

的生化和酶学检定、蛋白质和残余 DNA 相互结合的方式、更多的特异结构基因顺序在核基质中的检测等,将是未来几年的进一步研究方向。

参 考 文 献

- [1] Agutter, P. S., et al. *J. Cell Sci.*, **44**, 395, 1980.
[2] Berezney, R. et al. *Adv. Enz. Reg.*, **14**, 63, 1970.
[3] Comings, D. E., et al. *Exp. Cell Res.*, **103**, 341, 1976.
[4] Mitchelson, K. R., et al. *J. Cell Sci.*, **39**, 247, 1979.
[5] Hodge, L. D., et al. *J. Cell Biol.*, **72**, 194, 1977.
[6] Plagens, U. *Chromosoma*, **68**, 1, 1978.
[7] Adolph, K. W. et al. *Cell*, **12**, 805, 1977.
[8] Hadlaczky, G., et al. *Chromosoma*, **81**, 557, 1981.
[9] Keller, J. M., et al. *Science*, **193**, 399, 1976.
[10] Berezney, R. *J. Cell Biol.*, **85**, 641, 1980.
[11] Kaufmann, S. H., et al. *Exp. Cell Res.*, **132**, 105, 1981.
[12] Berezney, R., et al. *Exp. Cell Res.*, **132**, 1, 1981.
[13] Smith, H. C., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1541, 1980.
[14] Shi Chanpu. Dissertation, universität Heidelberg 1982.
[15] Gerace, L., et al. *Cell*, **19**, 277, 1980.
[16] Bekhor, I., et al. *Biochemistry*, **18**, 609, 1979.
[17] Allen, S. L., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 111, 1977.
[18] Higgins, L. L., et al. *J. Cell Biol.*, **79**, 132a, 1978.
[19] Werner, D., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 243, 1980.
[20] Gerace, L., et al. *J. Cell Biol.*, **79**, 546, 1978.
[21] Comings, D. E., et al. *J. Cell Sci.*, **34**, 233, 1978.
[22] Gates, D. M., et al. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1617, 1979.
[23] Robinson, S. I. et al. *Cell*, **28**, 99, 1982.
[24] Maundrell, K., et al. *Exp. Cell Res.*, **136**, 435, 1981.
[25] Ross, B. A., et al. *Biochemistry*, **21**, 764, 1982.
[26] Pardoll, D. M., et al. *Cell*, **19**, 527, 1980.
[27] Buongiorno-Nardelli, M., et al. *Nature*, **298**, 100, 1982.
[28] Biezunski, N. *Chromosoma*, **84**, 87, 1981.
[29] Millen, T. E., et al. *J. Cell Biol.*, **76**, 675, 1978.
[30] Herman, R., et al. *J. Cell Biol.*, **78**, 663, 1978.
[31] Ciejek, E. M., et al. *Biochemistry*, **21**, 4945, 1982.
[32] Comings, D. E., et al. *J. Cell Biol.*, **83**, 150a, 1979.
[33] Elgin, S. C. R. *Nature* **300**, 402.
[本文于1983年3月16日收到]

蛋 白 水 解 酶 催 化 肽 键 合 成

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白水解酶催化蛋白质肽键的水解平衡常数很大,也就是说,这类酶促反应是趋向肽键水解方向的,但是,是否可以利用蛋白水解酶在不同的条件下催化逆向的反应合成肽键呢?这曾经一度吸引过多肽化学家们的兴趣。最早是在1937年, Bergmann 和 Fraenkel-Conrat 成功地用木瓜蛋白酶等细胞内蛋白水解酶催化乙酰氨基酸和氨基酸酰替苯胺的缩合^[1]。这给人们带来了实现这种逆反应的希望。接着 Bergmann 和 Fruton 又发现消化道酶,如胰凝乳蛋白酶也有催化肽键合成的能力,而且可以在生理pH条件下进行^[2]。这样,在一段时间内,人们

以为体内蛋白质合成可能也有一条通过蛋白水解酶的作用进行的途径。为此, Borsook 专门综述了多肽键水解平衡的知识。但是,随着核酸和蛋白质研究的迅猛进展,认识到体内蛋白质合成是一个由 DNA 决定的,在核糖核蛋白体上进行的过程。顿时,对蛋白水解酶酶促肽键合成的兴趣陡然下降。五六十年代是人工合成多肽最兴旺的时期,但多肽化学家的全部努力几乎都集中在液相或固相的化学合成上,并没有对蛋白水解酶的应用给予重视。不过在美国的一二家实验室内,在有限的课题上,如蛋白水解酶抑制剂的结构与功能关系、合成类蛋白的反

