

Jun, Wang Jun, Jia Hongti (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract General initiation factors SL1, TFIID and TFIIB required for initiation of transcription in the three kinds of classic genes in eukaryotic cells respectively are multiprotein complexes that consist of a universal subunit termed TATA-box binding protein (TBP) and a set of TBP associated factors (TAFs). The C terminal domain of TBP, which is highly conserved in a wide variety of species, interacts directly with TATA element

or binds to DNA through TAFs. TAFs are polymerase—specific and promoter-specific. In transcriptional initiation, some of the TAFs are expected to function as adoptors for TBP-DNA interaction, some of them may serve as bridging proteins that allow the other TAFs interact with TBP in the assembly of transcription initiation complex, and some as coactivators may mediate transcription initiation activated by sequence-specific activators.

Key words general initiation factor, TBP, TAFs, transcriptional activation

反义肽及其在生化分离中的应用

林启山 刘国谏

(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

摘要 反义肽是由反义 RNA 编码和翻译的肽. 它可与其正义肽分子发生专一性相互作用. 近年反义肽的这种特异性结合实例研究, 已为其在生化分离领域应用奠定了基础, 尤其是在色谱亲和配基的选择方面, 可以预见不久以反义肽为配基的亲和色谱将是生物工程产品分离的一种有效手段.

关键词 反义肽, 专一性相互作用, 亲和色谱

1 引言

亲和色谱是最理想的色谱分离模式, 它具有高效、高选择性及分离步骤简单等特点^[1]. 然而, 亲和色谱高度的选择性也决定了它的局限性, 一种类型的亲和色谱填料只适合于某种特定的分离对象, 制备适合于某种特定分离对象的亲和色谱填料的关键, 是寻找适合的配基 (ligand). 人们从抗原-抗体、酶-底物、酶-抑制物以及给体和受体的专一性相互作用出发, 利用配对物的专一性相互作用已制得了不少专一性亲和柱, 然而有许多限制性因素影响了这些专一性相互作用更广泛的应用. 例如, 作为配基的物质往往制备困难、价格昂贵, 同时以生

物化学制备的配基往往还含有难以除去的杂质, 这些都给亲和色谱的研究提出了新的要求和课题. 大家知道, 双螺旋结构的 DNA 由互补的正义 (sense strand) 和反义 (anti-sense strand) 两条链组成, 正义链可以转录成 mRNA, 进而翻译成多肽和蛋白质, 也称正义肽或蛋白质; 反义 DNA 链可转录成反义 RNA, 它所编码和翻译的肽和蛋白质为反义肽 (antisense peptide) (图 1)^[2]. 长期以来, 对于反义 DNA 和反义 RNA 的功能并不十分了解, 很早有人推想: 正义肽和反义肽之间应该存在某种互补性相互作用^[3]. 直到 1985 年, Bost 等^[4]通过化学方法合

成了促肾上腺皮质激素 (ACTH) 的反义肽 (HTCAb), 才证实了以上假设, 以此反义肽为抗原所获得的抗体与 ACTH 受体的结构相近, 而且 HTCAb 与 ACTH 抗体之间还存在某种专一性相互作用, 以 HTCAb 为配基制得的亲和柱对 ACTH 显示了很好的分离效果. 此后, 反义肽及其在生化中的应用研究引起了人们关注^[5].

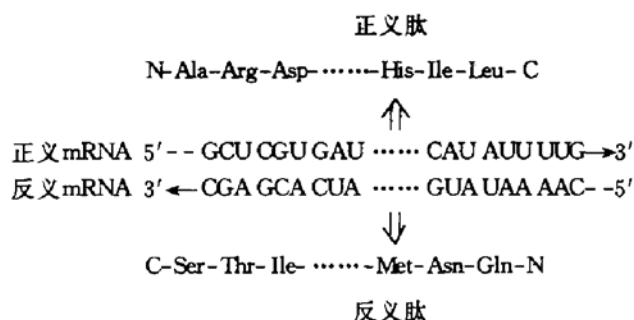


图1 正反义肽与其 mRNA 关系图

近年来, 反义肽的研究拓宽了亲和色谱的研究思路, 本文拟将此领域中的进展作一介绍.

