

# 大炎肽在胰腺中相互作用蛋白的纯化鉴定

赵燕英<sup>1,2</sup> 陈正望<sup>1</sup> 陆 婕<sup>1</sup>

1. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041

**摘要** 为研究大炎肽影响胰腺  $\beta$  细胞的机制, 将大炎肽偶联到 CNBr 活化的 Sepharose 4B 亲和层析介质上, 利用亲和纯化的方法垂钓其在胰腺组织中的相互作用蛋白, 并对纯化蛋白进行胰蛋白酶水解, 测定水解片段的分子质量和其中 2 个片段的氨基酸序列, 在 MASCOT 数据库中检索, 鉴定此蛋白为胱硫醚  $\beta$ -合成酶, 结果提示大炎肽可能通过结合胱硫醚  $\beta$ -合成酶, 调节其活性, 造成同型半胱氨酸积累。

**关键词** 大炎肽; 胱硫醚  $\beta$ -合成酶; 结合蛋白; 同型半胱氨酸; 胰腺; 胰蛋白酶; 肽指纹图谱

**中图分类号** Q 513 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0568-04

在研究胃肠多肽激素对胰腺细胞分泌胰岛素的影响时, 笔者所在课题组鉴定出一个巨噬细胞因子, 命名为大炎肽<sup>[1-2]</sup>, 研究表明大炎肽是巨噬细胞激活过程中的一个免疫调节器<sup>[3]</sup>; 大炎肽对于巨噬细胞的存活和前炎症 (pro-inflammatory) 活力至关重要<sup>[4]</sup>; 而抑制大炎肽的表达可减弱动脉粥样硬化刺激的巨噬细胞的迁移、增生和信号转导<sup>[5]</sup>。我们前期的研究显示大炎肽参与了自身免疫性 1 型糖尿病的发生发展, 并可伤及胰腺  $\beta$  细胞。为了进一步研究大炎肽影响胰腺  $\beta$  细胞的机制, 本研究从胰腺组织中垂钓其相互作用蛋白并进行纯化、鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

10 周龄 Balb/c 小鼠购自湖北省实验动物中心, CNBr 活化的 Sepharose 4B 介质购自 Pharmacia 公司, HEPES、蛋白酶抑制剂混合物及其他蛋白提取试剂均购自 Sigma 公司, 丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、SDS、过硫酸胺、TEMED、溴酚兰、考马斯亮兰、 $\beta$ -巯基乙醇均购自 Bio-Rad 公司, NC 膜购自 Millipore 公司, 高速冷冻离心机购自日本日立公司, 蛋白层析仪购自 Pharmacia 公司。

### 1.2 配体偶联

配制 5 mg/mL 大炎肽溶于偶联缓冲液 (pH 8.3、0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液含 0.5 mol/L

NaCl) 中; 1 mmol/L 的 HCl 溶胀 CNBr 活化的 Sepharose 4B。将含大炎肽的偶联溶液和溶胀的介质混合 120 min; pH 8.0、1 mol/L 乙醇胺封闭未结合介质, 装柱。用 pH 4.5、0.1 mol/L 乙酸钠、0.5 mol/L NaCl 和偶联缓冲液交替洗涤偶联介质 3 次, 备用。

### 1.3 胰腺膜蛋白准备

麻醉处死 Balb/c 小鼠后, 取胰腺, 在冰浴上剪碎, 加含有蛋白酶混合物的预冷提取液 (pH 7.6、50 mmol/L HEPES, 含 1 mmol/L DTT) 匀浆, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 4 °C、20 000 r/min 离心 60 min, 取沉淀膜碎片。用含 1% 的 Triton X-100 的提取液溶解膜碎片, 4 °C、20 000 r/min 离心 60 min, 取上清, 即为膜蛋白溶液, 用不含 Triton X-100 的 HEPES 缓冲液稀释 4 倍后上柱。

### 1.4 膜结合蛋白的结合、洗脱、收集及透析

将制备的膜蛋白溶液上柱。以含 0.1% 的 Triton X-100 的提取液洗脱, 吸收峰回到基线后, 以含 1 mol/L NaCl 的提取液洗脱; 吸收值回到基线后, 改为 pH 5.0、50 mmol/L 的乙酸钠缓冲液洗脱。将洗脱组分透析, 冷冻干燥。

