

综述与专论

人工模拟酶研究的新动向

罗贵民

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

摘要 以主-客体化学和超分子化学为理论, 评述了人工模拟酶研究的两个新动向: 催化抗体和分子印迹及其最近的研究进展。

关键词 主-客体化学, 超分子化学, 催化抗体, 抗体酶学, 分子印迹, 生物印迹

1 主-客体化学和超分子化学

两位美国化学家(D. J. Cram, C. J. Pederson)和一位法国化学家(J. M. Lehn)相互发展了对方的经验, 他们的工作为实现人们长期寻求合成与天然蛋白质功能一样的有机化合物这一目标取得了开拓性的进展。他们提出的主-客体化学(host-guest chemistry)^[1]和超分子化学(supramolecular chemistry)^[2]已经成为酶人工模拟的重要理论基础, 他们的工作对配位化学、有机合成化学、生物有机化学和生物无机化学等领域的发展有着极其重要的意义, 因而获得1987年诺贝尔化学奖。

主-客体化学和超分子化学无疑是人工模拟酶研究的重要理论武器, 文章就在主体分子或接受体的制备上。根据酶催化反应机理, 若合成出能识别酶底物又具有酶活性部位催化基团的主体分子, 同时底物能与主体分子发生多种分子相互作用, 那就能有效地模拟酶分子的催化过程。迄今, 在这方面已有相当成功的例子。丝氨酸蛋白水解酶已可用小分子化合物来模拟, 能同时结合两个底物分子的反应模板已经被设计并合成出来, 最近又合成出能自身复制的分子。

2 抗体酶 (Abzyme)^[3]

尽管模拟酶研究取得了开拓性成就, 然而化学仍赶不上自然产生复杂分子的能力。机体的免疫系统可产生 10^8 个不同的抗体分子。抗体分子的多样性正是抗体得以与靶分子精确匹配, 从而产生高度特异性和亲和性的分子基础。抗体的精细识别性使其能结合几乎任何天然的或合成的分子, 因此是比较理想的主体分子, 大有开发应用的潜力。酶和抗体尽管功能不同, 但有惊人的相似之处, 能否把抗体变为酶自然也就成为科学家关心的焦点。经过科学家的努力, 抗体酶终于诞生了。可以说, 抗体酶是抗体的高度选择性和酶的高效催化能力巧妙结合的产物, 本质上是一类具有催化活力的免疫球蛋白, 在可变区赋予了酶的属性, 所以也叫催化性抗体(catalytic antibody)。

P. G. Schultz小组认为对硝基苯磷酸胆碱是相应羧酸二酯水解反应的过渡态类似物。用这类似物作半抗原诱导产生单克隆抗体, 经过筛选, 找到一株MOPC167, 它使该水解反应速度加快12 000倍。R. A. Lerner小组根据金属肽酶的研究成果合成了一个含有吡啶甲

酸的磷酸酯化合物作为半抗原,得到一单克隆抗体 6D4,用来催化不含吡啶甲酸的相应碳酸酯的水解反应,使反应加速近 1000 倍。

上述两个小组的成功工作开创了抗体酶发展的新时代。此后,抗体酶制备技术得到了迅速发展。目前制备抗体酶的方法基本有四类:一是用抗体来稳定带电过渡态;二是用抗体作为熵阱;三是利用抗体-半抗原的互补性;四是在抗体的抗原结合部位上引入催化基团和辅基。这些方法综合运用现代化学,免疫学和现代分子生物学的成就,使抗体催化反应的类型越来越多。迄今,抗体酶催化的反应除酯、羧酸和酰胺键的水解反应外,还有酰胺形成,光诱导裂解和聚合、酯交换、内酯化、 β -消除反应,克莱森重排反应,金属螯合,肽键裂解,环氧化反应,氧化还原反应、三基水解以及顺-反异构化反应,脱羧和亚胺形成等反应。这些抗体酶催化反应的专一性相当于或超过酶反应的专一性,催化速度有的可达到酶催化的水平,但一般地说,抗体酶催化反应速度比未催化反应快 10^2 — 10^6 倍。

