

参 考 文 献

- 1 Ghislaine C, Buijs R M, Michel G. Glycine neurons in the brain and spinal cord. Antibody production and immunocytochemical localization. *Brain Res*, 1986, **376** (2): 400~ 405
- 2 Zarfra F C, Aragon L, Olivares N C, *et al.* Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neuroscience*, 1995, **15** (5): 3952~ 3969
- 3 Thomson A M. Glycine modulation of the NMDA receptor/ channel complex. *TINS*, 1989, **12** (9): 349~ 353
- 4 Wilkin G P, Csillay A. Localization of high affinity [³H] glycine transport sites in the cerebellar cortex. *Brain Res*, 1981, **216** (1): 11~ 13
- 5 Ottersen O P, Davanger S, Storm-Mathisen J. Glycine-like immunoreactivity in the cerebellum of rat and *Senegalese baboon* Papio: a comparison with the distribution of GABA-like immunoreactivity and with [³H] glycine and [³H] GABA uptake. *Brain Res*, 1987, **406** (2): 211~ 221
- 6 Suneja S K, Benson C G, Gross J, *et al.* Uptake and release of D-aspartate GABA and glycine in guinea pig brainstem auditory nuclei. *J Neurochemistry*, 1995, **64** (1): 147~ 160
- 7 Curtis D R, Hosli L, Johnston G A R. The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp Brain Res*, 1968, **5** (1): 235~ 258
- 8 Fagg G E, Foster A C. Amino acid neuro-transmitters and their pathway in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*, 1983, **4** (2): 1015~ 1036
- 9 吴奇久, 李俊凤, 韩 戩 (Wu Q J, Li J F, Han J). GABA 神经元在金黄仓鼠视觉中枢的分布. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1990, **6** (4): 550~ 555

Glycine immunopositive Neurons in the Visual Center of the Hamster. WU Qí-Jiu, LI Jun-Feng (*Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Distribution of glycine immunopositive neurons in the visual center of the hamster was studied by immunocytochemical technique, quantitative analysis was made statistically. The results showed that except the layer I, the glycine immunopositive neurons are distributed through all layers of the visual cortex. The mean density is 1 046/mm². An average of 23.9% of the neurons in visual cortex is immunopositive for glycine. The densities of positive glycine neurons in the superficial stratum and deep stratum of superior collicular are 750/mm² and 781/mm² respectively and their percentage are 19.5% in superficial layer and 20.3% in deep layer. Glycine immunopositive neurons of visual center include different type of cells.

Key words glycine, immunocytochemistry, visual center

以 GST 融合蛋白为靶从噬菌体肽库中筛选结合肽

薛沿宁

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

段凌浚 R. J. POMERANTZ

(Division of Infectious Disease, Thomas Jefferson University, PA19107, USA)

摘要 以重组的谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 和目标蛋白的融合蛋白为靶, 通过将其固定于谷胱甘肽琼脂糖凝胶上, 可以方便地从噬菌体肽库中筛选目标蛋白的结合肽. 用此方法筛选到含 WWXF 结构的 HIV-1 病毒蛋白 R (Vpr) 的结合肽, 与经典的将 Vpr 包被于培养板上的筛选方法相比, 此方法具有简便、快速的优点.

关键词 噬菌体展示, GST 融合蛋白, 多肽库, Vpr

学科分类号 Q78

噬菌体展示技术是寻找目标蛋白的结合蛋白或结合肽的有效途径, 从它的建立到现在, 已在各个领域里得到广泛的应用^[1,2]. 在应用噬菌体展示技术时, 一个首要的条件是要选择好目标蛋白. 对目标蛋白的要求除了它的研究意义外, 还必须具备以下条件: a. 足够的量, 以用于多次筛选或称生物

淘洗 (biopanning); b. 高的纯度, 以降低非特异结合; c. 有生物活性, 以得到有生物学意义的结合肽. 然而, 有些有重要意义的蛋白并不容易得到, 如 HIV-1 的病毒蛋白 R (Vpr)^[3], 由于它对宿主细胞功能蛋白, 特别是对细胞周期的影响, 可

能对宿主细胞产生毒性, 导致它的表达水平很低或者容易形成包涵体. 在从噬菌体蛋白或肽库中寻找这类蛋白的结合蛋白或结合肽时, 首先要选择一种适宜的表达和纯化系统.

