

- 4 Kane D J, Sarafian T A, Anton R, *et al.* BCL-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993, **262** (5137): 1274~ 1277
- 5 Baffy G, Miyashita T, Williamson J R, *et al.* Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, 1993, **268** (9): 6511~ 6519
- 6 Hale A J, Smith C A, Sutheland L C, *et al.* Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*, 1996, **236** (1): 1~ 26
- 7 Yin X-M, Oltvai Z N, Korsmeyer S J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994, **369** (6478): 321~ 323
- 8 Pepper C, Bentley P, Hoy T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Brit J Haematol*, 1996, **95** (3): 513~ 517
- 9 Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballesteros R, Ding L, *et al.* bcl-X_L is the major bcl-X mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, 1994, **120** (10): 3033~ 3042
- 10 Sedlak T W, Oltvai Z N, Yang E, *et al.* Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (17): 7834~ 7838
- 11 Boise L H, Minn A J, Noel P J, *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of BCL-X_L. *Immunity*, 1995, **3** (1): 87~ 98
- 12 Findly H W, Gu L, Yeager A M, *et al.* Expression and regulation of bcl-2, bcl-X_L, and bax correlate with P53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1997, **89** (8): 2986~ 2993
- 13 Kozopas K M, Yang T, Buchan H L, *et al.* MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (8): 3516~ 3520
- 14 Lin E Y, Orloffsky A, Berger M S, *et al.* Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol*, 1993, **151** (4): 1979~ 1988
- 15 Zhou P, Qian L, Kozopas K M, *et al.* Mcl-1, a bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood*, 1997, **89** (2): 630~ 643
- 16 Farrow S N, White J H M, Martinou I, *et al.* Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*, 1995, **374** (6524): 731~ 733
- 17 Kiefer M C, Brauer M J, Powers V C, *et al.* Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, 1995, **374** (6524): 736~ 739
- 18 Neilan J G, Lu Z, Afonso C L, *et al.* An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the

Epstein-Barr virus gene BHRF 1. *J Virol*, 1993, **67** (7): 4391~ 4394

- 19 Yang E, Zha J, Jockel J, *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, **80** (2): 285~ 291
- 20 Takayama S, Sato T, Krajewski S, *et al.* Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 1995, **80** (2): 279~ 284
- 21 Hengartner M O, Horvitz H R. C. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, 1994, **76** (4): 665~ 676
- 22 Vaux D L, Weissman I L, Kim S K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 1992, **258** (5090): 1955~ 1957

Recent Advances in Apoptotic Modulating Gene BCL2 Family. LIU Tao-Wen (*Institute of Bioengineering, Guilin Medical College, Guilin 541004, China*).

Abstract The regulation of apoptosis is an essential mechanism for physiological cell death and tumorigenesis. The analysis of the genetic mechanisms responsible for susceptibility to or protection from apoptosis stimuli not only enables us to gain insight into tumor cell biology, but may also prove useful in the development of new therapeutic strategies. Among the proteins coded by the genes of BCL2 family, BCL2, BCL-X_L, MCL-1, CED-9, BAG-1, E1B-194 and A1 act as death repressors, whereas BAX, BAK, BCL-X_s and BAD promote cell death. These different functions were shown to be mediated by homodimerization/heterodimerization of the various family members. Therefore a critical balance between molecules above may determine the fate of cells in response to apoptosis-inducing conditions.

Key words apoptosis, BCL2 family, mechanism, BCL2/BAX

蛋白质 C 端(异)硫氰酸法序列测定反应机理及进展*

莫碧兰 李 江 梁宋平

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要 蛋白质 C 端测序是蛋白质化学与分子生物学中一门有重要意义的技术, 由 Schlack 和 Kumpf 于 1926 年提出的(异)硫氰酸法在该领域发展迅速并占主导地位. 对(异)硫氰酸法的反应机理, 最新进展以及标准乙内

