

蛋白酪氨酸磷酸酶 PTP1B 催化活性区的原核表达及活性分析

王生育¹, 颜江华¹, 潘阳霖³, 李学军², 陈忠³

1 厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005

2 厦门第一医院, 厦门 361001

3 厦门大学生物医学工程研究中心, 厦门 361005

摘要: 从 GenBank 获得人 PTP1B 催化活性区(PTP1Bc)氨基酸序列(1~301aa), 通过重叠 PCR 获得 PTP1Bc 基因。构建 pET-22b(+)/PTP1Bc 原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 阳性重组子 IPTG 诱导表达, Ni 柱纯化蛋白。目的蛋白以包涵体的形式表达, 表达量占菌体总蛋白 30%以上。纯化后, 蛋白纯度达 95%以上。Western blotting 结果表明所得的蛋白可与抗 PTP1B 抗体发生特异性结合; 酶活实验证实复性的蛋白具有一定的磷酸酶活性。PTP1Bc 基因的构建、表达纯化及活性分析, 为进一步的功能研究奠定了基础。

关键词: PTP1Bc, 基因表达, 蛋白纯化, 活性分析

Expression and Activity Analysis of Catalytic Domain of PTP1B

Shengyu Wang¹, Jianghua Yan¹, Yanglin Pan³, Xuejun Li², and Zhong Chen³

1 Cancer Research Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 The First Hospital of Xiamen, Xiamen 361001, China

3 Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: The amino acid sequence (1–301aa) coding the human PTP1B catalytic domain (PTP1Bc) was obtained from the GenBank. The PTP1Bc gene was constructed by overlapping PCR, then was inserted into vector pET-22b(+) and expressed efficiently in *E. coli* BL21(DE3) under optimum condition after IPTG induction. The proteins were expressed mainly as inclusion bodies with the yield of more than 30% of total bacterial proteins. The expressed products were purified through Ni²⁺-affinity chromatographic column. After purification, the purity of the proteins was more than 95%. Western blotting analysis suggested that the purified proteins could specially combine with anti-PTP1B antibody. Enzyme activity assay showed that the protein has phosphatase activities.

Keywords: PTP1Bc, expression, protein purification, activity analysis

全世界超过 1 亿人患有 II 型糖尿病, 它与肥胖型糖尿病。目前用于治疗 II 型糖尿病的药物, 常常是紧密相连的。大约四分之三的肥胖者都会引起 II 型糖尿病。导致体重增加并带来一些副作用, 因此目前急需寻

Received: June 13, 2007; **Accepted:** August 19, 2007

Supported by: the Key Project of Health and Science and Technology of Xiamen (No. 3502Z20051027), Project of Science Research Foundation of Ministry of Health & United Fujian Provincial Health and Education Project for Tackling the Key Research, PR China (No. Wkj2005-2-019).

Corresponding author: Jianghua Yan. Tel: +86-592-2180587; E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

厦门市重大疾病攻关研究基金(No. 3502Z20051027)和卫生部(福建省)卫生教育联合攻关项目(No. Wkj2005-2-019)资助。

找更安全有效的药物和治疗方法。胰岛素信号转导机理的阐明为治疗 II 型糖尿病提供的一些新的药物靶标,在这些之中,蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)是最有希望的新药物靶标。

Tonks 等^[1,2]第一次成功地从人胎盘纯化得到 PTP1B。PTP1B 由 435 个氨基酸组成,分子量约 50 kD,在肝脏、肌肉、脂肪等组织器官中大量表达^[3,4]。最近的研究发现在糖尿病、癌症中涉及 PTP1B 的信号转导途径^[5]。Zinker 等^[6]研究发现给予反义 PTP1B 寡核苷酸可以促进胰岛素的分泌,并能维持血浆葡萄糖水平的正常化。PTP1B 基因缺陷小鼠对胰岛素高度敏感,即使长期喂食富含脂肪的食物也对体重的增加具有抵抗性,提示 PTP1B 是胰岛素信号的逆向调节子。

Hao 等^[7]发现 T 细胞 PTP (TC-PTP) 33 kD 催化区比全长的 TC-PTP 的酶活力高了 20~100 u,提示了全长的人 PTPs 酶活低于催化活性区。本研究通过重叠 PCR 技术获得适合在原核系统中表达的 PTP1Bc 基因,并在大肠杆菌中获得高效表达的蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pET-22b(+)购自 Novagen 公司。引物由上海生工公司合成。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品。质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。Pfu DNA 聚合酶、DNA Marker、蛋白质分子量标准为 TaKaRa 产品。鼠抗 PTP1B 抗体为达科为生物技术有限公司产品。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体由厦门波生生物技术有限公司制备。Ni²⁺-HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为德国 E. Merk 产品。其他试剂为国产分析纯。大肠杆菌 BL21(DE3)菌株由本中心保存。

