

文章编号:1009-038X(2003)02-0022-04

蛇毒类凝血酶基因在大肠杆菌中的融合表达及纯化

李民, 杨青, 包永明, 雷旭宇, 许建强, 安利佳
(大连理工大学生物工程系, 辽宁大连 116024)

摘要: 将大连蛇岛蝮蛇毒类凝血酶(Gloshedobin)基因克隆到载体 pET32-a(+)上,在 T7lac 启动子下以 N 端融合硫氧还蛋白的形式在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达,诱导条件为:30 ℃ 诱导 6 h, IPTG 浓度为 1 mmol/L. 利用固定化金属离子(Ni²⁺)亲和层析分别对胞内可溶物和变性条件下的包涵体进行纯化. 通过 SDS-PAGE 检测融合蛋白的纯度,采用点杂交和纤维蛋白凝块活性检测分析,显示纯化产物具有较高生物活性.

关键词: 类凝血酶;固定化金属亲和层析;融合表达;大肠杆菌

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Fusion Expression and Purification of Gloshedobin, a Thrombin-Like Enzyme from *Gloydius Shedaensis* in *E. coli*

LI Min, YANG Qing, BAO Yong-ming, LEI Xu-yu, XU Jian-qiang, AN li-jia
(Department of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The gene of snake venom thrombin-like enzyme from *Gloydius shedaensis*, Gloshedobin, was cloned into expression vector pET32-a(+). The enzyme fused with thioredoxin as its N-terminal part was expressed in *E. coli* BL21(DE3) under the control of T7lac promoter at 30 ℃ with 1 mmol/L IPTG for 6 hours. Recombinant proteins which distributed among soluble and insoluble cellular fractions were purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography(IMAC) individually. SDS-PAGE was used to detect the purity of target protein. A higher bioactivity of purified products was shown by the determination of dot-blotting assay and fibrinogen-clotting analysis.

Key words: thrombin-like enzyme; immobilized metal affinity chromatography; fusion expression; *E. coli*

蛇毒类凝血酶(TLE)主要存在于蝮亚科(Viperidae)和蝰科(Crotalidae)家族^[1],与凝血酶(Thrombin)的作用机制不同,它主要作用于纤维蛋白原的一条链A α 或B β ,个别作用于两条链.类凝血酶在体外作为促凝剂引起血浆或纯化纤维蛋白原

凝集.在体内一般不激活凝血因子XIII,形成的纤维蛋白块因不产生交联而不稳定,很快会被网状内皮系统吞噬和循环血液清除,引起血浆纤维蛋白原水平降低,呈良性的去(脱)纤维蛋白状态,从而表现抗凝效应^[2].又因为它不引发血小板凝集,故机

收稿日期:2002-11-26; 修回日期:2002-12-12.

基金项目:辽宁省科技基金项目(No.99305001)资助课题.

作者简介:李民(1976-),男,吉林白山人,生物化工硕士研究生.

体仍能维持正常的止血功能.这些特点使得该酶在血栓类疾病的治疗上具有重要的应用价值.此外由于类凝血酶对纤维蛋白原的这种作用方式独特,其结构与功能间的关系也成为酶学研究的重点.

大连蛇岛蝮蛇为我国二级保护蛇种,作者所在实验室已经成功获得其 cDNA 全序列^[3]并在酵母表达体系中克隆,获得该酶的表达.由于大肠杆菌系统具有发酵周期短、遗传背景清楚和操作方便等优点,作者系统地研究了该酶在大肠杆菌中的表达,为该药物的理化研究及规模化生产奠定了基础.

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

pET32-a(+)质粒和大肠杆菌 BL21(DE3)购自 Novagen 公司.编码 Glosheedobin 的基因由作者所在实验室保存.感受态细胞 JM109 和亚克隆载体 pUC18 由 Takara 大连公司提供.

1.2 培养基

胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,NaCl 10 g/L, 氨基西林钠 100 mg/L.