* 国家自然科学基金资助项目 (39570156). 收稿日期: 1998-01-15, 修回日期: 1998-04-20

酰硫脲氨基酸制备进行了较详尽的介绍。

关键词 蛋白质 C 端测序, (异) 硫氰酸法, 活化反应, 偶联反应, 环化反应, 裂解反应, 乙内酰硫脲氨基酸

学科分类号 Q51

蛋白质序列测定是蛋白质化学中十分关键的一项技术, 包括 N 端和 C 端测序两种策略. 1950 年, Edman^[1] 提出以化学降解从蛋白质 N 端依次切下氨基酸残基然后进行分析测定, 目前 Edman 降解作为 N 端测序方法已十分完善并实现仪器自动化. 随着蛋白质结构化学及分子生物学的发展, 基于诸多原因, 对蛋白质 C 端序列测定技术的需要日益增加. 蛋白质 C 端序列测定方法目前有化学法、酶法、C 端片段分离法以及物理法等, 屠红, 夏其昌曾作过较全面综述^[2]. 随着质谱软电离技术的发展, 采用酶法与基质辅助激光解吸/电离质谱 (MALDI MS) 相结合用于 C 端测序, 具有一定前景^[3, 4]. 在蛋白质 C 端测序的化学法中, Schlack 和 Kumpf (1926 年)^[5] 提出的 (异) 硫氰酸法反应机理与 Edman 降解类似, 是最有希望成为常规 C 端序列测定的方法. 随着该方法日渐成熟, 已逐步实现其仪器自动化, 并用于实际工作^[6~12]. (异) 硫氰酸法又称 Schlack-Kumpf 降解, 一般包括羧基活化、偶联、环化和裂解反应四个步骤, 然而除 Stark^[13] 曾对其反应机理作出一些合理推测外, 这方面的深入研究较少, 为使该法最终成为理想的常规蛋白质 C 端序列测定技术, 对其反应机理探讨很有必要. 本研究室自 1994 年以来, 致力于 (异) 硫氰酸法反应机理及方法学方面的研究, 并取得一些进展. 本文就 Schlack-Kumpf 降解四个步骤反应机理, 最新进展以及标准乙内酰硫脲氨基酸制备等方面作了扼要介绍.

1 羧基活化反应

(异) 硫氰酸法关键步骤是偶联反应, 而偶联反应实质是蛋白质 C 端羧基碳原子被偶联试剂分子亲核进攻, 形成蛋白质异硫氰酸酯衍生物. 由于羧基碳原子对亲核反应呈现钝性, 因此在进行亲核反应前, 必须事先活化.

1.1 反应机理

羧基活化方法很多, 用于蛋白质 C 端序列测定中的通常可分为三类: 混合酸酐法, 活化酯法和碳二亚胺法.

1.1.1 混合酸酐法: 该法是 (异) 硫氰酸法中最简便高效也是应用最广泛的一种羧基活化方法, 所用

试剂是酸酐或酰卤. 反应过程中, 羧基负离子作为亲核试剂, 对活化试剂分子亲电中心 (碳原子或磷原子) 进行亲核进攻, 形成蛋白质羧基端的混合酸酐, 而混合酸酐的形成又使羧基碳原子带有更多部分正电荷 ($\delta+$), 利于偶联反应, 从而达到活化目的.

1.1.2 活化酯法: 因羧酸甲酯和乙酯等常见简单酯衍生物活性太低, 无法在较短时间、较低温度下发生羧基碳的亲核反应, 因此, 增加酯化合物中醇组分的吸电子能力必将提高羧基碳原子的正电性而有利于偶联反应, 活化酯法正是利用以上原理. 这类活化试剂分子中存在一个正电荷中心, 活化反应使该正电荷中心成为活化酯分子醇组分, 而醇组分的强吸电子性使羧基碳原子带有更多部分正电荷 ($\delta+$), 利于偶联反应.

1.1.3 碳二亚胺法: 碳二亚胺类化合物结构通式为 $R-N=C=N-R'$, 蛋白质羧基可与之反应生成活化体 O-酰基脒, 也可看成一种特殊的活化酯, 反应机理类似于活化酯法.

1.1.4 活化中间体: 在以上三种活化反应中, 目的产物由于挂上一个吸电子基团, 使羧基碳原子带有更多部分正电荷 ($\delta+$), 为偶联反应提供有利环境. 由于羧基碳原子部分正电荷 ($\delta+$) 的增加, 蛋白质 C 端第二个残基的羧基氧原子可对其亲核进攻, 生成五元环衍生物: 恶唑烷酮, 已被核磁共振氢谱 (1H NMR) 所证实^[14]. 因此上述三种活化方法反应中恶唑烷酮才是蛋白质羧基的最终活化形式, 由于恶唑烷酮是一种十分理想的酰化试剂, 使偶联反应变得相对容易.

