

不管是脱壁处理还是完整细胞的转化率都很低, 能达到 10^6 每微克 DNA 的转化率就很不错了, 最近 Allon^[13] 等改进了电穿孔方法, 对七株革兰氏阳性菌进行五种质粒的电转移, 最高的转化率达到 10^7 每微克 DNA, 比原来的电穿孔方法提高了 40 多倍, 比常规诱导方法提高了 4000 倍。

2.4 电穿孔技术的特殊应用

a. 电插入法 (electroinsertion) 将蛋白分子插入细胞膜。当外加电场稍大于或等于临界值 V_c 时, 在细胞膜上形成贯通于细胞内外的亲水孔洞, 可将外源蛋白质插入细胞质膜, 而不造成明显的细胞损伤。例如将 CD4 受体插入红细胞膜上, 不仅可以延长受体的循环生活期, 而且提供了一种治疗艾滋病的方法。

b. 将蛋白分子导入细胞。在最佳电穿孔条件下, 既可使细胞损伤最小, 又可使细胞有效地通透, 将内切酶和抗体等导入细胞。例如将肿瘤天门冬酰胺合成酶的单克隆抗体导入鼠淋巴细胞和人成纤维细胞 HT-5 中, 细胞成活率达 80%—90%, 而且其中 90% 的活细胞结合了抗体。

c. 建立基因库。电穿孔技术现已被公认为在原核细胞中进行基因转移的最有效的手段。对一些好的菌株, 其基因转化率高达 10^{10} 每微克 DNA, 从而仅用少量 DNA 即可构建综合的基因库 (gene library)。Dower 等^[14] 利用电穿孔方法已经开发构建了大于 10^9 个独立的重组

质粒库。

d. 原位研究酶活性。例如海胆卵在受精过程中, 其生理活性增强, 而酶是影响新陈代谢的因素; 研究酶调节机制是令人感兴趣的问题。电穿孔对细胞完整的干扰最小, 可以把带标记的底物导入细胞, 进行酶活性的原位研究。

参 考 文 献

- 1 Kaler K V I S, Jones T B. *Biophys J*, 1990; **57**: 173
- 2 汪和睦, 杭 军. 中国科学 (B 辑), 1992; (10): 1038
- 3 Tsong T Y. *Biophys J*, 1991; **60**: 297
- 4 Sower A E. In: Chang D C ed. *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego: Academic Press, 1992; 119
- 5 汪和睦, 鲁玉瓦, 武延宽等. *生物物理学报*, 1986; **2** (4): 364
- 6 Chang D C, Reese T S. *Biophys J*, 1990; **58**: 1
- 7 郑 强, 赵南明. 中国科学 (B 辑), 1988; (8): 826
- 8 汪和睦, 鲁玉瓦, 谢廷栋等. *科学通报*, 1987; **32** (13): 1032
- 9 Gravekamp C, Santoli D, Vreudenhil R *et al.* *Hybridoma*, 1987; **6** (2): 121
- 10 Tomita M, Tsong T Y. *Biochem Biophys Acta*, 1990; **1055**: 199
- 11 Xie T D, Tsong T Y. *Biophys J*, 1993; **65**: 1684
- 12 Rhodes C A, Pierce D A *et al.* *Science*, 1988; **240**: 204
- 13 Allen S P, Blaschek H P. *FEMS Microbiol Lett*, 1990; **70**: 217
- 14 Dower W J, Cwirla S E. In: Chang D C ed. *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego: Academic Press, 1992; 291

重组人巨噬细胞集落刺激因子的结构与功能

凌明圣 徐明波 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 重组人粒细胞——巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 已经在原核、真核细胞表达并得到纯品, 为它的结构与功能研究提供了有利条件。目前国内外对于 rhGM-CSF 的结构与功能研究主要集中在晶体结构、化学修饰、溶液中构象和稳定性以及突变和分子设计方面。分子结构与功能的关系以及与 GM-CSF 受体作用机理研究也取得了突破性进展。

