

target antitumor drugs toward opioid receptor-rich mouse tumor cells with enkephalin-ellipticinium conjugates. *Cancer Res*, 1989, **49**: 1836~ 1842

7 Rigaudy P, Garbay J C, Jacquemin S A *et al.* Synthesis and binding properties to DNA and to opioid receptors of enkephalin-ellipticinium conjugates. *Int J Peptid Protein Res*, 1987, **30**: 347~ 355

8 Flannery G R, Pelham J M, Dixon G J *et al.* Immunomodulation: NK cells activated by interferon-conjugated monoclonal antibody against human osteosarcoma. *Eur Cancer Clini Oncol*, 1984, **20**: 791~ 794

9 Blalock J E, Eric M S. Human leukocyte interferon (HuINF- α): potent endorphin-like opioid activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **101**: 472~ 478

Stronger Analgesia and Antitumor Activities of Enkephalin- α I Interferon Fusion Protein.
ZHU Qianzheng¹⁾, WANG Jing²⁾, ZHANG Xiaobing, LI Mengfeng, ZHANG Ruli³⁾, CHEN Wanqiu, HOU Yunde (*National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, Beijing 100052, China*; ¹⁾*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100850, China*; ²⁾*Department of Microbiology, Tong Qi Medical University, Wuhan 430030, China*; ³⁾*Neuro-*

science Centre, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract Human colorectal, pulmonary carcinoma as well as neuroblastoma have been shown to be rich in opiate receptors. A possible targeted fusion protein, consisting of Enkephalin and α I interferon, was constructed, bacterially expressed, and purified. When injected intracerebrally into mice, enkephalin- α I interferon fusion protein caused more potent analgesia than α I interferon. The analgesia effects of the fusion protein were prevented and reversible by opiate antagonist, naloxone and naltridole. The fusion protein also inhibits bindings of [³H] DPDPE to opiate receptor. The enkephalin- α I interferon fusion protein was shown to have more antiproliferative and antitumor activities against opiate receptor bearing tumors, both *in vivo* and *in vitro*. These results suggest enkephalin- α I interferon fusion protein may be able to target opiate receptors on tumor cells.

Key Words interferon, fusion protein, analgesia, antitumor activity

GI 双突变体 GIK253RA198C 的构建及其性质分析*

伍传金 王琛 滕脉坤 王淳 肖亚中 王玉珍 牛立文 崔涛
(中国科学技术大学生物系, 合肥 230026)

摘要 以双引物法对葡萄糖异构酶 (GI) 基因进行定点突变, 将突变体基因于大肠杆菌中表达, 获得了 GI 双点突变体 GIK253RA198C. 研究 K253R 和 A198C 双点突变对 GI 的结构和性质的作用, 结果表明 GIK253RA198C 的热稳定性明显下降, 最适反应温度降低 5℃. 文章从结构和机制上解释了为何同是 K253R 突变, 对 SM33 GI 和密苏里游动放线菌 GI 的热稳定性产生不同的影响, 认为这是由于 Lys253 在两种 GI 结构的位置上存在微小差异, 从而使引入的 Arg 对亚基间的相互作用产生了相反效应所引起.

关键词 D-葡萄糖异构酶, 定点突变, 基因表达, 热稳定性

葡萄糖异构酶 (GI) 是一种重要的工业酶, 同时也是探讨酶催化机制和建立蛋白质工

* 国家“863”计划资助项目 (863-103-21-08).
收稿日期: 1996-10-10, 修回日期: 1997-02-03

程技术的良好模型. 本课题组开展了 7 号淀粉酶链霉菌 M1033 菌株 GI (以下简称 SM33 GI) 的蛋白质工程研究, 建立了完整的 GI 蛋白质工程研究系统^[1]. 我们曾报道, 单点突变体 GIK253R (将 253 位的 Lys 替换成 Arg)^[2]和 GIA198C (将 198 位的 Ala 替换成 Cys)^[1]的部分性质都有所改善, GIK253R 的比活为野生型 GI 的 1.5 倍, 在底物存在的情况下, 它的热失活半衰期略有增加; GIA198C 的最适反应温度比野生型 GI 提高了 8℃. 但是, 参照密苏里游动放线菌 GI (AM GI) 成功例子设计的 K253R 突变, 却引起 SM33 GI 热稳定性的下降; GIA198C 中新引入的 Cys198 在亚基间也未自然形成二硫键.

