

第二遗传密码

邹承鲁

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 遗传信息的传递应该是从核酸序列到有完整结构的功能蛋白质的全过程. 现有的遗传密码仅有从核酸序列到无结构的多肽链的信息传递, 因此是不完整的. 后一部分, 即遗传信息传递密码的第二部分(简称第二遗传密码), 是遗传信息从蛋白质中氨基酸序列到其空间结构之间的传递. 本文总结了当前已知的蛋白质中氨基酸序列和蛋白质总体空间结构的关系, 对第二遗传密码应该具有的特征进行了讨论. 认为第二遗传密码除和三联密码同样具有简并性(即不同序列对应相同结构)外, 还具有多意性(即类似序列具有不同结构)和全局性(即局部序列改变往往影响整体结构)等特征.

关键词 第二遗传密码 简并性 多意性 全局性

对生命遗传信息存储、传递及表达的认识是20世纪生物学所取得的最重要的突破. 其中的关键问题是由3个相连的核苷酸顺序决定蛋白质分子肽链中的1个氨基酸, 即“三联遗传密码”(“第一遗传密码”)的破译. 但是蛋白质必须有特定的三维空间结构, 才能表现其特定的生物功能^[1]. 50年代 Anfinsen 提出假说, 认为蛋白质特定的三维空间结构是由其氨基酸排列顺序所决定的^[2], 并因此获得诺贝尔奖. 这一论断现在已被广泛接受, 大量实验充分说明氨基酸顺序与蛋白质空间结构之间确实存在着一定的关系.

遗传信息的传递, 应该是从核酸序列到功能蛋白质的全过程. 现有的遗传密码仅有从核酸序列到无结构的多肽链的信息传递, 因此是不完整的. 本文讨论的是从无结构的多肽链到有完整结构的功能蛋白质的信息传递部分. 完整的提法应该是遗传密码的第二部分, 即蛋白质中氨基酸序列与其空间结构的对应关系, 国际上称之为第二遗传密码^[3]或折叠密码^[4](以下简称第二密码). Anfinsen 原理认为, 和一定的氨基酸序列相对应的空间结构是热力学上最稳定的结构, 但多肽链折叠成为相应的空间结构在实际上还存在一个“这一过程是否能够在一定时间内完成”的动力学问题. 事实上蛋白质最稳定结构与一些相似结构之间的能量差并不大, 约在 20.9~83.7 kJ/mol 左右^[5, 6]. 蛋白质之所以最容易形成天然结构除能量因素外, 是由动力学和熵的因素所决定的. 近10余年来国际上在蛋白质天然结构形成的问题上发生了概念上的变革. 过去曾经认为新生肽链能够自发地折叠成为完整的空间结构, 分子伴侣的发现已经把过去经典的自发折叠概念转变为“有帮助的肽链的自发折叠和组装”的新概念^[7]. “自发”是指由第二遗传密码决定折叠终态的“内因”亦即热力学因素, 而“帮助”则是为保证该过程能高效完成的“外因”, 是由一类新发现的分子伴侣蛋白和折叠酶来帮助完成的, 主要是帮助克服动力学和熵的障碍, 因而帮助克服细胞内由各种因素引起折叠错误并造成翻译后多肽链分子的聚集沉淀而最终导致信息传递中止. 新生肽成熟为活性蛋白的过程中, 不仅有折叠中间体与分子伴侣和折叠酶的相互作用, 还有亚基间相互作用而组装成有功能的多亚基蛋白, 以及错误折叠分子与特异蛋白水解酶的识别和作用以从细胞内清除构象错误的分子等. 细胞内折叠过程也是一个蛋白分子内和分子间肽链相互作用的过程. 细胞内新合成的多肽链浓度极高, 这种“拥挤”状态会加剧蛋白分子间的错误相互作用而导致分子聚集. 而分子伴侣及折叠酶的存

在阻断分子间的错误相互作用,从而保证蛋白质合成后的高效正确折叠.分子伴侣如何识别并与折叠中间态结合从而帮助蛋白质的正确折叠,是当前国际上折叠研究的核心问题之一.

