

段长度与 21.5kD 人 MBP 编码序列相应的酶切位点相符(图 4). 以该克隆的重组质粒 DNA 为模板, 分别用 P_1 - P_2 , P_1 - P_4 , P_3 - P_2 和 P_1 - P_6 扩增出 600, 350, 330 和 420bp 的特异性区带, 与人 MBP 外显子 I—VI, I—III, III—VI 和 I—V 等区段长度一致(图 5). 这表明成套引物扩增能对 MBP 家族中不同 cDNA 分子进行快速鉴定.

有关人脑 MBP 基因表达的研究报道甚少. Kamholz 等^[9]首次用鼠 MBP cDNA 克隆片段作探针, 从人脑干/小脑 cDNA 文库中发现 18.5kD (缺外显子 II), 17.2kD (缺外显子 I 和 V) 和 21.5kD 等三种 cDNA. Roth 等^[10]从人胎脊髓 cDNA 文库中发现 20.5kD (缺外显子 V) cDNA, 未从人脑中检出 17 和 14kD (均缺外显子 VI) 的表达产物. 本文构建含人脑 MBP 全长编码序列的 pGEMP 克隆, 为该基因体外转录和翻译的研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Mikoshiba K, Okano H, Tamura T *et al.* Annu Rev Neurosci, 1991; **14**: 201
- 2 Campagnoni A T. J Neurochem, 1988; **51**: 1
- 3 Kitamura K, Newman S L, Campagnoni C W *et al.* J Neurochem, 1990; **54**: 2052
- 4 Aruga J, Okano H, Mikoshiba K. J Neurochem, 1991; **56**: 1222
- 5 Streicher R, Stoffel W. Biol Chem Hoppe-Seyler, 1989; **370**: 503
- 6 陈俊杰, 程汉华, 李昌隆等. 科学通报, 1993; **38**: 1151
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 Hemsley A, Amheim N, Toney M D *et al.* Nucleic Acids Res, 1989; **17**: 6546
- 9 Kamholz J, Ferra F D, Puckett C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 4962
- 10 Roth H J, Kronquist K E, Rosbo K D *et al.* J Neurosci Res, 1987; **17**: 321

脯氨酰顺-反异构酶的纯化及对重组蛋白质折叠反应的催化性能*

徐明波 孟文华 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 脯氨酰异构是蛋白质折叠反应的限速步骤之一, 体内被脯氨酰顺-反异构酶 (PPI) 所催化. 为了研究 PPI 在重组蛋白体外折叠复性中的作用, 我们自猪肾脏中纯化了 PPI, 并对重组蛋白的酶促折叠过程进行了探讨. 结果表明, PPI 催化的重组蛋白的折叠反应主要是提高了它们的折叠速率, 而不增加正确折叠率和比活性, PPI 在很低的浓度下即有很高的催化活性.

关键词 重组蛋白, 折叠, 脯氨酰顺-反异构酶

蛋白质中的多数肽键, 由于共振和立体效应, 通常采用反式构象. 但脯氨酰由于其五元环的空间限制, 当反应处于平衡时, 约有 10%—20% 的 Pro 残基处于顺式构象, 室温下 Pro 的顺-反异构反应约需数分钟完成. 当肽链完全伸展时 Pro 的异构反应处于自由进行的状

态, 而当肽链处于折叠状态时其异构反应就受到一定的限制, 当 Pro 处于错误构象时, 蛋白质的折叠反应根本无法进行, 因为 Pro 的异构反应较蛋白质折叠反应慢得多, 因而 Pro 异构

*“863”项目的一部分.

收稿日期: 1993-05-07, 修回日期: 1993-08-23

就成了整个折叠反应的又一个限速步骤。

1984年Fischer^[1]首次报告了从猪肾脏纯化出一种能有效催化含Pro多肽底物Pro的顺-反异构反应的物质,并定名为多肽脯氨酰顺-反异构酶(PPI)。它所催化的反应是在Pro残基前绕C—N键进行的180°异构反应,而不是切断和形成一个共价键,因此PPI也称为构象酶。它的催化效率相当高,其催化寡肽异构的 K_{cat}/K_m 值高于 $10^6 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。PPI活性广泛分布于几乎所有的组织和器官,存在于从细菌到人的整个生物界。除催化寡肽中Pro的异构反应,它还可以催化几种以Pro异构作为折叠的限速步骤的几种蛋白质的折叠反应^[2,3],由于目标蛋白质的不同,它的催化效率有着很大区别,其中RNA酶T1在PPI的催化下其反应速率可以提高100倍以上。其催化反应与酶和底物的浓度有较大的关系^[4,5]。

