



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102718834 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201110258296. 3

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 09. 02

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 范祖森 王丽 孙飞 唐海东
吴连锋 李翀 翟羽佳

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

C07K 5/117(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

A61K 38/07(2006. 01)

A61P 37/06(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

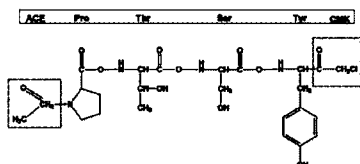
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 特异性抑制剂、制备方法及应用

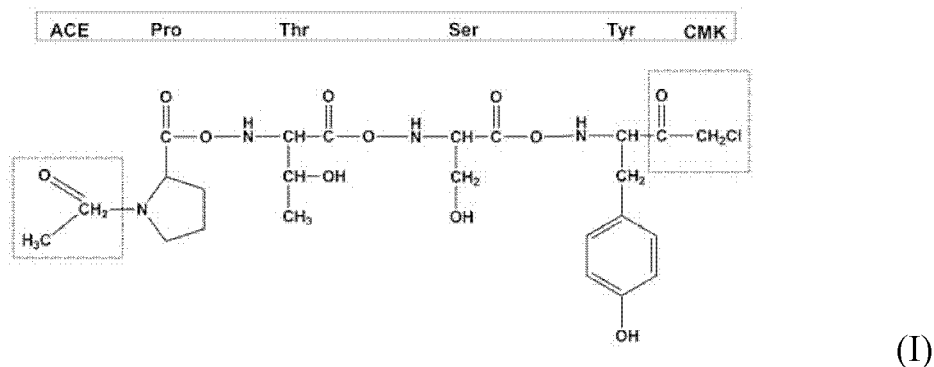
(57) 摘要

本发明涉及新的式 (I) 的化合物, 其中 ACE(乙酰基, ACE) 为乙酰基, CMK(氯甲基酮, CMK) 为氯甲基酮, Pro、Thr、Ser、Tyr 分别代指脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸四种氨基酸。式 (I) 化合物可作为颗粒酶 H 抑制剂用于相关科学研究, 并具有应用于临床器官移植和自身免疫病治疗等的潜在应用价值。



(I)

1. 式 (I) 的化合物：



其中 Pro、Thr、Ser、Tyr 分别代指脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸，ACE 表示乙酰基，CMK 表示氯甲基酮。

2. 权利要求 1 所述的化合物，其特征在于：多肽组成以及它们的相对结构位置为 Pro-Thr-Ser-Tyr；ACE 表示乙酰基；CMK 表示氯甲基酮。

3. 权利要求 1 或 2 所述的式 (I) 的化合物，其是人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 结合口袋识别多肽序列。

4. 权利要求 3 所述的式 (I) 的化合物，其中 Tyr-CMK 与人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 的结合口袋之间形成的共价键。

5. 式 (I) 的化合物的制备方法，该方法包括以下步骤：

- (1) 根据化学式 (I) 的化合物的氨基酸组成及其相对位置，合成肽段；
- (2) 对步骤 (1) 中合成肽段的 N 端进行乙酰化修饰；和
- (3) 对步骤 (2) 中修饰完成的肽段进行 C 端 CMK 修饰。

6. 权利要求 5 所述的制备方法，进一步包括：分离纯化和通过质谱法鉴定所得肽段。

7. 权利要求 1 或 2 所述的式 (I) 的化合物在制备人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 抑制剂中的用途。

8. 权利要求 7 所述的用途，其中所述抑制剂用于减少器官移植排斥、治疗自身免疫病和 / 或治疗肿瘤。

人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 特异性抑制剂、制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 抑制剂、它的制备方法以及用途。