关键词 重组人粒细胞——巨噬细胞集落刺激因子, 结构与功能, 晶体结构, 化学修饰, 溶液, 构象

集落刺激因子 (CSFs) 共有四种^[1]: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, Multi-CSF (IL-3), 它们对于造血细胞的生长和分化起介导作用. 人 GM-CSF 基因定位在 5q23—31^[2]. rhGM-CSF 已经在酵母^[3]、COS 细胞^[4]、大肠杆菌^[5]得到表达和纯化, Curtis 等^[6]还在酵母细胞表达了人 GM-CSF-IL-3 融合蛋白. 人 GM-CSF 的主要生物学功能是刺激髓祖细胞增殖和成熟, 提高中性、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的数量. 在临床上它用于癌症化疗而引起的白细胞减少症, 骨髓移植, 骨髓增生异常综合症及再生障碍性贫血, 并作为爱滋病的辅助药物以增强病人的骨髓功能.

1 rhGM-CSF 的高级结构

人 GM-CSF 为 144 个氨基酸残基的多肽, 含有 17 个残基的信号肽, 成熟肽为 127 个残基 (分子量为 14 477), 两对二硫键对于结构的稳定性和生物活性起重要作用. 真核细胞来源的 rhGM-CSF 可能含有两个 N-糖基化位点和多个 O-糖基化位点, 因糖基化程度不同, 分子量也有差异.

由于人 GM-CSF 在大肠杆菌中已高效表达, 使 rhGM-CSF 的晶体学研究成为可能. 已经获得 rhGM-CSF 的结晶^[7-10], 并得到低分辨率和高分辨率的 X 衍射图谱^[9,10] (图 1).

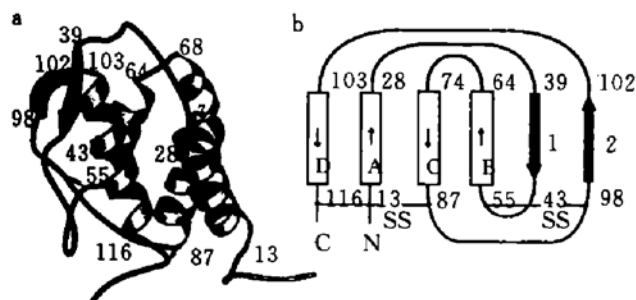


图 1' rhGM-CSF 的三级结构

(a) 丝带圈代表 α 螺旋, 粗箭头代表 β 折叠, 闪电符号代表二硫键. (b) rhGM-CSF 的拓扑学图谱: 长框代表 α 螺旋, 粗黑箭头代表 β 折叠.

M. R. Walter 等^[10]用同晶置换法获 2.8 Å 分辨率的 X 衍射图谱, 并进行了晶体结构研究. 其结果表明, rhGM-CSF 是扁球状分子, 约 40 Å 长, 24 Å 厚, 20—35 Å 宽. rhGM-CSF 的主要结构特点是一个反向平行的四螺旋束. 四个 α 螺旋标为 A→D, 分别由 13→27, 55→65, 74→86, 103→116 残基组成, 螺旋的残基数在 11 到 15 之间, 并由 22 个疏水残基在螺旋束内部形成紧密的疏水核. 四螺旋中 A, D 配对, B, C 配对, 两对螺旋的夹角约 40°. 四个螺旋形成一个左手 α 螺旋束^[11], 螺旋间的三个连接区分别由 8 到 27 个残基构成, 它们分别为 28→54, 66→73, 87→102 残基, 最短的连接在 B, C 之间, 有两个长的连接使 A→B, C→D 联系起来. 42→44, 99→101 残基形成两个反向平行的 β 折叠 S1 和 S2. 螺旋 A 和 S1 之间的长环 (30→35 残基) 是无规卷曲. rhGM-CSF 含有两个二硫键位于 Cys54—Cys96, Cys88—Cys121 之间. Cys88 和 Cys96 之间有一个富含 Pro 的片段, Pro92 的羧基和 Cys54 的氨基, Glu93 的羧基与螺旋 B N 端的 Glu56 和 Thr57 的氨基形成氢键, 对于结构稳定起重要作用^[12].

rhGM-CSF 约含 42% 的 α 螺旋, 5% 的 β 折叠, P. Wingfield 等^[13]用紫外 CD 谱推出的 α 螺旋含量 47% 与此结果比较吻合, 但 β 折叠含量高达 46%.

