

蛋-脑啡肽、亮-脑啡肽前体的研究

——由 DNA 序列反推蛋白质序列

文 重 黄 震

(北京大学化学系)

提 要

脑啡肽前体序列由于酶的影响及其它原因,在相当一段时间未能确定,直到借助遗传工程技术由核酸序列反推的方法,问题才得以解决。

1975 年 Hughes 等^[1]在猪脑提取液中发现两种五肽。这二者都具有和吗啡相似的作用,能产生镇痛、欣快、催眠等多种生理效应。C 端为蛋氨酸的肽 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) 被命名为蛋氨酸脑啡肽 (Met-enkephalin, 简称蛋-脑啡肽); C 端为亮氨酸的 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) 称为亮氨酸脑啡肽 (Leu-enkephalin, 简称亮-脑啡肽)。这二者在体内含量之比为 3~4:1。继脑啡肽发现之后,1979 年 Bradbury^[2], 李卓浩等^[3]先后报道发现内啡肽 (endorphin)。同年, Goldstein 等^[4]发现力啡肽 (dynorphin)。它们也都具有与脑啡肽类似的作用。Simon, Goldstein 等把这类物质统称为类啡肽 (endorphins)。这类有类啡肽作用的肽已发现 20 余种,据推测这是一类新的神经递质或神经调节物^[5]。

在对脑啡肽的研究中,人们最初对脑啡肽前体的认识是相当混乱的。类啡肽中都含有蛋-脑啡肽和亮-脑啡肽的序列。 β -内啡肽其 N 端的前五个氨基酸的序列与蛋-脑啡肽一致;而力啡肽, α -新-内啡肽 N 端的前五个氨基酸的序列与亮-脑啡肽一致(见图 1)。因此对脑啡肽前体的争论也就不足为怪了。不少人曾认为 β -LPH (β -脂肪酸释放激素) 是蛋-脑啡肽的前体。因为 β -LPH 序列中包含了蛋-脑啡肽、内

β -内啡肽: Tyr · Gly · Gly · Phe · Met · Thr · Ser ·
Glu · Lys...
 β -(61-91)LPH Glu⁶¹...Tyr⁶¹ · Gly · Gly · Phe · Met⁶⁵...Glu⁹¹
蛋-脑啡肽: Tyr · Gly · Gly · Phe · Met
力啡肽: Tyr · Gly · Gly · Phe · Leu · Arg · Arg ·
Ile · Arg...
 α -新-内啡肽: Tyr · Gly · Gly · Phe · Leu · Arg ·
Lys · Pro...
亮-脑啡肽: Tyr · Gly · Gly · Phe · Leu

图 1

啡肽、ACTH (促肾上腺皮质激素)、 β -MSH(β -促黑素细胞激素)等序列,而且完整的 β -LPH 不表现类吗啡活性^[6]。Chretien^[7]等用 ³⁵S-Met 和牛脑下垂体切片保温,从切片中分离出放射性的 β -LPH、 γ -LPH 和 β -内啡肽。于是他认为已证实 β -LPH 是蛋-脑啡肽的前体。Goldstein 等^[4]从猪脑下垂体中分离得到力啡肽,序列测定知道其中有两段亮-脑啡肽的序列。很自然,人们又把力啡肽与亮-脑啡肽的前体联系在一起。

但是,这些推断和结论的证据并不充分。以后的实验表明:经 mRNA 翻译出来的前体的量甚微,而且一经形成很快就被蛋白酶水解成各种碎片^[8-13]。因此,用化学法逐级降解测定的是前体的水解产物,而并非前体本身。面对这类复杂的问题化学法就显得束手无策了。一

方面测定中对样品量上的要求得不到满足;另一方面,酶体系对分析方法本身的影响;还有,类啡肽中都存在与蛋-脑啡肽或亮-脑啡肽相同的序列,干扰前体的确认。所以,解决此问题只能另选良策。

