

- 基金 (Bulletin of National Natural Science Foundation of China), 1998, 12 (1): 23~ 26
- 7 张 静, 刘次全, 来鲁华, 等 (Zhang J, Liu C Q, Lai L H, *et al.*). mRNA 可能携带三维遗传信息. 动物学研究 (Zoological Research), 1997, 18 (2): 封二, 138
- 8 Cho Y, Gorina S, Jeffrey P D, *et al.* Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science, 1994, 265: 346~ 335
- 9 Geourjon C, Deleage G. Significant improvements in protein secondary structure prediction by prediction from mutiple alignments. Compt Appli Biosc, 1995, 11: 681~ 684
- 11 Marston N J, Jenkins J R, Vousden K H. Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not PVH E6. Oncogene, 1995, 10: 1709~ 1715
- 12 Lee S, Elenbaas B, Levine A, *et al.* p53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell, 1995, 81: 1013~ 1020
- 13 Bakalkin G, Selivanova G, Yakovieva T, *et al.* p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. Nucleic Acids Research, 1995, 23: 326~ 369
- 14 Hupp T R, Sparks A, Lane D P. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. Cell, 1995, 83: 237~ 245
- 15 Jayaraman L, Prives C. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminal. Cell, 1995, 81: 1021~ 1029
- 16 Bayle J H, Elenbaas B, Levien A J. The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 5729~ 5733

The Three Dimensional Structure and Biological Domains of the p53 C-terminus. ZHANG Yan (*Kunming Medical College. Kunming 650031, China*); LIU Ci-Quan (*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences. Kunming 650223, China*).

Abstract It was expected that there are a coil (289 ~ 325) and two α helix (α_1 368~ 373, α_2 381~ 388) structures in p53 protein C-terminal region based on its mRNA secondary structure template and Chou-Fasman's protein secondary structure principle of prediction. The result was conformed by the other four methods of protein secondary structure prediction that are based on the multiple sequence alignment (accuracy = 73.20%). Combine with the 31 amino acids crystal structure of the oligomerization, the three dimensional conformation of p53 C-terminal 108 residues was built using the SGI INDIGO² computer. This structure further expounds the relationship among those biological function domains of p53 C-terminus at three-dimensional level.

Key words p53 protein, secondary structure prediction, mRNA secondary structure

蓖麻毒素 A 链突变体的设计、表达与活性研究

裴武红 冯健男 雷红星 黎 燕 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 利用蛋白质结构同源模建并结合表观静电势分析, 设计了拟具有生物学活性的蓖麻毒素 A 链的突变体. 将 PCR 扩增的突变体基因, 导入 pKK223-3 载体中, 于大肠杆菌 (*E. coli*) 中获得高效、可溶性表达, 而且, 确证了表达产物具有预期的生物学活性.

关键词 蛋白质同源模建, 蓖麻毒素 A 链突变体, 基因表达, 分子设计

学科分类号 R392.11

免疫毒素是由特异性导向的单克隆抗体与强毒性的弹头进行蛋白质交联而得到, 用于治疗肿瘤等顽症. 蓖麻毒素 (ricin) 是常用的弹头成分, 由 A、B 两条链构成, 其毒性部分 A 链是一种 N-糖苷酶, 可以使 28S 核糖体在 4324 位脱去一个腺嘌呤, 从而抑制蛋白质合成, 导致真核细胞的死亡. B 链是一种半乳糖结合型蛋白, 几乎可结合于所有的真核细胞表面. 用原核系统表达重组的蓖麻毒素 A

链 (recombinant ricin toxin A chain, rRTA), 不但可以排除 B 链的影响, 克服了天然 ricin 对细胞的非特异性结合; 而且也不发生糖基化, 在体内不易被快速清除^[1]. 目前免疫毒素在临床上的应用还不理想, 主要原因之一是其分子大, 不易渗透到肿瘤组织内部. 为了解决这一问题, 可以从两个方面着手, 用基因工程方法生产单链抗体代替天然

收稿日期: 1998-03-13, 修回日期: 1998-08-17

的单克隆抗体, 或改构天然弹头蛋白的核苷酸序列, 力求降低其分子质量. 本文正是基于这一思想, 设计了部分核苷酸序列删除的蓖麻毒素 A 链突变体 (mutant ricin toxin a chain, mRTA), 采用原核系统进行了表达, 表达产物纯化后, 进行了活性测定.

