

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810116369.3

[51] Int. Cl.

C07K 5/11 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[43] 公开日 2010年1月13日

[11] 公开号 CN 101624417A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2008.7.9

[21] 申请号 200810116369.3

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 范祖森 吴连锋 孙 飞 王 丽  
华国强 刘 侃 杨 轩 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

代理人 吴小明

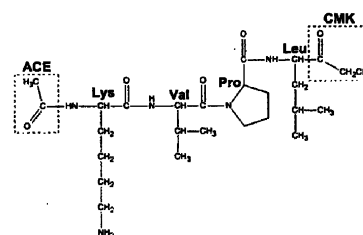
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 4 页

## [54] 发明名称

人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 M 特异性抑制剂、制备方法及应用

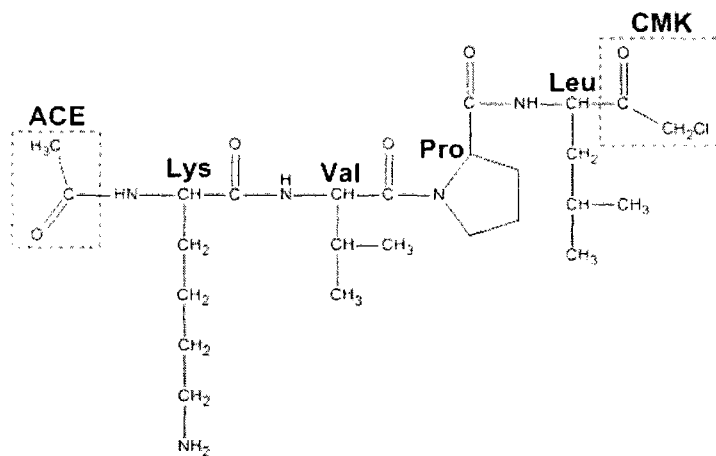
## [57] 摘要

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, Lys、Val、Pro、Leu 分别代指赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸、亮氨酸四种氨基酸。式(I)化合物可作为颗粒酶 M 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 Lys、Val、Pro、Leu 分别代指赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸和亮氨酸，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 Lys-Val-Pro-Leu；ACE 表示乙酰基；CMK 表示氯甲基酮。

3. 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。

4. 权利要求 3 所述的制备方法，进一步包括：用 C18 疏水层析方法分离纯化步骤（3）修饰完成的肽段。

5. 权利要求 4 所述的制备方法，进一步包括：通过质谱法鉴定所得肽段。

6. 权利要求 1 或 2 所述的式(I)的化合物作为人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 M 抑制剂的用途。

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 M 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、治疗自身免疫病和治疗肿瘤。

