

Hirulog 18 在大肠杆菌中的表达及其生物学活性检测

王旻东, 孙自勇, 陈俊勇, 邓华玲, 王莹, 唐艳春, 刘建宁

(南京大学分子医学研究所, 江苏 南京 210093)

[摘要] 以化学合成的 Hirulog 18 基因为模板, 经 PCR 扩增、限制性内切酶 Xho I 和 Kpn I 消化, 将编码 Hirulog 18 的基因片断插入表达载体 pET-32b 中编码硫氧化还原蛋白 (Trx) 基因序列的下游。用重组质粒转化感受态大肠杆菌-BL21 (DE3), 并用 IPTG 诱导表达 Trx-Hirulog 18 融合蛋白。复性、肠激酶酶切、Ni-Sepharose 和 HPLC 纯化后, 用质谱测定其分子量并进行活性测定。检测结果表明构建的 PET-32b/Hirulog 18 能够在大肠杆菌中高效表达, 表达的 Hirulog 18 具有较低的凝血酶抑制活性并能够竞争抑制 Angiomax 活性。

[关键词] Hirulog 18, 克隆, 表达, 融合蛋白, HPLC, 抑制

[中图分类号] Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0081-04

Expression of Hirulog 18 in *E. coli* and the Test of its Biological Activity

Wang Mindong, Sun Ziyong, Chen Junyong, Deng Hualing,
Wang Ying, Tang Yanchun, Liu Jianning

(Institute of Molecular Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Hirulog 18 DNA fragment chemically synthesized is amplified with PCR and digested with restriction endonuclease: Xho I and Kpn I, and inserted into the prokaryotic expression vector pET 32b. The host cell strain BL21 (DE3) transformed with recombinant plasmid Hirulog 18/Trx is induced at 37°C to express the recombinant product. Having been renaturalized, the fusing protein product is digested with enterokinase, purified by Ni-sepharose and HPLC. Hirulog 18 gene product is identified by MS. The activity assay is also performed. These results show the designed plasmid PET-32b/ Hirulog 18 can be expressed successfully in *E. coli*, and the gene product has a weak inhibitory activity against thrombin and competes with Angiomax.

Key words: Hirulog 18, clone, expression, fusing protein, HPLC, inhibition

双价水蛭素变体 (Angiomax) 是一个由化学方法合成的二十肽: D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginyl-L-prolyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-L-asparagyl-glycyl-L-aspartyl-L-phenyl-alanyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-isoleucyl-L-prolyl-L-glutamyl-L-glutamyl-L-tyrosyl-L-leucine, 相对分子质量为 2180 daltons^[1]。

Angiomax 直接抑制凝血酶活性是通过与凝血酶的活性位点以及离子结合位点 (ABE) 结合来实现的。Angiomax N-端 D-Phe-Pro-Arg-Pro 域同凝血酶活性位点结合, C-端十二肽域是 Hirudin C-端类似物, 同凝血酶的 ABE 位点结合, Angiomax 的这两个结合位点以 4 个甘氨酸残基相连。Angiomax 同凝血酶的结合是可逆的, 凝血酶可缓慢断裂 Angiomax-Arg3-Pro4 键, 之后碳端十二肽离去, 凝血酶可以重新发挥作用^[2]。

Angiomax 作为一种静脉抗凝剂, 与阿司匹林联合使用, 用于治疗血管成形术患者不稳定性心绞痛。同传统药物肝素相比较, Angiomax 的优势是既能抑制与血块结合, 又能抑制游离的凝血酶活性, 并不被血小板的分泌产物所阻断^[3]。大量的临床实验证明对于血管成形术或急性冠状动脉综合症病人, Angiomax 至少与高剂量肝素具有相同的疗效, 且其出血倾向明显低于肝素^[4]。

收稿日期: 2005-09-16.

基金项目: 南京大学分子医学研究所基金项目.

