

分子伴侣及其在蛋白质复性中的应用**

张佳艺 关怡新 姚善泾*

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

摘 要 *E.coli* 作为目前应用最为广泛的原核表达系统, 在异体表达蛋白质的过程中容易形成无活性的包涵体。蛋白质复性, 即如何高效地将无活性的包涵体转变成为有活性的蛋白质, 已成为基因工程蛋白产业化的瓶颈。而利用分子伴侣的协助折叠特性进行的蛋白质复性技术正成为这一领域的研究热点。本文针对这一技术, 综述了分子伴侣的功能和种类、各种分子伴侣体系的作用原理及在蛋白质复性中的应用情况, 并简单介绍了人工分子伴侣。

关键词 分子伴侣 复性 纯化 热休克蛋白 GroE

Molecular Chaperone and Its Application in the Renaturation of Proteins

Zhang Jiayi, Guan Yixin, Yao Shanjin

(Department of Chemical and Biochemical Engineering Hangzhou 310027)

Abstract Inclusion bodies are easily formed when recombinant proteins are expressed in *E.coli* system, and how to renature these inclusion bodies is now becoming the key problem in the genetic engineering. The protein refolding assisted by the molecular chaperone systems is promised to improve the protein renaturation efficiency. Some kinds of molecular chaperone systems and their functions as well were reviewed in this paper. Meantime, the mechanism and applications of molecular chaperone systems in the renaturation of proteins were presented. The artificial molecular chaperone systems were also briefly introduced.

Key words Molecular chaperone, Renaturation, Purification, Heat shock protein, GroE

随着基因工程技术的发展, 人们越来越多地利用成熟的原核、真核表达系统如大肠杆菌表达系统、酿酒酵母表达系统来生产有用的重组蛋白, 若采用较强的启动子, 在这些表达系统中, 外源基因能够获得较高的表达量。但除了少数重组蛋白本身含有信号肽, 如人表皮生长因子, 能够分泌到胞外去, 大部分的重组蛋白, 如酵母羟肽酶 Y、蝎毒 Cn5 等, 都是胞内产物, 很容易在胞内形成无活性的包涵体。据估计, 在大肠杆菌表达体系中, 其表达的产物大约有 80% 以上是以包涵体形式存在的。因此, 如何从包涵体中得到所需的有活性的重组蛋白, 是基因工程技术实现产业化的最重要的一步。

近几年来, 如何将无活性的包涵体转变成为有活性的蛋白, 即蛋白质复性, 已成为生物技术领域的热门话题之一, 出现了各种复性方法, 其中包括用高效液相色谱柱 HPLC 复性、高效

张佳艺 女, 23, 硕士生, 现从事分子伴侣协助蛋白质复性的研究。*联系人 E-mail: yaosj@che.zju.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(20076042), 国家教育部留学回国人员科研启动基金资助项目, 浙江省自然科学基金资助项目(201099)

2001-10-12 收稿, 2002-03-10 修回

疏水色谱柱^[1]复性、排阻色谱复性^[2]、加入 PEG^[3]复性等，复性效率均有不同程度的提高，但值得注意的是，有些蛋白需要糖基化修饰之后，才具有生物活性，而用上述复性方法，很难达到这一点，所以，提高复性效率，应从模仿生物的生理条件（pH、温度、一些辅酶等）入手。

1978 年，Lacksey 首先发现，在细胞内存在一种蛋白，能够帮助新生肽进行折叠，后来人们认识到细胞内蛋白质的折叠多半是在细胞内已经存在的这一类蛋白的帮助下才能进行。这种蛋白就是分子伴侣。用分子伴侣结合传统的复性方法，使一些体系的复性率达到 80~90% 以上。

本文将要介绍分子伴侣及其在以包涵体形式表达的重组蛋白复性中的应用。

1 分子伴侣的定义及其功能

1987 年，Ellis 正式提出分子伴侣在功能上的定义，认为分子伴侣是一类相互之间没有联系的蛋白，分子伴侣的功能是帮助含多肽结构的其他物质在体内进行正确的非共价的组装，但它们自身并不是组装完成的结构发挥其正常的生物功能的组成部分。凡是具有此功能的蛋白质都是分子伴侣，它们的结构可完全不同。目前已发现的分子伴侣的种类如表 1^[4,5]所示：

