

BRC2 基元的合成及与靶肽 p53(171-192)的相互作用

朱涵静¹,汪敬恒¹,卢奎^{2,3},赵东欣²,马丽²

(1.河南省化工研究所有限责任公司 材料与化学工程学院,郑州 450052;

2.河南工业大学 化学化工学院,郑州 450001;3.河南工程学院 材料与化学工程学院,郑州 451191)

摘要:乳腺癌易感基因 2 (Breast Cancer Susceptibility Gene 2, BRCA2) 是能抑制细胞发生恶变的关键基因。p53 蛋白是参与细胞过程的主调控蛋白,p53 蛋白要想行使其功能,则需要 BRCA2 及其产物对 p53 进行调控。选择 BRCA2 中的 BRC2 重复基元,用 Fmoc 固相合成法合成了 BRC2 及其 3 个片段。通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)和质谱对其进行表征,得到纯度大于 90%的目标肽链。利用圆二色谱法初步探究了 BRC2 及其 3 个片段与靶肽 p53(171-192)的相互作用。结果表明,BRC2 的 3 个肽片段中,片段 NEVGFGRGFYSAHG 在 BRC2 肽行使其功能中起着主要的作用。

关键词: BRCA2;固相合成;靶肽 p53

中图分类号: O629

文献标志码: A

近年来,乳腺癌的发病率一直上升,依照全球统计结果显示,每年诊断出患乳腺癌的人数超过 138 万,并且出现低龄化的现象^[1-2]。癌症之所以能够产生,是由多种基因及其产物发生改变所导致的,从而使细胞增生失去控制,引发恶变,这也是癌症很难治疗的其中一个原因^[3-4]。在已经发现的多种抑癌基因中,研究比较广泛的是 p53 和 RAD51, p53 和 RAD51 蛋白要想行使其功能,则需要乳腺癌易感基因 2 (breast cancer susceptibility gene 2, BRCA2) 及其产物对它进行调节控制。BRCA2 是一种重要的抑癌基因,它通过修复 DNA 的损伤及抑制细胞异常增殖等途径来抑制癌症的发生^[5-6]。

BRCA2 蛋白包含 8 个保守性很高的重复基元序列(BRC1-BRC8),其中,BRC2 重复基元对 BRCA2 蛋白的性质有着关键影响,但具体作用还不太清楚^[7-8]。为此,本文用 Fmoc 固相合成法合成了 BRCA2 蛋白中的 BRC2 重复基元及其 3 个片段。之所以把 BRC2 分成 3 段,是因为分段要考虑多肽片段的长短和连接位点两个关键因素;肽段碳端氨基酸比氮端氨基酸容易发生消旋反应,因此首先选择多肽片段 C 末端的氨基酸,适合作 C 末端的氨基酸有 Gly,Pro,Glu,Leu 和 Asn 等;其次肽段的长度以含 10 个左右的氨基酸较合适。通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)和质谱对其进行表征,并利用圆二色谱法初步探究了它们与靶肽 p53(171-192)的相互作用,对于更好地了解 BRCA2 与 p53 的作用机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Thermo Scientific LCQ Fleet 离子阱质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Bio-Logic MOS-500 圆二色谱仪(法国 Bio-Logic 公司);LGJ-10 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);PHS-3C 型精密 PH 计(上海精密科学仪器有限公司);FF210 型多肽固相合成管(郑州利研科技有限公司)。

收稿日期:2016-02-17;修回日期:2016-10-10.

基金项目:国家自然科学基金(21172054;21301050);河南省创新型科技人才队伍建设(104200510022)资助;郑州市创新型科技人才队伍建设工程(10LJRC174)资助。

第 1 作者简介(通信作者):朱涵静(1988-),女,河南商丘人,河南省化工研究所有限责任公司助理工程师,研究方向:化学生物学, E-mail: zhuhanjing1106@126.com.