1.3 仪器与试剂

用于蛋白分离纯化的层析系统 AKTA explorer 100,His-Tag 金属螯合填料、蛋白质相对分子质量标准 LMW Kit 均购自 Pharmacia Biotech 公司.蛋白质超滤及纯水系统购自 Millipore 公司.一抗(抗蝮蛇毒血清)和二抗(结合辣根过氧化物酶的兔抗马 IgG)及显色底物(二氨基联苯胺 DAB Kit)购自北京中山生物公司.IPTG(异丙基- β -D 硫代半乳糖苷)购自 Takara 公司.其它试剂均为分析纯.

1.4 重组表达载体的亚克隆

根据已有基因设计并合成一对引物,PCR 扩增、克隆按常规方法^[4]进行.

1.5 表达载体的构建

扩增产物经测序验证后,用限制性内切酶 *Xho*I 和 *Eco*RI 进行双酶切,回收后再与 *Xho*I 和 *Eco*RI 酶切处理后的融合表达载体 pET32-a(+)连接,热转化至宿主菌 BL21(DE3)中,获得表达菌株.

1.6 基因表达

将转化后的大肠杆菌 BL21(DE3),经含氨苄平板筛选,挑取单菌落接种于 5 mL 新鲜 LB 培养基中,37 °C,190 r/min 活化过夜,然后按 1:50 接种于 250 mL 的 LB 培养基中,37 °C 培养至 OD₆₀₀为 0.5~0.7 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续于 30 °C 诱导培养 6 h,于 6 500 r/min 4 °C 离心,15 min,收集菌体.

1.7 表达产物的纯化

收集菌体后,按湿重质量浓度为 1:5 加入冰冷 BufferA(Tris-HCl 20 mmol/L, pH 8.0),悬浮 5 min,冰浴超声破菌,离心(12 000 r/min,10 min,4 °C)收集沉淀和上清液.上清液直接进行固定化金属亲和层析.首先,用电荷缓冲液(100 mmol/L NiSO₄)平衡柱,再用结合缓冲液(5 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)继续平衡,上样(体积流量 1 mL/min)并洗至基线,然后用淋洗缓冲液(30 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗脱结合杂蛋白,最后用洗脱缓冲液(0.5 mol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗脱目的蛋白.收集洗脱峰,超滤除盐.用含 8 mol/L 尿素的结合缓冲液溶解包涵体后(室温下摇动 2 h),上亲和柱,除在上述结合、淋洗和洗脱缓冲液中加入 8 mol/L 尿素外,其余操作不变.得到的变性目的蛋白进行超滤除盐,同时复性.

1.8 SDS-PAGE 分析

参照文献[4]进行,采用 4 g/dL 浓缩胶,12 g/dL 分离胶,蛋白质条带用考马斯亮蓝染色.

1.9 点杂交检测

参照文献[4]进行,2%的脱脂奶粉封闭 1 h,一抗稀释 500 倍,室温过夜.二抗稀释 1 000 倍,孵育 1 h,DAB 显色,以牛血清白蛋白作空白.

1.10 纤维蛋白凝活血性检测

参照文献[5]的方法,取质量浓度为 1 mg/mL 的纯化产物 10 μ L,加入到 100 μ L 含纤维蛋白原质量浓度为 0.4 g/dL 的 40 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)中.37 °C 温育,观察凝块现象,并以水代替产物作为空白.

2 结果与讨论

2.1 亚克隆载体的构建

以蛇毒类凝血酶基因 cDNA 为模板,利用设计的引物,经扩增处理,将 pUC118 载体与目的片段连接起来,再转化至大肠杆菌感受态细胞 JM109 中,涂板、检菌,提质粒,电泳结果表明得到正确克隆.

2.2 表达载体的构建

大多数报道指出,蛇毒类凝血酶(TLE)不易通过非融合蛋白的形式在 *E. coli* 中表达^[6],其可能的原因与 TLE 基因的 mRNA 二级结构有关.为此,作者设计采用融合表达方式,在克隆时保留 N 端 Trx-Tag 和 6His-Tag 两个标签,之后在其克隆位点插入 TLE 基因并在其 3' 端加入终止密码子. N 端的

6His-Tag 方便地利用固定化金属配体亲和层析对融合的外源蛋白产物进行纯化. 分别对亚克隆载体质粒和 pET32-a(+) 进行双酶切后, 平端化处理, 并进行连接, 完成表达载体的构建, 见图 1. 酶切检测见图 2, 测序结果与预期一致.

