

- 1991; 19: 301
- 8 Lee H, Richards F M. J Mol Biol, 1971; 55: 379
- 9 Klapper I, Hagstrom R, Fine R *et al.* Proteins, 1986; 1: 47
- 10 Warwicker J, Watson H C. J Mol Biol, 1982; 157: 671
- 11 Gilson M, Sharp K A, Honig B. J Comp Chem, 1987; 9: 327
- 12 李维忠, 王瑾玲, 刘小兰等. 化学通报, 1996; (3): 58

Electrostatics and Stability of Modified Copper, Zinc Superoxide Dismutase. Li Weizhong, Miao Fangming (*Institute of Chemical Crystallography, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China*).

Abstract After the lysines on the surface of

Cu, Zn superoxide dismutase are modified, the enzyme stability increases remarkably. The rearrange of charge structure of the enzyme due to modification results in the change of enzyme electrostatic field. The finite difference solution to the Poisson-Boltzman method is used to calculate the change of electrostatic field and the effect on Cu, Zn ligand structure which play an important role to stabilize the enzyme. The results show the first and second decomposition constants of Cu, Zn ligand complex are reduced by 10^3 and 10^6 after modification respectively.

Key words enzyme stability, FDPB, superoxide dismutase, chemical modification

枸橼酸酐对原核表达重组 GM-CSF 的修饰作用

冯 丹 袁 勇 张颖妹 冯 岚 范 慧 狄春辉 宋泉声 马大龙

(北京医科大学免疫学系, 北京 100083)

摘要 根据枸橼酸酐对蛋白质中的游离氨基进行化学修饰后可使蛋白质溶解度提高的原理, 以大肠杆菌表达的人重组 GM-CSF 为模型, 研究了枸橼酸酐修饰对含凝血酶识别位点的融合蛋白的作用, 发现用微量枸橼酸酐修饰的重组 GM-CSF 变性、复性更容易, 溶解度明显提高, 并对凝血酶的消化更为敏感, 使凝血酶用量降低 100 倍. GM-CSF 活性测定结果证明枸橼酸酐修饰不影响其生物学活性. 这些结果为枸橼酸酐修饰法在大肠杆菌表达重组蛋白纯化中的应用提供了新途径.

关键词 枸橼酸酐, GM-CSF, 凝血酶, 蛋白修饰

在大肠杆菌中表达的外源基因产物多以包涵体形式存在于胞浆内, 必须经变性、复性后才可能成为具有生物学活性的可溶性蛋白. 在复性过程中往往会出现大量的重组蛋白的沉淀, 造成蛋白质回收率降低. 此外, 为了提高外源基因的表达效率, 许多研究者采用了表达细菌蛋白与目的蛋白的融合分子的战略, 并在二种蛋白质之间设计蛋白水解酶位点, 在蛋白酶的作用下去除细菌蛋白^[1]. 可选择的蛋白水解酶有胰蛋白酶、凝血酶、Xa 因子等. 本室采用在细菌蛋白与目的蛋白之间导入凝血酶切点的方法, 已成功地表达了人白细胞介素 3

(IL-3)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IL-8 等多种细胞因子^[2~4]. 但如重组融合蛋白复性不好时, 凝血酶的切割效率明显下降. 为解决上述问题, 我们根据枸橼酸酐对蛋白中 Lys 残基进行化学修饰后可使蛋白质溶解度提高的原理^[5], 以我室在大肠杆菌表达的人重组 GM-CSF 为模型, 研究了枸橼酸酐修饰对含凝血酶识别位点的大肠杆菌表达融合蛋白的作用, 发现用微量枸橼酸酐修饰的重组 GM-CSF 变性、复性更容易, 溶解度明显

提高, 并对凝血酶的消化更为敏感.