Fmoc-AA-Wang Resin, Fmoc-AA-OH, 2-羟基苯丙三氮唑(HOBT), 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)均购自浙江鸿拓有限公司; N,N-二异丙基乙胺(DIEA), 三氟乙酸(TFA), 哌啶, 二甲基甲酰胺(DMF)均为国产分析纯。

1.2 实验过程

1.2.1 BRC2基元序列的合成

BRC2的序列为 NEVGFRGFYSAHGTKLNVSTEALQKAVKLFSDIEN, 其合成方法参考文献^[9]。

把1.5 g的 Fmoc-Asn(Trt)-Wang Resin(担载量为 $0.29 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)放到含15 mL DMF的固相合成管里,同时打开氮气对其溶胀40 min,滤去溶剂。把20%的哌啶/DMF脱保护试剂,加到上述树脂中,对其进行(10+25) min的脱保护操作,检测,树脂变成了深紫色,说明脱保护已完成。用DMF和CH₃OH反复洗涤7次。把0.5553 g的 Fmoc-Glu(otBu)-OH、0.1763 g的 HOBT和0.4949 g的 HBTU及10 mL的 DMF、216 μL 的 DIEA加入反应器,打开N₂搅拌,通过茚三酮检测,直至偶联完全。重复上面的脱保护、洗涤、偶联、洗涤、脱保护…操作,直到把剩下的氨基酸依次全部偶联成功。

从中称取一定量的干燥树脂,倒入50 mL的圆底烧瓶中,同时加入切割试剂15 mL(TFA:苯甲硫醚:乙二硫醇:水:苯酚:TIS=81.5:5:2.5:5:5:1),切割3 h,而后通过砂芯漏斗过滤到冰乙醚中,冷冻放置4 h后,离心收集沉淀。

靶肽 p53 与 3 个 BRC2 基元片段 NEVGFRGFYSAHG、TKLNVSTEAL、QKAVKLFSDIEN 的固相合成方法同上面所述。

1.2.2 高效液相色谱分离纯化

将合成的多肽粗产品溶于水或甲醇,然后通过高效液相分离纯化,RP-HPLC的分离参数是:Agilent Zorbax 300SB-C18半制备柱;流动相:D相是0.1%的TFA/H₂O,C相为0.1%的TFA/乙腈;梯度:在0~15~30 min内,C相含量分别是20%~50%~20%;流速是每分钟1 mL;检测波长:220 nm或254 nm。

1.2.3 质谱表征

质谱检测参数:通过 Thermo-LCQ Advantage 型号的质谱检测器,对目标肽进行检测。检测参数为:毛细管温度 275 °C;喷雾电压 3.5 kV;毛细管电压 36 V,模式为正离子全扫描。

1.2.4 圆二色谱法探究 BRC2 及其片段肽与靶肽 p53(171-192)的相互作用

把称好的 24.89 mg 的靶肽 p53(171-192)产品,溶解到浓度为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl(pH=7.4)缓冲溶液里,而后在 1 mL 的容量瓶里定容,制备出浓度是 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的靶肽溶液。

从 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的靶肽 p53(171-192)溶液里,取出 0.01 mL 放入 1 mL 的容量瓶里。把不同体积的 BRC2 肽溶液和片段肽溶液,分别加到固定浓度的靶肽溶液里,加入缓冲溶液,定容到相应刻度,制备出一系列不同浓度的 BRC2 肽和 BRC2 片段肽与 p53(171-192)的混合溶液,在常温条件下存放 1 h。用 1.0 mm 规格的比色皿,设置响应时间为 2 s,步长是 1 nm,在 180~320 nm 波长区间内对它们分别扫描,扫描速度为每分钟 100 nm,反复扫 3 次,绘制出圆二色谱图。

2 结果与讨论

2.1 合成多肽的表征

靶肽 p53(171-192)的序列为 EVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQ。由图 1 可知,目标峰为 $[M+2H]^{2+} = 1245.05$, $[M+3H]^{3+} = 830.50$, $[M+4H]^{4+} = 623.20$, 与理论分子量 2 488.63 相吻合,表明成功合成产品。

由图 2 可知,BRC2 肽的表征结果为 $[M+H]^+ = 3871.81$,与理论分子量 3871.36 相吻合,表示成功合成目标产品。

由图 3 可知,目标峰为 $[M+H]^+ = 1440.42$, $[M+2H]^{2+} = 720.92$, $[M+3H]^{3+} = 481.00$,同理论分子量 1440.54 相吻合,表示成功合成目标产品。

片段肽 TKLNVSTEAL 的理论分子量为 1075.23。由图 4 可知,目标峰为 $[M+H]^+ = 1075.33$, $[M+$

$2H]^{2+} = 538.25$, 表示成功合成产品.