1.2 进展

混合酸酐法最经典也最高效, Schlack 和 Kumpf 最初提出 (异) 硫氰酸法就是使用该活化法, 当时采用的活化试剂是乙酸酐, 效果较佳, 沿用至今, 后来, Boyd^[14] 使用二苯磷酰氯以及四苯焦磷酸获得成功, 最近, Anumula 等^[15] 用乙酰氯作用作为活化试剂, 给出较好结果.

活化酯法效果不如混合酸酐法, Boyd 曾作过有益尝试, 使用氯化四甲基脒^[14] 和苯并三唑基四甲基脒六氟磷酸盐^[6] 进行活化, 发现反应速度较慢. 碳二亚胺法类似于活化酯法, Boyd^[6] 以及本研究室均对此方法进行过摸索, 效果不太令人满意.

2 偶联反应

偶联效率一直是(异)硫氰酸法难以常规化的最大瓶颈。N端测序和C端测序最大的区别在于偶联反应的机理不同, N端测序(Edman降解)的偶联反应是利用蛋白质N端氨基亲核性与PITC分子中异硫氰基碳原子被亲核性进行反应生成硫脲衍生物;而C端测序(Schlack-Kumpf降解)则是利用蛋白质C端羧基碳原子被亲核性与硫氰酸根离子或异硫氰基氮原子亲核性进行反应生成异硫氰酸酯衍生物。由于氨基氮原子与羧基碳原子化学活泼性相距甚远,使Schlack-Kumpf降解的偶联产率很难与Edman降解媲美,因此寻求一种高效偶联试剂成为当务之急。经过系统研究,我们将目前(异)硫氰酸法常用偶联试剂分为三大类^[16]。I: 离子化合物类; II: 含易离去基团类; III: 含活泼基团类。

2.1 反应机理

2.1.1 I类偶联试剂: I类试剂是离子化合物类,其主体或有效成分是硫氰酸根负离子(SCN^-),可直接对被活化的蛋白质羧基碳原子亲核进攻,生成异硫氰酸酯衍生物。大量实验表明, I类试剂可在较低温度下完成偶联反应,且测序结果并不比异硫氰酸类试剂逊色。

2.1.2 II类偶联试剂: II类试剂分子中存在一个较大体积的供电子基团,由于空间效应和异硫氰基的吸电子性,使该供电子基团易于离去,剩下异硫氰酸根负离子(NCS^-)呈“裸露”状态,成为较强的亲核基团,进攻被活化的羧基碳原子生成蛋白质异硫氰酸酯衍生物。

2.1.3 III类偶联试剂: III类试剂不同于I类和II类试剂,具有活化偶联双重功能。由于其试剂分子中含有磷酰基或碳酰基等活泼基团,异硫氰基的吸电子作用使这些活泼基团的亲电中心磷原子或碳原子带有更多部分正电荷(δ^+),易于与羧基负离子反应生成混合酸酐类似物中间体,完成活化功能,然后重排去除酸根负离子,形成异硫氰酸酯衍生物,完成偶联功能。

2.2 进展

I类试剂在(异)硫氰酸法中出现最早, Schlack-Kumpf降解首次提出时就是用硫氰酸^[5]测序获得成功。时至今日,硫氰酸胺、硫氰酸钾、硫氰酸钠等还被Inglis^[17]和Boyd等^[14]用于C端测序。

II类试剂应用广泛。Shenoy等^[7]使用三甲基

硅异硫氰酸酯和三丁基锡异硫氰酸酯,效果良好, Wittmann-Liebold^[8]则采用异硫氰酸胍获得成功。

III类试剂的活化偶联双重功能及其高效性使之非常适用于(异)硫氰酸法,是较理想的选择,近年来发展迅速。1991年, Hawke^[9]发现苯甲酰异硫氰酸酯用于C端测序十分有效, Bailey^[10, 11]和Miller等^[12]采用二苯磷酰异硫氰酸酯得到理想结果,最近Anumula^[18]报道乙酰异硫氰酸酯用于C端测序,本研究室改进并发展了这一方法^[16],使之更加简便高效。

3 环化反应

同Edman降解一样,(异)硫氰酸法偶联反应生成蛋白质异硫氰酸酯衍生物,必须经过环化才能使C端第一个酰胺键的性质有别于肽链中其他酰胺键,从而裂解反应只切除第一个氨基酸残基而不损害整个肽链。