1 材料与方法

1.1 材料

人重组 GM-CSF 表达克隆 pMT-GM-CSF 由本室按人 IL-3 构建路线重组^[2], 可在大肠杆菌高效表达噬菌体 MS2 聚合酶片段和 GM-CSF 的融合蛋白, 两者间含凝血酶识别接头序列: -Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg↓Ala-Pro, 凝血酶可在精氨酸处切割, 使 N 端为丙氨酸的 GM-CSF 正常序列释放出来, 本克隆工作已通过卫生部新药审评中心的审评, 获准临床试验 (另文发表); 枸橼酸酐及凝血酶购自 Sigma 公司; GM-CSF 依赖株 TF-1 细胞^[6]由卫生部生物制品和药品检定所丁锡申教授惠赠.

1.2 人重组 GM-CSF 的诱导表达和包涵体处理

按本室人重组 IL-3 的方法进行^[7].

1.3 枸橼酸酐修饰和变性复性

GM-CSF 包涵体用 pH 8.0 50 mmol/L Tris·HCl 8 mol/L 尿素变性, 变性浓度为 5 g/L. 离心取上清液进行修饰, 一次加入实验所需量的枸橼酸酐, 搅拌的同时用 10 mol/L NaOH 维持 pH 9.0, 室温下放置 20 min. 在 pH 8.0 的外液中透析复性. 本文中设置了几组不同量的枸橼酸酐修饰后的蛋白样品, 其分别是对照组 (不加枸橼酸酐), 每 10 ml 包涵体组中含 0.25 μ l, 0.5 μ l, 1 μ l, 2 μ l 及 5 μ l 枸橼酸酐, 并且为了防止透析过程中的交叉修饰, 分别在相同体系但不同容器中透析复性.

1.4 重组蛋白的溶解度测试

取 1.3 中 6 组复性后的样品, 用透析外液做为对照, 用 752 型分光光度计测各组在 650 nm 处的吸光度.

1.5 凝血酶消化

测 1.3 中对照组和 0.5 μ l 枸橼酸酐修饰组, 分别按照 10 U/mg 蛋白及 1 U/mg, 0.1 U/mg, 0.01 U/mg, 0.001 U/mg 蛋白的凝血酶终浓度加入凝血酶. 置 27℃ 水浴中, 8 h 后终止反应.

1.6 凝血酶消化效率分析

按常规方法进行 SDS-PAGE 鉴定, 用 Pharmacia-LKB. ImageMaster DTS 扫描仪扫入计算机, 用配套软件分析融合蛋白被凝血酶切割的百分含量, 同时分析切下的 15 ku 非融合型 GM-CSF 的百分含量做为校正.

1.7 去修饰

按文献方法^[5]样品在 pH 4.8 环境下透析 5 h, 出现白色沉淀后转到 pH 8.0 环境下继续透析 3 h. 沉淀消失表明去修饰结束.

1.8 活性测定

将对数生长期的 TF-1 细胞配成 10^5 /ml, 在 96 孔板中每孔加 100 μ l 细胞, 加一定比例的凝血酶切后的 0.5 μ l 枸橼酸酐组 (经去修饰处理) 及对照组样品, 二氧化碳温箱培养 44 h, MTT 法测定细胞增殖活性.

2 结果

2.1 蛋白质的溶解度在修饰前后的比较

经枸橼酸酐修饰后的重组蛋白溶解度有明显提高, 肉眼可见溶液清亮, 而未经枸橼酸酐修饰的重组蛋白虽经复性仍有一定浊度, 表 1 示分光光度计的量化检测结果.

表 1 枸橼酸酐修饰的重组蛋白溶解度测定

枸橼酸酐/ μ l ¹⁾	0	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
A_{650}	0.022	0.009	0	0	0	0

¹⁾每 10 ml 包涵体中枸橼酸的量.

2.2 修饰前后凝血酶消化效率比较

经 SDS-PAGE 分析证实, 枸橼酸酐修饰后的重组融合蛋白对凝血酶消化的敏感性大幅度提高 (图 1), 经扫描定量分析证明达到 100% 消化所需要凝血酶量仅为原来的 1/100 (表 2).