## 人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 M 特异性抑制剂、制备方法及应用

### 技术领域

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

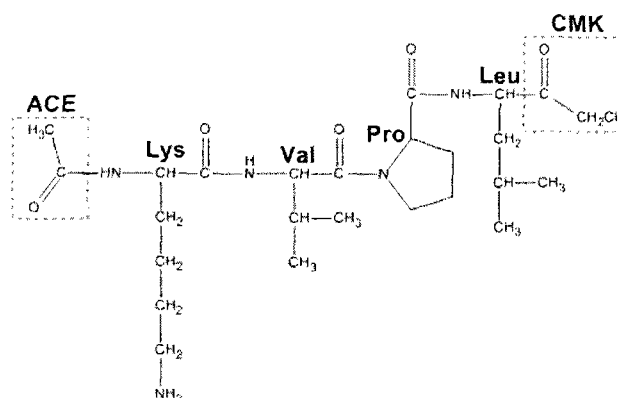
### 背景技术

自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK) 是固有免疫的主要效应细胞, 在抗病毒及细胞内细菌感染、器官移植排斥反应、抗肿瘤免疫应答和自身免疫性疾病方面具有重要作用(Vivier et al., 2008)。NK 细胞杀伤靶细胞的途径有两种: 直接释放细胞毒性颗粒或结合靶细胞上的死亡受体 (Fas/FasL 或 TNF/TNFR 通路)。细胞毒性颗粒的内含物主要包括穿孔素 (perforin) 和丝氨酸蛋白酶家族颗粒酶 (granzymes)。颗粒酶是一类高度保守的丝氨酸蛋白酶, 到目前为止, 在人类中发现了 5 种颗粒酶 (A、B、K、H 和 M) (Chowdhury and Lieberman, 2008)。颗粒酶 M 是其中非常特殊的一员, 它在甲硫氨酸、亮氨酸或正亮氨酸后特异性地切割其底物, 与一组嗜中性弹性蛋白酶共定位于人染色体 19p13.3 上。与其他四种颗粒酶不同, 颗粒酶 M 在活化的 CTL 细胞中没有表达, 而高表达于 NK 细胞和外周血大淋巴细胞 (LGL), 在  $CD3^+CD56^+T$  细胞和  $\gamma\delta T$  细胞仅有少量表达(Krenacs et al., 2003)。颗粒酶 M 独特的酶活性、基因定位及限定的表达谱表明其具有不同的杀伤作用。另外, 有研究发现颗粒酶 M 高表达于一种高细胞毒性细胞系 KHYG-1 中(Suck et al., 2005)。KHYG-1 取自于一位侵袭性 NK 细胞白血病患者的外周血(Yagita et al., 2000), 但是颗粒酶 M 在该细胞系中高表达的原因, 以及其在侵袭性 NK 细胞白血病发生发展过程所起到的作用还不清楚。目前, 有资料显示 KHYG-1 细胞已经被开始尝试用在癌症的过继性免疫治疗中 (<http://www.ihepa.com/Article/ArticleShow.asp?ID=637>)。KHYG-1 体内试验评估将进一步阐明它潜在的临床应用价值, 而该细胞中

高表毒性蛋白颗粒酶 M 所发挥作用也必是其中要评估的重要指标。在现有技术中,还没有任何一种丝氨酸蛋白酶的抑制剂能很好的抑制颗粒酶 M 的活性(Rukamp et al., 2004),所以我们致力于根据颗粒酶 M 的特殊结构设计颗粒酶 M 特异性的抑制剂。所获得的特异性抑制剂,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

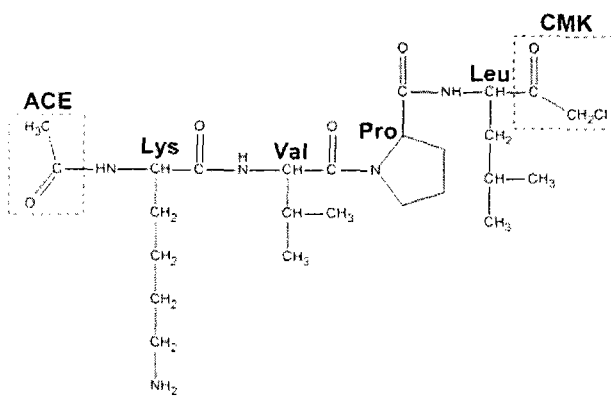
本发明在人颗粒酶 M 结构与功能的解析基础上,设计合成了一种人颗粒酶 M 特异性的抑制剂,其化学结构式如下:



其中 Lys、Val、Pro、Leu 分别代指赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸、亮氨酸四种氨基酸; ACE 表示乙酰基; CMK 表示氯甲基酮。

更具体地,本发明提供以下各项:

### 1. 式(I)的化合物:



其中 Lys、Val、Pro、Leu 分别代指赖氨酸、缬氨酸、脯氨酸和亮氨酸,

ACE 表示乙酰基，CMK 表示氯甲基酮。

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 Lys-Val-Pro-Leu；ACE 表示乙酰基；CMK 表示氯甲基酮。

3. 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。

4. 以上 3 所述的制备方法，进一步包括：用 C18 疏水层析方法分离纯化步骤（3）修饰完成的肽段。

5. 以上 4 所述的制备方法，进一步包括：通过质谱法鉴定所得肽段。

6. 式(I)的化合物作为人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 M 抑制剂的用途。

7. 式(I)的化合物在制备人免疫系统毒性蛋白颗粒酶 M 抑制剂中的用途。

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、治疗自身免疫病或治疗肿瘤。

化学结构式(I)化合物可以用于科学研究和临床治疗中。所述科学研究涉及有关颗粒酶肿瘤杀伤机制和单一颗粒酶在细胞或生物体作用通路的研究；临床治疗包括降低器官移植排斥、自身免疫病治疗和抗肿瘤治疗等。

## 附图说明

图 1. 式(I)化合物合成后疏水层析纯化结果；

图 2. 合成的式(I)化合物的质谱鉴定结果；

图 3. 化学结构式(I)化合物与颗粒酶 M 结合的结构图，其中化学结构式(I)化合物以绿色的 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，不同颜色的表面图表示了颗粒酶 M 底物结合口袋周围的电势环境。蓝色区域为负电荷区；红色区域为正电荷区；其它部分为疏水区；

图 4. 化学结构式(I)化合物可以高效地抑制颗粒酶 M 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）；

图 5. 化学结构式(I)化合物对颗粒酶 A 活性的影响 (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);