### 1.5 膜结合蛋白的鉴定

将冻干组分溶于电泳上样缓冲液中, SDS-PAGE 电泳, 12% 分离胶分离结合蛋白, 将考马斯亮蓝染色后条带挖出, 送至军事医学科学院分析测试

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划(2002AA214061)和国家自然科学基金项目(30370647, 30470823)

赵燕英, 博士, 研究方向: 蛋白质生物化学. E-mail: biozyy@163.com

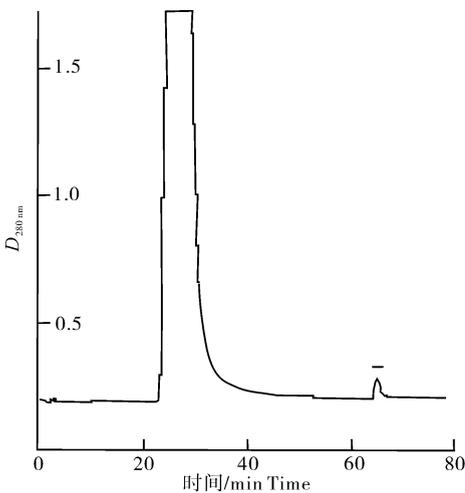
通讯作者: 陆 婕, 博士, 讲师, 研究方向: 生物活性肽. E-mail: lujie.jane@163.com

中心进行 SDS-PAGE 电泳,并用胰蛋白酶水解蛋白胶条,水解后高效液相色谱分离水解片段, MALDI-TOF-MS(matrix assisted laser desorption ionization/time of flight MS,基质辅助激光解析电离化/飞行时间质谱)鉴定各片段的分子质量,并根据肽指纹图谱在 www.matrixscience.com 的 Mascot 中搜索检测结果。如果未找到匹配蛋白,则测定其中 1~2 个水解片段氨基酸序列,再次根据片段序列检索。

## 2 结果与分析

### 2.1 配体偶联、膜蛋白准备及结合蛋白纯化

在弱碱性缓冲液中,将大炎肽通过氨基偶联到 CNBr 活化的 Sepharose 4B 载体上,由于偶联过程中大炎肽离开溶液主体达到介质表面,而蛋白质在 280 nm 处有最大光吸收值,通过测定偶联前后的介质或者偶联溶液在 280 nm 处的光密度变化,判定配体大炎肽的连接情况。将胰腺组织匀浆,破碎细胞。通过梯度离心,依次去除不溶性杂质、细胞器,获得膜碎片。利用表面活性剂 Triton X-100,溶解膜蛋白,制备膜蛋白溶液。将膜蛋白溶液与偶联在亲和介质上的配体大炎肽充分结合,依次以含高浓度盐溶液和改变酸碱度的缓冲液洗脱结合在亲和介质上的膜蛋白,洗脱结果如图 1 所示,当用提取缓冲液充分洗涤杂蛋白后(洗脱峰回到基线),选用含 1 mol/L NaCl 的提取液继续洗脱,此时出现图中横



图中第 1 个峰代表提取缓冲液洗脱峰,选取后面横杠所示洗脱峰进行鉴定 The peak indicated by a bar was selected for identification.

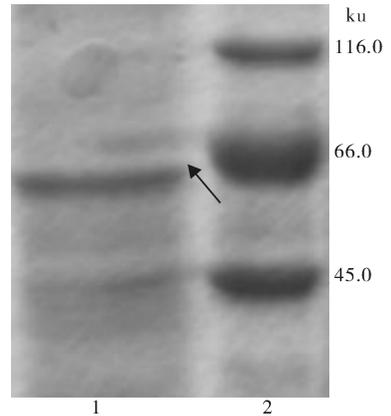
图 1 胰腺膜蛋白亲和层析图谱

Fig. 1 The bind protein of daintain in pancreas purified by affinity chromatography

线标注洗脱峰,最后改为 pH 5.0、50 mmol/L 的乙酸钠缓冲液洗脱,未发现明显洗脱峰。选取含 1 mol/L NaCl 的提取液洗脱峰进行后续检测。

### 2.2 SDS-PAGE 鉴定纯化蛋白分子质量

图 2 显示了采用 12% 分离胶的 SDS-PAGE 电泳胰腺亲和层析组分洗脱峰的电泳图谱,从电泳结果可以看出洗脱组分分子质量为 66.0 ku 左右。



1:洗脱蛋白条带,箭头所示条带为目的条带,选取目的条带进行胶内酶切鉴定 The target band, selected for trypsin digestion; 2:蛋白标准 Protein standard.