三联遗传密码解决的是在一维空间内两个不同性质分子的“翻译”关系,即从线性DNA的核苷酸排列顺序到线性多肽链的氨基酸排列顺序;而第二遗传密码要解决的是一维空间序列信息与三维空间结构信息之间的关系,自然要复杂得多.由氨基酸顺序决定蛋白质三维空间结构,到由蛋白质三维结构决定其特定的生物功能,是完整的遗传信息传递过程的不可缺少的重要的一半.

由于三联遗传密码的阐明,现在已经知道的不少蛋白质的氨基酸序列实际上是由其对应的DNA分子核苷酸序列推断得到的,而且根据氨基酸顺序预测蛋白质的三维空间结构的努力也有了不小进展.现在有不少原核生物及少数真核生物的基因组全序列已被解出,人基因组全序列也基本得到阐明.仅就人基因组而言,所编码的全部蛋白质总数约为数万个.这些蛋白质的氨基酸序列都可以由其对应的DNA核苷酸序列推断得到,但要认识这些蛋白的功能是与了解其空间结构密切相关的.即使现在对蛋白质三维空间结构测定的速度已经大大加快(平均一天解出5个蛋白质结构),但数以10万计的蛋白结构测定仍不是短期内能够完成的,这就对揭示氨基酸序列和蛋白质空间结构的对应关系提出了前所未有的挑战^[1].自然界存在的蛋白质总数虽然很大,但根据它们在序列上的相似性以及进化上的同源性,可以归并为总数并不很大的蛋白质家族;并从它们所含二级结构在拓扑学上的关系又可以归并为有限数目的折叠类型.对于自然界存在的蛋白质折叠类型总数,虽然各人估计不同,近年来倾向于不到1000种^[8,9],这就使认识全部蛋白质三维空间结构的任务大大简化,看来并不是可望而不可及的了.蛋白质三维空间结构预测的目的在于认识氨基酸序列和蛋白质空间结构的对应关系,也就是确立第二遗传密码.由于这一问题的复杂性,虽然最近Demshenko等人^[10]对这一问题做了一个详细的综述,迄今为止尚未见到关于第二遗传密码具体内容的任何设想.

当前国际上对于蛋白质在体内外的折叠过程已有了一定的了解.已取得的结果都说明第二遗传密码不仅确实存在,也是可以认识的.解决这一问题可以从两方面入手.一是从理论上研究蛋白质的氨基酸序列如何决定其三维空间结构,即如上所述的蛋白质空间结构的预测.二是在实验上研究变性蛋白如何重新折叠恢复其天然构象,以及新生肽链如何折叠成为完整蛋白质分子的全过程.在此基础上,研究肽链中氨基酸的定点突变如何影响蛋白质的总体结构折叠与形成的动力学过程.实验研究不仅将会为第二遗传密码的确定提供重要信息,也是最终检验所提出的第二遗传密码是否正确的必要手段.

结构预测方面的主要问题是:如何根据蛋白质的氨基酸组成和顺序预测蛋白质的折叠类型,如何根据一个肽段的氨基酸顺序预测其二级结构,不同肽段的二级结构又是如何构成一个蛋白质特定的三维空间结构,亚基如何组装为完整分子,有一定结构的蛋白质在细胞中处于什么位置,又担负着什么生物功能.当前对于结构预测主要从两个方面进行.一是从已知结构出发,从中总结规律,对未知结构的蛋白进行预测.这一方法特别对进化上相关的蛋白常常被证明是有效的.第二种较有一般意义的方法是根据蛋白质分子中已知的各种基团间物理化学相互作用基本原理,对蛋白质三维结构从头进行预测,这一方法已经取得的成果还极其有限.国际上每两年召开一次蛋白质结构预测比较评价会议,最近的一次会议是在1998年夏召开的^[11].二级结构预测目前还处于初期阶段,准确度最高也只不过是72%左右.高级结构预

