

文章编号:1673-1689(2006)06-0119-05

在大肠杆菌中融合表达重组羧肽酶抑制剂

许大洲¹, 王树英², 金坚¹, 李华钟^{*1,3}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 分析测试中心, 江苏 无锡 214036; 3. 江南大学 医学系, 江苏 无锡 214063)

摘 要: 利用 PCR 技术扩增得到编码土豆羧肽酶抑制剂(carboxypeptidase inhibitor from potato, CPI)活性多肽基因, 克隆于表达载体 pGEX-4T-1 的多克隆位点中, 得到重组质粒 pGCPI, 测序后将重组质粒转化到受体菌 *Escherichia coli* BL21 中。重组菌经 IPTG 诱导表达, 超声波破菌后, 通过谷胱甘肽 sepharose FF 亲和层析柱一步纯化得到融合蛋白, 纯度大于 97%。融合蛋白经凝血酶切割并分离除去谷胱甘肽-S-转移酶后得到纯度大于 98% 的重组 CPI, ELISA 鉴定产物具有免疫原性, 体外检测表明其促进纤溶的生物功能与天然 CPI 无明显差异。

关键词: 重组; 土豆羧肽酶抑制剂; 融合表达; 纤溶

中图分类号: O 657.7

文献标识码: A

Fusion Expression of Recombinant Carboxypeptidase Inhibitor in *Escherichia coli*

XU Da-zhou¹, WANG Shu-ying², JIN Jian¹, LI Hua-zhong^{*1,3}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Testing & Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. School of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214063, China)

Abstract: The gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor was amplified by polymerase chain reaction, and cloned into PGEX-4T-1 vector. The recombinant expression plasmid pGCPI was sequenced and was transformed to *Escherichia coli* BL21. reCPI-GST fusion protein expressed after IPTG induction was purified by glutathione Sepharose FF affinity chromatography. The purity of reCPI-GST reach at 97%. Purified reCPI was isolated after cleavage from fusion protein with thrombin. Elisa assays showed that reCPI bound with CPI antibody. There was no evident difference between reCPI and natural CPI in carboxypeptidase B inhibitory which enhance fibrinolysis in vitro.

Key words: recombinant; carboxypeptidase inhibitor; fusion expresion; fibrinolysis

土豆羧肽酶抑制剂(carboxypeptidase Inhibitor from Potatoes, CPI)是一种由 39 个氨基酸残基组

成的球状多肽, 相对分子质量为 4 300, 其最初从土豆中被分离纯化^[1]。近年来研究发现, CPI 可以专

收稿日期: 2006-01-16; 修回日期: 2006-05-20.

作者简介: 许大洲(1981-), 男, 江苏盐城人, 微生物学硕士研究生; * 为通讯作者.

一地抑制羧肽酶 A(CPA)和羧肽酶 B(CPB),后者也称凝血酶活化的纤溶抑制剂(thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI)^[1-2]。被激活的 TAFI(TAFIa)能抑制纤溶酶原生成纤溶酶,从而抑制纤溶系统的启动。CPI 作为 TAFIa 的特异性抑制物,有可能成为理想的辅助溶栓药物,克服目前临床溶栓药物使用过程中安全剂量过窄、容易引起出血的缺陷,因此再次受到广泛关注^[3]。目前获得土豆羧肽酶抑制剂主要从土豆中提取得到,分离繁琐,得率较低。Molina^[4]等曾通过人工合成 *cpi* 基因构建分泌表达质粒并在 *E. coli* 中成功表达具有生物活性的重组 CPI(reCPI),但从培养液中分离纯化 reCPI 步骤多,收率低。作者报道了通过在大肠杆菌中融合表达而制备 reCPI 的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 质粒 pGEX-4T-1 和 *E. coli* BL21、*E. coli* XL-1 Blue 均由本实验室保藏。

