

交叉酶切联合 MALDI-TOF/MS 分析重组 蛋白二硫键分布的方法建立*

徐祖敏¹, 程锐¹, 杨霞¹, 杨中汉¹, 刘少军²,
黎明涛², 蔡卫斌¹, 高国全¹

(1. 中山大学中山医学院生化教研室, 广东广州 510080;
2. 中山医学院蛋白质组学实验室, 广东广州 510080)

摘要: 以 Kringle 环为分子模型, 应用 MALDI-TOF/MS 联合特异性蛋白酶酶切技术, 探讨建立蛋白质二硫键分布和定位分析的研究方法。采用 pET22b (+) 原核表达体系诱导表达重组人纤溶酶原 K5 蛋白 (rhK5), 经 Ni²⁺ - NTA resin 亲和层析纯化, 并通过 SDS-PAGE 和 Western-blot 进行初步鉴定; 采用 MTT 法分析 rhK5 对微血管内皮细胞的抑制活性; 联合应用交叉酶切 (Trypsin Gold 单切或 Trypsin Gold 及 Endoproteinase ASP-N 双酶切) 和基质辅助激光解析 - 飞行时间质谱 (MALDI-TOF/MS) 分析 rhK5 的二硫键分布; 并应用生物信息学方法和圆二色谱法进一步验证 rhK5 二级结构。应用原核体系高效表达具有生物活性的 rhK5 蛋白, 经交叉酶切联合 MALDI-TOF/MS 证实 rhK5 中的 6 个半胱氨酸正确配对形成了 3 对二硫键 (Cys462: 541, Cys483: 524 和 Cys512: 536), 圆二色谱法测定发现 rhK5 为典型的 β 折叠型结构。上述研究结果为分析基因工程重组蛋白质中半胱氨酸配对及二硫键分布提供了方法学基础。

关键词: 基因工程; 重组蛋白; 蛋白质结构; 二硫键; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

中图分类号: Q3, Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2011) 05 - 0093 - 07

Unraveling Disulfide-bond Distribution of Recombinant Peptide by Orthogonal Protease Digestion and MALDI-TOF/MS

XU Zumin¹, CHENG Rui¹, YANG Xia¹, YANG Zhonghan¹, LIU Shaojun²,
LI Mingtao², CAI Weibin¹, GAO Guoquan¹

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Sun Yat-sen University,
Guangzhou 510080, China;

2. Proteomics Laboratory, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University,
Guangzhou 510080, China)

Abstract: In order to establish a method for analyzing the distribution and localization of disulfide in recombinant protein by specific protease digestion combined with MALDI-TOF/MS. The pET22b (+) prokaryotic system was harnessed to generate recombinant protein of human plasminogen kingle (rhK5) which was purified by Ni²⁺ - NTA resin affinity chromatography. SDS - PAGE and Western blot analysis were used to identify the recombinant protein. The disulfide bridging conformation and dimensional structure of rhK5 were predicted by 3D-JIGSAW Comparative Modeling Server (UK) and the disulfide bond distribution of rhK5 was confirmed by orthogonal enzymatic digestion and MALDI-TOF/MS. The second-

* 收稿日期: 2010 - 12 - 07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700120, 30973449, 81070746); “新药创制”科技重大专项基金资助项目 (2009ZX09103 - 642); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (3161001); 广东省自然科学基金资助项目 (10151008901000007)

作者简介: 徐祖敏 (1982 年生), 男, 助理研究员; 通讯作者: 蔡卫斌; E-mail: caiwb@mail.sysu.edu.cn

ry structure of rhK5 was analyzed by circular dichroism. Enzymatic digestion and MALDI-TOF/MS analysis demonstrated the presence of disulfide bridges among Cys462-Cys541, Cys483-Cys524 and Cys512-Cys536 in rhK5. Circular dichroism showed that rhK5 adopted the shape characteristic of a β -sheet. Our studies provide methodological basis for analyzing the pairing and distribution of disulfide bond of genetic engineering recombinant proteins.