作者简介: 王旻东, 1976—, 南京市公安局法医中心法医, 主要从事刑事 DNA 的检测与鉴定. E-mail: wangmd7611@sina.com

通讯联系人: 刘建宁, 1962—, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管发病及血栓的分子机理的研究. E-mail: jianingliu2000@yahoo.com

本文研究的 Hirulog 18, 是将 Angiomax N-端的 D-Phe-和 L-Pro-去除, 以检测其 N-端 D-Phe-和 L-Pro-对其活性的影响, 并为合成全长的 Angiomax 提供中间原料。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌扩增菌株 DH 5 α 、大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 由本实验室保存, 大肠杆菌表达载体 pET 32b 购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 Xho I 和 Kpn I、T4 DNA Ligation Kit、Taq 酶、dNTP、DNA marker DL2000 购自 Takara 公司。Hirulog 18 模板(连有 Xho I 和 Kpn I 核酸内切酶位点以及肠激酶酶切位点)由 Invitrogen 公司合成, PCR 引物由北京生工技术有限公司合成。柱式离心式胶回收试剂盒购自鼎国公司。BCA Protein Assay Kit 购自 Pierce 公司。其它所需试剂为国内分析纯常用试剂。

1.3 基因模板及引物的设计和合成

化学合成的 Hirulog 18 基因模板序列为: GGT ACC GAC GAC GAT GAC AAG CGA CCA GGA GGA GGA GGA GAT GGT GAT TTC GAA GAA ATC CCA GAG GAG TAC CTG TAA CTC GAG

PCR 扩增的上游和下游引物分别为:

5' ctg ggt acc gac gac gac gac aag gcc atg

5' cta ctc gag gcg cgg cac cag gcc gct gc

其中, GGTACC 和 CTCGAG 分别为 Kpn I 和 Xho I 酶切位点, GACGACGATGACAAG 序列编码肠激酶的酶切位点。

1.4 基因扩增和克隆以及重组质粒的鉴定

PCR 扩增目的基因的程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 28 次。用 Xho I/Kpn I 双酶切 PCR 扩增产物及表达载体 pET 32b, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳纯化回收酶切产物, 混匀, 加入 T4 DNA 连接酶, 置 16 $^{\circ}$ C 反应过夜。

将连接产物转化大肠杆菌 DH 5 α , 并将转化细菌涂在含 50 μ g/mL ampicillin 的琼脂糖平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜^[5]。挑取单克隆, 用 PCR 和 Xho I/Kpn I 双酶切鉴定。将 PCR 和双酶切鉴定正确的克隆进行 DNA 测序分析。

1.5 pET 32b/Hirulog 18-Trx 融合蛋白的表达及其 SDS-PAGE 分析

将含有正确 DNA 序列的重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑单克隆于 LB 培养基中(含 50 μ g/mL ampicillin), 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 培养过夜。取过夜菌液按 1:50 接种, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0, 诱导 4 h。收集的菌体以 5% 堆积胶和 13.5% 分离胶分析^[6]。

1.6 融合蛋白的提取、纯化和剪切以及 HPLC、MS 分析

将收集的菌体按 1 g 菌体 10 mL 1 \times binding buffer 1 (6 mol/L 盐酸胍、20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl、0.5 mmol/L PMSF、5~10 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0) 的比例溶解, 超声破碎, 18 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心, 收集上清。将收集的上清以 Ni-Sepharose 纯化后, 以 1 \times binding buffer 2 (8 mol/L Urea、20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl、10 mmol/L β -巯基乙醇、5 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗涤, 以 1 \times binding buffer 2 + 100 mmol/L 咪唑洗脱。洗脱的融合蛋白溶于 40 倍体积的复性液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L GSSG, 1 mmol/L GSH, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 4 $^{\circ}$ C 静置过夜。

融合蛋白以肠激酶酶切, 酶切产物以 Ni-Sepharose 纯化, 收集穿过液。收集的穿过液以 HPLC 纯化, 并以 MS 鉴定。

1.7 生物学活性检测

将 Angiomax 标准品溶于 buffer A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 至 40 μ g/mL, Hirulog 18 也溶于 buffer A 至 4 mg/mL。凝血酶溶于 ddH₂O 至 1 IU/mL, Chromozym TH 溶于 ddH₂O 至 2 mmol/L。将样品与 10 μ L Thrombin 溶液混合, 加入 buffer B (50 mL A + 50 mg BSA + 150 mmol/L NaCl) 至终体积为 90 μ L。将混合体系在 37 $^{\circ}$ C 中温育 30 min, 然后加入 10 μ L Chromozym TH 溶液, 405 nm 读数。