1.2 方法

1.2.1 PTP1Bc 基因构建

从 GenBank 上查得 PTP1Bc 的核苷酸序列,根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则,在不影响氨基酸序列的前提下,将 PTP1Bc 的核苷

酸序列进行部分修改。将修改后的全序列分成 16 个引物片段。在一个反应体系中,同时加入该 16 条引物,通过重叠 PCR 反应拼接成完整的 PTP1Bc。重叠 PCR 反应条件如下:95°C 4 min;95°C 30 s,65°C 2 h,72°C 10 min;第二轮 PCR 反应,以第一轮 PCR 扩增产物为模版,以 P17、P18 为引物扩增目的基因产物,并分别引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点,反应条件为:95°C 4 min;95°C 40 s,55°C 45 s,72°C 1 min,循环 35 次;72°C 延伸 10 min,产物进行 1.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定。引物设计如下(5'→3'):

P1: 5'-ATGGAGATGGAGAAAGAATTCGAACAGATCGACAAATCTGG-3'; P2: 5'-ACGGAAAGTCGC'TTCCCTCGTGACGGATGTCTTGATAGATCGCTGCCCAAGAACCAGATTTGTCGATCTGTTCGAATTCT-3'; P3: 5'-GAGGCAAGCGACTTTCCGTGTCTGTGGCGAAATTACCGAAGAACAAAACCGTAATCGCTACCGCGACGTTAGCCCATT-3'; P4: 5'-TAATCAGGCTTGC GTTGATATAATCATTGTCCTCTTGGTGCAGCTTAATACGAGAATGGTCAAATGGGCTAACGTCGCGG-3'; P5: 5'-CAATGATTATACAACGCAAGCCTGATTAAGATGGAAGAGGCACAACGTTCTTACATCCTGACCCAAGGTCCATTACCAA-3'; P6: 5'-ATGACAACACCACGGCTCTTTTGTCTCCAGACCATTCCCAGAAATGACCGCACGTA TTTGGTAATGGACCTTGGGTCAG-3'; P7: 5'-AAGAGCCGTGGTGTGTCATGCTGAATCGTGTCATGGAAAAGGGCTCTCTGAAATGCGCACAACTGGCCGCAAAAAG-3'; P8: 5'-TCCTCGCTAATTAA CGTCAGCTTCAGATTCGTGTCTCAAAAATCATCTCTTTTCTCTCTTTTTCGCGCCAGTATTGTGC-3'; P9: 5'-GAAGCTGACGTTAATTAGCGAGGACATTAAGAGCTACTACACCGTCCGCCAATTAGAGTTAGAAAACCTGACCACCCAGG-3'; P10: 5'-CCGGGACGCCAAAGTCTGGCCACGTCGTGTAGTGAAGTGCAGGATCTCACGGGTTTCTGGGTGGTCAGGTTTTCTAAC-3'; P11: 5'-AGACTTTGGCGTCCCGGAATCTCCAGCCTCTTTTCTGAATTTTCTGTTTAAAGGTGCGTGAGTCTGGTAGCCTGAGCCCGG-3'; P12: 5'-GCTAAGCAGAACGTGCCGCTACGCCAATGCCCGCAGAGCAATGGACGACGACTGGGCCGTGTTCCGGGCTCAGGCTACC-3'; P13: 5'-CGGCACGTTCTGCTTAGCAGATACGTGTTTACTGCTGATGGACAAGCGCAAAGACCCGTCTAGCGTTGACATCAAGAAGG-3'; P14: 5'-TAACTGATCCGCGCTCTGATTAACCCATACGAACTTGCGCATCTCTACAGAACCTTCTTGATGTCAACGCTAGACG-3'; P15: 5'-ATCCAGACGGCGGATCAGTTACGTTTCA GCTATCTGGCGGTGATTGAAGGCGCCAAGTTTAT

CATGGGTGACAGCAGCGT-3'; P16: 5'-CGGCTCT AAGTCTTCATGAGATAACTCTTCCATTGATCCT GAACGCTGCTGTCACCCAT-3'; P17: 5'-GACTGG ATCCCATGGAGATGGAGAAAG-3'; P18: 5'-CTGA CTCGAGCGGCTCTAAGTCTTCAT

