

结 合 珠 蛋 白

厉 朝 龙

(浙江医科大学生生化教研组)

结合珠蛋白 (Haptoglobin, Hp) 为 α_2 球蛋白组分中的一种糖蛋白, 与血红蛋白 (Hb) 具有高度亲和力。它的主要生理功能是与 Hb 结合, 形成 Hp-Hb 复合物, 以利血红蛋白中铁离子的固定。Hp 广泛存在于人类和许多哺乳类动物的血清和其它体液中。四十多年前 Polonovski 和 Jayle 首次发现 Hp, 六十年代以后, Hp 引起了人们浓厚的兴趣, 对它的分子结构、理化性质、遗传学、代谢、比较生化以及生理和病理意义等方面, 进行了广泛而深入的研究。Smithies (1955) 最先用淀粉凝胶电泳发现人类 Hp 有三种主要的表现型, 即 Hp 1-1、Hp 2-2 及 Hp 2-1。后来人们用还原和烷基化的方法, 将 Hp 裂解, 进一步发现 Hp 分子是由两条 α -链和两条 β -链所组成的四聚体。其中 Hp α 链有两种, hp α^1 和 hp α^2 ; hp α^1 又有两种亚型, hp α^{1F} 和 hp α^{1S} 。三种表现型所呈现的特征性电泳图象是由于 Hp α 链的不同造成的。由于 Hp 存在着普遍的分子变异, 因此通常所称的结合珠蛋白, 并非专指一种分子, 而是泛指具有相同生物活性和类似分子结构的一组蛋白质。

一、Hp 的特性

1. 理化性质和分子结构 Hp 在 pH 8.6, 离子强度 0.1 M 缓冲液中电泳的迁移率为 4.5 Tiselius 单位, 等电点为 pH 4.1。在浓度为 2 M 硫酸铵溶液中被沉淀析出, 其中 Hp 1-1 的溶解度比 Hp 2-2 略大, 前者被沉淀的硫酸铵浓度为 2.0—2.4 M, 后者为 1.8—2.2 M。

从物理化学性质看, 三种 Hp 表现型只有 Hp 1-1 是均一的蛋白质, 在淀粉凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 呈现单一区带; 在分析超离心中也呈现单一而对称的峰, Hp 2-2 的沉淀峰则不对称, Hp 2-1 至少看到有三种超离心组分。

Hp 2-2 由一系列不同聚合程度的多聚体组成, 在淀粉凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现的蛋白质区带有十二条之多。这些不同迁移率的电泳区带, 可看作不同聚合程度的 Hp 多聚体系列。组成多聚体的 α -链和 β -链的数目, 即依次递增的多聚体之间, 究竟是增加一条 β -链或半个分子 (即 $\alpha\beta$) 还是单个分子, 各家观点不完全一致。Fuller^[1] 在聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离系列中, 分出六个彼此独立的 Hp 2-2 多聚体, 通过对它们的氨基酸组成和末端氨基定量分析, 证明每一个多聚体均由 α^2 -链和 β -链以 1:1 比例组成。进一步用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和超离心分析测定, 发现前一个多聚体与后一个多聚体的分子量平均递增 54,500, 该值相当于一个 α^2 -链 (M.W. = 17300) 与一个 β -链 (M.W. = 40,000) 分子量之和的近似值。由此说明多聚体之间彼此相差一条 α^2 -链和一条 β -链, 或相差半个 Hp 分子 $\alpha_2\beta$ 。根据这一结果, 推测被分离的六个 Hp 2-2 多聚体的亚基递增数应为 $\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_2, \dots, \alpha_6\beta_6$, 这些多聚体理论上的分子量依次在 171,000 至 456,000 之间。

Hp 2-1 的分子模式与 Hp 2-2 不同, 电泳图象虽与 Hp 2-2 相似, 但各区带的迁移率不同。Hp 2-1 是由 α^1 -链和 α^2 -链与 β -链组合而成的多聚体。

三种 Hp 表现型的分子模式若以分子链式表示, Hp 1-1 是 $(\alpha^1\beta)_2$, Hp 2-2 是 $(\alpha^2\beta)_n$ (n 代表依次递增的数), Hp 2-1 是 $(\alpha^1\beta)_m \cdot (\alpha^2\beta)_n$ 的杂交多聚体。

关于 Hp 的分子量, 根据沉降扩散和与 Hb 结合量推算, Hp 1-1 约为 100,000。据氨基酸顺序及单条链的分子量测定结果, Hp 1-1 分子量为 $98,770 \pm 2,270$, 接近 100,000。通过氨基酸

顺序测定材料计算所得 α^{15} 的分子量为 9,304, 超离心测定所得 β -链的分子量为 42,582, 由此算出 Hp 四聚体的分子量为 103,772。Hp 2-2 多聚体的平均分子量约为 400,000, Hp 2-1 为 220,000。这些资料与淀粉凝胶电泳中的图象特征一致。

由于各种多聚体分子量不同, 它们各有不同的阻滞作用, 于是造成淀粉凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳中不同的迁移率。如果在 pH 8.6 的无界面电泳 (该电泳中迁移率与分子量无关), Hp 1-1 的移动只比 Hp 2-2 略为快一点。各型 Hp 的等电点比较接近, Hp 1-1 为 pH 4.2—4.25, Hp 2-2 为 pH 4.1—4.2。

