

重组人核苷二磷酸激酶 A 的理化性质

熊 盛¹ 钱垂文¹ 黄 立¹ 王一飞^{1*} 张美英¹ 李久香¹
严玖凤² 王小宁² 张晓伟² 毕志刚²

¹(暨南大学生物医药研究开发基地 广州 510630)

²(北京凯正生物工程发展有限责任公司 北京 100850)

摘 要 对重组人核苷二磷酸激酶 A (rhNDPK-A) 进行纯化, 并对重组产物的理化性质及在溶液中的聚合状态进行鉴定。NDPK-A 工程菌发酵后的菌体高压匀浆, 然后微孔过滤、超滤浓缩, 所得样品经 DEAE 阴离子交换、Cibacron Blue 亲和层析、分子筛层析三步纯化后, 以 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析纯化产物的纯度, RP-HPLC 测定酶活性。合格制品以基质辅助激光解析飞行时间质谱测定相对分子质量 (MW), Edman 降解法测定 N 末端序列; 多角度激光散射法测定重组产物在溶液中的表观分子量。结果表明, rhNDPK-A 纯化产物的 SDS-PAGE 纯度为 97.3%, RP-HPLC 纯度为 99.2%, 比活性为 $(900 \pm 100) \text{ U/mg}$; 单体相对分子质量为 17017, 与 NDPK-A 分子量理论值相差 132。测序结果表明, rhNDPK-A N 末端缺失 Met 残基, 其理论分子量为 17017, 与飞行质谱测定结果完全一致。表观分子量测定结果表明, rhNDPK-A 在溶液中形成六聚体, 表观分子量为 102kD。上述结果说明, NDPK-A 重组产物与天然产物相同的自发形成六聚体性质, 这为 NDPK-A 新药开发和机理研究打下了良好基础。

关键词 核苷二磷酸激酶 A, 飞行质谱, 多角度激光散射, 表观分子量, 六聚体

中图分类号 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0085-05

核苷二磷酸激酶 A (NDPK-A) 是抑癌基因 *nm23-H1* 的编码产物, 除了催化 NDP 和 NTP 之间的磷酸基转移反应外, 还可以作为蛋白激酶调节其它生化途径, 也可作为转录因子调节其它蛋白质活性^[1]。NDPK-A 通过一些还未完全了解的机制, 可以调节血细胞分化、抑制肿瘤转移, 调控神经细胞分化和生长, 影响个体发育。研究 NDPK-A 的非酶促活性对于揭示肿瘤的侵袭和转移机制有重要意义^[2]。

作为磷酸转移酶, NDPK-A 有可能开发为抗病毒增效药物^[3]; 作为血管新生抑制剂, NDPK-A 有望开发为新型抗肿瘤药物。开展 NDPK-A 新药开发和基础研究的前提之一是获得大量结构正确的重组人核苷二磷酸激酶 A (rhNDPK-A)。在前期工作中, 我们构建了 NDPK-A 高表达菌株^[4], 并对工程菌发酵和蛋白纯化条件进行了探索^[5], 还进行了初步药效学研究^[6]。

由于生理条件下, NDPK-A 可以与 NDPK-B 随机组合, 形成 A_6 、 B_6 以及 A 和 B 随机杂合的六聚体, 形成寡聚体是 NDPK 发挥生物活性的基础^[7]。因此, 用重组 DNA 技术获得 NDPK-A 后, 需要对重组产物的理化性质, 尤其是表观分子量、聚合状态等性质进行鉴定, 确认重组产物是否均一, 并且理化性质是否与天然产物相一致, 这是重组 NDPK-A 发挥生物活性的基础和保证。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 表达质粒 pBV-Nm23H1 由本室构建^[4], 质粒上含有 *nm23-H1* 以及 *Amp* 抗性基因。

宿主菌 *E. coli* DH5 α 由本室保存, pBV-Nm23H1 转化 DH5 α 后得工程菌 DH[pBV-Nm23]。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白酶 (TPCK 处理) 层析基质 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-100 购自

收稿日期 2003-07-23, 修回日期 2003-10-12。

基金项目 国家 863 高技术研究项目 (No. 2001AA215041) 及广东省科技厅重大攻关项目 (No. A1090207) 广州市天河区科技攻关项目 (No. 032G017) 基金资助。

