

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20520131151549

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

蛋白质-蛋白质相互作用研究平台的建立
及多肽分子探针构建

Development of Platform for Studies of Protein-Protein
Interactions and the Design of Peptide Probes

鲍小佳

指导教师姓名: 吴川六教授

专业名称: 分析化学

论文提交日期: 2016年05月

论文答辩时间: 2016年05月

学位授予日期: 2016年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015年05月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 蛋白质-蛋白质相互作用及其特点	2
1.3 α -螺旋-口袋介导的蛋白质-蛋白质相互作用	4
1.3.1 MDM2 / p53 相互作用	4
1.3.2 Bcl-2 家族蛋白相互作用	6
1.4 蛋白质-蛋白质相互作用抑制剂	7
1.5 稳定多肽 α -螺旋结构的化学修饰方法	11
1.5.1 二硫键介导	13
1.5.2 内酰胺键介导	14
1.5.3 烃类装订	14
1.5.4 氢键替代修饰	15
1.5.5 光敏化合物装订	16
1.5.6 其他交联剂装订	17
1.6 研究思路及意义	18
第二章 MDM2 相关蛋白及 Bcl-2 家族蛋白的表达与纯化	21
2.1 引言	21
2.2 实验部分	23
2.2.1 主要试剂	23
2.2.2 主要仪器	24
2.2.3 实验方法	24
2.3 实验结果与讨论	32
2.3.1 蛋白表达与纯化	32

2.3.2 荧光偏振分析法测定多肽与蛋白质的解离常数.....	46
2.4 本章小结	50
第三章 多肽分子探针的构建	51
3.1 引言	51
3.1.1 关于形成多肽二聚体对提高多肽结构稳定性和结合选择性的原理 预想.....	51
3.1.2 关于光敏性多肽抑制剂探针对细胞内抑制剂作用结果的监测原理 预想.....	52
3.2 实验部分	54
3.2.1 主要试剂.....	54
3.2.2 主要仪器.....	54
3.2.3 实验方法.....	54
3.3 实验结果与讨论	57
3.3.1 Bim-1、Bim-2 的 CD 光谱表征.....	57
3.3.2 基于双二硫键介导构建 Bim-1、Bim-2 二聚体	60
3.3.3 基于六氟苯介导构建 Bim-2 二聚体	63
3.3.4 Bim-2 及其二聚体的酶解动力学实验	65
3.3.5 Pep PMI、Pep J 的 LC-SDA 修饰	67
3.4 本章小结	67
第四章 多肽分子探针抑制剂与蛋白质相互作用的研究	68
4.1 前言	68
4.2 实验部分	69
4.2.1 主要试剂.....	69
4.2.2 主要仪器.....	70
4.2.3 实验方法.....	70
4.3 实验结果与讨论	77
4.3.1 Bim-1 及其二聚体对蛋白 Mcl-1、Bcl-xL 的活性及选择性	77
4.3.2 Bim-2 及其二聚体对蛋白 Mcl-1、Bcl-xL 的活性及选择性	78
4.3.3 LC-SDA 修饰的 Pep PMI、Pep J 与 MDM2 的光交联结果	80

4.4 本章小结	81
总结与展望	82
参考文献	86
攻读硕士学位期间所获奖项	92
攻读硕士学位期间发表论文	93
致谢.....	94

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Protein-protein interactions and their characteristics.....	2
1.3 α-Helix-mediated protein-protein interactions	4
1.3.1 protein-protein interactions of MDM2 and p53.....	4
1.3.2 protein-protein interactions of the Bcl-2 family	6
1.4 Inhibitors of protein-protein interactions.....	7
1.5 Chemical modification of strategies for α-helix stabilization	11
1.5.1 Disulfide bridges	13
1.5.2 Lactam bridges.....	14
1.5.3 Hydrocarbon stapling.....	14
1.5.4 Hydrogen-bonding surrogates.....	15
1.5.5 Photosensitive compound stapling.....	16
1.5.6 Others.....	17
1.6 Objectives, contents and significance of the dissertation	18
Chapter 2 Expression and purification of MDM2 and proteins of the Bcl-2 family.....	21
2.1 Introduction.....	21
2.2 Experimental section	23
2.2.1 Reagents.....	23
2.2.2 Instruments.....	24
2.2.3 Methods.....	24
2.3 Results and discussion	32

