

INHIBITION OF THE ACTIVITY OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE MEMBRANE TPK BY IATPD

Zhang Guangyi Feng Zhimin Wei Yong Zhao Shenghao
Yu Liangli Wang Lichen

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

ABSTRACT

In this paper, TPK activity from human peripheral blood lymphocyte membrane was measured using synthetic PGAT as substrate. The kinase activity was more strongly inhibited by a synthetic compound, 1-isopropyl-6-amino-thieno (3,4-d) pyrimidine-2, 4-dione (IATPD); IC_{50} was about $300 \mu\text{mol/L}$. Lineweaver-Burk plots revealed that IATPD was competitively with ATP and noncompetitively with PGAT to inhibit the kinase activity.

Key words human peripheral blood lymphocyte membrane, TPK, IATPD, competitive inhibition, noncompetitive inhibition

SDS-蛋白复合物的性质及其液相色谱分离研究

徐 明 波 姚 志 建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

利用一些常用的蛋白质液相色谱的分离方法, 首次系统地研究了 SDS-蛋白复合物的性质及其液相色谱分离规律, 并对有关的原理进行了探讨。该项研究为膜蛋白及基因工程产生的包涵体蛋白的研究提供了重要的参数。

关键词 SDS-蛋白复合物, 液相色谱分离, 白介素-2

由于色谱技术的发展, 特别是高效液相色谱在蛋白质分离纯化中的应用日益广泛, 使得可溶性蛋白质的分离纯化变得易于进行, 即使很微量的可溶性蛋白质, 也可用特异性亲和层析的方法进行纯化。然而对于膜蛋白的纯化却一直没有系统的和有普遍适用性的分离纯化方法。近年来由于基因工程技术的发展, 使大量的真核蛋白在原核细胞中表达, 其产物通常以包涵体的形式存在, 类似于膜蛋白的存在方

式^[1]。对包涵体蛋白的纯化目前理论方面尚不成熟, 经常是根据经验法进行摸索, 本文以包涵体混合蛋白中的白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 为纯化的目标蛋白对包涵体蛋白进行分离研究。

纯化包涵体蛋白首先将它们溶解和变性, 溶解的方法包括高浓度尿素、盐酸胍、非离子性

去垢剂和离子性去垢剂如 SDS (十二烷基硫酸钠) 等。在这些溶解方法中, SDS 的溶解效率最高, 可将蛋白完全溶解并可直接用于电泳分析, 但 SDS 溶解的蛋白通常以 SDS-蛋白复合物的形式存在, 它们的结合方式已有研究报告^[2], 但蛋白与 SDS 结合后其理化性质的改变及其液相色谱行为目前尚无系统的研究报道。为了对膜蛋白及包涵体蛋白的研究提供一可行的纯化手段, 我们将一些蛋白质分离纯化的色谱方法应用于 SDS-蛋白复合物分离纯化, 对其可行性及原理进行了探讨, 并对分离条件进行了优化。

1. 材料和方法

1.1 材料

SDS 和二硫苏糖醇 (DTT) 为 Sigma 公司产品; 分离材料 DEAE-Sephrose 6B, CM-Sephrose 6B, Phenyl-Sephrose CL-4B 以及 Sephacryl S-200, CNBr 活化的 Sepharose 均购自 Pharmacia; 羟基磷灰石 (hydroxylapatite, HA) 为 Serva 产品; 反相 C18 柱为 Synchropak 产品; 高压液相色谱仪为 Waters 650 型。其它试剂未标明者均为北京化工厂产品。

1.2 方法

1.2.1 包涵体蛋白的回收及蛋白提取 发酵的高效表达 IL-2 的大肠杆菌液经 3500r/min 离心收菌, 用 50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.3 洗涤 3 次后, 用超声方法破菌, 12000r/min 离心 30min 回收沉淀, 沉淀用 4mol/L 尿素洗一次, 用含 2% SDS, 10mmol/L DTT 的 50mmol/L PB, pH6.8 裂解包涵体, 12000r/min 回收上清。

1.2.2 离子交换色谱 DEAE-Sephrose 6B 柱 (1.2cm × 20cm) 用 20mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L DTT, pH7.2 平衡; CM 柱 (1.2 × 20cm) 的平衡缓冲液为 20mmol/L 醋酸缓冲液, 含 1mmol/L DTT, pH5.5。蛋白样品上样前经相应缓冲液稀释至 SDS 浓度为 0.1%, 洗脱采用 0—1mol/L NaCl 梯度或 pH 梯度。

1.2.3 疏水作用色谱 Phenyl-Sephrose

CL-4B 柱 (1.0 × 20cm) 缓冲液为 20mmol/L PB, pH6.8, 用硫酸铵或氯化钠反梯度洗脱; 或用乙腈 10% (含 0.1% TFA) 平衡柱, 用含 0.1% SDS 的蛋白样液上样, 10—80% 乙腈梯度洗脱。

