

- 11 Egholm M, Nielsen P E, Buchardt O *et al.* J Am Chem Soc, 1992; **114**: 9677
- 12 Bemidov V, Frank-Kamenetskii M D, Egholm M *et al.* Nucleic Acid Research, 1993; **21** (9): 2103
- 13 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H *et al.* Science, 1991; **254**: 1497
- 14 Rose D J. Anal Chem, 1993; **65**: 3545
- 15 Cherny D Y, Belosterkovskii B D, Frank-Kamenetskii *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 1667
- 16 Nielsen P E, Egholm M, Berg R H *et al.* Nucleic Acid Research, 1993; **21** (2): 197
- 17 Egholm M, Buchardt O, Christensen L *et al.* Nature, 1993; **365** (7): 566
- 18 Francois J C, Behmoaras T S, Thutong N T *et al.* Biochemistry, 1989; **28**: 9617
- 19 Kim S K, Nielsen P E, Egholm M *et al.* J Am Chem Soc, 1993; **115** (15): 6477
- 20 Hanvey J C, Peffer N J, Bisi J E *et al.* Science, 1992; **258**: 1481
- 21 Wittung P, Nielsen P E, Buchardt O *et al.* Nature, 1994; **368** (7): 561

- 22 ørum H, Nielsen P E, Egholm M *et al.* Nucleic Acid Research, 1993; **21** (23): 5332

Peptide Nucleic Acid. Zhang Ligang, Min Jimei, Zhang Lihe (*National Key Laboratory of Natural and Biometric Drug, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract A DNA analogue was designed in a computer model by replacing the deoxyribose phosphate backbone in DNA with a peptide backbone. Its binding to the complementary oligonucleotide was observed with great specificity. PNA's synthesis, hybridization and its application in molecular biology etc. were reviewed.

Key words peptide nucleic acid (PNA), oligonucleotides, antisense hybridization, specificity

膜蛋白的拓扑学

王庆达 林其谁

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 膜蛋白的拓扑学是研究膜蛋白三维结构的出发点. 利用融合蛋白和化学修饰等实验技术已确定了很多膜蛋白的拓扑学. 对膜蛋白的转运与插膜的研究确定可能存在两类插膜元件. 对已知拓扑学的膜蛋白的统计分析以及蛋白质工程的研究表明存在膜蛋白拓扑学的内正规则. 目前已形成预测膜蛋白的拓扑学的比较可靠的策略, 这在反向生物学上具有重要意义. 但要进行三维结构的预测还有许多路要走.

关键词 膜蛋白, 蛋白质拓扑学, 结构预测

膜蛋白的拓扑可定义为它来回穿膜的方式, 即跨膜片段在氨基酸序列中的定位和分子在膜上的总的定向. 拓扑代表了膜蛋白的二级结构, 可看作是膜蛋白的折叠中间体, 它是预测膜蛋白三维结构的出发点.

成束螺旋蛋白 (helix-bundle proteins) 代表了一类最丰富的膜蛋白, 它们由一束基本垂

直于膜平面的跨膜 α 螺旋以及连接这些跨膜螺旋的环 (外周环和胞质环) 组成. 本文主要讨论这一类膜蛋白的拓扑学. 其他类型的膜蛋白, 例如在革兰氏阴性菌外膜和线粒体外膜上发现的 β 桶 (β -barrel) 类型的膜蛋白^[1,2], 目

前所知不多, 本文不予讨论.

1 研究方法

迄今为止, 只有两个成束螺旋蛋白已得到高分辨率分子结构. 一是用电镜技术推测出结构的细菌视紫红质^[3], 二是目前唯一用 X 射线晶体衍射法解出结构的成束螺旋蛋白——细菌光合反应中心^[4]. 很多膜蛋白则是得到了一些低分辨率的结构.

为确定膜蛋白的拓扑也发展了一些方法, 主要有免疫抗体法、化学修饰法和融合蛋白法. 一种能比较可靠地给出拓扑信息的化学修饰方法是用点突变引入新的 N-连接糖基化位点^[5], N-连接糖基化一般只在内质网腔内侧发生. 融合蛋白法目前广泛应用于原核生物膜蛋白的分析, 在真核生物中也有若干应用. 最

性而在位于胞内时不表现活性, LacZ 则正好相反. 通过观察膜蛋白的一系列融合方式的活力模式即可推测膜蛋白的拓扑学 (图 1)^[6]. PhoA/LacZ 双融合则可提供更加清晰的图象^[7].