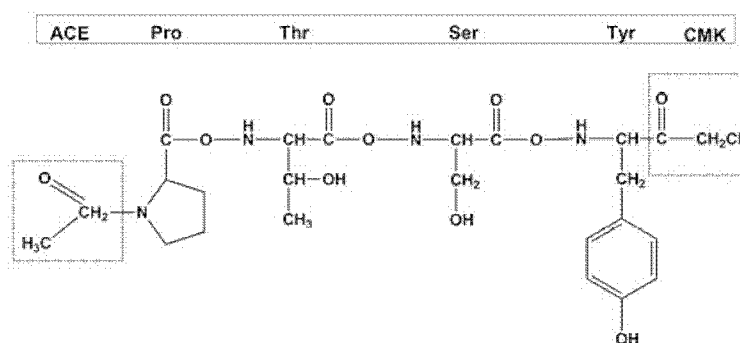
背景技术

[0002] 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤细胞 (NK) 在机体进行抗病毒及细胞内细菌感染、器官移植排斥和抗肿瘤应答中具有重要作用。死亡受体途径 (FAS/FASL) 以及释放细胞毒性颗粒是这两类杀伤细胞导致靶细胞凋亡及清除的重要通路,而后者是最重要且最有效的杀伤武器。细胞毒性颗粒内主要含有打孔蛋白穿孔素 (perforin) 和颗粒酶 (granzymes)。颗粒酶是一类高度保守的丝氨酸蛋白酶家族成员,具有经典的丝氨酸蛋白酶折叠构象及催化三联体结构。在人类中目前一共发现 5 种颗粒酶 (A、B、K、H 和 M)。颗粒酶 H 的基因定位于 14q11.2,在颗粒酶 B 以及组织蛋白酶 G (cathepsin G) 基因簇之间。尽管从基因进化上分析,颗粒酶 H 基因部分被颗粒酶 B 所取代,两者之间有着 71% 的氨基酸序列同源性,颗粒酶 H 却具有完全不同于颗粒酶 B 的酶学特性。颗粒酶 H 仅在疏水性芳香族氨基酸酪氨酸、苯丙氨酸后特异性水解底物。功能上,颗粒酶 H 一方面通过切割 ICAD (人凋亡蛋白酶激活因子 1), Bid 等底物导致细胞凋亡;另一方面通过水解宿主自身抗原蛋白 La,可抑制 La 介导的 HCV (Hepatitis virus C) 的转录复制。更重要的是,颗粒酶 H 通过直接切割腺病毒蛋白组装蛋白 100K 和 DNA 结合蛋白,解除 100K 对颗粒酶 B 的抑制,并且有效抑制腺病毒的组装和复制。鉴于颗粒酶 H 唯一高表达于 NK 细胞中,其表达量不受 NK 细胞活化状态的影响,关于颗粒酶 H 的研究证明其中天然免疫过程中的独特作用。根据颗粒酶 H 的特殊结构,设计颗粒酶 H 特异性的抑制剂,可在相关领域的科学研究,及临床抑制器官移植排斥反应和自身免疫性疾病的治疗中发挥重要的作用。

发明内容

[0003] 本发明在人颗粒酶 H 结构与功能的解析基础上,设计合成了一种人颗粒酶 H 特异性的抑制剂,其化学结构式如下:

[0004]



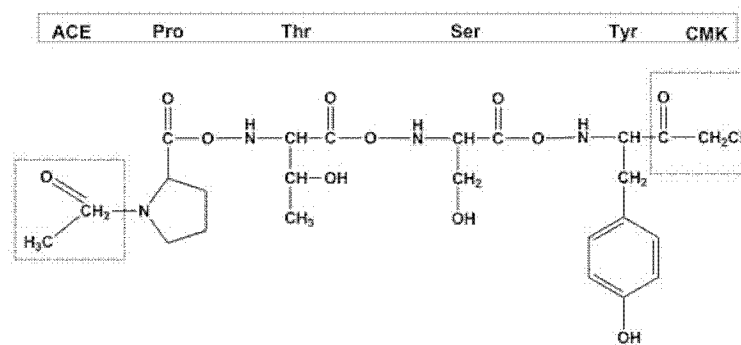
(I)

[0005] 其中 Pro、Thr、Ser、Tyr 分别代指脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸四种氨基酸, ACE 表示乙酰基, CMK 表示氯甲基酮。

[0006] 更具体地, 本发明提供以下各项:

[0007] 1. 式 (I) 的化合物:

[0008]



[0009] 其中 Pro、Thr、Ser、Tyr 分别代指脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸, ACE 表示乙酰基, CMK 表示氯甲基酮。

[0010] 2. 以上 1 所述的化合物, 其特征在于: 多肽组成以及它们的相对结构位置为 Pro-Thr-Ser-Tyr; ACE 表示乙酰基; CMK 表示氯甲基酮。

[0011] 3. 以上 1 或 2 所述的式 (I) 的化合物, 其是人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 结合口袋识别多肽序列。

[0012] 4. 以上 3 所述的式 (I) 的化合物, 其中 Tyr-CMK 与人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 的结合口袋之间形成的共价键。

[0013] 5. 式 (I) 的化合物的制备方法, 该方法包括以下步骤:

[0014] (1) 根据化学式 (I) 的化合物的氨基酸组成及其相对位置, 合成肽段;

[0015] (2) 对步骤 (1) 中合成肽段的 N 端进行乙酰化修饰; 和

[0016] (3) 对步骤 (2) 中修饰完成的肽段进行 C 端 CMK 修饰。

[0017] 6. 以上 5 所述的制备方法, 进一步包括: 分离纯化和通过质谱法鉴定所得肽段。

[0018] 7. 以上 1 或 2 所述的式 (I) 的化合物在制备人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 H 抑制剂中的用途。