Key words: genetic engineering; recombinant protein; protein structure; disulfide bond; matrix-assisted laser desorption-time of flight/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)

二硫键是肽链内或肽链间两个半胱氨酸的巯基氧化而成的共价键, 主要参与维持蛋白质分子的自然构象、保持及调节蛋白质的生物活性与稳定性^[1]。目前常用的蛋白质二硫键定位方法主要包括 X 射线衍射晶体结构解析法、多维核磁共振波谱法 (NMR)、对角线法、二硫键异构及突变分析法和酶解法等。X 射线晶体衍射法是确定蛋白质构象最准确的方法, 但依赖于纯蛋白高度有序结晶的形成。NMR 的特点是在近似自然生理条件的溶液状态下测出较小蛋白质的构象。上述两种方法进行二硫键研究时的缺点在于: 要求样品量比较大, 一些柔性的蛋白质不易得到所需的晶体, 并且结构复杂、相对分子质量较大的蛋白的计算处理和解谱非常复杂。而对角线法、二硫键异构及突变分析法和酶解法等, 则存在操作繁琐, 分析复杂等缺点, 应用受到限制^[2]。随着质谱仪器在分辨率、灵敏度、准确度和检测速度等方面的发展和提高, 质谱法更加适合于蛋白质和多肽结构与功能的研究, 并应用于二硫键的定位分析。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF/MS) 是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱, 具有灵敏度高、准确度高、分辨率高且简单高效的特点, 为生命科学、医学等领域提供了强有力的分析测试手段。MALDI-TOF/MS 是依据样品的质荷比 (m/z) 的不同来进行检测, 并测得样品分子的相对分子质量。相对分子质量正确与否往往代表着所测定的有机化合物及生物大分子的结构正确与否。MALDI-TOF/MS 测定蛋白质相对分子质量准确度高达 0.1% ~ 0.01%, 远远高于目前常规应用的 SDS-PAGE 电泳与高效凝胶色谱技术。理论上, MALDI-TOF/MS 技术如能准确测定出非还原状态二硫键连接肽段和还原状态肽段的相对分子质量, 进行肽段相对分子质量匹配分析, 应能确定蛋白质中二硫键的分布信息。

本研究以 Kringle 环作为分子模型, 以 MALDI-

TOF/MS 联合特异性蛋白酶酶切为技术手段, 探讨建立蛋白质二硫键分布和定位分析的研究方法。Kringle 环是存在于多种蛋白质分子内的结构模体, 如纤溶酶原激活因子、凝血酶原、纤溶酶原、载脂蛋白 a 及肝细胞生长因子等^[3]。Kringle 环由 80 个氨基酸残基组成, 包含 6 个半胱氨酸, 并按照 1-6, 2-4, 3-5 的方式形成 3 个二硫键, 从而维持独特的联环状 Kringle 结构。研究者采用原核表达系统表达出含单个 Kringle 环的重组人纤溶酶原 K5 多肽 (rhK5)^[4-5], 并分析该多肽的血管内皮细胞抑制活性^[6-7], 为明确重组 K5 多肽中二硫键的形成以及 6 个 Cys 能否正确配对连接, 进一步采用了高度特异性的质谱分析级胰蛋白酶 (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade) 和蛋白内切酶 Asp-N (Endoproteinase Asp-N) 交叉酶切的方式, 获取重组 K5 多肽理论上包含单个二硫键的特定肽段, 并用 MALDI-TOF/MS 分别测定和配对酶切片段相对分子质量和还原后片段的相对分子质量, 判断酶切片段中是否存在二硫键。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

pET22b (+) 质粒、*E. coli* BL21 (DE3) 表达菌株和 Ni²⁺ His Bind Resin 为 Novagen 公司产品; *EcoR* I、*Hind* III 购自 Takara 公司; IPTG 为鼎国公司产品; His-tag 鼠源性单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自 Vector 公司; 质谱分析级 Trypsin Gold 购自 Promega 公司; Endoproteinase Asp-N 购自 Roche Diagnostic 公司; 三羟甲基氨基甲烷、盐酸、醋酸、磷酸三氯乙酯等为广州化学试剂厂分析纯; 乙腈、三氟醋酸、 α -氰-4-羟基肉桂酸等为 Sigma 公司产品; ZipTip 微量固相萃取吸嘴购自 Millipore 公司; 凝胶成像系统为 GENE GENIUS 公司产品, 真空冻干机为 Virtis 公司产品, MALDI-TOF/MS 质谱仪为 Amersham Biosciences 公司产品, JASCO-J-810 圆二色谱仪为日本分光公司产品。

1.2 rhK5 的表达纯化

以 K5 全长 cDNA 为模板用 PCR 的方法扩增人纤溶酶原 Kringle 5 基因, 在 *EcoR* I、*Hind* III 处将其克隆进表达载体 pET22b (+) 中, DNA 测序鉴定其连接正确; pET22b (+) /K5 转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中。IPTG 25 °C 诱导蛋白表达 12h, 表达产物经固化 Ni²⁺ His Bind Resin 亲和层析纯化, 所得重组蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western-blot 方法分析鉴定, I 抗为抗 His-tag 鼠源性单克隆抗体, II 抗为辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgG。