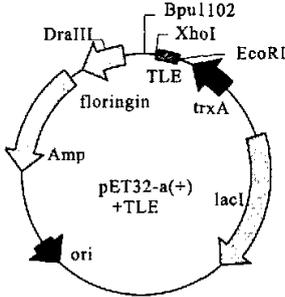
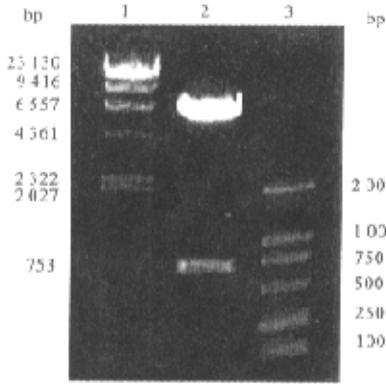


图 1 表达质粒示意图

Fig.1 Schematic representation of the expression plasmid pET32-a(+)+TLE



1 为 λ -HindIII 标准, 2 为酶切后的表达载体, 3 为 DL2000 标准
图 2 表达载体经 XhoI 和 EcoRI 双酶切后的电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of expression construct treated by two restriction enzymes, XhoI and EcoRI

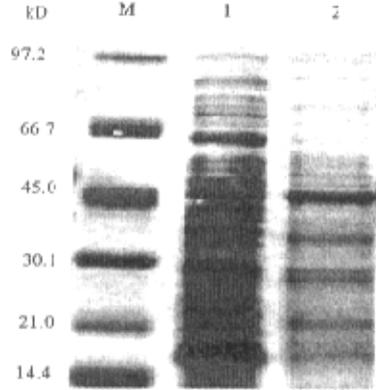
2.3 重组类凝血酶的表达

以 pET32-a(+) 作为表达载体, 利用其较强的 T7 RNA 聚合酶活性表达异源蛋白. 采用硫氧还蛋白作为融合蛋白的方式, 以提高蛋白的表达量和可溶比例. 并采用降低诱导温度和延长发酵时间的方法, 表达后的菌体破碎后分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 蛋白以可溶的形式表达的目的蛋白占总目的蛋白的 40%, 远高于其他类凝血酶在大肠杆菌中的可溶性表达^[9]. 总目的蛋白的表达量约 20 mg/L.

2.4 表达产物的纯化

由于设计使用了 His 标签, 因此可以通过金属

螯合层析进行蛋白质纯化. 与其它亲和纯化系统相比, 金属螯合层析有其独特优点, 如树脂稳定性好, 容量大, 洗脱条件温和等, 并且可以在变性的条件下纯化蛋白. Ni^{2+} 与 His 标签的亲和力较高(每毫升吸附剂可吸附 5~8 mg 的带 His 标签的蛋白), 因此选用 Ni^{2+} 体系来捕获蛋白, 经洗脱, 得到的蛋白纯度较高, 约为 80% (见图 3). 可溶组分与包涵体分别进行亲和层析的曲线类似, 见图 4.



M 为蛋白质标准, 1 为胞内总蛋白, 2 为纯化后的目的蛋白

图 3 亲和层析洗脱后 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of fusion protein purified by

IMAC

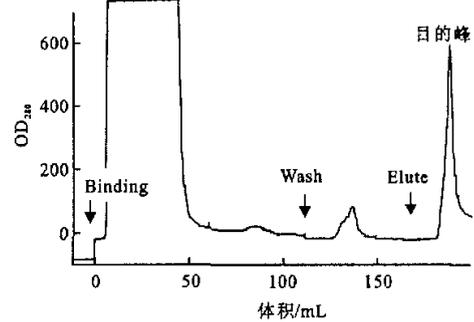


图 4 固定化金属亲和层析图

Fig.4 Purification curve of IMAC

2.5 融合蛋白的活性检测

从点杂交结果(见图 5)可以看出, 胞内可溶物与复性后的包涵体均能与蝮蛇毒免疫得到的马血清多克隆抗体产生较强的抗原-抗体反应. 利用类凝血酶将纤维蛋白原水解成纤维蛋白凝块的特性, 可以检测到纯化产物(可溶与复性后的融合蛋白)都具有较明显的纤维蛋白凝结活性(见图 6). 这也说明在 N 端融合的硫氧还蛋白没有完全改变蛋白的生物活性, 因此用该体系高效表达类凝血酶是可行的.

