

新型人白细胞介素-2突变点的分析鉴定

吴高德 屠红旻 邵晓霞 徐来根 夏其昌

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

对新型人白细胞介素-2(IL-2-Ser-125)进行了精制和纯度指标的鉴定。蛋白质N端序列分析表明产品中1/3部分N端缺失Met,这种微观不均一性在等电聚焦和毛细管电泳中有所反映。此外,对新型人IL-2的含点突变残基的多肽进行氨基酸序列分析,证实确由Cys-125突变成Ser。

关键词 新型IL-2(Ser-125); 蛋白质序列分析; 点突变分析

白细胞介素目前已有近十余种,生物效应各有异同。天然人白细胞介素-2(IL-2)由133个氨基酸组成,其中含有一个游离半胱氨酸(位于第125位),而第58位和第105位的半胱氨酸形成二硫键。此二硫键为活性所必需。二硫键的错配,可降低其生物活性和形成抗原性^[1]。IL-2在肿瘤临床应用方面有很大潜力,但其毒性大,体内半衰期短。刘新垣等^[2]用蛋白质工程方法将IL-2的第125位Cys突变为Ser或Ala,其热稳定性等方面都有明显改善。新型IL-2由于改变其中某些氨基酸残基,易增加抗原性,加入聚乙二醇(PEG)等聚合物可降低其抗原性。

本文从蛋白质结构分析上验证新型IL-2第125位确由Cys突变成Ser,以及其它一些性质。

材料与 方法

(一) 材料

1. 新型人白细胞介素-2(Ser-125): 承上海医药工业研究院IL-2中试组提供。

2. 天然人白细胞介素-2: 美国 Hoffmann La-Roche公司赠送。

(二) 方法

1. 蛋白酶酶解: TPCK-胰蛋白酶为本实验室自制。IL-2:胰蛋白酶=50:1(w/w), 碳酸氢铵缓冲液, pH 8.0, 37°C, 酶解4h, 加TFA至pH 2-3停止反应。

2. RP-HPLC: Beckman System Gold. 4.6×250mm RP-C18柱, 梯度条件: 60 min, 0.1% TFA/H₂O-0.085% TFA/乙腈。

3. 毛细管电泳: Applied Biosystems公司270A型毛细管电泳仪, 20mmol/L柠檬酸缓冲液 pH 2.5, 20 kV, 30°C电泳15min, 用于鉴定IL-2纯度和含点突变残基多肽的纯度。

4. SDS/PAGE和电印迹: 分别按Laemmli方法^[3]和Walsh方法^[4]进行。

5. 蛋白质/多肽氨基酸序列分析: Applied Biosystems 477A/120A蛋白质多肽序列仪。

6. IL-2活性测定: 按匡彦德等^[5]方法进行。

本文于1991年6月29日收到。

中国医药工业研究院IL-2中试组和本所刘新垣教授工作组供给样品和进行活性测定特此致谢。

结果和讨论

(一) 新型IL-2的分离纯化和性质

新型IL-2的高密度发酵产物, 经破菌抽提和 Sephacryl S-200初步纯化之粗制品由上海医药工业研究院提供。IL-2精制用C-4反相柱。图1所示为微柱(RP-C4)和半制备柱(Aquapore Butyl)分析及制备分离所得的结果, 发现IL-2粗制品能被分成4个峰, 依洗脱顺序命名为峰-1, 峰-2、峰-3和峰-4(图1)。分别收集这些组份后用SDS/PAGE、HPLC、等电聚焦

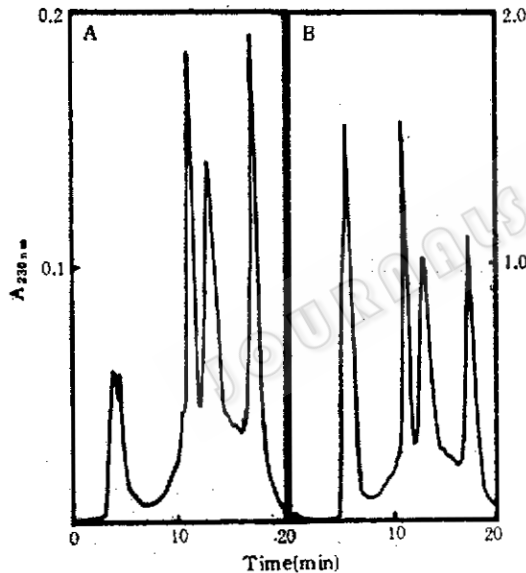


图 1. 新型IL-2的分离纯化

Fig.1 The purification of new type IL-2 (Ser-125)

- A: Analytical HPLC; C4 column (30 × 2.1mm ID); gradient elution; flow rate 0.2ml/min; detection: 230nm.
 B: Semipreparative HPLC; C4 column (100 × 10mm ID); gradient elution; flow rate 1.0 ml/min; Detection 230 nm.