1.3 rhK5 蛋白对视网膜微血管内皮细胞的抑制活性

人视网膜微血管内皮细胞培养及鉴定参照本研究组前期研究报道^[9], 活体眼组织来源于中山大学中山眼科中心。取对数生长期的细胞以 1×10^5 /mL 接种到 24 孔培养板, 培养至约 80% 细胞融合度时用 rhK5 处理, 各组终浓度分别为 5、10、20、40、80 nmol/L, 阴性对照组为等量无血清培养液, 继续培养 72 h 后终止处理。细胞的增殖状态采用噻唑兰颜色反应法 (MTT 法) 检测^[9]。每组设 4 个复孔, 相同实验重复 3 次, 计算细胞增殖抑制率 ($\% = 100 - \text{OD 处理组} / \text{OD 阴性对照组} \times 100\%$), 作为判断 rhK 是否对内皮细胞增殖具有抑制活性的指标。

1.4 rhK5 一级结构与二硫键分布的生物信息学分析

野生型人纤溶酶原 K5 的氨基酸序列从数据库 <http://genome.ucsc.edu/> 中查找 pET22b (+) /BL21 (DE3) 原核系统表达的 rhK5 蛋白 N-末端包含信号肽残余氨基酸序列, C-端会保留载体的部分序列及 6 × His 标签。rhK5 一级结构正确与否主要通过相对分子质量分析来验证: 采用蛋白序列分析软件包 ANTHEPROT 4.3 (Institute of Biology and Chemistry of Proteins, France) 依据推测氨基酸序列计算其理论相对分子质量; 采用 MALDI-TOF/MS 精确测定其实际相对分子质量。根据实际相对分子质量和理论相对分子质量之间的差异判断重组蛋白推测氨基酸序列是否正确 (MALDI-TOF 的准确度极高, 一般认为蛋白质的理论相对分子质量 MALDI-TOF-MS 测定值之间差异不超过 0.1% ~ 0.01%)。

采用 3D-JIGSAW 蛋白质结构数据库 (Cancer Research UK London Research Institute, UK, <http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>) 对 rhK5 二硫键分布进行生物信息学分析。3D-JIGSAW 是以已知结构域的类比为基准预测蛋白质三级结构的服

务器, 特别适合于序列长度适中、序列复杂程度不高且没有四级结构的蛋白质三级结构的预测。rhK5 预测结果用 RasTop 软件分析, 获得其三级结构示意图和二硫键的空间位置分布, 初步分析 rhK5 二硫键和 Kringle 结构域的形成情况。

1.5 rhK5 的单酶切和交叉酶切

单酶切: 将纯化的 rhK5 蛋白用真空冻干机制成蛋白冻干粉, 后用 500 μL 酶切缓冲液 (50 mM Tris-Cl, 1 mmol/L CaCl₂, pH 7.6) 溶解, Bradford 法测定蛋白质浓度, 取 100 μL 蛋白溶液, 加入一定量 Trypsin Gold (质量比 1:50), 37 °C 水浴 16 h。交叉酶切: 在 Trypsin Gold 单酶切后的混合物中加入一定量的 Endoproteinase Asp-N (质量比 1:20), 37 °C 水浴 8 h。单酶切或双酶切完成后, 将酶切后的混合物分成两等分, 一份备用, 另一份加入约 3 μL 磷酸三氯乙酯, 60 °C 水浴约 10 min。将此混合溶液 (包括非还原状态和还原状态的蛋白质) 经真空冷冻干燥制成蛋白冻干粉, 并经 ZipTip pipette 脱盐浓缩后, 与基质 (α-氰-4-羟基肉桂酸) 1:1 均匀混合, 混合物直接用于 MALDI-TOF/MS 分析。

1.6 rhK5 空间结构的圆二色谱分析

取上述亲和层析方法纯化的 rhK5 蛋白用 25 mmol/L 硼酸溶液 (pH 7.4) 透析 8 h 后, 于 JASCO-J-810 圆二色谱仪在 25 °C 恒温下测量其 CD 谱 (185 ~ 260 nm), 重复测量 3 次, 取平均值进行统计。用 25 mmol/L 硼酸溶液 (pH 7.4) 作为空白对照, 偏振值扫描时蛋白的质量浓度为 0.5 mg/mL。