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 融合蛋白表达系统, 是将外源基因与 GST 基因融合后在细菌内表达的原核表达系统^[4], 它的主要优点是, 在很多情况下所表达的融合蛋白是可溶性的, 而且表达量通常也很高. 另外, 它很容易用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析的方法在温和及非变性条件下得以纯化. 为了研究 V_{pr} 的结合肽及结合蛋白, 我们选用了 GST 融合蛋白大肠杆菌表达系统来表达 GST-V_{pr} 融合蛋白, 并以该融合蛋白为靶子, 从噬菌体多肽库中筛选 V_{pr} 的结合肽.

1 材料与方法

1.1 GST-V_{pr} 融合蛋白的表达和纯化

参照文献方法, 将 V_{pr} 基因插入 pGEX-KG 表达载体, 转化 *E. coli* 获得表达菌株^[5]. GST-V_{pr} 的诱导表达方法与文献基本相同, 为减少包涵体的形成, 将 IPTG 的诱导时间减为 1 h. 将 1 L 培养液得到的菌体离心收集, 于 10 ml 裂解液 [20 mmol/L PBS, pH 7.5, 1% Triton X-100, 20 mmol/L EDTA, 0.4 mmol/L PMSF, 2 mg/L leupeptin, 50 mg/L TLCK (N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) 及 100 mg/L TPCK (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)] 中, 4℃ 超声破碎. 在 10 000 g 下, 4℃ 离心 10 min 除去菌体裂解液中的不溶物质. 将上清通过床积为 1 ml 的已用 PBST (20 mmol/L PBS, pH 7.5, 1% Triton X-100) 平衡好的谷胱甘肽琼脂糖凝胶柱 (Sigma 公司), 再用 2 ml PBS (20 mmol/L PBS, pH 7.5) 洗 3 次后, 用含 5 mmol/L 谷胱甘肽的 TB (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 将 GST-V_{pr} 融合蛋白洗下. 洗脱的 GST 融合蛋白对 2 L TBS (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl) 分 4 次透析除去谷胱甘肽, 用于结合肽的筛选.

用上述方法亦纯化了非融合的 GST 蛋白, 用于下面的预吸附实验和对照实验.

1.2 V_{pr} 结合肽的筛选 (参见图 1)

1.2.1 将 50 μ l (50%, 体积比) 谷胱甘肽琼脂糖凝胶分装于 1.5 ml 离心管中, 用 1 ml TBS 洗两次. 每管加入 50 μ g 纯化的 GST 或 GST-V_{pr} 融合蛋白 (溶于 250 ml TBS 中), 室温温和摇动下孵育

30 min 后, 用 TBST (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20) 洗 3 次后用于下面结合肽的筛选.

1.2.2 将 2×10^{11} pfu (在 250 μ l TBST 中) 的 7 肽噬菌体展示库 (New England Biolabs) 加入上述含 GST-谷胱甘肽凝胶的离心管中, 混匀并在室温孵育 1 h. 低速离心 2 min, 将上清转移到另一离心管中; 凝胶沉淀用 250 μ l TBST 洗一次, 洗液与原始上清液合并.

1.2.3 将上面得到的与 GST 不结合的噬菌体的一半分别加入新的含 GST 或 GST-V_{pr} 融合蛋白的离心管中, 混匀并在室温孵育 1 h. 低速离心 2 min 后, 弃去上清, 沉淀用 1 ml TBST 洗 10 次, 以除去不结合的噬菌体. 用 100 μ l 含 5 mmol/L 谷胱甘肽的 TBS 洗脱结合于 GST 或 GST-V_{pr} 融合蛋白的噬菌体.