* 通讯作者。 Tel 86-20-85222706; Fax: 86-20-85223426; E-mail: twa@journals.im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Pharmacia Biotech 公司 ;Cibacron Blue 3GA Sepharose CL-4B 购自 Millipore 公司 ;Symmetry 300 C18 的反相柱购自 Waters 公司 ,规格 4.6mm × 250mm ,粒度 5 μ m ,孔径 300Å # 506 ;Tris base、DTT、蛋白电泳试剂购自 Promega 公司 ;其它化学试剂为进口或国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 高压匀浆机购自 Sartoris 公司 ;切向流微孔过滤系统和超滤系统购自 PALL 公司 ;低压层析系统为 ÄKTA Purifier ;高效液相色谱仪为 HP1100 型和 Waters 600 型 ;DAWN^R EOS 多角度激光散射检测仪购自 Wyatt Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白纯化 参照文献进行^[4,8] ,有改动。工程菌 DH α pBV-Nm23 经 42℃ 温控诱导后 ,高压匀浆 ,然后以微孔滤膜进行切向流过滤 ,收集滤过液 ,用截留分子量为 30kD 的超滤膜进行超滤浓缩 ,浓缩液上样 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱 ,用含 0.1mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱目的组分 ;收集目的组分上样 Cibacron Blue 3GA Sepharose 4B 柱 ,用含 0.1mmol/L ATP 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱目的蛋白 ,最后通过 Sephadex G-100 凝胶柱精制。

1.2.2 反相高效液相色谱 :10 μ L rhNDPK-A 样品上柱。流动相 A 为 0.1% TFA/DDW ,流动相 B 为 0.1% TFA/ACN ;柱温 30℃ ,流速 1mL/min ;检测波长 260nm 及 280nm(TFA :三氟醋酸 ;DDW :双蒸水 ;ACN :乙腈)。

1.2.3 磷酸转移酶活性测定 :参照文献[4]进行。利用 rhNDPK-A 能够催化 NTP 和 NDP 之间的磷酸基转移反应这一特性 ,将 rhNDPK-A 与定量 UDP、ATP 混合 ,37℃ 反应 5min ,终止反应后 ,上样 C18 反相色谱柱 ,比较底物 UDP 和产物 UTP 的峰面积 ,计算酶活性 ,其单位定义为 :在最佳条件下 ,每分钟转化 1 μ mol 底物的酶量为 1 个活力单位。

1.2.4 分子量测定 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight ,MALDI-TOF)测定 rhNDPK-A 分子量 ,精确度为 0.1% ~ 0.01%^[9]。委托解放军军事医学科学院生物医学分析中心进行。

1.2.5 氨基酸末端测序 :Edman 降解法。委托北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室进行。纯化 rhNDPK-A 样品 50pmol ,上样 Applied Biosystems Procise 氨基酸序列分析仪 ,进行全自动测序 ,测定速度为 1 残基/h。

1.2.6 表观分子量测定 :rhNDPK-A 上样分子排阻

高效液相色谱柱 ,多角度激光散射法(Multiangle laser light scattering method ,MALS)测定重组蛋白在溶液中的表观分子量 ,然后根据亚基分子量推导 rhNDPK-A 在溶液中的聚集状态^[10,11]。

2 结 果

2.1 rhNDPK-A 的纯化及酶活测定

经过三步纯化后 ,还原 SDS-PAGE 分析 rhNDPK-A 纯度为 97.3% ,Fig. 1 是纯化过程中各阶段样品的电泳结果。Lane 1 是蛋白分子量标准 ;Lane 2 是微孔过滤后的残留物 ,可见经微孔过滤后 ,仍有少量目的蛋白损失 ;Lane 3 是经浓缩后的微孔过滤液 ,即上样离子交换柱样品 ,凝胶光密度扫描结果表明 ,rhNDPK-A 占总蛋白的 40.9% ;Lane 4 是离子交换柱洗脱组分 ,经过离子交换层析(IEX)后 ,目的蛋白纯度由 40.9% 提高到 54.7% ;Lane 5 是亲和层析(AC)收集样品 ,目的蛋白纯度为 92.8% ;Lane 6 是凝胶过滤(GF)后的目的蛋白 ,纯度为 97.3%。分析整个纯化过程 ,可知 IEX 纯化倍数为 1.34 ,AC 纯化倍数为 1.69 ,GF 纯化倍数为 1.05。

Fig. 2 是 rhNDPK-A 样品的 RP-HPLC 分析结果 ,可知目的蛋白出峰时间为 26.74min ,并且目的蛋白峰形尖锐、对称。峰面积积分结果表明 ,rhNDPK-A 纯度为 99.2%。

