

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、—CN 及 —NO₂ 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

则有轻度下降。K_m 值不随年龄有大的改变, 表明此酶并不存在有胎儿型和成人型之分^[3]。血清对氧磷酶水平也没有明显的性别间差异^[4,5]。

人血清对氧磷酶在人群中表现有底物依赖性多态性分布^[5]。这种多态性由第七染色体上的两个等位基因控制, 这两种基因型决定的同工酶以相同的转化数水解苯乙酸酯, 但 A 型水解对氧磷的速度较慢, 而 B 型的分解速度很快。

2 底物特异性

人血清对氧磷酶优先选择芳香酯底物。苯乙酸酯可能是其最佳底物, 乙酸萘酯也是一个有效底物, 但两者都不是这个酶的特异性底物。对乙酸酯的选择性比长链的羧酸酯强。有机磷酸酯和有机磷酯、有机亚磷酸酯、氨甲酸酯及羧酸酯都是人血清对氧磷酶的底物^[5,6]。最近已用纯化数百倍的人血清对氧磷酶对一些底物的分解进行了系统的测定^[7]。

无论血清还是纯化的酶, 苯乙酸酯都是酶的最有效的底物。与苯乙酸酯及其他几种芳香乙酯相比, 对氧磷是一个低效的底物, 对氧磷酶的名称, 主要是根据有机磷酸酯的特殊毒理学意义而命名的, 并非指底物的最佳有效性。对氧磷是至今唯一能够区分出两种同工酶的底物^[7], 所以保留对氧磷酶或者芳香酯酶这一名称是合理的。已有证据表明人血清中的某些成分对梭曼异构体具有一定程度的立体结构选择性水解作用^[8]。尚未见到纯化的对氧磷酶水解有机氟磷酸酯的报道。

3 酶蛋白的纯化及性质

人血清对氧磷酶已被高度纯化^[9]。纯化的酶在有 Ca²⁺、甘油及乳化剂 911 存在时, 在 4℃ 可稳定数月。这一酯酶似乎是一种与 apo 脂蛋白, 特别是与 apo A-I 紧密粘连的糖蛋白。这种形成高分子量复合体并与其他 apo 脂蛋白聚集的倾向使得酶的纯化非常困难, 而且在除去 apo A-I 后很容易失活, 直到采用甘

油及乳化剂后, 才获得了高纯度的酶蛋白^[9]。

在人血清中, 对氧磷酶或者芳香酯酶不表现有多种形式。单一的酶既可水解对氧磷又可分解苯乙酸酯。苯乙酸酯可抑制酶对对氧磷的水解(混合型抑制, 不是完全竞争性的), 二异丙基氟磷酸酯 (DFP) 可完全抑制酶对苯乙酸酯的水解。

A、B 型两种同工酶已分别纯化。经纯化后同工酶的基因型保持不变。纯化过程中, 对氧磷酶活力与芳香酯酶活力比值始终保持与原血清相同。A 型和 B 型特性似乎代表了这一酶的两种同工酶的固有性质, 至少在人血清中对氧磷酶活性和芳香酯酶活性都是同一酶蛋白的两种属性。芳香酯酶活性和对氧磷酶活性均需要有钙, 随着钙的减少, 两种酶活性受到同样程度的抑制。这种依赖钙的平行效应进一步支持一种酶具有两种水解活性的假说。A、B 型两种同工酶在 pH 增高时酶活力也增加^[8], 而且可不同程度地被 1 mol/L NaCl 激活。pH 值在 9.5 到 10.5 之间时, 1 mol/L NaCl 明显激活两种同工酶的活性, B 型同工酶受激活的程度显著大于 A 型。

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测得的最小分子量是 43 ku, 它含有三个糖链, 糖含量约为 15.8%, 除去糖后, 酶蛋白的净分子量约为 37 ku。A、B 型或 AB 混合型多态性酶的纯化没有区别, 电泳分析表明对氧磷酶同工酶的蛋白区带模式是相同的。两种同工酶的等电点大约是 5.1^[7]。氨基酸组分分析表明人血清对氧磷酶或芳香酯酶是一含有 337 个氨基酸残基的糖蛋白, 亮氨酸残基含量相对较高。氨基酸组分分析表明它不同于任何已知序列的蛋白质。

