

蛋白酪氨酸磷酸酯酶 4A2 基因的克隆、表达及活性鉴定

程 超¹, 郭爱林², 巫国勇¹, 吴伟康³, 罗红鹤¹, 钟佛添¹

(1. 中山大学附属第一医院胸外科, 广东 广州 510080; 2. 广东省人民医院医学研究中心, 广东 广州 510080; 3. 中山大学基础医学院病理生理教研室, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】获取人蛋白酪氨酸磷酸酯酶 4A2(PTP4A2) 基因并高效表达纯化, 对于产物的体外活性进行测定。【方法】用 RT-PCR 技术, 从肝癌细胞系 HepG2 的总 RNA 中, 获得编码 PTP4A2 基因功能片段的 DNA。测序后, 通过酶切亚克隆至表达载体 pGEX-4T-2, 构建重组表达载体, 并导入大肠杆菌 E.coli BL21 中, IPTG 诱导表达重组的 GST 融合蛋白。对重组融合蛋白过谷胱甘肽琼脂糖柱进行纯化, western 印记进行鉴定, 质谱检测蛋白分子量。通过其对底物磷酸多肽的去磷酸化反应, 鉴定其活性。【结果】获得编码肝癌细胞 PTP4A2(全长氨基酸) 的基因序列, 测序结果与已发表的基因序列相一致。重组 GST 融合蛋白经 western 分析, 在相对分子质量 Mr=45 000 处, 有特异的蛋白条带。重组蛋白经谷胱甘肽琼脂糖柱进行纯化后, 得到了高纯度的融合蛋白, 质谱检测其分子量为 45 470.6。底物多肽去磷酸化反应表明纯化产物具有较强活性。【结论】成功克隆人 PTP4A2 基因, 并在 E.coli BL21 中高效表达, 亲和层析后获得高纯度 GST 融合蛋白, 质谱检测分子量与预期结果一致, 纯化产物具有蛋白磷酸酯酶活性。

关键词: 蛋白酪氨酸磷酸酯酶; 基因克隆; 表达; 纯化; 质谱

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0137-05

Cloning, Expression, and Purification of Human Protein Tyrosine Phosphatase Type 4A2

CHENG Chao¹, GUO Ai-lin², WU Guo-yong¹, WU Wei-kang³, LUO Hong-he¹, ZHONG Fo-tian¹

(1. The Thoracic Department of The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, P.R.China;
2. Medical Research Center, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, P.R.China;
3. Department of Pathophysiology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, P.R.China)

Abstract: 【Objective】To obtain human protein tyrosine phosphatase type 4A2 (PTP4A2) gene expressed in E. coli and purify the target proteins. 【Methods】PTP4A2 genes were amplified by RT-PCR from total RNA of HepG2 human hepatoma cell line, then were inserted into pGEM-Teasy plasmid. After auto-sequencing, the target gene fragment was cloned into prokaryotic expression vector pGEX-2T in fusion form and transformed into E.coli BL21. Recombinant GST fusion proteins were expressed via the induction of IPTG and purified through glutathione agarose column. The molecular weight of fusion protein was detected by SELDI mass spectrometry. In vitro PTPase assays were used to determine the activity of fusion protein. 【Results】The sequence of cloned PTP4A2 gene was identical with those early reported. GST fusion protein was separated by SDS-PAGE, One protein band of Mr= 45 000 appeared on SDS-PAGE gel. The expressed fusion proteins were highly purified and its molecular weight was 45470.6 detected by mass spectrometry. 【Conclusions】The human PTP4A2 gene had been successfully cloned and efficiently expressed in E.coli, and the GST fused target protein had been highly purified with high activity in vitro.