Hp 分子结构目前了解较少。Hp 1-1 虽已被纯化结晶, 但详细的 X 线衍射研究尚未见报道。在 pH 5.5 条件下的旋光色散研究发现, Hp 1-1 和 Hp 2-2 的二级结构主要的既不是 α -螺旋, 也不是随机缠绕。由 200—240 nm 圆二色性光谱分析推断, 也证明三种 Hp 型中螺旋结构极少, 但存在 β -结构。Hp 1-1 结构与 Hp 2-2 有明显区别, 前者结构比较松散, 而后者比较紧密; Hp 2-1 与 Hp 2-2 类似。

Hp 分子的特定结构与其生物活性密切相关。Wanda^[2] 提出, 人 Hp 2-1 经化学修饰和加热 (至 54—58°C), 蛋白质中螺旋含量降低, 同时伴有过氧化物酶活性及抗原-抗体反应性改变。Bernini (1970) 证明, 人 Hp 在还原裂解后可重行组合。他们在 8 M 尿素或 6 M 胍中, 用巯基乙醇还原 Hp 1-1 和 Hp 2-2, 结果每分子 Hp 1-1 游离出 SH 基 18 个, 每分子 Hp 2-2 游离出 24 个, 如果去除变性剂再氧化, 则使天然蛋白质的化学和免疫学性质恢复。在最适条件下, 活性可恢复 60% 至 90%。Hp 亚基的组合具有惊人的精确性。

2. Hp-Hb 复合物 Hp 与 Hb 结合形成 Hp-Hb 复合物, 是 Hp 特征性的物理化学和生理学性能。研究证明, Hp 与 Hb 之间的结合完全是化学计量上的关系, 即一克分子 Hp 与一克分子 Hb 发生反应, 该反应基本上是不可逆的。Hp 与血红素或肌红蛋白没有结合能力,

但与珠蛋白却有高度的亲和力, 说明 Hb 中的血红素对 Hp-Hb 复合物形成关系不大。Hp 与 Hb 的结合没有种属特异性, 人 Hp 除能与人胎儿 Hb 及某些异常 Hb 结合外, 尚能同各种动物的 Hb 结合, 但种系关系较远的动物的 Hb, 如蛙和鲤鱼 Hb、与 Hp 的亲和力要比哺乳动物的弱得多。

Hp 结合 Hb 的部位是在 Hb 的 α -链上, 而且这种结合是在 Hb ($\alpha\beta$) 二聚体的基础上进行的。在中性反应条件下, Hp 与 Hb 半分子 ($\alpha\beta$) 间的作用要比同完整 Hb 分子中的两个半分子间的作用强得多。因此, 可以说每一个被 Hb 完全饱和的 Hp 1-1 分子结合有两个 Hb 半分子。已报道确有一种 $\text{Hp} \cdot \frac{1}{2} \text{Hb}$ 形式的中间

复合物存在。近年发现^[3], 游离的 Hb 亚基也具有与 Hp 结合的能力, 其中 Hb β -链与 Hp 的亲和力几乎与 Hb α -链相等。

人 Hp 与 Hb 反应动力学研究证明, Hb 四聚体解聚成 ($\alpha\beta$) 二聚体, 是与 Hp 结合的先决条件。Hp 分子上可能存在四个结合位置, 每个 Hb ($\alpha\beta$) 二聚体各占有两个, 两对结合位置间彼此互不影响。Nagel^[4] 以下式表示 Hp 与 Hb ($\alpha\beta$) 二聚体间的反应: $\frac{1}{2} \text{Hp} + \alpha\beta \rightarrow \frac{1}{2} \text{Hp} \cdot \alpha\beta$,

反应速度常数为 $5.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 。他认为, 在 Hp 分子的 α -链专一的位置上结合一个 ($\alpha\beta$) 二聚体后, 结果在其附近因变构作用形成另一个 β -结合位置。

Hp-Hb 复合物具有很大的稳定性, 其原因一方面是彼此间有静电键和疏水键的维系, 但更重要的可能是 Hp 与 Hb 两对多肽链结构上具有某种互补性。Hp 分子上的游离氨基在 Hp 与 Hb 结合中起重要作用, 如果以三硝基苯封闭 Hp 的氨基, 就大大地减弱了结合 Hb 的能力。有人将大 Hp 分子中反应活性较强的酪氨酸残基或色氨酸残基乙酰化后, 结果发现该 Hp 虽仍具有与 Hb 反应的能力, 但由此所生成的 Hp-Hb 复合物却失去了过氧化物酶的活性。如果把人 Hp 中酪氨酸残基硝基化, 则使其结合 Hb

的能力丧失。Chiao^[5] 认为, Hp 分子中的酪氨酸残基是唯一结合 Hb 的配体。

Hb一旦与 Hp 形成 Hp-Hb 复合物,其性质随即发生改变。由于重组,使 Hp-Hb 复合物对氧的亲合力大大提高,而 Bohr 效应却消失了。这可能是由于形成 Hp-Hb 复合物导致 Hb β -链C-端(β -146)组氨酸不可逆的固定(fixation),进而影响 Hb 分子构象所造成的。Waks^[6] 研究了原血红蛋白结合 Hp 1-1 后所引起的结构变化,发现游离的去血红素珠蛋白链(α^0 及 β^0)本身不能相互结合形成原血红蛋白,但在 Hp 参与下,即能形成一种稳定的复合物,该复合物包括一分子 Hp 和两条 α^0 -链和两条 β^0 -链。他认为,由于 Hp 与原血红蛋白间的相互作用,使其不能再改变珠蛋白的分子结构,从而阻碍了加入血红素后引起的天然结构的复原。

