

蛇毒锯鳞蝥素融合蛋白的发酵与纯化

杨利军¹ 杨 涛¹ 程牛亮¹ 解 军¹ 牛 勃^{1*}

(¹ 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室 太原 030001)

(² 首都儿科研究所 北京 100020)

(³ 中国疾病预防控制中心 北京 100050)

摘 要 研究大肠杆菌表达重组蛇毒锯鳞蝥素(Echistatin, Ecs)融合蛋白的发酵和纯化工艺。将 Ecs 基因插入表达载体 pTXB1, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 构建工程菌。对工程菌进行补料分批培养并诱导表达, 研究培养基、培养和诱导时间对工程菌生长和目的蛋白表达的影响, 几丁质亲和层析纯化 Ecs 融合蛋白, 经 DTT 裂解后, 检测 Ecs 活性。发酵后菌体湿重可达 75g/L, 融合蛋白表达量约占总蛋白的 35%, 重组质粒在 BL21 宿主菌中传代稳定。亲和层析纯化后, 得到 Ecs 单体, 得率为 28mg/L 发酵液。生物学活性分析显示, 重组 Ecs 能有效抑制血小板的聚集, 其活性与天然 Ecs 相似。优化了 Ecs 融合基因工程菌的发酵和纯化条件, 为规模化生产奠定基础。

关键词 蛇毒锯鳞蝥素; 大肠杆菌; 发酵; 纯化

中图分类号: Q815 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0095-04

Ecs 是一种从蛇毒中提取出来的活性蛋白, 由 49 个氨基酸残基组成, 第 24 ~ 26 位是 RGD (Arg-Gly-Asp), 该序列在许多细胞外基质蛋白分子内广泛存在, 可以被细胞表面的多种整合素(integrin)受体分子识别结合, 因此, Ecs 可以竞争性抑制多种整合素分子与其配体的结合, 从而表现出多方面的作用。Ecs 可选择性抑制活化血小板和纤维蛋白原的结合, 具有抑制血管平滑肌细胞迁移和增生的功能, 在预防和治疗动脉栓塞及动脉硬化性疾病方面有良好的应用前景^[1~4]。

由于从天然蛇毒中提取 Ecs 成本太高, 化学合成方法也较为昂贵, 因此限制了 Ecs 的大量使用。Ecs 分子量小, 单独表达存在一定困难, 我们采取融合表达方式, 构建了 Ecs 融合表达体系——BL21/pTXB1-Ecs, 实现了 Ecs 融合蛋白的高效表达。本文在此研究基础上, 对 Ecs 工程菌进行高密度发酵培养, 并进行 Ecs 的分离纯化和生物学活性研究, 为利用基因工程方法生产 Ecs 探索新的工艺流程。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 重组质粒 pBV220-Ecs 由本室构建并保存, pUC118 载体由本室保存, 表达载体

pTXB1 购自 NEB 公司, 宿主菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) JM109 由本室保存, 胰蛋白胨、酵母提取物购自 Merck KgaA 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制酶、几丁质亲和填料购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 其它试剂均为国产分析纯。Biostat-15L 发酵罐购自 B. Braun 公司; 电泳图像分析系统购自 Alpha Innotech 公司; 层析工作站购自 Pharmacia 公司; PACKS-4 型血小板聚集仪购自 Helena 公司。

1.1.3 培养基: LB、SOB、2 × YT 及 M9 培养基 (Amp100 μg/mL, pH 7.4) 见文献[5]; 补料 I : 500mL (含酵母提取物 100g, MgSO₄ · 7H₂O 5g, NaCl 10g); 补料 II : 50% 甘油 400mL; 补料 III : 10% 氨水 200mL; 补料 IV : 消泡剂 10mL。