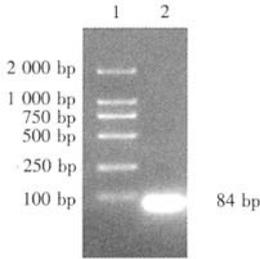
2 实验结果

2.1 Hirulog 18 基因片段的扩增

将化学合成的 Hirulog 18 模板用 PCR 扩增,PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳,所得条带的大小与预期值一致(图 1)。

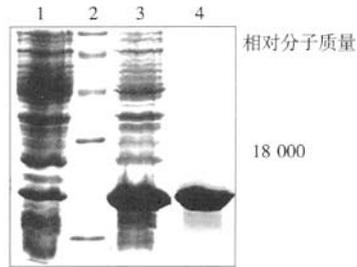
2.2 表达产物的分析

将含有正确 DNA 序列的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导,融合蛋白的表达效率达 25%,融合蛋白的相对分子质量为 18 000(图 2)。经 Ni-Sepharose 亲和纯化后,融合蛋白的纯度达 85% 以上(图 2)。



Lane 1: DNA markers; Lane 2: PCR 产物

图 1 Hirulog 18/Trx PCR 结果



Lane 1: control(未加 IPTG 诱导); Lane 2: 蛋白 markers

Lane 3: Hirulog 18/Trx 融合蛋白经 IPTG 诱导表达;

Lane 4: Hirulog 18/Trx 融合蛋白

图 2 Hirulog 18/Trx 融合蛋白的诱导表达

2.3 融合蛋白的酶切

肠激酶可以将融合蛋白 Hirulog 18'-Trx 酶解,产生 Hirulog 18 和 Trx. Trx 由于相对分子质量比融合蛋白小 2 000 左右,因而在电泳中比融合蛋白具有更快的迁移率. Hirulog 18 由于相对分子质量比较小,且易扩散,在凝胶中未能显示染色条带.(图 3)

2.4 MS

肠激酶酶切产物经 Ni-Sepharose 和 HPLC 纯化后,用质谱 MS 测定 Hirulog 18 的相对分子质量,结果见图 4。(其中 966.9 为半相对分子质量峰,1934.5 为 Hirulog 18 全相对分子质量峰。)

2.5 Hirulog 18 的生物学活性以及对 Angiomax 的竞争抑制

相对于 Angiomax,800 倍浓度的 Hirulog 18 对凝血酶产生几乎相同的抑制(图 5);图 6 表明,100 倍浓度的 Hirulog 18 对 Angiomax 能够形成显著的竞争抑制。



Lane 1: 肠激酶酶切后所得的 Trx;