1.2.4 凝胶过滤色谱 Sephacryl S-200 柱 (1.5cm × 100cm) 平衡缓冲液为 50mmol/L PB, 1mmol/L DTT, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS, pH6.8。蛋白样品可直接上样。

1.2.5 羟基磷灰石吸附色谱 HA 柱 (1.0cm × 20cm) 平衡缓冲液为 20mmol/L PB, pH6.8 含 0.1% SDS。蛋白样品上样时稀释至 SDS 浓度为 0.1%。洗脱用 20—500mmol/L PB, pH6.8, 含 0.1% SDS 的缓冲液线性梯度洗脱。

1.2.6 亲和色谱 经 CNBr 活化的琼脂糖按厂商提供的偶联方法与抗 IL-2 中段的单克隆抗体偶联制成亲和柱 (0.8cm × 10cm)。经稀释的蛋白样液在 20mmol/L PB, 0.1% SDS, pH7.5 吸附, 用 pH3 的 NaH₂PO₄-柠檬酸 (0.1mol/L) 缓冲液洗脱。

1.2.7 反相色谱 Synchropak C18 反相柱 (0.5cm × 20cm) 经 10% 乙腈, 0.1% TFA 平衡, 蛋白样品为经凝胶过滤或羟基磷灰石吸附色谱后的 IL-2 粗品, 脱盐后可直接上样。洗脱采用 10—70% 乙腈梯度, 流速 1ml/min。

1.2.8 IL-2 活性及纯度鉴定 IL-2 活性用 MTT-CTL 方法^[3], 12.5% SDS-PAGE 鉴定纯度。

2 结果与讨论

2.1 离子交换色谱 SDS-蛋白复合物在阴离子交换柱上被全部吸附, 用增加盐浓度至 1mol/L 或降低缓冲液的 pH 至 5.5 仍不能使蛋白洗脱; 相反, 它们在 CM-Sephrose 6B 上无保留。我们曾用 MonoQ 柱在 FPLC 上分离得到类似的结果。结合在阴离子交换柱上的蛋白需用极端的条件下才能洗脱, 这样蛋白质的结构和生物活性全部被破坏。

阴离子性去垢剂 SDS 与蛋白相互作用后,

二者以一定的比例结合(一般为 1.4g SDS 与 1g 蛋白质结合)^[4], 因此使蛋白具有很强的负电性, 它能掩盖蛋白质本身所带电荷, 而使各种蛋白荷电相等。我们在 7.5% 聚丙烯酰胺的薄层等电聚焦上得出这一复杂的蛋白成分仅在阳极形成一条聚焦区带。由于 SDS-蛋白复合物的高负电性导致它与阴离子交换剂有很强的结合而与阳离子交换剂不结合, 因此, 离子交换色谱不适用于 SDS-蛋白复合物的分离纯化。

为了消除 SDS 对蛋白等电点的影响, 使 SDS 与蛋白质解离, 我们用高浓度尿素、NP40 (非离子性去垢剂) 或酸性乙腈来处理 SDS-蛋白复合物, 可使蛋白混合物在等电聚焦上显示多条区带, 并可用离子交换色谱进行分离, 但分离度及回收率很低。

2.2 疏水作用色谱 含 SDS 的蛋白提取液加高浓度的硫酸铵或氯化钠即出现凝胶状, 因此用高浓度盐的反梯度来进行 SDS-蛋白复合物的疏水色谱是不能成立的, 而低盐缓冲液中蛋白不被疏水介质结合。为了进一步探讨疏水色谱分离 SDS-蛋白复合物的可行性, 我们改用 0.1% TFA-乙腈系统, 图 1 为色谱图。峰 4 后半部分为 IL-2 洗脱峰(见图 5)。

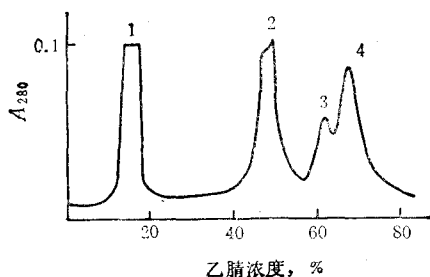


图 1 SDS-蛋白复合物的疏水色谱图
Fig. 1 Hydrophobic interaction chromatogram of SDS-protein complex

2.3 凝胶过滤色谱 图 2 是提取的包涵体蛋白经 Sephacryl S-200 后的色谱图, 经电泳证实, 第 3 峰为 IL-2 洗脱峰(见图 5)。在 SDS 存在时, 凝胶过滤色谱性能不会降低, 但蛋白质的洗脱体积 V 要提前(分子量为 17.5kD 的标准蛋白 kD 由 0.81 减少到 0.65), 其原因可能是 SDS 与蛋白质形成复合物后使蛋白的