分子遗传学的知识告诉我们,从 DNA 反推可以解决这一难题。由脑啡肽前体的 mRNA 通过反转录、DNA 重组及分子克隆技术可得到足够量的相应 DNA。测定 DNA 序列便可推知脑啡肽前体的氨基酸顺序。脑啡肽前体的确定是该法颇为成功的例子。

1982 年 Comb 等^[14,15]用这种方法确定了人脑啡肽前体。Giraud 等在人嗜铬细胞瘤中发现大量脑啡肽,推测此组织中含脑啡肽信息的 mRNA 一定丰富。于是 Comb 采用嗜铬细胞瘤作实验材料。他们合成了 CAT₆AAGC-CGCC₆TA 寡聚核苷酸作探针。它是蛋-脑啡肽的编码序列,能与前体的 mRNA 特异结合。经过一系列实验,他们初步估计蛋-脑啡肽和亮-脑啡肽源于同一前体,并且分离出了前体的 mRNA。

在反转录酶的作用下,反转录出 c-DNA,并合成双链 c-DNA。用核酸酶 S₁ 切去双链 c-DNA 两端的突环,消除它们对重组的影响。电泳纯化后,用末端转移酶在 c-DNA 的 3' 端接上 poly(dC)。质粒 pBR322 用限制性内切酶 Pst I 切开,3' 端接 poly(dG),然后与已带 poly(dC) 的 DNA “退火”,得到的重组质粒 DNA 转化受体菌 *E. coli* 294。

用四环素筛选含重组质粒的细菌,39℃ 下再繁殖 6 小时,氯霉素扩增。分离出质粒 DNA, Pst I 酶切,切后的 DNA 与经 Pst I 切的 M13mpTRF-DNA 用 T₄ DNA 连接酶连接得重组噬菌体 DNA。以此噬菌体转染 *E. coli* JM103 细胞, DNA 的量得以增殖。

用 Sanger 的末端终止法测定了 DNA 序列,从而得到 mRNA 的序列,最后由遗传密码推出前体的序列。结果证明蛋、亮-脑啡肽源于同一前体。前体由 267 个氨基酸残基组成;N 端有段 24 个氨基酸组成的信号肽(切点在 Ala、

Glu 之间);前体中含有 6 段蛋-脑啡肽序列和 1 段亮-脑啡肽序列。仔细分析还会发现一个有意思的现象,脑啡肽片段两侧均为 Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Arg 等碱性氨基酸包夹,形成一个碱 “box”。

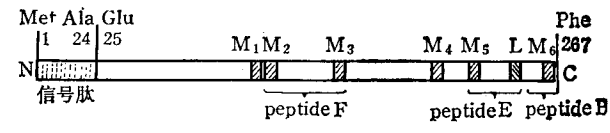


图 2 人脑啡肽前体与 F、E、B 肽

前体在蛋白酶类的作用下,分解产生蛋-脑啡肽、亮-脑啡肽,以及一系列不同长度的含脑啡肽的多肽,现已有不少被测定^[16,17],它们与所测得的前体相吻合。Kilpatrick 等从牛肾髓质嗜铬颗粒中分离出了三种这样的肽,这三条肽段几乎恰好就是人脑啡肽前体中的序列(见图 2)。它们是脑啡肽生物合成的中间产物。

同样采用基因工程技术, Masaharn 等^[18]以牛肾髓质作实验材料,完成对牛脑啡肽前体的测定。他们在前体序列中找到了 F、E、B 肽。牛脑啡肽前体由 263 个氨基酸组成(与人的仅四个氨基酸之差);与人的一样,也有一段 24 个氨基酸的信号肽,同样有六个蛋-脑啡肽序列,一段亮-脑啡肽,并且每段两侧也都为碱性氨基酸包围。这两种同功能体具有惊人的相似之处。

十多种从牛肾上腺髓质分离得到的含脑啡肽多肽(分子量 0.5K—12K)的序列已被测定^[8-13]。Gubler 等^[19]用这些肽段进行拼接,几乎可以拼接出牛脑啡肽前体,至少拼出失去信