2 反义肽与正义肽相互作用

早在1970年, Mekler^[3]即提出两条多聚肽的相互作用来源于互补的两条 DNA 链, 互补的 DNA 密码链所对应的氨基酸是肽专一性相互作用的直接原因. 后来 Blalock 等^[6]发现亲水氨基酸所对应的核酸密码和另外一条链上疏水氨基酸密码有很好的互补效应, 由此认为两条

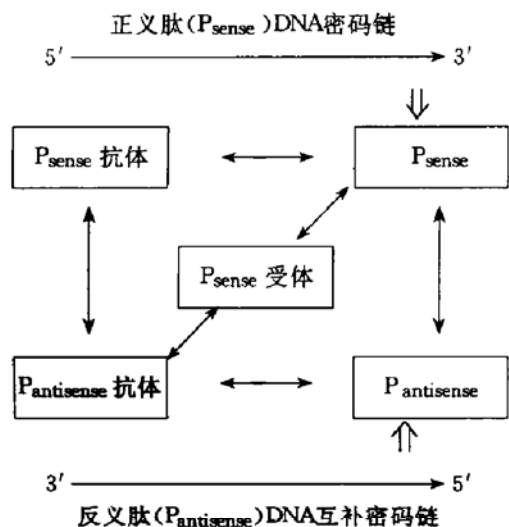
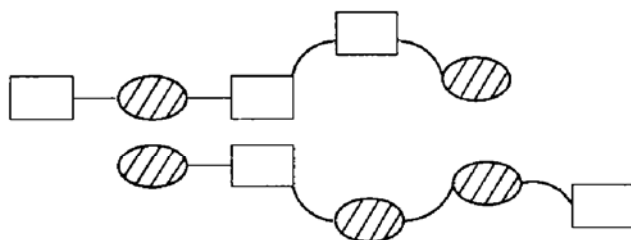


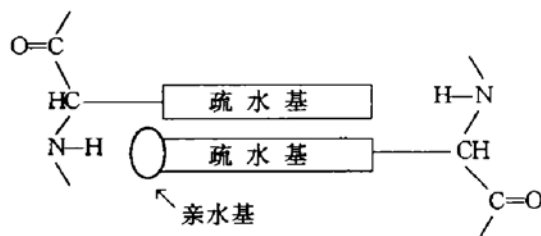
图2 正义和反义肽及其抗体间的相互作用

核酸链各自表达的肽链也双亲互补, 两条肽链似呈“内影像” (internal image) 关系. 他们^[7]还提出多聚肽激素的反义肽可能为其受体的空间影像 (steric image), 抗反义肽的抗体可与正义肽的受体特异性结合, 显示出分子识别的能力: 各自以 DNA 其中一条链为合成模板的两条肽 (正义肽和反义肽) 链具有一定的亲和效应. 图2示出了正义和反义肽及其抗体、受体相互作用的关联图^[8].

对于反义和正义肽专一性相互作用的本质, 人们认识不一, 文献 [9] 报道了两种主要机理: a. 疏水相互作用机理; b. 亲水-疏水相互作用亦即两亲识别机理. 前者认为肽段上氨基酸按亲水-亲水基和疏水-疏水基配对识别, 在这种机理中疏水残基在识别过程起主导作用, 因为亲水基团此时已被溶剂化. 第二种机理是由 Chaiken 提出来的, 极性相反的正反义氨基酸识别源于肽侧链之间的疏水性相互作用以及主链和侧链亲水和疏水相互作用所导致的双亲识别^[10], 这可用图3加以说明, 亲水和



双亲识别互补



肽链氨基酸结构双亲互补

图3 正义和反义肽氨基酸亲疏水基团识别图

疏水残基对之间的疏水部分可相互作用; 疏水性相互作用阻碍了亲水基团与水分子的接触从而使亲水基团之间也发生相互作用. 残基侧链的亲水基团既可与主链亲水基团又可与侧链亲

水基团相互作用。总之,反义和正义肽上的亲水和疏水基团是导致分子双亲识别的主要原因^[10]。根据上述机理,反义肽氨基酸序列可由反义 DNA 链直接读出或由正义肽链按氨基酸疏水亲水配对原则获得(图3)。以此法获得的反义肽作为亲和配基键合于色谱固定相,便有可能用来分离其对应的蛋白质和多肽。