1.1.2 酶与试剂 限制性内切酶、DNA 连接酶、LA Taq DNA 聚合酶:购于日本 Takara 公司;凝血酶:北京鼎国生物技术公司产品;IPTG:购于日本 Nacalai Tesque 公司;羧肽酶抑制剂(CPI)、羧肽酶 A(CPA)、组织纤溶酶原激活物(tPA):购于 Sigma 公司;丙烯酰胺, N,N'-亚甲基双丙烯酰胺:Promega 公司产品;苯甲酰甘氨酸-L-苯丙氨酸,四甲基乙二胺(TEMED):Fluka 公司产品;血栓调节蛋白(TM):美国 ICN 公司产品;兔抗血清 CPIIgG:江南大学生物制药研究室提供^[5];带辣根过氧化物酶的山羊抗兔 IgG-HRP:购于上海华美生物工程公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪:BIOMETRA 公司产品;谷胱甘肽-S-转移酶亲和层析预装柱:北京卓冠科技公司产品;垂直板电泳仪 Bio-rad Mini protein 3:Bio-rad 公司产品;生物电泳图像分析系统 FR-980:上海复日科技有限公司产品;spectra max plus 384 光谱仪:美国 Molecular Devices 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析 参照文献[6-7]进行。

1.2.2 PCR 扩增 根据土豆 CPI 编码基因的 DNA 序列^[4]设计下列引物:

引物 1:5'-AAGGATCCGAACAGCACGCCGATCCGATCTGCAACAAACCGTGCAAGACTCACGACGACTGCTCCGGCGCTTGGTTCT 3'

引物 2:5'-AAGTCGACTTAACCAACGTA CGGGCCGCAGGTACGAGCGCTGTTCCAGC AGGCTTGGCAGAACCAAGCGCCGGAGCAG3'

引物 1 的 5'端含 *Bam*HI 酶切位点,引物 2 的 5'端含 *Sal*I 酶切位点。

50 μ L 反应体系中有 PCR 缓冲液 5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 8 μ L, 两种引物分别为 20 pmol, 0.5 μ L LA Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}C$ 变性 3 min, 扩增反应 10 个循环(94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}C$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min), 72 $^{\circ}C$ 10 min。

1.2.3 重组大肠杆菌的培养条件及融合蛋白的诱导表达 分别将含重组菌株 *E. coli* BL21(pGCPI) 和 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1)接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}C$ 下振荡培养 14~16 h, 然后以 5% 的接种量接至新鲜的 LB 培养基中, 振荡培养至 A_{600} 为 0.5~0.7 时加入 1 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导 4 h, 离心收集菌体。

1.2.4 rePCI 的分离和纯化 将收集到的 *E. coli* BL21(pGCPI)菌体用 PBS 洗涤一次后再悬浮于 1/5 体积的 PBS 中, 冰浴超声破碎(功率 350 W, 工作 1 s, 间隙 3 s, 共 180 次), 细胞破碎液经 12 000 r/min 离心 30 min, 上清液通过 0.45 μ m 滤膜过滤去除不溶物, 将滤液以 0.5 mL/min 的体积流量过谷胱甘肽 Sepharose FF 亲和层析柱, 用 PBS 洗柱, 然后用 3 个床体积的洗脱缓冲液(含质量分数 0.6% 还原性谷胱甘肽的 PBS)以 0.2 mL/min 的流速洗脱 reCPI-GST 融合蛋白, 经过截留分子量为 10 000 的透析膜 PBS 缓冲液透析过夜后, 将融合蛋白于 PBS 缓冲液中按每 100 μ g 融合蛋白 1 U 的量加入凝血酶, 于 20 $^{\circ}C$ 放置 16 h 对融合蛋白进行消化, 然后将其再次通过 GSH 亲和层析柱收集流出液以除去 GST, 并经过截留分子量为 10 000 的超滤膜超滤去除凝血酶, 收集流出液经冷冻干燥得到 rePCI 样品。

1.2.5 蛋白质浓度测定 以牛血清白蛋白(BSA)为标准, 采用 Bradford 法测定^[8]。

1.2.6 reCPI 的 ELISA 鉴定 以兔抗血清 CPI-IgG 为一抗, 带辣根过氧化物酶的山羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯二胺)为显色底物, 检测所表达蛋白的抗原性^[9]。

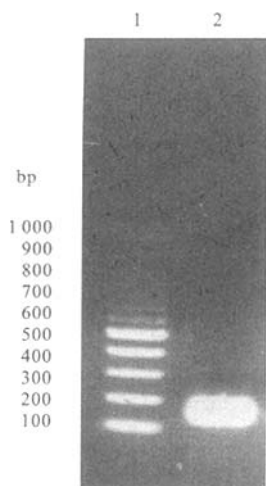
1.2.7 reCPI 的促进纤溶活性检测 在 96 孔微孔板中分别加入含血栓调节蛋白(TM)2 mmol/L、组织纤溶酶原激活物(tPA)100 ng/mL 及 CPI 与 reC-