[0019] 8. 以上 7 所述的用途, 其中所述抑制剂用于减少器官移植排斥、治疗自身免疫病和 / 或治疗肿瘤。

[0020] 在本发明中, 发明人根据颗粒酶 H 的特殊结构 (结晶结构) 从头设计一种颗粒酶 H 特异性的新抑制剂。本申请的发明人解析并鉴定人颗粒酶 H 的晶体结构, 然后基于解析出来的晶体结构理性设计和验证了本申请要求保护的人颗粒酶 H 特异性抑制剂化合物。在本发明中, CMK 不仅仅是起一种肽末端保护基的作用, 其在本发明的肽抑制剂与颗粒酶 H 的结合中也发挥重要作用。如本申请说明书附图 2 所示, Tyr-CMK 与颗粒酶 H 的结合口袋之间形成的共价键, 从而有效地将该抑制剂锁定在该酶内。

[0021] 化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H 结晶和结构解析实验表明, 该化合物可以在颗粒酶 H 上迅速地找到其靶点, 并能非常恰当地结合到其靶点上 (图 2)。功能测试的结果也一致地表明, 化学结构式 (I) 化合物能非常高效和特异地抑制人颗粒酶 H 的活性 (图 3, 4,

5),因此,该化合物可用于颗粒酶 H 的相关科学研究及其可能带来的临床反应与疾病的治疗等。颗粒酶 H 相关的科学研究包括颗粒酶 H 肿瘤杀伤机制、诱导细胞死亡通路以及其与同家族颗粒酶成员协同关系等的研究。颗粒酶 H 可能带来的临床反应与疾病包括器官移植排斥和自身免疫病等。

附图说明

[0022] 图 1. 式 (I) 的化合物的质谱鉴定;

[0023] 图 2. 化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H 结合的结构图。图中化学结构式 (I) 化合物以黄色的 ball-and-stick 模式呈现,并标注了其各氨基酸和修饰基团的名称。网格图显示了化学结构式 (I) 化合物确实存在的电子密度图 (2Fo-Fc omit map, counter level 1.0 σ),不同颜色的表面图表示了颗粒酶 H 底物结合口袋周围的电势环境;

[0024] 图 3. 化学结构式 (I) 化合物可以高效地抑制颗粒酶 H 的活性。图中 [I]/[E] 指化学结构式 (I) 化合物抑制剂 (inhibitor, I) 与酶 (enzyme, E) 的浓度比;

[0025] 图 4. 化学结构式 (I) 化合物可以高效抑制人颗粒酶 H 对生理底物的切割。图中 wtGzmH 指活性的野生型人颗粒酶 H;D102NH 指活性中心突变的人颗粒酶 H 的无活性形式;ICAD 和 La 是 K562 细胞裂解液中存在的人颗粒酶 H 的天然底物;NM23H1 为内部参照,表明上样量均一;*指 ICAD 蛋白的短型剪切异构体。图中 I/E 指化学结构式 (I) 化合物抑制剂 (inhibitor, I) 与酶 (enzyme, E) 的浓度比;

[0026] 图 5. 化学结构式 (I) 化合物对颗粒酶 A、B、K、M、H 活性的影响。空白柱表示未用化学结构式 (I) 化合物处理,黑色填充柱表示经过化学结构式 (I) 化合物预处理;

[0027] 图 6. 化学结构式 (I) 化合物对杀伤细胞 LAK 活性的影响。图中 E/T(Effector/Target) 比率指杀伤细胞 LAK 与靶细胞 K562 之间的比率。

具体实施方式

[0028] 实施例 1 式 (I) 的化合物的合成、纯化与鉴定

[0029] 式 (I) 的化合物中的氨基酸序列 Pro-Thr-Ser-Tyr 的合成可以按照本领域技术人员公知的固相合成技术来进行(例如参考《固相有机合成-原理及应用指南,王德心编,化学工业出版社,2004 年 9 月》)。对肽段的 N 端进行乙酰化修饰和对 C 端进行 CMK 修饰也是本领域技术人员公知的技术 (Bell, J. K., Goetz, D. H., Mahrus, S., Harris, J. L., Fletterick, R. J. and Craik, C. S. (2003) The oligomeric structure of human granzyme A is a determinant of its extended substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol*, 10, 527-534; Marzo, I., Susin, S. A., Petit, P. X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N. and Kroemer, G. (1998) Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett*, 427, 198-202)。