应等,作为一种特殊的研究手段,还是保持着对蛋白水解酶催化肽键合成的研究。在有机合成中,酶的使用尽管一直没有停止过,但对蛋白水解酶催化肽键合成的兴趣一直到七十年代才又被重新激起。一些日本化学家重又开始系统地寻找用蛋白水解酶反向酶促肽键合成的条件,因为与化学合成相比,这总是更简单更有效的合成多肽的办法。到七十年代末,已经可以应用这个技术合成多种小肽,以及对天然蛋白质分子作化学修饰。最近又成功地把猪胰岛素改性成人胰岛素^[3-5],这是酶促合成肽键的一项出色的成果。

1980年在丹麦的 Helsingør 召开的第十六届欧洲多肽会议上,丹麦 Carlsberg 大学的 Johansen 作了关于酶促多肽合成的专题报告^[6],引起与会者极大的兴趣。许多人认为酶促肽键合成很有希望发展成为一种成熟的多肽合成方法。Johansen 列举了他所用过的各种蛋白水解酶和已经获得成功的多种氨基酸之间的肽键合成,着重讨论了反应得以成功的条件。德国羊毛研究所的 Gattner 介绍了他近年来用此方法在胰岛素化学修饰中的许多有趣的结果^[7]。国内有些实验室也已经用此方法在胰岛素结构与功能的研究中做了许多很好的工作^[8]。为探索酶促肽键合成的普遍规律的深入研究还在继续着。

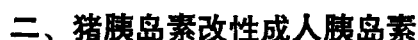
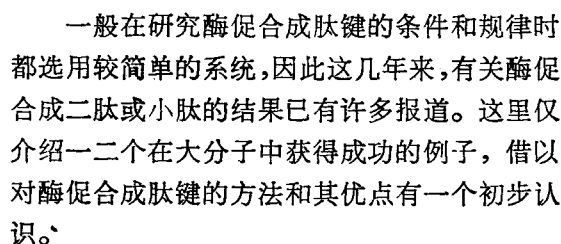
一、酶促肽键合成反应

从理论上说,一个化学反应虽然不是可逆反应,也总不是绝对不可逆的,应该可以找到适当的条件使事物发生转化,使反应逆向,对蛋白水解酶催化的肽键水解反应也应该可以把化学反应的平衡点移到有利于合成的方向。例如按质量作用定律增加初始物的浓度,降低合成产物的浓度,反应会向合成方向移动。在实际情况中确也存在着一些有利的条件。譬如许多蛋白质分子在天然状态下由于有严密的三维结构对水解并不十分敏感,但在变性时却变得敏感;而且在好几个潜在的可以被水解的肽键中,由于各种外界的和内在的因素的限制,真正易

被水解的往往只有一个位点,即特异性水解。例如在许多蛋白水解酶抑制剂中只有活性中性的碱性氨基酸肽键可被胰蛋白酶水解。这样就有可能把我们要“施手术”的位置专一地集中在一个点上。这对酶促多肽合成是很重要的条件,也是相当苛刻的条件。幸好现在已越来越多地发现了专一性很高的酶,日本人在 *Achromobacter lyticus* M497-1 中发现的一种丝氨酸蛋白水解酶,对赖氨酸羧端肽键的水解有极高的专一性,现已用于胰岛素的改性中^[9]。目前用于实现蛋白水解酶催化肽键合成的方法归纳起来主要是两大类。一类是通过热力学途径,一类是通过动力学途径。前者首先可以借选择溶解度大的反应物,加入大大过量的一个反应物,或用封闭初始物的氨基,羧基或其他官能团的方法降低产物的溶解度,按质量作用定律迫使反应朝合成产物方向移动。第二,在合成体系中加入高浓度的有机溶剂。这是极为关键的措施,也是近年来酶促合成肽键研究的主要结果之一。它最早是 Laskowski 偶然发现的。他们在一个为其他目的设计的实验中,在把胰蛋白酶和大豆胰蛋白酶抑制剂保温时用了 60% 浓度的甘油,结果意外地发现水解常数降低 8 倍。于是,甘油的存在促进肽键合成只是一个特殊情况呢还是具有普遍意义就成为非常有趣的值得进一步探讨的新问题。在深入研究了甘油和其他有机溶剂对水解反应平衡的影响后发现有机溶剂促进肽键合成的作用是普遍存在的,而且总结其原因并非简单的只是因为有机溶剂的存在而降低了体系水的浓度,主要的还是因为有机溶剂降低了质子从反应物的羧基移向氨基的平衡常数而致水解常数降低^[9]。第三,使肽键合成反应与另一个容易进行的反应相耦合^[10]。