(IEF) 和毛细管电泳(CE)鉴定。峰-4在SDS/PAGE中为均一的区带, 分子量为15kDa(图2), 并经过活性测定, 确定系

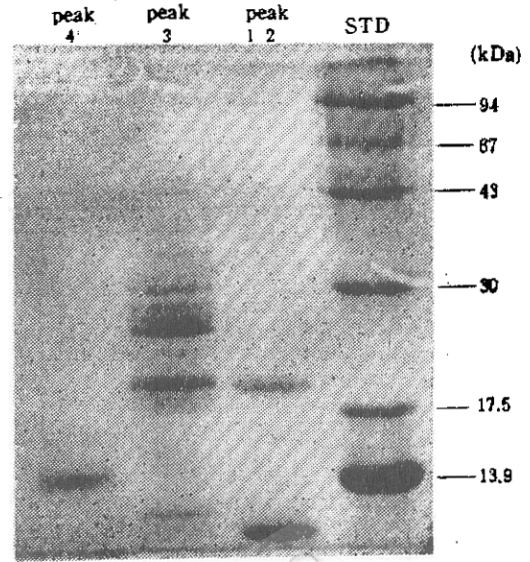


图 2 SDS/PAGE鉴定新型IL-2纯度

Fig.2 SDS/PAGE pattern of new type IL-2 (Ser 125)

IL-2的活力峰。峰-4在分析型HPLC上重分析也为均一的对称峰, 但在Mini-IEF中为深浅不同很相近的两条区带(图未列入)。而在毛细管电泳中, 于常规分析多肽的实验条件下(pH 2.5, 20mmol/L柠檬酸缓冲液), 左侧有骑峰(图3)。

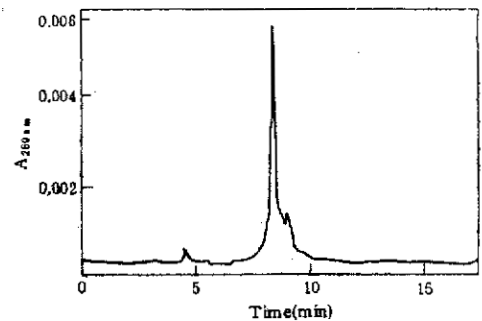


图 3 毛细管电泳(CE)鉴定新型IL-2纯度

Fig.3 Purity analysis of IL-2 (Ser-125) using capillary electrophoresis 20mmol/L citrate buffer pH2.5; 20kV; 15min

Weir等曾报道^[6]IL-2有两个主要区带分别为pI 7.7(N-Met)和pI 8.0(N-Ala), 其含量比约4:1, 还有其它次要的

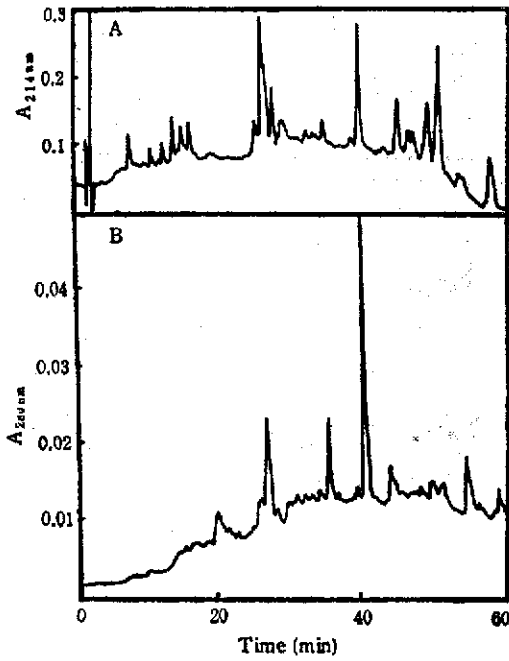


图 4 新型IL-2的胰蛋白酶解肽谱
Fig.4 Tryptic map of new type IL-2 (Ser-125)

A: C-18 column (250×4.6mm ID); gradient elution; Detection 214nm
B: C-18 Column (250×4.6mm ID); gradient elution; Detection 280nm