1.2.2 PTP1Bc 表达载体的构建、表达及纯化

PCR 产物及 pET-22b(+)质粒分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 消化, 胶回收。在 T4 DNA 连接酶的催化下, 将 PTP1Bc 基因克隆至质粒 pET-22b(+) 中, 构建重组质粒 pET-22b(+)/PTP1Bc, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。重组子提取质粒进行酶切鉴定, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序。挑选测序正确的重组子单菌落, 37°C 振荡培养过夜, 按 1: 100 稀释到 LB 培养液中, 振荡培养至 A_{600} 值 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h。因为融合蛋白 C 末端带有 6-His 标签, 故采用 Ni 亲和层析柱纯化目的蛋白。具体方法参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供操作手册。纯化的蛋白采用梯度透析法复性。

1.2.3 重组蛋白 Western blotting 鉴定^[8]

将纯化的 PTP1Bc 蛋白进行 Western blotting 检测, 同时设空白对照。SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶封闭, 加鼠抗 PTP1B 抗体, 37°C 温育 1 h, 加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 温育 30 min, 用 3, 3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)显色。

1.2.4 PTP1Bc 活性测定^[9]

以 5 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠(pNPP)为反应底物, 在 0.01 mol/L NaAc-HAc pH5.0, 1 mmol/L EDTA 钠盐体系中, 加入不同量的 PTP1Bc 蛋白, 37°C 反应 10 min, 加 0.2 mol/L NaOH 终止反应, 用分光光度计测 A_{405} 。同时做含 PTP1B 抑制剂的对照实验, 即各反应体系中均加入终浓度为 1.2 μ mol/L 的活性的过氧钒配合物 $K[VO(O_2)_2(phen)] \cdot 3H_2O$ 。

2 结果

2.1 PTP1Bc 基因构建

以第一轮 PCR 反应的 PCR 产物为模板, 利用引物 P17 和 P18 扩增目的基因 PTP1Bc, PCR 产物经 1.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定为单一的条带, 其大小与理论值(923 bp, 包括酶切位点和保护碱基)相符(图 1)。

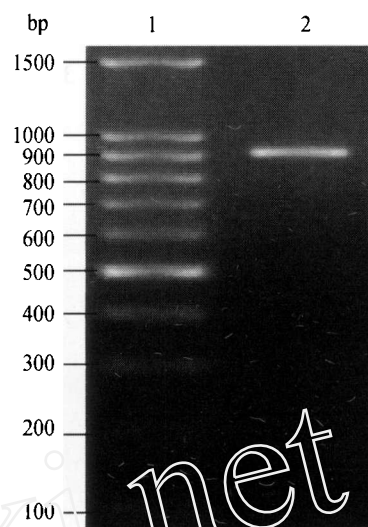


图 1 PCR 产物电泳图(1.7%琼脂糖)

Fig. 1 1.7% Agarose gel electrophoresis of PCR products
1: 100 bp DNA ladder marker; 2: PTP1Bc

2.2 重组质粒的构建

重组子质粒经 *Bam*H I 及 *Xho* I 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到目的条带分别为 PTP1Bc 条带(913 bp)、pET-22b(+)条带(5453 bp)(图 2)。测序结果表明载体构建正确。

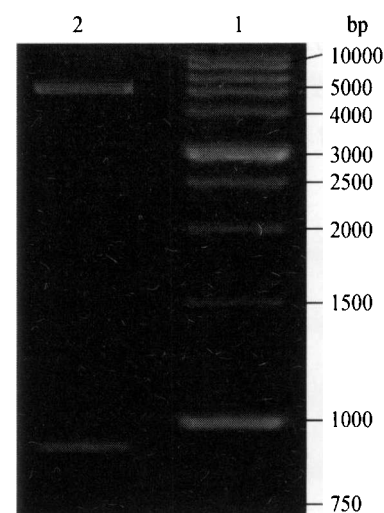


图 2 重组质粒 pET-22b(+)/PTP1Bc 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pET-22b(+)/PTP1Bc by digestion with different restriction enzymes
1: 1 kb DNA ladder marker; 2: plasmid fragment digested with *Bam*H I and *Xho* I

2.3 PTP1Bc 表达及纯化

通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度对重组菌进行诱导表达, 确定重组质粒最适表达条件为 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L、37°C 诱导 4 h。目的蛋白主要以包涵体形式存在, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。洗涤并溶解包涵体, 离心取上清过 Ni 柱纯化。