以包涵体形式存在的重组蛋白体外再折叠效率低,副反应多。分子中通常含有较多的Pro残基,为了证实Pro的异构对这些蛋白折叠的影响及其可能的作用环节,我们进行了PPI的分离纯化及对重组蛋白质折叠作用的研究。

1 材料与方法

1.1 PPI的纯化

参照Kordel等^[6]的方法,并做部分调整。新鲜猪肾购自丰台屠宰场,取肾皮质剪成小块,用冷生理盐水洗涤后,在50mmol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.4, 0.2mol/L蔗糖溶液中匀浆(45s×4,间歇1min), 10 000×g离心30min去沉淀。上清液用1mol/L醋酸(pH4.0)调pH至5.5, 4℃置30min再次离心去除由于pH的变化而引起的沉淀;离心的上清用1mol/L Tris调整pH至7.0,计体积并缓慢加入固体硫酸铵至40%饱和度, 4℃放置30min离心弃沉淀;上清补加硫酸铵至60%饱和度, 4℃放置30min再次离心,收取沉淀并溶解于50mmol/L Tris-HCl, pH8.5的缓冲液中,并对该缓冲液透析过夜以去除硫酸铵。

DEAE-Sepharose CL-6B柱经50mmol/L

Tris-HCl, pH8.5缓冲液平衡后放进经上述透析后的蛋白样品,收取不吸附峰并超滤浓缩后待Sephadex G-50分离, Sephadex G-50(2.6cm×105cm)柱用50mmol/L Tris-HCl, pH7.5缓冲液平衡后,将上述浓缩液进样。以20ml/h流速洗脱并收集活性峰,加NaCl至终浓度1mol/L后在Waters 650蛋白纯化系统上以0.5ml/min的流速进经50mmol/L Tris-HCl, 1mol/L NaCl, pH7.5缓冲液平衡的Shodex HIC疏水分离柱(0.8cm×10cm),以1ml/min的流速进行NaCl浓度由1mol/L→0的反梯度洗脱,最后柱用H₂O和6mol/L尿素洗脱使柱再生,收集第一个洗脱峰即为PPI。

1.2 活性测定

活性测定的寡肽底物(N-琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Phe对硝基苯胺,购自Sigma公司)溶于67%(V/V)的二甲基亚砷水溶液,终浓度为1.68mmol/L。2ml 0.035mol/L Hepes,含5mmol/L β-巯基乙醇, pH7.8缓冲液,在加入50μl上述底物并平衡1min后,加入待测PPI酶活性的蛋白溶液作用30s,加入20μl 0.76mmol/L的糜蛋白酶溶液并连续记录390nm光吸收的变化。

1.3 PPI催化的重组蛋白质折叠的荧光变化

纯化的IL-2(1mg/ml在50mmol/L PB, pH7.0,含1%SDS中)以50mmol/L PB, pH7.0缓冲液快速稀释5倍后,加入不同浓度的PPI,并以Cu²⁺催化的折叠反应和不加任何试剂作为对照,连续检测在295nm激发下,315nm相对荧光强度的变化(狭缝宽度2.5nm)。

纯化的GM-CSF(1mg/ml在0.1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 8mol/L尿素中)以0.1mol/L Tris-HCl, pH8.0缓冲液5倍稀释,加入不同浓度的PPI并以Cu²⁺和不加催化剂作为对照,连续检测在295nm激发下,315nm相对荧光强度的变化。

2 结果

2.1 PPI的纯化

由于PPI是一种碱性蛋白质,等电点接近

9. 这样利用 DEAE 型阴离子交换柱即可在 pH8.5 左右收集不吸附峰而去除 90% 以上的杂蛋白. 图 1 是进一步经 Sephadex G-50 的分离图谱, 收集 PPI 活性峰, 加 NaCl 至 1mol/L, 图 2 是疏水色谱分离图.