1.2.4 按照肽库试剂盒提供的方法, 将洗脱的与 GST-V_{pr} 融合蛋白结合的噬菌体扩增并测定滴度, 然后用于下一轮的筛选 (回到步骤 1.2.2).

1.2.5 按照肽库试剂盒提供的方法测定结合噬菌体的滴度. 通过比较 GST 结合噬菌体的滴度 (N) 和 GST-V_{pr} 融合蛋白结合噬菌体的滴度 (P), 确定得到的 V_{pr} 结合肽的专一性. 当 P/N 值大于 20 后, 即可随机挑选 10 个噬菌体克隆, 按试剂盒提供的方法扩增并提取噬菌体 DNA, 然后用试剂盒提供的-96 引物测序.

2 结果与讨论

根据有关文献报道, 使用 GST 融合蛋白表达系统可能有助于可溶性产物的表达, 这对于包括噬菌体结合肽的筛选在内的许多实验研究是有益的. 用 GST 融合表达系统表达 GST-V_{pr} 融合蛋白虽然得到了可溶性的表达产物, 但依然有包涵体存在. 为了提高可溶性表达产物的比例, 防止包涵体的形成, 可以考虑适当降低诱导温度或减少诱导时间, 我们通过减少诱导时间确实增加了可溶性产物的表达水平. 生物活性分析表明, 我们所得到的可溶性 GST-V_{pr} 具有同 V_{pr} 一样的诱导细胞分化的活性 (结果有待发表, 未在此给出).

用 GST 融合蛋白从肽库中筛选结合肽的方法存在的问题是, GST 的存在可能影响所筛选到的结合肽的专一性, 也就是说得到的结合肽不一定是针对目标蛋白, 也有可能是针对 GST. 为了避免这种情况的发生, 我们增加了用 GST 预吸附噬菌

体肽库的步骤 (图 1), 将可能存在的 GST 结合肽去除, 再用于 GST 融合蛋白结合肽的筛选. 虽然在这一实验体系中 GST 对 V_{pr} 结合肽的筛选结果影响很小 (结果未给出), 但我们还是采取了这一步骤, 以提高结合的专一性, 并使这种方法更具有普遍的应用意义.

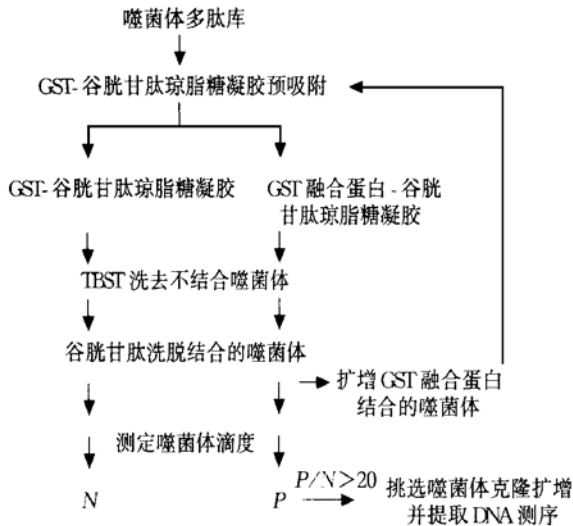


图 1 GST 融合蛋白的结合肽筛选示意图

P 为结合 GST 融合蛋白的噬菌体滴度; N 为结合 GST 的噬菌体滴度.

