

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200225040

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

丝组二肽及其类似物, 衍生物的生物活性研究
& 甲胺磷降解细菌的筛选及研究

**Biological Activity of Seryl-histidine Dipeptide,
Seryl-histidine Analogues and Seryl-histidine derivatives
& Screening and Investigation of Methamidopho(MAP)
Degrading-bacteria**

路 杨

指导教师姓名: 赵 玉 芬 院 士

专 业 名 称: 有 机 化 学

论文提交日期: 2 0 0 5 年 6 月

论文答辩日期: 2 0 0 5 年 6 月

学位授予日期: 2 0 0 5 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2005年6月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

丝组二肽及其类似物，衍生物的生物活性研究

摘要

本研究首先利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、荧光分光光度技术、圆二色光谱技术、多级质谱技术、竞争法酶联免疫技术等对丝组二肽的蛋白质切割功能从活性定量、底物选择性等方面进行了较为深入的研究，并对组丝二肽与蛋白质的相互作用进行了较为全面的对比研究。发现丝组二肽在中性环境下可以 $4.63 \times 10^{-4} \text{mM} / \text{hr}$ 的速度切割蛋白质。在二级结构选择性上，丝组二肽对 β 折叠以及自由 LOOP 区含量较高的蛋白质具有较高的切割活性。在一级结构上，丝组二肽切割蛋白的位点比较偏向甘氨酸。并且在此基础上，进一步研究了一系列非肽类酰胺和一种聚酰胺/丝组二肽缀合物与核酸，蛋白质的相互作用。发现了丝组二肽不同基团在核酸切割过程中具有不同的作用，及其作为人工合成核酸定点切割剂的切割基团具有良好的应用前景。

关键词：丝组二肽 切割 绿色荧光蛋白

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Biological activity of Seryl-histidine dipeptide, Seryl-histidine analogues and Seryl-histidine derivatives

Abstract

In our study, SDS-PAGE, Fluorescence spectrophotometry, CD, ESI/MS/MS, competitive ELSIA, and biosense techniques were used to investigate the interactions of Seryl-histidine or Histidyl-serine dipeptide with proteins and the interactions of derivatives and analogues of Ser-His or a pair of polyamide/Ser-His conjugates with DNA, proteins. We found the rate of 1mM SH cleavage on GFP in BRbuffer at pH6.8 in 50°C was 4.63×10^{-4} mM/hr, and Ser-His cleavage activity on proteins was substrate dependent in some extent. The fragments resulted from Seryl-histidine dipeptide cleavage on proteins were checked by ESI/MS/MS, and the results showed that Seryl-histidine dipeptide preferentially cleave Gly residue site. A pair of new enantiomer serine/histamine conjugates (L-Ser-Hism and D-Ser-Hism) was capable of cleaving DNA significantly with optimal pH 6.0-6.5. The isomer L-Ser-Hism has stronger cleavage ability than the other isomer D-Ser-Hism. The polyamide/Ser-His conjugate showed an significantly enhanced DNA-cleaving activity.

Key word: Seryl-histidine dipeptide, cleavage, GFP

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

1. 引言	8
2. 丝组二肽与蛋白质的相互作用	14
2.1 实验部分	14
2.1.1 试剂	14
2.1.2 仪器	14
2.1.3 方法	15
2.2 结果与讨论	16
2.2.1 丝组二肽蛋白质切割活性最佳 pH 的选定	16
2.2.2 丝组二肽蛋白质切割活性的半定量研究	18
2.2.3 丝组二肽对不同底物的切割效率之比较	20
2.2.4 组丝二肽 (HS) 与蛋白质的互作研究	26
2.2.5 组丝二肽 (HS) 对 DNA 酶的抑制作用	28
2.2.6 切割碎片的 ESI—MS 分析	29
2.3 本章小结	33
3. 丝组二肽类似物的活性研究	35
3.1 实验部分	36
3.1.1 材料	36
3.1.2 仪器	37
3.1.3 方法	37

3.2 结果与讨论	40
3.2.1 肽库的 ELISA 结果	40
3.2.2 10 种丝组二肽类似物的 DNA 和蛋白质切割活性	41
4.DNA 定点切割剂的初步研究	49
4.1 实验部分	49
4.1.1 材料与试剂	49
4.2 结果与讨论	49
5.结论	53
参考文献	54