2 内正规则

近年来, 已经确定比较多的细菌膜蛋白的拓扑学, 统计分析结果表明存在一个内正规则, 即碱性氨基酸——Lys 和 Arg 在外周环上极其稀少 (~5%), 而在胞质环中却非常丰富 (~15%). 带正电荷越多的环越不能被转运. 随后的研究发现在真核生物质膜蛋白、叶绿体和线粒体内膜蛋白中也有同样的倾向.

内正规则仅为较短的环 (< ~60 残基) 所遵守, 而长的胞质环和外周环的氨基酸组成与可溶性蛋白没有明显差别. 由此推测长环和短环的转运机制是不同的, 短环比长环受到更多的氨基酸组成方面的限制. 实际上, 大部分外周环都很短 (<21 残基), 可能因为中等长度的环更难转运.

3 跨膜转运与插膜

膜蛋白的转运和插膜与蛋白的分泌有很多共同之处, 跨膜蛋白可看作未完成的分泌蛋白. 大肠杆菌蛋白分泌依赖于 Sec 机制, 它包括胞质组分 (SecB、Ffh)、外周组分 (SecA) 和内膜组分 (SecD、SecE、SecF、SecY). 分泌蛋白含有一段 N 端信号肽, 它很象跨膜片段, 包括带正电的胞质 N 端、中心疏水片段 (一般比典型的跨膜片段短) 和含导肽酶 (Lep) 识别位点的 C 端可切除区. 尽管只有少数膜蛋白具有可被切除的信号肽, 很多细菌膜蛋白的外周结构域的转运也依赖于 Sec 机制. Lep 即是一例^[8], 如图 2a, 它有一个很大的 C 端外周结构域 P₂, 其转运依赖于 SecA、SecY 和膜电位. 第二个跨膜片段 (H₂) 充当不被切除的信号肽, 在其 C 端附近插入一个 Lep 识别位点后, 它可转换为可被切除的信号肽. 相反, 第一个跨膜片段 (H₁) 即使在 Sec

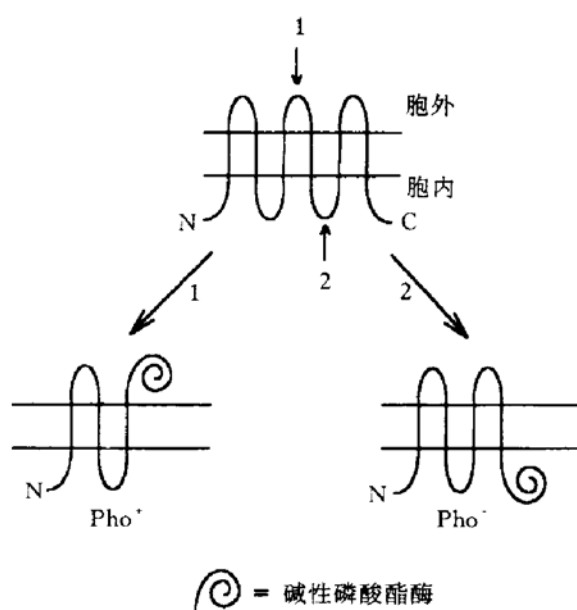


图 1 利用碱性磷酸酯酶的融合确定膜蛋白拓扑学图解

- 1: 与膜蛋白胞外结构域的融合导致碱性磷酸酯酶位于胞外而具有较高的酶活力 (Pho⁺); 2: 与胞内结构域的融合导致碱性磷酸酯酶位于胞内而具有较低的酶活力 (Pho⁻).