Hp 与 Hb 形成复合物后,能使 Hb 过氧化物酶活性大大提高,这究竟与结构有何关系呢?一般认为这与血红素的氧化状态无关,也与 Hp 的糖基掺入无关。但是,如果封闭 Hp 的氨基,则酶活性减弱,在结合 Hb 前全部封闭 Hp 上活泼的酪氨酸残基或色氨酸残基,酶活性就完全消失。由此认为,在 Hp-Hb 复合物形成过程中,至少 Hp 分子的一半被整合入复合物的结构中,才有可能提高复合物的过氧化物酶活性。

3. Hp 及 Hp-Hb 复合物的免疫学性质 人类 Hp 可使非灵长类动物如家兔产生高效价的特异性抗血清,这是运用免疫学方法对 Hp 进行定性和定量检测的基础。不同 Hp 表现型存在抗原性差异。在免疫扩散中发现, Hp 2-2 与 Hp 1-1 对高效价的 Hp 2-2 抗血清有部分交叉反应。游离的 Hp 多肽链 $hp\alpha^1$ 和 $hp\beta$ 具有专一性相同的抗原决定簇。现知一些人 Hp 抗原决定簇的数目: Hp 2-1 有八个, Hp 1-1 有七个。其中有的位于 $hp\alpha$ -链上,有的位于 $hp\beta$ -链上。异型 Hp 如 Bellevue 和 Marburg 还具有少数特殊的抗原决定簇。Hp 1-1 型中的 (1F-1F) 与 (1S-1S) 亚型,用一般方法不能区别,但由于 $hp\alpha^{1F}$ 与 $hp\alpha^{1S}$ 链上有一个氨基酸残基不同,即 54 α 上, α^{1F} 是赖氨酸,而 α^{1S} 是谷

氨酸,故用免疫化学方法能容易地鉴别开来。与 Hp 多聚体结构有关的抗原决定簇,除人类外,其它所有灵长类动物均不存在。非人灵长类动物随着进化上接近人类,它们与人相同的决定簇数目逐渐减少,但位于 Hb 结合部位附近的决定簇仍保留着。形成 Hp-Hb 复合物后,天然 Hp 的许多抗原决定簇被 Hb 封闭。实验证明,最大限度封闭一克分子 Hp 1-1 的抗原决定簇需要一克分子 Hb。Hp 抗血清具有型别特异性,并不会因结合 Hb 而改变。形成 Hp-Hb 的复合物虽不会改变 Hb 抗原决定簇的性质,但能有效地诱导抗 Hb 抗体的生成。Hb 分子上结合 Hp 的部位与结合抗体的部位无关。

二、Hp 的分子结构

1. Hp 的化学组成与亚基结构 各家对 Hp 氨基酸组成的分析,结果颇为一致(表 1)。

表 1 所示, α -链中二羧基氨基酸含量很

表 1 每克分子人 Hp1-1 和 α -及 β -链氨基酸组成的克分子数

氨基酸	α^{1S}	α^{1F}	α^2	β	Hp1-1
赖氨酸	8	9	15	22	64
组氨酸	2	2	4	10	23
精氨酸	2	2	4	5	14
天门冬氨酸	15	15	23	28	83
苏氨酸	3	3	5	19	44
丝氨酸	2	2	3	15	40
谷氨酸	9	8	16	29	75
脯氨酸	7	7	11	13	43
甘氨酸	7	7	12	20	51
丙氨酸	5	5	8	21	50
半胱氨酸	4	4	7	6	20
缬氨酸	8	8	12	27	63
甲硫氨酸	0	0	0	4	8
异亮氨酸	3	3	5	13	30
亮氨酸	3	3	6	23	53
酪氨酸	5	5	10	12	34
苯丙氨酸	0	0	0	8	16
色氨酸	1	1	2	5	14
合计	84	84	143	280	725
2 α + 2 β					725
分子量	9300	9300	17300	42580	104000

高,带羟基氨基酸和亮氨酸很低,没有甲硫氨酸和苯丙氨酸。 β -链中含有甲硫氨酸和苯丙氨酸,

带羟基氨基酸和亮氨酸含量丰富，二羧基氨基酸含量一般。可见 α -和 β -链在氨基酸组成上具有某种互补性。从表 1 还可看出， β -链的长度几乎为 α^2 -链的两倍，为 α^1 -链的四倍。Hp1-1 的氨基酸数减去两条 β -链的氨基酸数，大约等于两条 α^1 -链的氨基酸数。

Hp 分子中含有糖，人 Hp 的含糖量如以每克分子 Hp 所含糖的克分子数表示，己糖 43，乙酰氨基己糖 24，涎酸 17，岩藻糖 1。犬 Hp 含糖量分析结果如下：己糖 28，氨基己糖 27—28，涎酸 13，岩藻糖 1。人和犬 Hp 中半乳糖与甘露糖的比值近 2:1。

Hp 分子如同免疫球蛋白一样，是一种由四条多肽链结合而成的四链结构；其中两条小肽称 α 链，两条大肽称 β 链，分别以 $hp\alpha$ 和 $hp\beta$ 表示。 $hp\alpha$ 与 $hp\beta$ 通过二硫键相连。

图 1 所示，两条 α^1 -链位于组合图的内侧，

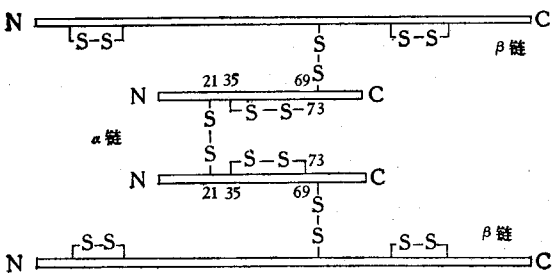


图 1 人 Hp 1-1 分子亚基组合结构模式

Hp 型别	纯化 Hp 淀粉凝胶电泳图象	Hp 亚型	Hp α -链尿素-巯基乙醇淀粉凝胶电泳图象
Hp1-1		hp1S-1S	
		hp1S-1F	
		hp1F-1F	
Hp2-1		hp2-1S	
		hp2-1F	
Hp2-1 (mod)		hp2M-1S	
		hp2M-1F	
		hp2J-1S	
Hp2-1 (Johnson)		(hp2J-1F)	
		hp2-2	
Hp2-2		hp2-2M	