1 材料与方法

1.1 材料

mRTA 三维结构利用 BioSym 公司 Insight II 软件模建设计; pKK223-3 载体及蓖麻毒素 A 链基因、菌株 TG2、蓖麻毒素 A 链突变体的扩增引物、细胞株 HSB2 由本室保存, *Eco*R I、*Hind* III、T4 连接酶购自 Promega 公司, Q-Sepharose 购自 Pharmacia 公司.

1.2 方法

1.2.1 DNA 体外操作技术: 参考文献 [2].

1.2.2 重组蛋白的表达: 重组质粒转化 TG2 受体菌, 转化子 37℃活化过夜后, 1% 接种于新鲜的 LB 培养基中, 37℃培养 1.5 h 后, 转入 30℃培养至 A₆₀₀ 约 0.6, 然后加入 IPTG 达终浓度 1 mmol/L, 30℃诱导 3 h, 收集菌体, 15% SDS-PAGE 分析表达量.

1.2.3 重组蛋白的蛋白质印迹鉴定: 先将 SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 酪蛋白封闭后, 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗 ricin 多克隆抗体, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色.

1.2.4 表达产物的 Q-Sepharose 纯化: 30 ml Q-Sepharose 预先用 10 mmol/L pH 7.4 的 Tris 缓冲液平衡, 然后将表达产物的超声上清缓慢流过层析柱, 收集未被 Q-Sepharose 吸附的蛋白, 然后用含有 1 mol/L NaCl 的 10 mmol/L pH 7.4 的 Tris 缓冲液洗脱杂蛋白, 用 15% SDS-PAGE 分析.

1.2.5 细胞毒性测定参照文献 [3], 以 HSB2 为靶细胞, 将其悬浮于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中, 调整细胞浓度为 10⁶/ml, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl, 再加入系列浓度的毒素液, 37℃ 5% CO₂ 孵箱培育 24 h, 然后加入 10 μl 噻唑蓝 (MTT), 继续培育 6 h 后, 加入 100 μl 0.1 mol/L HCl/10% SDS, 37℃处理过夜, 590 nm 测定吸光值.

2 结果与讨论

2.1 mRTA 的设计

利用 Insight II 软件中 Fasta 程序全面搜索 PDB

蛋白质数据库, 获得 RicinA 的同源蛋白, 表 1 列出了 RicinA 同源蛋白^[4]及同源性分数.

表 1 RicinA 与五种蛋白质的同源性比较

同源蛋白	同源性分数
Pdb1abr. ent	0.842
Pdb1ahc. ent	0.891
Pdb1mom. ent	0.813
Pdb1mrh. ent	0.805
Pdb1mrj. ent	0.906

RicinA 及五种高同源性蛋白的三维晶体结构已经知道, 对上述六种蛋白质进行多序列比较 (alignment), 通过计算对比序列块的统计分数, 决定该蛋白质家族共同具有的结构保守区 (SCR).

对 RicinA 氨基端删除 13 个氨基酸 (¹I~¹³T), 羧基端删除 8 个氨基酸 (²⁶⁰A~²⁶⁷F), 设计了 mRTA. 利用同源模建 HOMOLOGY 方法 (Homology User Guide, Version 95.5, BioSym Technologies, San Diego, 1995), 对其赋入坐标, 以确定 mRTA 保守区、LOOP 区的三维结构. 考虑到 mRTA 保守区与 LOOP 区的 N 端、C 端连接处肽键的可能不合理性, 采用分子力学中 Amber 力场对连接处肽键进行优化, 使其结合处结构趋于合理; 利用分子力学分别对各保守区、LOOP 区中排斥力大、张力较大处进行计算优化, 初步预测出设计蛋白质的三维结构, 最后对整个设计的蛋白质进行分子力学优化^[5]和分子动力学模拟 (Discover User Guide, Version 95.5/3.0.0, Biosym/MSI, San Diego, 1995) 获得其最优结构, 获得的最优结构如图 1 所示.

