

一种来源于链霉菌的纤溶酶的纯化及其基因的克隆

龚 勇 王以光*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究 所 北京 100050)

摘 要:链霉菌 C3662 的发酵液上清经 80% 硫酸铵沉淀, DEAE-Sepharose 和 CM-Sepharose 层析分离后纯化出一种纤溶酶。SDS-PAGE 显示为单一的条带, 分子量约为 30kD。以 pIJ699 为载体, *S. lividans* TK24 为宿主菌, 鸟枪法克隆纤溶酶基因, 从 3000 个转化子中挑选到 1 个具活性转化子, 经亚克隆, 序列测定得到一个 903bp 的完整 ORF, 其 GC% 为 68.33%, 密码子第三位 GC% 为 95.6%, 符合链霉菌基因的典型特征。与多种蛋白酶具有较高的同源性。

关键词: 纤溶酶, 纯化, 鸟枪克隆, 链霉菌

中图分类号: Q939.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 02-0186-05

溶栓药物由第一代的链激酶和尿激酶^[1]发展至第二代的组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(scu-PA)和乙酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物(APSAC), 但在血栓再通率, 所要求的给药方式及引起出血等不良反应方面仍有许多缺点^[2]。所以, 从更广泛的范围内寻找新的溶栓药物, 并深入研究其作用机理和构效关系可以拓宽对溶栓药物进行改造的思路。链霉菌是产生各种具生理活性物质的重要资源, 链霉菌 C3662 是本实验室筛选到的能产生纤溶活性物质的菌株, 本文报道了其发酵液中纯化纤溶酶的方法及其编码基因的克隆。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 DH5 α ^[3]为克隆的宿主菌, 产生纤溶酶的链霉菌 3662 由本室筛选得到, 变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* TK24^[4], 大肠杆菌/链霉菌穿梭质粒 pIJ699^[5], pUC18^[3]和 pBluescriptSK^[3]为本室保藏。

1.1.2 培养基:LB 培养基按文献[3]配制, 发酵培养基的配方为葡萄糖 25g、可溶性淀粉 10g、黄豆饼粉 20g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄ 0.5g、CaCO₃ 3.0g, 定容至 1L, pH7.0(用作固体培养时加 1.2% 琼脂)。

1.1.3 抗生素:氨苄青霉素(Amp), 硫链丝菌素(Tsr)。

1.1.4 酶和试剂:所用限制性内切酶和 T4DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品, X-gal、IPTG 和蛋白分子量标准为 Promega 公司产品。凝血酶、牛血纤维蛋白和尿激酶(标准品)是中国药品生物制品检定所产品, DEAE-Sepharose 和 CM-Sepharose 是 Pharmacia 公

* 联系作者

作者简介:龚 勇(1971-), 男, 湖北人, 博士研究生, 主要从事分子生物学研究。

收稿日期:2000-01-31, 修回日期:2000-04-20

司产品。

1.2 方法

1.2.1 纤溶酶活性的检测:参照文献[4]方法进行,以尿激酶标准品为标准。

转化子纤溶活性的检测:转化子点种至牛津杯中的固体发酵培养基中,28℃培养 8d 后,将牛津杯置于纤维蛋白平板上于 37℃保温 16h。观察纤维蛋白平板上是否有透明圈出现。

1.2.2 纤溶酶的发酵:接种链霉菌孢子悬液于 250mL 三角瓶内的 50mL 发酵培养基中,28℃培养 2d,再接种至 5L 三角瓶内的 1L 发酵培养基中。28℃培养 4d。离心收集发酵液上清即得粗酶液。