另外，还有一些分子伴侣不属于以上几类，如 α -晶状蛋白^[6]、大肠杆菌 SecB^[7]、取自冰核菌(ice-nucleating bacterium)的 Patoea ananas KUIN-3、对冷变性蛋白具有帮助折叠功能的 Hsc25^[8]等。

分子伴侣除了复性这一主要功能之外，还具有介导线粒体蛋白质跨膜运输，调控信息传导通路和转录、复制，参与微管的形成与修复等功能^[4]。

表 1 分子伴侣的种类及名称^[4,5]
Tab.1 Molecular chaperone category and its appellation^[4,5]

原核生物		真核生物								
大肠杆菌		酵母			果蝇		哺乳动物		植物	
		胞质	内质网	线粒体	胞质	胞质	内质网	线粒体	内质网	线粒体
Hsp60 家族	GroE			Hsp60 (Mif4p)				Hsp60 (Hsp58)		RuSBP
Hsp 70 家族	Dnak	Ssa1-40	Kar2p (Bi p)	Ssc1 p	Hsp68 Hsp70 Hsc1 Hsc2 Hsc4	Hsp70 (p73) Hsc70 (P72, CUATPase, Prp73)	Bip (Grp78)	Hsp70 (Grp75)		
Hsp90 家族	H tpG (C62.5)	Hsp83 Hsc83			Hsp83	Hsp90 (Hsp83 Hsp87)	Grp94 (Erp99 endopl- asmin)			
Hsp100/Clp 家族 ^[5]										HsP104

2 分子伴侣在重组蛋白体外复性中的应用

分子伴侣属于热休克蛋白，能在蛋白质的形成过程中帮助蛋白质进行正确折叠，这一特性被用到蛋白质体内复性和体外复性的研究中。体内复性主要是在工程菌培养过程中同时加入分子伴侣的基因进行共表达，如将分子伴侣 SecB 基因与人淋巴毒素基因在大肠杆菌中进行共表达^[7]，从而降低包涵体的量。体外复性主要是将基因工程菌中的包涵体溶解，再加入分子伴侣

帮助折叠。在体外复性中所用的分子伴侣可分为分子内分子伴侣和分子外分子伴侣, 分子内分子伴侣可以是某蛋白的前导序列, 也可以是该蛋白的前体, 这种分子伴侣特异性较强, 目前对这种分子伴侣的体外复性研究不是很多, 据报道, 只有 Yamamoto 等^[9]曾用家蚕的半胱氨酸蛋白酶前肽对家蚕的半胱氨酸蛋白酶在溶液中进行复性, 还有 Hahm 等用酵母羧肽酶 Y 的前导序列 (CPYPR-His₆) 对在大肠杆菌中表达的酵母羧肽酶 Y (CPY) 进行复性。目前应用的比较多的是分子外分子伴侣, 这种分子伴侣的特异性不是很强, 应用范围比较广, 以下我们讨论的就是这种分子外分子伴侣。