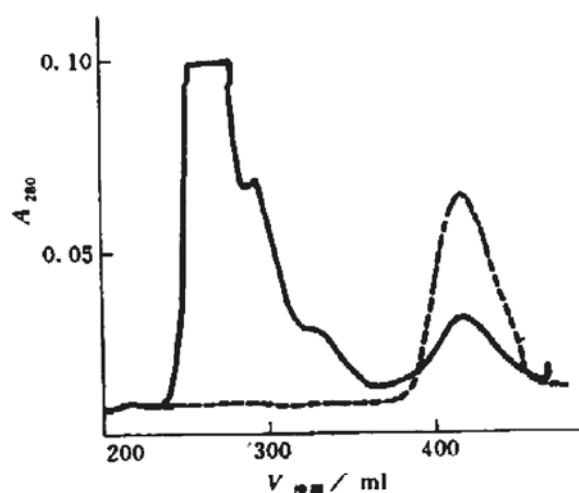


图 1 Sephadex G-50 分离 PPI 层析图谱

— A_{280nm} , ---- PPI 活性.

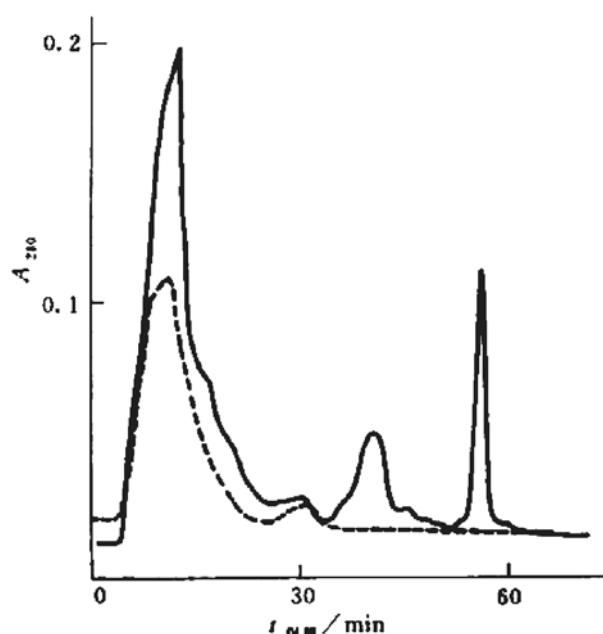


图 2 Shodex HIC 分离 PPI 色谱图

— A_{280nm} , ---- PPI 活性.

PPI 在疏水介质上有微弱保留. 经 HIC 分离后 PPI 达电泳纯 (图 3, 第 1 条), 表 1 是蛋白回收情况.

以疏水色谱纯化的 PPI 作为抗原免疫家兔, 并以所得的抗体作亲和配基. 这样就可以

用亲和的方法来简化 PPI 的纯化步骤. 结果表明用亲和纯化可以纯化到 2—3 种分子量不同的蛋白, 而分子量为 19 000 左右的蛋白恰好又是在疏水色谱上分离所得的小的活性峰. 说明 PPI 在体内可能以多种分子形式存在, N 端测序结果表明, 它们具有不同的 N 末端序列, 但都能与 PPI 抗体反应, 说明它们具有某种相似的抗原决定簇结构.

表 1 猪肾中纯化 PPI¹⁾

纯化步骤	总蛋白/mg	活性回收/%
硫酸铵沉淀	4100	100
DEAE 交换	375	65
Sephadex G-50	6.4	42
HIC	2.8	32

¹⁾ 从 200g 猪肾中提纯的 PPI 三次测定结果的平均值.