1.2.3 蛋白电泳:浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,参照文献[3]进行。

1.2.4 链霉菌总 DNA 的提取:参照文献[6]进行。

1.2.5 链霉菌原生质体制备与转化:参照文献[6]进行。

1.2.6 DNA 测序:采用通用引物在 PE 公司的荧光自动测序仪上进行。

2 结果和讨论

2.1 新型纤溶酶的分离纯化

链霉菌 3662 的发酵液于 4000r/min,离心 30min,上清加入硫酸铵至 80%饱和度,用 3mol/L 氨水调节 pH 值至 8.0,4℃静置过夜,8000r/min,离心 30min,收集沉淀,溶于蒸馏水中,经 pH8.0 50mmol/L 磷酸盐缓冲液透析。将透析后的样品上预先用 pH8.0 50mmol/L 磷酸盐缓冲液平衡的 DEAE-Sepharose 柱(2.6cm×52cm),用同样缓冲液洗脱,收集活性部分洗脱液,12%SDS-PAGE 显示样品为两条分子量约为 40kD 和 30kD 的多肽链(图 1),其中 30kD 大小的多肽链的量与样品的活性强弱成正相关。样品冷冻干燥后溶于蒸馏水,经 pH6.0 20mmol/L 磷酸盐缓冲液充分透析,上用同样缓冲液平衡的 CM-Sepharose 柱(1.4cm×21cm),用相同缓冲液进行线性梯度洗脱(NaCl 浓度从 0~0.5mol/L),收集活性部分洗脱液,12%SDS-PAGE 显示样品为单一的 30kD 大小的多肽链(图 2),样品冷冻干燥后即得纯酶。

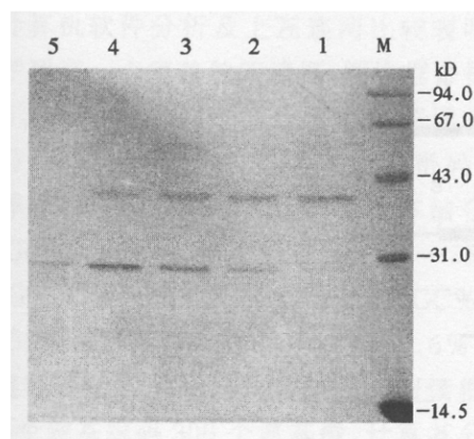


图 1 DEAE-Sepharose 柱纯化后的纤溶酶凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE pattern of the purified protease after DEAE-Sepharose

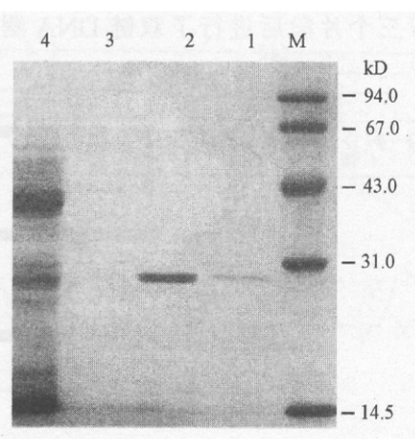


图 2 CM-Sepharose 柱纯化后的纤溶酶凝胶电泳图

Fig.1 SDS-PAGE pattern of the purified protease after CM-Sepharose

2.2 纤溶酶基因的克隆

2.2.1 鸟枪法克隆纤溶酶基因:在鸟枪法克隆中选用大肠杆菌/链霉菌穿梭质粒 pIJ699 作为载体,pIJ699 是一种提供正选择的质粒载体,它被 *Bgl* II 酶切后产生两条 5kb 片段,一条是含有链霉菌复制子,两端为回文序列的线性化载体片段,当含有链霉菌复制子载体片段与外源 DNA 片段连接后重组时,质粒才能正常复制并使宿主菌产生抗性,而自身环化的载体由于两回文序列没被隔开而无法复制,所以转化子均携带有外源 DNA 片段。链霉菌 3662 的总 DNA 经 *Sau*3A I 部分酶切,电泳回收 4~6kb 的片段,载体 pIJ699 经 *Bgl* II -*Eco*R I 双酶切,电泳回收 5kb 载体片段,将上述两种片段用 T4DNA 连接酶连接,转化链霉菌 *S. lividans* TK24 的原生质体,挑取转化子点种至含有发酵固体培养基(Thio 50mg/mL)的牛津杯中,28℃ 培养 8d 后,将整个固体培养基琼脂块置于纤维蛋白平板上检测活性,从 3000 个转化子中获得了一个具有纤溶活性的转化子,提取此转化子的质粒,命名为 pGY1,酶切鉴定其重组质粒中含有 6kb 大小的外源片段,将 pGY1 再转化 TK24 原生质体,得到的转化子经培养后均具有纤溶活性。

