NRDR 具有较高的视黄醛还原酶活性和较低的底物亲和常数, 适于进行此类反应<sup>[15]</sup>。(2) 做为视黄醛体内清除剂, 避免由于视黄醛的积累对机体造成的损伤。(3) 体内 NRDR 可能与视黄酸合成酶, 竞争性的结合视黄醛, 对组织和细胞内的视黄醇类化合物代谢进行精确的调节。(4) 过氧化物酶体是胆汁酸合成的重要场所<sup>[16]</sup>, 视黄醇是胆汁酸合成的原料, 因此 NRDR 可能参与胆汁酸的代谢。

由于 SDR 家族成员催化的反应复杂、底物范围广, NRDR 是否可以参与其他化合物的代谢反应, 还有必要进行深入研究。另外视黄醇结合蛋白, 如 CRBP(I)、CRBP(II)、apo-CRBP 等, 是细胞内视黄醇类物质代谢的重要影响因素。它们对 NRDR 活性的影响还需进一步研究确定。

## 参考文献 (References)

- [1] Wolf G. *Physiol Rev*, 1984, **64**: 873
- [2] Morriss-Kay GM *et al. Int Rev Cytol*, 1999, **188**: 73
- [3] Duester G. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 4315
- [4] Huang DY *et al. Biochim Biophys Acta*, 1997, **1338**: 47
- [5] Napoli JL. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1440**: 139
- [6] Newcomer ME. *FASEB J*, 1995, **9**: 229
- [7] Noy N. *Biochem J*, 2000, **348**: 481
- [8] Luu L *et al. Adv Enzyme Regul*, 2001, **41**: 159
- [9] Recalcati ME, *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 1625
- [10] Kallberg Y *et al. Eur J Biochem*, 2002, **269**: 4409
- [11] Jornvall H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 4226
- [12] Haeseleer F *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 21790
- [13] Dowling JE. *The Retina: An Approachable Part of the Brain*, Cambridge: Harvard University Press, 1987
- [14] Blomhoff R *et al. Physiol Rev*, 1991, **71**: 951
- [15] Kakkad BP *et al. J Biol Chem*, 1988, **263**: 12916
- [16] Formelli F *et al. FASEB J*, 1996, **10**: 1014

## Functional Expression of NADP-dependent Retinol Dehydrogenase/Reductase and Determination of Its Subcellular Localization

Ge-Fei Liu<sup>1</sup>, Dong-Yang Huang<sup>2\*</sup>, Jing Du<sup>1,4</sup>, Ze-Shi Cui<sup>3</sup>, Jin-Dan Song<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China;

<sup>2</sup>Medical School of Shantou University, Shantou 515031, China; <sup>3</sup>Experimental Technology Center, China Medical University, Shenyang 110001, China; <sup>4</sup>Bio-X Life Research Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract** Human liver NADP-dependent retinol dehydrogenase/reductase (NRDR) was expressed by baculovirus protein expression system and its biochemical activity was identified by the recombinant protein. The results indicated the NRDR was a NADP-dependent retinal reductase whose  $K_m$  and  $V_{max}$  for retinal reduction were  $(2.8 \pm 0.24) \mu M$  and  $(0.468 \pm 0.036) \mu mol/(min \cdot mg)$ , respectively. Both of the wild type NRDR which has a C-terminal peroxisome targeting signal SRL, and mutant type NRDR whose C-terminal targeting signal was deleted expression vectors were constructed and transfected into HeLa cells. Immunofluorescence double staining was performed to determinate the subcellular localization of NRDR. The acquired images indicated that NRDR was targeted to peroxisome and this process was C-terminal SRL dependent. These data proved that NRDR was a NADP-dependent retinal reductase whose subcellular location was peroxisome.

**Key words** retinol dehydrogenase/reductase; activity; peroxisome

Received: June 14, 2004 Accepted: June 20, 2004

\*Corresponding author. E-mail: huangdy@stu.edu.cn