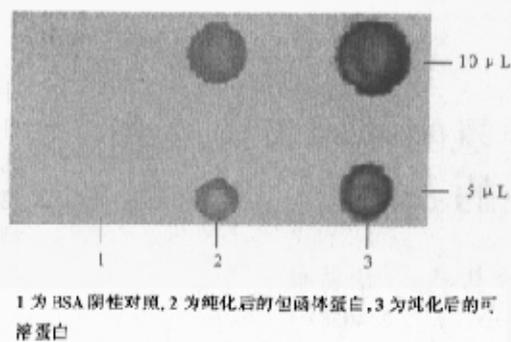
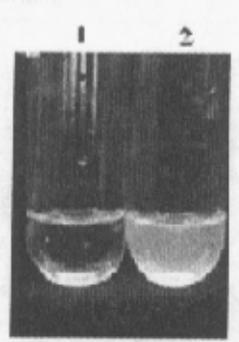


图5 融合蛋白的点杂交检测

Fig. 5 Dot-blotting analysis of TLE-trx



1 为水 + 纤维蛋白原, 2 为纯化后的融合蛋白

图6 纤维蛋白凝结活性检测

Fig. 6 Fibrinogen-clotting analysis of Tex-trx

3 结论

自1991年首次利用重组DNA技术得到矛头蝮蛇(*B. atrox moojeni*)毒类凝血酶基因并在*E. coli*中融合表达以来,已有近10种不同的类凝血酶基因得到表达^[7],其中以大肠杆菌表达系统为主.由于以非融合形式表达的产量很低,加上产生蛋白的

凝聚体即包涵体,不利于提高蛋白的活性^[8],从而限制了该酶的基因工程生产.作者将蛇岛蝮蛇毒类凝血酶基因克隆到大肠杆菌中,采用N端融合硫氧还蛋白的方式并降低诱导温度(30℃)、延长诱导时间(6h)等,提高了融合蛋白在胞内的可溶性表达.利用表达载体上的组氨酸标签,采用Ni²⁺亲和层析,分别纯化了可溶和不可溶形式的融合蛋白,纯度大于80%,产物经检测具有明显的生物活性.

参考文献:

- [1] Pirkle H, Theldor I. Thrombin-like venom enzymes: structure and purification[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 281:165-175.
- [2] Markland F S. Snake venoms and the hemostatic system[J]. *Toxicon*, 1998, 36:1749-1800.
- [3] Yang Q, Hu X J, Xu X M, et al. Expression, purification and partial characterization of recombinant defibrinase, a thrombin-like enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29:390-393.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual 2nd*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Koh Y S, Chung K H, Kim D S, et al. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom[J]. *Toxicon*, 2001, 39:555-560.
- [6] Madea M, Satoh S, Suzuki S, et al. Expression of cDNA for batroxibin, a thrombin-like snake venom enzyme[J]. *J Biochem*, 1991, 109:632-637.
- [7] Li M, Yang Q, Bao Y M, et al. Study progress on snake venom thrombin-like enzyme[J]. *Life Science Research*, 2002, 6: 61-66.
- [8] Anni L, Frank N, Garabed A, et al. Single-step purification of a recombinant thermostable α -amylase after solubilization of the enzyme from insoluble aggregates[J]. *J Chrom B*, 2000, 737:253-259.
- [9] Fan C Y, Qian Y C, Yang S L, et al. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the cDNA of the thrombin-like enzyme(pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*[J]. *Biochem Molec Biol Inter*, 1999, 47:217-225.

(责任编辑:李春丽)