[0030] 式 (I) 的化合物的合成工作委托杭州中肽生化有限公司完成,其中用 C18 疏水层析方法分离纯化修饰完成的肽段,并且用质谱法鉴定所得肽段,根据理论大小验证主要合成成份是否为化学式 (I) 化合物。从质谱图(见附图 1) 结果可知,所得化合物鉴定的分子量 (541.1Da) 与式 (I) 化合物的理论分子量 (541.0Da) 大小基本相符,因此所得化合物为式 (I) 的化合物。

[0031] 化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H 结晶和结构解析实验表明,该化合物可以在颗粒酶 H 上迅速地找到其靶点,并能非常恰当地粘合其靶点上(图 2)。该结构图形象地表明,式 (I) 化合物能非常合适地锚定于颗粒酶 H 的催化口袋部位,化合物各组分与颗粒酶 H 蛋白表面氨基酸有着很强的相互作用,因此该化合物对抑制颗粒酶 H 的活性可能有很高的效率和特异性。

[0032] 化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H 复合物的结晶与该复合物的结构解析方法如下:用包涵体变复性的方法制备人颗粒酶 H 蛋白(见附录一。虽然 GzmH 的方法与 GzmM 很相似,但有一些改进之处。如果按照 GzmM 的方法,几乎无法纯化得到 GzmH),筛选优化高质量颗粒酶 H 晶体后,再向晶体(晶体生长条件为:100mM Bicine pH 8.5,0.2M Li₂SO₄,25% PEG3350)中加入适量化学结构式 (I) 化合物。16℃ 十二小时浸泡后,挑取化学结构式 (I) 化合物浸泡的颗粒酶 H 晶体在同步辐射线站收集其结构数据,衍射分辨率达 2.70 Å (参见表 1)。用结构解析相关软件处理和分析所收集数据,确定化学结构式 (I) 化合物已经锚定于其靶点后(图 2),利用高质量数据(2.70 Å)建立该复合物的三维结构模型。

[0033] 表 1. 化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H 复合物数据收集及处理结果

GzmH-抑制剂 复合物	
数据收集	
空间群	P4 ₁ 2 ₁ 2
晶胞参数	
a, b, c (Å)	63.243, 63.243, 144.785
α, β, γ (°)	90, 90, 90
分辨率 (Å)	50-2.70
完整度 (%) ^a	99.4(99.6)
R _{merge} (%) ^{a, b}	9.9(24.8)
I/σ<I> ^a	128.67 (12.67)
修正统计	
R _{work} /R _{free} (%) ^c	24.8/30.7
均方根偏差	
键长 (Å)	0.017
键角 (°)	1.661
拉氏图分析 (%)	
最合理区 (%)	87.7
合理区 (%)	12.3
不合理区 (%)	0

[0035] ^a 括号内参数代表最高壳层数据。

[0036] 实施例 2 式 (I) 的化合物抑制人颗粒酶 H 的活性

[0037] 化学结构式 (I) 化合物抑制效果及特异性检测方法如下:

[0038] (1) 使用不同比例浓度的化学结构式 (I) 化合物,完成颗粒酶 H 切割其荧光底物 Suc-FLF-pNA(由北京中科亚光公司合成)(FLF 是检测类糜蛋白酶活性的通用底物)的抑制效率实验。按照化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H 的浓度关系比,将实验分成九个组(每组三个副孔)在酶标板上同时进行。每组 0.3 μM 的颗粒酶 H 分别与不同浓度关系化学结构式 (I) 化合物在酶标板各孔中于 37℃ 结合半小时,再向各孔加入荧光底物 Suc-FLF-pNA(300 μM),充分混匀后将酶标板放入 37℃ 温浴反应 0.5 小时。反应结束后,在多波长酶标仪 Wallac 142 0Victor 上测定各组 405nm 处的吸光度。多次重复上述实验后,对实验结果作统计学处理并绘制各组间数据的比较图(图 3)。结果表明,本发明的式 (I) 化合物能够非常有效地抑制颗粒酶 H 的活性。

[0039] 同时,我们制备了肿瘤细胞 K562(ATCC CCL243) 的细胞裂解液测试化学结构式 (I) 对于颗粒酶 H 切割生理底物的影响 (图 4)。将不同比例的化学结构式 (I) 化合物与颗粒酶 H(0.5 μ M) 37°C 温育 0.5 小时,加入制备的 K562 细胞裂解液,充分混匀后于 37°C 反应 2 小时。反应结束将样品跑 12% SDS-PAGE,转膜做 Western blot,用生理底物 ICAD(由加拿大 Laboratoire d'Immunologie, Université de Montreal, Montreal 实验室的 Dr. R. P. Sekaly 提供) 以及 La(购自 abcam),内部参照 NM23H1(购自 Santa Cruz) 的特异性抗体进行识别鉴定酶切效率。结果表明,化学结构式 (I) 化合物可以高效地抑制颗粒酶 H 的活性。