图 2 Hp 及 Hp 亚型淀粉凝胶电泳图象

两条 β -链位于外侧， α - β 间以及 α - α 间以二硫键相连。 α^1 -链含有四个半胱氨酸，其中 Cys-35 与 Cys-69 形成链内二硫键，Cys-21 与另一 α -链的 Cys-21 形成链间二硫键，Cys-73 与 β -链形成 α - β 间二硫键。 β -链所含的半胱氨酸数目，已确定有五个，其中 Cys-168 与 Cys-182 形成链内二硫键，Cys-122 与 α -链 Cys-73 形成 α - β 间二硫键，另二个半胱氨酸形成链内二硫键，但所处位置尚不能最后确定。Alexander^[7]指出，不同动物 Hp 二硫键的数目不同，如犬 Hp 1-1 分子，虽也有 $\alpha_2\beta_2$ 的亚基组合，但连接两个 α -链间的 Cys-21-Cys-21 二硫键没有找到。

电泳分析证明，三种 Hp 表现型可分成六种亚型。在 8 M 尿素存在下，用巯基乙醇将天然 Hp 分子还原裂解，经酸性-尿素淀粉凝胶电泳分离，出现两种 Hp 多肽链，即 α -链和 β -链。进一步将 α -链作尿素淀粉凝胶电泳，获得的电泳图象计有六种，即 hp1S-1S、hp1F-1F、hp1S-1F、hp2-1S、hp2-1F 和 hp2-2（见图 2）。 β -链虽经种种方法鉴定，只有一种。根据以上材料就可清楚地表示出六种亚型的亚基组合方式： $(hp\alpha^{1S} \cdot hp\beta)_2$ 、 $(hp\alpha^{1F} \cdot hp\beta)_2$ 、 $hp\alpha^{1S-1F} \cdot hp\beta_2$ 、 $hp\alpha^{2-1S} \cdot hp\beta_2$ 、 $hp\alpha^{2-1F} \cdot hp\beta_2$ 及 $(hp\alpha^2 \cdot hp\beta)_2$ 。六种亚型中的 β -链均相同，仅仅 α -链有差别。由于 β -链在酸性-尿素淀粉凝胶电泳中基本不移动或移动很慢，因此还原裂解后的 Hp 在电泳中的图象实际上就代表 α -链的特征。例如，Hp 1-1 型可呈现单一快速移动带 ($hp\alpha^{1F}$) 或单一慢速移动带 ($hp\alpha^{1S}$) 或者两者兼有 ($hp\alpha^{1F-1S}$)，它们分别相当于 Hp 1-1 的三个亚型——Hp^{1F-1F}、Hp^{1S-1S} 及 Hp^{1F-1S}。Hp 2-1 型呈现移动更慢的 $hp\alpha^2$ 区带和 $hp\alpha^{1S}$ 或 $hp\alpha^{1F}$ 带，没有 $hp\alpha^{1S}$ 和 $hp\alpha^{1F}$ 带兼备的图象，它们分别相当于 Hp 2-1 的两个亚型——Hp 2-1F 和 Hp 2-1s。Hp 2-2 型仅有 $hp\alpha^2$ 区带。

三种 α -链 (hp^{1F} 、 hp^{1S} 、 hp^2) 是三个等位基因(以 Hp^{1F}、Hp^{1S}、Hp² 表示)的表达产物，六种亚型实际上就是该三个等位基因联合表达的产物。

2. α -链的一级结构 人 Hp 分子的多态

α^{1F}	1	5				10				15						
	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Asp	Ile	Ala	Asp	Asp	Gly	
21 α -21 α 链间二硫键	16	Gln	Pro	pro	pro	Lys	Cys	Ile	Ala	His	Gly	Tyr	Val	Glu	His	Ser
	31	Val	Arg	Tyr	Gln	Cys	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Gly
	46	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Lys	Lys	Gln	Trp	Ile	Asn	Lys
	61	Ala	Val	Gly	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Cys	Glu	Ala	Val	Cys	Gly	Lys
	76	Pro	Lys	Asn	Pro	Ala	Asn	Pro	Val	Gln	与 β 链形成二硫键					
α^1	1	5				10				15						
	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Asp	Ile	Ala	Asp	Asp	Gly	
	16	Gln	Pro	pro	pro	Lys	Cys	Ile	Ala	His	Gly	Tyr	Val	Glu	His	Ser
	31	Val	Arg	Tyr	Gln	Cys	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Gly
	46	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Lys	Lys	Gln	Trp	Ile	Asn	Lys
	61	Ala	Val	Gly	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Cys	Glu	Ala	Asp	Asp	Gly	Gln
	76	Pro	pro	pro	Lys	Cys	Ile	Ala	His	Gly	Tyr	Val	Glu	His	Ser	Val
	91	Arg	Tyr	Gln	Cys	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr	Gln	Gly	Asp
	106	Gly	Val	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Glu	Lys	Gln	Trp	Ile	Asn	Lys	Ala
	121	Val	Gly	Asp	Lys	Leu	Pro	Glu	Cys	Glu	Ala	Val	Cys	Gly	Lys	Pro
	136	Lys	Asn	Pro	Ala	Asn	Pro	Val	Gln							