1.2 PCR 扩增 Ecs 基因

根据文献[4]提供的序列, 设计引物 5'-GGTGCTCATATGGAATGCCAATCCGGT-3' 和 5'-TGTTGCTCTTCCGCAAGTACCGGACCTTTGT-3', 其中分别在 5'端引入 *Nde* I、3'端引入 *Sap* I 酶切位点, 并加入相应的保护碱基, 以 pBV220-Ecs 为模板, PCR 扩增 Ecs 基因。反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 15s, 循环 35 次; 72℃ 5min, 2% 琼脂糖电泳观察结果。回收并纯化目的条带, 将 PCR 产物与 pUC118

基金项目: 山西省自然科学基金(20021100); 山西省留学归国人员基金(200159); 山西省科委攻关项目(042035)

* 通讯作者。Tel : 86-351-4135637; Fax : 86-351-2022548; E-mail : niub2004@126.com

作者简介: 杨利军(1973 -)男, 山西太原人, 讲师, 在读博士, 主要从事基因工程药物的研发工作。E-mail : yanglijunmm@126.com

其他作者: 王国亮², 杨 琦³

收稿日期: 2005-05-08; 接受日期: 2005-06-10; 修回日期: 2005-09-22

载体在 16℃ 连接, 连接产物转化 JM109 蓝白斑筛选阳性克隆并进行 DNA 序列分析。

1.3 Ecs 重组质粒的构建

用 *Nde* I 和 *Sap* I 酶切 pUC118-Ecs, 回收目的基因片段, 与表达载体 pTXB1 体外连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。PCR 和序列分析鉴定重组子, 取单个菌落接种于 2mL LB (Amp 100 μ g/mL) 中, 37℃ 振荡培养过夜, 按 1:50 扩种至 50mL LB (Amp 100 μ g/mL) 中, 37℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$, 加入 IPTG (终浓度为 0.08mmol/L) 诱导 4h, 取样进行 12% SDS-PAGE 分析, 经电泳图像分析系统扫描得到目的蛋白占全部可溶性菌体蛋白的百分含量。选用表达量最高的单克隆作为发酵用种子。

1.4 菌体密度和菌体湿重测定

752 紫外分光光度计测定 600nm 处菌液的 OD_{600} 值; 用分析天平称量菌体湿重。

1.5 发酵培养

15L 发酵罐装料 10L, 在 IPTG 诱导后, 每隔 10min 加入补料 I 和补料 II 各 15 ~ 20mL, 在泡沫较多时加入补料 IV, 每次 0.5mL, 监测 pH 值降低时逐滴加入补料 III。依次分别改变培养基种类、培养时间、诱导时间以及溶解氧浓度等参数, 具体操作按照发酵罐说明进行。

1.6 融合蛋白的纯化

离心收集菌体沉淀, 用 TE 按 1:10 重悬, 冰浴超声破菌, 18000g 离心 25min, 收集上清, 0.45 μ m 滤膜过滤。几丁质亲和填料装柱, 用平衡液 (20mmol/L Tris-Cl, 0.5mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 平衡 20 个柱体积 (CV); 用平衡液 1:10 稀释超声上清, 上样, 收集穿透峰行 SDS-PAGE 分析。上样完毕, 用含 1mol/L NaCl 的平衡液至少洗涤 20 个 CV; 再用 3 个 CV 含 30 ~ 50mmol/L DTT 的平衡液以 5 ~ 8mL/min 的流速过柱, 此过程在 30min 内完成, 用柱帽封口, 4℃ 放置 20 ~ 40h。次日用平衡液洗柱, 分别收集 3 个 CV 的洗脱峰, 18% SDS-PAGE 鉴定。用 G-25 除去粗样品中的盐和 DTT, 得到精样品。纯化产物的鉴定采用 18% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。

1.7 Ecs 抗血小板聚集实验

健康志愿者静脉采血 20mL, 制备富血小板血浆 (PRP) 和贫血小板血浆 (PPP), 用 PPP 调整 PRP, 使血小板数约为 $250 \times 10^9/L$ 。取 400 μ L 调整后的 PRP 于测试杯中, 分为阴性对照组、测试组和阳性对照组, 分别加入 0.9% NaCl、纯化 Ecs 和天然 Ecs 各 50 μ L。磁珠搅拌 37℃ 温育 2min, 每管加 0.2mmol/L