用合成法证明 N 端 1→13 残基片段缺失对活性无影响, 14→25 残基片段为活性必需, 97→121 残基片段对于完整的活性非常重要, 77→94, 40→94 和 110→127 残基片段对于受体结合和/或完整活性非常重要. K. Kaushansky 等^[14]用一系列人和鼠的杂交分子证实 38→48, 95→111 残基片段对造血功能非常重要. 分子缺失实验证实 20→21, 55→60, 77→82, 89→120 残基片段为生物活性必需^[15]. 基于 rhGM-CSF 的晶体结构和其他学者的各种研究方法, 以下四个区域对于其生物功能是必需

的: 14→25 (螺旋 A), 46→58, 77→94 (部分螺旋 C), 110→124 (部分螺旋 D), 这些残基片段形成连续的表面在一端环绕着分子, 包含螺旋 A 和 D 的表面形成与受体的主要接触区域, 这就可以解释为什么位于螺旋 A 的 N-糖基化使得 rhGM-CSF 的生物活性降低。

分子设计策略和肽合成途径证实 21→31, 77→94 残基片段为 rhGM-CSF 活性所必需, 其中 Arg23 和 Arg24 尤其重要。Arg23→Gln 突变使活性丧失 75%, Asn27 和 Asn37 的脱糖基又使活性提高了 20 倍^[16]。

rhGM-CSF 分子另一个显著特征是 68→73 残基片段形成伸展的 310 螺旋。Pro76 打断螺旋的氢键式样, 导致进入螺旋 C 的链发生 30° 弯曲。

2 化学修饰

2.1 糖基化

人 GM-CSF 是含有 N-糖基化和 O-糖基化位点的糖蛋白, 但是其生物功能并不需要糖基化作用。P. Moonen 等^[17]报道, 移去酵母和 CHO 细胞产生的 rhGM-CSF 的 N-糖基, 生物活性明显提高。K. Kaushansky 等^[18]也报道了 COS 细胞中表达的缺失 N-糖基和/或 O-糖基的 GM-CSF 活性与天然 hGM-CSF 活性一样。N-糖基化位点位于 Asn-X-Ser/Thr 中的 Asn 残基, O-糖基化位点常在 N 端 Pro 残基紧连的 Ser 或 Thr 残基^[19]。在永久细胞株和瞬时表达系统得到中等和较高表达水平的天然或糖基缺失 hGM-CSF, 在 BHK, 293, COS 和 LdLD 细胞几种糖基缺失分子的分泌效率和天然 GM-CSF 一样^[20]。另外, 正常人表皮细胞、成纤维细胞也能合成分泌 GM-CSF。

Namalwa 细胞来源的 rhGM-CSF 有两个 N-糖基化和多个 O-糖基化位点^[21]。用 N-糖苷酶 F 消化这种 rhGM-CSF, 则把它分成三类: 含 2 个 N-糖基 (2N 型); 含 1 个 N-糖基 (1N 型); 缺少 N-糖基 (ON 型), 三类都有 O-糖基。2N 型比大肠杆菌来源的非糖基化 rhGM-CSF 活性低 200 倍, ON 型具有与大肠杆菌来源的

rhGM-CSF 相同的活性。1N 型活性在其它两类之间, 而 2N 型在体内的半衰期比 ON 型和大肠杆菌来源的 rhGM-CSF 长 5 倍。

Ernst J F 等^[19]在酵母和 COS-1 细胞中表达了 hGM-CSF。在酵母中 O-糖基化需要残基 Ser9 和 Thr10。15 500 的 rhGM-CSF 的 O-糖基链的延伸在 Ser9 残基, 而 14 500 的 rhGM-CSF 在 Ser9 和 Thr10 各有一个甘露糖基, 这表明 Thr10 位点的 O-糖基抑制了附着在 Ser9 上的 O-糖基链延伸, 糖基延伸只在 Thr10 未被糖基修饰时进行。COS-1 细胞的情况类似于酵母。O-糖基对于 GM-CSF 的体外生物活性没有影响。