近年来, 定点突变已成为研究蛋白质结构和功能关系的有力工具. Lys253 和 Ala198 都位于 GI 亚基间的界面处, 它们的突变都可能影响亚基间的相互作用, 本文则研究这两个位点同时突变之间的相互影响及其对 GI 产生的效应.

1 材料和方法

1.1 材料

E. coli XL1-blue, CJ236, K38/pGP1-2 均为本室保存; pTKD-GI、带有突变体 GIA198C 基因片断的 M13 mp19 重组子分别由本室崔虹等^[3]、肖亚中等^[1]构建; 引物 5'-TCCGGCATCAGGTACGACCA-3' (用于引入 Arg253) 由中科院细胞所合成; 限制性内切酶 EcoR I、Hind III、Sph I、T4 DNA 连接酶、T7 DNA 多聚酶为华美公司产品; T4 多核苷酸激酶、DEAE-Sepharose FF、Sephacryl S-300 HR、T7 DNA Sequencing Kit 均为 Pharmacia 公司出品.

1.2 实验方法

1.2.1 定点诱变: 采用双引物法, 于带有突变体 GIA198C 基因片段的 M13mp19 重组子的掺 U 单链上进行, 具体过程参见文献 [2].

1.2.2 DNA 序列测定: 按 Sanger 双脱氧链终止法, 用 T7 DNA Sequencing Kit 进行.

1.2.3 突变体基因的表达及酶的分离纯化, SDS-PAGE 和亚基间二硫键的测定, 均按文献 [1] 的方法进行.

1.2.4 蛋白质含量的测定: 采用 Lowry 法, 以牛血清白蛋白作为标准.

1.2.5 GI 活力测定: 采用改进的 Cys 咪唑法^[4], 以 D-木糖或 D-葡萄糖为底物.

1.2.6 酶热稳定性的测定: 将酶以终浓度 0.5 g/L 加入 10 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 中, 于 80℃下保温, 间隙取样测活. 以残余活力百分数的对数为纵坐标, 以保温时间为横坐标作图, 求出酶热失活半衰期.

1.2.7 酶最适反应温度测定: 用 D-木糖作底物, 保温反应时间为 10 min.

1.2.8 酶动力学试验: 按颜思旭等的方法^[5], 分别以 D-木糖和 D-葡萄糖为底物测其在 40℃下, 10 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L 三乙胺 (TEA) pH 8.0 中的木酮糖和果糖生成量, Lineweaver-Burk 作图法求出酶的表观 K_m 和 V_{max} .

2 结果与讨论

2.1 突变体基因的表达及酶的分离纯化

经 DNA 序列测定, 筛选出 Lys253 的密码子 AAG 正确替换成 Arg253 的密码子 AGG (图1) 的突变体重组子, 将突变体基因克隆

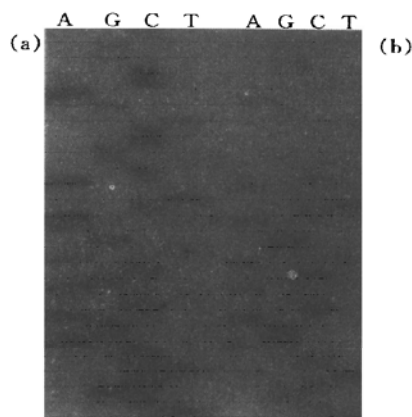


图1 突变位点的 DNA 序列测定
(a) 野生型 GI; (b) GIK253RA198C.

回 pTKD-GI 质粒, 转化宿主菌 K38/pGP1-2 后获得高效表达 (图 2). 破碎表达菌体并离心, 从得到的上清液中对酶进行分离纯化, 结果 GIK253RA198C 的分离峰形与野生型 GI 基本一致. 得到了电泳纯的突变体酶蛋白 GIK253RA198C, 测定它与野生型 GI 的性质并进行比较.

