

释, 以增加对蛋白酶 E 结构功能的理解, 提高对蛋白质工程应用的认识.

参 考 文 献

1 Markland F S, Smith E L. Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties. In: Boyer P D ed. The Enzymes. 3rd. New York: Academic Press, 1971. 561~608

2 Wells J A, Estell D A. Subtilisin: an enzyme designed to be engineered. TIBS, 1988, 13: 291~ 297

3 朱榴琴, 季永梅. 枯草杆菌蛋白酶 E 的蛋白质工程. 生物工程学报, 1997, 13: 15~ 20

4 Wells J A, Cunningham B C, Graycar T P *et al.* Recruitment of substrate specificity properties from one enzyme into a related one by protein engineering. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5167~ 5171

5 郭兴华, 贾士芳, 陈乃用等. 芽孢杆菌原生质体作为质粒 DNA 转化的受体. 微生物学报, 1992, 22 (3): 263 ~ 268

6 Sanger F, Nickelen S, Coulson A R. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74: 5463~ 5467

7 北京大学生物系编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1979. 151~ 154

Site 156 and 165 Mutation of Subtilisin E.
CHEN Weidong, MA Jianhua, ZHU Liuqin
(*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract E156S and V165I mutation were introduced into subtilisin E gene by site-directed mutagenesis. The mutated gene fragments were recombined with pBE-2 which is a shuttle vector between *E. coli* and *Bacillus subtilis*. The recombinant plasmids were used to transform *B. subtilis* DB104, a mutant strain deficient in alkaline and neutral protease, then they were expressed. They were (M222A, E156S) and (M222A, E156S, V165I). The property analysis of these enzymes revealed that the Subtilisin E E156S substitution enhanced the hydrolysis K_{cat}/K_m by 90% while keeping thermal stability and oxidation-resistance unchanged, however the V165I mutation reduced the K_{cat}/K_m value.

Key words subtilisin E, protein engineering, specific activity, stability

北京鸭血清 HDL 及 apo A I
在胆固醇代谢中的作用*

尹银亮 王克勤¹⁾ 陈保生

(中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学部 ,

摘要 对纯化的北京鸭脂蛋白进行了电镜观察、梯度凝胶电泳、总胆固醇及卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (LCAT) 活力分布测定等研究, 对鸭 apo A I 的氨基酸组成、序列、亲-疏水性同人及其他动物进行了比较并初步进行了二级结构预测. 实验结果进一步证实北京鸭血清胆固醇是由高密度脂蛋白 (HDL) 携带运输, 鸭 apo A I 在胆固醇代谢中起着重要作用.

关键词 北京鸭, 高密度脂蛋白 (HDL), apo A I , α 螺旋, 结构, 功能

* 国家自然科学基金资助项目 (39270764). ¹⁾ 通讯联系人, 本研究导师.
收稿日期: 1996-06-12, 修回日期: 1996-12-24

北京鸭一直是用以研究胆固醇代谢和抗动脉硬化机理的良好动物模型, 其血清中含高水平的 HDL 和 apo A I, 鸭长期被填喂高脂饲料也不易患动脉粥样硬化. 本研究室曾对此进行了大量的研究, 发现其血清 HDL 水平明显高于人, 而低密度脂蛋白 (LDL) 较人的为低, 其血清卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (LCAT) 活力较高而胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 活力水平明显为低, 其血清中 apo A I 水平及 apo A I / apo B 比值都较人的为高. 此外还与国外有关实验室合作, 已测定了鸭 apo A I 的全部氨基酸序列. 为了进一步从分子机理上阐明北京鸭胆固醇代谢和抗动脉硬化提供基础. 我们对北京鸭脂蛋白颗粒进行了电镜观察, 血清总胆固醇及 LCAT 活力在脂蛋白之间的分布进行了测定, 鸭 apo A I 的氨基酸组成、序列及亲-疏水性同人及其他动物进行了比较, 并初步作了二级结构预测. 我们的实验结果为王克勤教授提出的北京鸭胆固醇主要由 HDL 运输, 通过 HDL 受体途径代谢的假说提供了进一步的证据.

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂: 丙烯酰胺, 二豆蔻酸磷脂胆碱 (DMPC), 胆固醇氧化酶 (Sigma 公司), 高分子质量标准蛋白 (Pharmacia 公司), 胆酸钠 (Merck 公司), 考马斯亮蓝 G250 (Fluka 公司), 总胆固醇测定试剂盒 (中国科学院百泰生物公司), 辣根过氧化物酶 (中国科学院生物化学研究所), 乙腈等 (国产分析纯).