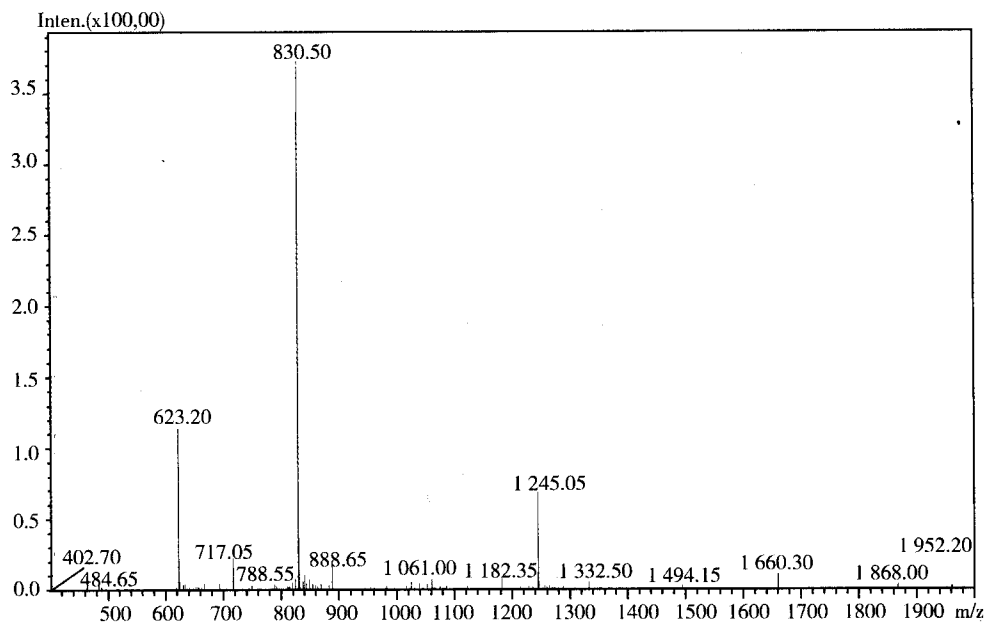


图1 p53 (171-192)的ESI-MS检测图

由图 5 可知, 目标峰为 $[M+H]^+ = 1391.50$, $[M+2H]^{2+} = 696.33$, 同片段肽 QKAVKLFSDIEN 理论分子量 1391.59 相吻合, 表示成功合成产品.

4 700 Reflector Spec #1 MC[BP=3 871.8, 697 8]