图 6. 化学结构式(I)化合物对颗粒酶 B 切割其底物 Bid 的影响 (图中 aB 指活性的颗粒酶 B (active GzmB, aB), GST-Bid 指重组的 GST 和 Bid 融合蛋白 (GST-Bid), M-I 指颗粒酶 M 的抑制剂 (GzmM inhibitor, M-I))。

## 具体实施方式

### 实施例 1 式(I)的化合物的合成、纯化与鉴定

式(I)的化合物中的氨基酸序列 Lys-Val-Pro-Leu 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 et al., 2003; Marzo et al., 1998)。

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, 合成纯化与鉴定结果见图 1 和 2, 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, 纯度为多少。从图 1 结果可知, 式(I)化合物的合成纯度大于 98%。从图 2 结果可知, 所得化合物鉴定的分子量 (530.8) 与式 (I) 化合物的理论分子量 (530.1) 大小基本相符, 因此所得化合物为式(I)的化合物。

化学结构式(I)化合物与颗粒酶 M 结晶和结构解析实验表明, 该化合物可以在颗粒酶 M 上迅速地找到其靶点, 并能非常恰当地粘合其靶点上 (图 3)。该结构图形象地表明, 式 (I) 化合物能非常恰当地锚钉于颗粒酶 M 的催化口袋部位, 化合物各组分与颗粒酶 M 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 M 的活性可能有很高的效率和特异性。

化学结构式(I)化合物与颗粒酶 M 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 M 蛋白 (制备方法参照 Hink-Schauer et al., 2002, 具体见附一), 筛选优化高质量颗粒酶 M 晶体后, 再向晶体 (晶体生长条件为: 50 mM Bicine pH 8.5, 0.2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20%

PEG 3350) 中加入适量化学结构式(I)化合物。16°C 三个小时浸泡后, 挑取化学结构式(I)化合物浸泡的颗粒酶 M 晶体在同步辐射线站收集其结构数据, 衍射分辨率达 2.30 Å。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)化合物已经锚钉于其靶点后, 利用高质量数据 (2.70 Å) 建立该复合物的三维结构模型 (图 3)。

## 实施例 2 式(I)的化合物抑制人颗粒酶 M 的活性

化学结构式(I)化合物抑制效果及特异性检测方法如下:

(1) 使用不同比例浓度的化学结构式(I)化合物, 完成颗粒酶 M 切割其荧光底物 Suc-AAPL-pNA (购于瑞士 Bachem 公司) 的抑制效率实验。按照化学结构式(I)化合物与颗粒酶 M 的浓度关系比, 将实验分成八个组在酶标板上同时进行。每组 0.5 μM 的颗粒酶 M 分别与图 4 所示的不同浓度关系的化学结构式(I)化合物在酶标板各孔中混合后, 再向各孔加入过量的荧光底物 Suc-AAPL-pNA (300 μM), 充分混匀后将酶标板放入 37 °C 温浴反应 2 小时。反应结束后, 在多波长酶标仪 Wallac 1420 Victor 上测定各组 405 nm 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 4)。活性实验表明 (图 4), 式(I)化合物可以高效地抑制颗粒酶 M 的催化活性。

(2) 化学结构式(I)化合物抑制颗粒酶 M 活性特异性的检测实验。在特异性检测实验中, 我们主要检测了化学结构式(I)化合物对 CTL 和 NK 中丰度最高并与颗粒酶 M 同一家族的两个成员活性的影响, 颗粒酶 A (制备方法参照 Fan et al., 2003, 具体见附二) 和颗粒酶 B (制备方法同颗粒酶 A, 参照 Fan et al., 2003, 具体见附二)。我们在颗粒酶 A 底物筛选文献报道数据 (Mahrus and Craik, 2005) 的基础上, 首先设计了颗粒酶 A 的荧光底物 Suc-VANR-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)化合物对颗粒酶 A 切割其荧光底物的影响 (图 5)。图 5 表明式(I)的化合物对颗粒酶 A 的活性无抑制作用。

化学结构式(I)化合物对颗粒酶 B 降解其底物影响的检测采用重组蛋白的体外切割实验来完成。我们表达纯化了重组的颗粒酶 B (其制备方法同

附二) 和其底物 GST-Bid (制备方法参见附三), 然后在颗粒酶的工作缓冲液 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween 20, pH 7.3) 中完成化学结构式(I)化合物对酶与底物切割抑制效果的实验, 最后跑蛋白电泳 SDS-PAGE 来呈现了该反应的结果 (图 6)。图 6 所示结果表明, 式 (I) 的化合物对颗粒酶 B 的活性也无抑制作用

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 M 的活性 (图 4, 图 5, 图 6), 因此该化合物可用于颗粒酶 M 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 M 相关的科学研究包括颗粒酶 M 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 M 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。

**附一、颗粒酶 M 包涵体表达纯化方案(本方案是参照文献(Hink-Schauer et al., 2002)的基础上改进得来)**

质粒: pET22b-Gzm M (Amp<sup>+</sup>) (参见 Hua et al., 2007);

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

其余试剂如果没无另外指出, 都购自 Sigma, Co.