2 结果

2.1 rhK5 的表达纯化及初步鉴定

IPTG 25 °C 低温诱导 BL21 (DE3) /pET22b (+) /K5 重组菌表达, 细菌裂解物经 SDS-PAGE 电泳分离并用考马斯亮兰染色分析显示 (图 1a): IPTG 诱导后细菌裂解产物在 13 000 处有明显蛋白表达。将上述蛋白提取液与 Ni²⁺ - His Bind Resin 在 4 °C 搅拌混合后, 通过亲和层析纯化含有 6 个 His-tag 的重组蛋白, 可获得高纯度可溶性蛋白 rhK5。用凝胶成像系统对凝胶进行灰度扫描, 结果显示纯化后重组蛋白纯度可达 95%。重组蛋白用抗 His-tag 抗体进行蛋白质免疫印迹分析, 显示有明显的免疫杂交带 (图 1b)。

2.2 rhK5 抑制人视网膜微血管内皮细胞增殖

图 2 结果显示, 与对照组 (rhK5 浓度为

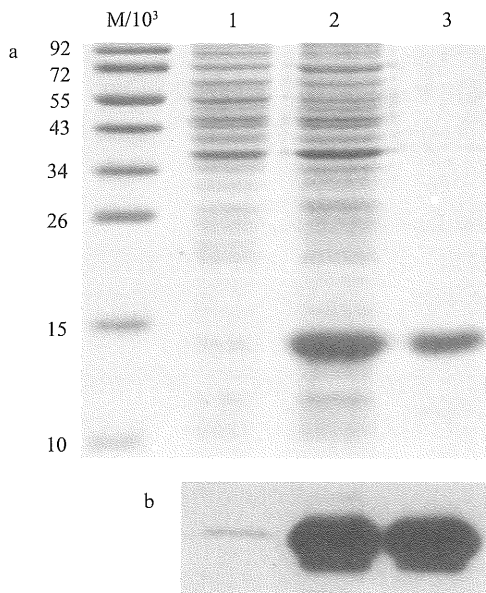


图 1 重组人纤溶酶原 kringle 5 蛋白的表达、纯化及鉴定
Fig. 1 Expression and purification of K5 recombinant protein, and identified by SDS-PAGE (upper panel) and Western Blot (lower panel)

M: protein marker; 1: crude cell extract before IPTG induction; 2: crude extract after IPTG induction; 3: Affinity-purified K5.

0 nmol/L, 即未加 rhK5 组) 相比, rhK5 能明显抑制人视网膜微血管内皮细胞增殖, 在浓度为 20 nmol/L 时即有抑制作用 ($P < 0.05$), 当浓度达 40 nmol/L 时, 差异具有显著意义 ($P < 0.01$)。这种对人视网膜微血管内皮细胞增殖的抑制作用随着 rhK5 浓度的增大而增加, 存在明显的浓度依赖关系。

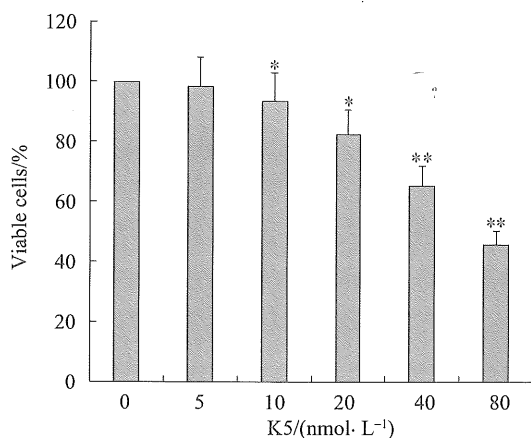


图 2 重组人纤溶酶原 kringle 5 蛋白抑制人视网膜微血管内皮细胞的增殖

Fig. 2 Inhibitive effect of K5 on the proliferation of endothelial cells

Values represent the mean of three determinations (\pm SD.) as percentages of control ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control)

2.3 rhK5 一级结构验证

根据 pET22b (+) 载体结构特点和目的基因插入位点分析, rhK5 蛋白的 N-末端包含信号肽残余氨基酸序列 (NH₂-MDIGINSDPNS-COOH), C-端会保留载体的部分序列及 6 × His 标签 (NH₂-KIAAALEHHHHHH-COOH)。推测 rhK5 一级结构 (氨基酸序列) 如图 3A 所示, 并依据此序列采用蛋白序列分析软件包 ANTHEPROT 4.3 计算出 rhK5 蛋白相对分子质量分别为 12 834.08。SDS-PAGE 电泳图谱显示 (图 1), 与蛋白质标准相比, 区带位置与理论计算值一致。进一步采用 MALDI-TOF/MS 精确测定 rhK5 蛋白相对分子质量分别为 12 826.70 (见图 3B)。SDS-PAGE 和 MALDI-TOF/MS 相对分子质量分析数据证实预测的 K5 及其突变体重组蛋白质一级结构 (氨基酸序列) 是正确的。