诱聚剂 ADP 50 μ L, 用比浊法测定血小板聚集率, 测定时间为 5min。记录聚集曲线, 并计算血小板聚集抑制率。血小板聚集抑制率 = [(阴性管血小板最大聚集率 - 测试管血小板最大聚集率) / 阴性管血小板最大聚集率] $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 目的基因扩增及 DNA 序列分析

Ecs 由 49 个氨基酸组成, 设计的 PCR 预期扩增产物为包含全编码序列的约 170bp 长的片段 (包括引物所带的酶切位点序列)。电泳结果显示, 在 100 和 250bp DNA 分子量标准之间, 获得了特异性的目的扩增。测序结果显示, 测得 Ecs 的 DNA 序列与已知的 Ecs 序列一致^[4]。

2.2 重组质粒的鉴定

挑取重组子转化的阳性菌落, 快速小量抽提质粒, PCR 扩增目的基因, 1 ~ 4 号克隆均在预期位置出现特异条带, 选取 2 号质粒进行 DNA 序列测定。测序结果表明 Ecs 基因已成功克隆到载体 pTXB1 的 *Nde* I / *Sap* I 位点。

2.3 发酵培养基和培养时间选择

使用 2 \times YT 培养基发酵, 菌体湿重和目的蛋白表达量都明显优于其它 3 种培养基 (表 1), 故确定 2 \times YT 做为发酵用培养基。随后, 控制细菌培养时间, 使其菌密度 OD_{600} 分别等于 0.6、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 时进行诱导。当 OD_{600} 为 5.0 ~ 6.0 时开始诱导, 菌体得率和目的蛋白表达量都较高。

表 1 Ecs 工程菌在不同培养基中发酵结果

Table 1 Fermentation results of Ecs bacterial strain in different medium

Medium	Expression level/%	Wet weight/(g/L)
LB	12.6	29.9
SOB	13.3	30.6
2 \times YT	30.6	50.3
M9	8.9	15.6

2.4 诱导时间确定

加入 IPTG 诱导后, 每隔 1h 取样, 做全菌蛋白 SDS-PAGE 分析。诱导 4h 后, 融合蛋白的表达趋于稳定, 表达量占到菌体总蛋白的 30% 左右, 相对分子量约为 32kDa (图 1)。

2.5 Ecs 工程菌的高密度发酵

根据以上优化条件, 用 2 \times YT 培养基 37℃ 培养 6h 左右, IPTG 诱导 4h, 控制溶解氧浓度为 60% ~

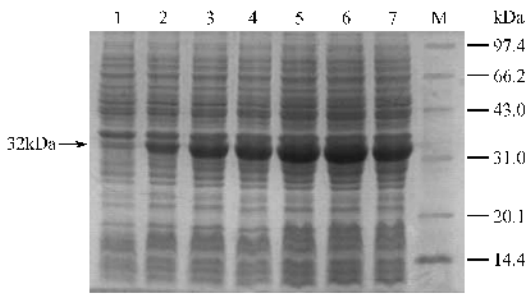


图1 不同诱导时间 Ecs 融合蛋白表达的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of expressed Ecs fusion protein at different induction time

1. Before induction; 2. 1h; 3. 2h; 4. 3h; 5. 4h; 6. 5h; 7. 6h; M. Protein marker.

80%, 补加 10% 氨水以保持 pH 恒定。经电泳图像分析系统分析,目的蛋白表达量占全菌总蛋白的 35%(图 2),菌体湿重为 75g/L。

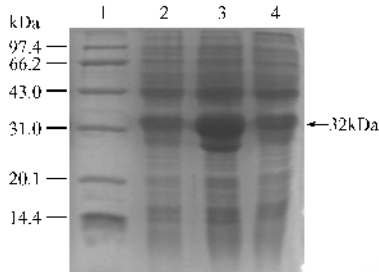


图2 Ecs 工程菌发酵的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of Ecs bacterial strain fermentation