2.1 抗体酶制备方法

2.1.1 利用抗体来稳定带电过渡态 迄今,大多数抗体酶是通过理论设计合适的与反应过渡态类似的小分子作为半抗原,然后让动物免疫系统产生针对半抗原的抗体来获得的。由于针对半抗原的抗体在几何形状和电学性质上与反应过渡态互补,因而可以稳定过渡态,从而加速反应。1990 年 Shultz 小组利用与底物扭曲构象相似的扭曲卟啉作半抗原,制备的抗体可催化卟啉金属螯合反应^[4]。亚铁螯合酶是血红素生物合成途径中的末端酶,可催化亚铁离子插入原卟啉的生物合成。N-甲基原卟啉由于内部甲基取代而呈扭曲结构,它是此酶的有力抑制剂,也与酶催化的卟啉金属螯合反应的过渡态类似。针对甲基卟啉的抗体可催化平面结构原卟啉的金属螯合,这就为该反应过渡态扭曲结构的作用提供了证据。此工作不仅说明抗体结合能扭曲底物结构,而且表明用抗体可以检验酶催化作用机理。

2.1.2 利用抗体作为熵阱 设计的其它半抗原是利用抗体结合能克服反应熵垒。抗体的结合能被用来冻结转动和翻转自由度,这种自由度的限制是形成活化复合物所必须的。P. A. Bartlett 等合成一个有椅式构象的氧杂双环化合物来模拟由分枝酸生成苯酸这样一个 Claisen 重排反应的过渡态结构^[5]。用此双环半抗原诱导的抗体可使重排反应加速 10^4 倍。由于反应中不形成离子或游离基中间体,反应不需要酸、碱等催化基团催化,所以这项工作对于采用非化学基团催化的抗体酶的发展有重要意义,它加深了人们对于酶作用机理中熵阱模型的理解。用抗体作为熵阱的另一个例子是抗体催化的 Diels-Alder 反应。此反应是由二烯和烯烃产生环己烯,这在有机合成中很重要,但却没有相应的酶催化此反应。这反应的过渡态是具有高能构象的环状物(含有一个高度有序排列的轨道环),反应中化学键的断裂和生成同时进行。因此常可观察到不利的活化熵。设计半抗原时不仅要利用临近效应,还要消除产物抑制,方能诱导出催化这一双分子反应的抗体。D. H. Hilvert 等成功地解决了这一问题。他们用稳定的三环状半抗原诱导的抗体可催化起始加合物的生成,然后立即排出 SO_2 ,产生次级二氢苯邻二甲酰亚胺,抗体对该产物的束缚很弱,因而显著加速反应^[6]。这些例子说明,抗体酶不仅可以催化天然酶不能催化的反应,而且通过半抗原设计还能解决产物抑制问题。

2.1.3 利用抗体-半抗原的互补性 抗体与其配体的相互作用是相当精确的,抗体常含有与配体功能互补的特殊功能基。已经发现带正电的配体常能诱导出结合部位带负电残基的抗体,反之亦然。K. M. Shokat 等利用这种互补性,制备了针对带正电半抗原的抗体,结果在抗体结合部位上产生带负电的羧基,可作为 β -消除催化作用中的碱功能基。他们获得的 6 个抗体有 4 个具有催化活性,其中一个抗体可加速反应 10^5 倍^[7]。后来证明,利用抗体-半抗原互补性是产生抗体的一般方法,可适合各类不

同的反应,如缩合、异构化和水解反应等.抗体催化的下一个重要目标是在其结合部位诱导出两个催化基团(两个酸、一酸一碱或两个碱),进一步增加反应速度.

2.1.4 在抗体的抗原结合部位上引入催化基团和辅基 很多酶的催化作用要有辅因子参与,这些辅因子包括金属离子、血红素、硫胺素、黄素和吡哆醛等.因此,开发将辅因子引入抗体结合部位的方法无疑会扩大抗体催化作用的范围.为此,基本上有三种方法:第一,用多底物类似物一次免疫动物,可产生既有辅因子结合部位又有底物结合部位的抗体.小心设计半抗原可确保辅因子和底物的功能部分的正确配置.此法已用于获得以 $\text{Zn}(\text{II})$ 为辅因子的序列专一性裂解肽键的抗体酶^[8].将 $\text{Co}(\text{III})$ 三乙基四胺连到肽底物上作为半抗原,免疫动物后产生抗体,其结合部位能适应肽底物、三乙基四胺和 $\text{Zn}(\text{II})$ 离子. $\text{Zn}(\text{II})$ 上的开放配位部位可将羟离子传递到束缚底物的待断酰胺键的羧基碳上.此法还用于许多具有氧化还原活性的辅因子,如黄素、刃天青和依赖吡哆胺的反应.第二,用选择性化学修饰法,即半合成法将辅因子或催化基团引入到抗体结合部位.一般是先用可裂解亲和标记物将反应基团(锚功能基)选择性引入到抗体的结合部位,再用这个反应基团作为锚,引入各种催化基团和辅因子.已用此法制备了含有活性部位巯基和咪唑基的具有水解活力的抗体酶^[9].特别重要的是,此法并不需要了解目的抗体的三维结构,而且可以引入天然和非天然辅因子.第三,蛋白质工程即定点突变是产生抗体酶的另一个重要方法. Schultz 小组用此法将催化基团组氨酸插入到对二硝基苯专一的抗体(MOPC315)的结合部位.这个组氨酸在酯底物水解中起亲核催化剂的作用.他们合成了 V_L 片段的基因,其中抗体结合部位的 Tyr-34 被组氨酸残基取代,然后用大肠杆菌表达重组的 V_L ,再将此 V_L 链与天然的 V_H 链组合在一起,则得到具有显著酯解活力的抗体酶,加速反应 10^5 倍^[10].