1.1.2 主要仪器: L8-80 超速离心机及 Ti80 转头 (Beckman 公司), 紫外监测仪 (Pharmacia 公司), 电镜 JEM-2000EX (日本电子公司).

1.2 方法

1.2.1 鸭血清脂蛋白及 apo A I 的分离、纯化及鉴定: 按文献 [1] 的方法超速离心分离脂蛋白, 以琼脂糖电泳鉴定, 其中脂质和蛋白

的纯度. 按文献 [2] 脱脂, Sephadex G200 柱层析分离 apo A I, 然后以 HPLC、SDS-PAGE 及氨基酸组成分析鉴定.

1.2.2 重组脂质体制备: 参考文献 [3] 的方法, 以胆盐透析法制备, DMPC: 胆固醇: 胆酸钠 = 100: 10: 100 (摩尔比), DMPC 和 apo A I 的三种摩尔比为分别为 200: 1、100: 1 和 50: 1.

1.2.3 电镜观察: 鸭脂蛋白颗粒及重组脂质体以 2% 磷钨酸钠负染, 滴于铜网上自然干燥, 于电镜下 $\times 6K$ 倍观察.

1.2.4 梯度凝胶电泳: 按文献 [4] 的方法进行. 鸭血清脂蛋白及重组脂质体以 4% ~ 30% 的聚丙烯酰胺凝胶进行梯度电泳, 125 V, 24 h, 以 10% 磺基水杨酸固定 1 h 后, 以 3.5% 高氯酸、0.04% 考马斯亮蓝 G250 染色 4 h, 再以 7% 乙酸充分脱色. 以高分子质量蛋白标准作参照, 估算脂蛋白及重组脂质体的颗粒大小.

1.2.5 LCAT 活性测定及总胆固醇测定: 参照梅美珍方法^[5] 测定脂蛋白及无脂血清 (LDS) 中 LCAT 活性. 总胆固醇测定以总胆固醇测定试剂盒 (中国科学院生物物理研究所中生公司) 及方法进行.

1.2.6 LCAT 激活实验: 以 LDS 为 LCAT 来源, 稀释 10 倍的热失活鸭全血清为反应底物, 比较单纯 apo A I 及重组脂质体对 LCAT 的激活作用.

1.2.7 不同种属动物 apo A I 的氨基酸组成、序列的比较及同源性分析: 参考文献 [6~11], 对鸭 apo A I 的氨基酸组成和序列与人、Cynomolgous monkey、牛、狗、兔、大鼠和鸡的 apo A I 进行比较并作同源性分析.

1.2.8 鸭 apo A I 氨基酸序列的亲-疏水性分析及其二级结构预测: 参考文献 [12] 以“Prosis 蛋白序列分析”软件进行亲-疏水性分析.

2 结 果

2.1 鸭血清脂蛋白及 apo A I 的分离纯化

经超速离心分离得到的 VLDL、LDL、

HDL 以琼脂糖电泳鉴定为纯品, LDS 不含脂质. 鸭 apo A I 在 Sephadex G200 柱层析及 HPLC 中呈现为一个独立的大峰, 在 SDS-PAGE 中呈现为单一条带, 氨基酸组成分析与本室以往结果完全一致, 表明为纯品.

2.2 鸭脂蛋白的电镜观察

VLDL 颗粒多呈圆球状, 大小极不均一, 直径大多在 20~ 100 nm 之间, 另有一些直径约 10 nm 的小颗粒. LDL 颗粒多为圆球状或短椭球体, 颗粒大小相对较均一, 直径在 12.5~ 20 nm 之间. HDL 颗粒呈圆球体, 大小均一, 直径大多在 8.5-10 nm 之间, 最大者可达 12 nm 以上, 未见呈串珠状排列的扁盘状颗粒 (图 1a, 1b, 1c). Apo A I 与 DMPC 组建的脂质体则呈现为扁盘状结构、并串联在一起 (图 1d).