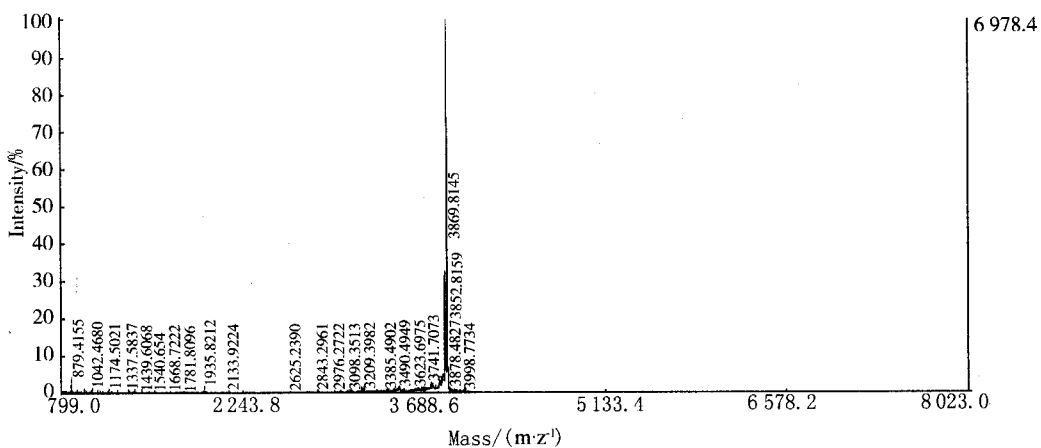


图2 BRC2的MALDI-TOF-MS

2.2 BRC2 及其片段肽与靶肽 p53(171-192)相互作用的圆二色谱

2.2.1 靶肽 p53(171-192)与 BRC2 肽相互作用的圆二色谱

把不同体积的 BRC2 溶液, 分别加到靶肽溶液里, 控制靶肽溶液的终浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变, 并以相应浓度的 BRC2 肽溶液作参比, 分别用圆二色谱检测, 得到靶肽 p53(171-192)与 BRC2 相互作用的圆二色谱, 如图 6 所示.

$c(p53) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 B 到 F, $10^4 c(\text{BRC2}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0; 0.2; 0.4; 0.8; 1.0$.

在图 6 中, 随着 BRC2 肽浓度的增加, p53(171-192)的 CD 光谱吸收峰的强弱渐渐出现变化, 并且吸收峰位置出现一定程度的红移. CD 光谱中, 多肽的 α 螺旋吸收会在波长 192 nm 附近呈现正峰, 波长 200—

210 nm 间有明显负峰^[10-11]. 依据神经网络算法(K2D)^[12]对图6进行分析,相互作用前,p53(171-192)的 α 螺旋含量为55%,而相互作用后,由于BRC2的疏水影响,致使p53(171-192)肽段的结构出现收缩,p53(171-192)的 α 螺旋含量有所下降,肽链结构发生改变.与此同时,230 nm左右出现负的吸收峰,表示当接着增大BRC2的浓度时,p53(171-192)中 β 折叠和 β 转角的含量有所提高^[13].由此推测:当两者相互作用后,靶肽p53(171-192)内部的氢键结合力相应的升高,又有疏水作用,使p53(171-192)结构呈现收缩,最后使p53(171-192)的二级结构发生改变.