2.3 枸橼酸酐修饰后的人重组 GM-CSF 活性分析

利用 TF-1 细胞的增殖反应证明, 经枸橼酸酐修饰后的人重组 GM-CSF 具有良好的生

物学活性, 与未经修饰的对照组相比, 活性无改变 (图 2), 表明修饰不影响蛋白质的活性。



图 1 凝血酶消化效率的 SDS-PAGE 分析比较图
0: 未加凝血酶的融合蛋白; 1~10: 均为酶切 8 h 后的样品, 凝血酶终浓度为 10 U/mg 蛋白, 1: 未修饰组, 2: 0.5 μ l 修饰组; 凝血酶终浓度为 1 U/mg 蛋白, 3: 未修饰组, 4: 0.5 μ l 修饰组; 凝血酶终浓度为 0.1 U/mg 蛋白, 5: 未修饰组, 6: 0.5 μ l 修饰组; 凝血酶终浓度为 0.01 U/mg 蛋白, 7: 未修饰组, 8: 0.5 μ l 修饰组; 凝血酶终浓度为 0.001 U/mg 蛋白, 9: 未修饰组, 10: 0.5 μ l 修饰组。

表 2 凝血酶消化效率的定量分析

凝血酶用量 /U $\cdot$ mg $^{-1}$	10	1	0.1	0.001	0.001
非修饰组泳道	1	3	5	7	9
凝血酶消化的百分率/%	100	74.8	35.1	0	0
修饰组泳道	2	4	6	8	10
凝血酶消化的百分率/%	100	100	100	69.8	30.1

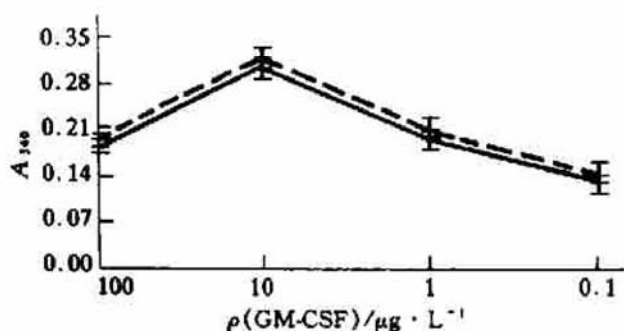


图 2 枸橼酸酐修饰后的人重组 GM-CSF 活性分析图
----: 未修饰组; —: 修饰组。

3 讨 论

1968 年 Dixon 等^[5]用枸橼酸酐研究蛋白质的化学修饰, 其作用原理是在 pH9~11 的碱性条件下, 枸橼酸酐与蛋白质的游离氨基 ($-\text{NH}_2$) 反应, 使原本带正电的 $-\text{NH}_3^+$ 酰基化变成带负电的羧基, 这样蛋白质由于带同种负电而彼此排斥, 从而破坏蛋白质的二级和四级结构, 使蛋白质变性。与其他变性剂相比, 酸酐修饰法有着不可替代的优越性, 如高浓度的尿素在碱性条件下可能会对蛋白质侧链氨基进行不可逆修饰, 而 SDS 等离子性变性剂很难去除, 给复性后纯化带来不便, 盐酸胍变性的蛋白质在复性过程中极易出现沉淀, 复性蛋白质构象也不一定正确, 从而影响其生物活性。Habeeb 等^[8]的研究表明, 虽然在修饰、变性状态的蛋白质的构象和免疫原性与天然蛋白质有明显差异, 但在酸性条件下, 酰基化的氨基可 100% 地去修饰, 复性成氨基, 去修饰后的蛋白质在生物活性、构象、分子的均一性、免疫原性与天然蛋白质无差别。本文利用大肠杆菌表达的 GM-CSF 作为枸橼酸酐修饰的模型, 进一步证实了枸橼酸酐修饰结合尿素变性和复性可使重组蛋白明显提高溶解度, 并充分保留其生物学活性, 这一结果有可能部分解决大肠杆菌表达产物溶解度低, 回收率低的难题。同时, 我们在方法学上进行了改进, 研究了不同量枸橼酸酐的修饰效果, 证明微量枸橼酸酐即可有效对大肠杆菌表达产物进行修饰, 所用量相当于文献报道的 1/240^[9], 这不仅可节约试剂, 而且使得去修饰过程更为容易, 对保留蛋白质活性可能会有帮助。