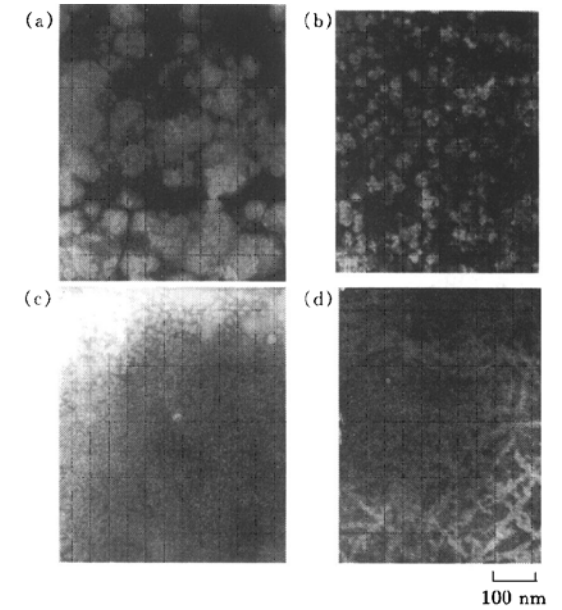


图 1 北京鸭血清和脂质体电子显微镜图
(a) 极低密度脂蛋白; (b) 低密度脂蛋白; (c) 高密度脂蛋白; (d) apo A I 与 DMPC 和胆固醇形成的脂质体.

2.3 梯度凝胶电泳

VLDL 未能进入凝胶, LDL 带仅位于凝胶加样孔下缘, HDL 的主带位于 HMS 的第

2、3 带之间, 在相对于 HMS 的第 5 带处可见一浅带, 表明 HDL 的颗粒大小均一, 直径平均为 10 nm 左右, 最小者 9 nm, 最大者可达 12.5 nm, 与电镜观察结果基本相符 (图 1c).

2.4 重组脂质体制备结果

梯度凝胶电泳结果表明, apo A I 能与 DMPC、胆固醇重组形成 3 种不同大小的脂质体, 直径分别为 8.8 nm、9.8 nm 和 10.8 nm, 其中以直径为 9.8 nm 的脂质体颗粒为主. DMPC: apo A I 比例为 200: 1 时, 可形成这三种大小的脂质体; 比例为 100: 1 时, 也可形成这三种大小的脂质体, 但大颗粒较少, 而且还存在未能与脂质结合的 apo A I 分子; 比例为 50: 1 时, 则只形成直径为 9.8 nm 和 8.8 nm 的脂质体颗粒, 同时存在大量过剩的 apo A I 分子, 可能是 apo A I 分子增多时, 脂质分子相对不足, 所以形成的主要脂质体颗粒变小 (图 2).

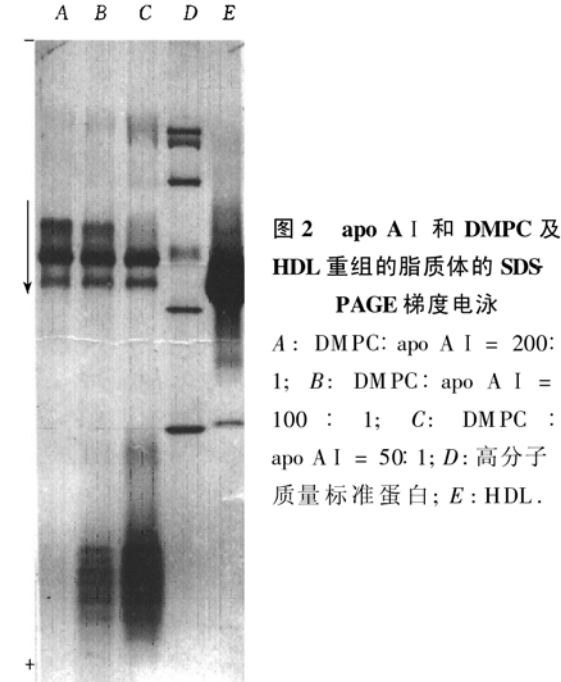


图 2 apo A I 和 DMPC 及 HDL 重组的脂质体的 SDS-PAGE 梯度电泳
A: DMPC: apo A I = 200: 1; B: DMPC: apo A I = 100 : 1; C: DMPC : apo A I = 50: 1; D: 高分子质量标准蛋白; E: HDL.