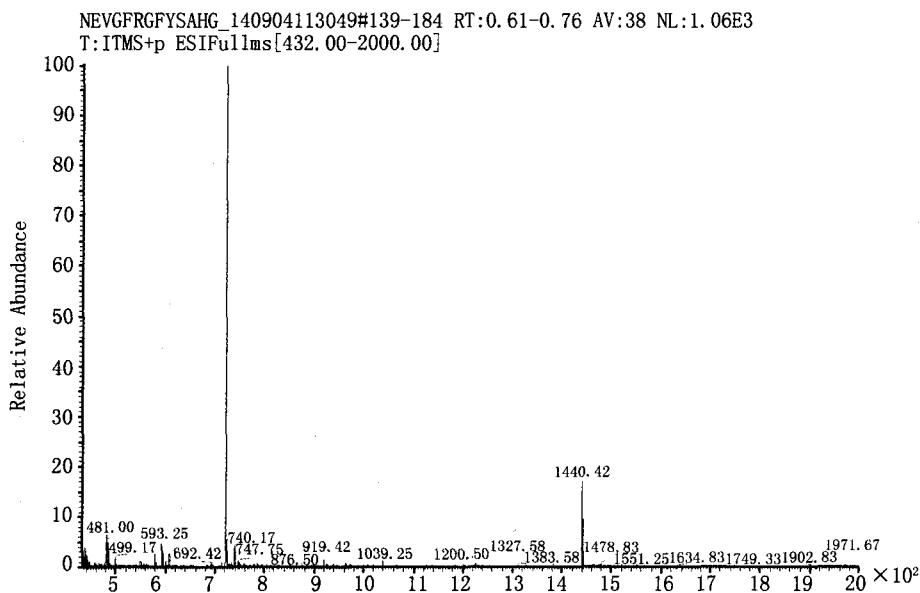


图3 片段NEVGFRGFYSAHG的ESI-MS表征图

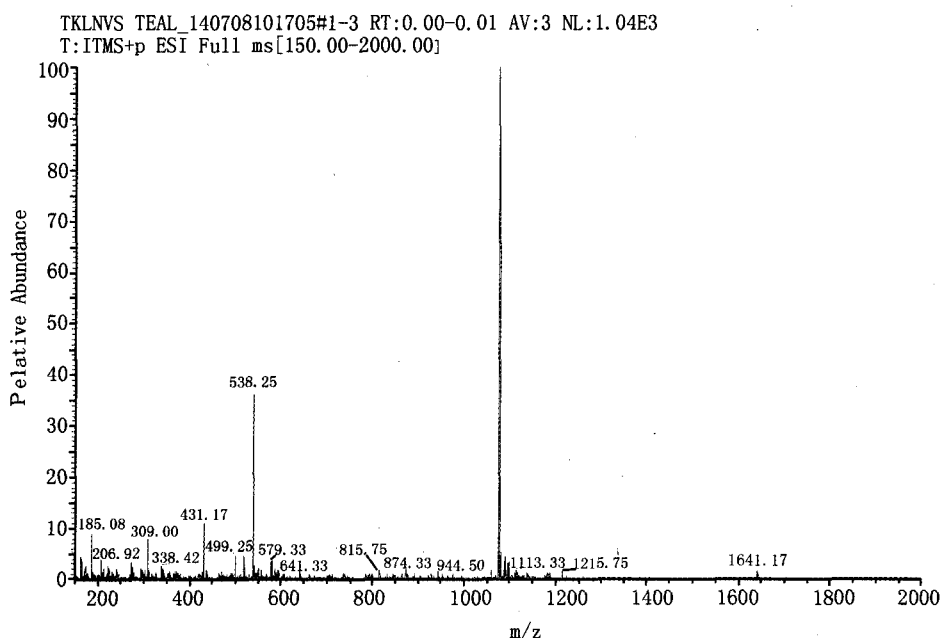


图4 片段TKLNVS TEAL的ESI-MS表征图

2.2.2 靶肽 p53(171-192)与片段 NEVGFRGFYSAHG 相互作用的圆二色谱

把不同体积的片段肽 NEVGFRGFYSAHG 溶液,分别加到靶肽溶液里,控制靶肽溶液的终浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变,并把对应浓度的 NEVGFRGFYSAHG 肽溶液作参比,分别对它们用圆二色谱检测,得到靶肽 p53(171-192)与 NEVGFRGFYSAHG 相互作用的圆二色谱图,如图7所示.

$c(\text{p53}) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 B 到 F, $10^4 c(\text{NEVGFRGFYSAHG}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0; 0.2; 0.4;$

0.8;1.0.