4 基因克隆及多态型分子基础

人血清对氧磷酶基因已被克隆, 它是以家兔的对氧磷酶的 cDNA 为探针从人肝 cDNA 文库中克隆到的。全长 cDNA 中有一个开放阅读框架, 编码 355 个氨基酸残基, 这一长度比从氨基酸组分中推算的长度多 12 个残基。比较

由 cDNA 推导的 N 端和由直接测定的酶蛋白 N 端的氨基酸序列时, 发现除起始甲硫氨酸被切除外, 其他信号肽序列在分泌后仍然保留. 这与其他成熟的分泌型蛋白的特征是不同的.

最近, 通过对用胰蛋白酶消化的肽片段分析及部分氨基酸残基序列测定发现了两种同工酶的多态性区段, 用 PCR 方法将多态性区段扩增后发现 A 基因型个体的对氧磷酶基因编码的氨基酸序列第 191 位是谷氨酰胺, B 基因型个体则是精氨酸, AB 型则是杂合体. 这一结构上的差异至少是对氧磷酶多态性分子基础之一^[1,10].

5 遗传学研究

人血清对氧磷酶活力水平的双模式分布早在 1968 年就被发现, 此后又有许多实验室都对此作了报道^[4,11,12]. 在 1976 年, Playfer^[11]对高低两种对氧磷酶活性现象的遗传学基础作了仔细的研究. 他们发现对氧磷酶水平是单纯的孟德尔式性状遗传, 由常染色体单个位点上的等位基因决定. 由于“慢”活性以隐性性状遗传, 所以很容易通过“慢”活性在抽样群体中的比例, 估计两个等位基因的基因频率, 例如, 英国人或其他白种人的血清中对氧磷酶活性明显呈现双模式分布. 通过复杂的等位基因分离分析表明^[12], 一个不完全显性的等位基因在多因子遗传背景下, 导致高的对氧磷酶活性. 根据整个群体中低活性人群所占的比例, 可推算出低高两种活性的基因频率 (分别为 p 和 q). 高活性的基因频率可由 $1 - p = q$ 计算出.

儿童在家族中代表着亲本的所有可能的基因型组合, 通过谱系的分析证实在儿童中的确存在这种预期的基因分布^[11]. 代表低活性的等位基因的频率在欧洲人及加拿大人中为最高, 美国人大约为 51% ~ 53%, 而澳大利亚的土著印第安人、尚比亚人、辛巴威人及一些美洲印第安人频率最低^[13]. 然而在分析多个来自于非洲及东方人群体样本时则遇到了困难, 在多数情况下, 对氧磷酶活性是单模式

分布的, 不可能以同样的方式来估计反映“低”或“高”对氧磷酶活性的基因频率, 还不清楚在这些群体中的这种单模式分布, 是由于基因频率中的漂移还是这些人群中存在有另外的对氧磷酶等位基因, 探究这些地域的人血清对氧磷酶水平缺乏双态分布的原因是一个令人感兴趣的问题. 通过测定多态性对氧磷酶的性质特征如基因结构等, 而不是仅仅测定对氧磷酶活性的水平, 就有可能确定个体的基因型 (纯合子的高等位基因, 纯合子的低等位基因, 或带有一种类型等位基因的杂合子).

基因型一般是通过利用两种同工酶的几个不同特性而加以区分^[7]: a. 对盐反应的不同, 高对氧磷酶活性的 B 型同工酶经盐激活后, 活性要比低对氧磷酶活性的 A 型同工酶增高多 2~3 倍; b. 对氧磷酶活力与芳香酯酶活力的比值, B 型同工酶大约是 A 型同工酶的 7 倍, 酶经纯化后也是如此; c. 0.1 mmol/L 氯丙嗪对芳香酯酶活力的抑制; 对 A 型同工酶的抑制强于对 B 型同工酶的抑制.

6 对氧磷酶与疾病的关系

血清对氧磷酶水平与多种疾病有关 (如糖尿病、关节炎、贫血、结核病、动脉粥样硬化及心脏病). 患有幽门狭窄的婴儿具有较高的血清芳香酯酶活力水平, 而且这种酶活力水平的提高一直持续到手术矫正并恢复正常饮食一周以后. 患有全身性淀粉样变性的病人被发现有低的血清对氧磷酶和芳香酯酶活性^[14].