经 SDS-PAGE 分析在 40 kD 附近有一特异条带, 扫描分析显示其纯度达 95% 以上(图 3)。复性后的蛋白浓度为 0.2 mg/mL。

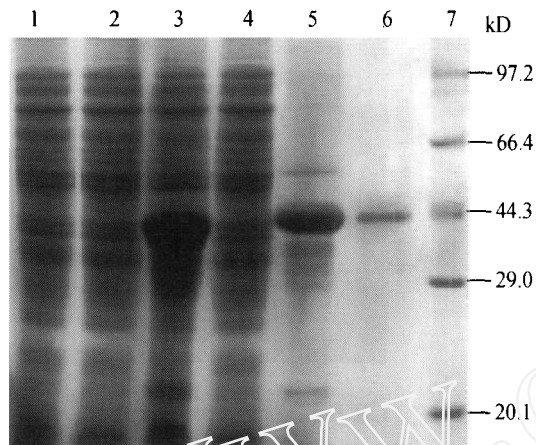


图 3 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein

1: pET-22b(+) control; 2: cell extract induced without IPTG; 3: cell extract induced with IPTG; 4: supernatant after fragmenting by ultrasonic; 5: precipitate after fragmenting by ultrasonic; 6: refold protein; 7: protein marker

2.4 特异性鉴定

Western blotting 分析的结果如图 4 所示, 在 40 kD 处有一条特异的显色带, 说明复性后的蛋白可以同抗 PTP1B 抗体发生特异性结合。结果证实, 在原核表达系统中成功表达了 PTP1Bc 蛋白。

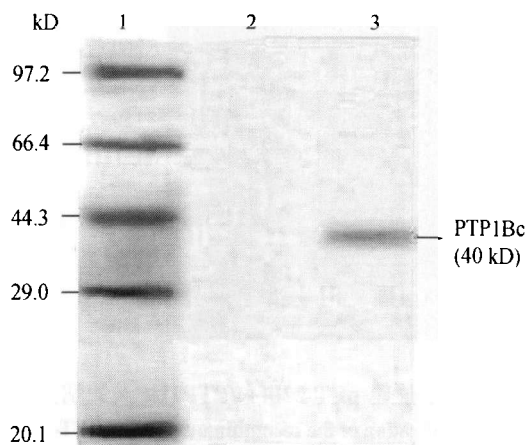


图 4 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of recombinant fusion protein

1: protein marker; 2: bacterial protein of pET-22b (+)/DE3 after induction; 3: PTP1Bc protein

2.5 酶活力测定

在酶活检测体系中, 随着 PTP1Bc 蛋白量的增加, A_{405} 值逐渐增大, 两者呈正相关。如图 5 所示, 在 100 μ L 的体系中, 当蛋白达到 10 μ g 时, 酶活达到饱

和, 符合酶活动力学特征, 而当加入 PTP1B 抑制剂 $K[VO(O_2)_2(phen)] \cdot 3H_2O$ 时, 其酶活性明显被抑制。这些结果表明, 纯化复性后的蛋白具有磷酸酶活性。

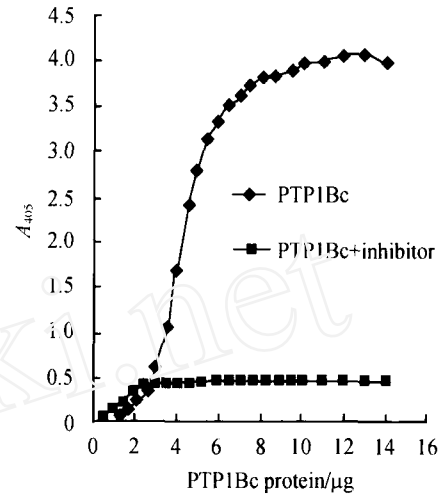


图 5 PTP1Bc 酶活分析

Fig. 5 Enzyme activity analysis of PTP1Bc protein

3 讨论

蛋白酪氨酸磷酸酶家族(PTPs)和蛋白酪氨酸激酶在细胞增殖、转化、黏附和迁移中相互协调作用, 并与肿瘤、心血管疾病、免疫失调传染病及代谢疾病等有关^[10]。PTPs 成为研究人类疾病的最重要的靶点之一^[11]。目前研制 PTP 抑制剂最有效的策略就是以 PTP 的活性部位为靶点。尽管研究发现 PTP 的催化结构域都具有高度保守的序列和非常相似的三维结构, 但并不意味着获得特异性抑制剂是不可能的。最近研究发现, 在 PTP1B 催化结构域活性中心的相邻部位存在一个“第二位点”, 其能结合芳基磷酸盐, 这又提供了一种有效的提高 PTP1B 抑制剂的亲和性及特异性靶标^[12]。大量的研究表明, PTP1B 的作用存在组织特异性, 在不相干的细胞类型之间, 存在着重叠或代偿的信号途径, 这有可能是 PTPs 家族其他成员在起作用。在 Src 激酶的研究中也观察到类似的现象, 尽管 Src 在多种细胞类型中普遍存在, Src 敲除小鼠却只表现出骨硬化症^[13]。因此, PTP1B 作为胰岛素信号主要的负调控因子, 其小分子抑制剂极有可能成为有效的抗糖尿病/肥胖剂, 而且不产生副作用。