2.2 PEG 修饰

rhGM-CSF 含有 6 个 Lys 残基和 1 个末端氨基基团能与 PEG 偶联。PEG 修饰的优点可以概括为: 使蛋白在体内的半衰期增加 3—400 倍; 降低抗原性和免疫原性; 降低对蛋白裂解的感受性; 增加溶解性 (对重组蛋白尤其重要)。F. Malik 等^[22]用单甲氧 PEG (MPEG) 对 rhGM-CSF 进行修饰, 并用 FPLC 分离纯化, 进行活性检测, MPEG-rhGM-CSF 的活性比未修饰前仅有轻微的降低, 但在体内的半衰期增加了近 15 倍, 在各器官中的分布量也显著增加。

2.3 生物素修饰

T. P. Angelotti 等^[23]用硫代琥珀酰亚胺 6-生物素酰胺己酸盐或生物素酰肼/1-[3-(二甲氨基)-丙基]-3-乙基碳二亚胺对 rhGM-CSF 进行修饰, 修饰基团结合在氨基或羧基基团, 得到氨基衍生物 1.2 和 3.8 mol 生物素每摩尔蛋白 (N1-bGM-CSF 和 N4-bGM-CSF), 羧基衍生物 4.6 mol 生物素每摩尔蛋白 (C5-bGM-CSF)。它们对衍生物的生物活性和与 GM-CSF 受体结合特征进行了研究。用人骨髓祖细胞的生长对三种衍生物进行活性检测, 与天然蛋白相比它们均保留了完整的活性。衍生物与人嗜中性白细胞的 GM-CSF 受体结合试验, 用接有荧光素的亲和素和荧光激发细胞分类法检测。N-bGM-CSF 与受体的专一性结合可被过量的非

衍生蛋白替代, C5-bGM-CSF 能结合并激活细胞受体, 但它不能同时结合接有荧光素的亲和素. 保留生物活性的 N-bGM-CSF 能特异性的标记细胞表面受体, 可用做非放射性探针研究 GM-CSF 受体的细胞化学, 亦可借助流式细胞仪研究受体调节机制.

3 rhGM-CSF 溶液中的构象研究

研究溶液中蛋白构象常采用光谱法, 诸如紫外差光谱、荧光光谱、旋光色散、紫外圆二色性 (UVCD) 和激光拉曼光谱等, 多维核磁共振和振动圆二色性 (VCD) 更为该研究注入新的活力.

P. Wingfield 等^[13]采用分析型超速离心、脲素变性梯度胶电泳、溶剂微扰紫外差光谱、荧光激发光谱和 CD 谱研究了大肠杆菌来源的 rhGM-CSF 在溶液中的构象和稳定性.

190nm—240nm 远紫外 CD 谱分析 rhGM-CSF 含47%的 α 螺旋和46%的 β 折叠.

rhGM-CSF 含两对二硫键, 在 DTT 作用下, 二硫键发生缓慢的还原, 在8mol/L 脲素中还原速度大大加快. 用脲素变性梯度胶电泳证实二硫键对于折叠态构象的稳定性起关键作用, 伸展的氧化态蛋白比还原态蛋白结合更为紧密. 电泳结果比较了哺乳细胞、大肠杆菌来源的 rhGM-CSF, 证明糖基对于分子的稳定性及变复性动力学均无影响.

紫外差光谱证实在4mol/L 盐酸胍作用下, rhGM-CSF 的两个 Trp 或者是暴露, 或者是一个暴露一个隐埋, 但两个靠近 Lys 残基的 Tyr 残基完全暴露.