人血清中的对氧磷酶活性主要存在于高密度脂蛋白 (HDL) 中, 在动脉粥样硬化及冠心病病人血清中 HDL 和载脂蛋白浓度下降, 对氧磷酶活力随之也下降^[15]. HDL 水平严重下降的“Fish-eye”病患者及 Tangier 病患者^[16], 其对氧磷酶活力也明显降低. 血清中的对氧磷酶与 HDL 中的其他成分相比, 与脂代谢的关系可能更为密切, 在家族性高胆固醇血症及胰岛素依赖型糖尿病患者其血清中的 HDL-胆固醇浓度并不降低, 但对氧磷酶活性却显著降低^[17], 很可能对氧磷酶在脂代谢中

发挥重要的生理作用, 活性减低有可能加速动脉粥样硬化的形成. 低密度脂蛋白 (LDL) 经氧化修饰后可促进巨噬细胞对它的吞噬, 从而导致动脉脂肪条纹这一动脉粥样硬化前体的形成. 纯化的人血清对氧磷酶和 HDL 一样能显著降低脂质过氧化物在动脉管壁上的累积^[18], 提示对氧磷酶可以预防动脉粥样硬化形成.

7 对有机磷酸酯毒性的防护作用

对硫磷是目前农药中毒性最强的一种, 对硫磷在体内经 P-450 混合功能氧化酶催化后, 转化成为活性形式的对氧磷. 对硫磷作为杀虫剂其效应和对人及其他动物的毒性取决于它的代谢转化产物对氧磷, 对氧磷可与乙酰胆碱酯酶及其他胆碱酯酶和丝氨酸酶的活性位点丝氨酸反应, 最终形成不可逆的钝化酶. 除与这些丝氨酸酶共同作用结合外, 血清对氧磷的清除主要靠酶催化的水解, 水解的效率很高. 除对氧磷外, 对氧磷酶还可水解许多其他有机磷酸酯.

8 结 语

尽管对氧磷酶可防护有机磷化合物的毒性, 但对氧磷酶活性与此酶的其他功能相比可能是微不足道的.

对氧磷酶存在于 HDL 中, 提示它可能与 HDL 中的其他成分一样与脂代谢有关. 高分子的 HDL 蛋白防止动脉粥样硬化的作用仍然在研究中. 对氧磷酶或芳香酯酶与 apo A-I 非常密切的关系并不仅仅是一种非特异性的蛋白结合. apo 脂蛋白是磷脂酰胆碱-胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 的辅基或激动剂, 似乎与人血清中结合前列环素 I (PG I) 的前列腺环素稳定因子 (prostacyclin stabilizing factor, PSF) 相同^[19]; apo A-I 也是与对氧磷酶结合的, 当除去 apo A-I 后, 酶则变得非常的不稳定, 而且很易变性失活. PG I 与对氧磷酶的关系值得深入研究.

对氧磷酶具有广泛底物特异性. 从食物、植物体及药物和化学药品中寻找此酶的其他底

物是有可能的.

总之, 寻找对氧磷酶的天然底物并探究其生理功能将是一个很有前景的研究课题.