图3 人 Hpa^{1F} 和 α^2 氨基酸顺序

α^2 虚线处为 α^{1F} 前 71 与 α^{1S} 后 72 残基连接点;圈住的残基分别代表相当于 α^{1F} 54 位的赖氨酸和 α^{1S} 54 位的谷氨酸。

性是由 α -链的结构不同所造成的。 hpa^{1F} 和 hpa^{1S} 均由 84 个氨基酸组成,但在 hpa^{1F} 和 Hpa^{1S} 的肽图上有一个肽斑不相同,分别称为 F 和 S。经氨基酸顺序分析,进一步发现两种 hpa^1 链除 α^{1F} 54 位为赖氨酸和 α^{1S} 54 位为谷氨酸外,其它 83 个氨基酸残基顺序均相同。在 α^{1F} 和 α^{1S} 相应的 mRNA 上,也只有一个密码子的差异,即赖氨酸密码子 AA_6 变为谷氨酸密码子 GA_6 。两种 α^1 -链由于单个氨基酸残基的取代,导致酸性——尿素淀粉凝胶电泳中产生不同的迁移率。

hpa^2 - 与 hpa^1 -链有显著的区别。 hpa^2 -链由 143 个氨基酸残基组成,分子量 17,300,几乎为 α^1 -链的两倍。Smithies^[8] 最先指出, α^1 -链的全部或部分氨基酸顺序在 α^2 -链中被重复两次,这是由于带有 Hp^{1F} 和 Hp^{1S} 基因的染色体重组所造成的某一局部的内部重复。该假设后来被 hpa^2 -链的氨基酸顺序分析所证实(见图 3)。

如图 3 所示, hpa^2 -链是由 hpa^1 -链的前 71 个氨基酸残基和后 72 个残基相连接,组成一个具有 143 个残基的多肽链。因为这一原因, hpa^1 的 Asp-13 至 Ala-71 序列在 hpa^2 -链的 Asp-72 至 Ala-130 区段中被重复,重复的氨基酸残基

数有 57 个。 hpa^2 -链中的重复多肽片段,前一个片段在相当于 α^1 -链的 54 位上(亦即 α^2 -链的 54 位)是赖氨酸,说明该片段来源于 hpa^{1F} ,而后一重复片段相当于 α^1 -链的 54 位(即 α^2 -链顺序的 113 位)是谷氨酸,说明该片段来源于 hpa^{1S} 。 hpa^2 -链是迄今发现具有部分基因重复的第一个例子。通常认为,部分基因重复是蛋白质进化的一种重要机制。

3. β -链的一级结构与糖肽 三种 Hp 型的 β -链在酸性尿素淀粉凝胶电泳中的电泳行为以及抗原决定簇、肽图和氨基酸组成完全相同, β -链大约含有 310 个氨基酸残基,含有糖,分子量约为 40,000。

β -链的氨基酸顺序已有 2/3 被搞清。顺序分析的初步材料证实, $hp\beta$ -链与血清蛋白酶的糜蛋白酶系和免疫球蛋白重链有同源性,其中前者比后者更大。

β -链的一级结构与牛糜蛋白酶 A(BC-A) 和牛胰蛋白酶(BT)的同源性既可从 N-端 8 肽序列看出,也可在 N-端 30 个残基序列的有关部分看到。 $hp\beta$ -链, BC-A 及 BT 的 N-端 1 至 18 个残基序列如下:

$hp\beta$: Ile-Leu-Gly-Gly-His-Leu-Asp-Ala-Lys-
Gly-Ser-Phe-Pro-Trp-Gln-Ala-Lys-Met

BC-A: Ile-Val-Asn-Gly-Gln-Gln-Ala-Val-Pro-
Gly-Ser-Trp-Pro-Trp-Gln-Val-Ser-Leu
BT: Ile-Val-Gly-Gly-Tyr-Thr-Cys-Gly-Ala-
Asn-Thr-Val-Pro-Tyr-Gln-Val-Ser-Leu

hp β -链 C-端 9 肽序列与同种的蛋白水解酶也有明显的同源性,但与免疫球蛋白 μ -、 γ -或 α -重链 C-端 9 肽没有任何相似性。Kurosky^[9] 提出一个包含有 170 个残基的 β -链片段,将它的残基同蛋白酶作了类似的排列。结果约有 30% 的残基顺序与五种蛋白酶中任何一种的顺序都相同,这五种蛋白酶是:猪弹性蛋白酶、牛糜蛋白酶 A 和 B、胰蛋白酶以及凝血酶 B 链。 β -链顺序与这些酶的如此明显的同源性,究竟有什么生理意义,恐怕在 hp β -链全部序列搞清前是不能完全清楚的。Barnett^[10] 指出,根据一级结构的相似性,可以设想 Hp α -及 β -链的结构基因分别是与免疫球蛋白和血清蛋白酶同一原始基因衍生出来的。

关于 β -链一级结构中二硫键的种类和位置仅了解一部分。考虑到三种 Hp 型中 Hp 2-1 和 Hp 2-2 是多聚体,可以推测,在 hp α^2 上有 1—3 个位于分子外部的半胱氨酸参与多聚体的交联中。

人 Hp 含糖约 20%,其中包括半乳糖 (5.3%)、甘露糖 (2.5%)、氨基己糖和涎酸合 5.3%。如果用神经氨酸苷酶将游离的 Hp 及 Hp-Hb 上的涎酸水解掉 70%,过氧化物酶活性并不消失。说明涎酸与过氧化物酶活性无关。