测、细胞定位预测和功能预测,现在还刚刚开始^[4]。

关于蛋白质折叠研究,早期曾认为变性的蛋白质可以由完全不含任何结构的状态一步折叠形成天然状态,即所谓“二态模型”或“全或无模型”。但是近年来的研究已经表明除某些小分子蛋白外,蛋白质折叠一般是一个序变过程^[12, 13]。所谓“全或无模型”不过是因为折叠中间体极不稳定而无法捕捉到的特殊情况。因此当前的努力集中于用快速手段探测和捕捉蛋白质折叠中间体,测定其结构,从而了解蛋白质折叠的全过程。蛋白质折叠的中间状态显然已经具有某些局部的类似于天然状态的结构,了解这些中间状态的结构对认识特定的氨基酸序列如何决定这些中间物的局部结构十分重要,是破译第二遗传密码的一个重要的环节。

1 第二遗传密码的特点

对于第二密码的具体内容虽然还未见有人在总体上提出任何实质性的设想,但是从现有的知识已经可以看出第二密码所必须具有的特点。

1.1 简并性

从一定的氨基酸序列决定一定的空间结构看来,也许会认为第二密码是绝对的、惟一的,即两者之间是一对一的对应关系,但实际情况不是这样简单。在第一遗传密码中有所谓“简并性”,即同一氨基酸可以为不同密码子所编码,如 CGA 和 AGC 都编码为精氨酸, UCC 和 AGU 都编码为丝氨酸等。第二密码也同样有简并性。现在已经知道有不少氨基酸序列颇为不同的肽链可以有极为相似甚至相同的空间结构,这就是第二密码的简并性。

第二密码的简并性首先体现在在不同生物体中执行相同生物功能的蛋白质虽然可以有氨基酸序列上的差异,但却有相同的整体空间结构。例如有近百种不同来源的线粒体细胞色素 c 的氨基酸序列已经测定,它们的氨基酸残基数均在 104 左右,其中仅在 21 个位置上的氨基酸在不同生物体的细胞色素 c 是完全相同的,其他则各不相同;但是所有这些细胞色素 c 的整体空间结构却是非常相似的^[14]。另外,两个在功能上完全无关的蛋白质,卵类黏蛋白的第三结构域和核糖体结构蛋白 L7/L12 的 C-末端部分虽然在氨基酸序列上仅有 3% 相同,却具有几乎完全相同的空间结构^[15]。

简并性还体现在用化学修饰及定点突变方法研究侧链残基取代对蛋白质折叠状态影响的研究结果。首先是研究改变侧链性质,包括大小、极性、电荷、氢键形成能力等的影响。例如硫氧还蛋白在分子内部有一个巯基,对这个巯基用不同链长的烷基硫代磺酸修饰可以在分子内部引入不同链长,包括从甲烷到正戊烷的烷代二硫键。这样在分子内部引入大小不同的疏水基团的结果并没有影响分子的圆二色光谱,也没有影响它在胍溶液中的去折叠与重折叠以及对 DNA 多聚酶的活化^[16]。晶体衍射结构分析的结果表明,对金黄色葡萄球菌核酸酶做同样的修饰也不影响分子的整体结构^[17]。在分子内部引入大小不同的疏水基团的结果,只不过是使某些侧链基团在位置上有所重排,但并不影响分子的总体结构。

更多的证据来自定点突变研究。定点突变技术的建立为蛋白质结构功能关系研究提供了极大的方便。金黄色葡萄球菌核酸酶是研究得最多的蛋白之一,它的 149 个氨基酸残基几乎每一个都被替换过。多数残基被替换时对酶的结构或功能都不产生明显影响。特别值得注意的是处于分子内部的疏水残基 Val-56 被极性并带正电荷的 Lys 取代时,不影响酶分子的整体三维结构^[18]。对 T4 溶菌酶类似取代也得到同样的结果^[19]。结构研究还表明处于分子内部的

Lys 并没有为氢键或盐键所稳定. 这一事实充分说明某些个别键的破坏并不能对结构起到决定性的作用, 所以个别残基的单独替换不会对分子的总体构象产生明显的影响. 甚至把整段的序列用相同残基构成的序列所取代, 如 T4 溶菌酶分子内部 40~49 的 10 个残基都用丙氨酸取代, 对酶的折叠或生物活性都没有明显影响^[20]. 对 Arc 阻遏物进行类似的取代实验也得到类似的结果^[21].