Key words: protein tyrosine phosphatase; clone; express; purify; mass spectrometry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):137- 141]

酪氨酸蛋白磷酸酯酶对细胞生长、分化、代谢、细胞周期调节和细胞骨架等有重要的调节功

收稿日期: 2006-10-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30100218); 广东省科技厅资助项目(No.2004B30301010)

作者简介: 程 超(1974-), 浙江永康人, 主治医师, 肿瘤学博士, 主要从事胸部肿瘤的多学科治疗和分子生物学研究, E-mail: drchengchao@tm.com; 郭爱林, 通讯作者, E-mail: alinguo@163.com

能。它特异性地催化蛋白质酪氨酸残基上脱磷酸反应,调控细胞内蛋白质酪氨酸残基的磷酸化程度^[1]。酪氨酸蛋白磷酸酯酶除催化结构域外,还包括亚细胞定位结构域及底物识别和调控结构域^[2]。酪氨酸蛋白磷酸酯酶 4A2 (protein tyrosine Phosphatase type IVA2, PTP4A2),又名肝细胞再生磷酸酯酶 2 (phosphatase of regenerating liver 2, PRL-2),是一类新发现的小分子酪氨酸蛋白磷酸酯酶,包括 PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3。它们参与了细胞生长的调控^[3],增殖^[4],细胞的浸润和肿瘤的转移^[5]。PTP4A2 与肿瘤细胞的恶性转化密切相关,很有可能是一种癌基因^[6]。为了进一步研究 PTP4A2 的功能,制备相应抗体及寻找抗肿瘤药物,我们尝试克隆并表达 PTP4A2 基因,对于表达产物进行了纯化和活性鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

肝癌细胞系 HepG2 本教研室保存;寡聚核苷酸引物由上海生工公司合成;RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Gibco 公司;pGEX4T-2 质粒购自瑞典 Pharmacia 公司;pGEM T easy 载体、RT-PCR 试剂盒及 T vector 试剂盒、各种限制性内切酶、连接酶及 TaqDNA 聚合酶均为美国 Promega 公司产品;DNA 酶和高纯质粒提取试剂盒为德国 Qiagen 公司产品;IPTG, DTT, DTE, 胱胺、谷胱甘肽琼脂糖及还原性谷胱甘肽, 色谱级乙腈, 色谱级去离子水, 三氟乙酸, 芥子酸均为 Sigma 公司产品;去磷酸化底物多肽 R-R-L-I-E-D-A-E-pY-A-A-R-G, 美国 UBI 公司产品, 抗 GST 抗体及 western 试剂盒购自美国 NEB 公司, 蛋白 marker 购自珠海百奥生物技术有限公司。其余一般化学试剂均为国产分析纯。表面增强激光解吸电离质谱仪 (SELDI-TOF-MS) PBSI 及金质芯片, 美国 Ciphergen 公司制造。

1.2 RNA 的抽提

弃去培养瓶中的培养液, 流干。加入适量 Trizol 裂解细胞, 在冰上放置 5 min; 将裂解产物分装到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 再加入 200 μ L 的氯仿, 混匀, 冰上放置 5 min; 1 200 \times g 离心 15 min, 吸上清液于另一离心管中, 加入等体积的异丙醇, 冰上放置 15 min。1 200 \times g 离心 15 min, 沉

淀 RNA 去上清, 体积分数 70%乙醇洗涤沉淀, 室温风干, 加 DEPC 处理双蒸水溶解。10 g/L 琼脂糖凝胶检测质量, 随后用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度, 置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3 PTP4A2 基因的扩增

以提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR, 扩增 PTP4A2 全长的 cDNA 编码片段, 引物序列如下: 5 端引物: ggatccATGAACCGTCCAGCCC, 3 端引物: ctccgagCTACTGAAC ACAGCAATGCC。48 $^{\circ}$ C 50 min 反转录。首先于 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 然后 92 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 60 s 共循环 30 次; 最后 1 次循环完成后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.4 RT-PCR 产物的克隆与鉴定

回收 RT-PCR 产物, 与质粒 pGEM T Easy 进行连接反应, 转化感受态 DH5, 挑取白色菌落进行酶切鉴定, 所获阳性克隆命名为 pGEM PTP4A2, 送至上海生工公司进行测序。经 BamH I, Xho I 双酶切后与经同样酶切的 pGEX-4T-2 进行连接反应, 挑选的阳性克隆命名为 pGEX PTP4A2。