Hp 所含的糖全部位于 β -链上,各型 Hp 所含的糖没有质的差别。

有人从人 Hp 的链霉蛋白酶水解液中分离出两种糖肽。其中之一,含天冬氨酸较多,如以

天冬氨酸含量作基础,换算得该糖肽的分子量约为 3,000 (2,750—3,050)。两种糖肽中含糖量近似,即己糖(包括半乳糖和甘露糖) 5—6 克分子、N-乙酰葡萄糖胺 3—4 克分子、涎酸 0—3 克分子。有少数糖肽含有岩藻糖。假定 Hp 分子量为 100,000,估计在人 Hp 2-1 中含有七个寡糖单位。

糖肽在 Hp 中的功能是什么? 在 Hp 不均一性上起什么作用? 一般认为,糖肽是按其分子量比例分布在三种 Hp 型中的,这就不可能是造成 Hp 不均一性的原因。但是寡糖生物合成不完全或被神经氨酸苷酶降解后,可使 Hp 电泳迁移率改变。关于寡糖在多肽链上的位置,尚需进一步研究,不过已经知道人和狗的 hp β -链 N-端 Asn-23 都含有一个寡糖,而在大鼠 hp β -链的同一部位则没有。

三、Hp 遗传变异

1. α -链突变和基因重复 遗传性变异所引起的 Hp 突变,最常见于 α -链。目前所知,突变有三种类型: (1) 单一突变,由于 α -链 54 位谷氨酸-赖氨酸的替代,结果变异成 α^{1S} (54 位为谷氨酸)和 α^{1F} (54 位为赖氨酸), (2) 染色体重组导致部分基因重复,这就是 α^{1F} 和 α^{1S} 部分列在 α^2 中重复的原因, (3) α -链和 β -链合成的控制作用的改变,这与地中海贫血型血红蛋白相类似,结果使 Hp 生物合成减少。

染色体重组所引起的 Hp 突变,即 hp α^1 -链的前 71 个残基与后 72 个残基连接,形成具有 143 个残基的 hp α^2 -链,这一事实已被氨基酸序列分析所证明。如何解释这一现象, hp α^2 是 Hp 2 等位基因的表达产物, Hp 2 基因是一种突

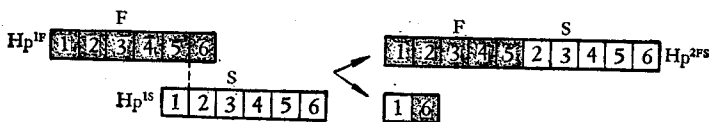


图 4 Hp 2FS 等位基因形成的方式

左: Hp 1F 与 Hp 1S 不同区间的非同源重组; 右: 形成两种新等位基因,其一为 Hp 2FS , 几乎有两倍长,另一为缺失基因。数字代表 Hp 基因亚单位 (DNA 的一个片断) 的顺序,其中“3”表示 Hp 1F 和 Hp 1S 基因中单个碱基替代部位。

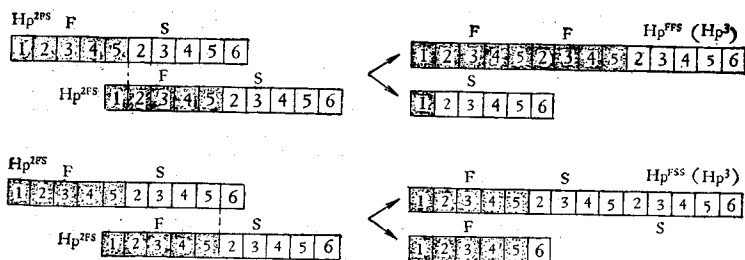


图5 Hp^3 等位基因形成的方式

通过几乎有2倍 Hp^1 基因长度的两个 $\text{Hp}^{2\text{FS}}$ 等位基因之间的不等交换,产生一个几乎有三倍 Hp^1 基因长度的等位基因—— Hp^{FSS} 或 Hp^{SSS} , 同时产生一个 Hp^1 单位长度的等位基因。

变型等位基因,可能是通过不等交换形成的。一个单位长度的 $\text{Hp}^{1\text{F}}$ 基因同它的同源染色体内的等位基因 $\text{Hp}^{1\text{S}}$ 进行交换,但未在同源点上交换。其结果就是 $\text{Hp}^{1\text{F}}$ 和 $\text{Hp}^{1\text{S}}$ 等位基因一前一后的部分重复,从而形成 Hp^2 (即 $\text{Hp}^{2\text{FS}}$) 等位基因,其长度几乎为 Hp^1 等位基因的两倍(图4)。

在以后的世代中就会产生 Hp^2 基因纯合子个体,在这些人的减数分裂细胞中,两个 Hp^2 等位基因有两种不同方式配对的倾向,或者“对等地”配对,一个染色体中的重复基因在左半个同另一个的左半个配对,而两个右半个也同样地互相配对,或者“非对等地”配对,于是一个染色体中的基因的左半个同另一个中的基因的右半个配对。两种配对类型都是在同源段之间进行,但在第一种情况下配对节段以内的交换将产生不变的等位基因,而在第二种情况下则会产生一个几乎有三倍长的基因,即部分基因有三次重复,和一个单份长度的倒位等位基因。罕见的表现型 Hp Johnson (Hp 2J-1s) 就是这种具

有三倍长度的 Hp 等位基因的表达产物,这种等位基因称 Hp^1 或称 Hp^3 (图5)。

关于 Hp^2 等位基因形成过程中所产生的缺失基因的表达产物,现还未发现。可以设想,如果确有这种多肽链产物的生成,它仅含有25个氨基酸残基,即 α^1 -链的前12个和后13个,其中只有一个半胱氨酸残基,无法形成一个具有共价四链结构的单位。