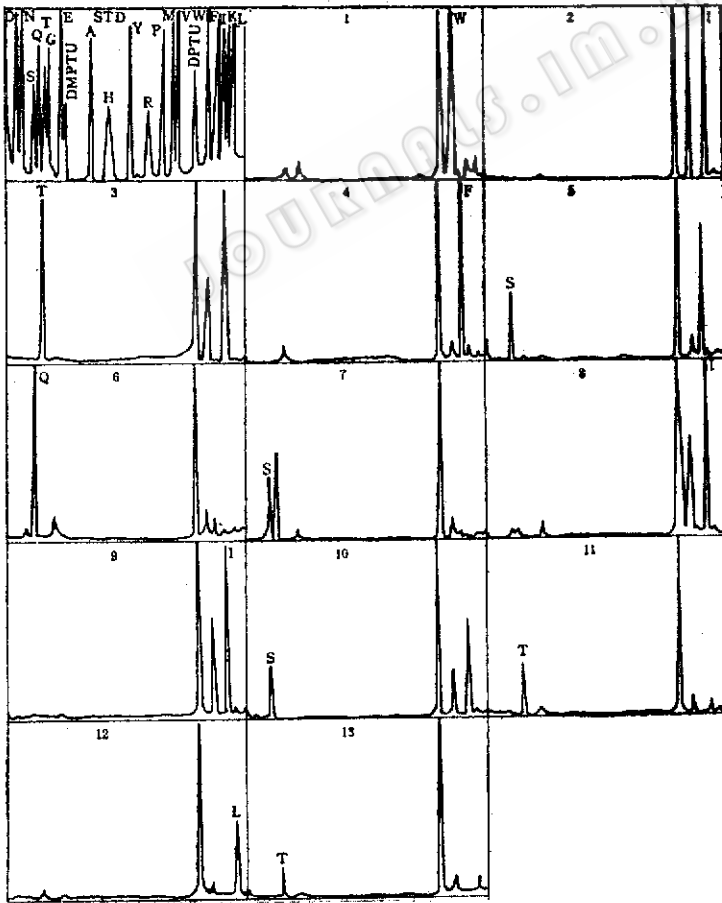


图 5 新型 IL-2 的点突变肽段的自动氨基酸序列分析
Fig.5 Automatic sequence analysis of the IL-2 point-mutated peptide

成份pI7.5。

对 IL-2 精制品 (HPLC产品或 SDS/PAGE 电泳后电印迹至 PVDF 膜上的样品)进行了 N-端 15 个氨基酸残基的序列分析, 结果与天然的 IL-2 基本相同, 只是部分 IL-2 分子的 N 端 Met 缺失, 这种微观不均一性, 在 IEF 和 CE 图谱中也有所反映, 推测是基因表达过程中形成的, 而不是分离纯化过程中产生的, Hoffmann-Roche 产品也有类似情况 (10%—20%)。

(二) IL-2 的酶解肽谱分析

为了鉴定新型 IL-2 的蛋白质工程突变点, 将 IL-2 用 TPCK 胰蛋白酶水解后, 进行 RP-HPLC 分离分析。为了搜寻点突变所在肽段, 可以用几种方法来进行。例如: (1) 天然 IL-2 和新型 IL-2 的酶解图

谱比较法, 寻找有差别的多肽进行顺序分析; (2) 荧光或化学标记 Cys 残基, 比较标记前后新型 IL-2 酶解图谱的差别, 从而鉴别出含点突变的多肽; (3) 由于 IL-2 只有一个色氨酸残基, 而蛋白质的 280nm 紫外吸收主要源于色氨酸, 其次是酪氨酸和苯丙氨酸的贡献, 所以我们采用酶解后分别用 214nm 和 280nm 检测肽谱, 从而非常简便地判断出含有 Trp 的多肽 (残基 121—133), 图 4 表明了这一结果。分离到的多肽再经过 CE 鉴定确定为均一, 最后进行了此多肽的氨基酸序列分析 (图 5)。从而由蛋白质化学分析方法直接证明了在新型 IL-2 中 Ser(125) 确实取代了天然 IL-2 中的 Cys(125)。

参 考 文 献

- [1] Tsuji, T et al.: *Biochemistry*, 26:3129, 1987.
- [2] Liu, X. Y. et al., Annual Meeting of ISIR, p.45, Japan 1988.
- [3] Leammli, U. K. et al.: *Nature*, 227:680, 1970.
- [4] Walsh, M. et al.: *Biochemistry*, 27:6867, 1988.
- [5] 匡彦德等; 上海医科大学学报, 14:10, 1987.
- [6] Weir, M. P. et al.: *J. Chromatogr.*, 396:209, 1987.

The Purification and Point Mutation Analysis of Human Interleukin-2(Ser-125)

Wu Gaode Tu Hongmin Shao Xiaoxia Xu Laigen Xia Qichang
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

New type IL-2(Ser-125) was purified by RP-HPLC and its purity was analyzed with microbore HPLC, IEF, SDS/PAGE and capillary electrophoresis. The N-terminal sequencing indicated the microheterogeneity of the N-terminus, i.e. N-Met (2/3) and N-Ala (1/3), and it was identified with the results of CE and IEF. The amino acid sequence of the point mutated peptide confirmed the replacement of Cys-125 with Ser.

Key words

IL-2 (Ser-125); protein sequencing; point mutation analysis