

蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-1/SHP-2 催化活性域的表达和动力学分析

莫毅^{1,4}, 王伟², 梁方方³, 傅冠元², 蒋和生¹, Wayne Zhou²

1 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004

2 美国路易斯安那州立大学生命科学院, 巴吞鲁日 LA 70803

3 广西畜牧研究所, 南宁 530001

4 广西人口和计划生育研究中心, 南宁 530021

摘要: 为了分离纯化 SHP-1/SHP-2 催化活性域蛋白(分别命名为 D1C/D2C), 并估测其动力学常数, 将已经构建好的 D1C/D2C 重组质粒转化 *Escherichia coli* BL21 菌株, 经 IPTG 诱导表达、菌体裂解缓冲液悬浮和超声波破碎后, 通过 HPLC 分离纯化 D1C/D2C 蛋白, 所得产物进行 SDS-PAGE 电泳检测。然后, 以 pY 作为去磷酸化反应的底物, 利用孔雀绿显色法, 通过双倒数作图法对纯化的 D1C/D2C 蛋白进行动力学分析。结果表明, 本试验已成功地表达了 D1C 和 D2C 蛋白, 主要以可溶性蛋白的形式表达; 利用 HPLC 技术可有效地对 D1C/D2C 蛋白进行分离纯化; D1C 的相对分子质量为 34.6 kD, 米氏常数 $K_m=2.04$ mmol/L, 催化常数 $K_{cat}=44.98$ s⁻¹, 特异性常数 $K_{cat}/K_m=22.05$ L/(mmol · s); D2C 的相对分子质量为 35.3 kD, 米氏常数 $K_m=2.47$ mmol/L, 催化常数 $K_{cat}=27.45$ s⁻¹, 特异性常数 $K_{cat}/K_m=11.11$ L/(mmol · s); D1C 的磷酸酶活性强于 D2C。

关键词: SHP-1, SHP-2, 蛋白表达, 蛋白纯化, 动力学分析

Expression and kinetic analysis of catalytic domain of protein tyrosine phosphatases SHP-1/SHP-2

Yi Mo^{1,4}, Wei Wang², Fangfang Liang³, Guanyuan Fu², Hesheng Jiang¹, and Wayne Zhou²

1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

2 Life Science Department of Louisiana State University, Baton Rouge LA 70803, USA

3 Guangxi Animal Science Institute, Nanning 530001, China

4 Research Center of Population and Family Planning of Guangxi, Nanning 530021, China

Abstract: In order to express and purify the catalytic domain of SHP-1/SHP-2 (named as D1C and D2C respectively) and determine their kinetics, the constructed D1C and D2C plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 and the expression was induced with IPTG. The harvested cells were suspended in extraction buffer. After sonication, the solution was applied to HPLC and the results were confirmed by SDS-PAGE. The purified peptides were further subjected to kinetic specificity study using synthetic phosphotyrosine (pY) as substrate by malachite green method and analyzed by Lineweaver-Burk plot calculation. From this study, we found D1C and D2C were expressed successfully in soluble state in *Escherichia coli* BL21 and purified efficiently with HPLC system. The molecular weight of D1C was 34.6 kD, and its Michaelis constant (K_m) was 2.04 mmol catalytic constant (K_{cat}) was 44.98 s⁻¹, specific constant (K_{cat}/K_m) was 22.05 L/(mmol · s); the molecular weight of D2C was 35.3 kD, and its Michaelis constant

Received: September 24, 2008; **Accepted:** November 26, 2008

Corresponding author: Wayne Zhou. Tel: +86-771-3270119; E-mail: zhouw2008@gmail.com

(K_m) was 2.47 mmol, catalytic constant (K_{cat}) was 27.45 s⁻¹, specific constant (K_{cat}/K_m) was L/(mmol · s). The enzyme activity of D1C is stronger than that of D2C.