除 Hp Johnson 变种外,还发现了一些其它罕见的 Hp 表现型,它们都有结构上的变化。这些 Hp 变种与 Hb 的复合物在 pH 8.6 淀粉凝胶电泳中的图象如图6。

虽然突变大多数发生在 α -链,但少数也出现在 β -链,如 Hp Marburg (Hp2-1Mb 及 Hp1-1Mb)。这种 β -链变种与 Hb 形成复合物后并不封闭专一性抗原部位,而普通的 Hp 表现型的专一性抗原部位一旦与 Hb 结合,即被封闭。 HpMarburg 结构上的变异似乎不单是个别氨基酸的取代,如果将 $\text{Marburg } \beta$ -链 (hp^{Mb}) 与正常 $\text{hp}\beta$ -链用肽图法比较, hp^{Mb} 链上具有许多附加的可被胰蛋白酶水解的肽段。

2. 量突变 人血清 Hp 水平的变化除有关疾病的影响外,尚受许多遗传因素的影响,其中包括:(1) α^1 或 α^2 基因表达减弱所引起的量变,(2) 低 Hp 血症,(3) 无 Hp 血症。

据报道,最常见的 Hp 量变异的例子是 Hp 2-1 (mod) 或 Hp 2-1 M 表现型,这完全是 $\text{Hp } \alpha^1$ 和 $\text{Hp } \alpha^2$ 基因表达差异所造成,特别是 $\text{hp}\alpha^2$ -链生成严重缺陷。 Hp 2-1 (mod) 以四聚体和聚合程度较低的多聚体为主,在凝胶电泳

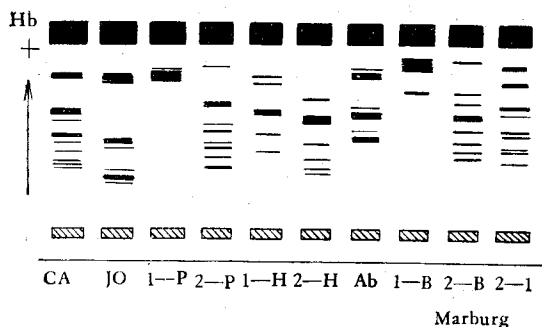


图6 各种罕见的人 Hp 表现型与 Hb 形成的复合物在淀粉凝胶中的电泳图象

中显示特有的图象， α^2 -链慢速移动的多聚体区带浓度降低， α^1 -链快速移动区带模糊不清。

影响 Hp α^1 基因产物的量变异十分少见，Hp 2-1 Carlberg 为其中一例。该型在常规淀粉凝胶电泳中的图象与 Hp 2-2 相似，比较象 Hp 2-2 和 Hp 2-1 的混合形态，同时出现 Hp 2-2 和 Hp 1-1 两种多聚体区带的特征。Giblett (1964) 对 Hp 2-1 Carlberg 用碱性尿素淀粉凝胶电泳作了亚型研究，提出在 Hp α 位点上有一个等位基因，能产生一个与 $hp\alpha^1$ -链无法区别的产物，仅仅生成量略少。

此外，还发现另外两种 Hp 量变种，即 Hp 2-1 (Trans) 和 Hp 2-1 (Haw)，它们都是 $hp\alpha^2$ 合成减少所造成的。其中 Hp 2-1 (Trans) 在电泳中的图像介于 Hp 2-1 与 Hp 2-1 (mod) 间的过渡形态，而 Hp 2-1 (Haw) 的图象介于 Hp 2-1 与 Hp 1-1 之间。

3. 遗传性缺陷及遗传控制 人血清 Hp 缺少可见于两种情况：一是在某些生理和病理条件下所引起的血 Hp 含量降低，例如出生三个月左右的新生儿，常见有无 Hp 血症，严重的肝脏疾病和血管内溶血也会发生血 Hp 降低，甚至消失。二是遗传性因素，因 Hp 不能合成或合成减少，从而导致低 Hp 血症或无 Hp 血症，这种人的 Hp 型称 Hp 0。Hp 0 是否为一种“潜在的等位基因”，即这种等位基因不能产生可识别的基因产物，也就是说它不可能产生一条能与 $hp\beta$ -链结合而形成 Hp 的多肽链，这有待进一步研究。用一般的蛋白质化学技术验证这问题是困难的，而无 Hp 血症和设想存在的 Hp⁰ 基因的频率很低，也造成验证困难。Pintera (1971) 估计，Hp⁰ 等位基因的频率只有 0.0005。因此想要找到具有这种基因的纯合子个体希望极少。

究竟无 Hp 血症是量上的问题还是质上的问题，不少作者提出了 Hp 合成的遗传控制问题。Gerald^[11] 提出，Hp α 基因可能存在于 D 组染色体上一个 Hp 位点上。Robson^[12] 认为，Hp 基因位于第 16 号染色体上的可能性为 0.97，Hp 位点与 ABO 及 Rh 血型或血清抗原标

志物之间没有联系。

四、生物合成和降解

Hp 生物合成的主要部位是肝脏。如用放射性氨基酸和半乳糖灌注离体大鼠肝，结果都掺入新合成的 Hp 中。在整体实验中，也同样证明 ^{14}C -Gly 掺入犬肝合成的 Hp。免疫荧光研究发现，特异性的荧光仅出现在肝小叶实质细胞和 Kupffer 细胞以及脾脏中少数类巨噬细胞中。由此说明，除肝外，其它一些网状内皮系统组织包括脾、淋巴结和胸腺也能合成 Hp。