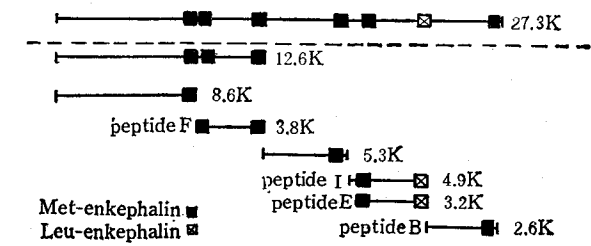


图 3 牛脑啡肽前体及其水解片段

生物硒的研究进展

王 远 亮

(重庆大学应用化学系, 重庆)

提 要

自 30 年代以来, 硒的生物特性得到广泛研究。硒的营养性和毒性与其浓度相关。生物硒在机体内的作用已进行的研究有: 硒在体内平衡, 硒与辅酶 Q 和维生素 E 之间的关系, 硒酶的结构及其催化功能, 硒激活免疫响应和拮抗有毒元素的作用, 以及硒对细胞的影响等。本文对此作了综述。并重点综述了硒与癌症、心血管疾病、大骨节病等的研究进展。

本世纪 30 年代, 第一次发现了硒化物的生物化学特性——对牛及其他家畜有剧烈的毒性。此后关于硒的毒性和营养性开展了众多的基础研究。硒与许多疾病的防治有关, 硒的抗癌变作用尤其引起关注。在我国硒的临床运用

以及预防克山病方面已取得了重大的成果。

一、硒 的 营 养

在经典的化学学科中认为硒化物有毒, 现在实验却表明硒可防癌、抗衰老、拮抗有毒元素

号肽后余下的部分(信号肽在前体产生后很快被切下, 接着迅速被蛋白酶水解, 因而难以获得)(见图 3)。

另外, 早在 1979 年, Nakanishi 等^[20]就曾用 DNA 重组、分子克隆技术完成了内啡肽前体的测定。它由 265 个氨基酸组成, 仅有一段蛋-脑啡肽, 同时它还是 ACTH、 β -LPB 的前体。

1982 年 Kakidani 等^[21]也由 DNA 推出力啡肽前体的序列。力啡肽前体由 256 个氨基酸组成, 含 3 段亮-脑啡肽序列, 其水解产物——力啡肽曾被人们当作亮-脑啡肽的前体。现在一切都真相大白了。

参 考 文 献

[1] Hughes, J.: *Nature*, 1975, 258, 577.
[2] Bradulury, A. F. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 950.
[3] Li, C. H. and Chung, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 1145.
[4] Goldstein, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 6666.
[5] Marx, J. L.: *Nature*, 1981, 294, 80.

[6] Graf, L. et al.: *FEBS Lett.*, 1976, 64, 181.
[7] Chretein, M. et al.: *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and other Peptides*, 1979, pp137—151, Raven Press, New York.
[8] Jones, B. N. et al.: *Archs Biochem. Biophys.*, 1980, 204, 392.
[9] Stern, A. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 1962.
[10] Mizuno, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 95, 1482.
[11] Jones, B. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 3057.
[12] Kilpatrick, D. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 3265.
[13] Kilpatrick, D. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, 103, 698.
[14] Comb, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 360.
[15] Comb, M. et al.: *Nature*, 1982, 295, 663.
[16] Stern, A. S. et al.: *Biosynthesis Modification and Processing of Cellular and Viral Proteins*, 1980, pp 99—111. Academic, New York.
[17] Kilpatrick, D. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 3265.
[18] Masaharn, N. et al.: *Nature*, 1982, 295, 202.
[19] Gubler, U. et al.: *Nature*, 1982, 295, 206.
[20] Nakanishi, S. et al.: *Nature*, 1979, 278, 423.
[21] Kakideni, H. et al.: *Nature*, 1982, 298, 245.

[本文于 1987 年 2 月 6 日收到]