[0040] (2) 化学结构式 (I) 化合物抑制颗粒酶 H 活性特异性的检测实验。在特异性检测实验中,我们检测了化学结构式 (I) 化合物对人 CTL 和 NK 细胞中所有五种颗粒酶活性的影响。我们在对颗粒酶底物筛选文献报道数据 (Mahrus, S., 和 Craik, C. S. (2005). Chemistry & Biology 12, 567-577) 的基础上,首先设计合成了颗粒酶 A、B、K、M 对应的荧光底物 Suc-VANR-pNA、Z-IEPD-AFC、Ac-YRFK-pNA、Suc-AAPL-pNA(委托中科亚光生物科技有限公司协助合成)。然后,同上述荧光底物使用方法检测了化学结构式 (I) 化合物对其他四种颗粒酶切割其对应荧光底物的影响 (图 5)。结果表明,式 (I) 的化合物对颗粒酶 A、B、K、M 的活性无明显抑制作用,其中颗粒酶 A(GzmA) 的制备参照参考文献 1 和 2,颗粒酶 B(GzmB) 的制备参照参考文献 3,颗粒酶 K(GzmK) 的制备参照参考文献 4,颗粒酶 M(GzmM) 的制备参照参考文献 5。

[0041] (3) 化学结构式 (I) 化合物抑制杀伤细胞 LAK(IL-2 activated killer cells) 活性的检测试验。从人全血中分离的外周血单核细胞培养于含有 200 单位/毫升 RPMI 1640 培养液中活化三天,使用前用 100 μ M 化学结构式 (I) 化合物结合一小时。靶细胞 K562 肿瘤细胞用 200 μ Ci 铬酸钠标记一小时。标记结束后,用 PBS 洗去未结合铬酸钠,按一定比例加入化学结构式 (I) 化合物处理或未处理的 LAK 细胞。37°C 孵育 4 个小时,离心取上清测定 ^{51}Cr 释放,计算抑制效率 (图 6)。CMA(Concanamycin)(购自 sigma 公司) 可抑制 LAK 细胞脱颗粒,作为阳性对照。图 6 所示结果表明,化学结构式 (I) 化合物能够显著抑制杀伤细胞 LAK 的活性。

[0042] 以上功能测试的结果一致地表明,式 (I) 的化合物能非常高效和特异地抑制人颗粒酶 H 的活性 (图 3 至图 6),因此该化合物可用于颗粒酶 H 的相关科学研究及其可能带来的临床反应与疾病的治疗等。颗粒酶 H 相关的科学研究包括颗粒酶 H 肿瘤杀伤机制、诱导细胞死亡通路以及其与同家族颗粒酶成员协同关系等的研究。颗粒酶 H 可能带来的临床反应与疾病包括器官移植排斥和自身免疫病等。

[0043] 附录一、颗粒酶 H 包涵体表达纯化方案 (本方案是本实验室在文献 (4) 以及本实验室另一部分工作 (5) 的基础上改进得来)

[0044] 质粒 :pET28a-Gzm H(Kan⁺) (参照参考文献 5 构建);

[0045] 表达体系 :E. coli :Rosetta(DE3) (Novagen);

[0046] 其余试剂若无另外指出,都购自 Sigma, Co.

[0047] 一、Gzm H 的大量表达

[0048] 1. 从平板中挑出一个含 pET28a-Gzm H 质粒的菌落 (宿主菌为 Rosetta(DE3)),接种于约 50mL 终浓度 100 μ g/ml Kan 的 LB 培养基中,37°C、220rpm 过夜培养;

[0049] 2. 将过夜新鲜菌液按 1-2% 转接于含 100 μ g/ml Kan 的 2L LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220rpm 振荡约 3hr, 至 OD600 为 0.6-0.8 时, 取 1ml 菌液做检测诱导蛋白对照;

[0050] 3. 加 IPTG 至终浓度 1mM/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 5hr, 再取出 1ml 诱导后的菌液留做全菌对照, 剩余菌液 4000rpm 离心 30 分钟 (1L 离心瓶), 或 8000rpm 离心 10 分钟 (250ml 离心瓶), 倒掉上清 (注意将残留 LB 充分流尽), 将沉淀部分放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱过夜保存。

[0051] 二、Gzm H 的包涵体制备

[0052] 1. 取上述冻存细菌沉淀, 于冰上加入裂解缓冲液后, 在磁力搅拌器上搅拌至沉淀全部均匀悬起;

[0053]