Keywords: SHP-1, SHP-2, protein expression, protein purification, kinetic analysis

SHP-1/SHP-2 是 1 种含有 2 个 Src 同源结构域 2 (Src homology II domain, SH2) 的蛋白酪氨酸磷酸酶 (Protein tyrosine phosphatase, PTP), 作为细胞因子、生长因子及其他胞外刺激因子的下游信号分子^[1,2], 通过调节细胞内酪氨酸残基的磷酸化水平, 影响着细胞的生长、增殖、分化、细胞周期、细胞间相互联系、细胞运动、基因转录、免疫应答等多种重要生命活动^[3]。尽管 SHP-1/SHP-2 同属于非受体样的蛋白酪氨酸磷酸酶, 在基因序列上有 55% 的同源性, 具有相近的蛋白质三维结构和催化活性激活机制^[4]。SHP-1/SHP-2 在机体内却各自具有不同的生物学功能: SHP-1 主要在造血细胞和上皮细胞中表达, 在信号转导中主要起负调控作用^[2,5]; 而 SHP-2 则在各种类型的细胞中都有表达, 在信号转导中主要起正调控作用^[2,6]。研究表明 SHP-1/SHP-2 通过其催化活性域对底物的特异选择及作用, 来实现其对细胞信号转导通路的选择, 进而发挥其相应的生物学功能^[7,8]。因而, 对于 PTPs 域的研究在某种意义上成为了揭示 SHP-1/SHP-2 生物功能的关键。但是, 由于缺乏对于 SHP-1/SHP-2 催化活性域具体的特异性底物和精确的作用机制的了解, 限制了对 SHP-1/SHP-2 在细胞信号转导通道的生物功能的精确研究。此问题引起了相关领域研究人员的极大关注。

本试验旨在通过原核表达系统诱导表达和 HPLC 分离纯化, 获得 SHP-1 和 SHP-2 催化活性域蛋白(分别命名为 D1C 和 D2C); 然后, 使用合成的磷酸化酪氨酸(Phosphotyrosine, pY)作为底物, 对 D1C/D2C 蛋白进行动力学分析。试验的顺利完成为研究 SHP-1/SHP-2 在细胞信号转导通道中的生物学功能提供理论数据, 进而为日后在治疗由 SHP-1/SHP-2 调节机能障碍引发的免疫性疾病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

D1C/D2C 的重组原核表达载体、*Escherichia coli* BL21 菌株由美国路易斯安娜州立大学生命科学系 Dr. Wayne Zhou 实验室保存; Aptotinin、PMSF、

Benzamidine、40% 的聚丙烯酰胺溶液、过硫酸氨、蛋白质分子量标准、孔雀绿(Malachite green reagent, MGR)和钼酸铵等试剂购自 Sigma 公司; 色谱柱 Q 柱含有 Q Sepharose fast flow 填料、H 柱含有 L-Histidyl-diazobenzyl-phosphonic acid-Agarose 填料购自 Pharmacia 公司; 透析袋购自美国 Union Carbide 公司; 蛋白超滤管购自美国 Millipore 公司。

1.2 重组原核表达载体的转化

按照《分子克隆实验指南(第三版)》^[9]中的方法进行, 分别将 D1C/D2C 的重组原核表达载体质粒共转化 *Escherichia coli* BL21 菌株, 并使用 Amp (100 μg/mL)抗性平板筛选阳性转化表达菌株。

1.3 目的蛋白的表达检测

挑取 D1C/D2C 的阳性转化菌株 37°C 摇床活化过夜。次日, 按 1:100 比例接种新鲜培养基中 37°C 摇床(225 r/min)培养。当 OD_{600} 至 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 23°C 诱导表达过夜。

制样检测: 分别在加入 IPTG 诱导表达前和 IPTG 诱导表达过夜后, 离心收集菌体, 加入 2× SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min; 制备诱导前的全菌样和诱导表达的全菌样, 4°C 保存备用。10% SDS-PAGE 电泳分析。

1.4 HPLC 分离纯化目的蛋白

将诱导表达后的菌体悬浮于菌体裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 2 mmol/L DTT, 10 mmol/L EDTA, 5% 甘油, 0.1 mol/L NaCl, 2% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Benzamidine 和 1 μg/mL Aptotinin), 超声波处理, 4°C, 14 000 r/min 离心 20 min。

收集菌体裂解上清, 于 4°C 冷室内, 连接装配有琼脂糖凝胶填充的液相色谱柱: Q 柱和 H 柱。然后, 使用小型液压泵将收集的菌体裂解上清以 <1 mL/min 的速度先缓慢地通过 Q 柱, 然后再通过 H 柱。待菌体裂解上清全部进入 Q 柱时, 添加 2 倍体积的 QA 缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 2 mmol/L β-巯基乙醇和 0.5 mmol/L EDTA), 将利于 Q 柱内的目的蛋白全部带入 H 柱, 并进行部分杂蛋白洗脱。