关于通过动力学途径实现酶促合成肽键,近年来被认为是更好的办法。Widmer^[11] 及 Oka^[12] 的研究非常强调这种优越性。动力学方法的关键是要把底物的羧基成分变成酯的形式,至于氨基成分,作为亲核成分,可以是自由氨基酸,氨基酸酰胺或氨基酸酰胺,这样可获得

的 pH 下活力下降十分严重。总之,为建立酶促多肽合成的一般方法,动力学途径也许是更可取的。



猪胰岛素和人胰岛素的化学结构十分相似,仅在 B 链羧端有一个氨基酸的差别,即猪胰岛素中 B₃₀ 是 Ala, 而人胰岛素是 thr。但在临床上,由于商品胰岛素都是猪胰岛素或牛胰岛素,因此有相当一部分糖尿病患者对这种外源胰岛素产生了免疫反应,要求越来越高的胰岛素剂量,这样对人胰岛素的需要就日益迫切地提到日程上来。显然我们不能从人的胰脏提取人胰岛素,自然必须要用化学的方法(这里暂且不考虑遗传工程方法)。尽管人们早在 1965 年就成功地在实验室中全合成了有完全活力的结晶胰岛素(中国小组,西德的 Zahn 小组和美国的 Katsoyannis 小组),但大规模工业生产化学合成的胰岛素至今还没有实现。这里,似乎有一条捷径,就是把商品猪胰岛素经化学修饰换一个氨基酸改成人胰岛素。化学家们的确努力在做这件事。但至今仍无能为力在生产规模上完成这样一个 thr 对 Ala 取代的修饰。有二个美国人曾提出一条半合成的途径,并声称他们通过这条途径从猪胰岛素得到了人胰岛素,但其他实验室重复不出他们的结果,此后也再未得到他们进一步的报道。后来二个德国化学家 Obermaier 和 Geiger 确实走通了这条路^[13],但冗长麻烦的化学制备过程,远远不能得到令人满意的产率。实际上还是达不到有工业生产经济效益。近年来,日本科学家利用酶促合成肽键这种比较简单的方法,以 40—60% 的产率把猪胰岛素改性成人胰岛素,为工业生产人胰岛素提供了现实的基础^[13-15]。最近丹麦的

Nouo 公司(世界上最早生产胰岛素的三家公司之一,生产胰岛素已有六十年之久的历史)仅仅用了一二年的时间就把实验室的这项成果扩展到工业生产中,生产出了酶促改性的人胰岛素。