2.2.2 纤溶酶基因的序列测定:将 pGY1 上的 6kb 外源片段用 *Hind* III 切下,连接至 pUC18 上,命名为 pGY2,酶切分析图谱见图 3。pGY2 经 *Bam* HI 酶切后得到两条相同大小的约 4.5kb 片段,一条是 *Bam* HI-*Bam* HI 外源片段,另一条 4.5kb 片段中包括外源片段 2.0kb 和载体 pUC18 2.68kb。为了定位纤溶酶编码基因于其中一个片段,电泳回收两片段的混合物与 pIJ699 载体连接,转化 *S. lividans* TK24 原生质体,用上述方法检测转化子的溶栓活性,有约一半转化子有活性,从两种类型的转化子中分别提取质粒 DNA,结果表明从有活性的转化子中提取的质粒为含有 4.5kb 外源片段的 pIJ699 重组质粒,而无活性转化子中提取的质粒为含有 2kb 外源片段及载体 pUC18(2.68kb)的 pIJ699 重组质粒。表明 *Bam* HI-*Bam* HI 4.5kb 的外源片段中含有编码纤溶酶结构基因。将该片段克隆至 pUC18 上,命名为 pGY3。再用 pUC18 进行亚克隆,经测序表明在 *Pst* I-*Eco*R I 2.2kb 片段有可能存在链霉菌结构基因,含 *Pst* I-*Eco*R I 2.2kb 克隆的 pUC18,命名为 pGY4。将 pGY4 上的 2kb 外源片段亚克隆为 *Pst* I-*Apa* I 0.5kb, *Apa* I-*Apa* I 0.8kb 和 *Apa* I-*Eco*R I 0.9kb 三个片段后进行了双链 DNA 测序。

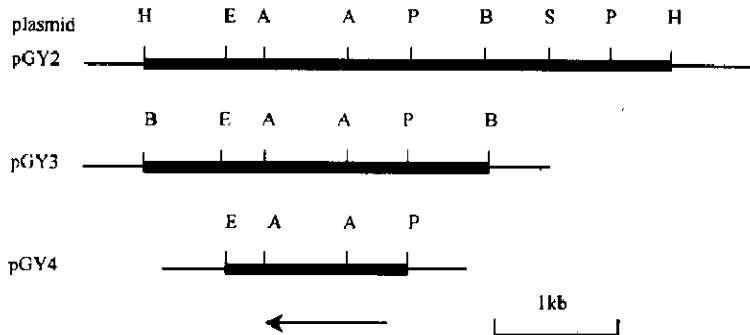


图 3 重组质粒 pGY2 及其衍生质粒的限制性内切酶图谱

Fig. 3 The restriction enzyme map of pGY2, pGY3 and pGY4

—:DNA of *S. lividans* 3662; —:DNA of vector; ←:Transcriptional direction;
E: *Eco*R I; A: *Apa* I; P: *Pst* I; B: *Bam* HI; S: *Sac* I; H: *Hind* III.