3.1 反应机理

随着偶联反应的完成,得到蛋白质异硫氰酸酯衍生物,酰基的连接使异硫氰基碳原子带有更多部分正电荷(δ^+),成为较强亲电中心,与C端第一个残基氮原子发生反应,环化生成乙内酰硫脲衍生物。在(异)硫氰酸法中,环化反应相对容易进行,反应温度较低,时间较短。

3.2 进展

由于环化反应较易进行,没有专门试剂和条件促使其完成,随着研究的日益深入,许多文献^[9~12]均报道吡啶、咪唑等三级胺的存在对环化反应起催化作用,本研究室^[16]的一些摸索也说明三乙胺、N-甲基吗啉等有利于环化反应。由于三级胺试剂分子与异硫氰基碳原子反应,形成四级胺正离子,而正电荷的强吸电子性使碳原子带更多部分正电荷(δ^+),提供一个高活性亲电中心,加速了环化反应。

4 裂解反应

Schlack-Kumpf降解的裂解反应产生C端的乙内酰硫脲氨基酸(TH-AA)和C端缩短一个残基的肽,这是能继续从C端逐个进行序列分析的前提和保障。总结各种裂解方法,(异)硫氰酸法裂解反应实质是碱催化,酸催化或亲核试剂催化的水解反应。

4.1 反应机理

4.1.1 碱催化裂解反应: 碱催化指的是专一碱催

化, 即 OH^- 催化, 其反应机理类似于酯的碱催化双分子酰氧裂解反应历程 ($\text{B}_{\text{AC}}2$). 反应属亲核加成消除机制, OH^- 作为强亲核试剂, 对蛋白质 C 端第二个残基羰基碳原子进攻, 形成一个四面体中间物负离子, 然后脱除乙内酰硫脲氨基酸, 形成 C 端缩短了一个残基的肽.

4.1.2 酸催化裂解反应: 酸催化指的是专一酸催化, 即 H^+ 催化, 其反应机理类似于酯的酸催化双分子酰氧裂解反应历程 ($\text{A}_{\text{AC}}2$). H^+ 使蛋白质 C 端第二个残基羰基氧原子质子化, 正电荷的存在使羰基碳原子亲电能力增大, 与亲核能力不大的水分子反应形成四面体中间物正离子, 然后脱除乙内酰硫脲氨基酸, 形成 C 端缩短了一个残基的肽.

4.1.3 亲核试剂催化裂解反应: 某些有机酸或碱无法解离产生高浓度 $[\text{H}^+]$ 或 $[\text{OH}^-]$, 但其试剂分子本身具亲核性, 可催化裂解反应. 反应属亲核加成消除机制, 亲核试剂分子对蛋白质 C 端第二个残基羰基碳原子进攻, 形成一个四面体中间物负离子, 然后脱除乙内酰硫脲氨基酸, 最后水解消除亲核基团, 形成 C 端缩短了一个残基的肽.

4.2 进展

1926 年, Schlack 和 Kumpf^[5] 利用盐酸来完成裂解反应, 后来由于酸催化裂解反应产率不高, 即引入碱催化裂解反应, 常用试剂为氢氧化钠和氢氧化钾^[17], 而碱催化速度太快, 难以控制, 才涌现出亲核试剂催化裂解反应, Hawke^[9] 采用哌啶, Bailey^[10, 11] 采用三甲基硅醇钠达到满意结果. Boyd 等^[19, 20] 对环化形成的乙内酰硫脲肽 (TH-肽) 进行烷基化处理, 得到离去性更强的烷基化 TH-肽 (ATH-肽), 从而提高裂解产率.

5 标准乙内酰硫脲氨基酸制备

采用 (异) 硫氰酸法进行蛋白质 C 端序列测定, 其相应乙内酰硫脲氨基酸 (TH-AA) 的制备是必须解决的首要问题. Yamashita^[21] 采用乙酸酐作为活化试剂, 硫氰酸钠作为偶联试剂, 制备了所有 20 种 TH-AA. 然而, 由于某些氨基酸的低溶解性, 侧链基团的反应活性以及产物 TH-AA 的相对不稳定性, 致使某些 TH-AA 按经典方法制备十分困难. Swan^[21] 报道无法制备 TH-Arg, TH-Ser, TH-Asp 和 TH-Glu, Cromwell 等^[21] 在制备 TH-Asp 和 TH-Pro 时未获成功, Suzuki 则改进 Swan 方法后, 制备了所有 20 种 TH-AA^[21]. 本研究室以 L-氨基酸为原料, 采用乙酰氯代替乙酸酐作为