2.5 LCAT 活力及总胆固醇的分布

鸭血清 LCAT 活力分布为: VLDL 0%, LDL 9.9%, HDL 34.65%, LDS 54.45%, 表明经过超速离心的 LDS 中含 50% 以上的

LCAT 活力, HDL 中也含有较高的 LCAT 活力, 这一结果与文献 LCAT 活力分布的报道相似. 鸭血清中总胆固醇含量为 1458.0 mg/L, 以血清胆固醇为 100% 在脂蛋白中的分布为: VLDL 9%, LDL 25.44%, HDL 65.56%, LDS 0%, 表明大部分胆固醇集中在 HDL 中 (图 3).

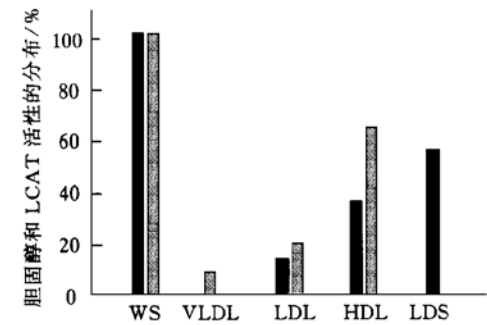


图 3 血清脂蛋白和无脂血清中胆固醇和 LCAT 的活性含量和分布

WS: 全血清; VLDL: 极低密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白; HDL: 高密度脂蛋白; LDS: 无脂血清. ■: LCAT 活性; ▨: 胆固醇活性.

2.6 LCAT 激活实验

实验结果表明, 单纯的 apo A I 激活 LCAT 能力较弱, 重组脂质体则具较强的激活力, 后者为前者的 3 倍多. 分别为 100% 和 350%.

2.7 氨基酸组成、序列比较及同源性分析

鸭 apo A I 的氨基酸组成与鸡的十分相似, 与人及其他哺乳动物的也基本相近, 但也有些较明显的差异. 它们都含有大量的疏水性氨基酸如 Leu、Ala、Val 和大量带正、负电荷的氨基酸如 Lys、Arg、Asp 及 Glu, 而不同的是鸭 apo A I 中含 Gly、Ser 及 His 明显较少, 疏水性氨基酸总数和带正、负电荷氨基酸总数都明显居多. 鸭 apo A I 与鸡的氨基酸序列同源性最大, 为 93.3%, 与人的同源性为 49%, 与其他哺乳动物的同源性为: 兔 53.1%, 狗 49.4%, 大鼠 42.8%. 鸭 apo A I 分子中间部分的 8 个 Pro 的位置与人或其他动物的完全一致, 将 apo A I 分子分割成 11/22 氨基酸的串

联重复序列, 其共同序列为: P-Z-Z-E/D-E-Z-K/R-E-R/K-Z-X-X-X-L-E-X-L-R-X-K-L-A/T (Z 代表疏水性氨基酸, X 代表任何一种氨基酸, 其余为各氨基酸的一字符).

2.8 Apo A I 分子亲-疏水性分析及二级结构预测

据计算机分析的图谱来看, 在鸭 apo A I 多肽链中有多个疏水性强的区, 如 AA52~58, AA76~97, AA143~162, AA165~185 等, N 端部分中 AA29~50 及中部的 AA97~142, AA186~200 区域疏水性较弱. 另外, 鸭 apo A I 分子在整体上比人 apo A I 分子具有较强的疏水性 (图 4).

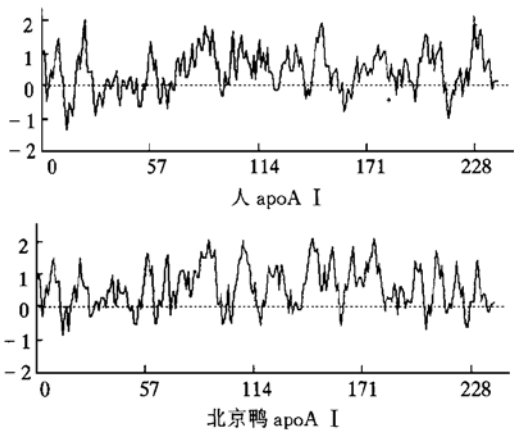


图 4 以电子计算机分析, 比较人和北京鸭的疏水及亲水性

3 讨 论

3.1 鸭胆固醇的运输和代谢特点

鸭 HDL 中总胆固醇含量占全血清的 65.6%, 且 HDL 中具有较高的 LCAT 活性. 电镜观察及梯度凝胶电泳结果表明, 鸭 HDL 呈圆球状, 颗粒大小均一, 直径在 9 nm 左右. 而人 HDL 中总胆固醇含量一般占全血清的 20%~25%. 所以我认为, 游离的胆固醇在鸭 HDL 中比较容易被酯化, 新生的 HDL 易被转化成成熟的 HDL, 鸭 HDL 中含大量的胆固醇及胆固醇酯, 故使其颗粒呈圆球状且大小均一, 鸭血清中胆固醇主要是由 HDL 所携