Content

Chapter 1 Introduction	8
Chapter 2 Seryl-histidine dipeptide interaction with Protein	14
2.1 Experiments	14
2.1.1 Reagents	14
2.1.2 Instruments	14
2.1.3 Experimental Procedure	15
2.2 Results and Discussions	16
2.2.1 pH effect of SH cleavage on Protein	16
2.2.2 SH cleavage effect semi-quantitative analysis	18
2.2.3 SH cleavage effect on different kinds Protein	20
2.2.4 HS interaction with Protein	26
2.2.5 HS interaction with DNAase	28
2.2.6 Fragments resulted from SH cleavage on protein by ESI/MS/MS	29
2.3 Summary	33
Chapter 3 Biological activity of Seryl-histidine analogues	35
3.1 Experiments	36
3.1.1 Reagents	36
3.1.2 Instruments	37

3.1.3 Experimental Procedure	37
3.2 Results and Discussions	40
3.2.1 ELISA results of Peptide libraries	40
3.2.2 Ten analogues of SH interaction with DNA or Protein	41
Chapter 4 DNA directional cleavage	49
4.1 Experiments	49
4.1.1 Reagents and Instruments	49
4.2 Results and Discussions	49
Chapter 5 Conclusion	53
References	54

第一章 引言

1.1 丝组二肽的研究意义

按照化学进化的理论，在原始大气阶段，由于高压放电等作用，简单的无机小分子逐渐形成有机小分子再到生物大分子物质的过程，必须要经历一个氨基酸的中间体，在模拟远古大气高压放电的条件下已经可以形成 20 种自由氨基酸，那么第一个肽键是如何形成的呢？清华大学生命有机磷教育部重点实验室的研究人员于 10 年前发现了磷酸化氨基酸具有自组装功能，该实验室负责人赵玉芬院士提出了磷酸化氨基酸是生命化学进化的最基本单元的理论，并相继发现了基于这一理论的产物磷酸化丝氨酸和丝组二肽具有核酸、蛋白质以及脂的切割功能。这些生物活性分子所具有的功能代表了现代酶的雏形，也进一步验证和提升了“磷酸化氨基酸是生命化学进化的最基本单元的理论”。同时，这些发现对著名的“RNA 世界”理论提出了挑战，为从化学进化的角度探索生命起源提供了全新的视角。

丝氨酸和组氨酸是大多数天然酶的活性中心，包括丝氨酸蛋白酶家族、脂肪酶、酯酶以及同源内切核酸酶的联结处，并直接参与酶促化学反应。Ser 的侧链—OH 常常作为亲核基团，His 的咪唑基则常常作为酶的质子供体或受体。

清华大学生命有机磷实验室发现丝组二肽能够在近中性条件下以水解方式切割 DNA、蛋白质以及羧酸酯，这是目前为止发现的世界最小的有切割功能的肽。从化学进化的角度这一发现对著名的“RNA 世界”的理论提出了挑战，并由此可以推测丝氨酸、组氨酸等在蛋白酶活性中心的高频出现是进化中被重复选择的结果。这一研究结果进一步提示对小肽生物功能的挖掘，有可能为生命起源与进化、酶机制、蛋白质折叠等方面的研究提供重要的线索。虽然丝组二肽切割 DNA 的机理还不完全清楚，但已有的研究结果发现，丝组对 DNA 的切割可以产生自由的 5'磷酸基团和 3'羟基，而且其切割活性非常低，与 DNA 酶参比在 50℃时的切割活性只有 1.5×10^{-2} unit/mg。

用 Silicon Graphics System 计算机模拟软件，算得丝组二肽在最低能态下的立体结构图以及丝组二肽与 DNA 相互作用的模式见 Fig.1-1。

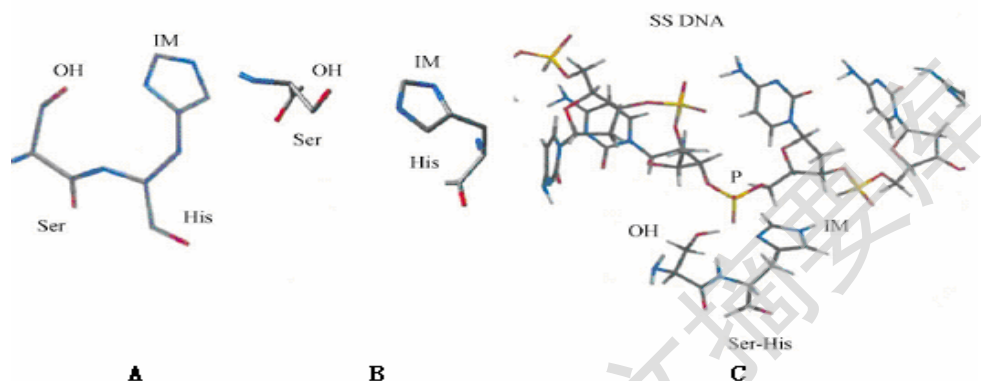


Fig.1-1 Computer modeling of Ser-His and Ser-His interaction with DNA substrate.