1.5 目的蛋白的诱导表达

工程菌在含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养基中过夜培养, 按 10% 的接种量进行转接, 250 r/min, 37 $^{\circ}$ C 摇菌至 A600=1.0, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续通气培养 4-5 h。取 1.5 mL 菌液, 10 000 \times g 离心 30 s 收集菌体, 菌体加入 H₂O 60 μ L, 剧烈振荡混匀, 再加入 4 \times 样品缓冲液 20 μ L, 100 $^{\circ}$ C, 5 min; 10 000 \times g 离心 5 min; 120 g/L SDS-PAGE 电泳检测, 预计相对分子质量 M_r=45 000 处有明显的蛋白表达。大规模培养细菌, 诱导表达目的蛋白, 收集菌体, 超声破菌。离心后将上清和沉淀分别制样, 进行 SDS-PAGE。可溶的目的蛋白直接应用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱进行亲和层析纯化以包涵体形式存在的表达产物。N-十二烷基肌氨酸钠将沉淀蛋白质变性过夜, 经缓慢透析去除 N-十二烷基肌氨酸钠, 令蛋白复性后, 用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析柱对目的蛋白进行亲和层析纯化。抗 GST 抗体及 western 试剂盒购自美国 NEB 公司。

1.6 表达产物的亲和层析

将 10 mL Glutathione Sepharose 4B 加入柱子中, 用 10 倍体积的 PBS 洗去保护液至柱体平衡, 柱

体平衡后,分别加入 15 mL 的表达液(调节流量为 0.15 mL/min 过柱,UV280 nm、UV215 nm 监测洗脱、吸附情况),使蛋白质充分吸附。PBS 洗涤层析柱至重新平衡,将 PBS 更换为超纯水洗柱至将目的蛋白洗出。

1.7 表达产物的 Western 印记鉴定

将 GST-PRL-2 融合蛋白、表达空载体纯化的 GST 蛋白变性后,经 150 g/L SDS-PAGE 分离蛋白质,并电转移至 PVDF 膜上。依次滴加兔抗 GST 抗体及 HRP 标记的羊抗兔抗体,最后以 ECL 试剂盒显影。

1.8 回收蛋白的 SELDI 质谱鉴定

将基质芥子酸溶解于色谱级水:乙腈=1:1 且含体积分数 0.5%三氟乙酸的溶液,制成饱和溶液。亲和层析回收的蛋白质 100 μ L 冷冻干燥后,溶解于 20 μ L 体积分数 0.1%三氟乙酸的色谱级水中。取 2 μ L 基质和 2 μ L 样品充分混合,加 2 μ L 混合液于芯片靶上,自然干燥后,推入离子源待测。仪器参数设置如下:激光强度 200,检测器灵敏度 10,质量聚焦 45 000,分子量检测范围 40 000~50 000,信号累加次数 40 次。

1.9 纯化产物的体外活性测定

采用磷酸酶消化法鉴定 GST-PTP4A2 蛋白的活性。将纯化的 GST 融合蛋白制成磷酸酶消化反应液(0.5 g/L 融合蛋白,25 mmol/L 咪唑盐酸,pH 7.0,1 ml/L 二巯基乙醇)。取 50 μ L 磷酸酶消化反应液,加入磷酸化底物多肽至终浓度 0.2 mmol/L,30 反应 60 min,加入 200 μ mol/L 钒酸钠终止反应。取 2 μ L 反应液 SELDI 质谱检测底物多肽去磷酸化情况。

2 结 果

2.1 PTP4A2 基因的扩增及序列测定

RT-PCR 扩增 PTP4A2 编码区的全长 cDNA 序列,得到 504 bp 的片段(图 1)。挑取含插入片段的阳性克隆 pGEM PTP4A2,用高纯质粒提取试剂盒提取质粒,测序结果表明所扩增的 PTP4A2 与 GeneBank 公布的序列相符。

2.2 表达载体的构建

pGEM PTP4A2 经 BamH I、Xho I 双酶切后与经同样酶切的 pGEX-4T-2 进行连接反应后,转化感受态细胞,挑选的克隆进行双酶切鉴定,10 g