3 作用实例

自 Bost 等以 ACTH 实验证实反义肽可与正义肽之间产生选择性识别以来,人们相继发现不少类似的例子。表1列出了近年所观察到的这种识别体系。

表1 反义肽与正义肽识别事例

系 统	反义肽氨基酸序列	参考文献
牛 ACTH (1~24)	GVHLHRAFLLAHRLAPAEVFGH	[4]
说明:反义肽和正义肽可以产生非共价键性的1比1的结合,反义肽对 ACTH 与其抗体的特异反应有竞争性抑制作用,其 $K_d=1.9 \mu\text{mol/L}$ 。亲和常数为 5×10^7 。		
γ -内啡肽	QRDLGRLALLGGHEPAV	[4]
羊催乳激素	FRGEVMNVYGHHD (5' → 3') QYHRVMNYLERSV (3' → 5')	[11]
说明:结合部位第23~35号残基,5' → 3' 及 3' → 5' 表达的肽链均具备亲和性,残基 VMNY 为结合位点。		
重组人 β -干扰素	IAASLQESLQVVAH (第1~14位) VLLLELLQLLDLL (第42~54位) FSPGELFFLQFFF (第103~115位)	[12]
说明:计算机模拟选择暴露于外层的亲和肽链,共三个位点即:第1~14位、第42~54位和第103~115位,对应反义肽由化学合成获得,分别键合于固定相,所得亲和和色谱柱对重组人 β -干扰素有较好的分离作用。		
AVP/BNPII	SQLQVGHGPLAAPWAVLELR (第20~1位)	[13, 14]
说明:竞争解离常数 $K_d=1 \text{ mmol/L} \sim 1 \mu\text{mol/L}$,分别以第20~1,第20~13,第12~1位残基为模型研究正义和反义肽的选择识别效应,认为离子和疏水作用为分子识别的原因。		
促黄体激素释放因子	LVPGISQARS (3' → 5')	[15]
血管紧张肽 II (AII)	VAYVDVG	[16]
说明:由反义肽 (IIA) 获得的抗体对 AII 受体有亲和分离作用,IIA 可以抑制 AII 与其抗体或受体的特异性结合, $K_d=0.4 \mu\text{mol/L}$,用 AII 的无关肽(如:ASTTTNYY)代替 IIA,则不能抑制 AII 与其抗体或受体的结合。从反义肽中可得到受体结合位点。		
Cystatin C	LDYSP	[17]
说明:对应于第55~59位残基的反义肽为 LDYSP 对 cystatin C-C4作用体系有抑制效应,正好与 C4的第611~614位 β 链一致。		
纤连蛋白 (fibronectin)	GAVSTA (人), WTVPTA (鼠)	[18]
说明:利用反义和正义肽相互作用研究了纤连蛋白和受体的结合位点特征,反义肽对纤连蛋白与其细胞受体的识别起抑制作用。		
胰岛素	CVVEAS (6肽)	[19]
说明:竞争解离常数 $K_d=3 \text{ nmol/L}$		
C-raf protein	ARAGKASHVLALPMSINSYL	[20]
说明:结合位点第356~375位,反义肽连接于固定相可用于重组 C-raf 蛋白的纯化。		
核糖核酸酶 S-肽	RGGSRSVHVLPLKLSRRSF	[21]
说明:利用高效液相亲和和色谱定量研究正义和反义肽间的相互作用,反义肽定量识别正义肽至少为4:1~5:1, $K_d=0.19 \mu\text{mol/L}$ 。		

4 反义肽用于亲和色谱分离

以反义肽为配基的色谱固定相用于正义肽分离, 其选择性最早表现在8-精后叶加压素 (Arg⁸-vasopressin, AVP) 系统的分离中, 将 proAVP/BNPII 的反义肽 (SQLQVGHGPLAA-PWAVLELR) 接于色谱固定相, 柱子对 AVP 和 BNPII 均有较好的亲和选择效果, 优于与其结构相近的催产素 (oxytocin, OT) 和 BNP I, 其有关数据为: AVP ($K_{m/p}=53.1 \mu\text{mol/L}$) > Arginin Vasotocine ($K_{m/p}=86 \mu\text{mol/L}$) > Lysine Vasopressin ($K_{m/p}=110 \mu\text{mol/L}$) > 催产素 ($K_{m/p}=530 \mu\text{mol/L}$)^[14]. 图4为 AVP 和催产素系统的分离图. 二个神经肽8-精后叶加压素和催产素分离较好. 在 C-raf 体系中, 按第356~375 位结合位点获得的反义肽 (ARAGKASHVLALPMSINSYL) 可用于重组 C-raf 的分离 (图5)^[20]. 图6示出了重组人 β -干扰素在以反义肽为配基的亲和色谱柱上的分离情况^[12]. 从图6可以看出: 所有的杂蛋白在进样过程已被淋洗下来, 改用0.1 mol/L 柠檬酸洗脱, 可获得纯度80%以上的 β -干扰素. 使用其