裂解缓冲液	终浓度
Tris-HCl (pH8.0)	50mM
NaCl	500mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5mM
DNase I	5 μ g/ml
RNase	10 μ g/ml
Lysozyme	0.25mg/ml
NP40	0.1%

[0054] 2. 超声破菌, 起始:4 秒, 停:9 秒, 共 130-150 次, 破碎过程中应间断性地摇晃下烧杯, 避免局部受热;

[0055] 3. 破碎完毕, 蛋白样品 4 $^{\circ}$ C、17,000rpm 离心 30min。离心后将上清转移到三角瓶中 4 $^{\circ}$ C 保存, 取沉淀部分制备包涵体;

[0056] 4. 将沉淀用洗涤缓冲液 I (约 70ml) 重悬后移入小烧杯中, 在搅拌器上搅拌均匀 (停止搅拌后烧杯底部基本无沉淀物), 然后再转入离心管中 4 $^{\circ}$ C、16,000rpm 离心 30min。按上述方法用洗涤缓冲液 I 洗 2 次, 再用洗涤缓冲液 II 反复洗 3 次后, 便可得到较纯的 Gzm H 包涵体蛋白;

[0057]

洗涤缓冲液 I	终浓度	400ml
Tris-HCl	50mM	20ml (1M Tris-HCl)
EDTA	60mM	48ml (0.5M EDTA)
NaCl	1.5M	120ml (5M NaCl)
Trion X-100	6%	24ml

[0058]

洗涤缓冲液 II	终浓度	500ml
Tris-HCl	50mM	25ml (1M Tris-HCl)
EDTA	60mM	60ml (0.5M EDTA)

[0059] 用 HCl 调洗涤缓冲液 I 和 II 至 pH 7.2, 用双蒸水分别定容至所需体积, 0.22 μ m 抽滤后即可使用 (最好不要放置时间太长, Triton X-100 长时间易产生混浊现象)。

[0060] 三、Gzm H 包涵体蛋白的变复性

[0061] 1. 取上述包涵体蛋白, 用约 10ml 溶解缓冲液重悬后, 在漩涡混匀器上振荡至沉淀完全溶解 (长时间不溶解时, 要采用超声的方法将其完全溶解), 然后放置于摇床摇晃或绑到漩涡混匀器室温振荡过夜。

	溶解缓冲液	终浓度	10 ml
[0062]	Tris-HCl	100 mM	1 ml (1M Tris-HCl)
	EDTA	20 mM	0.4 ml (0.5 M EDTA)
	还原型谷胱甘肽	150 mM	0.46 g
	(307.33 g/mol)		
[0063]	氧化型谷胱甘肽	15 mM	0.092 g
	(612.6 g/mol)		
	盐酸胍	6 M	5.73 g

[0064] NaOH 调 pH 至 8.0 后, 最好马上使用;

[0065] 2. 取过夜溶解的上述蛋白样品到透析带中, 在 pH 5.0 的 6M 盐酸胍中 4℃ 透析完全 (由于溶液非常粘稠透析时间可能要长些);

[0066] 3. 将透析好的蛋白样品逐滴加到 1L refolding buffer (按 1 : 100 的比例) 中, 并用搅拌器不断搅拌使蛋白样品迅速扩散 (转速也不能过高), 此步操作要在 4℃ 层析柜中完成。

[0067]	Refolding buffer	终浓度	3 L
	Tris-HCl	500 mM	181.71 g
	NaCl	100 mM	17.53 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	20 mM	8.82 g
	EDTA	1 mM	6 ml (0.5 M EDTA)
	L-Arg	500 mM	261.3 g
	L-Cys	0.5 mM	0.182 g

[0068] 用盐酸(约 150ml)调节 pH 至 8.5,用双蒸水定容至 3L,0.22 μm 抽滤;

[0069] 4. 将上述蛋白样品 4℃层析柜搅拌复性 8-16hr 后,再按 1 : 2 的比例缓慢加入 2L 的 refolding buffer 中,继续 4℃复性 96hrs。

[0070] 四、复性蛋白的浓缩与纯化

[0071] 1. 复性完毕的蛋白 0.22 μm 抽滤后,用浓缩仪浓缩至 200ml 以下,浓缩过程中要不断正反洗柱子,避免蛋白局部过浓沉淀;

[0072] 2. 纯浓缩后用 binding buffer(50mM Tris,500mM NaCl,10% Glycerol)透析样品,透析完全后再分批上 Ni-NTA 基质过柱纯化(避免蛋白过量堆积);

[0073] 3. SDS-PAGE 检测后,离心浓缩将蛋白样品透析换 buffer 至肠激酶的酶切 buffer(20mM Tris pH 8.0,1mM CaCl₂)中,之后再浓缩至约 1.5ml。