活化试剂, 三甲基硅异硫氰酸酯为偶联试剂, 制备了所有 20 种 TH-AA^[22]. 由于脯氨酸的特殊结构, TH-Pro 的制备一直是标准 TH-AA 制备的一大难点. 1993 年, Inglis^[17] 采用乙酰化脯氨酸作为原料制备 TH-Pro 获得成功, 本研究室^[23] 采用 L-脯氨酸为原料, 发展了一种更为简便高效制备 TH-Pro 的方法. 由于 TH-AA 烷基化后, 可成为良好的离去基团, 有利于 C 端测序, 故 Boyd 等^[19, 20] 采用 ATH-AA 作为标准.

6 结 语

自从 1926 年 Schlack 和 Kumpf 提出 (异) 硫氰酸法用于蛋白质 C 端序列测定以来, 发展至今, 已有 70 余年时间, 随着各种分析检测手段的出现, (异) 硫氰酸法获得迅猛发展, 新的羧基活化方法, 偶联方法, 环化方法以及裂解方法层出不穷, 但迄今为止, 做得最好的 C 端测序结果不过十几个残基, 绝大多数少于 10 个残基. 更高效偶联试剂, 更温和反应条件以及更精密可靠仪器将成为蛋白质 C 端测序方法学领域中有待解决的课题, 也是 21 世纪蛋白质 C 端测序方法学的发展趋势. 随着 Schlack-Kumpf 降解反应机理的逐步明了, 随着人们对其化学本质认识的逐步深入, 相信 (异) 硫氰酸法常规化将为期不远.

参 考 文 献

- 1 Edman P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand*, 1950, **4** (2): 283~293
- 2 屠红旻, 夏其昌 (Tu H M, Xia Q C). 蛋白质和多肽 C 端氨基酸序列研究进展. *生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys)*, 1993, **20** (3): 181~185
- 3 Patterson D H, Tarr G E, Regnier F E, *et al.* C-terminal ladder sequencing via matrix-assisted laser desorption mass spectrometry coupled with carboxypeptidase Y time-dependent and concentration-dependent digestions. *Anal Chem*, 1995, **67** (21): 3971~3978
- 4 Bonetto V, Bergman A-C, Jomvall H, *et al.* C-terminal sequence determination of modified peptides by MALDI MS. *J Protein Chem*, 1997, **16** (5): 371~374
- 5 Schlack P, Kumpf W. Über eine neue methode zur Ermittlung der konstitution von peptiden. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1926, **154** (1): 125~170
- 6 Boyd V L, Bozzini M, Zon G, *et al.* Sequencing of peptides and proteins from the carboxy terminus. *Anal Biochem*, 1992, **206** (2): 344~352
- 7 Shenoy N R, Shively J E, Bailey J M. Studies in C-terminal sequencing: new reagents for the synthesis of peptidylthiohydantoins. *J Protein Chem*, 1993, **12** (2): 195~205
- 8 Wittmann-Liebold B, Matschull L, Pilling U, *et al.* Modular Berlin microsequencer for the sequential degradation of proteins and peptides from the amino- and carboxyl-terminal ends. In: Jomvall H, eds. *Methods in Protein Sequence Analysis*. Basel: Birkhauser