分子量增大^[5]或是蛋白质空间构型变化的结果。

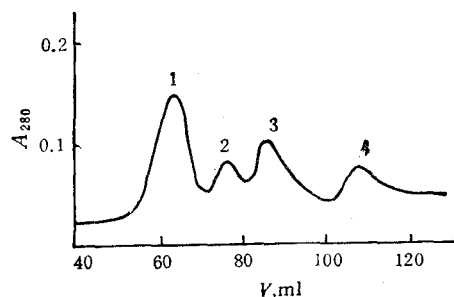


图 2 SDS-蛋白复合物的凝胶色谱图
Fig. 2 Gel permeation chromatogram of SDS-protein complex

2.4 羟基磷灰石吸附色谱 图 3 为蛋白提取液的羟基磷灰石色谱图。峰 4 主要是 IL-2 (见图 5), 其纯度提高 4 倍, 回收达 80% 以上。

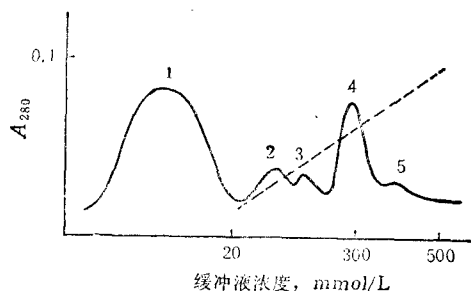


图 3 SDS-蛋白复合物的 HA 色谱图
Fig. 3 Hydroxyapatite chromatogram of SDS-protein complex
虚线示缓冲液浓度梯度
Dotted line indicates the gradient of ion strength

尽管 SDS-羟基磷灰石色谱早已被用于变性蛋白的分离^[6], 它的机理还不完全清楚。一般认为, 在不存在 SDS 时, 蛋白质上的酸性和碱性基团(主要是羧基和氨基)分别与 HA 颗粒上的不同部位结合, 通过增加盐浓度来洗脱酸性蛋白(磷酸钾或氯化钠)或碱性蛋白(氯化钾)。但在 SDS 存在时, 所有蛋白均带负电荷, 因而不能根据蛋白本身固有的电荷(pI)来分离, 此时带负电荷的蛋白与 HA 胶粒表面阳性基团的作用成了主要作用。有人^[7]研究了经

SDS 处理的多种蛋白质在 HA 柱上的保留,发现其保留时间与蛋白分子的疏水性和分子大小呈正相关。羟基磷灰石色谱的吸附能力大而不受样品体积的限制,因而较凝胶过滤色谱更为实用。

2.5 亲和色谱 经稀释的样品液确有部分能与抗体配基结合,但吸附量很有限(饱和量为 10mg 的亲合柱仅能吸附其饱和容量 5% 的蛋白),而且在 pH4 洗脱液中混有少量抗体配基的脱落(银染证实,结果未显示)。其原因可能是在 SDS 存在时抗体构象改变,不能与 IL-2 结合,或 SDS 破坏了抗体与填料 Sepharose 连结的化学键造成抗体脱落。为解决这一问题,曾有人^[8]改进了配基的偶联方法,以期提高亲和配基在 SDS 系统中的稳定性和亲和色谱在 SDS-蛋白复合物分离中的适用性。

2.6 反相 HPLC 图 4 为蛋白样品初步分离后的反相 HPLC 图谱。峰 4 经电泳证实为纯的 IL-2 (见图 5)。蛋白在经 HPLC 前需经复性处理(即用氯化铜或谷胱甘肽促使其形成高级结构)。

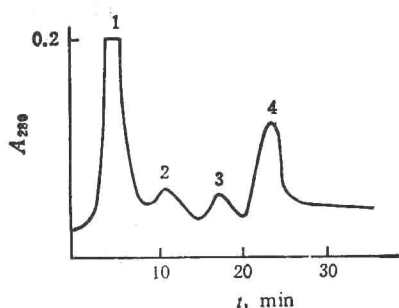


图 4 粗分后的 SDS-蛋白复合物的 RP-HPLC 图
Fig. 4 RP-HPLC of SDS-protein complex after initial purification

反相 HPLC 已被广泛用于多肽和小分子蛋白质的分离纯化,它与疏水作用色谱相同,都是根据多肽和蛋白质的疏水性的差别来进行分离,一般认为反相 HPLC 对组分的分辨率是相当高的。但我们观察到用含 0.1% SDS 的蛋白溶液上样,反相色谱的分辨率明显下降,而且蛋白质的回收率也低。部分纯化的含 IL-2 100 μ g 的蛋白样液经 RP-HPLC 分离可见 4 个明显