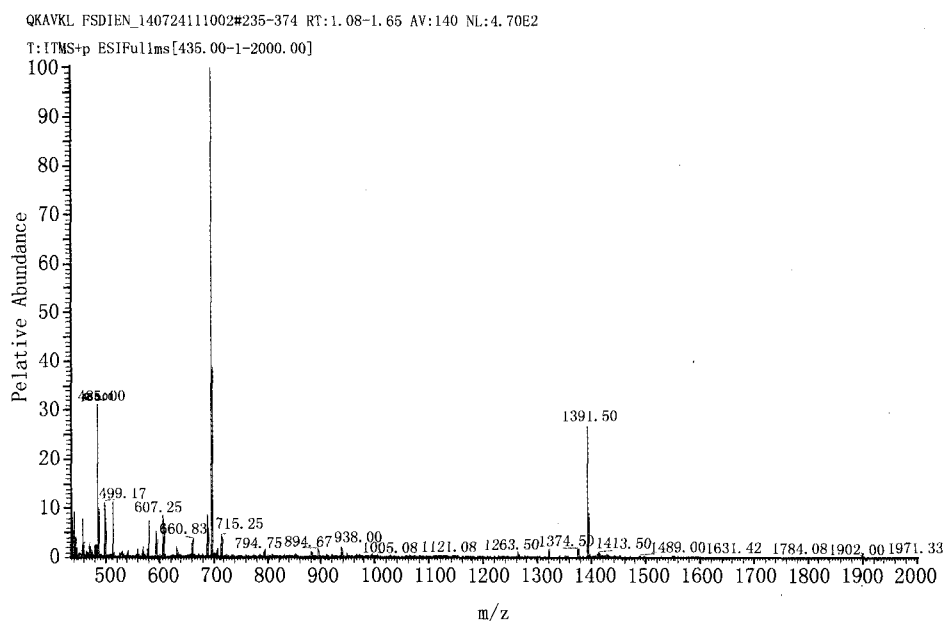


图5 片段QKAVKLFSDIEN的ESI-MS表征图

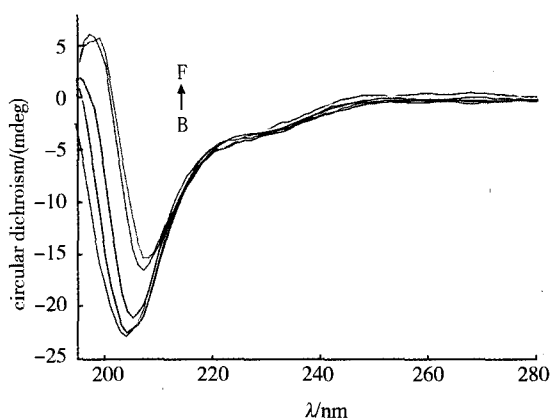


图6 靶肽p53(171-192)与BRC2作用的圆二色图谱

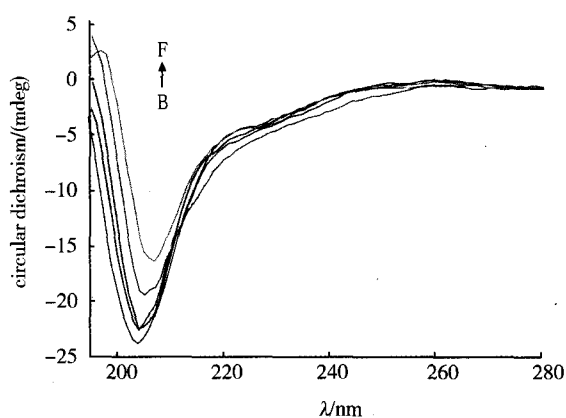


图7 靶肽p53(171-192)与片段NEVGFRGFYSAHG作用的圆二色图谱

在图7中,当改变片段肽的浓度,靶肽 p53(171-192)的圆二色谱图也发生改变,表示该片段肽与靶肽 p53(171-192)之间产生了相互作用依次增大体系中 NEVGFRGFYSAHG 肽的含量,CD 光谱吸收峰的强弱渐渐出现变化,并且吸收峰位置出现一定程度的红移。 α 螺旋吸收在波长 200 nm 附近渐渐呈现正峰,200~210 nm 波长间有着显著的强度明显的负峰,说明 α 螺旋含量相对较高^[14]。用 K2D 对图7 进行分析,得到的分析结果与 BRC2 很是接近,表示片段 NEVGFRGFYSAHG 对 BRC2 有着关键的影响相互作用后, p53(171-192)中 α 螺旋含量由 55% 下降到 35%,可能是由于片段 NEVGFRGFYSAHG 中的疏水影响,致使 p53(171-192)肽段的结构出现收缩,即在相互作用后,靶肽构象改变^[15]。与此同时,在波长 230 nm 左右出现负的吸收峰,表示当接着增大片段 NEVGFRGFYSAHG 的浓度时, β 折叠和 β 转角的含量都有所提高。推测是:当两者作用后,靶肽 p53(171-192)内部的氢键结合力相应的升高,又有疏水作用,使 p53(171-192)结构呈现收缩,最后使 p53(171-192)的二级结构发生改变。

2.2.3 靶肽 p53(171-192)与片段 TKLNVSTEAL 相互作用的圆二色谱

把不同体积的片段肽 TKLNVSTEAL 溶液,分别加到靶肽溶液里,控制靶肽溶液的终浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变,并把对应浓度的 TKLNVSTEAL 肽溶液作参比,分别对它们用圆二色谱检测,得到靶

肽 p53(171-192)与 TKLNVSTEAL 相互作用的圆二色谱,如图 8 所示.