常用的报告蛋白是碱性磷酸酯酶 (PhoA), β -内酰胺酶 (Bla) 和 β -半乳糖苷酶 (LacZ). PhoA 和 Bla 只在被转运到胞质外周时具有活

机制不起作用时也能插入到膜内. 对 Sec 机制的依赖性是与转运的环的长度有关的. 当翻转的 Lep (图 2b) 的外周环 P_1 的长度从 25 逐渐增加到 65 个残基, 其转运对于 Sec 机制的依赖性也相应增加^[9]. 短的外周环为什么不能利用 Sec 机制尚不清楚, 它们的低 Arg + Lys 含量反映了细胞在不利用 Sec 机制时不能转运高度带电的结构域.

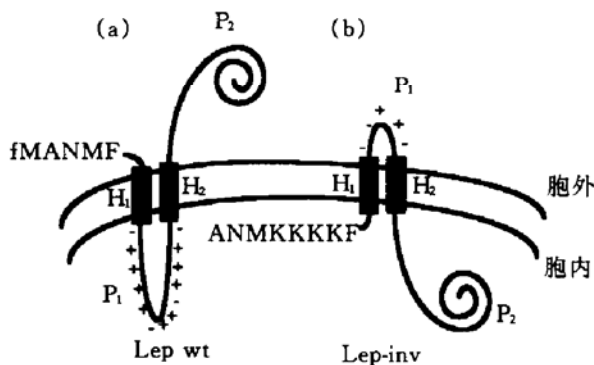


图 2 Lep 的拓扑图

(a) 野生型 Lep; (b) 翻转突变体.

对于细菌内膜蛋白, Arg + Lys 含量的倾向性是独立于环在拓扑学中的位置的, 提示各个环的转运是独立于它们的相邻伙伴的. 为了与顺序插膜模型 (即插入沿着 $N \rightarrow C$ 的方向, 越靠 N 端部分越能影响下游跨膜片段的插入) 相区分, 构建了由四个跨膜片段和两个外周环组成的分子 (N 端和 C 端均位于胞内), 外周环或者是长的 (~90 残基) 并依赖于 Sec 机制, 或者是短的 (~25 残基) 且不依赖于 Sec 机制. 结果发现短环总能插入过膜, 即使长环的转运因为阻断了 Sec 机制而受阻. 这一点并不依赖于两个环的相对位置. 这一结果支持了独立插膜模型.

总之, 细菌膜蛋白可能存在两种插膜元件: a. 由两个疏水片段和一个含有较少碱性氨基酸的短的连接环组成的螺旋发夹, 其插膜不依赖于 Sec 机制; b. 由一个 N 端正电区和长的疏水片段以及随后一段长的极性片段组成的序列, 其插膜依赖于 Sec 机制.

跨内质网膜和细菌内膜的蛋白转运机制不

同, 但两者的基本过程是相似的. 不仅原核和真核来源的信号肽的性质相同, 而且两种机制的某些组分已检测到序列的类似性. 两个体系的一个重要区别是在真核生物中转运是与翻译协同的, 而在细菌中转运则在翻译后进行. 而且, 对于真核生物膜蛋白, 电荷倾向在 N 端环中表现最强, 越向 C 端, 越见削弱, 推测真核生物膜蛋白的插膜可能是顺序进行的.

4 膜蛋白拓扑学的蛋白质工程

内正规则暗示人们可以通过重新分布跨膜片段的带正电氨基酸来控制膜蛋白的拓扑. 这已在原核和真核生物中实现. Lep 有两个跨膜片段 H_1 和 H_2 , 它的 N 端和大的 C 端均位于外周 (图 2a), 碱性残基的分布正如内正规则所预期: 外周 N 端不带电荷, 胞质 P_1 结构域 (23~61 残基) 有 9 个碱性残基, 大的外周结构域 P_2 (77~326 残基) 含 10% 的碱性残基. 通过重新分布使得 N 端碱性残基数量比 P_1 结构域中多即可改变此分子的拓扑 (图 2b)^[10].

通过复制 Lep 的 H_1 - H_2 区域构建具有四个跨膜片段的分子, 它们一般按内正规则所预见的方式插膜, 除非当分子的不同部分的拓扑学信息发生冲突. 图 3 即为一例, 该分子仅插入四个疏水片段中的三个以不致于违背内正规则.

