

- 11 王升启, 马立人. 高效薄层色谱法纯化合成寡核苷酸及其衍生物, 生物化学与生物物理进展, 1993, 20 (3): 234~ 237
- 12 王升启, 马立人. 薄层扫描法测定寡核苷酸含量, 生物化学与生物物理进展, 1993, 20 (2): 130~ 132

Synthesis of Antisense Phosphothioate Oligodeoxynucleotides of Dengue Fever Virus and Their Anti-viral Activity. WANG Shengqi, MA Liren, YANG Peiying (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Antisense oligonucleotides can bind to

a specific viral RNA, and hence inhibit the reproduction of virus selectively. Six tetradecyl modified antisense phosphothioate deoxyoligonucleotides were synthesized, antiviral assay showed that RDS-53, RDS-32 and RDS-33 targeting to the translation initiation site, 3'-repeated and 3'-terminal sequences of D2-04 RNA had fairly strong inhibitory activity.

Key words antisense, antiviral drug design, antisense oligodeoxynucleotide, dengue fever virus

用有限酶切法分析蛋白质的氨基酸序列^{*}

王 台

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

门仓宏 依田幸司 山崎真狩

(日本国东京大学生物工学系, 东京 113)

摘要 报道了一个通过有限酶切蛋白质产生多肽片段的方法. 蛋白质经单向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离和用考马斯亮蓝短暂染色后, 切下所需的蛋白质带, 将其放入另一个 SDS-PAGE 凝胶的样品槽内, 在电泳过程中该蛋白质被蛋白酶如蛋白酶 V8 降解, 所产生的多肽片段随之被分离. 电泳结束后, 将多肽片段电印迹至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上. 这些多肽片段从 PVDF 膜上切下后可以直接被用于分析氨基酸序列. 该方法能广泛适用于分析一般蛋白质和 N 端被修饰蛋白质的氨基酸序列.

关键词 有限酶切法, N 端被修饰蛋白质, SDS-PAGE, 电印迹, 多肽片段, 氨基酸序列

蛋白质的氨基酸序列分析在分子生物学的研究中有着重要的作用. 当鉴定出一个 (些) 与某发育过程或代谢环节等相关连的蛋白质时, 在不知其分子特性和生物学功能的情况下, 最常用的策略是分析蛋白质的氨基酸序列. 根据氨基酸序列, a. 可以预测蛋白质的结构特征; b. 通过检索数据库确定该蛋白质是否有同源性蛋白质存在, 由此预测蛋白质的功能; c. 合成简并性的寡核苷酸探针, 克隆蛋白质的编码基因.

Matsudaira^[1] 的方法可以测定皮摩尔 (pmol) 蛋白质的 N 端氨基酸序列. 此方法的特点是易于操作, 不需纯化蛋白质. 蛋白质混合物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-

PAGE) 或双向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (双向电泳) 分离后, 电印迹至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上, 切下所需的蛋白质带或点, 即可用序列分析仪分析氨基酸序列.

如果蛋白质 N 端的 α 氨基被化学修饰后, 这个蛋白质对 Edman 降解不敏感. 无法直接测定其 N 端氨基酸序列. 此时, 需要用蛋白酶或化学试剂 (如 CNBr) 将蛋白质切成多肽片段, 然后分析多肽片段的氨基酸序列. 这些方法需要纯的蛋白质和采用逆向 HPLC 分离

^{*} 本工作得到日本政府、联合国教科文组织和国际细胞学联合会资助.

收稿日期: 1996-01-31, 修回日期: 1996-06-02

多肽片段.

Aebersold 等^[2] 建立了一个比较简单的方法. 这个方法虽然不需要纯的蛋白质, 但仍采用逆向 HPLC 分离多肽片段. 由于许多实验室没有 HPLC, 而且操作 HPLC 也不是一件简单的工作, 因此, 用该方法分析蛋白质的氨基酸序列仍然会遇到许多困难.