比较 rhGM-CSF 的 Trp 和 AcTrpNH₂ 的荧光激发强度, 发现前者大于60%的荧光猝灭, 这种猝灭可以用4mol/L 盐酸胍使 rhGM-CSF 伸展而得到部分回复, 但与 AcTrpNH₂ 相比仍有30%猝灭, 这说明有1个 Trp 暴露在溶液中. Trp13位于 Pro-Trp-Glu-His-Val 序列中, 在 pH3左右的实验条件下, Glu 的羧基离子不会对 Trp 的荧光起猝灭作用. 同样, Trp122位于 Asp-Cys-Trp-Glu-Pro 序列中,

Glu 不会对 Trp 的猝灭有何影响, 而极可能是二硫键的影响 (Cys121与 Cys88形成二硫键), 二硫键是 Trp 荧光的显著猝灭剂. 用 DTT 使 rhGM-CSF 还原, 随时间延长 Trp 的荧光激发波长发生蓝移. 在天然状态下, Trp 位于非极性环境, 荧光被邻近的二硫键猝灭; 另一方面, Trp13位于极性环境荧光未被猝灭. 在还原条件下, Trp122选择性的去猝灭, 还原蛋白的荧光激发含有 Trp122 残基的贡献, 如 Trp122仍处于非极性环境, 将发生蓝移而位于分子表面 Trp13发生红移. 用盐酸胍使还原蛋白伸展, 虽然激发波峰波长向 AcTrpNH₂ 处发生红移, 但荧光强度不变, 这表明此时两个 Trp 残基均处于极性环境.

参 考 文 献

- 1 Dexter T M. *Nature*, 1984; **309**: 746
- 2 Le Beau M M, Epstein N D, O' Brien S J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 5913
- 3 Cantrell M A, Anderson D, Cerretti D P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; **82**: 6250
- 4 Wang G G, Witek J S, Temple P A *et al.* *Science*, 1985; **228**: 810
- 5 Burgess A W, Begley C G, Johnson G R. *Blood*, 1987; **69**: 43
- 6 Curtis B M, Williams D E, Broxmeyer H E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 5809
- 7 Reichert P, Cook W J, Ealick S E *et al.* *J Biol Chem*, 1990; **265**: 452
- 8 La Londe J M, Hanna L S, Rattoballi R. *J Mol Biol*, 1989; **205**: 783
- 9 Diederichs K, Jacques S, Boone T *et al.* *J Mol Biol*, 1991; **221**: 55
- 10 Walter M R, Cook W J, Ealick S E *et al.* *J Mol Biol*, 1992; **224**: 1075
- 11 Presnell S R, Cohen F E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 6592
- 12 Diederichs K, Boone T, Karplus P A. *Science*, 1991; **254**: 1779
- 13 Wingfield P, Graber P, Moonen P. *Eur J Biochem*, 1988; **173**: 65
- 14 Kaushansky K, Shoemaker S G, Alfaro S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 1213
- 15 Shanafelt A B, Johnson K E, Kastelein R A. *J Biol Chem*,

- 1991; **266**: 13804
- 16 Von Feldt J M, Kieber Emmons T, Weiner D B *et al.* DNA Cell Biol, 1992; **11**: 183
- 17 Moonen P, Mermod J J, Ernst J F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987; **84**: 4428
- 18 Kaushansky K, O'Hara P J, Hart C E *et al.* Biochemistry, 1987; **26**: 4861
- 19 Ernst J F, Mermod J J, Richman L H. Eur J Biochem, 1992; **203**: 663

- 20 Kaushansky K, Lopez J A, Brown C B. Biochemistry, 1992; **31**: 1881
- 21 Okamoto M, Nakai M, Nakayama C *et al.* Arch Biochem Biophys, 1991; **286**: 562
- 22 Malik F, Delgado C, Knusli C *et al.* Exp Hematol. 1992; **20**: 1028
- 23 Angelotti T P, Clarke M F, Longino M A *et al.* Bioconjug Chem, 1991; **2**: 466

生物高分辨电子显微学进展*

徐 伟

(中国科学院生物物理研究所, 北京100101)

潘东日 邢 力

(中国科学院北京电子显微镜实验室, 北京 100080)

唐静华

(北京大学生物系, 北京 100871)