本研究首次通过重叠 PCR 技术获得 PTP1Bc (氨基酸序列 1~301aa)。根据 GenBank 上查得 PTP1Bc 的核苷酸序列和氨基酸序列, 按照密码子的简并性

和大肠杆菌的密码子喜好性原则, 对核苷酸序列进行部分修改, 使其二级结构得到优化, 更有利于在大肠杆菌中表达。

PTP1Bc-6×His 融合蛋白主要以包涵体形式存在, 可有效防止细胞内蛋白酶对目的蛋白的水解作用, 使目的蛋白大量聚集, 经变性处理后便于分离纯化。目的蛋白在细菌中的表达量占菌体总蛋白的 30%, 经 Ni²⁺-树脂亲和层析纯化后, 表达蛋白的纯度达 95%。Western blotting 检测结果显示表达纯化产物可与鼠抗 PTP1B 抗体发生特异结合, 酶活实验说明 PTP1Bc 蛋白具有一定的磷酸酶活性。这些研究为进一步分析其功能和调节机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, 1988, **263**(14): 6722-6730.
- [2] Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Characterization of the major protein tyrosine phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, 1988, **263**(14): 6731-6737.
- [3] Tonks NK. PTP1B: from the sidelines to the front lines. *FEBS Lett*, 2003, **546**(1): 140-148.
- [4] Goldstein BJ. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disorders*, 2001, **1**(3): 265-275.
- [5] Dube N, Tremblay ML. Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1754**(1-2): 108-117.
- [6] Zinker BA, Rondinone CM, Trevillyan JM. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(17): 11357-11362.
- [7] Hao L, Tiganis T, Tonks NK, Charbonneau H. The noncatalytic C-terminal segment of the T-cell protein tyrosine phosphatase regulates activity via an intramolecular mechanism. *J Biol Chem*, 1997, **272**(46): 29322-29329.
- [8] Yan JH, Yang GW, Wang JP, Wu N, Zhuang GH. Gene expression and activities analysis of a new fusion protein (RGD)3/tTF. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(3): 409-412.
颜江华, 杨桂旺, 王阶平, 吴娜, 庄国洪. 一种新型融合蛋白(RGD)3/tTF 的基因表达与活性分析. *生物工程学报*, 2007, **23**(3): 409-412.
- [9] Zhou XW, Chen Z, Chen QX, Ye JL, Huang PQ, Wu QY. Inhibition effect of some bioactive peroxovanadium complexes on the tyrosine phosphatase. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2000, **32**(2): 133-138.
周兴旺, 陈忠, 陈清西, 叶剑良, 黄培强, 吴钦义. 活性过氧钒配合物对酪氨酸磷酸酶的抑制作用. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32**(2): 133-138.
- [10] Muja N, Lovas G, Romm E, Machleder D, Ranjan M, Vittorio Gallo, Lynn D. Hudson. Expression of a catalytically inactive transmembrane protein tyrosine phosphatase ϵ (tm-PTP ϵ) delays optic nerve myelination. *Glia*, 2004, **48**(4): 278-297.
- [11] Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, Tonks NK, Møller NP. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J*, 2004, **18**(1): 8-13.
- [12] Puius YA, Zhao Y, Sullivan M. Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(25): 13420-13425.
- [13] Enan E, Dunlap DY, Matsumura F. Use of c-Src and c-Fos knockout mice for the studies on the role of c-Src kinase signaling in the expression of toxicity of TCDD. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 1998, **12**(5): 263-374.

~~~~~

## 第 13 届国际生物技术大会暨展览会即将在大连举行

始于 1960 年, 每四年举办一届、各大洲轮流举办并首次登陆中国的第 13 届国际生物技术大会暨展览会(IFS-2008)将于 2008 年 10 月 13 日在大连举行。(IFS-2008)是生物技术领域公认的规模最大、学术水平最高、社会影响最强的国际盛会, 堪称是生物技术领域的奥林匹克大会。本次大会邀请生物技术领域取得突出成就而享誉全球的一百五十多位科学家做学术报告, 包括 3 位诺贝尔奖获得者, 数十位各国科学院和工程院院士及多位国际上著名的生物技术公司 CEO 和的研发部门 CTO 等。更多详情请登录: <http://cn.ibs2008.org/exhibition.html>。