2.1.5 化学诱变法 这是我们开发的制备抗体酶的新方法.在特定条件下,也可用化学诱变法产生抗体.鉴于天然谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)有重要的医疗价值,而其来源又有限,稳定性差,没有导向性等缺点,我们开发一种化学诱变单克隆抗体法,用于制备具有 GPX 活力的抗体酶.据文献调查,抗体轻链可变区一般含有 3—4 个 Ser,而 Ser 可用诱变剂苯甲基磺酰氟(PMSF)活化,再经硒化氢处理后,则变成 SeCys,而 SeCys 是 GPX 活性部位中的不可缺少的催化活性基团.于是,我们先制备针对酶反应底物之一谷胱甘肽(GSH)衍生物的单克隆抗体,使单抗具有底物结合部位,然后再用化学诱变法将底物结合部位上的 Ser 转变为 SeCys,使单抗具有 GPX 的催化基团.果然,诱变后的单抗具有 GPX 活力,其活力是世界最好的 GPX 模拟物 PZ51 的 1100 倍,催化效率与天然酶在同一数量级,动力学行为也与天然酶类似.

2.2 前景

抗体酶研究还处于幼年时期,还有许多问题有待解决.然而抗体酶的研究实践清楚表明,它是研究酶作用机理的有力工具,对专一性抗体的生化和结构表征有可能最终获得蛋白质结构和功能间关系的一般规律.

同时还要不断开发更有效、合理的产生催化抗体或抗体片段的新方法,拓宽抗体酶催化反应范围,特别是那些天然酶不能催化的反应,可通过设计定做抗体酶来弥补天然酶的不足,这是抗体酶的优势所在.

抗体酶有着广泛的应用前景.医学上可用于治疗和诊断,如溶解血栓、杀死病毒.由于催化抗体的高度专一性,可以特异性导向癌细胞,或用于弥补细胞中的酶不足.能代替真核细胞内一种缺失酶的催化抗体已被表达并在细胞内起催化作用.

各类精细化工产品和合成材料的工业生产需要具有精确底物专一性和立体专一性的催化剂,而这正是催化抗体的突出特点,因此,催化抗体在制备适合市场需要的药物、激素、抗

菌素和其它分子上会大有用武之地,并有助于改进难得药物的合成步骤.在有机合成中可用抗体酶解决外消旋混合物的对映体拆分问题.已经证明,抗体酶可以反相胶团和固定化的形式在有机溶剂中起作用,这为抗体酶的商业应用开辟了前景.具有酯解活力的抗体酶已用于生物传感器的制造上.抗体酶制备技术的开发预示着可以人为生产适应各种用途的,特别是自然界不存在的高效生物催化剂,展现出在生物学、医学、化学和生物工程上会有广泛的令人鼓舞的应用前景.

催化抗体的发展代表着酶工程的新前沿.催化抗体的巨大成就预示一个以开发免疫系统分子潜力为核心的新学科——抗体酶学(Abzymology)的崛起,今后几年无疑会有更大的进展.

3 分子印迹^[11]

分子印迹(molecular imprinting)是指制备对某一特定分子(印迹分子或称模板)具有选择性的聚合物的过程.此法包括如下内容:a.选定印迹分子和单体,让它们之间发生互补作用;b.在印迹分子-单体复合物周围发生聚合反应;c.用抽提法从聚合物中除去印迹分子,则聚合物留有恰似印迹分子的空间,可用于该分子的高选择性分离材料.此技术也叫“主-客”聚合(“host-guest” polymerization)或“模板”聚合(template polymerization).显然,分子印迹法是制备高选择性亲和层析材料的新方法,已用于对映体氨基酸衍生物的外消旋拆分^[12].然而,从人工酶角度看,它又是制备主体分子的有效方法.和用过渡态类似物法制备抗体酶的原理相同,若用过渡态类似物作为印迹分子,则所得聚合物应具有相应的催化活性,此时代替抗体的是人工聚合物.这与Cram和Lehn制备的低分子量冠状的主体分子是不同的、使用聚合物作催化剂的活性部位载体正是考虑了酶的大分子特性.酶的许多独一无二的特征(如功能基的高度协同性和诱导契合、别构效应、空间张力等动态效应)都直

接与酶的聚合物性质相关.所以与低分子量载体相比,聚合物可使体系更复杂,更有可能设计出类酶催化剂.