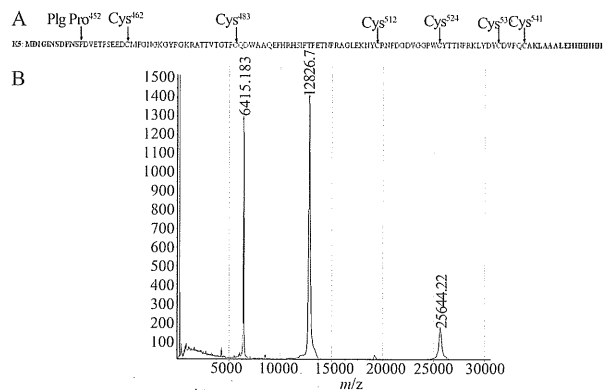


图 3 重组人纤溶酶原 kringle 5 蛋白的氨基酸序列示意图及其相对分子质量测定

Fig. 3 The primary sequence of rhK5 (A) and its molecular weight determined by MALDI-TOF mass spectrometry (B) The amino acids of rhK5 were numbered and arranged in numerical order as them in human plasminogen

2.4 rhK5 空间结构的生物信息学分析

登录 3D-JIGSAW 蛋白质结构数据库 <http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw> 将 rhK5 氨基酸序列输入后, 进行氨基酸序列分析和蛋白质空间结构预测, 应用 RasTop Version 2.1 软件获得目标蛋白的三级结构示意图并标示二硫键。分析结果显示 (图 4): 采用原核表达体系获得的 rhK5 蛋白能进行正确空间折叠, 蛋白分子中的半胱氨酸能进行正确配对连接形成 3 个二硫键, 分别为 Cys^{462:541}, Cys^{483:524} 和 Cys^{512:536}, 这与野生型 K5 完整 Kringle 结构域形成方式一致。

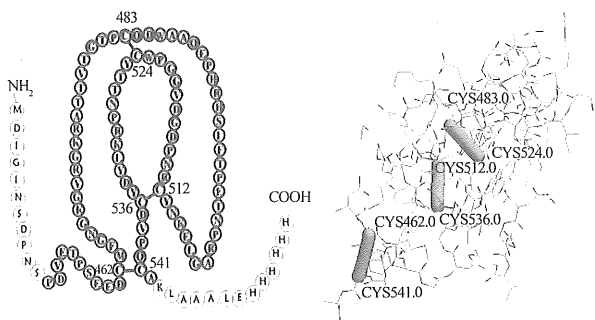


图 4 重组人纤溶酶原 kringle 5 蛋白一级结构及空间结构示意图

Fig. 4 Primary structure model (left panel) and tertiary structure model (right panel) of rhK5. The tertiary structure was predicted by 3D-JIGSAW. Three disulfide bonds (yellow cylinder) linked by Cys^{462,541}, Cys^{483,524} and Cys^{512,536} were shown in the tertiary structure model

2.5 交叉酶切联合 MALDI-TOF/MS 分析 rhK5 蛋白二硫键分布及 Kringle 结构完整性

在利用生物信息学的方法初步论证 rhK5 蛋白空间结构的基础上, 采用交叉蛋白酶切联合 MALDI-TOF/MS 进一步分析二硫键定位与分布。研究

中所用 Trypsin Gold 特异性切割位点在 Lys (K) 和 Arg (R) 的羧基侧, 内蛋白酶 - ASP-N 特异性切割位点在 X (氨基酸残基) - D (Asp) 的氨基侧。

如表 1 所示, rhK5 蛋白经 Trypsin Gold 消化后, 理论上可以得到包含二硫键 Cys⁴⁸³:524 的预期相对分子质量为 3 916.20 (用 ANTHEPROT 4.3 推算) 的肽段, 用 MALDI-TOF/MS 分析 rhK5 Trypsin Gold 消化产物, 证实存在精确相对分子质量为 3 916.773 多肽, 即为目标肽段 (图 5 A1); 采用 TCEP 充分还原 rhK5 Trypsin Gold 消化产物后, MALDI-TOF/MS 图谱显示相对分子质量为 3 916.773 的肽段消失, 仅见相对分子质量 2 069.662 及 1 848.488 的两个片段 (图 5 A2), 由此说明在 rhK5 蛋白的 Cys⁴⁸³ 与 Cys⁵²⁴ 间存在一个二硫键。

rhK5 蛋白经 Trypsin Gold 和内蛋白酶 - ASP-N 联合酶切产物在非还原状态和还原状态下的 MALDI-TOF/MS 图谱以类似的方法证实了另外两个二硫键 Cys^{462,541} 和 Cys^{512,536} 的正确形成 (图 5 B1 和 B2), 从而说明 K5 蛋白空间结构正确和 Kringle 结构完整。