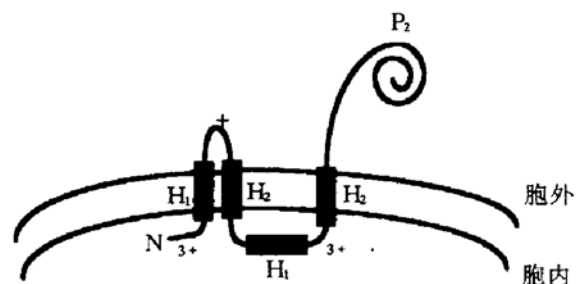


图 3 含有四个疏水片段的 Lep 衍生物的拓扑图

利用依赖 Sec 机制和不依赖 Sec 机制的跨膜对于碱性残基的敏感性的差别也可造成拓扑转换. 野生型 Lep 的 P_1 结构域只有 40 个残基长, 因而是依赖于 Sec 机制的, 将一个 Lys 加到 N 端并不能导致翻转的拓扑. 但是, 当

P_1 结构域增加到 ~70 残基, 插入变成依赖 Sec 机制, 结果 P_1 结构域 (而不是 P_2 结构域) 被转运到外周 (图 4)^[9].

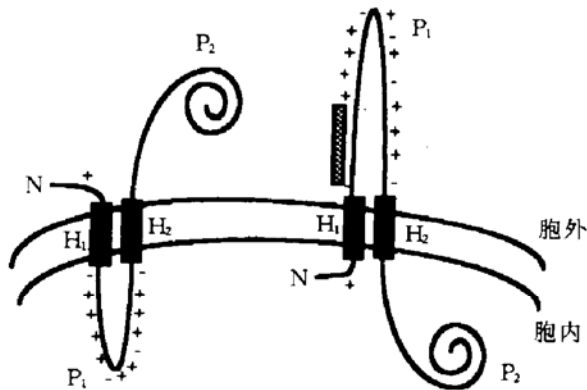


图 4 具有不同 P_1 环长度的两个 Lep 衍生物的拓扑图

浅色条指示插入的残基的位置。

5 膜蛋白拓扑学的预测

根据实验结果, 归纳以下几点作为预测细菌膜蛋白拓扑学的前提: a. 跨膜螺旋由疏水氨基酸的长片段形成; b. 短环的分布遵守内正规则; c. 在真核生物膜蛋白中, N 端跨膜螺旋的定向与跨这一片段的净电荷差别有密切联系 (正电荷多端面向胞质); d. 在真核生物膜蛋白中, 长的 (>60 残基) 胞内和胞外结构域倾向于含有不同的氨基酸组成。

这些前提形成了预测细菌膜蛋白拓扑学的基础: 第一步, 根据疏水性辨认候选的跨膜片段, 产生一套必然的 (非常疏水的) 和可能的 (疏水性稍差的) 的跨膜螺旋; 第二步, 列出所有的拓扑结构, 每一拓扑结构包含所有的必然候选者以及包含或不包含可能候选者; 最后, 按照 Arg + Lys 在两侧短环中的分布倾向选出最佳拓扑结构。这一过程已被编为计算机程序, 目前证明比较可靠。对于 24 个已知序列和拓扑学的细菌内膜蛋白 (包括视紫红质和反应中心 L、M 亚基) 的预测至少有 22 个是正确的^[6]。

类似的策略已用于真核质膜蛋白, 但因为

真核生物中内正倾向较不强烈, 且向 C 端削弱, 预测相对较为困难一些。目前, 一般从净电荷差别预测 N 端的定向, 然后依照内正和组成倾向来建立其他部分的拓扑。

膜蛋白的拓扑学的预测在反向生物学上具有重要的意义。对于新发现的蛋白, 根据氨基酸序列预测其拓扑学结构有助于人们确定其可能的功能或作用机理。但是值得注意的是, 基于结构预测的很多推测甚至已经编入教科书, 而并未经过充分的实验证实。这有可能导致错误。谷氨酸受体——脑内的一种重要的神经递质即为一例^[11]。根据克隆的基因人们预测该蛋白是四次跨膜的, N 端和 C 端均位于胞外。但后来越来越多的证据表明该蛋白事实上是三次跨膜的, C 端位于胞内。预测不能代替实验。