图 2 亲和层析洗脱组分电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE for the eluted protein in affinity chromatograph

### 2.3 肽指纹图谱及序列测定

经 SDS-PAGE 分离后,从 PAGE 胶上切下已染色的蛋白条带,脱色,然后利用胰蛋白酶水解蛋白条带,高效液相色谱技术分离水解片段, MALDI-TOF-MS 鉴定各片段分子质量。在 www.matrixscience.com 的 Mascot 中用 peptide mass fingerprint 进行搜索。此蛋白的肽指纹图谱见图 3,通过获取的肽指纹图谱在 Mascot 中检索,未得到相关蛋白信息;选取其中 2 个片段进行氨基酸序列测定,测定结果分别为 SPKILPDILK 和 SNDEEAFAR,再次利用多肽片段氨基酸序列检索,结果显示此蛋白为胱硫醚  $\beta$  合成酶 (cyathionine-beta-synthase, CBS)。

## 3 讨论

本研究将已知配体大炎肽偶联到常用介质 CN-Br 活化的 Sepharose 4B 制备亲和层析介质,通过测定偶联前后的介质或者偶联溶液在 280 nm 处的光密度变化,判定配体大炎肽的连接情况;并利用梯度离心的方法依次除去细胞碎片、细胞核,获得膜碎