表 1 重组人纤溶酶原 kringle5 经 Trypsin 和/或 endoproteinase Asp-N 后的蛋白片段

Table 1 Fragments of interest after rhK5 digested by Trypsin only or followed Endoproteinase Asp-N

Enzymatic digestion	NON - REDUCED		REDUCED	
	FRAGMENTs	MW	FRAGMENTS	MW
Trypsin	ATTVTGTPCys483QDWAAQEPHR	3916.2	ATTVTGTPCys483QDWAAQEPHR	2069.2
	NPDGDVGGPWCys524YTTNPR		NPDGDVGGPWCys524YTTNPR	1848.9
Trypsin	ATTVTGTPCys483Q	2441.7	ATTVTGTPCys483Q	978.1
	DVGGPWCys524YTTNPR		DVGGPWCys524YTTNPR	1465.6
Trypsin + Asp-N	Dcys462MFGNGK	1628.9	Dcys462MFGNGK	871.0759.9
	DVPQCys541AK		DVPQCys541AK	
Asp-N	NYCys512R	952.1	NYCys512R	554.6399.5
	DYCys536		DYCys536	

The molecular weights of the peptide fragment were calculated according to their amino acid sequence with the software of ANTHEPROT 4.3

2.6 rhK5 空间结构的圆二色谱分析

纯化的 rhK5 蛋白, 在 JASCO-J-810 圆二色谱仪上经 185 ~ 260 nm 远紫外线扫描显示, 在约 230 nm 附件出现一个最大负峰, 为典型的 β 折叠型结构 (如图 4 所示)。

3 讨论

根据重组体构建的原理和人纤溶酶原的氨基酸序列, 本研究首先分析了 rhK5 氨基酸序列, 并进

一步比较通过蛋白序列分析软件包 ANTHEPROT 4.3 获得的理论相对分子质量和通过 MALDI-TOF/MS 精确测定实际相对分子质量之间的一致性, 从而证明重组蛋白一级结构的正确和符合实验设计; 在一级结构氨基酸序列基础上采用生物信息学的方法 (3D-JIGSAW 蛋白质结构数据库) 预测了重组蛋白质的结构特征, 预测的结果显示了目标蛋白的空间结构符合实验预期。