### 一、Gzm M 的大量表达

1. 从平板中挑出一个含 pET22b-Gzm M 质粒的菌落 (宿主菌为 Rosetta(DE3)), 接种于约 50 mL 终浓度 100 µg/ml Amp 的 LB 培养基中, 37°C、220 rpm 过夜培养;
2. 将过夜新鲜菌液按 1-2%转接于含 100 µg/ml Amp 的 2 L LB 培养基中, 37°C、220 rpm 振荡约 3 hr, 至 OD600 为 0.6-0.8 时, 取 1 ml 菌液做检测诱导蛋白对照;
3. 加 IPTG 至终浓度 1 mM /L, 37°C 诱导表达 5 hr, 再取出 1 ml 诱导后的菌液留做全菌对照, 剩余菌液 4000 rpm 离心 30 分钟 (1 L 离心瓶), 或 8000 rpm 离心 10 分钟 (250 ml 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°C 冰箱过夜保存。

### 二、Gzm M 的包涵体制备

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;

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

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;
3. 破碎完毕, 蛋白样品 4 °C、17,000 rpm 离心 30 min。离心后将上清转移到三角瓶中 4 °C 保存, 取沉淀部分制备包涵体;
4. 将沉淀用洗涤缓冲液 I (约 70 ml) 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 °C、16,000 rpm 离心 30 min。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 M 包涵体蛋白;

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

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

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 µm 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)。

### 三、Gzm M 包涵体蛋白的变复性

1. 取上述包涵体蛋白，用约 10 ml 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
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 (307.33 g/mol)	150 mM	0.46 g
氧化型谷胱甘肽 (612.6 g/mol)	15 mM	0.092 g
盐酸胍	6 M	5.73 g

NaOH 调 pH 至 8.0 后，最好马上使用；

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

3. 将透析好的蛋白样品逐滴加到 1 L 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 °C 层析柜中完成。

refolding buffer	终浓度	3 L
Tris-HCl	500 mM	181.71 g
NaCl	100 mM	17.53 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> 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

用盐酸（约 150 ml）调节 pH 至 8.5，用双蒸水定容至 3 L，0.22 μm 抽滤；  
4. 将上述蛋白样品 4 °C 层析柜搅拌复性 8-16 hr 后，再按 1:2 的比例缓慢加入 2 L 的 refolding buffer 中，继续 4 °C 复性 96 hrs。

#### 四、复性蛋白的浓缩与纯化

1. 复性完毕的蛋白 0.22 μm 抽滤后，用浓缩仪浓缩至 200 ml 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；
2. 纯浓缩后用 binding buffer（50 mM Tris，500 mM NaCl，10 mM imidazole，10% Glycerol 也可不加咪唑）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）；
3. SDS-PAGE 检测后，离心浓缩将蛋白样品换 buffer 至肠激酶的酶切 buffer（20 mM Tris pH 8.0，1mM CaCl<sub>2</sub>，0.1% Tween-20）中，浓缩至约 1.5 ml。

#### 五、Gzm M 的激活及活性检测...肠激酶处理与合成底物切割

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），4 °C 酶切约 20 hrs；
2. 酶切完毕 SDS-PAGE 检测酶切效果后，将样品再次过 Ni-NTA 基质去除肠激酶；
3. 所得蛋白再次浓缩换 buffer（20 mM Tris PH 8.0 或 20 mM Tris PH 8.0，300 mM NaCl，15% Glycerol），浓缩至所需浓度后可直接放置 4 °C 保存；
4. 取适量样品做 Gzm M 合成底物切割实验，即活性检测。反应 buffer:

100 mM HEPES PH 7.2, 200 mM NaCl, 0.01% Tween-20; 反应体系: 100  $\mu$ l 反应 buffer + 4 $\mu$ l Gzm M 合成底物 + 10 $\mu$ l Gzm M (很浓样品最好稀释); 由 NaOH 作为阳性对照, 37 $^{\circ}$ C 放置并记录底物变黄时间。

## 附二、颗粒酶 A 表达纯化方案(Fan et al., 2003)

质粒: pET26b-Gzm A (Kan<sup>+</sup>) (参见 Fan et al., 2003);