的色谱峰,其中峰 1, 峰 3 和峰 4 均有 IL-2 活性,经电泳证实也均含有 MW 为 15.5kD 的 IL-2。但大多数的 IL-2 出现于峰 1 (包括许多杂蛋白),峰 4 为电泳纯的 IL-2,其比活性也最高,但其回收率仅为 20%,很明显这种现象不能归结为超出柱容量。其可能的解释是在 SDS 存在时反相柱容量降低,原因是疏水性的 SDS 占据了 C18 的疏水区域;IL-2 在多个峰中出现的原因可能是 IL-2 的分子构象不均一,尤其是复性不完全,也可能是 IL-2 结合 SDS 的比例不同而造成分子本身疏水性大小的差异。直接证明 SDS 能与反相 HPLC 介质结合并在 80% 乙腈中洗脱最近已见报道^[9]。

为了克服反相 HPLC 分辨率低的缺陷,我们将反相流动相的修饰剂 TFA 改为低浓度磷酸缓冲系统,仍用原程序洗脱,它对 SDS-蛋白复合物的分辨率明显改善,其原因目前我们还不能解释。

图 5 为 SDS-蛋白复合物经色谱分离后的 12.5% SDS-PAGE 图谱。

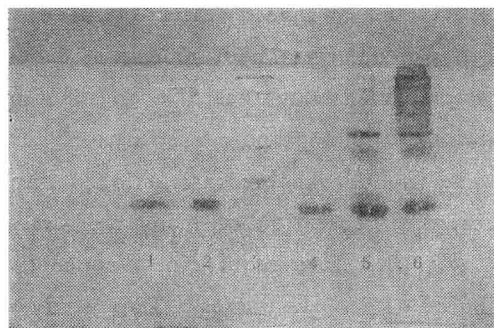


图 5 SDS-蛋白复合物经色谱分离后的电泳图谱
Fig. 5 SDS-PAGE of SDS-protein complex after chromatographic purification

1,2,4,5 分别为经疏水、凝胶、亲和和羟基磷灰石色谱后的蛋白;6 为原液;3 为标准 MW 蛋白,自上而下 MW 分别为 94,67,45,30,17.5kD.
lane 1,2,4,5 indicated IL-2 peak after hydrophobic, gel permeation, affinity and hydroxyapatite chromatographic purification; lane 6: total inclusion body proteins extracted in SDS; lane 3: low molecular weight markers (94,67,45,30 and 17.5kD from top)

根据以上实验结果,我们认为 SDS-蛋白复合物的分离用羟基磷灰石吸附色谱和凝胶过滤色谱效果最好,SDS 不干扰这两类色谱的过程,

而且对蛋白质的活性影响较小,二者比较,前者更为实用,但凝胶过滤色谱可作为去垢剂溶解包涵体蛋白效果的评价。SDS 的存在使反相色谱、疏水色谱和亲和色谱效能下降(柱的容量和蛋白回收率均明显降低),为了提高这三类色谱对膜蛋白和包涵体蛋白的分离效率,必须对柱型设计、固定相的种类和键合方法以及流动相的组成和洗脱模式进行改进,以满足膜蛋白及生物工程研究和发展的需要。

参 考 文 献

- 1 Marston F A O. In: Glover D M ed, *DNA cloning*. Oxford and Washington: IRL Press, 1985: 59
- 2 Rao P F *et al.* *Anal Biochem*, 1988; **174**: 251
- 3 Tada H *et al.* *J Immun Meth*, 1986; **93**: 157
- 4 Creighton T E. *Proteins: Structure and molecular principles*, New York: Freeman, 33
- 5 Mascher E. *J Chromatogr*, 1989; **476**: 147
- 6 Moss B *et al.* *J Biol Chem*, 1972; **247**: 5194
- 7 Horigome T *et al.* *Eur J Biochem*, 1989; **186**: 63
- 8 Scher M G *et al.* *Anal Biochem*, 1989; **177**: 168
- 9 Bosserhoff A *et al.* *J Chromatogr*, 1989; **473**: 71

THE STUDY OF SDS-PROTEIN COMPLEX PROPERTY AND ITS LIQUID CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

Xu Mingbo Yao Zhijian

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT

A systematic investigation of the property of the SDS-protein complex and the influence of the detergent sodium dodecyl sulphate (SDS) on protein purification is reported. The data demonstrate that SDS in the sample doesn't disturb gel permeation and hydroxyapatite chromatographic separation, but reduces the separation efficiency and protein recovery in hydrophobic interaction, affinity and reversed-phased chromatographic methods. A successful separation of many membrane and inclusion body proteins in genetic engineering will therefore require new concepts in column design as well as critical revision of the choice of mobile phases. This study provides important data on membrane and inclusion body proteins purification.

Key words SDS-protein complex, chromatography, protein purification, interleukin-2