L 琼脂糖电泳显示约 4 900 bp 大小片段的载体片断和约 500 bp 的目的基因(图 1)。阳性克隆命名为 pGEX PTP4A2。

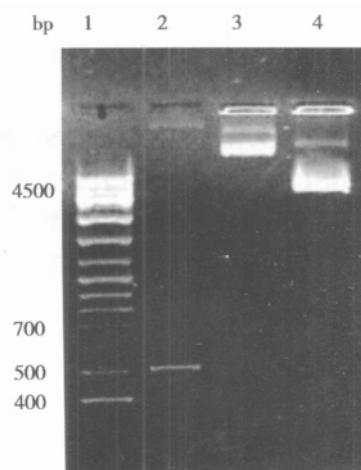


图 1 PTP4A2 基因 RT-PCR 及表达质粒双酶切鉴定图谱

Fig.1 RT-PCR amplification productions and restriction analysis of pGEX PTP4A2

1:DNAMarker; 2:RT-PCR productions; 3:undigestion of pGEX PTP4A2; 4:digestion of pGEX PTP4A2 with BamHI and Xho I

2.3 重组蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

将 pGEX PTP4A2 转化入 E.coli BL21, IPTG 诱导,SDS-PAGE 电泳表明工程菌表达了相应分子质量的谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathion S transferase,GST) 与 PTP4A2 的融合蛋白,即 GST-PTP4A2 (图 2)。对菌体总蛋白上清和沉淀蛋白分

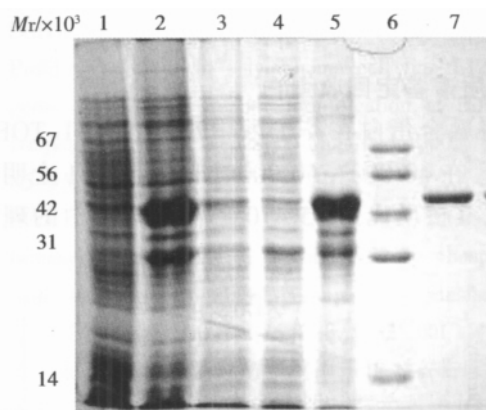


图 2 SDS-PAGE 测定 GST-PTP4A2 表达蛋白及纯化蛋白
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression and purified protein of GST fusion PTP4A2

1, 3 : the cell lysates of PTP4A2 before induction; 2 : the cell lysates of PTP4A2 after induced by IPTG; 4 :cytoplasm of BL21 containing pGEX-PTP4A2; 5 :inclusion body of pGEX-PTP4A2; 6 : marker ; 7 :purified protein of GST fusion PTP4A2

别进行电泳分析,发现 GST 融合蛋白主要位于不溶的包涵体中,对包涵体蛋白用 N-十二烷基肌氨酸钠变性处理过夜,经缓慢透析除去 N-十二烷基肌氨酸钠,蛋白复性后,经过谷胱甘肽琼脂糖亲和层析纯化,得到 Mr 45000 的目的蛋白(图 2)。

2.4 Western 印记鉴定表达蛋白

由于表达蛋白为融合蛋白,含 GST 蛋白序列,故可应用抗 GST 抗体检测蛋白表达。western blot 检测可见空载体组仅有 GST 表达条带,诱导前组隐约可见含 GST 蛋白表达,诱导后组可见融合蛋白和 GST 蛋白表达条带,纯化后组可见明显的融合蛋白表达条带和明显减弱的 GST 表达条带(图 3)。上述结果表明 GST-PRL-2 融合蛋白在大肠杆菌中得到成功表达,经亲和层析后获得纯度较高的融合蛋白。

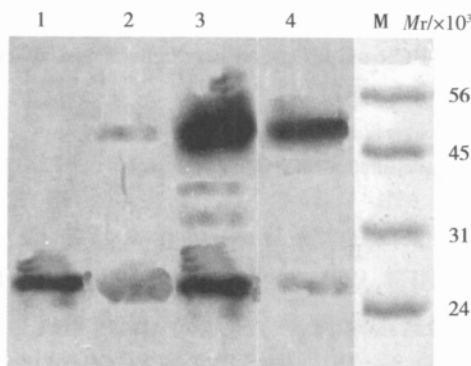


图 3 各组表达蛋白的 Western blot 检测

Fig 3 Western blot analysis of protein expression in each group

2.5 质谱鉴定回收蛋白

将融合蛋白在芥子酸中进行 SELDI-TOF-MS 分析,在 40 000 ~ 50 000 之间只出现 1 个明显的谱峰,其核质比为 45 470.6,与融合蛋白的理论分