PI 的复钙 (CaCl_2 20 mM) 枸橼酸钠抗凝血浆 200 μL 。以不添加 TM 组作为对照,将 96 孔板置于微孔板连续光谱分光光度计上,控制温度 37 $^{\circ}\text{C}$,于 405 nm 处持续测定 A_{405} ,整个反应时间约 2.5 h,测定间隔 2 min^[10]。

2 实验结果

2.1 重组质粒 pGCPI 的构建和鉴定

PCR 扩增产物以琼脂糖电泳检测,结果见图 1。结果表明位于 100~200 bp 之间有一明显条带,与期望扩增的 *cpi* 结构基因 (136 bp) 长度相符,且特异性较高。



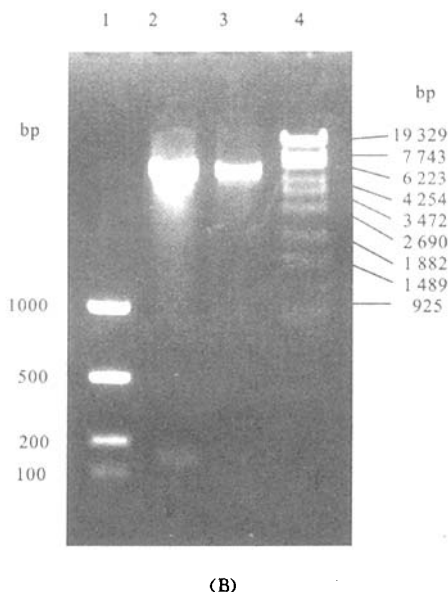
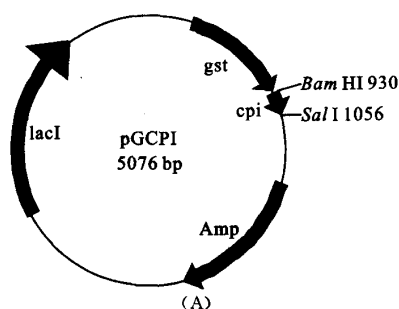
1. 标准相对分子质量;2. *cpi* 结构基因扩增产物

图 1 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR product

将经 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切、胶回收纯化后的 PCR 产物与用 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切、胶回收的表达载体 pGEX-4T-1 片段连接,转化 *E. coli* XL1-Blue 感受态细胞,并挑选阳性转化子 *E. coli* XL1-Blue (pGCPI)。

接种 *E. coli* XL1-Blue (pGCPI) 于含 Amp 的 LB 液体培养基中培养 12 h 后进行质粒提取。提取所得的重组质粒 pGCPI 图谱及酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 2。由图可见,用 *Bam*HI 单酶切 pGCPI 得到约为 5.08 kb 的片段;用 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切 pGCPI 得到 130 pb 的 *cpi* 结构基因片段以及 4.95 kb 的 pGEX-4T-1 片段;同时,用 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切表达载体 pGEX-4T-1 得到 4.95 kb 的大片段,测序结果表明,所克隆的 *cpi* 基因与文献报道^[7]一致,证明重组表达质粒构建成功。



(B)

1, 4. 标准相对分子质量;2. pGCPI/*Bam*HI 酶切;3. pGEX-4T-1/*Bam*HI+*Sal*I 酶切

图 2 表达载体 pGCPI 图谱(A)及其酶切鉴定(B)

Fig. 2 Map (A) and double digestion(B) of pGCPI

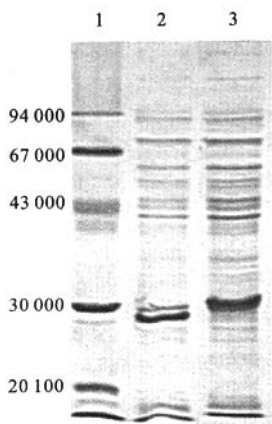
2.2 reCPI-GST 融合蛋白的表达

将 pGEX-4T-1 和 pGCPI 分别转化进 *E. coli* BL21, 各挑选一阳性转化子,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养经 IPTG 诱导后,离心收集菌体,经 PBS 悬浮后进行超声波破碎,取上清进行 SDS-PAGE 分析。从图 3 的结果可以看出对照菌 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-1) 在相对分子质量 27 900 处的谱带为 GST,而重组菌 *E. coli* BL21 (pGCPI) 有一条明显的蛋白表达条带,其相对分子质量与 reGST-CPI 对应(应为 30 592),经生物电泳图像分析系统分析得知,融合蛋白 reGST-CPI 约占总蛋白质质量的 22.6%,说明 reGST-CPI 表达较好。