摘要 生物高分辨电子显微学是近年来发展起来的一种可与X射线晶体学相媲美的测定生物大分子高分辨结构的方法。它克服了一些限制X射线晶体学应用的困难,可以直接对非晶体状态的生物大分子或仅能形成二维晶体的蛋白进行结构测定。这一技术主要包括高分辨电子显微象的获得与电子显微象解析。文章就这一技术应用中的一些问题:自然结构的保持、辐射损伤、低衬度、低信噪比等进行了讨论。

关键词 生物大分子, 高分辨, 电子显微学

高能电子作为一种可以聚焦的短波辐射(加速电压如为100kV,波长为0.037Å)提供了以原子分辨率成像的可能性。电子显微镜分辨本领的提高以及成像理论和方法学的发展,终于使人们在70年代第一次观察到单个金属原子象。长期以来,人们一直致力于研究用高分辨电子显微术观察生物结构,特别是生物大分子结构,然而生物材料的某些特性造成了一些特殊困难:a.电镜中的高真空环境使含有大量水并借助于这些水维系正常结构和功能的生物大分子脱水,以至结构严重破坏;b.生物材料对辐射极其敏感,电子束可迅速造成生物材料的辐射损伤,这种损伤在远不足以形成统计学界定的原子分辨率象的极低的曝光水平时就已

经出现^[1],而过低的剂量又会形成信噪比很低的图象,造成图象解释的困难;c.由超轻元素为主构成的生物材料对电子的散射能力弱,因此它的固有衬度很低,而常规的重金属染色又会产生制备假象等等。

经过几十年来众多学者的努力,在克服上述困难,发展高分辨生物电子显微学理论上已获得一系列突破性进展。英国医学研究会(MRC)分子生物学实验室以Klug为首的学者们对此作出了卓越贡献。他们把衍射理论与电子显微术巧妙结合起来,发展出一整套以样

*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期:1993-06-21,修回日期:1994-01-31

rized.

Key words electroporation, electrofusion, biotechnology

Structure and Function of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor. Ling Mingsheng, Xu Mingbo, Ma Xiankai. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 326—330

Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) has been expressed in prokaryotic and eukaryotic cells. Purified to homogeneity, which facilitates to study the structure and function of this factor. Recently, the study of structure and function of rhGM-CSF has been mainly focused on crystal structure, including chemical modification, conformation and stability in solution, mutation and molecular design. The progress in study the structure-function relationship and the mechanism of interaction of GM-CSF with its receptor is discussed.

Key words rhGM-CSF, structure and function, crystal structure, chemical modification, conformation and stability in solution

Advances in Biological High Resolution Electron Microscopy. Xu Wei, Pan Dongri, Xing Li, Tang Jinghua. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 330—333, 371

Biological high resolution electron microscopy, a method developed recently, is comparable to X-ray crystallography for determination of high resolution structure of biological macromolecules. It overcomes some difficulties confronted by X-ray crystallography and can apply

directly to the non-crystal biological macromolecules or to those proteins which can only form two-dimensional crystals. This method contains mainly experimental recording of real structure information and image analysis of the electron micrographs. Several problems which will be encountered in the application of these techniques, e. g. natural structure preservation, radiation damage, poor contrast, and low signal-noise ratio are discussed.

Key words biological macromolecule, high resolution, electron microscopy

Expression of the Gene of the 58kD Subunit of the Vacuolar H⁺-ATPase From Human Kidney in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 334—338

The 58kD subunit gene of the human kidney vacuolar H⁺-ATPase has been successfully expressed in *E. coli*. The fragment of 58kD subunit gene was obtained by polymerase chain reaction (PCR). A clone encoding 58kD subunit was obtained by directly joining PCR product into the plasmid for expression by T7 RNA polymerase (PET). Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression of 58kD subunit gene. The product of 58kD subunit accounted for 50% of cytoplasmic proteins.

Key words H⁺-ATPase, 58kD subunit, bacteria expression

Expression and Secretion of Salmon Growth Hormone From an *Escherichia coli* Secretion