(A 能量最低状态下的丝组二肽三维结构; B 胰凝乳蛋白酶晶体结构三维, 示活性中心丝氨酸和组氨酸残基的相对位置, 由 BNPD 下载并除去蛋白质结构中的其余氨基酸残基; C 能量最低状态下的丝组二肽与其底物的相互作用。)

计算发现, 能量最低状态下, Ser 羟基的氧与 His 咪唑基的两个氮之间的距离分别为 2.76Å 和 4.87Å(图 1-1), 在胰凝乳蛋白酶的活性中心。它们的距离分别为 2.68Å 与 4.49Å (图 1-1)。不仅如此, 在能量最低状态下丝氨酸的氨基氮与其羟基氧之间的距离也与胰凝乳蛋白酶的参数非常接近, 分别为 2.83Å 和 3.11Å。根据计算机模拟的丝组二肽的结构以及胰凝乳蛋白酶的作用机制, 可以推测丝组二肽切割 DNA 的机理见 Fig.1-2¹⁻¹⁵。

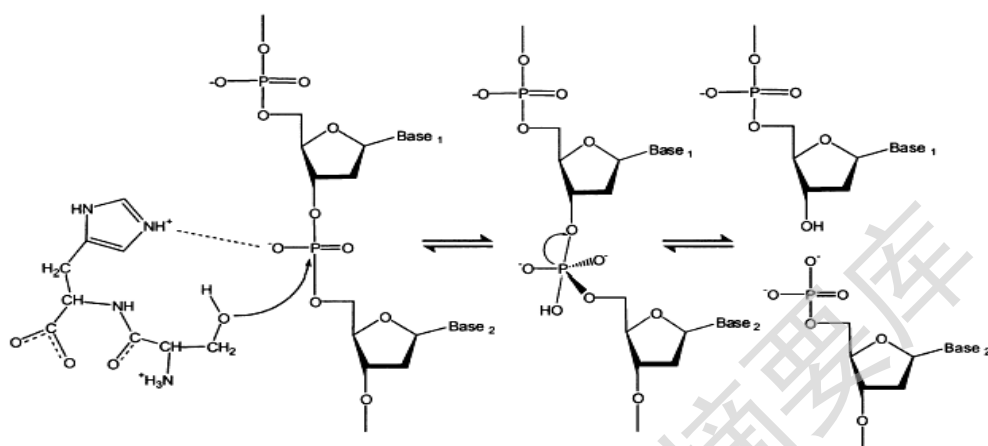


Fig.1-2, Proposed DNA nicking mechanism by Ser-His.

1.2 绿色荧光蛋白

绿色荧光蛋白(GFP) 是一种新的蛋白折叠方式的典型代表, Yang 把它称作 β -can。

绿色荧光蛋白的立体结构是由 11 条 β -strand 折叠绕成的一个圆柱体, 构成了一个把荧光发光中心包含在中央的桶。一条 α 螺旋几乎完美地包埋于圆柱的中心, 形成一个坚实的桶状结构, 直径大约 30 Å, 长 40 Å, 全长为 238 个氨基酸, 分子量约为 27 KD。GFP 不容易变性, 只有在 6 mol/L 盐酸、温度高于 90°C 或者 pH 小于 4 或大于 12 的条件下才会变性。

厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室从厦门海域的水母中分离并表达出绿色荧光蛋白 GFPxm, 进行了一系列突变, 经预测, 得到不同 β 折叠含量的绿色荧光蛋白。本论文利用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、荧光分光光度技术、圆二色性光谱技术(CD) 等研究了丝组二肽与 GFP (绿色荧光蛋白)、BSA (小牛血清白蛋白) 和 LYS (溶菌酶) 的相互作用 (其中 GFP 二级结构为 β -折叠型蛋白质, BSA 为 α 螺旋和 β -折叠混合型, 而 LYS 则为典型的 α 螺旋型球蛋白)。从活性定量、底物选择性、切割机制等方面对丝组二肽的蛋白质切割功能进行了较为深入的研究¹⁶⁻²⁰。