2.2.3 纤溶酶基因的核苷酸序列:测定了重组质粒 pGY4 中包括编码纤溶酶基因及其上游序列的 2171 个核苷酸序列(图 4)。

```
1  GAATTCGAACATTCCGGCCAGTGGGGGACGACGGTGACGGGTGGTGTGACGGGGGCGAAGGCGACGGTCTGACC
80  GTCCAGCGGAAGCCGTTACCGGGGAGGTCGGCTCGACGGGACCCGGGACCGGTGACGGGGCCCGGTCCGGTAGG
160  CGAGCGCCCTCTGGTCTGCTCTCGTCGGGAGGGTGTGAGGGCGTTTCGGGACTACGATCCCGCGCGCCGCGCCGACAG
240  CATTCAGGGCATCGACGCCACGCCCTACGAGCGCGCTGGTTCGGTTCGAGGGGCACTTACCCCGTACGGCGAGGGCCGC
320  ACCGTACAGCTCGAGAACGCCGACGGCCGCGCATCGTGCCCTCTGCTCGGGGAGTGCTCGCCTTCACGCTCGACGGACA
400  GGACCTCAGCTCCAGGTGTCGGTGCAGGGCGACGGCTCGCTGCGGGCGTCTTCGGGACACACACAGCGGGGACAGCA
480  GTTACCGCTTCGGGTTCCTGCGGCCGCCCGCGCCGACGGGACGGGTGTACGACGGTGGACTTCAACCGGCTCTGCTG
560  CCGCCGTGCGCTTTTCGGGACCACTTATCTGCCCCCTTCGGCGCCCGCGGCAACACGCTGGGGCTCGCGATCGAGGCGGG
640  GGAGCGCACCTTGCTAGAAAGTCCCTCAACGTATCTGGTGGTCTCTAAGTGAACGCTGCACGGCCGAAAGGCGCCCT
720  TCGCTCGGTTCGGTCTGTGCGCGAATACTCCCCACAGCGCTGTGACGAGACGACCTTTCGCGAATCCGGGACGGGG
800  CCCTTGGCTGCGCTCAGGGCCCCAACCCACGTGACCCCCGACTTCCCTTGGAGCGAACAAGTACGAGATCAAGC
1  start V R I K
880  GCACCACCCCAAGCGGCATCGCGAGACGGACCCGGTGTATCGCGGTGGCCACCGGATTCGTGGCGCTCGCGGATC
5  R T T P T G I A R R T R L I A V A T G F V Y A A A A I
960  GCGGTCCCCAACGGAACGCGAGCGACGTGCACACTTCAAGGCCAACAGCTACCAACGGCGAGGACTCGGTGCTCAA
32  A V P N A N A S D V H T F S A N Q L T K A S D S V L N
1040  CTCGGATGTCGGCGGACCGCTGGGCGGTGACCCCGCGGACGAACCGGTGCTGCTACCGTTCGACAGCACGGTCTCCA
59  S D V A G T A W A V D P A T N R V V V T V D S T V S
1120  AGGCGGAGATCGGAAGATCAAGAAGACTGCCGGCAGCAACCGCGTGCCCTCACCATCAAGCACCCCGGGCAAGTTC
86  K A E I A K I K K T A G S N A G A L T I K H T P G K F
1200  AACAGCTGATCTCGCGGCGAGCGCATCTATGCGAGTAGCTGCGGTGCTCGCTGGGTTCACGCTCCAGGACTCCAG
113  N K L I S C G G D A I Y A S S W R C S L G F N V Q D S S
1280  CCGGAACTACTACTCTCACC CGGTCACTGCACCGACGGCGCGGCACTGGTGGTCCAACTCTCGCACACCACCA
140  G N Y V F L T A G H C T D G A G T W W S N S S H T T
1360  CGCTCGGCACACAGCGCGTCTCTCTTCCCGGCAACGACTACGGCATCGTGGCTACCAACAGCTCGGTGGCCAAAG
167  T L G T T A G S S F P G N D Y G I V R Y T N S S V A K
1440  TCGGGCGCGTGGGACGCGAGATCACCAGCGCGGCCACGCCCTCGGTGGGACACCGCTTACCGCGCGGCTCCAC
194  S G A V Y C Q D I T S A G A T P S V Y V V T V R R G S T
1520  GACCGGACCGACAGCGCGCGGTCAACCGCGCTCAACCGGACGGTCAACTACGGCAACGGCGAGATCGTCTACGGCTCA
221  T G T H S G R V T A L N A T V N Y G N G E I V Y G L
1600  TCCAGACCACGGTCTGCGCGGAGCCGGTGACTCAGGCGCGCGCTGTACGGCGGCTCCACGGCTACGGTCTGACCTCC
247  I Q T T V C A E P G D S G G P L Y G G S T A Y G L T S
1680  GGCGGACGCGCAACTGCACCTCCGCTGTGACGACTTCTTCCAGCGGTACCGAGGGGCTCAGCGCTACGGGTGCA
274  G G S T G S G G T T F F Q P V T E A L L S A Y G V H
1760  CGTCTACTGAGCCGCGCCCGGCATCCCGGTATCCGGGACCGGCCGAGCCGCGCAGAGTgGGCCCCCGACGCAACTGG
298  V Y *
1840  CGTGGCGGGGTCGCCCCGTGTCGCGACCGCGGAGTACCGTGAAGTACACGGGTGAGTGGCGCGTGTTCCTCTCAACA
1900  CGCCCACTTCGGAACCCGAGGGGGCCGGCATGGTCGAGGAGCTGTTGACGGCAGGAGCGGCCCTTGTGTCCGTGGGCGCGG
1980  TCTATCGGATGCGCGCGCCAGGGTCGTCAAACAGTACGAGCGGGCGTGGTGTTCGGTCTCGGGCGGCTCAGGCCCGGG
2060  GTGCGGGAGCCGCGACTGACGATGGTGTGCTTCTGTCGACCGGCTCCAGAGGTCAATCTGACGGATGCAACCTTGG
2140  CACTGCGCGTC
```