RP-HPLC 法测定 rhNDPK-A 酶活性 ,发现其比活为(900 ± 100)u/mg(原始结果略) ,与文献[13]报道的 NDPK-A 重组产物酶比活性相当。

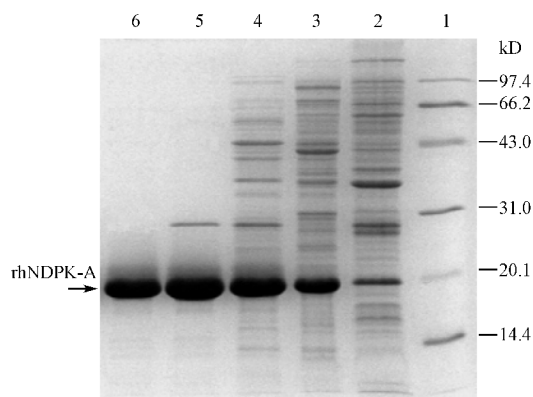


图 1 SDS-PAGE 分析重组 NDPK-A 纯化过程

Fig.1 SDS-PAGE analysis of samples collected in the purification of rhNDPK-A

1 : standard of molecular weight markers ; 2 : discarded fraction of micro-filtration ; 3 : fraction loaded on IEX column ; 4 : fraction eluted from IEX column ; 5 : fraction eluted from AC column ; 6 : fraction collected from GF column

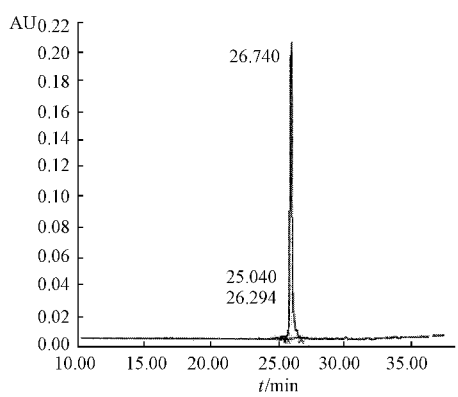


图 2 反相高效液相色谱分析重组 NDPK-A 纯度
Fig.2 RP-HPLC of rhNDPK-A

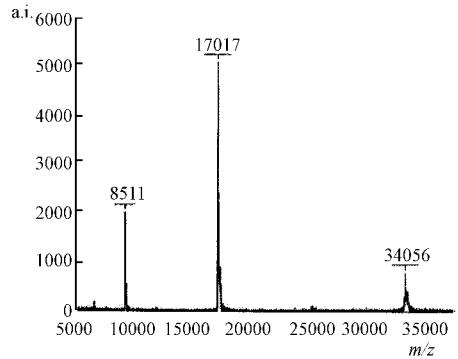


图 3 MALDI-TOF MS 测定重组 NDPK-A 单体分子量
Fig.3 Molecular weight measurment of rhNDPK-A by MALDI-TOF MS

2.2 rhNDPK-A 单体分子量
MALDI-TOF MS 测定 rhNDPK-A 分子量 结果如

Fig. 3 所示 ,从图中可以看出 ,样品在质荷比(m/z) 为 17017 处有一强信号峰 ,结合 SDS-PAGE 电泳结果 ,可知这是单电荷峰 ,即 rhNDPK-A 相对分子质量 为 17017 。在 17017 主峰上还有一分子量为 17225 的肩峰 ,是基质与 rhNDPK-A 结合后形成的信号峰。此外 ,Fig.3 中还有质荷比为 8511 的双电荷峰和质荷比为 34056 的二聚体峰。双电荷峰是因样品离子化后带有 2 个电荷 , m/z 数值减半而造成的信号峰 ;二聚体峰是待检样品因非共价键或共价键形成二聚体后所形成的单电荷峰。根据 NDPK-A 一级结构计算 ,其相对分子质量理论值为 17149 ,对照分子量测定结果 ,二者相差 132 ,原因有待进一步分析。

2.3 rhNDPK-A 末端测序

对 rhNDPK-A 的 N 末端进行序列分析 ,发现 N 末端氨基酸残基为 Ala ,而不是 Met。 Fig.4 是 Edman 降解法测定 N 端第一个残基的洗脱曲线 ,图 A 是空白对照 ,图 B 是混合氨基酸标准品 ,图 C 是样品的洗脱曲线 ,对照标准品 ,可知该残基为 Ala。对 rhNDPK-A N 端 15 个氨基酸残基进行分析 ,发现序列为 Ala-Asn-Cys-Glu-Arg-Thr-Phe-Ile-Ala-Ile-Lys-Pro-Asp-Gly-Val ,与理论序列 $N_2 \sim N_{16}$ 完全相符 ,说明 rhNDPK-A 在翻译后加工过程中 ,缺失 N 端第 1 个氨基酸残基 Met。