从晶体衍射研究已经看到某些分子内部比较拥挤, 而另一些分子内部具有大量的空间, 为此进行了侧链大小颇为不同的残基的替换, 甚至用插入或删除一定长度肽段的方法探讨分子内部空间对分子整体结构的影响. 例如用侧链大小不同的氨基酸相互取代以增加或减少分子内部的拥挤程度^[22, 23], 甚至引入或删除一定长度的肽段^[24, 25], 对蛋白质分子的整体构象都没有明显的影响. 分子表面则可以容忍更大的变化, 例如在核糖核酸酶 H^[26] 的表面引入含 120~130 个氨基酸残基的肽段, 对蛋白质分子的整体构象没有明显的影响.

1.2 多意性

从已知的蛋白质氨基酸序列和空间结构的对应关系看来, 第二遗传密码显然远较第一密码更为复杂. 除和第一密码同样具有简并性外, 看来某些相同的氨基酸序列还可以在不同条件下决定不同的空间结构, 这种情况可以称之为第二遗传密码的多意性, 一个为大家熟悉的例子是 Prusiner^[27]对天然型和感染型朊病毒(prion)的研究. 天然型朊病毒(PrP^C)在正常动物体内存在, 不导致疾病, 而感染型的朊病毒(PrP^{Sc})则导致某些神经性疾病, 并导致天然型朊病毒转变为感染型的朊病毒. 初步的结构研究表明天然型朊病毒主要为 α -螺旋结构, 而感染型的朊病毒却主要为 β -折叠结构. 近年来还有其他一些实验表明某些蛋白在一定条件下可以有多种构象存在, 如鸟氨酸脱羧酶^[28]和腺苷酸激酶^[29]等. 这在表面上看来似乎和 Anfinsen 原理相矛盾, 但实际上并非如此. Anfinsen 原理从根本上说是一个热力学原理, 其基本论点是“由氨基酸序列所确定的一种空间结构是在一定条件下从热力学角度来看最稳定的结构”. 这里应该指出两点. 首先是这一最稳定的结构是在一定条件下的最稳定的结构, 在其他条件下并不一定是最稳定的结构. 其次热力学上最稳定的结构并不一定是在动力学上最容易达到的结构. 图 1 是一个说明这一原理的示意图. A 和 B 都是热力学上的稳定结构, 两者由一个较高的能障所隔开. 单纯从能量角度来看 A 比 B 更为稳定, 但是从 B 转化为 A 需要克服一个较高的能障, 因此从动力学角度来看 B 比 A 更容易达到. 在变性蛋白(U)重新折叠时, 更容易形成的是构象 B 而不是更为稳定的 A. 新生肽链在体内折叠时也有类似情况. 正因为动力学上最容易达到的状态不一定是热力学上最稳定的状态, 因此达到稳定状态的过程常常是不能自发完成的, 而需要其他分子即所谓分子伴侣的帮助.