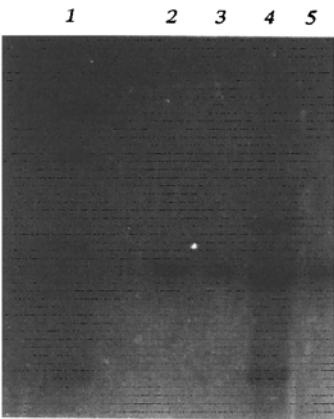


图 2 SDS PAGE 电泳图

1: 分子质量标准; 2: GIK253RA198C (加 DTT); 3: GIK253RA198C (不加 DTT); 4: 表达 GIK253RA198C 的细胞裂解上清液; 5: 野生型 GI.

2.2 酶的性质分析及比较

以 D-葡萄糖为底物, 测得电泳纯的 GIK253RA198C 和野生型 GI 的比活相近, 分别为 12.6 U/mg 和 10.5 U/mg. 在 SDS-PAGE 上, GIK253RA198C 在 DTT 存在和不存在的条件下迁移率相同 (图 2), 表明 Cys198 的 -SH 仍处于自由状态, 同样没有在亚基间自然形成二硫键.

由图 3 求得 GIK253RA198C 在 80℃ 下的热失活半衰期约为 11 min, 明显低于野生型 GI 的 120 min. 同时, GIK253RA198C 的最适反应温度亦从野生型 GI 的 75℃ 左右下降为 70℃ (图 4).

实验条件下 GIK253RA198C 和野生型 GI 的动力学的参数见表 1, 以木糖为底物时, 野生型 GI 与 GIK253RA198C 的 V_{max} 相差不大,

而 GIK253RA198C 的 K_m 值比野生型 GI 略有增加 (18%); 以葡萄糖为底物时, GIK253RA198C 的表观 K_m 值几乎比野生型 GI 增加 1 倍.

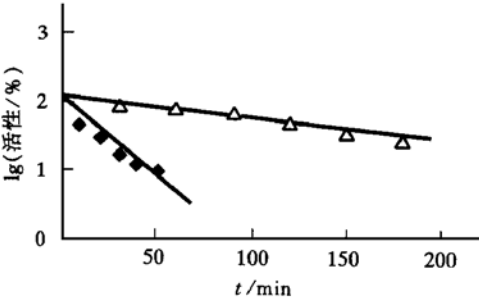


图 3 80℃ 下热失活曲线的测定

△ — △: 野生型 GI, 半衰期为 120 min;
◆ — ◆: GIK253RA198C, 半衰期为 11 min.

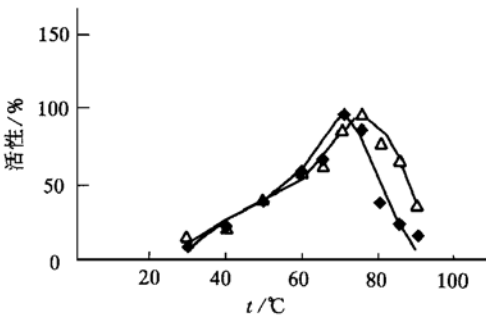


图 4 反应温度对酶活性的影响

△ — △: 野生型 GI, 75℃; ◆ — ◆: GIK253RA198C, 70℃.

表 1 GIK253RA198C 和野生型 GI 的动力学参数的比较

酶	底物	$K_m/$	$V_{max}/$
		$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
野生型 GI	D-木糖	77	78
	D-葡萄糖	380	77
GIK253RA198C	D-木糖	91	71
	D-葡萄糖	714	91

加强亚基间的相互作用是提高寡聚酶热稳定性的重要手段^[6]. 在 GIA198C 中, 由于 Ala198 和 Ala198' 的 α 碳原子相距略远等原因, 新引入的 -SH 间未能形成二硫键^[1]. 如果 Arg253 能起到象在 AM GI 中由于和邻近亚基的氨基酸残基形成了新的氢键、从而加强了亚

基间相互作用的效应^[7], 则能有助于邻近亚基 Cys198 间二硫键的自然形成. 可是, GIK253RA198C 没有综合 Lys253 → Arg253 和 Ala198 → Cys198 的有益效应, Arg253 的引入没有消除原有的 GIA198C 中影响二硫键形成的空间障碍. 从动力学数据等结果看, 它反而影响了由于 Cys198 的 —SH 的引入对电荷中继系统或活性中心区域产生的有益作用^[1]. 同样, Cys198 的引入也更加引起 GIK253R 结构的不稳定, 使得热稳定性进一步下降, 而且最适反应温度降低.