本文报道了一个简单的通过有限酶切蛋白质产生多肽片段的方法. 本方法不需要纯化蛋白质和复杂的实验仪器, 可以被一般实验室采用.

1 材料和方法

1.1 蛋白质的制备

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 细胞生长在 37℃ 的 LB 培养基上. 当细胞生长至后对数期时, 8000 × g 离心收集细胞. 细胞经磷酸缓冲液 A (10 mmol/L 磷酸钠 pH 6.8, 含 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 和 2 mmol/L β-巯基乙醇) 悬浮和超声波破碎后, 在 10 000 × g 离心 10 min. 上清液在 100 000 × g 离心 45 min, 最终的上清液为粗细胞质, 含有蛋白质 p50.

1.2 蛋白质的部分纯化

粗细胞质蛋白质被上样至 2 cm × 24 cm 的羟基磷灰石层析柱. 上样后, 用磷酸缓冲液 A 洗脱至洗脱曲线降到基线, 随后用 0.01 ~ 0.5 mol/L 线性浓度梯度的磷酸钠 pH 6.8 (含 2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF 和 2 mol/L β-巯基乙醇) 洗脱, 收集洗脱峰. 用 SDS-PAGE 检测层析结果.

1.3 凝胶电泳分析

依照 Laemmli^[3] 的方法, 用 SDS-PAGE 分离蛋白质. 凝胶规格是 200 mm × 200 mm × 1 mm. 电泳后, 凝胶用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250、50% 甲醇和 10% 醋酸溶液染色, 5% 甲醇-7% 醋酸溶液脱色.

1.4 蛋白质的有限酶切

经羟基磷灰石柱层析后, 得到部分纯化的

p50. 该蛋白质混合物经 SDS-PAGE 分离和短暂染色后, 切下含 p50 的蛋白质带. 蛋白质带在 0.125 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS 缓冲液中平衡 30 min 后, 被切成小胶片. 将这些小胶片放入另一个新凝胶的样品槽内, 每个样品槽内约放入 4 ~ 5 个蛋白质带. 用 0.125 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS 和 20% 甘油缓冲液 (THSG) 填充小胶片之间的空隙, 除去所有气泡. 在小胶片的上表面加上适量的含有 0.1 g/L 蛋白质 V8 (646 U/mg) 的 THSG, 蛋白酶与底物的质量比约为 1:100. 在 28 mA 稳流电泳, 当溴酚蓝指示剂进入浓缩胶中部时, 停止电泳 5 min, 然后在 28 mA 稳流电泳至结束.

1.5 蛋白质的半干印迹

依照 Matsudaira^[1] 的方法. 用 Applied Biosystem Model 477A 蛋白质序列分析仪分析氨基酸序列.

2 结果与讨论

在研究枯草杆菌对环境胁迫的反应时, 我们发现一个受二硫键还原剂 (如巯基乙醇和二硫苏糖醇) 诱导的细胞质蛋白质, 该蛋白质的分子质量约是 50 ku, 简称 p50. 为了研究它的分子特性, 将细胞质蛋白质经羟基磷灰石柱层析, 得到两个洗脱峰, 大部分杂蛋白质在第一个洗脱峰, 而 p50 和小部分杂蛋白质在第二个洗脱峰 (图 1). 第二个洗脱峰中的蛋白质经 SDS-PAGE 分离后, 电印迹至 PVDF 膜上, 切下 p50 直接用蛋白质序列分析仪测定氨基酸序列. 但是在本实验中, 即使用较大的量的 p50, 也没有成功地测定出它的 N 端氨基酸序列. 这暗示 p50 的 N 端氨基酸被化学修饰了.