2.1 GroE

GroE 是目前应用最广泛的分子伴侣体系, 它包括两种分子量不同但氨基酸顺序相关的蛋白, GroEL 和 GroES, 其氨基酸序列如图 1^[10]所示。

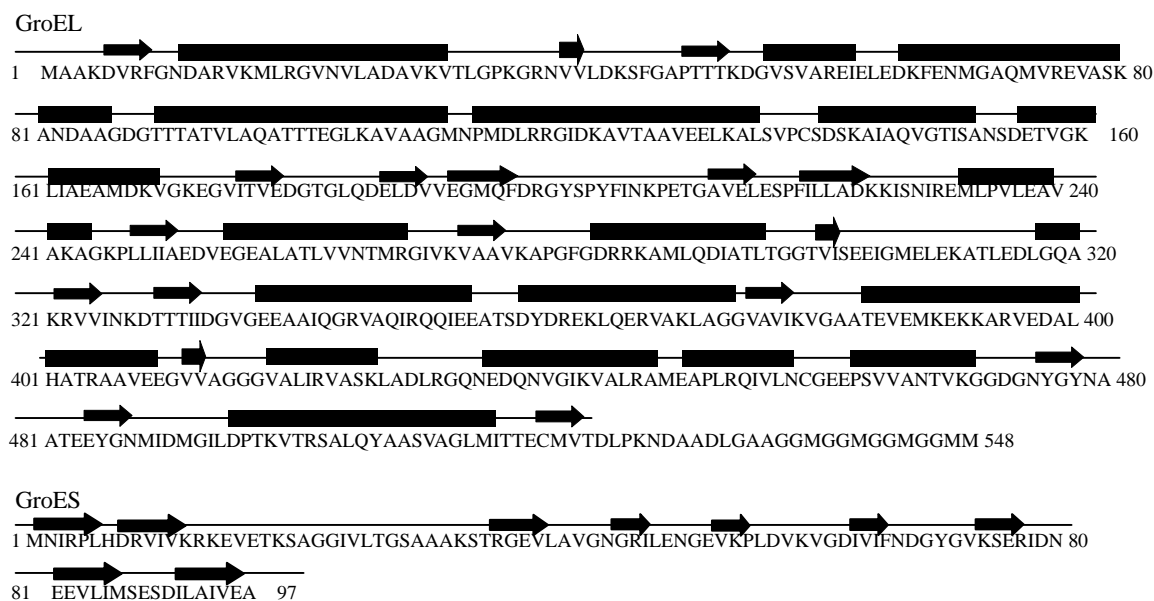


图 1 GroEL、GroES 的氨基酸序列图^[10]

Fig.1 Amino acid sequences of GroEL and GroES^[10]

图中矩形是 α -螺旋, 箭头是 β -折叠

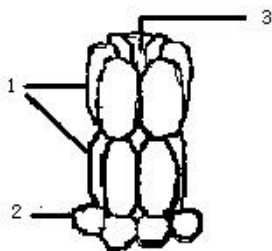


图 2 不对称 GroEL-GroES 复合物表观结构图^[11]

Fig. 2 Apparent structure of asymmetry GroEL-GroES compound

1—GroEL 的七元环; 2—GroES; 3—GroEL 的内腔

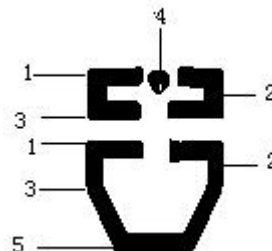


图 3 GroEL-GroES 无活性蛋白复合物结构示意图^[11]

Fig. 2 Apparent structure of GroEL-GroES-inactive proteins compound

1—顶端区; 2—中间区; 3—赤道区; 4—目标蛋白; 5—GroES

分子伴侣 GroEL 是一晶状圆柱形复合物, 高 1450 nm, 直径 1350 nm。它是由两个背对背的七元环组成的十四聚体, 在两端各形成一个内径为 450 nm 的空腔。GroEL 的表观结构如图 2 所示。多聚体中的每个七元环 (以后简称环) 内部都含有 7 个亚基, 亚基的分子质量约为 57 kD, 由 548 个氨基酸组成。各环中的 7 个亚基折叠成三部分, 即顶端区、赤道区、中间区, 如图 3 所示。顶端区内表面含有丰富的疏水基团, 可为无活性蛋白提供较大的结合表面, 从而阻止其聚集。赤道区由接近平行的 α -螺旋组成, GroEL 的两环在赤道区相结合, 此区内还具有可与三磷酸腺苷 (ATP) 相结合的点位, 分子伴侣可通过 Mg^{2+} 与 ATP 中的磷酸根相结合。中间区较小, 通过共价键连接顶端区与赤道区, 对 GroEL 的特性影响较大^[11]。

GroES 由 7 个 10kD 的亚基组成。如图 2 中的 2 和图 3 中的 5 所示。在 ATP 存在时, GroES 可与 GroEL 的一端或两端连接, 形成一个突起结构, 从而可使 GroEL 的内腔扩大近一倍。GroES 与 GroEL 顶端区的结合可导致原来与顶端相结合的肽链释放到 GroEL 空腔中, 同时引发肽链的初步折叠。由于 GroES 对分子伴侣和复性有这样的协同作用, 故称 GroES 为协同分子伴侣。图 2 所示的是 GroEL 与 GroES 端相结合的结构, 称为不对称 GroEL-GroES 复合物图 3 为这一复合物的结构示意图^[11]。图 4^[12]所示的是 GroEL、GroES、ATP、变性蛋白之间的相互作用过程。