1.3 丝组二肽类似物、衍生物的生物活性研究

在具有生物切割功能的分子当中，除了众所周知的 RNA 酶 (RNase) 和胰蛋白酶 (chymotrypsin) 等之外，还有许多小分子化合物能水解性地切割 RNA 和蛋白质。在这些小分子切割剂尤其是天然的切割酶的化学结构当中，作为磷酸化的丝氨酸和组氨酸残基总是占据着非常关键的活性位置，并由于它们的氨基、羟基和咪唑基直接参与催化反应而发挥着非常关键的作用。

DNA 水解或切割在现代生物学尤其是分子生物学上占据着不可或缺的地位。在至今为止的分子生物学研究当中，通常被用于 DNA 切割的工具是酶蛋白即 DNA 水解酶，这也是唯一的工具。DNA 水解酶是从天然生物材料中分离出来的，目前已分离获得上百种。这种分离制取不但程序复杂、成本高、不易保存，而且其种类数量也受到很大的制约，已越来越不能适应分子生物学研究发展的需要。目前只有一些在活性中心带有金属原子的小分子，由于它们能产生自由基并以此切割 DNA，很少有小分子能够以水解方式切割 DNA。因此，人工的 DNA 水解酶或具有同类功能的化合物如 DNA 定点切割试剂的研制和开发必然地成为科学领域的一项紧迫的任务。这也是科学家尤其是化学家面临的一个重要挑战，同时也为化学家在生物学领域发挥作用提供了广阔的空间。

十年前，在清华大学化学系生命有机磷实验室的研究中，发现丝组二肽不但具有切割 DNA 的活性而且具有切割 RNA 和蛋白质的活性，但是单独的磷酸化丝氨酸却没有这种活性。最近对蛋白质自装组的研究结果表明，自组之后的蛋白序列中总是含有带丝氨酸或半胱氨酸残基的 N 末端及组氨酸-天冬酰胺残基 C 末端，而且更重要的是这种蛋白质具有核酸酶功能去切割染色体 DNA。更近一个时期的研究表明，带丝氨酸残基的 N 末端及组氨酸残基 C 末端的小肽能够切割 DNA、酯及蛋白质。

基于以上研究，朱长进博士设计合成了一系列丝组二肽类似物以及衍生物，以研究丝组二肽的 DNA 切割机理。本报告主要研究以上化合物的生物

活性²¹⁻²⁶。

1.4 DNA 定点切割剂的初步研究

DNA 的小分子识别是一个新兴且非常活跃的化学生物学研究领域。它为有机化学尤其是有机合成化学向生命科学的渗入开辟了又一个广阔的空间。以非插入形式与 DNA 结合的天然或人工合成小分子有许多种，其中最具有代表性的、目前最为人们所关注的、具备 DNA 识别功能的小分子有两类，即寡聚核苷酸和聚酰胺。

单链的寡聚核苷酸能与 DNA 双螺旋结构结合而成三螺旋，这一概念早在上世纪的五十年代就提了出来，距 DNA 双螺旋结构的发现仅几年时间。然而，又过了三十年才由加州理工大学的 Moser 等人在实验中证明一个十五聚的寡聚核苷酸在近似于细胞的条件下能稳定地、序列特异性地结合在 DNA 双螺旋结构的大沟而形成三螺旋复合物。几乎在同时，法国 Hélène 领导的研究小组也获得了重要的突破。这便成为 DNA 分子识别研究的重要开端。经过此后的一系列深入工作，DNA 三螺旋复合物的方法已成为 DNA 分子识别研究领域的标志，因为它表明，除了天然的蛋白质分子对 DNA 的识别之外，用化学的方法仍然可以特异性地识别 DNA 双螺旋结构上碱基序列的单个靶位点。正是在这一基础之上，人们通过有机化学途径设计合成了一种能特异性识别 DNA 的小分子聚酰胺核酸 (PNA)。与此同时，也是在加州理工大学，Dervan 等人对另一类具有 DNA 特异性识别功能的小分子聚酰胺的研究开发也获得了巨大的成功。这种小分子是在天然聚酰胺抗生素纺锤菌素 (netropsin) 和偏端霉素 (distamycin) 的基础上设计合成的。X 衍射及核磁共振谱的研究结果表明，纺锤菌素和偏端霉素的碱基特异性地结合在 DNA 双螺旋结构小沟里，由此几乎就可以断定这就是该抗生素具备抗菌、抗病毒和抗癌作用的分子机理。相比于天然的抗生素，合成的聚酰胺显然具有了更强的结合活性和识别的特异性。

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