应用分子印迹时,可遵照如下两种方法:a.印迹分子被共价、可逆结合;b.单体与印迹分子之间的最初相互作用是非共价键的.这两种方法均使用了基于苯乙烯,丙烯酸和二氧化硅的聚合物.

用可逆共价结合可得到能分辨糖的外消旋混合物的聚合物.苯基- α -D-甘露吡喃糖苷(印迹分子)和乙烯基苯基硼酸之间的共价复合物,在大量交联剂存在下聚合,然后用酸水解除去印迹分子.然而,由于携带适当结合基团的化合物数目不多,在不破坏聚合物条件下能可逆进行反应的数目也有限,因此,可逆共价结合法的应用受到了限制.

基于非共价相互作用的分子印迹系统是多种多样的,因为可使用的单体数比可逆共价结合法多得多.由于可使用不同单体的“合剂”,所以,很多相互作用可以使本方法简化.这些相互作用可以是离子的、氢键的、疏水的、电荷转移的或其它.况且印迹分子可用简单的抽提法除去,而不必使用任何剧烈条件.例如,用丙烯酸单体印迹染料,如藏红O和Rhodanile蓝,所得聚合物对聚合时存在的染料有选择性.选择性受使用的单体类型所影响.该系统在层析中的价值已得到证明:将染料印迹在多孔硅石表面上的一薄层丙烯酸聚合物中,所得制备物可在HPLC条件下使用.

3.1 用分子印迹法制备的人工酶

基于非共价相互作用的分子印迹可用来产生催化聚合物.模拟蛋白酶水解氨基酸酯的聚合物已由咪唑单体[4-(5)-乙烯基咪唑]制备出来了.

K. Mosbach描述了一种制备具有专一结合部位的非蛋白质催化剂的方法.他用反应的过渡态类似物印迹聚合物,结果得到可水解对硝基苯乙酸酯的合成酶^[13].他使用的过渡态类似物是对硝基苯甲基磷酸酯(印迹分子).印迹分子和Co(II)与多聚乙烯基咪唑于65℃混合

反应 5d, 则得一蓝色聚合物, 其水解对硝基苯乙酸酯的活力比未印迹聚合物高 60%。

3.2 生物印迹

此法类似于分子印迹, 只不过主体分子是生物分子. Mosbach 小组^[14]用生物印迹法修饰了 α -胰凝乳蛋白酶, 修饰酶可催化 *D* 型氨基酸酯的合成. 用正丙醇沉淀酶和 *N*-乙酰-*D*-色氨酸间的酶-抑制剂复合物, 干燥后再放在环己烷中反应, 可以催化合成 *N*-乙酰-*D*-色氨酸乙酯, *D* 型氨基酸酯化的速度为 $7.5 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$. 然而, 修饰酶在水中即失去对 *D* 型氨基酸的专一性. 因为在有机溶剂中沉淀时, 酶分子接受 *D* 型衍生物的构象被冻结, 并且在无水有机相中仍能继续保持. 在水中则酶又变回到它的天然构象, 只能催化 *L* 型氨基酸酯化.

A. M. Klibanov 小组^[15]研究了牛血清白蛋白、右旋糖酐、糊精、多聚异丁烯酸和多聚天冬氨酸等作为主体分子的生物印迹现象. 配体(印迹分子)加入上述主体分子的水溶液中, 然后冻干、用有机溶剂抽提配体, 再真空干燥, 则得印迹的主体分子. 印迹的主体分子可在无水有机溶剂(不是水)中结合配体. 用酒石酸印迹的牛血清白蛋白在无水乙酸乙酯中结合酒石酸的量是未印迹白蛋白的 30 倍.

催化抗体技术和分子印迹技术是主-客体化学和超分子化学理论宝库中的两件新武器,

它使我们在设计定做实用催化剂, 以实现任何所期望的化学转化这一目标上又向前迈进了一大步. 我们相信, 不久的将来会有更多更好的适合各种用途的实用催化剂问世.