[0074] 五、Gzm H 的激活及活性检测

[0075] 1. 将样品移至 EP 管中,加入适量肠激酶(肠激酶使用量根据所得蛋白量并参考其说明书决定),20℃酶切约 16hrs;

[0076] 2. 酶切完毕 SDS-PAGE 检测酶切效果后,将蛋白用 FPLC 过 Hi trapS 柱去除肠激酶及其他杂质;

[0077] 3. 所得蛋白再次浓缩换 buffer(25mM MES pH 5.5,100mM NaCl),浓缩至所需浓度后可分装放置 -80℃保存;

[0078] 4. 取适量样品做 Gzm H 合成底物切割实验,即活性检测。反应 buffer :40mM Tris PH 7.6,200mM NaCl ;反应体系 :100 μl 反应 buffer+1 μl GzmH 合成底物+1 μg Gzm H(很浓样品最好稀释),37℃孵育并记录底物变黄时间。

[0079] 参考文献

[0080] 1. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, & Lieberman J(2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. Cell 112(5) :659-672.

[0081] 2. Fan Z, et al. (2003) Cleaving the oxidative repair protein Apel enhances cell death mediated by granzyme A. Nat Immunol 4(2) :145-153.

[0082] 3. Waugh SM, Harris JL, Fletterick R, & Craik CS(2000) The structure of the

pro-apoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity. *Nat Struct Biol* 7(9) :762-765.

[0083] 4. Hink-Schauer C, et al. (2002) The 2.2-Å crystal structure of human pro-granzyme K reveals a rigid zymogen with unusual features. *J Biol Chem* 277(52) :50923-50933.

[0084] 5. Wu L, et al. (2009) Structural basis for proteolytic specificity of the human apoptosis-inducing granzyme M. *J Immunol* 183(1) :421-429.