2.3.1 Expression and purification of proteins	32
2.3.2 Determination of dissociation constants of peptides and proteins by competition fluorescence polarization assays	46
2.4 Conclusions.....	50
Chapter 3 Design and synthesis of peptide probes	51
3.1 Introduction.....	51
3.1.1 Improving the stability and selectivity of peptide by the forming of peptide dimer	51
3.1.2 Characterization of the combination of peptide and protein in cells using photosensitive peptide probe	52
3.2 Experimental section	54
3.2.1 Reagents.....	54
3.2.2 Instruments.....	54
3.2.3 Methods.....	54
3.3 Results and discussion	57
3.3.1 Circular dichroism spectra of Bim-1 and Bim-2.....	57
3.3.2 Formation of Bim-1 and Bim-2 dimers mediated by twin disulfide linkages or hexafluorobenzene	60
3.3.3 Formation of Bim-2 dimer mediated by hexafluorobenzene	63
3.3.4 Enzymolysis experiments of Bim-2 and Bim-2 dimer	65
3.3.5 Modification of Pep PMI and Pep J by LC-SDA	67
3.4 Conclusions.....	67
Chapter 4 Study of peptide probes and proteins	68
4.1 Introduction.....	68
4.2 Experimental section	69
4.2.1 Reagents.....	69
4.2.2 Instruments.....	70
4.2.3 Methods.....	70
4.3 Results and discussion	77

4.3.1 Binding ability and selectivity of Bim-1 and Bim-1 dimer	77
4.3.2 Binding ability and selectivity of Bim-2 and Bim-2 dimer	78
4.3.3 Covalent binding of photosensitive peptide probes and MDM2	80
4.4 Conclusion	81
Conclusion and prospect	82
References	86
Awards.....	92
Publications	93
Acknowledgements	94

厦门大学博硕士学位论文摘要

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

蛋白质是生命的物质基础和生命存在的表现形式，而其生物学功能，很多是依靠特殊的蛋白质-蛋白质相互作用(Protein-Protein Interaction)来实现的。因此，研究和调控蛋白质-蛋白质相互作用在研究蛋白质功能、阐明细胞通路以及设计新型药物等方面均有着非常重要的意义。有研究发现，很多蛋白质-蛋白质相互作用都是由 α -螺旋结构介导的，可以通过具有 α -螺旋的多肽进行调节。但是，自然状态下，多肽在溶液中往往呈无规卷曲状态，导致其与目标蛋白的识别、结合功能大大降低，限制了多肽在生物体中的应用。因此，探索如何稳定多肽 α -螺旋以提高其生物活性和稳定性是目前的研究热点和重点。

本论文利用大肠杆菌原核表达技术，表达得到了生物体中比较重要的几组具有相互作用的蛋白质，成功建立起蛋白质-蛋白质相互作用的研究平台。在多肽抑制剂方面，我们探索提出了一种通过双二硫键或六氟苯介导构建多肽二聚体的方式稳定多肽 α -螺旋结构，并对装订后的多肽进行了亲和力和抗酶解稳定性等方面的研究。此外，我们还探索合成了一种光敏性多肽抑制剂探针，其光活性基团可以在一定波长激发下与蛋白质对应间隔臂长度距离上的侧链或肽链骨架形成共价键，有望应用于直观表征细胞内多肽与目标蛋白的结合。

本论文共分为四章，主要包括以下内容：

第一章：首先综述了几种由 α -螺旋-口袋介导的蛋白质-蛋白质相互作用以及几类针对蛋白质-蛋白质相互作用的分子探针，介绍了目前在稳定多肽 α -螺旋结构方面的研究进展，以此为基础，提出本文的研究思路、内容和意义。

第二章：采用大肠杆菌原核表达技术，成功表达并得到了 MDM2、MDMX、p53、Mcl-1、Bcl-xL、SUMO 酶等多种活性蛋白，建立了 MDM2/p53 相互作用以及 Mcl-1/Bak 相互作用研究平台。

第三章：以活性多肽 Bim 为基础，将多肽分子内 i 和 $i+7$ 位置上的氨基酸替换为半胱氨酸，构建了 Bim-1 和 Bim-2 两条多肽。利用两个半胱氨酸侧链上的巯基氧化形成分子间双二硫键，成功合成了 Bim-1 二聚体；同时，基于六氟苯的

装订技术，成功合成了 Bim-2 二聚体。酶解实验也证明了多肽二聚体的抗酶解稳定性明显优于单体。

第四章：利用荧光偏振竞争分析法对 Bim-1、Bim-2 及其同源二聚体的活性和选择性进行了探究。研究发现：1) 半胱氨酸的引入位置对多肽活性有重要影响；2) 具有较高结合能力和选择性的多肽 Bim-2，在形成二聚体后，依旧能保持原有的生物活性。此外，利用 SDS-PAGE 对光敏性多肽抑制剂探针与目标蛋白的共价结合情况进行定性表征，发现光交联剂在多肽上的偶联位置对结合效果有重要影响。

关键词：蛋白质；原核表达；多肽； α -螺旋；半胱氨酸；二聚体；选择性；抗酶解稳定性；光交联

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库