为了确定每一轮筛选到的 GST-V_{pr} 结合肽对 V_{pr} 结合的专一性, 以减少 DNA 测序的次数, 我们在每一轮筛选中都用结合 GST 的凝胶作为对照, 通过测定洗脱噬菌体的滴度, 以结合 GST-V_{pr} 噬菌体滴度 (P) 与结合 GST 噬菌体滴度 (N) 的比值 P/N 作为 V_{pr} 结合肽专一性的指标. 结果显示, 每一轮筛选 P/N 值都显著增加, 经过三轮筛选, 可达到 20 以上 (图 2), 表明得到的 V_{pr} 结合肽具有很高的专一性.

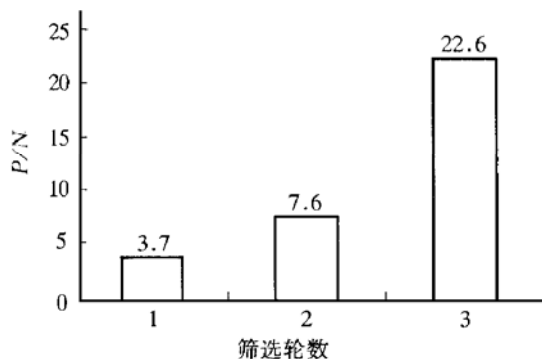


图 2 GST-V_{pr} 结合噬菌体的专一性分析

P 和 N: 分别表示结合 GST-V_{pr} 和 GST 的噬菌体滴度; 每轮筛选得到的 P/N 值标于方框上方.

从第三轮滴度测定平板上任意挑选 10 个噬菌体克隆, 扩增并提取 DNA 测序, 得到一组有规律的序列, 其中有三个序列有重复 (图 3). 从 DNA 序列推断出氨基酸序列, 并经适当的排列后可以看出, 这些 DNA 序列所编码的肽也是有规律的, 其结构特征为 WWXF, 其中 X 为不确定的氨基酸残基. 目前, 还未见 V_{pr} 结合肽的研究报道, WWXF 可能即为 V_{pr} 结合肽或蛋白的特征序列, 这一发现将有助于 V_{pr} 及其结合蛋白的结构与功能的研究. 关于这一 V_{pr} 结合肽的生物学作用还有待于进一步的研究确定.

- 1 CAG CCT TGG TGG GCT TTT TTT
Q P W W A F F
- 2 ACT CCG TGG TGG TCG TTT ATG
T P W W S F M
- 3 ACT CCG TGG TGG TCG TTT ATG *
T P W W S F M
- 4 TCT TGG TGG TCG TTT TAT CCT
S W W S F Y P
- 5 TCT TGG TGG TCG TTT TAT CCT *
S W W S F Y P
- 6 AGT TGG TGG TCT TTT TCG ATG
S W W S F S M
- 7 GCG TGG TGG GAT TTT CTG GAT
A W W E F L D
- 8 GCG TGG TGG GAG TTT CTG GAT *
A W W E F L D
- 9 AAG TGG TGG GAG TTT CCG GCG
K W W E F P A
- 10 ACT TGG TGG CAT TTT CCG GCG
T W W H F P A

图 3 V_{pr} 结合肽的序列分析结果

DNA 序列用三联字母表示; 氨基酸序列用单字母表示, 黑体表示序列中的保守性氨基酸; * 为重复序列.

同将目标蛋白包被于培养板上的筛选方法相比, 以 GST 融合蛋白作为噬菌体肽库筛选的目标蛋白有以下几点. 首先, 它可以省略蛋白质纯化一步. 将表达 GST 融合蛋白的菌体裂解后, 上清加入含谷胱甘肽琼脂糖凝胶的离心管中, 洗去不结合的杂蛋白后即可直接用于结合肽的筛选. 在采用这一方法后, 亦得到一组结合肽序列, 其结构特征 WWXF 与用纯化后的 GST-V_{pr} 作为目标蛋白而得到的结果相同 (结果未给出). 另一个优点是它可用谷胱甘肽, 而不是用酸性条件或用目标蛋白来洗脱结合的噬菌体. 它的好处是即可提高洗脱的专