前已提及, 不同生物体中执行相同生物

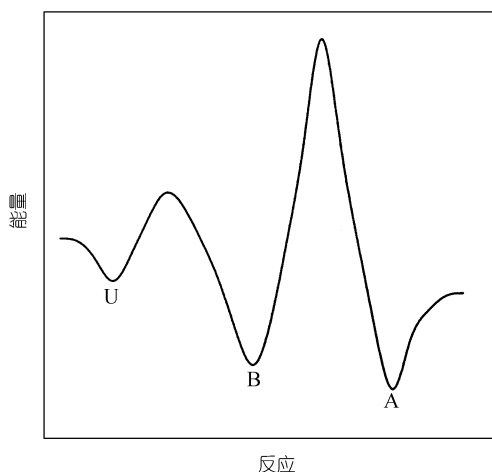


图 1 Anfinsen 原理示意图

功能的蛋白质(又称同源蛋白质,意指在进化上的同一起来源)可以在氨基酸序列上差异很大,但却有几乎完全相同的空间结构。由于第二密码的这种高度的简并性,在1994年Rose和Creamer^[30]提出一个挑战,他们称之为Paracelsus挑战,即如果有人能够在改变不超过50%的氨基酸序列的情况下就能改变一个蛋白的基本空间结构,将得到1000美元的奖金。结果在1997年,Regan小组获得了这一挑战的胜利^[31],赢得了奖金。他们改变了金黄色葡萄球菌IgG结合蛋白中一个56个残基片段中的28个残基,从而设计得到一个全新结构的蛋白,把原来主要是 β -折叠的结构改变为一个主要是 α -螺旋的蛋白。

这一实验说明不能简单的看待简并性和多意性。不同来源的细胞色素c虽然仅有20%序列相同,或者说在80%的位置上残基不同,结构却几乎完全相同;但另一方面,50%残基的改变已经可以完全改变金黄色葡萄球菌IgG结合蛋白片段的折叠类型。这只能说明第二密码的复杂性,不能简单的看有多少残基被取代,而更重要的是看用什么残基取代什么残基以及在什么位置上取代。

1.3 全局性

维系蛋白质总体空间结构相对稳定的是大量弱键协同作用的结果,个别键的形成或破坏并不足以影响蛋白质的总体空间结构,这就是第二密码简并性的结构基础。任何对于第二密码的设想都必须把大量弱键协同作用的考虑放在首位,并不是一段特定序列的肽链只对应一种特定空间结构这样的简单关系。正因为肽链在空间卷曲折叠构成蛋白质总体的空间结构,在肽链上相距很远的残基可以在空间上彼此靠近而相互作用,并对分子总体结构产生重要影响。第二密码必须把蛋白分子作为一个全局来考虑,这就从根本上决定了第二密码的复杂性,不可能像第一密码那样有简单的一对一的关系。某些蛋白C-末端少数氨基酸的去除,或侧链基团的翻译后修饰^[32],有时都可以对整体构象和功能产生重大影响^[1]。在新生肽链合成过程中,后形成的肽段可以影响已经形成的肽段的构象从而造成对分子整体的影响^[33]。以上这些情况可以称之为第二密码的全局性,全局性决定了第二密码的复杂性。

第二密码的全局性还体现在环境对分子结构的影响上。已经知道蛋白质分子与水可有紧密结合,水分子对于维系蛋白质一定的空间结构有重要作用,即使在结晶状态,蛋白质分子也含有大量的结晶水。因此曾经认为以非水溶剂全部或部分取代水溶液,将对蛋白质折叠起破坏性的作用,但是实际情况却并非如此。例如溶菌酶在甘油与水的混合溶液甚至纯甘油中仍能保持天然结构^[34]。虽然已知不少有机溶剂是蛋白质的变性剂,但是溶菌酶能在丙酮或乙酰胺的水溶液中正确折叠^[35]。即使是50%的甲醇也只影响金黄色葡萄球菌核酸酶^[36]及核糖核酸酶^[37]的折叠动力学,而不影响它们的最终折叠状态。但环境对蛋白分子结构确实有重要影响,如免疫球蛋白轻链在不同离子强度和pH下形成不同的晶体,X射线衍射结构测定表明这些不同晶体确实具有略为不同的空间结构^[38]。在体内,某些跨膜蛋白是部分处于膜双层内部的疏水条件下,对于这些蛋白的折叠状态虽然仍是由其氨基酸序列所决定,但也必然会受到其特殊环境的影响。

体外研究和体内研究有一个重要的条件的不同。体外折叠研究通常是在稀溶液($\mu\text{g/mL}$)中进行的。但细胞内某些高含量蛋白质浓度可以高达毫克每毫升的水平,两者相差千倍,而细胞内总蛋白浓度更是可高达数百毫克每毫升的水平^[39]。因此高浓度的蛋白与蛋白间的相互作