根据 SM33 GI 的 0.19 nm 晶体结构模型, 可以看到 Lys253 位于 AM GI 中 Lys253 的类似位置, 都处于亚基的界面处, 而且它同样能与底物发生希夫碱反应^[2]. 但是, SM33 GI 的 Lys253 更靠近四聚体的中心, 可能就是这种位置及邻近亚基在 Lys253 处距离间的微小差别, 导致了由于 Arg253 的侧链基团较 Lys253 的长, 使得它的引入反而加大了 SM33 GI 亚基间的距离, 削弱了亚基间的相互作用. 这从结构和机制上帮助解释了, 同是 K253R 突变, 在 SM33 GI 和 AM GI 中对热稳定性却产生了不同的效果^[2].

从以上结果也可以看出, 结构上的微小差别, 即可导致突变体性质的较大不同. 橄榄产色链霉菌 GI^[8] 的 253 位也是 Lys, Quax 等^[9] 推测它同样是使酶热失活的不稳定因素. 但是也有可能 SM33 GI 一样, K253R 突变并不能提高橄榄产色链霉菌 GI 的热稳定性. 在蛋白质工程中, 有效的分子设计需要对特定蛋白质结构和功能关系有着深刻的理解, 进行双点或多点突变时则更要精确地把握.

参 考 文 献

1 肖亚中, 伍传金, 龙 凡等. 用蛋白质工程方法改变葡萄糖异构酶最适 pH 和最适温度. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27 (5): 469~ 476
2 伍传金, 肖亚中, 龙 凡等. K253R 和 N184V 点突变对葡萄糖异构酶热稳定性的影响. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28 (3): 272~ 278
3 崔 虹, 刘咸安, 李澄清等. 7 号淀粉酶链霉菌 M103 菌

株葡萄糖异构酶在大肠杆菌中的高效表达. 高技术通讯, 1993, 3 (7): 9~ 12
4 黄婉治, 王 淳, 刘 兢等. 链霉菌 M1033 葡萄糖异构酶的分离纯化及其性质的研究. 中国科学技术大学学报, 1992, 22 (3): 283~ 288
5 颜思旭, 蔡红玉等. 酶催化动力学原理和方法. 厦门: 厦门大学出版社, 1987. 225
6 Ahern T J, Casal J I, Petsko G A *et al.* Control of oligomeric enzyme thermostability by protein engineering. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 675~ 679
7 Mrabet N T, Broeck A V, Brande I V *et al.* Arginine residues as stabilizing elements in protein. Biochemistry, 1992, 31 (8): 2239~ 2253
8 Farber G K, Glasfeld A, Tiraby G *et al.* Crystallographic studies of the mechanism of xylose isomerase. Biochemistry, 1989, 28: 7289~ 7297
9 Quax W J, Mrabet N T, Luiten R G M *et al.* Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering. Bio/Technology, 1991, 9: 738~ 742

Construction and Characterization of the Glucose Isomerase Mutant, GIK253RA198C. WU Chuanjin, WANG Chen, TENG Maikun, WANG Chun, XIAO Yazhong, WANG Yuzhen, NIU Liwen, CUI Tao (*Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China*).

Abstract The GI mutant, GIK253RA198C, was obtained by *in vitro* site-directed mutagenesis using the double primer method and then expressed in *E. coli* K38. The characteristic analysis of the enzymes showed that thermostability of GIK253RA198C was significantly lower as compared with wild-type GI in 80 °C. Moreover, its optimum reaction temperature decreased from 75 °C to 70 °C. The results are explained by the kinetic parameters. Previous experiment indicated that the same mutation of K253R produced different effects on the thermostability of SM33 GI and *A. missouriensis* GI. It is clarified here, based on structure and mechanism, that the result was due to the minor difference between Lys253's positions in the two GI structures.

Key words D-glucose isomerase, site-directed mutagenesis, gene expression, thermostability