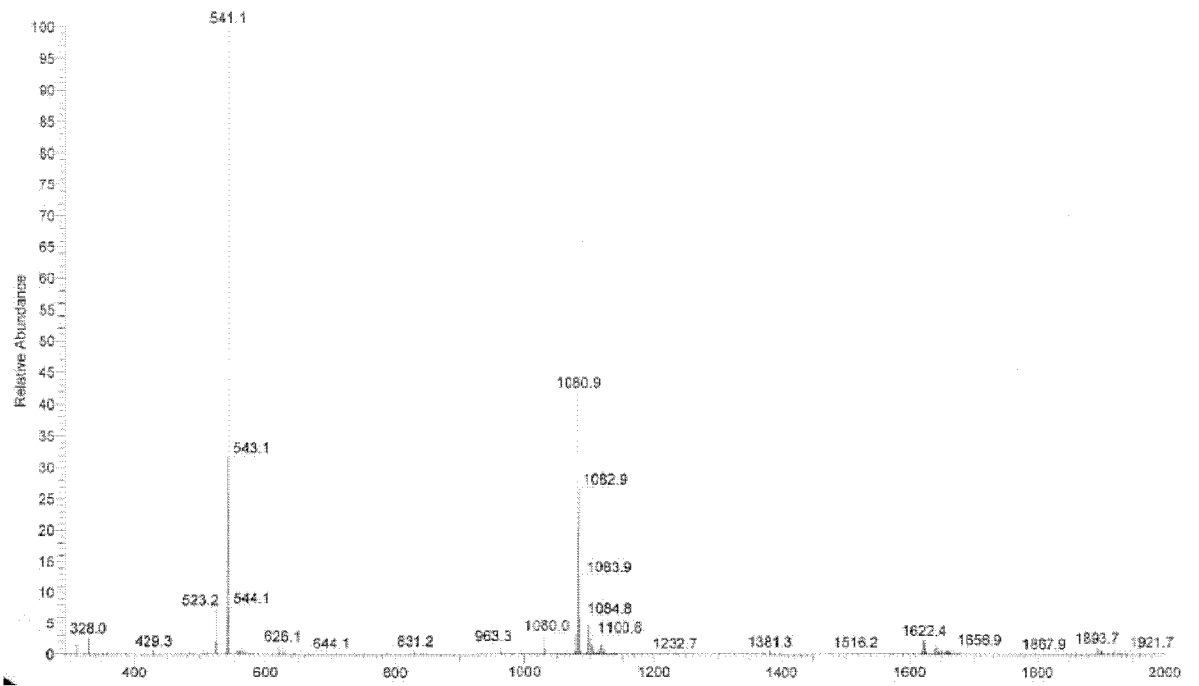


图 1

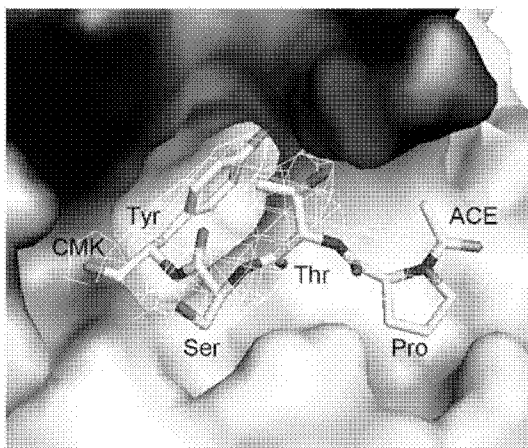


图 2

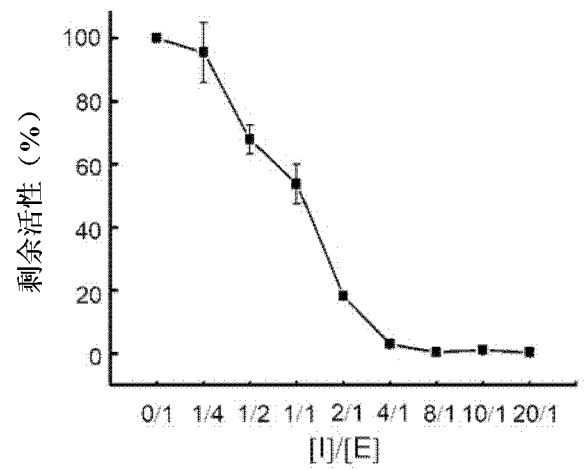


图 3

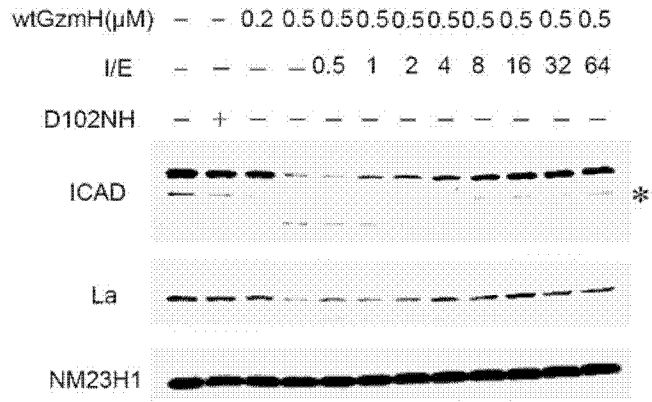


图 4

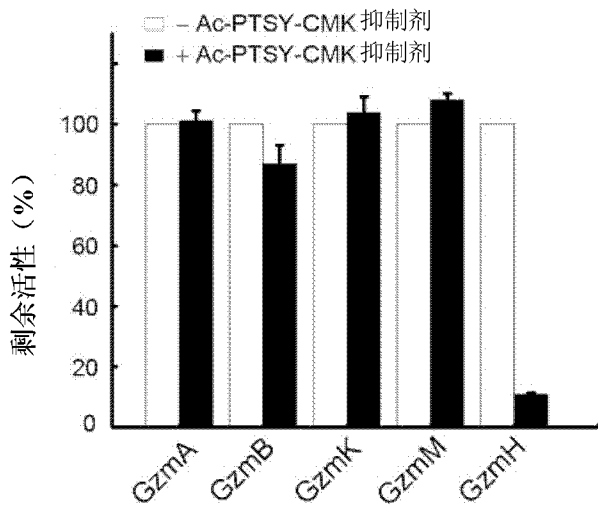


图 5

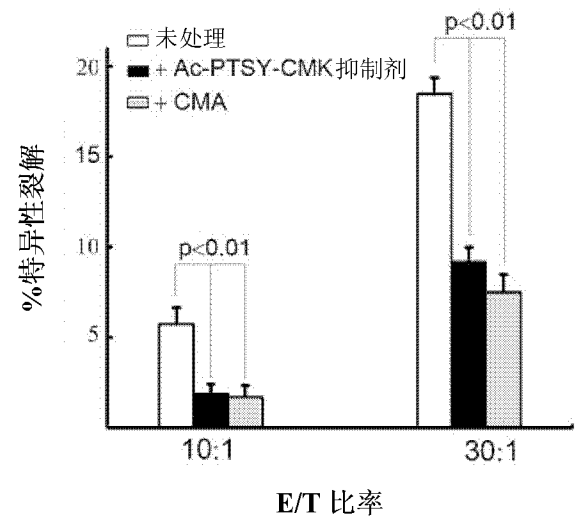


图 6