参 考 文 献

- 1 Akin S, Gan K N, Mody M. *Am J Hum Genet*, 1993; **52**: 598
- 2 Lotti M, Flatter B, Traverso R. In: Reiner E eds. *Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood: Chichester, 1989: 193
- 3 Mueller R F, Hornung S, Furlong C E. *Am J Hum Genet*, 1983; **35**: 393
- 4 Szabo I, Rona K, Czinner A *et al.* *Inter J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1991; **29**: 238
- 5 Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diefgen T L. *Toxicol Envir Chem*, 1988; **18**: 79
- 6 Augustinsson K B, Casida J E. *Biochem Pharmacol*, 1959; **3**: 60
- 7 Smolen H, Eckerson H W, Gan K N *et al.* *Drug Metab Dispos*, 1991; **19**: 107
- 8 de Bisschop H C J V, de Meerleer W A P, van Hecke P R J *et al.* *Biochem Pharmacol*, 1987; **36**: 3579
- 9 Blatter M C, James R W, Messmer S *et al.* *Eur J Biochem*, 1993; **211**: 871
- 10 Humert R, Adleer D A, Distech C M *et al.* *Nat Genet*, 1993; **3**: 73
- 11 Playfer J R, Eze L C, Bullen M F *et al.* *J Med Genet*, 1976; **13**: 3372
- 12 Iselius L, Evans D A P, Playfer J R. *J Med Genet*, 1982; **19**: 424
- 13 Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diefgen T L. In: Reiner E eds. *Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood: Chichester. 1989: 15
- 14 Maury C P, Junge W, Teppo A M *et al.* *Drug Metab Dispos*, 1991; **19**: 100
- 15 Hiasa Y, Maeda T, Mori H. *Clin Cardiol*, 1986; **9**: 3349
- 16 Mackness M I. In: Reiner E eds. *Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood: Chichester. 1989: 202
- 17 Mackness M L, Harty D, Bhatnagar D *et al.* *Atherosclerosis*, 1991; **86**: 193
- 18 Mackness M L, Arrol S, Durrington P N. *FEBS Lett*, 1991; **286**: 152
- 19 Yui Y, Aoyama T, Morishita H *et al.* *J Clin Invest*, 1988; **82**: 803

Paraoxonase in Human Serum. Wang Qingding, Sun Manji (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China*).

Abstract Paraoxonase can hydrolyzes paraoxon, the most highly toxic pesticide, and was paid good attention in recent decades, but there was no published report in our country. Its existence, substrate specificity, isolation, purification,

polymorphism, genetic properties, relations with some diseases, and its protection against organophosphorus compounds are introduced. It is beneficial for further studies of its biological properties, physiological function and application.

Key words paraoxonase, isolation, purification, substrate specificity, polymorphism

体外遗传学方法及应用

史国利 陈德凤

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

摘要 体外遗传学是利用核酸分子本身一定的表型(如结合、催化等)在试管中分离筛选特定核酸分子序列进行研究的方法。由于体外遗传学方法改变了自然界缓慢的进化过程, 使人为的进化得以简单地实现, 同时也使许多核酸功能区的识别和确定由被动变为主动, 为进一步探索基因的调控规律及主动地调节生化反应过程提供了有效的手段, 近年来体外遗传学方法及在分子生物学方面的应用得到了很大的发展。

关键词 体外遗传学, 离体筛选, 核酸序列, 应用

经典的遗传学研究是从活体的基因型变化研究表型的变化, 或者按相反的方式进行, 而许多核酸分子本身具有一定的表型(如与配体的结合特性, 催化特性等), 碱基序列的变化可导致核酸本身表型的变化, 体外遗传学(*in vitro genetics*)就是利用上述特点在试管中分离目标核酸分子序列并对其功能进行研究的新兴研究领域。

体外遗传学的概念是 Szostak^[1]在 1992 年提出的, 但有关的方法和研究在 80 年代末期已有报道, 如 1989 年 Kinzler 和 Vogelstein^[2]报道了用全基因组 PCR (whole genome PCR) 的方法筛选爪蟾转录因子 III A (TF III A) 特异性 DNA 结合位点, 同年 Oliphant 等^[3]用人工合成的随机寡核苷酸作随机序列库体外筛选了酵母转录活化蛋白 GCN4 的 DNA 结合位点。这是体外遗传学的初级形式。近年来体外遗传学有关方法和应用研究都有很大的发展, 本文

对此作了简要的综述。

1 体外遗传学方法

离体筛选和体外进化是目前体外遗传学研究的主要内容, 其主要模式是先根据研究目标建立随机序列库, 经多次体外筛选后, 得到所需的核酸序列, 再测定序列进行分析(图 1)。

筛选所用随机序列库可以是全细胞 DNA 文库, 亦可以是化学合成的带随机序列的 DNA 片段。早期的许多研究用 DNA 文库作随机序列库, 如 Kinzler 和 Vogelstein^[2,4]将人类淋巴细胞的全细胞 DNA 剪切成 200~300 bp 的片段, 再在片段两端连接两个 PCR 引物作为随机序列库分离选择出爪蟾转录因子 III A (TF III A) 特异性 DNA 结合位点的保守序列和 GLI 核蛋白的 DNA 结合序列。与细胞 DNA 文库不同, 化学合成的随机序列库是将