用更是一个必须考虑的问题。虽然已有不少作者注意到这一差异,但尚未在折叠研究中引起足够的重视。

2 第二遗传密码的研究在实际应用上的意义

第一密码的阐明解决了基因在不同生物体之间的转移与表达,开辟了遗传工程和蛋白工程的新产业。但是在异体表达的蛋白质往往不能正确折叠成为活性蛋白质而聚集形成包含体。生物工程的这个在生产上的瓶颈问题需要第二密码的理论研究和折叠的实验研究来指导和帮助解决。由于分子伴侣在新生肽链折叠中的关键作用,它一定会对提高生物工程产物的产率有重要的实用价值。

蛋白工程的兴起,已经使人们不再满足于天然蛋白的利用,而开始追求设计自然界不存在的全新的、具有某些特定性质的蛋白质,这就开辟了蛋白设计的新领域^[40]。前面提到的把原来主要是 β -折叠结构改变为一个主要是 α -螺旋的新蛋白的设计^[31]就是这方面的一个例子,更多的努力将集中于有实用意义的蛋白设计上。

近年来得知某些疾病是由于蛋白质折叠错误而引起的^[41, 42],如类似于疯牛病的某些神经性疾病、老年性痴呆症、帕金森氏症等。这已引起人们极大的注意。异常刺激会诱导细胞立即合成大量应激蛋白帮助细胞克服环境变化,这些应激蛋白多半是分子伴侣。由于分子伴侣在细胞生命活动的各个层次和环节上都有重要的甚至关键的作用,它们的表达和行为必然与疾病有密切关系。如局部缺血、化疗损伤、心脏扩大、高烧、炎症、感染、代谢病、细胞和组织损伤以及老年化都与应激蛋白有关。因此在医学上不仅开辟了与分子伴侣和应激蛋白有关的新的研究领域,也开创了广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 王志珍, 邹承鲁. 后基因组——蛋白质组研究. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30: 533~539
- 2 Anfinsen C B, Haber E, Sela M, et al. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. Proc Natl Acad Sci USA, 1961, 47: 1309~1314
- 3 Jaenicke R. Protein folding local structures, domains, subunits, and assemblies. Biochemistry, 1991, 30: 3148~3160
- 4 Sippl M J. Who solved the protein folding problem? Structure Fold Des, 1999, 7: R81~R83
- 5 Dill K. Dominant forces in protein folding. Biochemistry, 1990, 29: 7133~7155
- 6 Pace C N. Conformational stability of globular proteins. Trends Biochem Sci, 1990, 15: 14~17
- 7 Ellis J. Molecular chaperones: pathways and networks. Curr Biol, 1999, 9: R137~R139
- 8 Wang Z X. A re-estimation for the total number of protein folds and superfamilier. Protein Eng, 1998, 11: 621~626
- 9 Zhang C, De Lisi C. Estimating the number of protein folds. J Mol Biol, 1998, 284: 1301~1305
- 10 Demchenko A P, Chinarov V A. Tolerance of protein structures to the changes of amino acid sequences and their interactions. The Nature of the Folding Code Protein and Peptide Letters, 1999, 6: 115~129
- 11 Sternberg M J E, Bates P A, Kelley L A, et al. Progress in protein structure prediction assessment of CASP3. Curr Op Structural Biol, 1999, 9: 268~373
- 12 Baldwin R L, Rose G D. Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. Trends Biochem Sci, 1999, 24: 77~83
- 13 Tsai C J, Maizel J V, Nussinov R. Distinguishing between sequential and nonsequentially folded proteins: implications for folding and misfolding. Protein Sci, 1999, 8: 1591~1604
- 14 Banci L, Bertini I, Rosato A, et al. Mitochondrial cytochromes c: a comparative analysis. J Biol Inorg Chem, 1999, 4: 824~837
- 15 Laurents D V. Different protein sequences can give rise to highly similar folds through different stabilizing interactions.