本文的另一重要发现是证明修饰后的蛋白质对凝血酶的敏感性提高了 100 倍, 这一结果具有理论研究意义和应用价值。造成这一现象的机理可能是: a. 修饰后蛋白质的二、四级结构被破坏, 蛋白质处于伸展状态, 凝血酶作用位点充分暴露, 有助于凝血酶的消化; b. 修饰后由于蛋白质同带负电, 彼此排斥增加, 溶解性增高, 可操作的蛋白质浓度增高, 使凝

血酶的底物浓度增大, 酶切效率就自然提高了. c. 枸橼酸酐对 Arg 残基修饰后, 导致修饰后 Arg 更易被蛋白酶水解. 深入对此进行研究将有助于了解蛋白质与蛋白酶之间的互作用. 在应用研究上, 由于已有大量基因工程产品应用限制性蛋白酶水解策略进行生产, 因而本文结果的应用有可能大量节约凝血酶等蛋白酶, 并提高蛋白质回收率.

综上所述, 由于枸橼酸酐微量修饰有助于重组蛋白的变性、复性, 增高了修饰蛋白凝血酶的敏感性, 去修饰后蛋白质的生物活性不受影响, 因而微量枸橼酸酐修饰是进行重组蛋白纯化的十分有用的方法.

参 考 文 献

- 1 Kun Liang Guan, Dixon K. *Analytical Biochemistry*, 1991; **192**: 262
- 2 马大龙 狄春辉, 庞建等. *高技术通讯*, 1991; **11**: 26
- 3 周宝宏 马大龙, 狄春辉等. *中国免疫学杂志*, 1993; **9** (3): 147
- 4 马大龙, 张颖妹, 宋泉声等. *中华微生物和免疫学杂志*, 1995; **15** (3): 168
- 5 Dixon H B F, Perham R N. *Biochem J*, 1968; **109**: 312
- 6 Kitamura T, Tange T, Terasawa T. *J Cell Physiol*, 1989; **140**: 323
- 7 冯岚, 马大龙, 狄春辉等. *生物化学杂志*, 1993; **9** (3): 337
- 8 Habeeb A F S A, Atassi M Z. *Biochemistry*, 1970; **9**: 4939
- 9 Singhal R P, Atassi M Z. *Biochemistry*, 1971; **10**: 1756

Citraconic Anhydride Modification on the Recombinant Protein Expressed in *E. coli*.
Feng Dan, Yuan Yong, Zhang Yingmei, Feng Lan, Fan Hui, Di Chunhui, Song Quansheng, Ma Dalong (Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The solubility of the protein can be increased by citraconic anhydride (CT) modification. According to this principle, the effects of the CT modification on the fusion protein using rhGM-CSF as a model which contain thrombin cleavage sites have been studied. The result demonstrated that the process of denature and renature in the modified protein was much easier than that in unmodified counterpart. In addition the modified protein is more sensitive to thrombin digestion, one percent amount of thrombin was enough to achieve the complete digestion. The modification by CT did not effect the bioactivity of rhGM-CSF. A new way was paved in the purification of recombinant protein by CT modification method.

Key words citraconic anhydride, GM-CSF, thrombin, protein modification

氧化修饰脂蛋白刺激人动脉平滑肌 细胞 DNA 合成*

汪浩川 刘秉文¹⁾ 付明德

(华西医科大学生物化学与分子生物学研究所, 成都 610041)

摘要 动脉平滑肌细胞 (SMC) 是动脉粥样硬化 (As) 斑块中的主要细胞, 它的增殖在 As 的形成过程中极为重要. 在建立人主动脉 SMC 体外培养法的基础上, 通过³H-TdR 掺入实验观察了人低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL) 及高密度脂蛋白 (HDL) 和相应的氧化修饰型脂蛋白对培养

*国家教委博士点科学基金及纽约中华医学基金部分资助课题. ¹⁾通讯联系人.

收稿日期: 1996-01-10, 修回日期: 1996-09-16