参 考 文 献

- 1 Cram D J. Science, 1988; **240**: 760
- 2 Lehn J-M. Angew Chem Int Ed Engl, 1988; **27**: 89
- 3 Scanlon T, Schultz P G. Phil Trans R Soc Lond B, 1991; **332**: 157
- 4 Cochran A G, Schultz P G. Science, 1990; **249**: 781
- 5 Jackson D Y, Jacobs J W, Sugawara R *et al.* J Am Chem Soc, 1988; **110**: 4841
- 6 Hilvert D, Hill K M, Nared K D *et al.* Antibody catalysis of a Diels-Alder reaction, 1989; **111**: 9261
- 7 Shokat K M, Leumann C J, Sugawara R *et al.* Nature, 1989; **338**: 269
- 8 Iverson B L, Lerner R. Science, 1989; **243**: 1184
- 9 Pollack S J, Schultz P G. J Am Chem Soc, 1989; **111**: 1929
- 10 Baldwin E, Schultz P G. Science, 1989; **245**: 1104
- 11 Wulff G. Trends Biotechnol, 1993; **11**: 85
- 12 Ekberg B, Mosbach K H. Trends Biotechnol, 1989; **7**: 92
- 13 Mosbach K H. Preparation of synthetic enzymes and synthetic antibodies, U. S. US 5, 110, 833 (Cl. 521. 50; C08J9/26) 1992: 1—8
- 14 Staahl M, Mansson M, Mosbach K H. Biotech Lett, 1990; **12** (3): 161
- 15 Braco L, Dabulis K, Klibanov A M. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 274

载脂蛋白 J 的结构与功能

刘秉文

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610041)

摘要 载脂蛋白 J (apo J) 是 1990 年从人血浆 HDL 中新分离出的一种酸性糖蛋白, 分子量 70 000, 由 α 及 β 亚基通过二硫键相连而成. 通过 apo J cDNA 已确定了 apo J 427 个氨基酸残基的序列. apo J 含双性 α 螺旋及结合肝素的结构域, 可与脂质结合成脂蛋白. apo J mRNA 广泛分布于全身各组织, 以脑、卵巢、睾丸及肝脏含量最多. apo J 的功能可能有: 结合与转运脂质; 抑制补体 C8 及 C9 的激活; 参与精子的成熟等.

New Trends in Artificial Imitation of Enzymes. Luo Guimin. (*The National Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 290—294

Catalytic antibodies and molecular imprinting are two new trends in artificial imitation of enzymes, and their recent advances have been reviewed on the basis of the host-guest chemistry and supramolecular chemistry.

Key words host-guest chemistry, supramolecular chemistry, catalytic antibodies, molecular imprinting, artificial imitation of enzymes

Structure and Function of Apolipoprotein J. Liu Bingwen. (*Apolipoprotein Research Unit, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 294—299

Apolipoprotein J (apo J) has been purified from human plasma HDL and characterized by de Silva *et al* in 1990. Apo J is a 70kD glycoprotein, comprised of two disulfide-linked subunits designated apo J α (34—36kD) and apo J β (36—39kD). The sequence of the 427 amino acid residues of apo J was deduced by the cDNA cloning and sequencing. The predicted α helical regions of apo J indicated that three of these could generate amphiphilic α helices, and may be lipid-binding domains in apo J. Apo J mRNA was expressed in relatively high levels in brain, ovary, testis and liver. Apo J is unique among previously characterized human apolipoproteins in its structure and tissue distribution. The function of apo J is thought to be involved in a variety of physiological processes, including binding and transport of lipids, regulation of complement function and sperm

maturation etc.

Key words apolipoprotein J, apo J α and apo J β , apo J HDL, structure and function, apo J homologs

Gene Expression System in Mammalian Cells.

Ma Wenli, Xue Shepu. (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 300—303

Through appropriate design and molecular manipulation, mammalian expression vectors could be constructed. Such plasmids, when introduced into suitable mammalian host cells, would effectively express foreign genes of interest, which constitutes a mammalian gene expression system. Here, the current advances in this field are reviewed.

Key words mammalian cells, expression vector, expression plasmids

Advances in the Researches of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). Liang Hua, Ma Dalong. (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (4): 303—307

Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), which belongs to the immunoglobulin superfamily, is one of the important adhesion molecules on the cell surfaces. It can bind rhinovirus and some of the members of the integrin family and involves the developments of inflammation, common cold, allergy and graft rejection etc. A brief review about the cell distributions, expression regulation, structure, functions and clinical applications of ICAM-1 is described.

Key words CD 54, ICAM-1, rhinovirus,