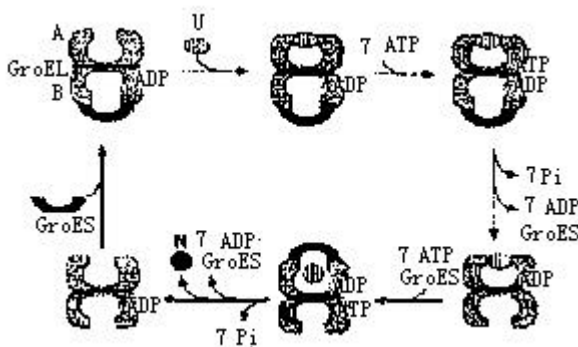


图 4 GroEL、GroES、ATP、变性蛋白之间的相互作用过程^[12]

Fig.4 Interaction among GroEL, GroES, ATP and inactive protein^[12]

A、B 分别表示 GroEL 的顺环、逆环; U 为变性蛋白; N 为天然蛋白; ATP 为三磷酸腺苷, 分解后形成 $Pi + ADP$

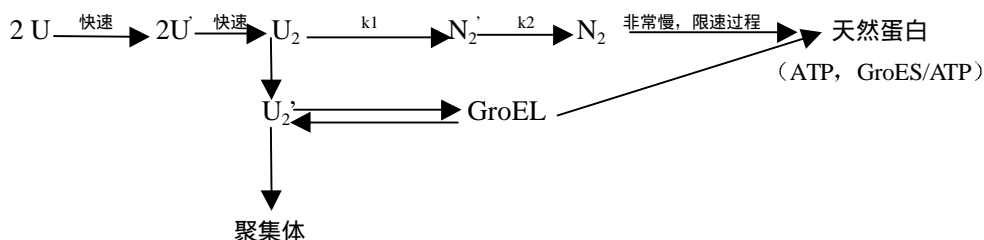


图 5 GroE 的作用机理^[13,14]

Fig.5 Renaturation mechanism of GroE^[13,14]

其中 U 是变性后, 伸展开的蛋白质 (unfolding protein); U' 是无活性的一维折叠中间体; U₂ 是无活性的二维折叠中间体; U₂' 是错误折叠的二聚体; N₂' 是有部分活性的二维折叠物; N₂ 是有活性的二聚体。

GroE 在变性蛋白质复性过程中的作用主要是通过以下途径来实现的, 如图 5^[13, 14]所示, 在蛋白质复性过程中, 有一小部分无活性的二维折叠中间体 U₂ 会自发形成有部分活性的二维折叠

物 N_2' ，正确折叠成天然蛋白，但大部分无活性的二维折叠中间体 U_2 在折叠过程中，向错误折叠的二聚体 U_2' 转变，这些错误折叠的二聚体 U_2' 由于疏水基的相互作用，不可逆的聚集形成无活性的聚集体，造成复性效率低下，GroEL 内部有很多的多肽结合位点，容易与这些错误折叠的二维折叠中间体结合，从而防止聚集体形成，并提供一个复性空间，提高底物蛋白的正确折叠率，但在协助过程中，分子伴侣 GroE 的加入并不影响变性蛋白重折叠的速度。

用 GroE 复性的变性蛋白分为三类：(1)只需 GroEL 帮助折叠的蛋白；(2)需要靠 ATP 的水解帮助从 GroEL 上脱离的蛋白；(3)需要 GroEL、GroES 及 ATP 共同作用的蛋白。具体应用见表 2。

表 2 GroE 分子伴侣系统复性应用
Tab.2 Application of GroE molecular chaperone system in protein renaturation

复性体系	目标蛋白	复性率/%	
		未加分子伴侣	加分子伴侣
只用 GroEL	甘油脱氢酶 (GDH) ^[15]	20	45
	肌酸激酶 (Creatine Kinase) ^[13]	32	1
GroEL+ATP	溶菌酶 ^[16]	45	95 (游离 GroEL) 81 (固定 GroEL)
	乳酸脱氢酶 (LDH) ^[15,17]	10	20
	吡哆-5'-氧化酶 ^[18] (Pyridoxine-5-P Oxidase)	22	75
	柠檬酸合成酶 ^[15] (Citrate synthetase)	1.3	8 (游离 GroEL) 5.5 (固定 GroEL)
GroEL+GroES+ATP	荧光蛋白酶(Firefly Luciferase) ^[14]	18	18
	硫氰酸酶(Rhodanese) ^[16,19]	23	67
	γ -干扰素 (γ -rhIFN) ^[20]	6.4	55