重新计算 rhNDPK-A 的相对分子质量 ,理论值为 17017 ,与 Fig.3 中分子量测定结果完全相符。

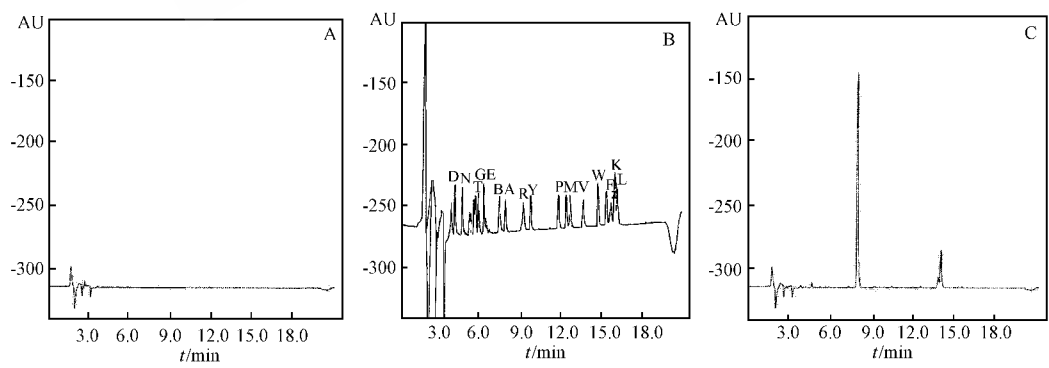


图 4 rhNDPK-A N 末端序列测定结果
Fig.4 N-terminal amino acid residue of rhNDPK-A
A : blank ; B :standard curve of amino acid mixture ; C :the first residue of rhNDPK-A

2.4 rhNDPK-A 表观分子量

确定了 rhNDPK-A 单体的分子量后 ,以 SE-HPLC 结合多角度激光散射(MALS)测定重组蛋白在溶液中的聚合状态。仪器组成为一台 HP1100 高效液相色谱仪、一台 DAWN[®] MALS 检测器、一台 UV

(280nm)检测器和一台示差折光(DRI)检测器。 Fig.5 中图 A 是目的蛋白在洗脱过程中的检测信号 ,其中 ,散点线是 MALS 信号 ,峰高最低的是 DRI 信号 ,峰高居中的是 UV 信号 ,图 B 是分子量对洗脱时间的函数图 ,可知 rhNDPK-A 表观分子量为 102kD

(图 B 中散点拟合直线在纵坐标上的对应值),结合 Fig.3 中 rhNDPK-A 单体分子量测定结果可知, rhNDPK-A 具有与天然产物相同的自发形成寡聚体性质,在溶液中以六聚体形式存在。

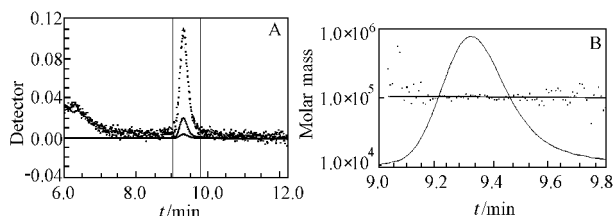


图 5 重组 NDPK-A 表观分子量测定结果

Fig.5 Apparent molecular weight of rhNDPK-A

A: signal detected by MALS, UV and DRI detector; B: curve of apparent MW vs elution time of rhNDPK-A

3 讨 论

本文所使用的 rhNDPK-A 工程菌具有表达量高、产物可溶、菌种稳定等特点。在 80L 发酵罐中进行高密度培养后,参照本文所使用的纯化工艺,每升培养液可得 rhNDPK-A 400 ~ 600mg,远远超过目前报道的绝大多数重组蛋白产量。rhNDPK-A 能最终得到高产,一方面与目的蛋白的可溶性高表达有关,另一方面与样品前处理方法有关。样品前处理是影响目的蛋白回收率的重要影响因素之一,常规超声破碎方法只能回收大约 10% ~ 20% 目的蛋白,而采用高压匀浆结合微孔过滤和超滤处理,目的蛋白回收率可以超过 65%。处理好的样品经过 3 步层析后,可以得到均一的重组蛋白,其纯度经过基于蛋白质分子量和疏水性的两种纯度鉴定方法验证。