然后,将H柱接入液相色谱仪,使用Amersham Biosciences公司的UNICORN4.12操作系统,以QB缓冲液(25 mmol/L Tris·HCl, pH 8.5, 2 mmol/L β -巯基乙醇, 0.5 mmol/L EDTA 和 1 mol/L NaCl)作为洗脱液,使用10%~60%的盐浓度梯度,1.5 mL/min流量,每蛋白收集管收集4 mL洗脱液,进行D1C/D2C蛋白洗脱和收集。

次日,取HPLC色谱峰内适量的蛋白洗脱液,加入2×SDS上样缓冲液,煮沸10 min;然后,进行10% SDS-PAGE电泳分析,以检测D1C/D2C蛋白的纯度。

1.5 目的蛋白的透析和浓缩

收集色谱峰内的D1C/D2C蛋白洗脱液于透析袋内,以终浓度为2 mmol/L DTT的4 L QA缓冲液作为透析液,4°C透析8 h,重复2次。

透析完毕后,使用蛋白超滤管,4°C 4500 r/min对蛋白进行浓缩,至D1C/D2C终浓度约为1 mg/mL。加入等体积的蛋白保存缓冲液(50% Glycerol, 25 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 2 mmol/L DTT, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0), -20°C保存备用。

1.6 D1C/D2C的磷酸酶活性分析

1.6.1 制作磷标准曲线

参考Wayne Zhou教授等人的方法^[10],分别测定10~100 $\mu\text{mol/L}$ 的 PO_4^{3-} 标准液与孔雀绿-钼酸铵23°C反应1 min后产物的 OD_{630} ,并绘制其标准曲线。

1.6.2 D1C/D2C的动力学分析

参考Wayne Zhou教授等人的方法^[10],分别测定使用不同浓度的pY底物与D1C/D2C在23°C反应1 min后产物的 OD_{630} ,并通过磷标准曲线公式推算出反应体系的无机磷含量,进而估算D1C/D2C的反应速度;然后,通过底物浓度和反应速度的双倒数作图法得到米氏常数方程,推断出D1C/D2C的动力学反应的米氏常数(K_m)、催化常数(K_{cat})和特异性常数(K_{cat}/K_m),并对两者的动力学常数进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 目的蛋白的表达检测

D1C/D2C重组原核表达载体的阳性转化菌经培养后,使用IPTG诱导表达,分别在诱导前和诱导后

取样后电泳。电泳结果表明:经IPTG诱导后,D1C/D2C的阳性转化菌株均表达出特异的蛋白条带,相对分子质量位于29.0 kD和36.0 kD之间,与预计目的蛋白相对分子质量34.6 kD/35.3 kD相符合。

2.2 目的蛋白的可溶性分析

经IPTG诱导表达的D1C/D2C菌体使用裂解缓冲液悬浮、超声波处理及高速离心沉淀后,取菌体裂解沉淀和裂解上清样进行SDS-PAGE电泳比较。结果表明,D1C/D2C均主要以可溶性蛋白的形式进行表达,相对分子质量位于29.0 kD和36.0 kD之间,与预计目的蛋白相对分子质量34.6 kD/35.3 kD相符合(图1A、1B)。

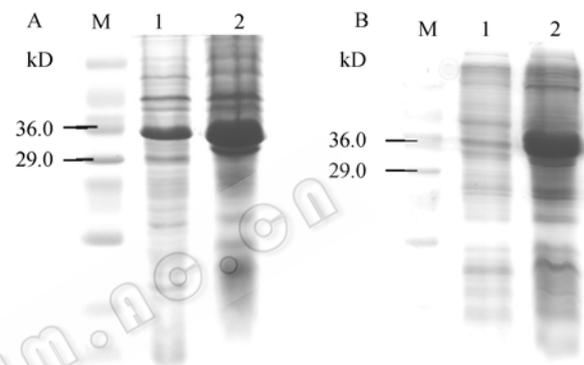


图1 D1C(A)和D2C(B)蛋白的可溶性分析

Fig. 1 Analysis of D1C (A) and D2C (B) solubility. M: protein marker; 1: deposition of lysate; 2: supernatant of lysate.