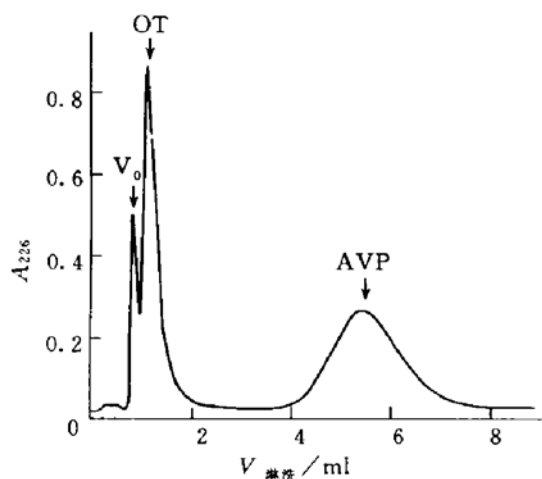


图4 8-精后叶加压素 (AVP) 和催产素 (OT) 混合物在以反义肽为配基的亲和色谱分离图

色谱条件: 柱子: $\Phi 3 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, 流速: 0.4 ml/min , 淋洗液: $0.1 \text{ mol/L NH}_4\text{Ac}$, $\text{pH} 5.5$.

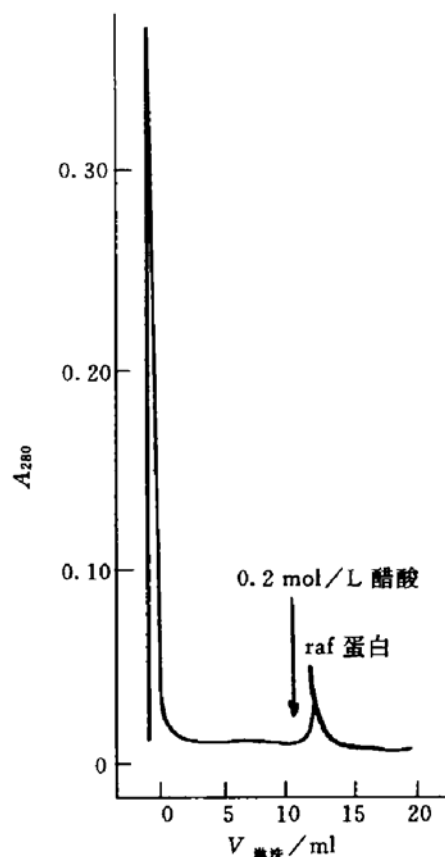


图5 重组 raf 蛋白大肠杆菌初提物在反义肽 C. G raf 柱子上的亲和色谱分离图
色谱条件: 柱子: $\Phi 3 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, 流速: 1.0 ml/min , 淋洗液: $50 \text{ mmol/L NH}_4\text{Ac}$, $\text{pH} 5.7 \rightarrow 0.2 \text{ mol/L HAc}$, $\text{pH} 2.5$.

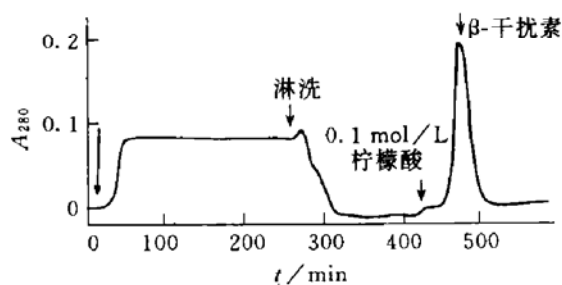


图6 重组人 β -干扰素 (CHO-rhIFN- β) 初提物在反义肽 R-AS 42-54 柱子上的亲和色谱分离图

色谱条件: 柱子: $\Phi 5 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, 流速: 1.0 ml/min , 淋洗液: 0.125 mol/L NaCl - 0.1 mol/L 磷酸盐, $\text{pH} 7.0 \rightarrow 0.1 \text{ mol/L}$ 柠檬酸, $\text{pH} 2.0$.