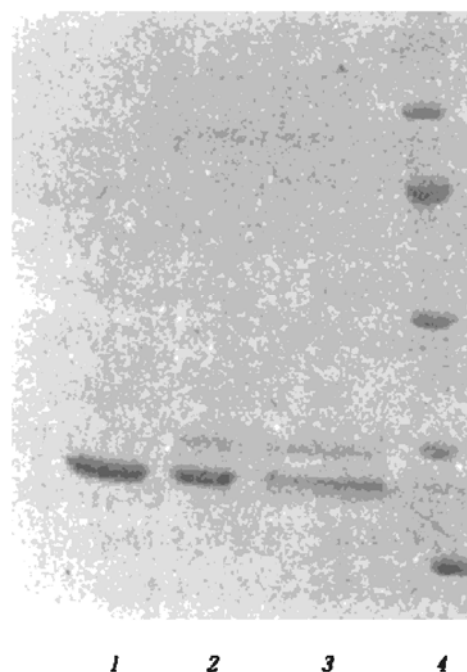


图 3 PPI 纯化后电泳图谱

1: 用 HIC 纯化 PPI; 2, 3: 亲和纯化 PPI;
4: 分子量标准, M_r 从上至下分别是
94 000, 67 000, 43 000, 30 000, 20 000
及 14 400.

2.2 PPI 催化的 IL-2 和 GM-CSF 的折叠

表 2 为 IL-2 在 PPI 催化下的相对荧光强度的变化.

表2 PPI 催化的 IL-2 折叠过程中的
相对荧光强度

作用时间 /min	PPI 量/ ($\mu\text{g/ml}$)					Cu^{2+} / ($50\mu\text{mol/L}$)	空白 对照
	1	2	5	10	20		
0	2.8	2.8	2.8	2.8	2.9	2.8	2.8
2	2.6	2.1	1.6	1.3	1.5	2.1	2.3
5	1.2	0.92	0.51	0.6	0.5	1.8	1.9
10	0.44	0.38	0.26	0.28	0.26	1.5	1.7
20	0.38	0.26	0.26	0.27	0.26	0.61	0.83
40	0.26	0.26	0.26	0.27	0.26	0.42	0.62
60	0.26	0.25	0.24	0.26	0.26	0.30	0.34
90	0.26	0.25	0.24	0.26	0.25	0.26	0.28
120	0.25	0.25	0.24	0.26	0.25	0.26	0.25

IL-2 在变性状态下发射光谱峰值蓝移至 315nm, 相对荧光强度增加至 0.70, 荧光强度在折叠过程中逐渐恢复到正常值, 峰值也相应移动, 因此就可以利用在 315nm 处的相对荧光强度的变化作为折叠是否完成的一个指标, 蛋白折叠完成后其荧光强度约为 0.26. 并可根据相对荧光强度达到稳定的时间作为反应时间.

在无任何催化剂催化的情况下, IL-2 荧光值达到稳定的时间约为 90min. 在 Cu^{2+} 催化下也大于 60min, 说明 IL-2 在体外折叠是一个相当缓慢的过程. PPI 在 $1\mu\text{g/ml}$ 时即能表现出明显的催化活性, PPI 的浓度 $\geq 5\mu\text{g/ml}$ 时 10min 内即可完成折叠反应, 说明 PPI 在以上条件下对 IL-2 具有很高的催化折叠性能.

GM-CSF 分子中含有 2 个 Trp, 变性后的发射光谱 ($\lambda_{\text{exc}} = 295\text{nm}$) 的最大吸收波长 (348nm) 不发生蓝移和红移, 但相对荧光强度约增加 46%. 与 IL-2 类似 GM-CSF 在 Cu^{2+} 催化下要使荧光恢复到天然状态的荧光强度, 需要 60min 以上的时间, 在 $5\mu\text{g/ml}$ 的 PPI 催化下, 荧光值达到稳定的时间 $< 10\text{min}$.

活性测定结果表明 PPI 催化的两种重组蛋白折叠后的比活性与 Cu^{2+} 催化的折叠并无显著差异, 说明 PPI 并不能提高蛋白的正确折叠率, 而只是提高它们的折叠速率.

3 讨 论

IL-2 在折叠的过程中, 最大荧光强度的波长 (λ_{max}) 又红移, 荧光的强度逐渐降低, 说明 Trp 残基又重新进入分子内部的疏水区域; GM-CSF 在变性折叠的过程中 λ_{max} 不发生偏移, 只是荧光强度有所变化, 推测两个 Trp 残基分别位于分子表面和分子内部, 变性后均处于暴露状态, 而再折叠的过程中又会使其中一个 Trp 残基重新进入分子内部而使荧光强度减弱, 说明利用荧光光谱这种简单的方法来检测蛋白质的折叠过程是合理的.