2.3 HPLC分离纯化

诱导表达后的D1C/D2C菌体经过裂解液悬浮和超声波处理后,目的蛋白经HPLC分离纯化,得到一个特异的色谱主峰,其具体的纯化效果使用10% SDS-PAGE对各主峰内的蛋白样进行分析。电泳结果表明,各样品均得到了纯度较高的特异蛋白条带,表明通过HPLC技术可有效地对D1C/D2C蛋白进行分离纯化(图2A、2B)。

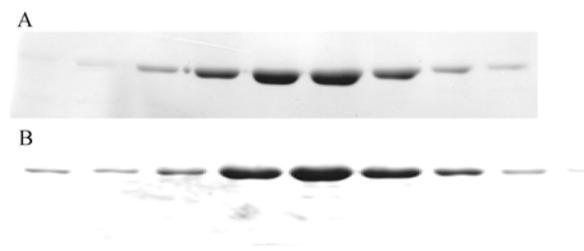


图2 D1C/D2C纯化的SDS-PAGE分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified D1C (A) and D2C (B).

2.4 磷标准曲线

通过孔雀绿定磷法绘制磷标准曲线, 表明在 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 的 PO_4^{3-} 浓度范围内, PO_4^{3-} 的含量与 OD_{630} 值呈线性相关, 线性方程为: $y=0.0096x+0.0598$, 其中相关系数 $R^2=0.9941$, 可通过测定 OD_{630} 值估算待测溶液的 PO_4^{3-} 浓度(图 3)。

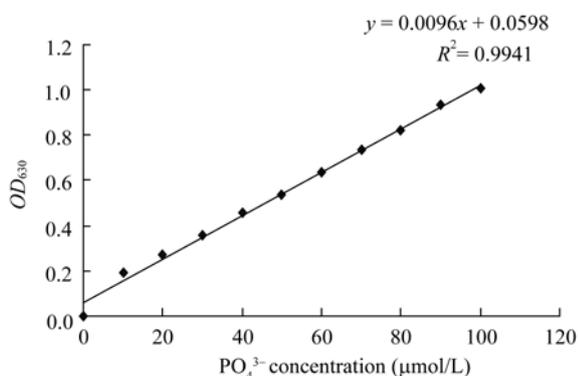


图 3 PO_4^{3-} 浓度标准曲线

Fig. 3 Standard curve of PO_4^{3-} concentration.

2.5 D1C/D2C 的动力学分析

以不同浓度的 pY 底物与 D1C 反应, 测定反应产物的 OD_{630} 值, 并推算其反应速度。然后, 使用底物浓度和反应速度的双倒数作图, 并绘制其趋势线。D1C 蛋白得到的线性方程为: $y=0.575x + 0.2823$, 其中相关系数 $R^2=0.9936$ 。推测 pY 为底物, 纯化的 D1C 具有一定的磷酸酶活性, 其米氏常数 $K_m=2.04 \text{ mmol/L}$, 催化常数 $K_{cat}=44.98 \text{ s}^{-1}$, 特异性常数 $K_{cat}/K_m=22.05 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$ (图 4A)。D2C 蛋白得到的线性方程为: $y=0.6356x+0.2569$, 其中相关系数 $R^2=0.9922$, 推测以 pY 为底物, D2C 的米氏常数 $K_m= 2.47 \text{ mmol/L}$, 催化常数 $K_{cat}=27.45 \text{ s}^{-1}$, 特异性常数 $K_{cat}/K_m=11.11 \text{ L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})$ (图 4B)。结果表明, 纯化的 D1C/D2C 蛋白均具有磷酸酶活性;

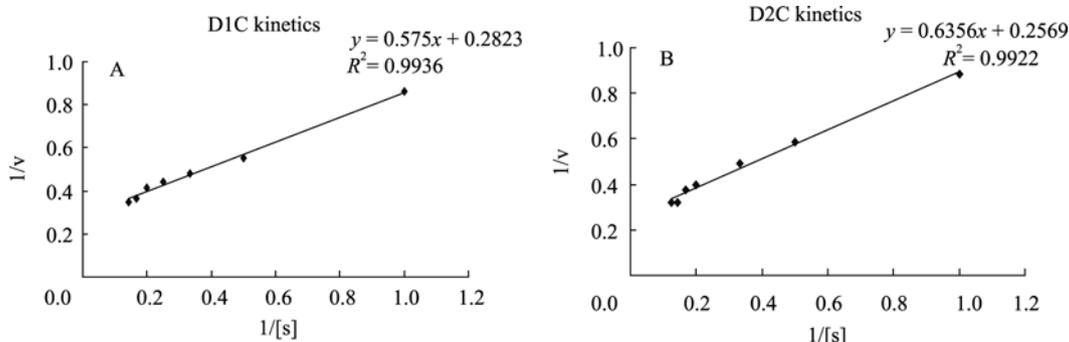


图 4 D1C/D2C 动力学趋势线

Fig. 4 D1C (A) and D2C (B) kinetics curve.

