参 考 文 献

- 1 O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. New York: W H Freeman and Company, 1992. 1~ 347
- 2 Weyer U, Knight S, Possee R D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. J Gen Virol, 1990, 71: 1 525~ 1 534
- 3 Anderson D, Harris R, Luckow V A. Rapid generation of recombinant baculovirus and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac baculovirus expression system. Focus, 1995, 17: 53~ 58
- 4 Hartig P C, Cardon M C. Rapid efficient production of baculovirus expression vector. J Virol Methods, 1992, 38: 61~ 70
- 5 Luckow V A, Lee S C, Barry G F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculovirus by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol, 1993, 67: 4 566~ 4 579
- 6 张光裕, 周莲春, 张友清. 棉铃虫核型多角体病毒的生物活性测定. 植物保护学报, 1982, 9(3): 193~ 197
- 7 王福山, 黄永秀, 齐义鹏, 等. 多角体完整重组病毒的构建及苏云金杆菌截短 δ 内毒素基因的表达. 科学通报, 1995, 40(20): 1 896~ 1 900
- 8 姚 斌, 范云六, 赵荣敏, 等. 表达昆虫特异性神经麻痹毒素 AaIT 的杀虫杆状病毒的构建. 中国科学, C 辑, 1996, 26(1): 78~ 84
- 9 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Tex Agri Exp Stn (Bull), 1987, 1 555: 1~ 57
- 10 Washburn J O, Kirkpatrick B A, Volkman L E. Insect protection against virus. Nature, 1996, 383: 767
- 11 黄永秀, 齐义鹏, 李晓峰, 等. 昆虫病毒多角体蛋白对病毒粒子的异源包装. 病毒学报, 1995, 11(1): 88~ 91

(1998-03-27 收稿, 1998-06-18 收修改稿)

人类神经 tau 蛋白形成新荧光过程

罗健颖 李 为 赫荣乔*

(中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放实验室, 北京 100101. * 联系人)

摘要 人类神经 tau 蛋白在 37℃保温, 可在 333 nm 波长形成新荧光峰; 该荧光分别在 230 和 280 nm 具有最大激发峰, 其量子产率为 0.02. 该荧光团的形成约需 30 h, 同时伴有溶液瑞利散射强度的增加. 肝素对该荧光的形成影响不明显. 以上结果表明, 333 nm 新荧光可能来自于 tau 蛋白分子在溶液中的聚集.

关键词 人类神经 tau 蛋白 荧光 配对螺旋样纤维 早老性痴呆

人类神经 tau 蛋白具有稳定细胞内的微管系统, 调控神经细胞生长发育的作用^[1], 并在轴突的通讯传导和神经系统的形成中有着至关重要的作用^[2]. 在早老性痴呆(Alzheimer's disease, AD)病人脑中, 已经发现 tau 蛋白分子的聚集形成配对螺旋样纤维(paired helical filaments, PHFs)^[3], 这是形成早老性痴呆病理学的基本病变之一. 因此, 研究人类神经 tau 蛋白分子聚集的机理, 不但在结构分子生物学上具有意义, 同时对于我们认识和防治早老性痴呆也具有一定的价值.

tau 蛋白在自然条件下, 其空间结构的可塑性很强. 最近几年的研究表明, tau 蛋白可能

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-20-2183>

没有严格的二级结构^[4], 加热到 100 °C, 15 min 也不发生聚集, 因此有人认为该分子肽骨架结构处于随机弯曲的状态. 到目前为止, tau 蛋白的空间结构依然不清楚. 我们通过 *E. coli* 表达人类神经 tau 蛋白, 用乙醛对该蛋白进行醛胺化, 再用 NCLK (neuronal cdc2_like kinase) 磷酸化, 结果表明, 醛胺化 tau 蛋白将产生 2 个新的磷酸化片段(A4 和 A6). 醛胺化可使人类神经 tau 蛋白的分子构象发生改变, 并可能产生新的磷酸化位点. 我们采用荧光猝灭, 盐酸胍变性及脱磷酸化研究 tau 蛋白在溶液中的空间结构, 结果提示, 人类神经 tau 蛋白在常温下可能具有某种稳定的溶液构象. 在研究 tau 蛋白空间构象的过程中, 我们发现人类神经 tau 蛋白能在分子聚集时产生新的荧光现象.