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

### 一、诱导表达

1. 从长有含 pET26b-Gzm A 质粒克隆的平板中或保存的该质粒甘油菌中挑取单克隆或少许甘油菌, 接种于约 200mL 终浓度 50ug/ml 的 Kan<sup>+</sup> LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220rpm 过夜培养;
2. 将过夜菌液按 1-2%转接于含 50ug/ml Kan 的 8L LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220rpm 振荡约 3hr, 至 OD600 达到 0.6-0.8;
3. 加 IPTG 至终浓度 1mM /L, 诱导表达 3hr。表达后的菌液 4000rpm 离心 30 分钟, 取沉淀部分 (注意将残留 LB 充分流尽);

### 二、分离纯化

1. 取出上一步收集的细菌沉淀, 于冰上加 160ml Binding Buffer (50 mM Tris pH7.9, 500 mM NaCl, 10% 甘油), 160ul NP40, DNAase (终浓度为 5ug/ml), 以及 1mg/ml 的 Lysozyme;
2. 将重悬菌液分装于 3 个烧杯中, 每杯超声 start: 3sec, pause 9sec, 超声有效时间 2min;
3. 超声后样品 4 $^{\circ}$ C、20,000rpm (约 40000g) 离心 30min, 上清转移到烧杯中, 取上清的 100ul 待以后电泳分析. 沉淀留样;
4. 将上清通过  $\Phi$  0.45um 的滤膜抽滤;
5. 装 Ni 柱 (8 ml): 将层析柱清洗、调节至垂直于水平面后, 将出水口关闭, 加入少量脱气纯水 (大约 1/3 柱体积)。将 His-Tag Resin 搅拌均匀 (注意动作要轻, 不要产生气泡), 用长玻璃胶头滴管轻轻吸取混匀的 Resin, 沿柱子的管壁环形均匀加入纯水中 (注意将滴管尽量接近液面, 以免产生气泡)。待加入的 Resin 沉积出层面后, 打开下方出水口, 调节流速为 10 柱体积/小时, 即大约 50 d/min, 以后均保持此流速。继续加入 Resin,

直到沉积体积达到 8 ml。

6. 用 50 ml 去离子水充分冲洗沉积好的柱床，洗去 Resin 中残留的乙醇。
7. 用 50 ml 的 Charge Buffer (200 mM NiSO<sub>4</sub>) 充分平衡，挂镍。
8. 用 50 ml 的 Binding Buffer 充分平衡。
9. 层析 (永远不要让柱子走干!!)
10. 上样。注意要沿着管壁均匀上样! 控制流速 10 柱体积/小时，注意要保留该步样品。
11. 用 50 ml Binding Buffer 充分平衡。注意要保留该步样品，
12. 用 50 ml Wash Buffer 洗去未结合的杂蛋白。注意要保留该步样品!
13. 用 50 ml Elute Buffer (50 mM Tris pH 7.9, 500 mM NaCl, 250 mM 咪唑) (75% 1X wash buffer + 25% 1X elute buffer) 洗脱。收集 1-25 管，每管 1ml (收集的管应置于冰上)。取 40ul 加到 5ml 的考马斯亮蓝 G250，测其吸光值。选取蛋白含量高的管，连同上面留的样品一起 12% SDS-PAGE 电泳分析表达蛋白的位置。合并目的蛋白管。
14. 对于使用过的柱子，应在用 50 ml 去离子水冲洗后，用 30 ml 盐酸胍溶液 (6 Mol/L 盐酸胍, 0.2 Mol/L 乙酸) 洗，再用 50 ml 去离子水冲洗。最后保存在 20% 的乙醇中。
15. 将亲和层析得到的样品装于处理好的透析袋中 (约 3ml)，加入 1ul rEK 酶 (Sigma 产品) 于透析袋中。透析过夜，其中，更换三次透析 buffer (即 EK 酶的裂解液: 20mM Tris-HCl pH7.4, 50mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>)。
16. 二次层析，去除 rEK 酶，纯化活性 GzmA
17. 透析的样品 3,000 rpm 离心 5 min 后，用 1X Binding Buffer 稀释 10 倍，上镍柱纯化。注意使样品保持始终在 4℃! 用 BLT 法 (1) 分析所得 fraction，合并有活性的管。
18. 将上步得到的样品转入超滤离心管中，2000 g 离心 5 min，将样品浓缩至终体积为 1ml。控制蛋白浓度约 3 mg/ml，于 50 mM Tris-HCl Buffer pH7.4 中，于 -80℃ 长期保存。或 1mg/ml -20℃ 短期保存。