且以 pY 为反应底物时, D1C 的催化常数和反应特异性常数要高于 D2C, 即 D1C 的磷酸酶活性要较 D2C 强。

3 讨论

SHP-1/SHP-2 是非受体样蛋白酪氨酸磷酸酶家族内的重要成员, 在细胞信号转导途径中有重要的作用, 与由细胞信号转导失调相关的免疫性疾病, 尤其是肿瘤的发生密切相关^[11]。SHP-1 和 SHP-2 的催化活性域是执行其生物功能的主要区域, 结构很相似: 均为一个由 200~250 个氨基酸残基组成的蛋白酪氨酸催化结构域, 并且在其活性中心含有一段保守氨基酸基序(H/V)C(X)₅R(S/T)(X 代表任意一个氨基酸)^[12]。维持催化活性域的稳定是实现蛋白酪氨酸磷酸酶生物活性的关键, 异常的基因突变和任何氧化或能与该区域形成稳定复合物的反应都会抑制磷酸酶的活性。如基因点突变实验证明将该区域核心序列内半胱氨酸突变为丝氨酸时其磷酸酶活性完全丧失; 将精氨酸突变为丝氨酸时将会影响酶与底物结合和稳定状态转换。此外, SHP-1 和 SHP-2 已经成为了肿瘤治疗中的重要靶基因, 研究人员致力于寻找除活性裂隙中心外的磷酸盐特异结合位点, 以利用该位点设计出结合能力高的抑制剂, 调节肿瘤组织内因异常表达 SHP-1 和 SHP-2 引发的平衡失调, 从而实现对肿瘤控制。由此可见, 对于蛋白酪氨酸磷酸酶催化活性域的特性研究是 SHP-1 和 SHP-2 的底物特异性和生物学功能, 进而控制肿瘤生长研究中至关重要的部分。本试验的顺利完成建立了由 IPTG 诱导表达, 利用 HPLC 技术分离纯化, 以获得 D1C 和 D2C 蛋白的试验技术路线, 为日后提供大量的纯化蛋白奠定了基础。

本试验使用孔雀绿定磷法对 D1C/D2C 进行了动力学分析, 结果表明纯化的 D1C/D2C 具有一定磷酸酶活性, 且 D1C 的磷酸酶活性要高于 D2C。此结果与 Sugimoto 等^[13]和 Zhao 等^[14]报道了通过体外表达纯化获得的 SHP-1/SHP-2 中, SHP-1 的磷酸酶活性要高于 SHP-2 的研究结果相符。同时, 与 Wayne Zhou 博士的前期工作中报道的在相同 pH 值和盐浓度条件下, D1C 的磷酸酶活性要高于 D2C 的研究结果相符^[10]。但是由于各种试验条件的差异, 如试验时的环境温度和湿度, 酶保存时间的长短和测定反应产物吸光度时所使用的波长长度等。本试验所测得的 D1C 和 D2C 磷酸酶活性, 均未能达到前期工作中的活力水平。

REFERENCES

- [1] Neel BG, Gu HH, Pao LL. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**(6): 284–293.
- [2] Streuli M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, **183**(8): 182–188.
- [3] Tonk NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7** (11): 833–846.
- [4] Neel BG, Tonk NK. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatase. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9** (2): 193–204.
- [5] Samuel W, Douglas JH. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*, 2004, **279** (2): 821–824.
- [6] Qu CK. Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cyto-kine-induced signaling and cellular response. *Biol Chim Biophys Acta*, 2002, **1592**(3): 297–301.
- [7] Yang ZY. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, **42**: 209–234.
- [8] Yang J, Liu LJ, Zhou GW, *et al.* Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem*, 2002, **277**(51): 50190–50197.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Jie Chen, Ying Qi, Zhou GW, *et al.* Kinetic comparison of the catalytic domains of SHP-1 and SHP-2. *J Cell Biochem*, 1999, **72**(1): 145–150.
- [11] Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD, Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**: 307–320.
- [12] Jia Z, Barford D, Tonks NK. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by PTP1B. *Science*, 1995, **268**: 1754–1758.
- [13] Sugimoto S, Lechleider RJ, Shoelson SE, *et al.* Expression, purification and characterization of SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 22771–22776.
- [14] Zhao Z, Shen SH, Fischer EH. Structure, regulation, and function of SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase. *Adv Prot phosphatase*, 1995, **6**(9): 301–321.