带运输. 本室长期的研究表明, 鸭血清中 LCAT 活性较其他哺乳动物高而 CETP 活性极低< 1%, 长期填喂高脂饲料也不易患动脉粥样硬化. 为此, 王克勤等^[13, 14]曾提出了鸭的 HDL 受体途径假说, 认为北京鸭血清胆固醇主要由 HDL 运输, 通过 HDL 与肝细胞膜上的 HDL 受体相结合而被摄入肝脏中代谢. 本实验结果为这一假说提供了进一步的证据.

3.2 Apo A I 分子结构功能及在胆固醇代谢中的意义

Apo A I 是 HDL 中最主要的载脂蛋白, 占 HDL 蛋白成分的 70%. 鸭 apo A I 在氨基酸组成上同人及其他哺乳动物相似, 一级结构的同源性在 50% 左右, 但二级结构则明显相似, 表现出二级结构进化上的保守性, 鸭和人的 apo A I 分子中有多个 11/22 氨基酸重复序列, 它们都能形成双性 α 螺旋. 另一方面, 鸭 apo A I 在整体上较人的 apo A I 疏水性强, 分子中所形成的一部分双性 α 螺旋也较人的规则, 特别是其中的 AA187~ 208 所形成的双性 α 螺旋最为规则, 可能使鸭 apo A I 更适于与脂质结合, 这可能是鸭 HDL 能携带丰富胆固醇及胆固醇酯的分子结构基础, 也反映出鸭 apo A I 在胆固醇代谢中的重要作用. 由鸭 apo A I 与 DMPC 和胆固醇组成的脂质体, 比单纯的 apo A I 具有较强的激活 LCAT 能力, 可能是脂质的结合使 apo A I 分子形成能与 LCAT 活性部位相结合的空间结构而更好地发挥出激活作用.

致谢 承蒙我组薛红、吕新跃两位同志协助打印等, 特此致谢.

参 考 文 献

1 李志高, 王克勤, 郝扞林等. 鸭血清脂蛋白的研究 V: 血清 apo A I 在脂蛋白体外转化的初步研究. 生物化学与生物物理学报, 1985, 17: 239~ 245

2 王克勤, 解用虹. 鸭血清脂蛋白的研究 III: 鸭血清脂蛋白的主要载脂蛋白的分离提取及某些性质的研究. 中国医学科学院学报, 1983, 5: 79~ 83

3 Matz C E , Jonas A . Micellar complexes of human

apolipoprotein A I with phosphatidyl cholines and cholesterol prepared from cholater-lipid dispersions. J Biol Chem, 1982, 257: 4535~ 4540

4 Nichols A V, Gong E L, Blanche P J. Characterization of discoidal complexes of phosphotidyl choline apo A I and cholesterol gradient gel electrophoresis. Biochim Biophys Acta, 1983, 750: 353~ 364

5 蒋宪成, 庄庆祺, 梅美珍. 卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性的简易测定法. 上海第一医学院学报, 1985, 12: 155 ~ 157

6 Sparrow D A, Lee B R, Laplaud P M *et al.* Plasma lipid transport in the preruminant calf, Bos spp primary structure of bovine apolipoprotein A I . Biochim Biophys Acta, 1992, 1123: 145~ 150

7 Chung H, Randoph A, Reardon J *et al.* The covalent structure of apolipoprotein A I from caine high density lipoprtein. J Biol Chem, 1982, 257: 2961~ 2967

8 Yang C Y, Yang T, Pownall H J *et al.* The primary structure of apolipoprotein A I from rabbit high-density lipoprtein. Eur J Biochem, 1986, 160: 427~ 431

9 Porcin J E, Martial J A, Gielen J E. Cloning and structure analysis of the rat apolipoprotein A I cDNA. Eur J Biochem, 1984, 140: 493~ 498

10 Murray R W, Merrottii K R. Nucleotide sequence of the cynomolgus monkey apolipoprotein A I gene and corresponding flanking regions. Biochim Biophs Acta, 1992, 1131: 207~ 210