2.3 reCPI 的纯化

将经超声波破碎后的细胞上清液经过谷胱甘肽 sepharose FF 亲和层析柱,绝大部分 reGST-CPI 融合蛋白被结合到柱子上并进而被洗脱下来,经生物电泳图像分析系统分析得知获得的 reCPI-GST

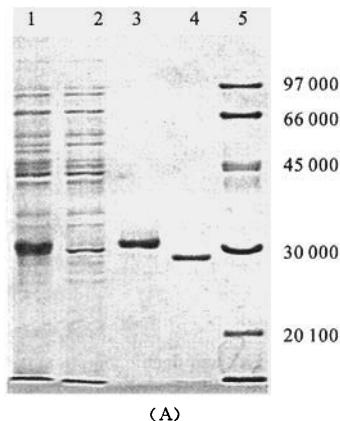
纯度大于97%。凝血酶切除 GST 后经进一步分离纯化得到 reCPI, 经生物电泳图像分析系统分析, 显示纯化 reCPI 的纯度为 98% 以上。



1. 相对分子质量标准; 2. *E. coli* BL21(pGEX-4T-1); 3. *E. coli* BL21(pGCPI)

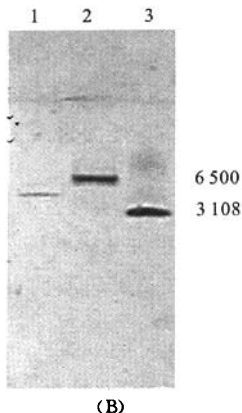
图3 表达 reGST-CPI 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of expressed reGST-CPI



(A)

1. BL21(pGCPI)破碎上清液; 2. 流出液; 3. 洗脱 reGST-CPI 蛋白; 4. GST 蛋白对照; 5. 相对分子质量标准



(B)

1. 纯化的 reCPI; 2. 抑肽酶; 3. 胸腺素 $\alpha 1$

图4 reGST-CPI(A)与 reCPI(B)的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE of reGST-CPI(A) and reCPI(B)

2.4 reCPI 的 ELISA 检测

ELISA 检测结果显示所获得的 reCPI 能与兔抗血清 CPIIgG 呈显色反应, 与正常兔血清没有显色反应。在同一抗血清浓度下, 随着包被蛋白质的增加而显色反应颜色加深; 在包被同一蛋白质浓度下, 显色反应随抗血清浓度的增加而加深。证明了所获得的 reCPI 蛋白质具有 CPI 的抗原性。

2.5 reCPI 的促纤溶作用

纤溶过程是通过添加 tPA 诱导实现的, 当添加 TM 后, TM 通过凝血酶激活了 TAFIa, 因此延缓了纤溶。添加 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CPI 后, TAFIa 的活性被抑制, 纤溶时间恢复为未加 TM 的水平。reCPI 的促纤溶作用测定结果(图 5)表明, 添加相同质量浓度(5 $\mu\text{g/mL}$)的 reCPI 后, 其促纤溶作用与对照组(添加天然 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CPI)无明显差异。