Lane 2: Hirulog 18/Trx 融合蛋白

图 3 融合蛋白酶切的 SDS-PAGE

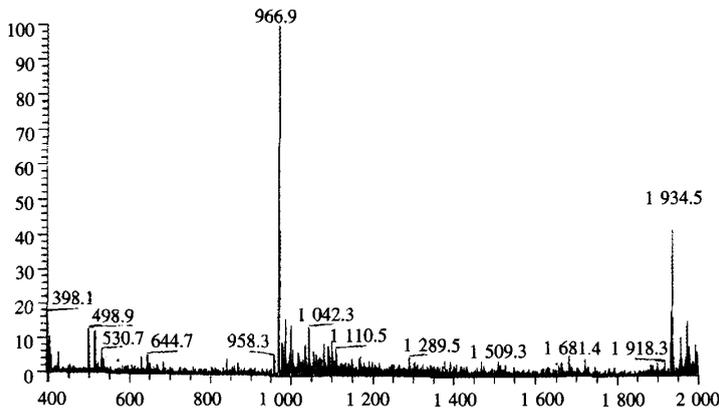


图 4 MS of Hirulog 18

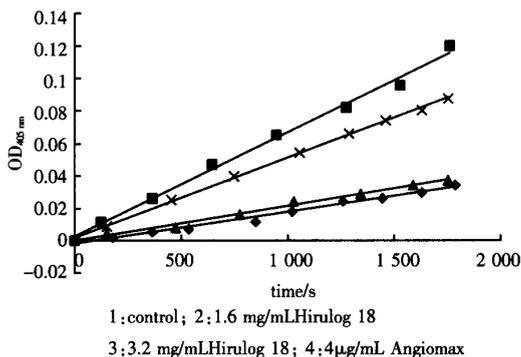


图 5 Hirulog 18 对 thrombin 抑制

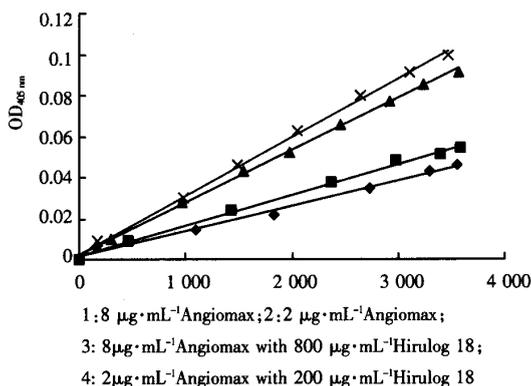


图 6 Hirulog 18 对 Angiomax 的竞争抑制

3 讨论

本文以基因工程的方法替代化学合成,以 pET 32b 作为表达载体,成功地构建了 pET 32b/Hirulog 18 重组质粒. 因为 Hirulog18 相对分子质量只有 2 000,因而在基因构建时,与 Trx 相连,这样表达成 Hirulog18/Trx 融合蛋白,相对分子质量达到 20 000,从而便于 SDS-PAGE 鉴定. 为了方便纯化,我们选择将基因连上 His tag,并且将 His 与 Trx 相连,在 Trx 和 Hirulog18 基因中间连上肠激酶位点,这样重组蛋白表达后,能够以 Ni-Sepharose 方便的纯化,肠激酶酶切后,再次以 Ni-Sepharose 纯化,这时,Trx 结合在柱子上,而 Hirulog18 在穿过液中,从而得以分开.

本文的结果说明重组质粒能够在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中高效表达, Ni-Sepharose 纯化后,纯度很高. 肠激酶酶切后,以 HPLC 进一步纯化,并用 MS 鉴定. 活性检测结果表明,基因工程方法表达的 Hirulog 18 对凝血酶的抑制活性显著低于 Angiomax,说明 N 末端的 D-Phe-L-Pro 对 Angiomax 的生物活性极其重要. 此外, Hirulog 18 能够减弱 Angiomax 对凝血酶的抑制作用. 和化学合成的 Hirulog18 相比,活性基本一致(化学合成由本实验室完成).

相对于化学合成,用基因工程方法制备具有较低的生产成本,不产生环境污染,并具有类似的纯度和活性. 因而基因工程方法可用于制备 Hirulog 18,以供进一步的研究之用.

[参考文献]

[1] Maraganore J M, Bourdon P, Jablonski J, et al. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin[J]. *Biochemistry*, 1990, 29: 7095 - 7101.

[2] Witting J I, Bourdon P, Breznjak D V, et al. Thrombinspecific inhibition by and slow cleavage of hirulog-1[J]. *Biochem J*, 1992, 283: 737 - 743.

[3] Maraganore J M, Chao B H, Weitz J I, et al. Comparison of antithrombin activities of heparin and Hirulog-1: Basis for improved antithrombotic properties of direct thrombin inhibitors[J]. *Thromb Haemost*, 1991, 65: 829.

[4] Marbet G A, Verstraete M, Kienast J, et al. Clinical pharmacology of intravenously administered recombinant desulfatohirudin (CGP 39393) in healthy volunteers[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 22: 364 - 372.

[5] 萨姆布鲁斯克 J, 拉塞尔 D W, 著. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[6] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[责任编辑:孙德泉]