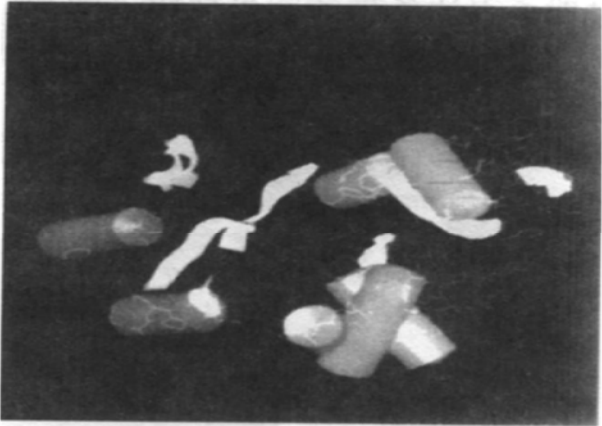


图 1 最优化的 mRTA 设计

获得的 mRTA 三维结构, 通过 Insight II 软件与 RicinA 晶体结构进行结构对比 (alignment), 回

归性分析发现其结构同源性高达 87.2%， α 碳距离矩阵均方根偏差 (RMS) 为 0.575。经过对比分析表明，mRTA 将表现出与 RicinA 近似的活性。

为了进一步研究 mRTA 的性质，利用 Insight II 软件中 Delphi 程序，应用泊松-波尔兹曼方程分别对 mRTA 和 RicinA 进行了表观静电势分析，

图 2 给出了 RicinA 和 mRTA 表观静电势分布情况。从图 2 中不难发现结果发现，RicinA 与 mRTA 的表观静电势分布相似性很高，表明 mRTA 相对于 RicinA 而言，电性未发生很大变化，表面的氢键分布、范德华力场均无大的变化，mRTA 将具有与 RicinA 近似的功能与性质。

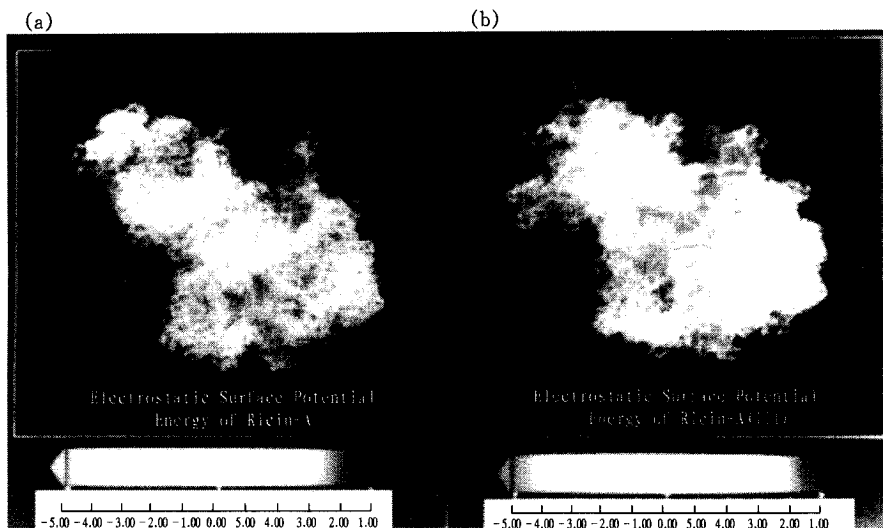


图 2 mRTA 的表观静电势分布情况
(a) 完整 RTA 的表观静电势分布；(b) mRTA 表观静电势分布。

为了确认理论预测的结果，我们利用分子生物学进行了 mRTA 的基因扩增及表达构建，进而进行了其活性研究。

2.2 重组质粒的构建与表达

mRTA 的 PCR 扩增片段经 *EcoR* I、*Hind* III 酶切，回收 780 bp 片段，导入相应酶切的 pKK223-3 载体中，IPTG 诱导进行非融合表达，SDS-PAGE 分析全菌体蛋白，在稍低于 Ricin A 链的位置出现了表达条带的明显变粗 (图 3)。