重组蛋白分子量测定有多种方法,飞行质谱法精度可达 0.1% ~ 0.01%,精度仅次于傅立叶变换质谱。本文 rhNDPK-A 分子量测定结果完全符合 N 末端缺失 Met 的重组蛋白的相对分子质量理论值。而在 SDS-PAGE 胶上, rhNDPK-A 分子量为 19.3kD,可见 SDS-PAGE 测定蛋白分子量的误差之大。

真核生物中 NDPK 形成六聚体,在空间上可看作是 3 个二聚体或 2 个三聚体进一步聚合后形成的寡聚蛋白,但到目前为止,还不清楚 NDPK 六聚体的组装过程。本文的 MALDI-TOF MS 测定结果发现, rhNDPK-A 中有二聚体存在,是否说明 NDPK 在组装时,形成二聚体中间产物,而不是三聚体中间产物,这有待进一步研究。

蛋白质翻译后切除 N 端 Met 残基是原核生物和真核生物翻译后加工的内容之一。批准上市的 IL-2、

IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、G-CSF、GM-CSF、EPO、EGF 等多种重组蛋白中,只有 IFN- β N 端是 Met 或 Ser 残基,其它重组蛋白 N 端均缺失 Met 残基。一般情况下, N 端有无 Met 残基不影响蛋白的生物活性,但如果 N 端不均一,则影响重组产品质量标准的制定。本文表达的 rhNDPK-A 也存在翻译后 Met 加工现象,但从 MALDI-TOF MS 结果可见,纯化的 rhNDPK-A 中,没有相对分子质量为 17149 的蛋白峰,并且,测序时第一个氨基酸残基的洗脱曲线中,在 Met 相对应的位置也没有信号峰,说明重组蛋白 N 末端均一。

由于市售 NDPK 提取自酵母(Sigma 产品 N0379)或动物组织(Sigma 产品 N2635),是 NDPK-A 与 NDPK-B 的杂合寡聚蛋白。因此,暂无法确定本文所得 rhNDPK-A 比活性与天然 NDPK-A 之间是否存在差异,但与文献报道的重组 NDPK-A 比活性相比,二者无差异。

多角度激光散射(MALS)是测量溶液中蛋白质分子量的理想方法,这种方法非常灵敏,不仅可以测定蛋白质的分子量,还可以研究蛋白质的外形、直径,以及寡聚蛋白中亚基与亚基之间的相互作用^[10-12]。MALS 系统用作 HPLC 的在线检测器时,不用柱子校准,不用参考标样,可直接得到所洗脱蛋白质的分子量,而且是蛋白质在溶液中的分子量。由这些数据可知蛋白质是以单体存在,还是二聚体,或是多聚体。本文用 MALS 确定了 rhNDPK-A 在溶液中的存在形式,这对于 rhNDPK-A 新药质量标准的制定^[12]和 rhNDPK-A 机理研究来说,都是重要进展。

NDPK-A 分子中含有 3 个 Cys,已有研究结果发现,氧化剂或者还原剂处理 NDPK-A 可以明显改变其酶活性^[13],提示 NDPK-A 酶活性在体内可能受氧化还原信号途径(Redox signal pathway)调控。但到目前为止,还没有直接实验证据揭示 NDPK-A 中二硫键的位置及其变化规律。应用本文所采用的质谱和多角度激光散射技术,有可能解决这一问题,这方面的工作已取得重要进展。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ma D, Xing Z, Liu B *et al.* NM23-H1 and NM23-H2 repress transcriptional activities of nuclease-hypersensitive elements in the platelet-derived growth factor-A promoter. *J Biol Chem*, 2002, **277**(2): 1560 - 1567
- [2] Roymans D, Willems R, Van Blochstaete DR *et al.* Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2002, **19**(16): 465 - 476
- [3] <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2001/Reac-en.html> #