### 附三、GST-Bid 的表达纯化

质粒: pGEX-6P-1-Bid (Amp<sup>+</sup>) (参见 Zhao et al., 2007)

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

### 一、诱导表达

1. 从长有含 pGEX-6p-1-Bid 质粒克隆的平板中或保存的该质粒甘油菌中挑取单克隆或少许甘油菌, 接种于约 200mL 终浓度 50ug/ml 的 Kan+ LB 培养基中, 37°C、220rpm 过夜培养;
2. 将过夜菌液按 1-2%转接于含 50ug/ml Amp 的 8 L LB 液体培养基中, 37°C、220rpm 振荡约 3hr, 至 OD600 达到 0.6-0.8;
3. 加 IPTG 至终浓度 1mM /L, 诱导表达 3hr。表达后的菌液 4000rpm 离心 30 分钟, 取沉淀部分 (注意将残留 LB 充分流尽);

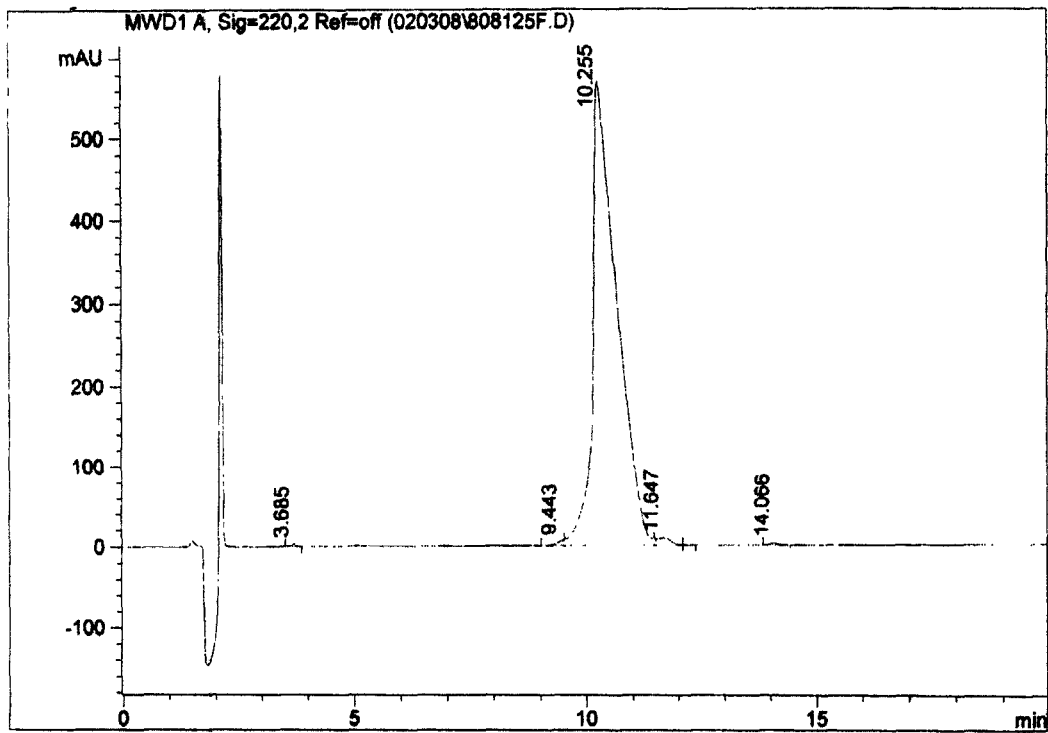
### 二、分离纯化

1. 取出上一步收集的细菌沉淀, 于冰上加 160ml PBS, 160ul NP40, DNAase (终浓度为 5ug/ml), 以及 1mg/ml 的 Lysozyme;
2. 将重悬菌液分装于 3 个烧杯中, 每杯超声 start: 3sec, pause 9sec, 超声有效时间 2min;
3. 超声后样品 4°C、20,000rpm (约 40000g) 离心 30min, 上清转移到烧杯中, 取上清的 100ul 待以后电泳分析. 沉淀留样.
4. 将上清通过  $\Phi 0.45\mu\text{m}$  的滤膜抽滤 (所有用于层析的液体都需要通过  $\Phi 0.45\mu\text{m}$  的滤膜抽滤后方能使用!)
5. 0.8 ml/min 过 GST 预装柱 (GE 产品), 上样完毕后用 10 倍柱体积的 PBS 冲洗预装柱;
6. 使用 elution buffer (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM GSH) 洗脱目的蛋白, 每管 1ml 分管接取洗脱蛋白;
7. SDS-PAGE 检测所得蛋白纯度与浓度, 收取目的蛋白最纯的管;
8. 将上步得到的样品转入超滤离心管中, 2000 g 离心 5 min, 将样品浓缩至终体积为 1ml. 控制蛋白浓度约 3 mg/ml, 于 50 mM Tris-HCl Buffer pH7.4 中, 于 -80°C 长期保存。或 1mg/ml -20°C 短期保存。