$c(\text{p53}) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 B 到 F, $10^4 c(\text{TKLNVSTEAL}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0; 0.2; 0.4; 0.8; 1.0$.

从图 8 中明显的能够看到,200~210 nm 波长区间有负峰且强度明显,这是 α 螺旋结构特性;慢慢增大 TKLNVSTEAL 的浓度,体系里的负峰强弱呈现出一定的变化. 依据神经网络算法对图谱的分析,相互作用前后,靶肽 p53(171-192)的二级结构含量没有出现大的变化. 因此,靶肽 p53(171-192)与 TKLNVSTEAL 间的相互作用较弱.

2.2.4 靶肽 p53(171-192)与片段 QKAVKLFSDIEN 相互作用的圆二色谱

把不同体积的片段肽 QKAVKLFSDIEN 溶液,分别加到靶肽溶液里,控制靶肽溶液的终浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变,并把对应浓度的 QKAVKLFSDIEN 肽作参比,分别对它们用圆二色谱检测,得到靶肽 p53(171-192)与 QKAVKLFSDIEN 相互作用的圆二色谱图,如图 9 所示.

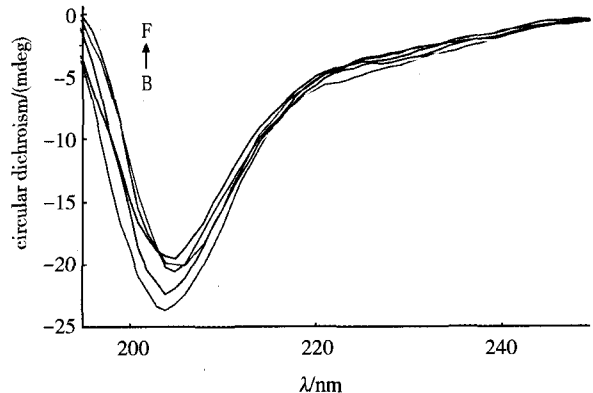
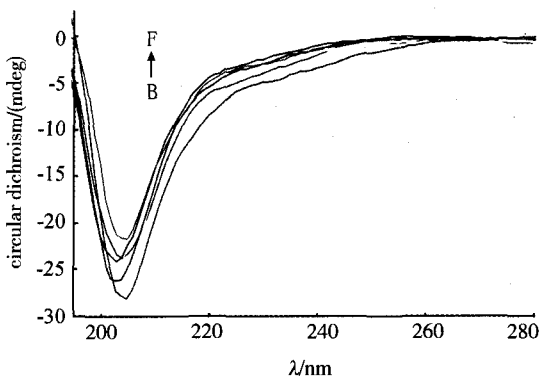


图8 靶肽p53(171-192)与片段TKLNVSTEAL作用的圆二色谱图 图9 靶肽p53(171-192)与片段QKAVKLFSDIEN作用的圆二色谱图

$c(\text{p53}) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 从 B 到 F, $10^4 c(\text{QKAVKLFSDIEN}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 0; 0.2; 0.4; 0.8; 1.0$.

从图 9 中明显的能够看到,200~210nm 波长区间有负峰且强度显著,这是 α 螺旋结构特性;随着 QKAVKLFSDIEN 浓度的增大,体系里的负峰强弱呈现出一定的变化,而位移基本不变. 依据神经网络算法对图谱的分析,相互作用前后,靶肽 p53(171-192)的二级结构含量没有出现显著的变化. 因此,靶肽 p53(171-192)与片段 QKAVKLFSDIEN 间的相互影响很弱.