11 Lamnr Fava S, Sadry R, Ferran S *et al.* Evolutionary distinct mechanisms regulate apolipoprotein A I gene expression: differences between avian and mammalean apo A I gene transcription control regiuons. J Lipid Res, 1992, 33: 831~ 842

12 Chou P Y, Fasman G D. Empirical predictions of protein conformation. Ann Rev Biochem, 1978, 47: 251~ 276

13 王克勤, 李志高, 郝扞林等. 鸭血清脂蛋白运转胆固醇的特点及其在抗动脉粥样硬化的作用. 中国医学科学院学报, 1986, 8 (2): 88~ 94

14 Wang K Q, Li Z G, Hao Q L *et al.* The differences of serum and lipoproteins in animals susceptible and nonsusceptible to atherosclerosis. Proc CAMS and PUMC, 1990, 5 (2): 112 ~ 119

Studies on the Structure and Functions of HDL and Apolipoprotein A- I of Beijing Duck. YIN Yinliang, WANG Keqin, CHEN Baosheng (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic*

Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China).

Abstract The purified Beijing duck serum lipoproteins were observed by electronmicroscope for its shape and size. The distributions of total cholesterol and LCAT activities and their gradient gel electrophoresis, the amino acid composition and partial amino acid sequences of each fragment of apo A-I were studied and determined, respectively. Furthermore, their

hydrophilicity and hydrophobicity of α helices were also studied and compared with human and other species. When the above results were integrated together they provided further evidence for the hypothesis that the cholesterol of Beijing duck is carried and transported by HDL instead of LDL and apo A-I played an important role in the cholesterol metabolism.

Key words Beijing duck, HDL, apo A-I, α -helix, structure, function

大鼠阴离子交换蛋白合成肽抗体制备及鉴定*

李津婴 赵法¹⁾ 郭俊生¹⁾ 叶煦亭²⁾ 胡小健³⁾ 张志鸿³⁾ 周汉清³⁾

(第二军医大学长海医院, 上海 200433)

摘要 根据带 3 蛋白 (阴离子交换蛋白) 拓扑学模式、氨基酸保守片段、功能片段、天然抗原表位, 设计大鼠带 3 膜外侧片段合成肽, 制备抗合成肽 (12 肽) 抗体, 同时制备抗大片段带 3 抗体加以印证。多项免疫学实验鉴定结果表明, 该 12 肽是带 3 抗原决定簇之一, 也是带 3 发挥阴离子转运功能的关键肽段; 12 肽的氨基酸组成与序列在各种属间高度保守。免疫金银显色——扫描电镜结果给出该 12 肽为带 3 蛋白膜外侧区片段的最直接证据。制备的抗带 3 抗体可作为研究带 3 结构与功能、探讨与带 3 病变有关的疾病发病机理和病理过程的有用工具。

关键词 带 3 蛋白, 合成肽, 抗体

高等动物细胞膜阴离子交换蛋白 (anion exchange protein, AE, 即带 3 蛋白, band 3 protein) 家族由三种不同基因编码, 产物分别称为 AE1、AE2 和 AE3。AE1 见于红细胞、肾细胞, 分子质量 95~ 102 ku, 氨基酸残基数 848~ 929 个。AE2 见于肾细胞、脑细胞、B 淋巴细胞系等; AE3 见于心肌细胞、脑细胞。AE2 和 AE3 的分子质量约为 135 ku, 氨基酸数 1227~ 1237。非红系有核血细胞、肺和小肠等组织细胞的带 3 样蛋白, 分子质量 60~ 180 ku 不等, 均属 AE 家族。已对 11 种 AE 的基因序列、氨基酸序列、拓扑学构型、阴离子转运位点等进行了大量比较研究, 提出多种

拓扑学模式^[1~ 4]。在红细胞, AE 即带 3 蛋白有 10、12 甚至更多穿膜次数的模式。但有一点得到多数作者肯定, 即第五穿膜区外侧片段与阴离子通透、抗原抗体反应、细胞衰老清除等生命活动有关, 是各组织间、各种属间高度保守的片段。为了研究带 3 蛋白的结构与功能, 探讨带 3 蛋白在有关疾病中的病变机理,

* 国家自然科学基金资助项目 (39270589)。

¹⁾ 第二军医大学军队卫生教研室。

²⁾ 第二军医大学电镜室。

³⁾ 复旦大学生物物理系。

收稿日期: 1996-06-24, 修回日期: 1996-10-23