- [4] Hou Y (候宇), Zhao LG (赵利淦), Zhang MY (张美英) *et al.* Study on high-level expression and purification of Nm23-H1/NDPK-A in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学报), 1998, **14** (6): 655 – 660
- [5] Qian CW (钱垂文), Luo Y (罗勇), Zhang MY (张美英) *et al.* Purification of rNm23-H1/NDPK-A in middle-scale. *Biotechnology* (生物技术), 2002, **12** (1) 23 – 24
- [6] Yang RY (杨瑞仪), Zhang MY (张美英), Zhao LG (赵利淦). Nm23-H1 gene induces apoptosis and improves the antioxidation in tumor cell. *Chinese Journal of Cancer* (癌症), 2000, **19** (5): 436 – 438
- [7] Mesnildrey S, Agou F, Karlsson A *et al.* Coupling between catalysis and oligomeric structure in nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem*, 1998, **273** (8): 4436 – 4442
- [8] Gilles AM, Presecan E, Vonica A *et al.* Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem*, 1991, **266** (14): 8784 – 8789
- [9] Xia QC (夏其昌). Technology and Its Advances in Protein Chemistry (蛋白质化学研究技术与进展). 1st ed, Beijing: Science Press, 1999, pp. 165 – 248
- [10] Yamaguchi T, Adachi K. Hemoglobin equilibrium analysis by the multiangle laser light-scattering method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **290** (5): 1382 – 1387
- [11] Bartkowski R, Kitchel R, Peckham N *et al.* Aggregation of recombinant bovine granulocyte colony stimulating factor in solution. *J Protein Chem*, 2002, **21** (3): 137 – 143
- [12] Wang JZ (王军志). Research & development and quality control of biotech drugs (生物技术药物研究开发和质量控制). 1st ed, Beijing: Science Press, 2002, pp. 341 – 342
- [13] Song EJ, Kim YS, Chung JY *et al.* Oxidative modification of nucleoside diphosphate kinase and its identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biochemistry*, 2000, **39** (33): 10090 – 10097

Physical and Chemical Characters of Recombinant Human Nucleoside Diphosphate Kinase A

XIONG Sheng¹ QIAN Chui-Wen¹ HUANG Li¹ WANG Yi-Fei^{1*} ZHANG Mei-Ying¹ LI Jiu-Xiang¹
YAN Jiu-Feng² WANG Xiao-Ning² ZHANG Xiao-Wei² BI Zhi-Gang²

¹(Biomedical Research and Development Center, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

²(Beijing Kaizheng Biotech Development Co. Ltd, Beijing 100850, China)

Abstract To purify recombinant human nucleoside diphosphate kinase A (rhNDPK-A) and determine its physical and chemical characters, recombinant NDPK-A producing *E. coli* was cultured in 80L fermentor under high cell density culture (HCDC) conditions. The harvested cells were treated with high pressure to break the cell up, tangential-flow microfiltration to remove the bacteria debris and ultrafiltration to concentrate the filtered solution containing target protein. The crude NDPK-A was purified by ion exchange chromatography with DEAE Sepharose Fast Flow, affinity chromatography with Cibacron Blue 3GA Sepharose CL-4B and gel filtration with Sephadex G-100. The purity of rhNDPK-A was analyzed with SDS-PAGE and RP-HPLC. The Enzymatic activity was determined with RP-HPLC. The molecular weight (MW) was measured with matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight MS (MALDI-TOF MS). The N-terminal residue was sequenced with Edman method. The apparent molecular weight of rhNDPK-A in solution was determined with multiangle laser light-scattering method (MALS). It was found that the purity of rhNDPK-A was 97.3% with SDS-PAGE method and 99.2% with RP-HPLC method. The specific enzymatic activity was (900 ± 100) u/mg. The molecular weight was 17017, which was 132 less than the calculated value according to the amino acid sequence of NDPK-A. The sequencing result of rhNDPK-A revealed that its N-terminal residue was Ala, which was the second residue on N-terminal of native NDPK-A. The calculated MW of N-terminal deleted rhNDPK-A was 17017, exactly equal to the experimental value. The result of apparent MW determination revealed that rhNDPK-A formed homohexamer in solution with a MW of 102kD. These results suggested that rhNDPK-A possessed character identical to its native counterpart of assembling into hexamer. Confirming the identity of rhNDPK-A to its native counterpart provided a good foundation for drug development and mechanism study of NDPK-A.

Key words NDPK-A, MALDI-TOF MS, MALS, apparent molecular weight, hexamer

Received: 07-23-2003

This work was supported by Grant of National “ 863 ” High-tech Project (No. 2001AA215041), Key Grant Project of Department of Science and Technology of Guangdong Province (No. A1090207) and Grant of Science and Technology Department of Guangzhou Tianhe District (No. 032G017).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85222706 Fax: 86-20-85223426 E-mail: xwangyf@jnu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>