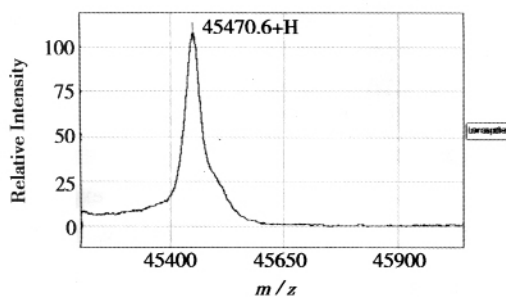


图 4 GST-PTP4A2 融合蛋白的 SELDI-TOF-MS 图

Fig.4 The SELDI-TOF-MS map of GST-PTP4A2 fusion protein

子量 45419.8 相当,表明该纯化蛋白即为 GST 与 PTP4A2 的融合蛋白(图 4)。

2.6 融合蛋白活性检测

去磷酸化底物多肽 R-R-L-I-E-D-A-E-pY-A-A-R-G 是酪氨酸蛋白磷酸酯酶的通用底物,其 Mr 为 1 599.8,当被酪氨酸蛋白磷酸酯酶水解后,失去磷酸基,Mr=1 519.7。将与 GST-PTP4A2 作用的反应液应用质谱检测,结果发现反应液中出现 Mr 为 1 599.8 和 1 519.7 的两个多肽峰,表明 GST-PTP4A2 在体外具有酪氨酸蛋白磷酸酯酶活性(图 5)。

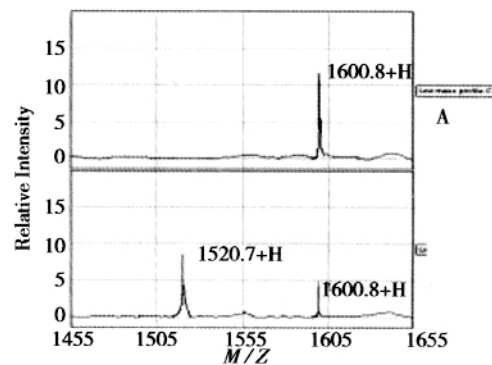


图 5 融合蛋白活性检测的质谱图

Fig.5 The SELDI-MS map of recombinant PTP4A2 activities in vitro

a. phosphotyrosine peptide in the absence of GST-PTP4A2; b. phosphotyrosine peptide in the presence of GST-PTP4A2

3 讨论

在过去的几年中,一类新的酪氨酸蛋白磷酸酯酶 PTP4A 被鉴定,它们包括三个成员:PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3。尽管 PTP4A 在活化位点具有酪氨酸蛋白磷酸酯酶的特征性基序: I/V (HCXAGXXR)ST, 它们的氨基酸序列与以前发现的酪氨酸蛋白磷酸酯酶明显不同。它们的分子量仅有 22 000 左右,在羧基端具有一个法尼基化的基序 CAAX。在体外它们均可被法尼基转移酶催化,在羧基端半胱氨酸残基上加上法尼基。在体内 PTP4A2 可以被异戊烯化^[4]。PTP4A2 与 PTP4A1 和 PTP4A3 氨基酸同源性分别为 87%和 75%。在正常组织中 PTP4A2 仅在骨骼肌中表达^[4],但是,其在肝癌,前列腺癌,肺癌和乳腺癌以及淋巴瘤中均有异常高表达^[7,8],其可以通过抑制细胞周期调控蛋

白 P21 的活性, 促进细胞增殖。目前发现 PTP4A2 的作用蛋白为 geranylgeranyltransferase (GGT), 通过调节 GGT 的磷酸化影响 GGT 的功能^[9]。对于 PTP4A2 的深入研究对于阐明细胞信号转导的调控以及开发新的抗肿瘤药物均具有重要意义。