有人曾给志愿者静脉注射血红蛋白溶液，结果在注射后 6—12 小时，血清 Hp 浓度降到零，5—7 天后仍未能恢复到正常水平。说明血清 Hp 大量消耗并不能刺激生物合成反应。在实验条件下，发现诱发性炎症，如注射松节油造成局部脓肿，则能刺激 Hp 的合成作用。

肝脏也是清除 Hp-Hb 复合物和分解 Hp 及 Hb 的主要部位。静脉注射 ^{14}C 标记的 Hp-Hb 复合物，大部分在肝 Kupffer 细胞中被代谢。在生理条件下，以 Hp-Hb 复合物形式被分解的占总 Hp 量的 $\frac{1}{2}$ ，游离 Hp 和结合的 Hp

在代谢速度上有明显不同。血浆 Hp 的半寿期各家意见不一，大致在 1.5—5 天之间。每天 Hp 合成量相当于血浆 Hp 总量的 30—50%。

Hp 对 Hb 的亲合力很高，血清 Hp 水平实际上受红细胞外的血红蛋白量控制的，当血循环中存在过量的 Hb 时，游离 Hb 大部分被网状内皮系统所摄取，约 10% 可由尿排出。而 Hp-Hb 复合物因结合力大，分子量较高，故不可能在尿中出现。可见 Hp 的作用是防止铁的过分丧失。除无 Hp 血症者外，Hb 肾阈不是主要取决于肾小管细胞对它的重吸收能力，而是决定于血 Hp 浓度。

五、结 语

结合珠蛋白作为一种血液中的遗传标志性质蛋白，存在着普遍的分子变异，在遗传学和人类学研究中的意义，已不容置疑。由于 Hp 具

有与 Hb 结合的特殊功能,并由此提高 Hb 的过氧化物酶活性,这就为生化分型鉴定和定量分析提供了有利条件。当前人们在研究 Hp 的分子结构、遗传变异和分子进化等问题的同时,正在继续探索 Hp 的生理功能和病理意义以及其它方面的实用价值。在法医学上的应用已引起不少人的兴趣。如只要采取微量血样或陈旧性血迹,通过分型鉴定,以判别父子关系的真伪,在国外已广为采用。我国对 Hp 的研究虽然比较缓慢,但在 Hp 的图型和亚型分布及血清 Hp 与某些疾病的关系等等方面,已进行了不少工作。从生化遗传学和医学的角度来看,探索 Hp 与人类遗传性缺陷的关系,应成为 Hp 研究的重要方面。

参 考 文 献

[1] Fuller, G. M. et al.: *Biochemistry*, 12, 253, 1973.

- [2] Wanda, D. et al.: *Stud. Biophys.*, 73, 117, 1978.
- [3] Kazim, A. L. et al.: *Biochem. J.*, 185, 285, 1980.
- [4] Nagel, R. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 246, 69, 1971.
- [5] Chiao, M. T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 263, 60, 1972.
- [6] Waks, M. et al.: *Biochemistry*, 13, 15, 1974.
- [7] Alexander, K. et al.: *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 62, 339, 1979.
- [8] Smithies, O. et al.: *Nature*, 196, 232, 19621.
- [9] Kurosky, A. et al.: *Biochem. Genet.*, 11, 279, 1974.
- [10] Barnett, D. R. et al.: *Biochemistry*, 11, 1189, 1972.
- [11] Gerald, P. S. et al.: *J. Pediat.*, 70, 172, 1967.
- [12] Robson, E. B et al.: *Nature*, 223, 1163, 1969.
- [13] 濑崎达雄:《临床血液》14, 495, 1973.
- [14] 浙江医科大学生化教研组:《第二次全国大肠癌科研会议交流资料》, 1980年,第78—83页。

[本文于 1981 年 4 月 18 日收到]

干扰素和干扰素基因工程研究动向

罗 明 典

(中国科学院微生物研究所)

干扰素 (Interferon, 简称 IFN) 指的是一种特异性的糖蛋白。这种糖蛋白是由一类诱导物诱导寄主细胞产生的。实际上这种糖蛋白诱导细胞合成另一种蛋白,这种新合成的蛋白叫翻译抑制蛋白 (TIP),只有这种翻译抑制蛋白才有干扰或抑制病毒繁殖的能力,它阻止病毒 mRNA 附着在核糖核蛋白体上,使病毒无法实现转译成蛋白,从而破坏了病毒整个复制周期。因此,IFN 是病毒的一种强有力的抑制剂,对寄主言,是一种无毒性作用的保护剂。

IFN 诱导物指的是:凡诱导产生干扰素的不论是有生命的如病毒等,或是无生命的物质如 poly I: C 等都称之为诱导物。前者系主要诱导物,由它产生的蛋白质是典型的 IFN,如白

细胞干扰素 (Le-IFN 或 d-IFN);后者是由微生物提取物或某些代谢产物诱导产生的干扰素如成纤维细胞干扰素 (F-IFN 或 β -IFN),其中以 poly I: C 最为有效,它亦具有广谱抗病毒作用,我国已有生产。真正起诱导作用的是核酸,而不是其他成分。除上面提到的两类干扰素外,还有一类来自 T-淋巴细胞的免疫干扰素 (Im-IFN 或 γ -IFN),它不仅抗病毒,而且抗癌细胞。不论哪一类诱导物产生的 IFN,都很快地从细胞中释放出来,一方面保护那些没有感染的细胞以抵抗病毒的攻击;另方面寄主细胞产生的 IFN (新蛋白)具有种属专一性,即尽管所有动物和人都可产生干扰素,但人体细胞产生的干扰素只对人起作用,鼠细胞产生的干扰素只对鼠细胞起作用,产干扰素的细胞与