生物信息学分析能初步说明 rhK5 蛋白中 Cys 的

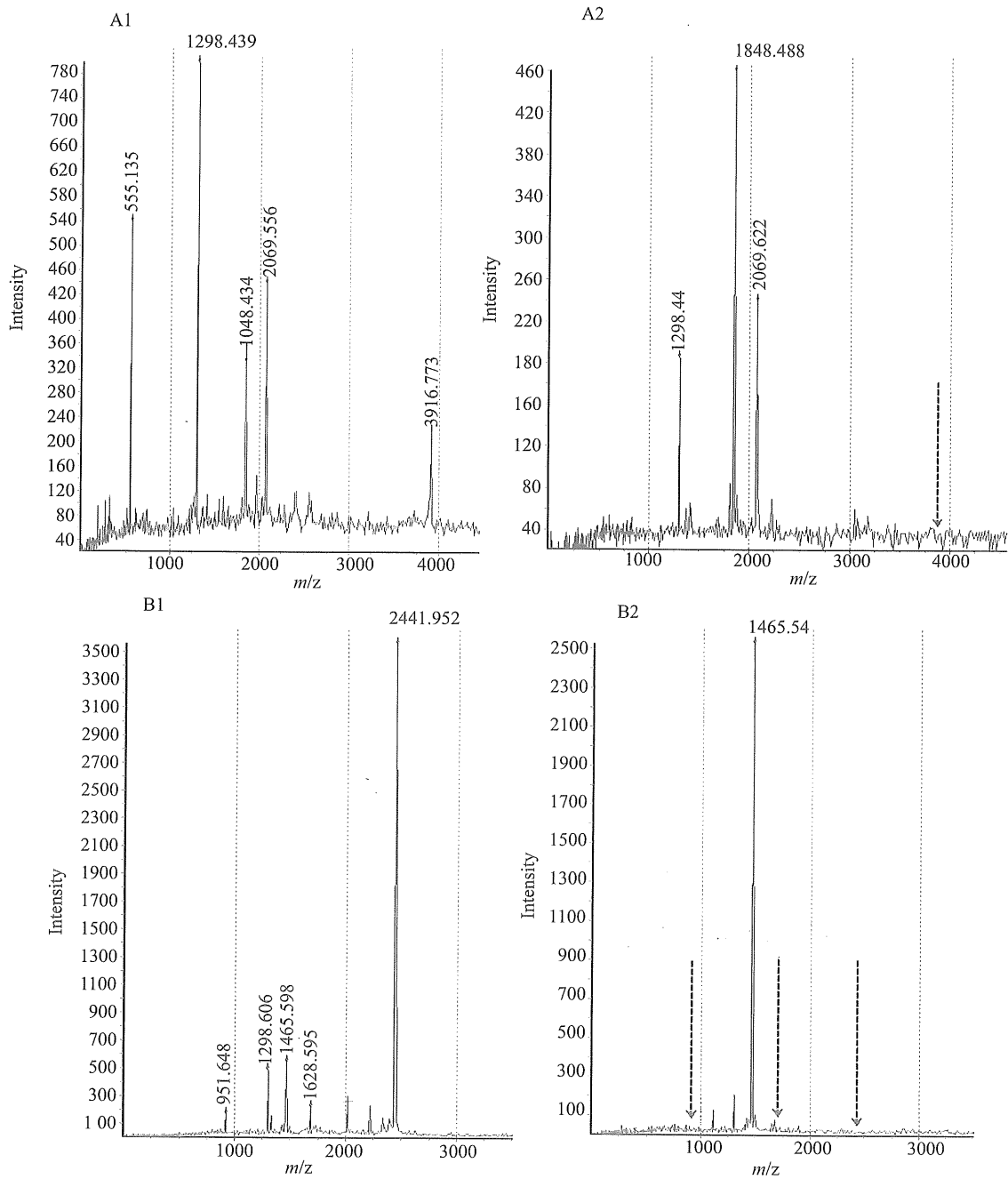


图 5 基质辅助激光解析-飞行时间质谱法分析重组人纤溶酶原 kringle 5 的二硫键分布

Fig. 5 Mass spectrum of the fragment from rhK5 by MALDI-TOF/MS

A1 and A2: The expected peptide fragment of interest generated for hK5His protein digested with trypsin alone, the disulfide bond of Cys^{483:524} confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry under non-reduction (A1) and reduction (A2); B1 and B2: The expected peptide fragment of interest generated for hK5His protein digested with trypsin followed by Asp-N endopeptidase, the disulfide bond of Cys^{462:541} and Cys^{512:536} confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry under non-reduction (B1) and reduction (B2)

正确配对和 Kringle 结构完整与否。更有说服力的证据需要客观的实验结果。本研究采用交叉蛋白酶切联合 MALDI-TOF/MS 法对基因工程重组蛋白二硫键的定位和形成进行客观分析。应用 Trypsin Gold 单独酶切或 Trypsin Gold 与 Endoproteinase Asp-N 交叉酶切的方式, 消化 rhK5 蛋白产生的目的片

段及其对应的相对分子质量如表 1 所示。完整的 rhK5 或酶切后的 rhK5, 经 MALDI-TOF/MS 分析得到质谱图。如图 3 所示, 完整 rhK5 的相对分子质量为 12 826.70, 这与预测的 rhK5 相对分子质量 12 834.08 相符 (误差 < 0.1%)。经单酶切的 rhK5, 在非还原状态下可见 3 916.7 峰 (图 5: A1), 在

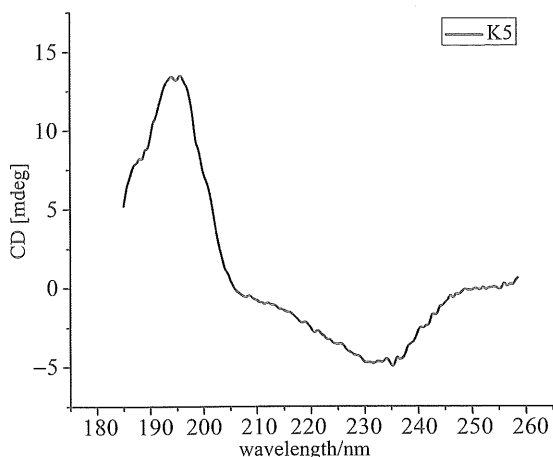


图 6 圆二色谱法分析重组人纤溶酶原 kringle 5 的二级结构特征

Fig. 6 Secondary structure analysis of purified rhK5 protein by circular dichroism