1978 年日本的 Inouye 采用下面的途径把

猪胰岛素改性成人胰岛素^[3]。从图 1 可见,58% 的去 B 链羧端八肽胰岛素(DOI)经胰蛋白酶酶促接上人胰岛素的 B 链羧端八肽而变成人胰岛素。

1979 年, Morihara 运用羧肽酶 A 和胰蛋

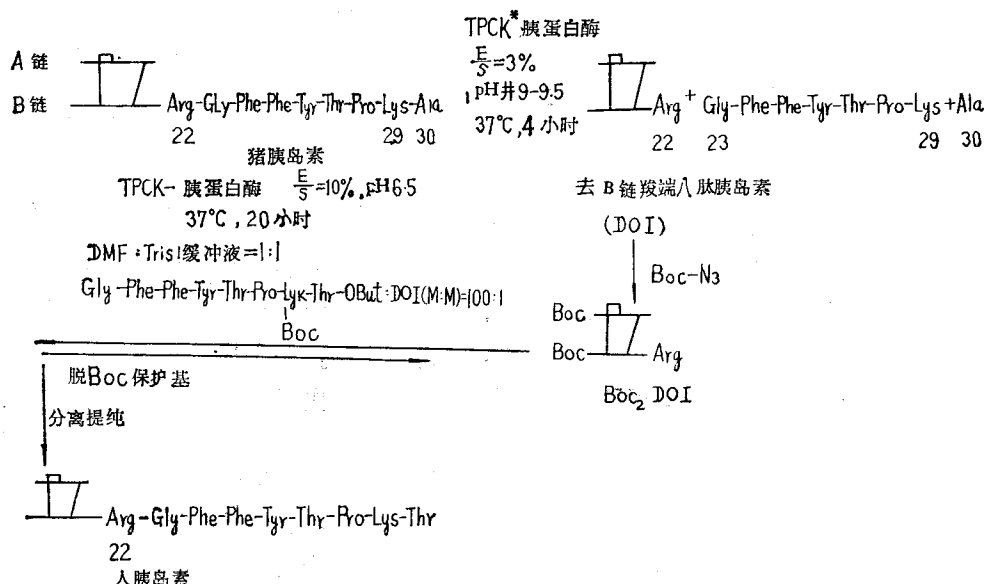


图 1 猪胰岛素经胰蛋白酶的催化作用改性成人胰岛素

* TPCK (L-1-对苯磺酰胺-2-苯乙基甲氧酮)处理胰蛋白酶制剂以去除其中的胰凝乳蛋白酶的活力。

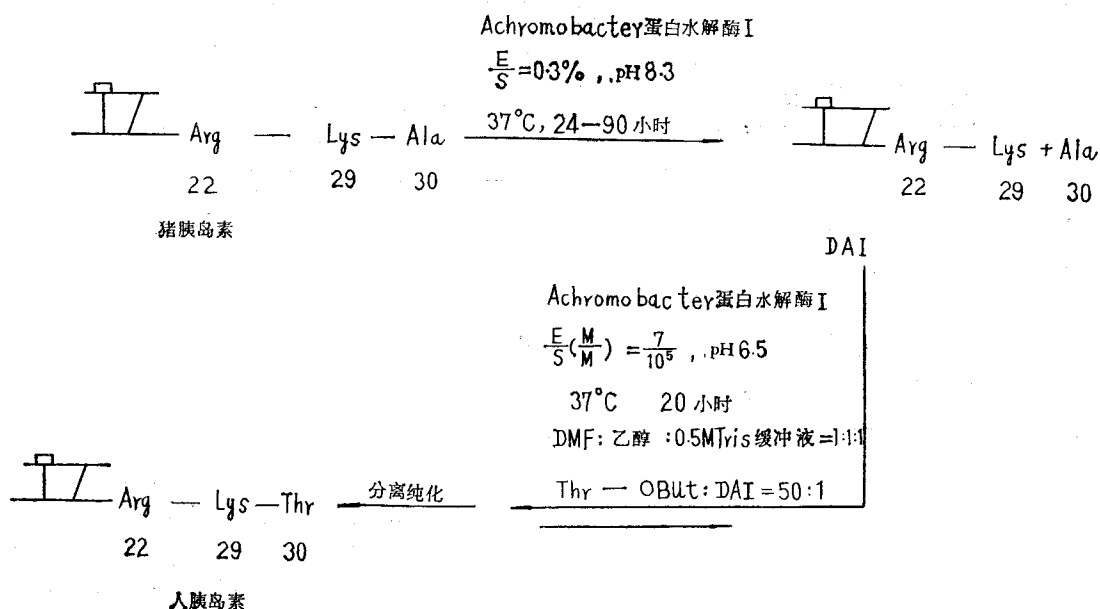


图 2 猪胰岛素经羧肽酶 A 和胰蛋白酶作用改性成人胰岛素

白酶,从另一条途径同样从猪胰岛素得到人胰岛素^[4](图 2)。80% 的去 B₃₀Ala 胰岛素(DAI)与 thr-OBu 经酶促缩合成人胰岛素。

1980 年 Morihara 又从 *Achromobacter lyticus* M497-1 中提取的一种丝氨酸蛋白水解酶更可靠地得到人胰岛素^[5](图 3) 83% 的 DAI