Protein Science, 1994, 3: 1938~1944

- 16 Wynn R, Richards F M. Unnatural amino acid packing mutants of *E. coli* thioredoxin produced by combined mutagenesis/chemical modification techniques. Protein Science, 1993, 2: 395~403
- 17 Wynn R, Harkins P C, Richards F M, et al. Mobile unnatural amino acid side chains in the core of staphylococcal nuclease. Protein Science, 1996, 5: 1026~1031
- 18 Stites W E, Gittis A G, Lattman E E, et al. In a staphylococcal nuclease mutant the side-chain of a lysine replacing valine is fully buried in the hydrophobic core. J Biol Chem, 1991, 266: 7~14
- 19 Dao S P, Anderson D E, Baase W A, et al. Evidence for a compaction process. J Biol Chem, 1995, 270: 24598~24603
- 20 Heinz D W, Baase W A, Matthews B W. Folding and function of a T4 lysozyme containing consecutive Ala illustrate the redundancy of information in an amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 3751~3755
- 21 Brown B M, Sauer R T. Post-translational folding of α_1 -inhibitor 3. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 1983~1988
- 22 Eriksson A E, Baase W A, Zhang X J, et al. Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. Science, 1992, 255: 178~183
- 23 Buckle A M, Henrick K, Fersht A R. Crystal structural analysis of mutations in the hydrophobic cores of barnase. J Mol Biol, 1993, 234: 847~860
- 24 Jackson S E, Moras M, el-Masry N, et al. Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2. Biochemistry, 1993, 32: 11259~11269
- 25 Vetter I R, Baase W A, Heinz D W, et al. Protein structural plasticity exemplified by insertion and deletion mutants in T4 lysozyme. Protein Science, 1996, 5: 2399~2415
- 26 Doi N, Itaya M, Yomo T, et al. Insertion of foreign random sequences of 120 amino acid residues into an active enzyme. FEBS Lett, 1997, 402: 177~180
- 27 Prusiner S B. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 482~487
- 28 Tsirka S E, Turck C W, Coffino P. Multiple active conformers of mouse ornithine decarboxylase. Biochem J, 1993, 293: 289~295
- 29 Zhang H J, Sheng X R, Pan X M, et al. Evidence for at least two native forms of rabbit muscle adenylate kinase in equilibrium in aqueous solution. J Biol Chem, 1998, 273(13): 7448~7456
- 30 Rose G D, Creamer T P. Protein folding-predicting. Protein-Struct Funct Genetics, 1994, 19: 1~3
- 31 Dalal S, Balasubramanian S, Regan L. Protein alchemy: changing β -sheet into α -helix. Nature Structure Biology, 1997, 4: 548~552
- 32 Wassler M, Esnard F, Fries E. Posttranslational folding of $\alpha(1)$ -inhibitor-3-Evidence for a compaction process. J Biol Chem, 1995, 270: 24598~24603
- 33 Tsou C L. The folding of the nascent peptide chain into a biologically active protein. Biochemistry, 1988, 28: 1809~1812
- 34 Rariy R V, Klibanov A M. Correct protein folding in glycerol. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13520~13523
- 35 Yasuda M, Murakami Y, Sowa A, et al. Effect of additives on refolding of a denatured protein. Biotechnol Prog, 1998, 14: 601~606
- 36 Nakano T, Fink A L. The folding of staphylococcal nuclease in the presence of methanol or guanidine thiocyanate. J Biol Chem, 1990, 265: 12356~12362
- 37 Fink A L, Anderson W D, Hattersley J E, et al. The effect of methanol and temperature on the kinetics of refolding of ribonuclease A. FEBS Lett, 1988, 236: 190~194
- 38 Huang D B, Anisworth C F, Stevens F J, et al. Three quaternary structures for a single protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7017~7021
- 39 Zimmermann S B, Minton A P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. Ann Rev Biophys Biomol Struct, 1993, 22: 27~65
- 40 Dahiyat B I, Mayo S L. De novo protein design: towards fully automated sequence selection. J Mol Biol, 1997, 273: 789~796
- 41 Taubes G. Misfolding the way to disease. Science, 1996, 271: 1493~1495
- 42 Bellotti V, Mangione P, Stoppini M. Biological activity and pathological implications of misfolded proteins. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 977~991

(2000-05-17 收稿, 2000-06-27 收修改稿)