1. Protein marker; 2. Induction of vector pTXB1; 3. After induction; 4. Before induction.

2.6 重组质粒的稳定性

参考文献 [6] 的方法。Ecs 融合基因工程菌在无选择压力条件下连续培养 50 代以上,质粒保持稳定(表 2)。

表 2 Ecs 重组质粒稳定性(氨苄抗性菌落百分数)

Table 2 The stability of Ecs recombinant plasmid (percentage of anti-ampicillin colony)

Culture time/h	Percentage of anti-ampicillin colony/%	Induction time/h	Percentage of anti-ampicillin colony/%
12	96	1	100
24	100	2	98
36	98	3	98
48	98	4	100
60	100	5	98
72	98		

2.7 纯化和 DTT 切割

超声上清过几丁质亲和柱后,用 DTT 将 Ecs 单体从融合蛋白上裂解下来,用平衡液洗脱,收集第 1 到第 3 个 CV 的洗脱峰,经 18% SDS-PAGE 分析,考马斯亮蓝染色呈单一条带,Ecs 单体主要存在于第

一个洗脱峰中(图 3),得率约 28mg/L 发酵液。

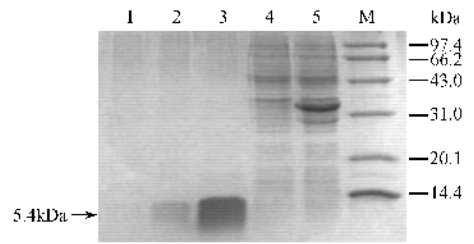


图3 Ecs 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of Ecs purification

1.No. 3 elution CV; 2.No. 2 elution CV; 3.No. 1 elution CV; 4. Penetration peak; 5. Sample before loading; M. Protein marker.

2.8 活性检测

通过抑制 ADP 活化的人血小板聚集试验,我们发现重组 Ecs 与天然 Ecs 活性相近,重组 Ecs 的抑制聚集率为 $73.6 \pm 2.35(\%)$,天然 Ecs 的抑制聚集率为 $75.1 \pm 1.9(\%)$,二者在统计学上无显著性差异。

3 讨论

Ecs 是一种小肽,小肽的表达通常比较困难,本室首先进行了单独表达 Ecs 的研究工作,但效果并不理想,分析其原因可能是由于 Ecs 分子量小,表达产物不稳定,容易被宿主细胞蛋白酶降解,因此表达量很低。之后采用了将 Ecs 基因与蛋白质剪切元件 intein(内蛋白子)融合,构建 Ecs 原核表达体系 BL21/pTXB1-Ecs 的方法。该体系实现了外源蛋白的高效表达,而且在 intein 与 Ecs 连接处可实现精确剪切。当超声上清通过几丁质亲和层析柱后,只有融合蛋白能够和几丁质结合,再用 DTT 裂解后,仅有 Ecs 蛋白被洗脱下来,而融合蛋白前体 intein 仍结合于柱上,这样便将融合蛋白的纯化与 DTT 裂解结合在了一起,极大的方便了外源蛋白纯化。国内外研究者所进行的 Echistatin 融合蛋白表达的研究中,外源蛋白的表达量不是很高,而且在纯化时采用溴化氰切割,工艺比较复杂^[4,7]。本文采用的几丁质亲和层析克服了这些缺点,实现了融合蛋白高效表达和一步过柱法纯化 Ecs 的目的。

工程菌发酵是个很复杂的过程,在发酵过程中,细菌生长过快,耗氧增多,代谢产物也产生过多,就会影响细菌的生长和外源蛋白的表达,此时要适当加入营养(碳源和氮源),并不断加入氧气,但氧分压也不能过高,否则对细菌生长有抑制作用,一般不超过 90%。在进入对数生长期后,随着代谢产物的增多,溶液 pH 值会下降,当降至 7.0 以下时,需加入氨水,应特别注意氨水要逐滴加入,以免矫枉过正。根