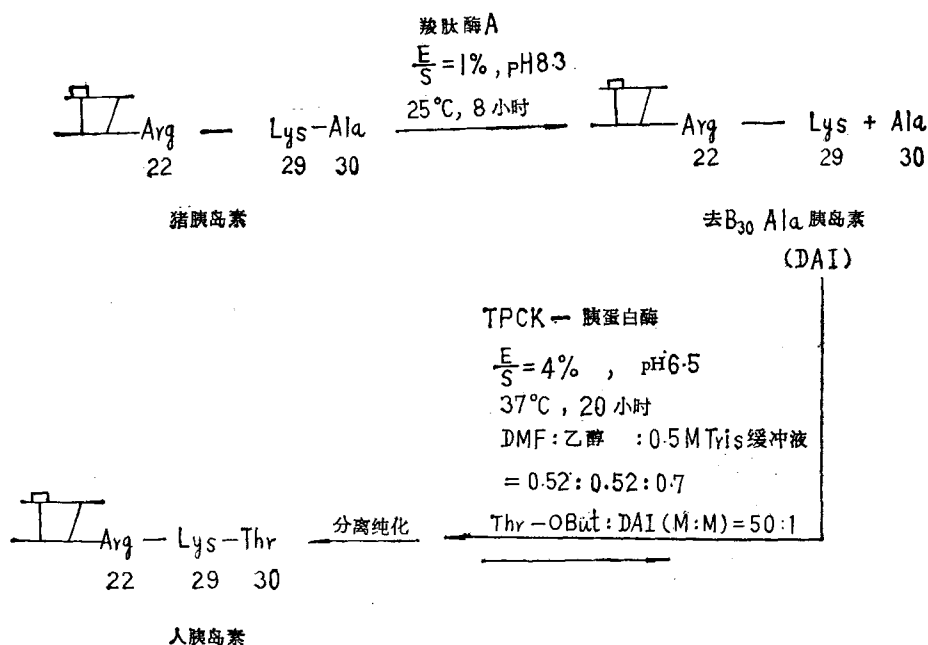


图3 猪胰岛素经 *Achromobacter* 蛋白水解酶作用改性成人胰岛素

转变成人胰岛素。

从以上反应,我们可以看到: 第一,同一种蛋白水解酶的确可以催化肽键水解和肽键合成二个方向相反的反应,但必需是在完全不同的条件下进行。这些条件包括反应体系的 pH, 温度、酶浓度,反应时间、有机溶剂的种类和浓度,反应物的浓度等。对每个具体反应,需具体摸索最佳反应条件。特别是合成反应所需的 pH 环境往往与我们很熟悉的某个酶的最佳 pH (即催化水解反应的最佳 pH) 迥然不同。此外,有机溶剂虽然对提高合成效率具有普遍意义,但另一方面,也要考虑到它对底物的溶解度以及酶的催化效率和稳定性的副作用。不过有机溶剂并不改变酶的专一性。现在已经用过的有机溶剂有甘油,1,4-丁二醇,乙二醇,戊二醇,三甘醇,丙酮,二甲亚砜 (DMSO),二甲替甲酰胺 (DMF),二氧六环,乙腈等。寻找新的酶使可以经受高浓度有机溶剂而不失活,也是一个新的努力方向。细菌酶似乎是很有希望的。第二,酶促合成肽键时,应该使有可能得到较大量样品的反应物尽量过量。在上面的反应中,苏氨酸和八肽的制备相对说要容易得多,因此用

超过 50—100 倍的量,迫使反应趋向合成方向。而过量的小肽可以回收,并不会浪费。

与化学合成相比,酶促肽键合成确实表现了下面这些优点: 首先酶促反应的专一性较高,有时还十分好。胰蛋白酶在碱性 pH 时只水解碱性氨基酸羧端肽键,在胰岛素分子中,只有 B 链 22 位的 Arg 和 29 位的 lys 二处可被特异水解。但在中性偏酸 pH 时,胰蛋白酶却只催化 DOI 和八肽的合成而不催化八肽中 lys 的水解;类似的只催化 DAI 和 thr 的缩合而不催化 DAI 中 Arg 的水解。第二、酶促合成反应不会产生外消旋化,而消旋作用恰恰是化学合成中非常令人讨厌的事情。第三、酶促合成操作简单。由于反应专一性强,初始物的官能团不必事先保护,因此省略了产物的脱保护处理。官能团的保护和脱保护是很繁琐的化学处理,还很可能引起原料和产物性质的变化,影响合成产物的质量和产率。此外制备和选择适当的保护基本本身在多肽合成中就是十分复杂的事情。第四、效率高。从已经成功的反应来看,虽然不能说百分之一百都有极高的效率,但确实有相当多的反应获得 40—90% 的高效率。对