### 参考文献

- 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.
- Chowdhury, D. and Lieberman, J. (2008) Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol*, **26**, 389-420.
- Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D. and 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**, 659-672.
- Hink-Schauer, C., Estebanez-Perpina, E., Wilharm, E., Fuentes-Prior, P., Klinkert, W., Bode, W. and Jenne, D.E. (2002) The 2.2-A crystal structure of human pro-granzyme K reveals a rigid zymogen with unusual features. *J Biol Chem*, **277**, 50923-50933.
- Hua, G., Zhang, Q. and Fan, Z. (2007) Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, **282**, 20553-20560.
- Krenacs, L., Smyth, M.J., Bagdi, E., Krenacs, T., Kopper, L., Rudiger, T., Zettl, A., Muller-Hermelink, H.K., Jaffe, E.S. and Raffeld, M. (2003) The serine protease granzyme M is preferentially expressed in NK-cell, gamma delta T-cell, and intestinal T-cell lymphomas: evidence of origin from lymphocytes involved in innate immunity. *Blood*, **101**, 3590-3593.
- Mahrus, S. and Craik, C.S. (2005) Selective Chemical Functional Probes of Granzymes A and B Reveal Granzyme B Is a Major Effector of Natural Killer Cell-Mediated Lysis of Target Cells. *Chemistry & Biology*, **12**, 567-577.
- 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.
- Rukamp, B.J., Kam, C.M., Natarajan, S., Bolton, B.W., Smyth, M.J., Kelly, J.M. and Powers, J.C. (2004) Subsite specificities of granzyme M: a study of inhibitors and newly synthesized thiobenzyl ester substrates. *Arch Biochem Biophys*, **422**, 9-22.
- Suck, G., Branch, D.R., Smyth, M.J., Miller, R.G., Vergidis, J., Fahim, S. and Keating, A. (2005) KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity. *Exp Hematol*, **33**, 1160-1171.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. and Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, **9**, 503-510.
- Yagita, M., Huang, C.L., Umehara, H., Matsuo, Y., Tabata, R., Miyake, M., Konaka, Y. and Takatsuki, K. (2000) A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation. *Leukemia*, **14**, 922-930.
- Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y. and Fan, Z. (2007) Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem*, **282**, 12104-12111.

Acq. Method : FINAL2.M  
 Analysis Method : E:\2-1\METHODS\FINAL2.M



Area Percent Report

Signal 1: MWD1 A, Sig=220,2 Ref=off						
Peak #	RT [min]	Type	Height	Width [min]	Area	Area %
1	3.685	VV	3.456	0.111	25.868	0.122
2	9.443	VV F	5.328	0.184	73.244	0.346
3	10.255	VV	566.954	0.501	20831.057	98.356
4	11.647	VV	8.947	0.344	202.661	0.957
5	12.097	VV B	0.908	0.180	11.178	0.053
6	14.066	VV	2.712	0.191	35.129	0.166