在此过程中，会出现三个问题：（1）加入 GroE 可以使大部分蛋白质复性效率得到显著提高，但肌酸激酶在加入 GroEL 之后，复性效率却显著下降，其原因因为肌酸激酶不属于第一类蛋白，它能和 GroEL 结合，形成复合物，这一过程不需 ATP 的帮助，但显然，没有 ATP 或 ATP+GroES 的帮助，它不能从 GroEL 上释放出来。所以，随着 GroEL 浓度的增加，肌酸激酶活性下降；（2）一般来说，固定化的分子伴侣复性效率要比游离的分子伴侣效率高，然而在 GroE 分子伴侣系统协助的复性中，却发现游离的 GroEL 协助蛋白复性效果要比固定化的 GroEL 要好，出现这种异常现象可能是由于固定化之后，传质阻力增加和固定在凝胶上的 GroEL 失活造成的；（3）在 GroE 的复性中发现，当 U_2 在溶液中的浓度很低时， U_2' 的浓度相对来说也比较低，这样在复性过程中，也不容易形成聚合体，此时，分子伴侣的加入与否，影响都不是很大。当 U_2 的浓度增加时， U_2' 的浓度也相应增加，此时，很容易形成包涵体，加入分子伴侣后，效果明显，可大大提高活性蛋白的收率。可见，GroE 协助蛋白质折叠过程中，可大大提高初始蛋白的浓度，从而降低成本，提高效率。

2.2 小分子伴侣

2.2.1 GroEL (191-376)、GroEL (191-345) 小分子伴侣 GroEL (191-376)、GroEL (191-345) 是 GroEL 顶部区的一小片段氨基酸序列，如图 6 所示，通常作为融合蛋白在大肠杆菌中克隆表达，这种融合蛋白的 N-末端含有 17 个残基的组氨酸尾，使小分子伴侣容易结合在某些固体基

质上, 如 Ni-NTA 树脂^[18], 形成单分散的形式。当变性蛋白与小分子伴侣 1:1 结合后, 相应的成单分散形式, 从而能够在隔离的条件下进行复性, 这一过程有点类似于 GroEL 的空腔结构^[17]。一般说来, 小分子伴侣只对那些用 GroEL 能帮助折叠的蛋白有用。如亲环蛋白 A(Cyclophilin A)^[21]和吡哆 3-甘油磷酸合成酶(IGPS)^[21], 在加入 GroEL(191-345)的复性液中复性, 其复性率分别能提高到 87%和 92%。



图 6 GroEL191-345 及 GroEL191-376 的氨基酸序列

Fig.6 Amino acid sequences of GroEL191-345 and GroEL191-376

图中后折箭头分别为 GroEL191-345 和 GroEL191-376 的终点, 实心矩形、箭头分别代表氨基酸二级序列中的 α -螺旋、 β -折叠

2.2.2 DnaK 热休克蛋白 DnaK、DnaJ、GrpE 来源于大肠杆菌, 三者组成了一个三元的分子伴侣体系。DnaK 能与部分折叠的多肽链, 或者说正在延伸的新生肽链相结合, 稳定该多肽链的构象并防止无活性结构生成; DnaJ 在此过程中, 主要起加速该过程作用; 热休克蛋白 GrpE 的主要功能是在 ATP 存在时, 协助 DnaK 将多肽链转移至伴侣 GroEL 上, 在 GroES 的存在下使变性蛋白复性^[22]。这一过程属于多种分子伴侣结合的网络系统, 将主要在后面多分子伴侣结合复性中讨论。

目前针对 DnaK, 主要考察了荧光蛋白的两种类型, 一种为 *V. fischeri* 荧光蛋白酶^[23], 它是一种热不稳定性蛋白, 热变性之后, 必须在 DnaK/DnaJ 的帮助下才能折叠, 在最佳复性温度 30°C 下进行复性, 复性效率达 99%, 但当温度升高时, 复性效率急剧下降, 到 40°C 复性效率为 0; 另一种为 *P. luminescens* 荧光蛋白酶^[23], 它是一种热稳定性蛋白, 热变性之后, 必须在 DnaK/DnaJ 的帮助下才能折叠, 在最佳复性温度 37°C 下进行复性, 但复性效率只能达到 10%, 且当温度升高时, 复性效率急剧下降, 到 44°C 复性效率为 0。