一性,防止酸性条件下可能发生的非特异洗脱;也可以防止酸性条件洗脱对噬菌体活性可能造成的影响;还能减少目标蛋白的用量,节省费用,因为谷胱甘肽通常要比目标蛋白更容易得到。

总之,GST融合蛋白的表达系统为从噬菌体肽库中筛选目标蛋白的结合肽提供了一种简便、快速和应用范围更为广泛的途径。

参 考 文 献

- 1 Clackson T, Wells J A. *In vitro* selection from protein and peptide libraries. Trends Biotechnol, 1994, 12 (5): 173~ 183
- 2 唐为钢, 甘人宝, 王克夷 (Tang W G, Gan R B, Wang K Y). 多肽噬菌体展示. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1997, 24 (3): 203~ 207
- 3 Emerman M. HIV-1, Vpr and the cell cycle. Current Biology, 1996, 6 (9): 1096~ 1103
- 4 Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene, 1988, 67 (1): 31~ 40
- 5 Guan K L, Dixan J E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. Ann Biochem, 1991, 192 (2): 262~ 267

Binding Peptide Selection from Phage Peptide Library by Using GST Fusion Protein as Target.

XUE Yan-Ning (Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China); DUAN Ling-Xun, R. J. POMERANTZ (Division of Infectious Disease, Thomas Jefferson University, PA 19107, USA).

Abstract Recombinant glutathione S-transferase (GST) Vpr fusion protein was used as target to select Vpr binding peptide from phage peptide library. By immobilized the GST or GST fusion protein to glutathione agarose gel, binding phage could be quickly panned and eluted by reduced glutathione. The sequencing result show that a WWXF motif exist among the Vpr binding peptide. Comparing with the classic biopanning method by coating target protein on plate this provide more quick and convenient way to screen binding protein from phage peptide library.

Key words phage display, GST fusion protein, peptide library, Vpr

用碱水解的方法测定蛋白质的消光系数*

周 波 静国忠

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 在蛋白质结构与功能的研究中,有时蛋白质溶液的浓度是一个重要的参数.紫外吸收法是测定蛋白质溶液浓度最为常用的方法,而已知蛋白质的消光系数是用紫外吸收法准确测定蛋白质溶液浓度的前提条件.在 0.1 mol/L NaOH 溶液中,蛋白质发生碱性水解,因而蛋白质溶液可以看作是色氨酸和酪氨酸的二元体系.以此为依据,给出了用碱水解的方法测定蛋白质消光系数的方法.这一方法操作步骤简便易行,蛋白质消光系数的计算公式简单明了.用这一碱水解的方法分别测定了几种氨基酸组成不同的蛋白质的消光系数,与文献数据对照,得到了令人满意的结果,测定误差均小于±5%.

关键词 蛋白质消光系数,碱水解,紫外吸收法,酪氨酸,色氨酸

学科分类号 Q5-33, Q53

在蛋白质结构与功能的研究中,往往需要知道蛋白质溶液的准确浓度,如酶比活的测定,蛋白质与蛋白质的相互作用以及蛋白质与配体的相互作用的研究等等.目前,测定蛋白质溶液浓度的方法很多,较常用的有紫外吸收法、双缩脲法、福林酚试剂法、考马斯亮蓝染色法等.其中紫外吸收法由于具有简便、快捷且不消耗样品等优点,已成为实验室中测定蛋白质溶液浓度的最为常用的方法.但

是,不同蛋白质中芳香族氨基酸残基(如色氨酸和酪氨酸)的含量不同,所处的微环境也不同,因此不同蛋白质溶液的紫外吸光度值会相差很大.据初步统计,浓度为 1 mg/L 的 1 800 余种蛋白质及蛋白质亚基在 280 nm 的光吸收值在 0.3~ 3.0 之间,平均值为 $1.25 \pm 0.51^{[1]}$.因此在不知道所测蛋白质

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1998-04-24, 修回日期: 1998-09-14