脯氨酰的顺-反异构和二硫键的形成一样, 都是蛋白质折叠的限速步骤. 由 PPI 催化的蛋白质折叠的加速反应至少有几个优点, 由于折叠的加速可以减少处于部分折叠状态的肽链被蛋白水解酶的降解, 同时它可以抑制许多副反应如聚合反应从而使蛋白进入正常折叠途径. 尽管由于 PPI 的催化未能使蛋白的正确折叠率和比活性提高, 但它可以使折叠的时间缩短到 10min 以内, 而且所需的酶量极低, 以 $5\mu\text{g/ml}$ (相当于其催化底物分子数的 1/45) 即能显示出很强的催化活性. 当然这还可能并不是 PPI 所发挥的最佳催化状态. 利用疏水色谱纯化的 PPI 作为抗原, 免疫动物所得的抗体再用于纯化细胞上清中 PPI 可以得到 2—3 种不同分子量但具有 PPI 活性的蛋白, 说明这几种蛋白至少具有类似的抗原决定簇结构. 已有的研究表明 PPI 的催化性能与 Pro 周围的氨基酸序列和部分折叠的中间体中 Pro 的表面可及性有关. 但对大多数蛋白来说, 在有或无 PPI 存在时, 结果大不相同, 这就说明 PPI 具备两种重要的酶促特性: 一是它可以催化 Pro 的异构反应, 二是最终反应的方向的产物的状态不取决于酶的存在而仅取决于终产物和底物所处的 Gibbs 自由能的差值, 而这种自由能的差异仅取决于在特定折叠条件下蛋白质底物结构的稳定性. 在合适的条件下部分折叠的中间体很快形成, 然后出现 Pro 的异构反应, 使 Pro 处于正确构象, 最终形成天然的稳定的蛋白质构象.

与 PDI 相同, PPI 也不能决定蛋白质的折叠途径.

体内催化 Pro 顺-反异构物质主要是 PPI, 但这种酶在体内催化蛋白质折叠的机理尚不清楚. 最近发现越来越多的具有 PPI 活性的蛋白质存在, 如 Cyclopholin^[7] 和 FK506 rotamase^[8], 因为它们可分别与 Cyclosporin A 和 FK506 两种免疫抑制剂结合而被发现, 经部分氨基酸序列分析等结果表明, Cyclopholin 可能与 17 000 的 PPI 系同一种蛋白, 以上两种蛋白目前被认为是两种免疫抑制剂的受体. 蛋白折叠与免疫调节过程之间的内在联系还不清楚, 它们的异构酶活性在与抑制剂结合后也被完全抑制, 这样可能会造成免疫抑制的同时也抑制

了蛋白质正常的折叠反应.

参 考 文 献

- 1 Fischer G, Bang H, Meeh C. *Biomed Biochim Acta*, 1984; **143**: 1101
- 2 Lang K, Schmid F X, Fischer G. *Nature*, 1987; **329**: 268
- 3 Lin L N, Hasumi H, Brandts J F. *Biochim Biophys Acta*, 1988; **956**: 256
- 4 Jackson S E, Fersht A R. *Biochemistry*, 1991; **30**: 10428
- 5 Jackson S E, Fersht A R. *Biochemistry*, 1991; **30**: 10436
- 6 Kördel J, Drakenberg T, Forsén S *et al.* *FEBS Lett*, 1990; **263**: 27
- 7 Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K *et al.* *Nature*, 1989; **337**: 476
- 8 Harding M W, Galat A, Uehling D E *et al.* *Nature*, 1989; **341**: 758

血管活性肠多肽结合核苷酸性质的研究

朱 平

(解放军农牧大学军事兽医研究所, 长春 130012)

D. MANN R. GREENBERG

(College of medicine, University of Kentucky, Lexington Kentucky 40536-0084)

摘要 采用光亲和技术检测了血管活性肠多肽 (VIP) 与核苷酸之间的相互作用, 发现 VIP 可以特异性结合同位素标记的 GTP, 还发现未标记的 GTP 以及其它三磷酸核苷抑制这种结合, 这意味着 VIP 与上述三磷酸核苷之间的结合是一种典型的可逆性的结合反应. 发现低浓度的 GDP, GMP 不但不抑制 VIP 与同位素标记 GTP 的结合反应, 反而增强这种结合. 联系到其它研究者关于 GTP 影响 VIP 与其受体结合反应的结果, 可认为 VIP 能可逆性地连接一种三磷酸核苷, 这种连接受反应系统中不同核苷酸比例影响, 通过这种连接来调节 VIP 与其受体之间的反应.