2.3 二硫键异构酶

二硫键异构酶包括线粒体体系中的 DsbA、DsbB、DsbC, 和真核体系中的 PDI。在体外复性中, 含有二硫键的蛋白折叠起来总是非常慢, 因为半胱氨酸残基的氧化和纠正的速度很慢, 速率限制步骤, 如牛胰胰岛素抑制体重重新折叠的半生长期 (half-life) 将近 8h, 且二硫键在形成过程中易发生错配。许多蛋白, 特别是由真核细胞分泌的蛋白, 二硫键起稳定作用, 这些蛋白包括那些用作医疗和生物技术的蛋白, 如白介素、干扰素、抗体和它们的片段 (fragments), 胰岛素, 变性生长因子 (transforming growth factor), 某些毒素和蛋白酶等。

在用 DsbA 复性核糖核酸酶 (RNAase)^[21]时发现, DsbA 的加入与否, 对变性 RNAase 的复性效率影响很大, 而且 DsbA 的固定化能显著提高变性蛋白的复性速度。当 RNAase 在含有游离 DsbA 溶液中反应 1h, 有 43% 的 RNAase 恢复活性; 当溶液中的 DsbA 蛋白被固定在珠状

凝胶上时, 10min 之后, 45%的 RNAase 恢复活性; 而不含 DsbA 蛋白的溶液, 10min 之后, 只有 2.3%的 RNAase 恢复活性。

通过研究分子伴侣 DsbC -革兰氏阴性菌的二硫键异构酶和 PDI-真核生物的二硫键异构酶对变性 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)、溶菌酶复性的影响发现^[24], 对变性蛋白质复性来说, DsbC 活性比 PDI 强。在复性过程中, 随着 DsbC/ D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶的比例的增加, D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶的复性得率从原来的 6%上升到了 32%, 溶菌酶的复性效率从 1%提高到 65%, 而随着 PDI/ D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶的比例的增加, D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶的复性得率只从原来的 6%上升到了 20%, 溶菌酶的最大复性效率仅为 38%。

2.4 多种分子伴侣结合进行的复性研究

在分子伴侣的复性过程中, 发现不同来源的分子伴侣, 在协助复性的过程中作用机理是不同的。如 GroEL 和 DnaK, 研究发现, GroEL 倾向于结合后期的折叠中间物, 对早期的折叠中间物的亲和力相对较低。而 DnaK 不仅能结合早期的折叠中间物, 而且能结合后期的折叠中间物, 甚至对天然蛋白也有结合作用^[14]。在荧光蛋白酶的复性中, 两者是起竞争作用的。在硫氰酸酶复性^[25]中, 两者是起互补协助作用的。又如二硫键异构酶、PPI 和 GroEL (191-345), 二硫键异构酶主要纠正错误的二硫键形成, PPI (肽基-脯氨酰基顺反异构酶) 在肽基-脯氨酸顺反异构化反应中起催化作用, 而 GroEL (191-345) 主要是提供变性蛋白一隔离复性的空间。所以, 对不同分子伴侣协同作用进行研究的蛋白质主要有以下几种, 如表 3 所示。

表 3 多种分子伴侣结合的复性实例

Fig.3 Combination of several molecular chaperones in protein renaturation

目标蛋白	分子伴侣	复性率/%	
		未加分子伴侣	加分子伴侣
荧光蛋白酶 (化学变性) ^[14]	DnaJ/K/GrpE+GroEL/S/ATP	8	90
(热变性) ^[5]	ClpB+DnaK/J/GrpE	无	52
乳酸脱氢酶(LDH) ^[26]	SAP ⁺ +Mo ^β DG	4	11
墨西哥蝎毒 Cn5 ^[27]	GroEL (191-345) /DsbA/PPI	5	98

SAP 为血清淀粉样蛋白 P 组分

由上可见, 分子伴侣体系对蛋白质的复性主要是通过两种方式来实现的: (1) 对二硫键较多的蛋白质的折叠, 二硫键异构酶在二硫键的形成过程中起纠正和稳定作用; (2) 当变性蛋白浓度比较高时, 采用变性蛋白与分子伴侣的结合作用, 给变性蛋白提供一个隔离复性的空间, 减少凝聚作用, 从而提高复性效率。