总的看来, 我们已大体解决了二级结构预测问题: 从氨基酸序列我们可以辨认所有跨膜螺旋和它们的定向, 我们也掌握了必要的实验手段验证这些预测 (主要是融合蛋白技术)。但是要进行三维结构预测还有很多路要走。我们已经比较了解肽链怎么编码拓扑信息, 但我们对于细胞如何解开这些信息——细胞的蛋白转运机制远未完全懂得。事实上膜蛋白是这些机制的重要参与者, 我们预测膜蛋白结构的能力反过来会直接关系到我们对膜蛋白生物合成的了解。

参 考 文 献

- 1 Cowan S W, Schirmer T, Rummel G *et al.* Nature, 1992; 358: 727
- 2 Weiss M S, Schulz G E. J Mol Biol, 1992; 227 (2): 493
- 3 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A *et al.* J Mol Biol, 1990; 213: 899
- 4 Deisenhofer J, Epp O, Miki K *et al.* Nature, 1985; 318: 618
- 5 Olender E H, Simoni R D. J Biol Chem, 1992; 267: 4223
- 6 von Heijine G. J Mol Biol, 1992; 225: 487
- 7 Manoil C. Methods Cell Biol, 1991; 34: 61
- 8 Wolfe P B, Wickner W. Cell, 1984; 36: 1067
- 9 Anderson H, von Heijine G. EMBO J, 1993; 12: 683
- 10 von Heijine G. Nature, 1989; 341: 456

11 Marcia B. Science, 1995; 267: 177

Topology of Membrane Proteins. Wang Qingda, Lin Qishui (State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract Membrane protein topology is the starting point for predicting the three-dimensional structure. Many membrane protein topologies have been determined by using several experimental approaches such as chemical modification and fusion-protein approach. Studies on

membrane translocation and insertion have determined two possible inserting structural elements. Statistical studies on membrane proteins with known topology and engineering membrane protein topology indicate a universal positive inside rule of helical-bundle proteins. Reliable strategies have been developed to predict the topology of membrane proteins, which is of great importance to reverse biology. But there is still a long way to go to make three-dimensional structure predictions.

Key words membrane protein, protein topology, structure prediction

人血清中的对氧磷酶

王青定 孙曼霖

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 对氧磷酶能够水解强毒性农药对氧磷而受到许多学者的重视, 但国内尚未见报道. 文章综述了人血清中对氧磷酶的分布、特异性、分离纯化、多态性、遗传学特性、与疾病的关系以及对有机磷化合物毒性的防护作用. 这有利于进一步研究对氧磷酶的生物学性质、生理功能及其应用.

关键词 对氧磷酶, 分离纯化, 底物特异性, 多态性

对氧磷酶 (芳香基磷酸三酯二烷基磷酸酯酶, aryltriphosphate dialkylphosphohydrolase, EC 3.1.8.1), 简称对氧磷酶或 E-600 酶, 属于 A-酯酶类. A-酯酶类水解带有一F、 $-\text{CN}$ 及 $-\text{NO}_2$ 离开基团的有机磷化合物、氨基甲酸酯及芳香羧酸酯, 对氧磷酶可分解所有这三类底物. 对氧磷酶存在于多种微生物、昆虫、蛇毒、鲑鱼轴索、鲑鱼后唾液腺、鸟类及哺乳类动物中. 鸟类的对氧磷酶活性很低, 哺乳类动物的对氧磷酶活性存在于血清和许多组织中 (主要在肝脏、肾脏和小肠). 还不清楚能够水解对氧磷的这些酯酶是否均来源于具有高度结构同源性的蛋白质家族.

1 来源及分布

人血清中的对氧磷酶的来源还不完全清楚, 很可能是在肝脏产生的^[1]. 不知道肝脏对氧磷酶与血清对氧磷酶的相似性有多大. 几年前已有人试图确定是否人肝对氧磷酶也表现有和血清中同样的基因型特性^[2], 但尸检肝脏的对氧磷酶活性下降很快, 无法进行比较. 推测采用活检样本可能会解决这个问题.

早产儿血清中有对氧磷水解酶活性. 婴儿血清中此酶的水平约为成人的一半, 一岁达到成人水平, 以后不再有很大的变化, 50 岁以后