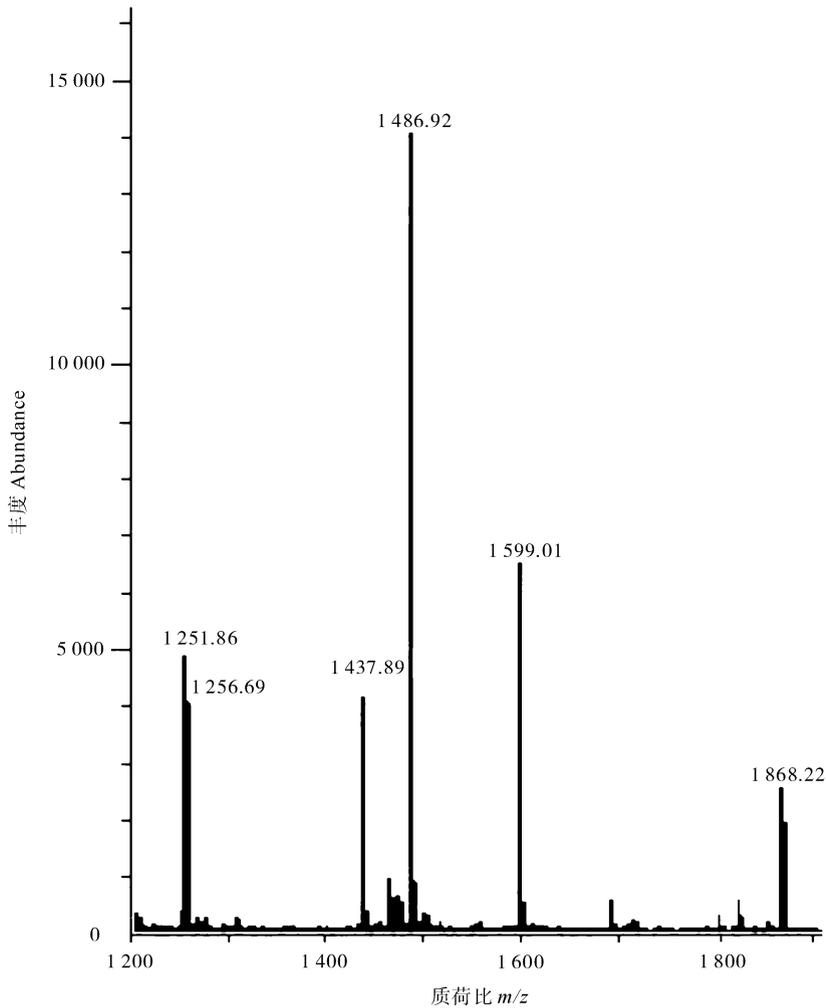


图 3 洗脱蛋白条带胰酶水解肽指纹图谱

Fig. 3 Peptide mass fingerprint of the eluted protein digested by trypsin

片,以表面活性剂溶解膜碎片,亲和层析技术垂钓大炎肽在胰腺组织中的受体;SDS-PAGE 分离纯化组分,同时获取作用蛋白的分子质量初步信息;进一步进行胰酶水解、高效液相色谱分离水解片段,根据肽指纹图谱和肽段氨基酸序列鉴定纯化蛋白,此方法是目前蛋白纯化鉴定尤其是受体垂钓经典而有效的方法。通过这些方法鉴定大炎肽的结合组分为胱硫醚  $\beta$ -合成酶,胱硫醚  $\beta$ -合成酶主要来源于肝脏和胰腺,是一个分子质量为 63 ku 的同源四聚体<sup>[6]</sup>,其主要生理功能为参与同型半胱氨酸代谢:在胱硫醚  $\beta$ -合成酶的催化下,同型半胱氨酸与丝氨酸发生合成反应,生成胱硫醚。如果胱硫醚  $\beta$ -合成酶活性丧失可能引起同型半胱氨酸代谢障碍,从而造成高同型半胱氨酸血症。

高同型半胱氨酸血症将改变血液系统的凝固状

态和血小板功能<sup>[7]</sup>,促进血管平滑肌细胞的增殖<sup>[8]</sup>,并进而引发动脉粥样硬化<sup>[9]</sup>。

基于大炎肽已知的生物学功能可提高血液粘度(未发表)和促进血管平滑肌细胞的增生<sup>[10]</sup>,大炎肽与胱硫醚  $\beta$ -合成酶的结合可能部分解释了这些功能,推断大炎肽与胱硫醚  $\beta$ -合成酶结合后,损伤了胱硫醚  $\beta$ -合成酶的活性,造成同型半胱氨酸的堆积,进而引发了血液凝固和血管平滑肌细胞的增生。大炎肽对胱硫醚  $\beta$ -合成酶的活性影响和后续的生理活性都有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] CHEN Z W, AHEN B, OSTENSON C G, et al. Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin

- secretion and abundantly present in the pancreas of pre-diabetic BB rats[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13879-13884.
- [2] CHEN Z W. Isolation and structural analysis of a novel peptide daintain[J]. Eur J Endocrinol (abstr. ), 1994, 30(Suppl 2): 32.
- [3] UTANS U, ARCECI R J, YAMASHITA Y, et al. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1; a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection[J]. J Clin Invest, 1995, 95: 2954-2962.
- [4] YANG Z F, HO D W, LAU C K, et al. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages[J]. Int Immunol, 2005, 17: 1391-1397.
- [5] TIAN Y, KELEMEN S E, AUTIERI M V. An inhibition of AIF-1 expression by constitutive siRNA expression reduces macrophage migration, proliferation, and signal transduction initiated by atherogenic stimuli[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290: 1083-1091.
- [6] KERY V, PONELEIT L, KRAUS J P. Trypsin cleavage of human cyatathionine-beta-synthase into an evolutionarily conserved active core; structure and functional consequences[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 355: 222-232.
- [7] EIKELBOOM J W, LONN E, GENEST J, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease; a critical review of the epidemiologic evidence [J]. Ann Intern Med, 1999, 131: 363-375.
- [8] 陈光慧, 朱燕青, 张晨晖, 等. 同型半胱氨酸/半胱氨酸诱导血管平滑肌细胞中的新cDNA [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(1): 8-14.
- [9] HANKEY G J, EIKELBOOM J W. Homocysteine and vascular disease[J]. Lancet, 1999, 354: 407-413.
- [10] AUTIERI M V, CARBONE C M. Overexpression of allograft inflammatory factor-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells by cell cycle deregulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21: 1421-1426.

## Isolation and characterization of a binding protein of daintain in pancreas

ZHAO Yan-ying<sup>1,2</sup> CHEN Zheng-wang<sup>1</sup> LU Jie<sup>1</sup>

1. School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;
2. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

**Abstract** Daintain, a macrophage inflammatory factor, was characterized. To investigate the regulatory mechanism of daintain on pancreatic  $\beta$  cells, daintain was coupled to CNBr -Sepharose 4B, and the binding protein of daintain in pancreas was isolated by affinity chromatography, then it was characterized as cyatathionine-beta-synthase (CBS) in the database of mascot according to the peptide mass fingerprint and amino acid sequence of two peptide fragments with trypsin digestion. The interaction of daintain with CBS suggests that daintain may regulate the activity of CBS, resulting in the accumulation of homocysteine.

**Key words** daintain; cyatathionine-beta-synthase(CBS); binding protein; homocysteine; pancreas; trypsin; peptide mass fingerprint

(责任编辑:张志钰)