The far UV spectra show that rhK5 have characteristic β -sheet spectrum with a single broad peak around 230 nm

还原状态下该峰消失, 而出现 2069.6 和 1848.4 这两个峰 (图 5. A2), 由此可证明 Cys483-Cys524 的存在。经双酶切的 rhK5, 在非还原状态下可见 2441, 1628 和 951 这三个峰 (图 5. B1), 而在还原状态下这三个峰皆消失 (图 5. B2), 由此可证明 K5 中的六个半胱氨酸按 Cys483-Cys524, Cys462-Cys541 及 Cys512-Cys536 的连接方式形成了 3 个二硫键。圆二色谱分析其二级结构, 发现 rhK5 的二级结构为 β 折叠, 其结果与前期对 Kringle 结构域研究的结果一致^[8-10], 提示其正确地折叠形成了的空间结构。文中对 rhK5 蛋白进行生物活性的研究表明 rhK5 正确地折叠形成了具有生物活性的空间构象。

相对分子质量是有机化合物最基本的理化性质参数, 相对分子质量正确与否往往代表着所测定的有机化合物及生物大分子的结构正确与否。本研究方法的主要理论依据在于 MALDI-TOF/MS 法能够精确的测定蛋白质的相对分子质量, 准确度高达 0.1% ~ 0.01%, 在这种精确度下, 蛋白质与相对分子质量之间存在一一对应关系, 在研究中我们也能很容易地根据相对分子质量判断对应的肽段, 以及根据相对分子质量的变化分析肽段的变化^[11-12]。交叉蛋白酶切联合 MALDI-TOF/MS 法相对其他生物结构分析方法的优点在于: 方法简单、实验周期短, 省时、成本低、实验结果直观, 易于分析、数据具有说服力。

综上所述, 本研究采用交叉蛋白酶切联合

MALDI-TOF/MS 法证实了 rhK5 分子中各 Cys 均是正确配对连接的。本实验证实了关于 rhK5 重组蛋白一级结构分析、氨基酸序列推测、相对分子质量预算和空间结构的预测都是正确的; 同时, 它还说明在原核表达体系获得的 rhK5 蛋白形成了完整的 Kringle 结构域。这为进一步深入地研究 Kringle 结构与 rhK5 的功能关系奠定了方法学基础。同时, 本研究从新的角度、采用新的技术手段建立分析蛋白质分子中二硫键的位置和分布的研究方法, 具有准确、简单、高效易操作等特点。

参考文献:

- [1] WEDEMEYER W J, WELKER E, NARAYAN M, et al. Disulfide bonds and protein folding [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(15):4207-4216.
- [2] 仇晓燕, 崔劲, 刘志强, 等. 蛋白质中二硫键的定位及其质谱分析[J]. *化学进展*, 2008, 20(6): 975-983.
- [3] JI W R, CASTELLINO F J, CHANG Y, et al. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis [J]. *FASEB J*, 1998, 12(15):1731-1738.
- [4] GAO G, LI Y, GEE S, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11):9492-9497.
- [5] 李朝阳, 温南, 杨中汉, 等. 人纤溶酶原 K5 突变体在大肠杆菌中的优化表达[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2008, 29(2):221-225.
- [6] YANG X, CHENG R, LI C, et al. Kringle 5 of human plasminogen suppresses hepatocellular carcinoma growth both in grafted and xenografted mice by anti-angiogenic activity [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(4):399-405.
- [7] CAI W, MA J, LI C, et al. Enhanced anti-angiogenic effect of a deletion mutant of plasminogen kringle 5 on neovascularization [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 96(6):1254-1261.
- [8] COX M, SCHALLER J, BOELENS R, et al. Kringle solution structures via NMR: two-dimensional 1H-NMR analysis of horse plasminogen kringle 4 [J]. *Chem Phys Lipids*, 1994, 67-68:43-58.
- [9] ULTSCH M, LOKKER N A, GODOWSKI P J, et al. Crystal structure of the NK1 fragment of human hepatocyte growth factor at 2.0 Å resolution [J]. *Structure*, 1998, 6(11):1383-1393.
- [10] MADEREGGER B, BERMEJIL W, HRZENJAK A, et al. Solution structure of human apolipoprotein(a) kringle IV type 6 [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(2):660-668.
- [11] KELLER B O, LI L. Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(1):88-93.
- [12] 伍小云, 张嘉杰, 吴曙光. VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂的三维定量构效关系研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2010, 49(1):57-61.