为了分析 p50 的氨基酸序列, 我们建立了一个用有限酶切获得多肽片段的方法 (简称有限酶切法), 即通过控制蛋白酶的用量和酶切时间, 使蛋白质仅在若干个酶切位点被降解, 以便获得可以用 SDS-PAGE 分离、适于序列分析的多肽片段. p50 经蛋白酶 V8 有限酶切后, 产生 4 个主要的多肽片段 (图 2). 我们

分析了片段 II 的 N 端氨基酸序列，同源性检索发现该片段与蛋白质合成的伸长因子 Tu (EF-Tu) 有 92.6% 的同源性 (图 3)。

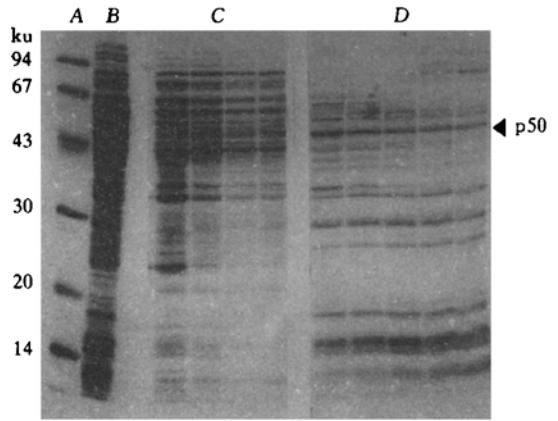


图 1 经羟基磷灰石柱层析后蛋白质的 SDS PAGE 图谱
A: 蛋白质分子质量标准; B: 细胞质蛋白质混合物;
C: 洗脱峰 I; D: 洗脱峰 II. 箭头示 p50.

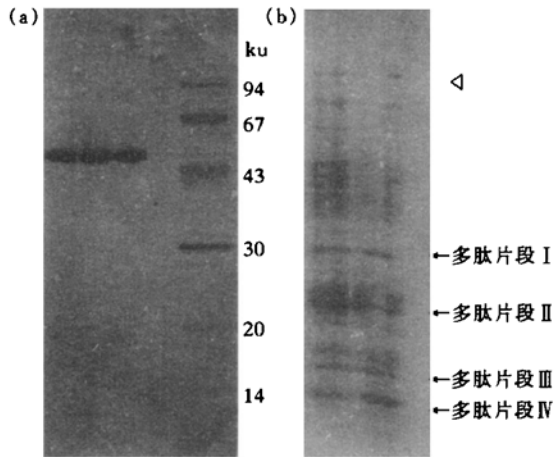


图 2 用蛋白酶 V8 有限酶切后 p50 的多肽图谱
(a) 未经酶切的 p50; (b) 酶切后的肽谱, 空心箭头示 p50 的原始位置.

	10
多肽片段 II	HG LQ EEN K K T T V G
	X : : : : : : : : X
EF-Tu	Q V K V G D E V E H G L Q E E N K K T T V T G V E M F R K L L D Y A
	240 250 260 270

图 3 片段 II 的 N 端氨基酸序列和同源性比较

从以上结果看出，有限酶切法特别适用于分析 N 端被修饰蛋白质的氨基酸序列。这类蛋白质经有限酶切后，产生一套多肽片段。通

过分析多肽片段的序列，即可了解蛋白质的序列信息和进行同源性检索、寡核苷酸探针的合成等下游工作。

有限酶切法也能广泛适用于分析一般蛋白质的序列。用此方法降解一般蛋白质能获得一套多肽片段。在分析每个多肽片段序列的基础上，不但可以预测蛋白质的结构或功能区域，而且也可以依据多肽片段的序列合成一套寡核苷酸探针，保证基因克隆的准确性。

有限酶切法包括如下程序：a. 用 SDS-PAGE 或双向电泳分离蛋白质，切取所需要的蛋白质带或点；b. 将蛋白质带或点放入另一个胶的样品槽内，在电泳过程中进行酶切；c. 将多肽片段电印迹至 PVDF 膜上，最后测定氨基酸序列。其优点是：a. 蛋白质的分离采用易于操作、灵敏度高的 SDS-PAGE 或双向电泳，不需要复杂的纯化程序；b. 酶切是在电泳过程中完成的，不需要额外的酶切反应；c. 不需要贵重仪器如 HPLC；d. 节省时间，在一个工作日可以得到多肽片段。