- Verlag, 1991. 9~ 21
- 9 Hawke K H, Boyd V L. Chemical C-terminal sequencing. In: Jornvall H, eds. *Methods in Protein Sequence Analysis*. Basel: Birkhauser Verlag, 1991. 35~ 45
 - 10 Bailey J M, Tu O, Issai G, *et al.* C-terminal sequence analysis of polypeptides containing C-terminal proline. In: Crabb J W ed. *Techniques in Protein Chemistry VI*. San Diego: Academic Press, 1995. 239~ 247
 - 11 Bailey J M, Miller C G. Automated methods for C-terminal protein sequencing. In: Smith B J ed. *Protein Sequencing Protocols*. Totowa: Humana Press, 1997. 259~ 269
 - 12 Miller C G, Hawke D H, Tso J, *et al.* Automated C-terminal protein sequence analysis using the Hewlett-Packard G1009A C-terminal protein sequencing system. In: Crabb J W ed. *Techniques in Protein Chemistry VI*. San Diego: Academic Press, 1995. 219 ~ 227
 - 13 Stark G R. Sequential degradation of peptides from their carboxyl termini with ammonium thiocyanate and acetic anhydride. *Biochemistry*, 1968, **7** (9): 1796~ 1807
 - 14 Boyd V L, Bozzini M, Guga P J, *et al.* Activation of the carboxy terminus of a peptide for carboxy-terminal sequencing. *J Org Chem*, 1995, **60** (11): 2581~ 2587
 - 15 Anumula K R, Tang S. Novel chemistry for sequencing of proteins from carboxyl terminus yields a simple method. *FASEB J*, 1995, **9** (6): 1275
 - 16 Mo B L, Li J, Liang S P. Chemical carboxy-terminal sequence analysis of peptides using acetyl isothiocyanate. *Anal Biochem*, 1997, **252** (1): 169~ 176
 - 17 Inglis A S, De Luca C. A new chemical approach to C-terminal microsequence analysis via the thiohydantoin. In: Imahori K, Sakiyama F eds. *Methods in Protein Sequence Analysis*. New York: Plenum Press, 1993. 71~ 78
 - 18 Anumula K R, Tang S. Carboxy terminal sequencing of protein by a novel manual method. *FASEB J*, 1996, **10** (8): 2956
 - 19 Boyd V L, Bozzini M, Zon G, *et al.* Sequencing of peptides and proteins from the carboxy terminus. *Anal Biochem*, 1992, **206** (2): 344~ 352
 - 20 Bozzini M, Zhao J, Yuan P-M, *et al.* Applications using an alkylation method for carboxy-terminal protein sequencing. In: Crabb J W ed. *Techniques in Protein Chemistry VI*. San Diego: Academic Press, 1995. 229~ 237
 - 21 Inglis A S. Chemical procedures for C-terminal sequencing of peptides and proteins. *Anal Biochem*, 1991, **195** (1): 183~ 196
 - 22 Mo B L, Li J, Liang S P. A method for preparation of amino acid thiohydantoin from free amino acids activated by acetyl chloride for development of protein C-terminal sequencing. *Anal Biochem*, 1997, **249** (2): 207~ 211
 - 23 莫碧兰, 李江, 梁宋平 (Mo B L, Li J, Liang S P). 一种用于蛋白质C端序列测定的脯氨酸乙内酰硫脲 (TH-Pro) 新制备方法. *中国生物化学与分子生物学报* (*Chin J Biochem Mol Biol*), 1998, **14** (2): 186~ 191

Mechanism and Progress of (iso)Thiocyanate Approach for C-Terminal Sequence Analysis of Proteins. MO Bi-Lan, LI Jiang, LIANG Song-Ping (Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410081, China).

Abstract Protein C-terminal sequence analysis is an important technique in protein chemistry and molecular biology. (iso)Thiocyanate approach appears to be the prevailing method since it was first described by Schlack and Kumpf in 1926. The chemical mechanism, the advances of (iso)thiocyanate approach and the preparation of amino acid thiohydantoin are reviewed and discussed in detail.

Key words protein C-terminal sequencing, (iso)thiocyanate approach, activation, coupling, cyclization, cleavage, amino acid thiohydantoin

细胞外基质与基质金属蛋白酶*

赵云阁 欧尔比特·安尼瓦尔¹⁾ 祝 诚

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 细胞外基质 (ECM) 是存在于细胞之间的动态网状结构, 由胶原、蛋白聚糖及糖蛋白等大分子物质组成。这些大分子物质可与细胞表面上的特异性受体结合, 通过受体与细胞骨架结构直接发生联系或触发细胞内的一系列信号传导而引起不同的基因表达, 从而导致细胞的生长和分化。作为降解 ECM 成分最重要的酶-基质金属蛋白酶 (MMPs) 及其组织抑制因子 (TIMPs) 在这一过程中起着非常重要的作用。MMPs 是一类依赖金属离子锌并以 ECM 成分为水解底物的蛋白水解酶。其在转录水平的表达受到生长因子、细胞因子及激素等因素的严格调控, 在蛋白质水平其活性也受到其激活剂和抑制剂的调节。MMPs 通过对 ECM 成分的水解来影响其降解与重组的动态平衡而参与多种细胞的生理和病理过程。

关键词 细胞外基质, 基膜, 基质金属蛋白酶, 基质金属蛋白酶组织抑制因子

学科分类号 Q26

* 95 攀登预选项目。 ¹⁾ 新疆师范大学生物学系, 乌鲁木齐 830053.

收稿日期: 1998-02-23, 修回日期: 1998-06-15