图 1



Sample status: Final  
Instrument Method: C:\Xcalibur\methods\Peptide-1min.meth

808125F #8-18 RT: 0.19-0.43 AV: 11 NL: 4.34E7

T: + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

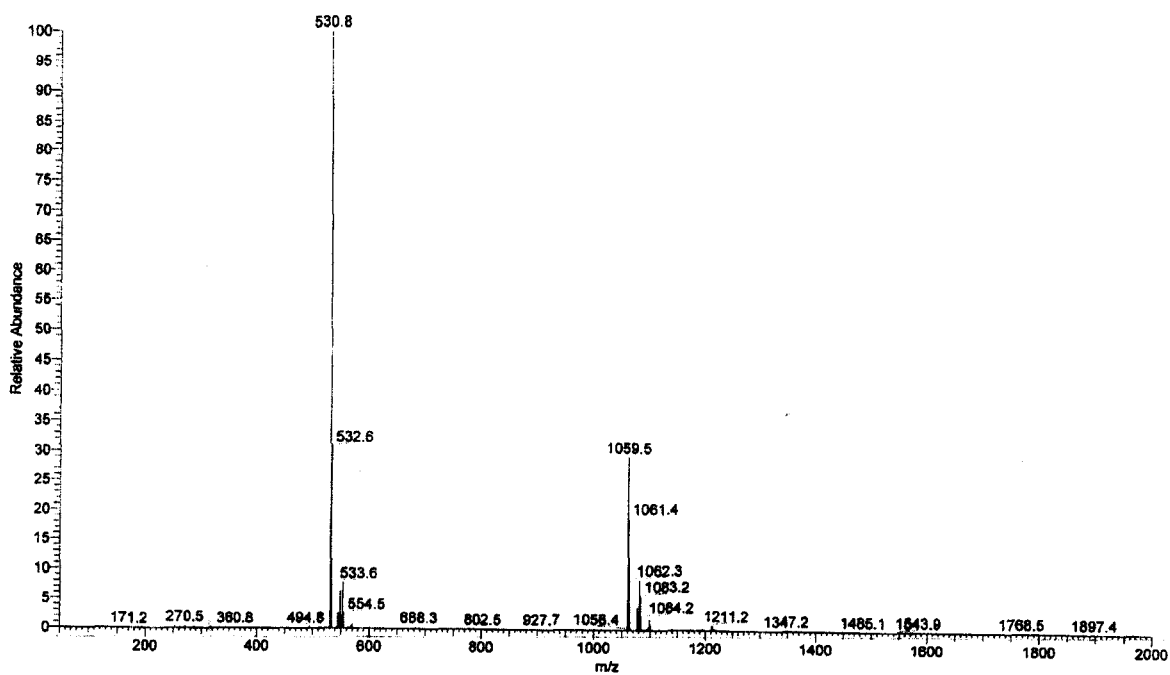


图 2

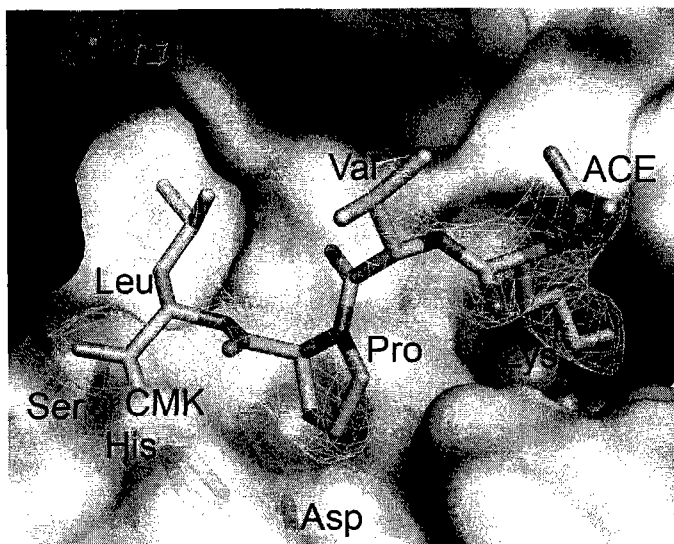


图 3

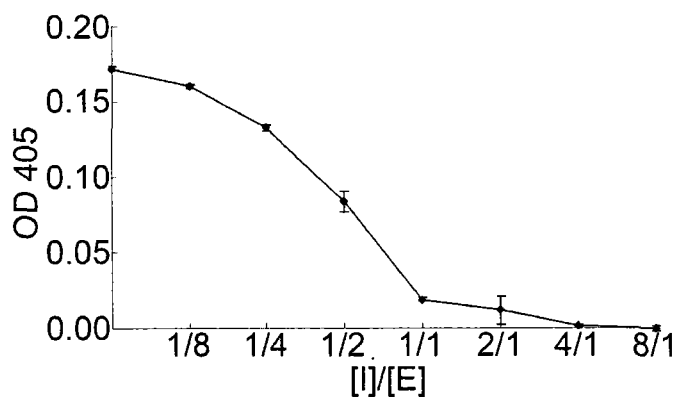


图 4

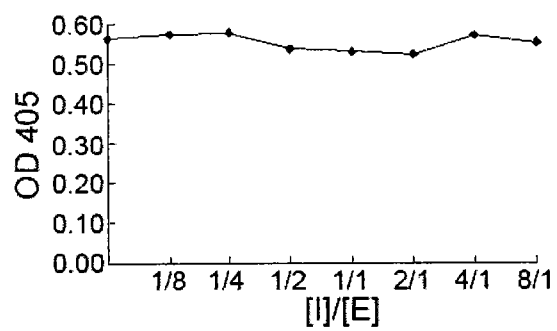


图 5

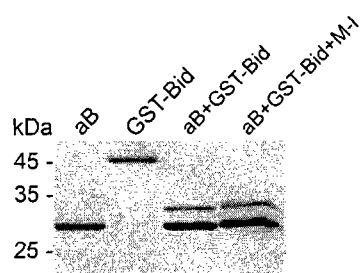


图 6