1 材料与方法

() 材料. 人类神经 tau 蛋白的全基因克隆由英国剑桥大学 Goedert 等人^[5] 制备. Sephadex G₅₀, Q_Sepharose 及 SP_Sepharose 购于 Pharmacia 公司. 光谱纯 GuHCl 购于 Sigma 公司, 其他试剂均为分析纯级.

() 人类神经 tau 蛋白的表达及纯化. 经过在 LB 培养基(10 g/L NaCl, 10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, 60 mg/L Ampicillin (pH = 7.2)) 中逐级放大培养, 离心分离菌体 ($5\,053 \times g$, 25 °C, 15 min). 在菌体离心沉淀中加入 Hepes 缓冲液(25 mmol/L Hepes, 0.1 mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PMSF (pH = 7.2)), 搅拌均匀, 加入 20 μ g/mL 溶菌酶, 4 °C 保温 25 min 并用超声法破碎细胞. 离心($26\,816 \times g$, 4 °C, 15 min) 分离出上清并将其置于沸水浴中 15 min, 离心(条件同上) 去除热变性蛋白, 取上清过事先用 Pipes buffer (100mmol/L Pipes, 1.0 mmol/L MgCl₂, 1.0 mmol/L EGTA (pH = 6.4)) 平衡好的 Q_Sepharose 层析柱(1 cm(ID) $\times$ 5 cm), 收集蛋白的穿过峰, 再把样品吸附到事先用 Pipes buffer(同上) 平衡好的 SP_Sepharose 层析柱(1 cm(ID) $\times$ 5 cm) 上, 用终浓度为 0.2 mol/L 的 NaCl 梯度洗脱样品, 收集 $A_{280\text{ nm}}$ 在 0.08~1.2 处的蛋白峰, 冷冻干燥后, 加入少量 Hepes buffer(同上) 溶解样品, 经 Sephadex G₅₀ 脱盐, -20 °C 保存备用.

() 333 nm 荧光的形成条件. 纯化后的 tau 蛋白(0.03 mg/mL) 在磷酸缓冲液(25 mmol/L pH = 7.2) 中 37 °C 保温 36 h 后, 于 25 °C 在 Hitachi F₄₅₀₀(狭缝: 激发 5.0 nm, 发射 5.0 nm) 荧光分光光度仪上测定其荧光光谱, 同时测定肝素对荧光的影响.

() 量子产率测定. 配制一定浓度的 Trp 溶液, 激发波长选择在 275 nm(根据 Teale 和 Weber^[6] 的测定, Trp 在中性溶液中的量子产率为 0.2, 并不随激发波长而变化). 被测样品及色氨酸在相应激发波长处的光吸收均小于 0.03. 将实验所测的数据按 Scott 等人^[7] 报道的方法进行计算.

() KI 猝灭. 在产生新荧光的样品溶液中滴加不同浓度的 KI, 25 °C 保温 10 min, 测定其荧光强度的变化.

() 蛋白溶液光散射的测定. 首先测定样品的三维散射光谱, 在确定最大散射波长后, 监测 460 nm 散射强度随反应时间的变化.

2 结果与讨论

2.1 tau 蛋白的新荧光

尽管人类神经 tau 蛋白由 441 个氨基酸残基组成, 但该分子不含有色氨酸残基^[1,5]. 因

此,在相同条件下,只能测定来自于酪氨酸残基的内源荧光(激发波长 230, 275 nm; 发射波长 305 nm, 图略). 经过 37 °C 保温 30 h, 我们观察到 tau 蛋白溶液能产生最大发射波长在 333 nm 新的荧光, 其激发光谱分别在 230 和 280 nm 波长处有最大峰值(图 1). 在肝素的存在下, 亦能观察到相同的荧光现象, 表明虽然肝素能促进 tau 蛋白分子的聚集^[6], 但对其空间结构的影响不十分明显(表 1).