于胰岛素的结构与功能关系的研究,羧端的化学修饰一直有许多困难。由于A链C端Asn在皂化脱保护基时总会产生亚氨环化物,使最终产物中含有不易分离除去的 β -Asn副产物。酶促肽键合成技术避免了这个麻烦,为胰岛素羧端修饰开辟了新的途径。在一个A₁与B₂₉氨基间用双功能团试剂交联起来的胰岛素衍生物中,用胰蛋白酶水解断裂B₂₂Arg和B₂₉Gly之间的肽键,此时B₂₃₋₃₀八肽片段仍然借交联桥联接在分子上,但溶液构象研究表明它已有很大的自由度,不再保持在原来的位置上。然而在适当的条件下,这个八肽片段仍可由胰蛋白酶酶促重组到B₂₂Arg羧端上去,此时羧基成分和氨基成分之比为1:1^[14]。胰岛素羧端的化学修饰也可通过这条途径。

三、胰蛋白酶抑制剂结构与功能的研究

美国普度大学化学系的Laskowski自六十年代开始对胰蛋白酶抑制剂做了非常系统的研究。这是一个由181个氨基酸组成的蛋白质分子,含有多个lys和Arg,但只有在活性中心的第63位Arg和第64位Ile之间的肽键能为胰

蛋白酶水解。Laskowski等便利用胰蛋白酶催化该肽键水解,对水解后新形成的氨基和羧基进行修饰,切除、内插或取代水解部位的残基,然后再用同一个酶催化修饰后的肽键的重组。结果发现这样修饰后的抑制剂的活力发生了变化,或改变了抑制过程的动力学,或改变了抑制剂的抑制性质,变为其他酶的抑制剂,从而获得许多有关活性中心的构象,必需基团或必需氨基酸等结构与功能关系的知识^[15]。后来他们用类似的方法还研究了核糖核酸酶的结构与功能关系^[16]。

这七八年来,酶促合成肽键的进展相当快,不仅在小肽合成方面,而且在蛋白质大分子的化学修饰和结构功能关系研究中都取得了很大的成功。同时在总结反应规律和建立一般的方法方面也有显著的进展。当然目前它还没有成为普遍可用的成熟的方法,对于不同的底物,不同的酶,仍然需要摸索具体的最佳反应条件。但在传统的化学方法不能取得成功的情况下,尝试一下不同种类的酶还是非常值得的。更何况酶促合成肽键法有那么多诱人的优点,所以蛋白水解酶在多肽合成的领域内必然会获得越来越广泛的运用。(下转第53页)

淋巴细胞的电泳行为和免疫功能*

施 永 德

(上海第一医学院生物物理教研室)

淋巴细胞的电泳行为——即电泳率的快慢与其表面特征及免疫功能有关,并愈来愈受到人们的重视,这是一个生物物理学和免疫学工作者共同感兴趣的问题^[1-3],本文就这一问题作一简述。

测定淋巴细胞电泳行为的仪器大致有两种——分析型细胞电泳仪和制备型细胞电泳仪。前者仅分析样品中细胞电泳率数值与细胞

数间的关系。后者除此功能外,还能将不同电泳率细胞分开,并可测定这些细胞的其他性质和功能,再与电泳率进行比较。所以制备型细胞电泳仪有更多的优点。分析型细胞电泳仪自本世纪二十年代开始出现,但60—70年代才形成较为完善的产品。制备型细胞电泳仪70—

* 梁子钧同志曾对本文提过宝贵意见,谨此致谢。

备用。

二、结果与讨论

1. MboI 酶粗提物的酶及两次纯化后酶制品活性在硫酸铵沉淀蛋白后, 直接进行 Biogel-A0.5M 的层析洗脱, 经过此步骤, 在 3000 毫升的脑心浸出液培养的菌体中, 可得大约 17,000 单位的 MboI 酶的粗提物, 对含有 MboI 酶活性各管进行磷酸纤维素 p11 的纯化, 其酶活性检测结果如图 1 (见封 3) 所示, 纯化后的酶活性部分一般在 5—15 管之间, 相当于 KCl 浓度 0.3—0.4M 之间。经进一步纯化后可得 MboI 6100 单位, 纯化率为 35.9%。