使用有限酶切法应注意调整蛋白质底物与蛋白酶的比率以及在凝胶中的酶切时间和电泳速度。由于一种特定的蛋白酶在不同蛋白质中的切点数目是不同的，因此在具体实验中通过调节以上三个因素可以得到理想的结果。

参 考 文 献

1 Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem, 1987, 262: 10035~ 10038

2 Aebersold R H, Leavitt J, Saavedra R A *et al.* Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after *in situ* protease digestion on nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 6970~ 6974

3 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~ 685

Internal Amino Acid Sequence Analysis of Proteins After Limited Proteolytic Cleavage.
WANG Tai (Institute of Botany, Chinese

Academy of Sciences, Beijing 100093, China); Hiroshi Kadokura, Koji Yoda, Makari Yamasaki (Department of Biotechnology, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan).

Abstract A procedure was used to obtain peptide fragments for sequence analysis from proteins separated by gel electrophoresis. After separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), proteins were briefly stained with Coomassie blue, interested protein-containing bands were cut and loaded onto the wells of a new SDS-PAGE gel. The protein was digested by protease V8 during electrophoresis,

the resulting peptide fragments were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane, and then sequenced with protein sequencer. The method can be used not only to obtain amino acid sequences from N-terminal blocked proteins, but also to produce multiple and independent amino acid sequence information from normal proteins.

Key words limited proteolytic cleavage, N-terminal blocked proteins, SDS-PAGE, electroblotting, peptide fragment, amino acid sequences

重组组织型纤溶酶原激活剂的纯化和鉴定

吴本传 陈昭烈 刘 红 叶建新

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 介绍一种简便高效的两步纯化重组组织型纤溶酶原激活剂 (rt-PA) 的方法, 产 rt-PA 的 CHO 工程细胞 SGG 培养上清, 经微孔玻璃珠 (MPG) 吸附和赖氨酸-Sepharose 4B 柱亲和吸附色谱纯化, 纯化倍数平均达到 380 倍, 比活性为 390 000 U/mg 蛋白, rt-PA 活性回收率达到 140%, 经 SDS-PAGE 还原电泳分析主要为 t-PA 蛋白, 其中高分子 t-PA 占 80% 左右. 用纤维蛋白自显影法检测均有溶纤活性, 蛋白质印迹证实具有 t-PA 的抗原性.

关键词 组织型纤溶酶原激活剂, 微孔玻璃珠, 赖氨酸-Sepharose 4B

目前临床使用的溶血栓药物一类为非特异的如链激酶、尿激酶等, 另一类为特异性的如 t-PA 等. 前一类对纤维蛋白结合的纤溶酶原和循环系统中的纤溶酶原都有活化作用, 因而在临床使用时常有出血现象, 而后一类选择性作用于血栓部位的纤维蛋白, 很少有这样的副作用, 而且体内溶血栓效果也比前者的好^[1]. 因此, 自 80 年代初开始 rt-PA 的研究工作以来, rt-PA 的研究工作进展很快, 并有 rt-PA 产品进入临床应用. 在已报道的 t-PA 纯化文献中多采用抗 t-PA 抗体亲和色谱、离子交换

色谱和凝胶色谱^[2,3]. 我们采用国产 MPG 和赖氨酸-Sepharose 4B 两步亲和和色谱法纯化 rt-PA, 获得了较为满意的效果.

1 材料与方法

1.1 材料

CHO 工程细胞 SGG 由本所三室构建, 培养基采用 DMEM: F12 (1: 1), 培养基中加入 1% 小牛血清, SGG 细胞持续表达 rt-PA 分泌在细胞培养上清中, 每天收集培养上清作为粗