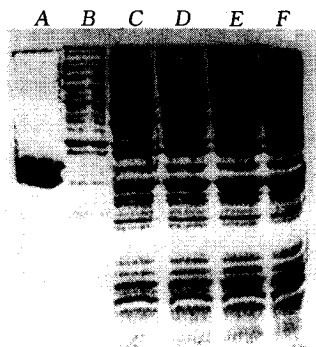


图 3 SDS-PAGE 分析 mRTA 的表达情况
A: 天然的 Ricin (A 链 31 ku, B 链 33 ku); B: 未诱导的 pKKmRTA/TG2; C~F: 诱导的 pKKmRTA/TG2。

2.3 表达产物的蛋白质印迹鉴定

在免疫转移膜上稍低于天然 Ricin-A 链的位置，出现了明显的 DAB 显色条带，说明表达产物是重组的 Ricin A 链突变体。

2.4 表达产物的 Q-Sepharose 纯化

表达产物的超声上清缓慢流过 Q-Sepharose 柱，收集未被柱体结合的蛋白峰，SDS-PAGE 分析表明，我们得到了分子质量约 29 ku 的蓖麻毒素 A 链突变体，其纯度达 80% 左右 (图 4)。蛋白质的紫外定量得知，蓖麻毒素 A 链突变体的得率约为 15mg/L 发酵液。这种纯化方法操作简单，只用



图 4 Q-Sepharose 纯化的 mRTA
A: 纯化的 mRTA; B: 天然的 Ricin (A 链 31 ku, B 链 33 ku)。

(下转第 294 页, Continued on page 294)

LI Chun-Hai, ZHU Yun-Feng, SUN Li-Ya, YAN Chun-Hong, ZHANG Li-Xin, FENG Dong-Xiao, CHEN Gao-Ming (*Research Clinic, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*).

Abstract Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) plays important role in tumor invasion and metastasis. MMP-2 is expressed in yeast expression system for further studying its function mechanism. The expression sequence of MMP-2 (gelatinase A) have been obtained by PCR amplifying, restriction

enzyme cut and sequencing analysis demonstrate that the sequence is correct. The expression vector pPIC9/GelA containing gelatinase A sequence is constructed and transformed the yeast *Pichia pastoris*. The gelatin enzymography demonstrate that recombinant protein secreted by transformant yeast is capable of degrading gelatin and the molecular weight of the matrix metalloproteinase-2 is 66 ku in SDS-PAGE.

Key words matrix metalloproteinase-2, *Pichia pastoris*, expression

(上接第 272 页, Continued from page 272)

Q-Sepharose 一步就获得了较高纯度的蓖麻毒素 A 链突变体.

2.5 mRTA 对 HSB2 细胞的细胞毒作用

细胞毒测定结果表明, mRTA 在为 10^{-6} mol/L 时, 对 HSB2 细胞的杀伤率达到 31%, 说明我们所表达的 mRTA 是具有生物学活性的, 只是其毒性比完整的蓖麻毒素 A 链 (它在 10^{-6} mol/L 时可达 60% 的杀伤率) 有所降低. 所以, 进一步改善预测模型, 设计出更合理的 mRTA, 使其能具有更强的毒性, 是我们努力的目标.

参 考 文 献

- 1 Lord J M, Roberts L M, Robertus J D, *et al.* Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*, 1994, **8** (2): 201~ 208
- 2 Sambrook J, Frish E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 16~ 69
- 3 Day P J, Ernst S R, Frankel A E, *et al.* Structure and activity of an active site substitution of ricin a chain. *Biochemistry*, 1996, **35** (34): 11098~ 11103
- 4 Blunder T L, Sibanda B L, Sternberg M J E, *et al.* Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 1987, **326** (6111): 347~ 352

- 5 Mackay D H, Cross A J, Hagler A T. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. New York: Plenum Press, 1989. 317~ 330

The Modeling, Expression and Activity Study of Mutant Ricin Toxin A Chain. PEI Wu-Hong, FENG Jian-Nan, LEI Hong-Xing, LI Yan, SHEN Bei-Fen (*Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Combined protein homologous modeling with analysis of electrostatic surface potential energy, mutant ricin toxin A chain, which was suggested to be bioactive, was designed. The gene of ricin toxin A chain was amplified by PCR and inserted in pKK223-3 to construct a prokaryotic expression vector, which was highly expressed in *E. coli* system. Moreover, the expression products showed obvious cytotoxicity, just in agreement with the prediction of modeling.

Key words protein homologous modeling, mutant ricin toxin A chain, gene expression, molecular design