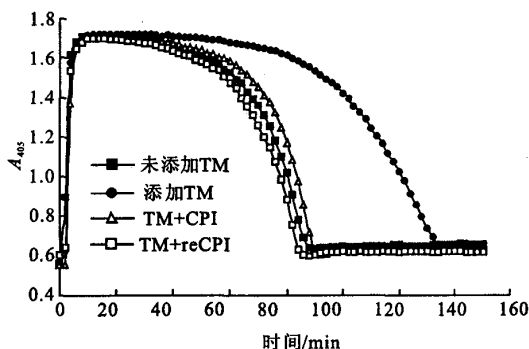


图5 添加 reCPI 对纤溶过程的影响

Fig.5 Effect of reCPI on fibrinolysis

3 结 论

融合蛋白 reGST-CPI 中的 CPI 部分在 *E. coli* 中能够折叠形成具有生物活性的形式, 同时由于具有 GST 的存在, 采用谷胱甘肽 Sepharose FF 亲和层析可较容易地分离纯化 reGST-CPI 融合蛋白, 达到简化蛋白纯化过程的目的。reGST-CPI 经凝血酶切除 GST 后在 reCPI 的 N 末端比天然 CPI 多出 Gly-Ser 两个氨基酸残基, 也不影响其对羧肽酶 A 和羧肽酶 B 活性的抑制, 因为 CPI 的作用机制是通过其 C 末端氨基酸残基插入到 CPA 和 CPB 的活性位点形成塞状结构而终止 CPA 和 CPB 的酶活性, CPI 的 N 末端氨基酸残基对其抑制活性作用不显著, 因为在其 N 末端增加 10 个氨基酸残基或切除 1-5 个氨基酸残基后也不会影响 CPI 的生物活性^[4]。在此基础上, 可运用蛋白质工程对得到的短肽进行人工进化, 以期获得具有更高生物活性的短肽, 为开发新型羧肽酶抑制剂打下基础。

参考文献:

- [1] Hass G M, Ryan C A. Carboxypeptidase inhibitor from potatoes[J]. *Methods in Enzymology*, 1982, 80:788—791.
- [2] Bajzar L, Manuel R, Nesheim M E. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:14477—14484.
- [3] Bouma B N, Marx P F, Mosnier L O, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor(TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U)[J]. *Thromb Res*, 2001, 101(5): 329—354.
- [4] Molina M A, Aviles F X, Querol E. Expression of a synthetic gene encoding potato carboxypeptidase inhibitor using a bacterial secretion vector[J]. *Gene*, 1992, 116:129—138.
- [5] 陈永发,孙钧铭,唐瑜菁,等. 马铃薯中羧肽酶抑制剂的放射免疫分析[J]. *中国医药工业杂志*, 2005, 36(7): 402—404.
- [6] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] 石继红,赵永同,张英起,等. 应用 SDS-PAGE 显示小分子多肽技术的探讨[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(1):38—40.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein Utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248—254.
- [9] 朱丽平. *常用免疫学实验方法*[M]. 北京:人民军医出版社, 2000.
- [10] Leurs J, Nerme V, Sim Y, et al. Carboxypeptidase U (TAFIa) prevents lysis from proceeding into the propagation phase through a threshold-dependent mechanism[J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2:416—423.

(责任编辑:朱明)

(上接第101页)

3) 锌的浸出研究表明, HB524 中的锌可以缓慢释放, 并且 95.5% 的锌可以被 EDTA 洗涤置换出来。采用细菌鉴定中产 H_2S 的实验^[12]后, 排除

了 ZnS 沉淀的可能, 加上发酵中酸性条件的保证, 可以认为用去离子水充分震荡后, 细胞中接近 50% 的锌是以有机态形式存在的。

参考文献:

- [1] 苏琪,段玉琴,刘金旭,等. 我国畜禽饲料重微量元素锌含量的调查研究[J]. *中国农业科学*, 1994, 27(2):83—88.
- [2] 于景芝. *酵母生产与应用手册*[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005. 243—463.
- [3] Demirci A, Pometto A L. Enhanced organically bound chromium yeast production[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:531—536.
- [4] Ponce C A, Bayon M M, Paquin C, et al. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods[J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 92:602—610.
- [5] 李卓棣,喻子牛,何绍江. *农业微生物实验技术*[M]. 北京:中国农业出版社, 1996. 45—46.
- [6] 陈佩林,詹文毅,叶辉. 含锌酵母的培养研究[J]. *动物医学进展*, 2003, 24(3):62—64.
- [7] 丁文军,钱琴芳,柴之芳,等. 富铬酵母中铬的化学种态及结合形态研究[J]. *分析化学*, 1999, 27(9):1061—1064.
- [8] 朱靖环,沈秋泉,杨建明,等. 啤酒酵母富铬条件的初步研究[J]. *食品研究与开发*, 2004, 25(2):49—52.
- [9] 郭雪娜,傅秀辉,何秀萍,等. 富锌酵母的选育及培养条件研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(2):240—243.
- [10] White C, Gadd G M. The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Gen Microbiol*, 1987, 133:727—737.
- [11] 张之申,郭锡勇,李向东,等. 锌酵母中酵母多糖组分的分离纯化和分析[J]. *微量元素与健康研究*, 1995, 12(1):48—49.
- [12] 赵斌,何绍江. *微生物学实验*[M]. 北京:科学出版社, 2002. 154—155.

(责任编辑:李春丽)