2. MboI 纯化度的鉴定: 对纯化的 MboI 各管作外切酶和非特异内切酶鉴定, 电泳是在 5% 丙烯酰胺胶中进行的, MboI 酶纯度的检测见图 2 (放封 3)。用 pBR322, 其中含有 22 个 MboI 酶切点片段如下: 1374, 655, 358, 341, 317, 272, 258, 207, 105, 91, 78, 75, 46, 36, 31, 27, 18, 17, 15, 12, 11, 8 碱基对。MboI 和 MboII 混合切时片段大小为: 692, 680, 355, 341, 317, 275, 236, 195, 183, 112, 105, 78, 70 碱基对。从图 3 (见封 3) 中可看出纯化后的 MboI 酶降解 pBR322 后的区带基本上与文献 [4] 中报道的结果符合。图 3 是以 Hinf I 已知片段大小作标准曲线, 根据对数与反对数的算法得知酶解 pBR322 片段的大小如下:

已知 Hinf I: 1631, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 及 75 碱基对。

纯化的 MboI 经计算为: 1380, 660, 380, 316, 288, 251, 199, (133, 123) 109 及 89 碱基对。

以上是酶解后得出的片段, 与文献报道基本符合。

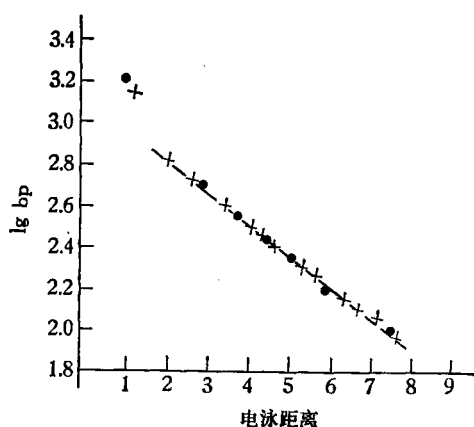


图 3 以已知 pBR322 的 Hinf I 片段为标准绘成的标准曲线

●—表示 Hinf I 酶切片段 ×—表示纯化 MboI 酶切片段

参 考 文 献

- [1] Gelinas, R. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 114, 169, 1977.
- [2] Brown, N. L. Hitchison et al.: *J. Mol. Biol.*, 140, 143, 1980.
- [3] Endow, S. A., *J. Mol. Biol.*, 114, 441, 1977.
- [4] *Genetic Engineering*, AMC Hakrabarty CRC Press, Inc. Editor. 1978.
- [5] Homandberg, G. et al.: *Biochemistry*, 17, 5220, 1978.
- [6] Sealock, R. W. et al.: *Biochemistry*, 8, 3703, 1969.
- [7] Widmer, F. et al.: *Carlsberg Res. Commun.*, 44, 37, 1979.
- [8] Oka, T. et al.: *Symp. on Peptide Chemistry in Japan*, Osaka, 79, 1977.
- [9] Obermeier, R. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357, 759, 1976.
- [10] Chu, S. H., et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, 647, 1981.
- [11] Kowalski, D. et al.: *Bayer-Symposium. V "Proteinase Inhibitors"*, Springer-Verlag, 311, 1974.
- [12] Homandberg, G. A. et al.: *Biochemistry*, 18, 586, 1979.
- [13] Bergmann, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 119, 707, 1937.
- [14] Bergmann, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 124, 321, 1938.
- [15] Inouye, K. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 101, 751, 1979.
- [16] Morihara, K. et al.: *Nature*, 280, 412, 1979.
- [17] Morihara, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 396, 1980.
- [18] Widmer, F. et al.: *Peptides*, 1980 Ed. Brunfeldt, Scriptor, Copenhagen, 46, 1981.
- [19] Gattner, H. -G., et al.: *Peptides*, 1980, Ed. Brunfeldt, Scriptor, Copenhagen, 372, 1981.
- [20] 张友尚, 朱尚权等(上海生物化学研究所) 个人通信。

(上接第 12 页)

参 考 文 献

(本文于 1982 年 10 月 20 日收到)