我们成功地表达了 GST-PTP4A2 融合蛋白, 它位于包涵体中, 工程菌经超声破菌, 离心后用 N-十二烷基肌氨酸钠对包涵体蛋白变性。N-十二烷基肌氨酸钠是一种温和的阴离子去垢剂, 可溶解许多包涵体蛋白。当用透析或层析将它从蛋白质中去除时, 即可使蛋白质复性。N-十二烷基肌氨酸钠处理变性的 GST-PTP4A2 包涵体蛋白, 经缓慢透析降低 N-十二烷基肌氨酸钠浓度后, 蛋白得到很好的复性, 过谷胱甘肽琼脂糖亲和层析纯化后, 得到 45 000 的目的蛋白。实验证明该方法是一种有效地纯化包涵体蛋白的方法。

表面增强/基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (SELDI-TOF) 是近年发展起来的一种“软电离”质谱技术, 具有样品不易裂解、分子离子峰强、灵敏度高等特点。该技术整合了芯片和质谱技术, 将蛋白质样品的制备、生化反应和检测分析等过程集成在芯片上进行, 具有操作简单, 快速, 样品用量少等优点^[10]。我们应用该技术检测纯化后的融合蛋白, 仅用 1 h 时便获得了结果, 检测结果与理论计算结果仅仅相差不到 0.1%, 表明质谱技术是一种高精度的质量检测技术, 在生物检测中具有广阔的应用前景。

磷酸酯酶活性的检测始终是一个难题, 过去的检测方法主要通过检测游离磷酸根的方法检测其水解活性。该方法灵敏度和特异性较低, 很少有人使用。对于磷酸化蛋白的检测是质谱的一个重要应用领域。我们将质谱应用于磷酸酯酶活性的定性检测。去磷酸化的底物多肽由于失去一个磷酸根, 因此在相对分子量上比原先减小 80, 这种差别应用质谱很容易检测出来。同时我们采用咪唑盐酸缓冲液作为溶剂, 不加任何金属盐离子, 使之更适合于质谱检测。检测结果表明纯化的 GST-PTP4A2 蛋白在体外具有酪氨酸蛋白磷酸酯酶活性。质谱法检测磷酸酯酶活性具有快速准确的优

点, 目前正在尝试将之应用于酪氨酸蛋白磷酸酯酶活性的定量研究, 使之获得更广泛的应用。

参考文献:

- [1] OSTMAN A, HELLBERG C, BOBMER F D. Protein-tyrosine phosphatases and cancer[J]. *Rev Cancer*, 2006, 6(4):307-320.
- [2] ZHANG Z Y. Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches [J]. *Biochim Biophys Acta*. 2005,1754(1-2):100-107.
- [3] SALLEE J L, WITTCHEEN E S, BURRIDGE K. Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases: . *Cell-cell adhesion*[J]. *J Biol Chem*, 2006,281(24):16189-16192.
- [4] ZENG Q, HONG W, TAN Y H, et al. Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244(2): 421-427.
- [5] SAHA S, BARDELLI A, BUCKHAU P, et al. phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer[J]. *Science*, 2001, 294(5545):1343-1346.
- [6] ZENG Q, DONG J M, GUO K, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11):2716-2722.
- [7] SANTAGADA V, CALIENDO G, SEVERINO B, et al. Synthesis, pharmacological evaluation, and molecular modeling studies of novel peptidic CAAX analogues as farnesyl-protein-transferase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(6):1882-1890.
- [8] SCHWERING I, BRAUNINGER A, DISTLER V, et al. Profiling of Hodgkin s lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin s lymphoma-specific genes[J]. *Mol Med*, 2003, 9(3-4): 85-95.
- [9] SI X, ZENG Q, NG C H, et al. Interaction of farnesylated PRL-2, a protein-tyrosine phosphatase, with the beta-subunit of geranylgeranyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 32875-32882.
- [10] 赵 艇, 高春芳. 蛋白质指纹图谱技术在临床医学中的应用 [J]. *国外医学, 内科学分册*, 2006, 33(3): 122-126.

(编辑 徐 杰)