表 1 tau 蛋白 333 nm 荧光的一些性质

量子产率	0.04	0.02
发射波长/nm	333	333
激发波长/nm	230	280

图 1 人类神经 tau 蛋白与肝素保温后在 333 nm 处形成的荧光

(a) 激发光谱, (b) 发射光谱

由于该荧光发色团的最大发射波长与色氨酸残基极为相似, 所以需要排除色氨酸对样品的污染. 首先, 样品在反应前不具有色氨酸残基的特征内源荧光; 其次, 反应前样品的最大吸收值仅在 230 和 275 nm, 其荧光的最大发射在 305 nm, 而色氨酸的最大激发波长为 286 nm; 再次, 肝素和所用的磷酸缓冲液都不具有任何荧光. 以上结果表明, 所用样品中不含有残存的色氨酸. 另外, 如果在反应液中加入盐酸胍(0.1~ 5.0 mol/L), 333 nm 新荧光则不产生, 一方面说明 GuHCl 能干扰该荧光团的形成, 另一方面提示 333 nm 荧光不是来自于色氨酸对样品的污染.

2.2 333 nm 荧光的形成过程

为了进一步探讨 333 nm 荧光是否由 tau 蛋白分子聚集所导致的, 我们观察了该荧光形成的时间动力学过程(图 2). 可以看到, 333 nm 荧光的形成是一个较为缓慢的过程, 大约需要 30 h 左右. tau 蛋白在溶液中放置较长的时间分子会自发聚集, 形成偶数倍聚体. 当其置于 37 °C 保温时, tau 蛋白会在含和不含肝素的体系中完全聚集. 在 37 °C 333 nm 荧光的形成是一个缓慢的过程, tau 蛋白的聚集也是一个较为缓慢的过

图 2 333 nm 处新荧光的形成过程

程^[9]. 为了说明这一点, 我们对 tau 蛋白在形成新荧光的同时, 监测了溶液瑞利散射的变化.

经比较, tau 蛋白溶液在 460 nm 有最大的瑞利散射强度, 因此, 采用该波长可以观察到 tau 蛋白分子聚集的时间动力学过程. 样品的瑞利散射强度在 30 h 后达到最大, 这与 333 nm 荧光的形成过程相一致. 该结果进一步表明了, 333 nm 荧光来自于 tau 蛋白分子的聚集.

人类神经 tau 蛋白的分子聚集具有特别的医学生物学意义^[3], 老年性痴呆患者大脑内, 现已发现了由 tau 蛋白分子聚集形成的神经纤维混乱的病理结构(neurofibrillary tangle, NFT; neuritic plaque, NP 和 neuropil thread, NT). 333 nm 荧光的发现, 能为我们寻找一种检测 tau 蛋白聚集的新方法. 至少可采用该荧光, 作为分子荧光探针, 来研究 tau 蛋白分子在溶液中空间构象变化. 为了证实这一点, 我们对 333 nm 荧光进行了 KI 猝灭.

2.3 KI 猝灭

与以前研究的蛋白质荧光相似^[10~13], KI 能猝灭 333 nm 荧光(图 3), 并且 Stern Vollmar

图3 KI在室温下对333 nm荧光的猝灭

插入部分为 Stern Vollmar 作图

作图分析结果表明, 333 nm 荧光强度的猝灭与 KI 的浓度呈线性相关. 提示该荧光团可能在空间位置上处于蛋白分子的表面, I⁻ 可以直接与之碰撞, 使其荧光猝灭. 另一方面, 也提示了在所用的 KI 浓度下, tau 蛋白聚集物(polymers of tau protein) 的空间构象不受影响.