据作者的经验,每加一滴,pH值升高0.01,因此切不可流速过快,流量过多。在本研究中并没有出现高密度发酵在提高收菌量的同时,目的蛋白表达量却有所下降的情况^[8,9]。恰好相反,我们实现了收菌量和目的蛋白高表达的双赢目标,利用高密度发酵的方法使菌体收量比摇瓶发酵法提高了10倍。由此可见,在发酵过程中,工程菌得率的高低与目的蛋白表达量之间没有直接相关性,只要选择适当培养基,选择合适的诱导时机和诱导时间,满足菌体生长对营养和氧气的代谢需求,并控制培养基的pH,即可以实现目的蛋白的高表达。

参 考 文 献

- [1] Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S, Marcinkiewicz C, *et al.* Structural requirements of echistatin for the recognition of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J Biol Chem*, 1999, **274**(53):37809–37814.
- [2] Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, *et al.* Immobilised echistatin promotes platelet adhesion and protein tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1497**(2):227–236.
- [3] Della MR, Squillacioti C, Garbi C, *et al.* Echistatin inhibits pp125FAK autophosphorylation, paxillin phosphorylation and pp125FAK-paxillin interaction in fibronectin-adherent melanoma cells. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(16):5047–5054.
- [4] Gan ZR, Condra JH, Gould RJ, *et al.* High-level expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for [Leu-28] echistatin. *Gene*, 1989, **79**(1):159–166.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999, 750–751.
- [6] 杨涛, 杨利军, 牛勃, 等. 重组人肝细胞生长因子(高效表达工程菌筛选及发酵工艺研究). *药物生物技术*, 2004, **11**(5):294–298.
- [7] 李洪超, 李雄彪, 胡美浩. 蛇毒锯鳞蝥素基因 Leu14-Lys15-Glu16 的定点突变. *遗传学报*, 1996, **23**(2):163–168.
- [8] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Review*, 1996, **60**(3):512–538.
- [9] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(3):98–105.

Fermentation and purification of Echistatin fusion protein expressed in *Escherichia coli*

YANG Li-jun¹, YANG Tao¹, CHENG Niu-liang¹, XIE Jun¹, NIU Bo^{1*}

(¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

(² Capital Institute of Paediatrics, Beijing 100020, China)

(³ Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract: Lots of studies of Echistatin (Ecs) have proved its wide use in many aspects. However, the low yield of Ecs has impeded the relative researches of the protein. To establish the high-level expression system of Ecs, the fermentation and purification process of Ecs fusion protein expressed in *E. coli* were optimized. The Ecs gene was introduced into vector pTXB1 and placed under the control of highly efficient T7 promoter system. The cloned Ecs gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3) as soluble form. The Ecs production and biomass accumulation were optimized by examining medium composition, point of induction and induction time in fed-batch fermentation. Biomass accumulation was greatly affected by medium gradient, reaching 50.3g/L in 2 × YT medium. Ecs production was found to increase to 35% of total protein with 75g/L biomass accumulation after induced for 4h. Purification of Ecs from supernatant of sonication was done using one-step chromatographic procedure with chitin affinity chromatography and DTT cleavage, resulting in yields of 28mg/L and >90% purity. The bioactivity of purified Ecs was determined and the result showed that purified Ecs could inhibit the aggregation of platelet *in vitro* with similar bioactivity to wild Ecs. This optimized method is readily scaled up for the expression and purification of Ecs in sufficient quantities for further structural and biological studies and applications.

Keywords: Echistatin; *E. coli*; Fermentation; Purification

Foundation item: Shanxi NSF(20021100); Shanxi SRF for ROCS(200159); Key Technology Research and Development of Shanxi(042035)

* Corresponding author. Tel: 86-351-4135637; Fax: 86-351-2022548; E-mail: yanglijunmm@126.com

Other authors: WANG Guo-liang², YANG Qi³

Received 8 May 2005/Accepted 10 June 2005/Revised 22 September 2005