3 结 论

采用 Fmoc 固相逐步合成法,成功得到了纯度都大于 90% 的 BRC2、靶肽 p53(171-192)和 BRC2 的三个片段肽 NEVGFRGFYSAHG、TKLNVSTEAL、QKAVKLFSDIEN. 采用圆二色谱法,考察了靶肽 p53(171-192)与 BRC2 及其三个片段肽的相互作用,结果表明,片段 NEVGFRGFYSAHG 对 BRC2 肽行使其功能有着关键的影响. 而片段 NEVGFRGFYSAHG 对 BRC2 肽的具体影响及 BRC2 肽与靶肽 p53(171-192)的具体作用机理有待继续研究.

参 考 文 献

- [1] Mavaddata N, Antoniou A C, Easton D F, et al. Genetic susceptibility to breast cancer[J]. *Mol Oncol*, 2010, 4(3):174-191.
- [2] 吴 桐,刘吉成. 乳腺癌易感基因研究现状[J]. *新乡医学院学报*, 2014, 31(7):579-582.
- [3] Walsh T, King M C. Ten genes for inherited breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(2):103-105.
- [4] Hartlerode A J, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells[J]. *Biochem J*, 2009, 423(2):157-168.
- [5] 阳泽龙,靳彦文,刘晓静,等. 家族性乳腺癌患者及家系成员乳腺癌易感基因携带情况调查[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(10):621-626.
- [6] Rajan T V, Wang M, Marquis S T, et al. BRCA2 is coordinately regulated with BRCA1 during proliferation and differentiation in mam-

- mary epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(23):13078-130831.
- [7] 邹晓, 李振凤, 程广, 等. 乳腺癌易感基因 BRCA1 与 BRCA2 的研究进展[J]. 青岛医药卫生, 2011, 43(4):286-289.
- [8] Gayther S A, Mangion J, Russell P, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene[J]. Nature Genet, 1997, 15(1):103-105.
- [9] 韩香, 顾军. 多肽的固相合成[J]. 天津药学, 2002, 24(1):7-9.
- [10] Sjöholm I, Sjödin T. Binding of drugs to human serum albumin. I. Circular dichroism studies on the binding of some analgesic, sedative and antidepressive agents[J]. Biochem Pharmacol, 1972, 21(22):3041-3050.
- [11] Kelly S M, Price N C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function[J]. Curr Protein Pept Sci, 2000, 1(4):349-384.
- [12] Louis-Jeune C, Andrade-Navarro M A, Perez-Iratxeta C. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra[J]. BMC Struct Biol, 2012, 80(2).
- [13] Kelly S M, Jess T J, Price N C. How to study proteins by circular dichroism[J]. BBA-Proteins Proteom, 2005, 1751(2):119-139.
- [14] Shahabadi N, Maghsudi M, Mahdavi M, et al. Interaction of calf thymus DNA with the antiviral drug lamivudine[J]. DNA Cell Biol, 2012, 31:122-127.
- [15] 王铮, 郭新秋, 朱邦尚, 等. 利用圆二色光谱检测计算血清白蛋白二级结构[J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(10):294-296.

Synthesis of BRC2 and Preliminary Study on the Interaction of BRC2 with Peptide p53(171-192)

ZHU Hanjing¹, WANG Jingheng¹, LU Kui^{2,3}, ZHAO Dongxin², MA Li²

(1. Chemical Research Institute Co. Ltd. of Henan Province, Zhengzhou 450052, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 3. School of Material and Chemical Engineering, Henan Institute of Engineering, Zhengzhou 451191, China)

Abstract: Breast cancer susceptibility gene 2 (BRCA2) is an important tumor suppressor gene. The p53 protein is a master regulatory protein involved in cellular processes, if p53 protein want to exercise its functions, it needs to BRCA2 and its products to its regulation. In this thesis, we selected the repeated motif BRC2 in BRCA2, with Fmoc solid phase synthesis, we synthesized repeated motif BRC2 and its three peptide fragments. Crude peptides isolated and purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and characterized by mass spectrometry (MS), their purity reached more than 90%. The interaction between p53(171-192) and BRC2 peptides had been investigated by using circular dichroism (CD) spectrum. The results showed that: fragment NEVGFRGFYSAHG plays a major role in the exercise of BRC2 functions.

Keywords: BRCA2; solid phase synthesis; p53 (171-192)