他类型柱 DEAE-Sepherose F F 和 Mono-Q 不具备类似分离能力。

5 问题与展望

由于反义肽与其正义肽的专一性相互作用是近年人们才发现的, 有关其作用机理仍在研究之中, 这其中也存在一些矛盾现象, 如甲状旁腺, 血管紧张肽 II 和人 ACTH 其正义和反义肽没有观察到这种选择性相互作用^[8,22], 这既可能是由于人们对这类相互作用尚缺乏深层次的认识, 也可能是肽的这类识别不具备普遍性. 还有人认为反义和正义肽之间有时可能是一类弱亲和作用^[9], 而且这种识别不是单一的亲水疏水相互作用, 库仑力、偶极和氢键等在某些情况下也起重要作用. 另外, 有关氨基酸的亲水性程度目前还未有一个准确的衡量标准; 在实用方面, 由于产品体系的复杂性为其对应的反义肽合成带来了困难. 尽管如此, 反义肽的研究毕竟为蛋白、多肽专一性相互作用及分离研究开辟了一条新的思路, 尤其是在生物工程产品分离纯化方面具有实际应用的前景. 生物大分子体系及相互作用的计算机分子图形模拟将为这一领域研究带来曙光, 通过计算机模拟出正义与反义肽的专一性结合位点, 找出亲和片段, 由化学合成或分子生物学手段可获得高效的亲和配基, 以应用于亲和色谱分离; 同时, 这类分子之间的识别, 特异性结合和激活, 相互作用中的活性基团和活性构象, 结合中亲和力的选择性也将为研究生物大分子的相互作用提供信息和新的启示.

参 考 文 献

- 1 刘国詮主编. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社, 1993; 232
- 2 丁金凤, 汤 健. 生理科学进展, 1992; 4: 355
- 3 Mekler L B. Biophys USSR, 1970; 14: 613
- 4 Bost K L, Smith E M, Blalock J E. Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 1372
- 5 Lu F X, Aiyar N, Chaiken I. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 3642
- 6 Blalock J E, Smith E M. Biochem Biophys Res Commun, 1984; 121: 203
- 7 Bost K L, Blalock J E. Mol Cell Endocrinol, 1986; 44: 1
- 8 Eberle A N, Martin H. J Rept Res, 1991; 11 (1~4): 15

- 9 Tropsha A, Kizer J S, Chaiken I M. J Mol Regn, 1992; 5: 43
- 10 Chaiken. Irwin J Chromator, 1992; 597: 29
- 11 Bajpai A, Hooper K P, Ebner K E. Biochem Biophys Res Commun, 1991; 180: 1312
- 12 Scapol L, Rappuoli P, Viscomi G C. J Chromatogr, 1992; 600: 235
- 13 Lu F X, Aiyar N, Chaiken I M. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 3642
- 14 Fassina G, Zamai M, Brigham-Burke M *et al.* Biochemistry, 1989; 28: 8811
- 15 Mulchahey J J, Neill J D, Dion L D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 9714
- 16 Elton T S, Dion L D, Bost K L. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 2518
- 17 Ghiso J, Saball E. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 1288
- 18 Brentani R R, Ribeiro S F, Potocnjak P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 364
- 19 Knutson V P. J Biol Chem, 1988; 263 (28): 14146
- 20 Fassina G, Roller P P, Olson A D *et al.* J Biol Chem, 1989; 264: 11252
- 21 Shai Y, Flashner M, Chaiken I M. Biochemistry, 1987; 26: 669
- 22 Eberle A N, Drozd R, Baumann J B *et al.* Peptide Res, 1989; 2: 213

Antisense Peptide and Its Application in the Separation of Bioproducts. Lin Qishan, Liu Guoquan (*Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100080, China*).

Abstract Antisense peptides encoded in the antisense strand of DNA can bind to sense peptides and proteins with significant affinity and selectivity. Sense-antisense peptide recognition observed in many systems lays a foundation in the separation of bioproducts, especially in the selection of chromatographic affinity ligand. Affinity chromatography immobilized with antisense peptides will be a best alternative choice for separation of biotechnical products.

Key words antisense peptide, specificity interaction, affinity chromatography