致谢 Hemant 教授给我们提供了人类神经 tau 蛋白分子克隆, 在此表示由衷的感谢. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39610710141)和中国科学院院长基金资助项目.

参 考 文 献

- Goedert M, Jakes R, Spillantini M G, et al. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 1996, 383: 550~553

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-20-2183>

- 2 Goedert M, Baur C P, Ahringer J, et al. PTL₁, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Science*, 1996, 109: 2 661~ 2 672
- 3 Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *TINS*, 1993, 16: 460~ 465
- 4 Schweers O, Schonbrun-Hanebeck E, Marx A, et al. Structural studies of tau protein and alzheimer paired helical filaments show no evidence for β -structure. *J Biol Chem*, 1994, 269: 24 290~ 24 297
- 5 Goedert M, Spillantini M G, Potier M C, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*, 1989, 8: 393~ 399
- 6 Teale F F, Weber G. Ultraviolet fluorescence of aromatic amino acids. *Biochem J*, 1957, 65: 476~ 482
- 7 Scott T G, Spencer R D, Leonard N J, et al. Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH and simplified synthetic models. *Amer Chem Soc*, 1970, 92: 687~ 695
- 8 Mar P•rez, Jos• M Valpuesta, Miguel Medina, et al. Polymerization of τ into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for τ - τ interaction. *J Neurochem*, 1996, 67: 1 183~ 1 190
- 9 He R Q, Tsou C L. Fluorescence of peptide N-terminal 2-oxoacyl and quino derivatives. *Biochem J*, 1992, 287: 1 001~ 1 008
- 10 He R Q, Yang M D, Zeng X, et al. Isolation and some properties of glycated D-glyceraldehyde_3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *Biochem J*, 1995, 309: 133~ 139
- 11 He R Q, Zhao K Y, Yan Z Z, et al. D-glyceraldehyde_3-phosphate dehydrogenase and maltotetraose-forming amylase from an *Alcaligenes* sp. during guanidine denaturation. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1 163: 315~ 320
- 12 He R Q, Li Y G, Wu X Q, et al. D-glyceraldehyde_3-phosphate dehydrogenase during guanidine_HCl denaturation. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1 253: 47~ 56

(1998-03-26 收稿, 1998-06-15 收修稿稿)

用 **dhfr** 非缺陷型细胞高效表达 **EPO** 基因的研究

崔振中* 刘朋朋 齐顺章 沈恒**

(中国农业大学生物学院动物生化室, 北京 100094; * 现工作单位: 北京医科大学神经科学研究所, 北京 100083; ** 北京第四制药厂)

摘要 用我们所克隆的促红细胞生成素(EPO)基因组基因, 构建了表达载体 pRSV/EPO. 用脂质体法转染 CHO-K12 细胞, 在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 G418 浓度下筛选到了稳定表达 EPO 的细胞株, 表达量约为每天每 10^6 细胞 160IU. 在此基础上又构建了带有潮霉素 B 抗性的二氢叶酸还原酶(dhfr)基因表达载体 pHY/dhfr, 再将这一表达载体用脂质体方法导入 C10 细胞中, 经 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素 B 筛选, 获得了部分潮霉素 B 抗性的细胞株, 这些细胞株既能表达 EPO 又能表达外源的 dhfr 基因, 经 1 μmol 的氨甲喋呤(MTX)加压筛选, 获得了表达量为每天每 10^6 细胞 2400 IU 的高表达细胞克隆, 表达量提高了 10~ 15 倍. 初步建立了用非 dhfr 缺陷型细胞高效表达外源基因的方法, 这一方法在生产上有实际意义, 在理论上值得进一步研究. 用 TF-1 细胞对 EPO 进行了生物活性检测, 证实所表达的 EPO 有生物活性.

关键词 促红细胞生成素 二氢叶酸还原酶基因 氨甲喋呤 潮霉素 B 细胞表达

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是一种由肾脏产生的酸性糖蛋白激素, 作用于造

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-20-2183>