关键词 血管活性肠多肽, 光亲和技术, 核苷酸

血管活性肠多肽 (VIP) 是一种具有多种生物学效应的神经多肽^[1], 它由 28 个氨基酸组成, 广泛分布于人和哺乳动物的神经系统中, 发挥重要的效能. 它对局部血流、心血管反应、平滑肌张力、水盐代谢、免疫和神经内分泌功能、以至体内神经介质代谢有重要影响, 甚至参与调整动物的记忆程序^[2]. 现有的资料表明, 哺乳动物和人的 VIP 分子结构是相同的.

像许多其它的生物活性多肽一样, VIP 是通过其受体起作用. 用多种动物组织进行的研究表明, VIP 与其受体结合, 刺激离体膜腺苷酸环化酶使细胞内 cAMP 水平升高^[3,4]. 1987 年 Ho 等发现, VIP 与其受体结合, 可以改变松果体细胞的 cGMP 水平^[5].

虽然大量材料述及 VIP 通过结合受体激

Yang Luchuan. (*Department of Biochemistry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 244

A series of DNA primers specific for human brain myelin basic protein (MBP) gene was designed and synthesized. MBP cDNA fragment about 600bp in length was amplified from human brain cDNA library by using polymerase chain reaction (PCR) with the specific primers P₁ and P₂. The recovered PCR product was flushed by klenow fragment and inserted into pGEM-3Zf (+) vector pretreated with Sma I and calf intestinal alkaline phosphatase. The recombinant plasmid was used to transform competent cell JM 109. The positive colonies were directly screened on indicator plates. The recombinant plasmid DNA and insert fragment isolated from four positive colonies were analyzed by digestion with EcoR I, Kpn I and Taq I. The different coding sequences including MBP exon I—VI, I—III, III—VI and I—V were amplified from these clones with their corresponding nested sets of primers respectively. These results show that these cDNA clones contain full-length coding sequence for 21.5kD human MBP.

Key words polymerase chain reaction (PCR), human brain cDNA library, coding sequence for myelin basic protein, vector pGEM-3Zf (+)

Studies on the Purification of PPI and its Catalyzing Activity for Folding of Recombinant Proteins. Xu Mingbo, Meng Wenhua, Ma Xiankai. (*Institute of Basic Medical Sciences, P. O. Box 130-3, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 247
Proline isomerization catalyzed by peptidyl-

prolyl *cis-trans* isomerase (PPI) *in vivo* is a limited procedure in protein folding. In order to study the catalyzing activity of PPI on the refolding of recombinant proteins *in vitro*, PPI is purified from pig kidney, and is investigated the effects of the enzyme on catalyzing the refolding process. Results indicate that PPI increases the folding rate without increasing the correct folding ratio and specific activity, and PPI has a high catalyzing activity even at very low concentration.

Key words recombinant protein, refolding, PPI

The Research on Vasoactive Intestinal peptide Binding With Nucleotides. Zhu Ping, D. MANN, R. GREENBERG. (*Veterinary Institute, University of Agriculture and Animal Sciences of PLA, Changchun 130012*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; **21** (3): 251
The interaction between VIP and nucleotide was tested with advanced photo-affinity technique. It was found that VIP can bind radio-labelled GTP specifically and this binding could be competitively inhibited by cold GTP (unlabelled GTP). The experiment indicated that not only GTP could inhibit the binding between VIP and hot GTP, but also all other nucleoside triphosphates such as ATP, TTP, UTP could competitively inhibit this binding, although their inhibitions were a little weaker than GTP. It means VIP binding nucleoside triphosphate was a typical reversible binding reaction. It was found also that GDP, GMP at low concentration did not inhibit VIP binding hot GTP but enhanced the binding. Connecting with other researchers' results of GTP influencing on VIP-receptor interaction, it was considered that VIP could reversibly bind one of nucleoside triphosphates and this binding