针对第二种方式, 最近有人采用环糊精的多聚体作为人工分子伴侣来模仿 GroE 分子伴侣体系, 在复性柠檬酸合成酶和碳酸酐酶取得了很高的复性效率^[28], 另外还有人用脂质体作为人工分子伴侣固定在柱子上, 对溶菌酶、核糖核苷酸酶、碳酸酐酶进行复性, 也取得了较高的复性效率^[29]。

3 展望

与通常稀释及透析方法比较, 虽然在重组蛋白时应用分子伴侣的新型复性技术具有很多优越性, 但它们仍然是一些处于发展阶段的方法。重要原因之一是从理论方面对复性的机理研究

仍然不够, 从而影响其在实际中的广泛应用。分子伴侣的分子生物学研究不仅在生物大分子结构和功能研究中具有重要的理论意义, 而且还具有广泛的应用价值, 从应用方面来讲, 如能深入研究分子伴侣体外复性的影响因素将分子伴侣协助蛋白质折叠装配的研究成果应用于基因工程和蛋白质工程中, 使之放大到制备规模将会大大提高有活性目的蛋白的产率。本实验室目前正在用 GroEL(191-345)对溶菌酶、内皮抑素的复性研究, 已取得了阶段性的成果, 积累了大量的实验数据; 并将该技术进一步应用于荧光蛋白及 γ -干扰素的复性之中, 力争获得一种具有普适意义的新型复性方法, 解决基因工程药物产业化的关键技术, 从而大幅度推动生物技术的产业化进程。

参考文献

- [1] Geng X, Chang X. *Journal of Chromatography*, 1992, 599: 185~194.
- [2] Batas B, Chaudhuri J B. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, 50: 16~23.
- [3] 凌明圣, 许祥裕, 施凤霞 等. *药物生物技术*, 1997, 4(1): 5~8.
- [4] 俞 峻, 马康涛. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(2): 106~110.
- [5] Krzewski J, Langer T, Liberek K. *FEBS Letters*, 2001, 489: 92~96.
- [6] Raman B, Ramakrishna T, Rao C M. *FEBS Letters*, 1997, 416: 369~372.
- [7] 周 颖, 张 青, 殷长传 等. *生物工程学报*, 1997, 13(4): 433~436.
- [8] Kawahara H, Koda N, Oshio M et al. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(12): 2668~2674.
- [9] Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T et al. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1999, 42(3): 167~178.
- [10] Xu Z H, Arthur L, Horwich et al. *Nature*, 1997, 388(21): 741~750.
- [11] 刘晓光, 董晓燕. *化学工业与工程*, 2000, 17(2): 120~124.
- [12] 郑 平, 钱新民. *生物工程进展*, 2000, 20(3): 18~22.
- [13] Li S, Bai J H, Park Y D. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33: 279~286.
- [14] Buchberger A, Schröder H, Hestekamp T et al. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 261: 328~333.
- [15] Nicola S P, Douglas J B, Stephen P B et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1426: 99~109.
- [16] Dong X Y, Yang H, Sun Y. *Journal of Chromatography A*, 2000, 878: 197~204.
- [17] Taguchi H, Makino Y, Yoshida M. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(11): 8529~8534.
- [18] Kwon O S, Churchich J E. *Biochimie*, 1999, 81: 1057~1064.
- [19] Gorovits B M, McGee W A, Horowitz P M. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1382: 120~128.
- [20] 郑平华, 陆 峰, 郭 嘉 等. *高技术通讯*, 1995, 8: 44~47.
- [21] Altamirano M M, Golbik R, Zahn R et al. *The National Academy of Science of the USA*, 1997, 94: 3576~3578.
- [22] 郑东东. *细胞生物学杂志*, 1996, 18(2): 68~73.
- [23] Manukhov I V, Eroshnikov G E, Vyssokikh M Y et al. *FEBS Letters*, 1999, 448: 265~268.
- [24] Chen J, Song J L et al. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(28): 19601~19605.
- [25] Langer T, Lu C, Echols H et al. *Nature*, 1992, 356: 683~689.
- [26] Coker A R, Purvis A, Baker D et al. *FEBS Letters*, 2000, 473: 199~202.
- [27] Altamirano M M, Garcia C, Possani L D et al. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 187~191.
- [28] Coker A R, Purvis A, Baker D et al. *FEBS Letters*, 2000, 473: 199~202.
- [29] Altamirano M M, Garcia C, Possani L D et al. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 187~191.