图 4 纤溶酶基因核苷酸全序列及其编码的核苷酸序列

Fig. 4 Nucleotide and amino acid sequence of the fibrinolytic protease gene

用计算机软件分析及上互连网比较表明这一序列有一个完整的阅读框,阅读框分析见图 5, 868 位的 GTG 作为可能的翻译起始密码,1771 位的 TGA 作为其终止密码,在翻译起始密码上游有可能的核糖体结合序列 GGAGG,和可能的启动子区的一35 区 TTGTCC 和-10 区 AAAA。其 GC% 为 68.33%,密码子第三位 GC% 为 95.6%,符合链霉菌结构基因的典型特征。阅读框的 903 个碱基编码 300 个氨基酸,计算其分子量为 30kD, pI 值 9.1。将这一阅读框用 PCR 方法扩增后在大肠杆菌中进行表达,表达产物具有纤溶活性(另文发表)。在氨

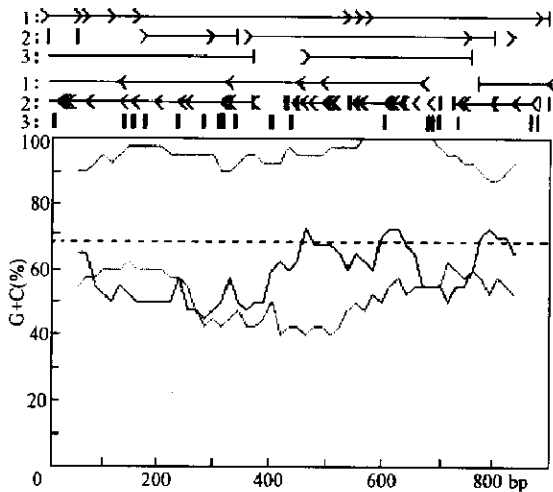


图 5 阅读框分析

Fig. 5 Analysis of the ORF

基酸水平与 Genbank 收录的基因进行比较,未见有完全相同的序列,与 75 种蛋白序列具有同源性,与链霉菌来源的蛋白酶 A、B 和丝氨酸蛋白酶 C、D、1、2 及谷酰氨肽链内切酶的同源性分别为 45%、64%、38%、50%、46%、64%、47%,与其它物种的多种蛋白酶也有较好的同源性。根据以上结果,我们认为所克隆到的纤溶酶基因可能是一个新基因,这一基因的获得为进一步研究纤溶酶的构效关系及其高水平表达和分子改造奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Sherry S. *Drugs*, 1987, 23: 1~12.
- [2] William O D, Borer J. *Circulation*, 1986, 73: 338~346.
- [3] Sambrook J, Fritsch F E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18. 47~18. 59.
- [4] Astrup M S. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 346~351.
- [5] Tobias K, Melton E T. *Gene*, 1988, 65: 83~91.
- [6] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*, Norwich: John Innes Foundation, U K, 1985.

PURIFICATION AND GENE CLONING OF A NOVEL FIBRINOLYTIC PROTEASE FROM *STREPTOMYCES* SP. C3662

Gong Yong Wang Yiguang*

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences,
Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. C3662 was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, DEAE-Sepharose and CM-Sepharose chromatography. The molecular weight of the protease was indicated to be 30 kD by SDS-PAGE. Using a *E. coli*/*Streptomyces* shuttle plasmid pIJ699 as the vector, shot-gun cloning was performed to clone the gene of the protease. One clone with fibrinolytic activity harboring a plasmid that contains a DNA fragment of 6kb was obtained from 3000 clones. Sequence analysis reveals that the open reading frame of the gene of the protease is 903bp in size, encoding a putative protein of 300 amino acids with 30kD. The overall GC% and the third codon GC% of the ORF were 68.33% and 95.6%, respectively. Comparison of homologue showed that the purative protein is highly homologous with other proteases of *Streptomyces* sp.

Key words: *Streptomyces* sp., Fibrinolytic protease, Purification, Gene cloning