

# 重组人超氧化物歧化酶的基因克隆、表达及产物纯化研究

张 翊 王军志 吴勇杰\*

(中国药品生物制品检定所 北京 100050)

**摘 要** 为了克隆人 SOD cDNA,构建表达载体,实现其在大肠杆菌中的高效稳定表达,通过抽提人肝组织总 RNA,RT-PCR 扩增人 SOD cDNA,构建含 rhSOD cDNA 的表达质粒 pLY-4/rhSOD,转化大肠杆菌 JF1125 进行表达研究。结果克隆到的 rhSOD cDNA 序列与文献报道一致,在宿主菌中获得高效表达,表达水平达 68% 以上,蛋白复性纯化工艺高效快速, rhSOD 纯品纯度达 98% 以上,比活性达到 2529u/mg,为用基因工程方法生产 rhSOD 打下基础。

**关键词** 重组人超氧化物歧化酶,基因克隆,基因表达,包含体,复性,纯化

中图分类号 Q816 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0557-04

超氧化物歧化酶(SOD)是机体内超氧自由基的天然清除剂<sup>[1,2]</sup>,对炎症、缺血再灌注损伤、辐射损伤均有一定疗效,还可减少抗癌药物对细胞和心脏的毒副作用<sup>[3,4]</sup>。rhSOD 作为药物酶制剂,具有医用价值及临床应用前景,但作为生物大分子,动植物来源的 rhSOD 均存在抗原等安全问题,可能诱发免疫反应。近年来,美日等国已开发出基因工程产品,并进入临床实验阶段。其临床适应症为早产儿氧中毒引起的呼吸系统疾病及神经系统疾病<sup>[5]</sup>。此外,对 rhSOD 在基因治疗及作为 AIDS 的辅助治疗等方面的研究也正在进行中<sup>[6,7]</sup>。我国除开展直接从人血中提取 SOD 外,也开展重组人 SOD 的研究<sup>[8,9]</sup>。我们从人肝组织中克隆到人 Cu-ZnSOD cDNA,并在大肠杆菌中得到表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 JF1125,质粒 pLY-4 由上海医科大学宋后燕教授惠赠。

### 1.2 主要试剂

TRIZOL Reagent 购自 Life Technologies 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;其它工具酶均购自 Life Technologies 公司。

### 1.3 引物设计与合成

正向引物 5'...ATTGAATTCATGGCGACGA AGGCC...3'

反向引物 5'...ATTGGATCCTTATTGGGCG ATTCC...3'

引物两端分别设计 EcoRI 和 BamHI 位点。

### 1.4 人 SOD cDNA 的克隆及表达载体的构建

取新鲜人肝组织 80mg,用 TRIZOL Reagent 抽提总 RNA,RT-PCR 扩增 rhSODcDNA,参照 Sambrook 等方法<sup>[10]</sup>构建含 rhSOD cDNA 的 pUC19 重组质粒,进行核苷酸序列分析。从阳性克隆质粒中回收 hSOD cDNA 片段,与表达载体 pLY-4 重组,构建表达质粒,转化大肠杆菌 JF1125,构建成 pLY-4/rhSOD 工程菌。

### 1.5 pLY-4/rhSOD 工程菌的发酵培养

pLY-4/rhSOD 工程菌菌种单克隆接种于 LBA 种子培养液(1% Tryptone,0.5% Yeast Extract,1% NaCl,100 $\mu$ g/mL Amp),于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 12 h,至  $OD_{600} = 4.0$ 。将 pLY-4/rhSOD 工程菌种子菌液按 1/100(V/V)比例接种于 4000mL 发酵培养液(0.08mol/L  $Na_2HPO_4$ ,0.02mol/L  $KH_2PO_4$ ,0.05mol/L NaCl,0.02mol/L  $MgSO_4$ ,1% Glucose,1% Casion,1.1mg/mL Vitm B1,0.1%  $NH_4Cl$ ,0.1% trace element solution,pH6.8),于 5L 生物反应器(Bioflo III, NBS, Co. USA)中发酵培养。30 $^{\circ}$ C 扩增,42 $^{\circ}$ C 诱导培养。离心收集 pLY-4/rhSOD 工程菌。经 SDS-PAGE 电泳分析后,-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.6 pLY-4/rhSOD 工程菌破菌及包涵体(Inclusion Body Solution,IBS)提取纯化

pLY4/rhSOD 工程菌悬浮于破菌缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4,0.15mol/L NaCl),于高压匀质机(APV, Co UK)500kg/cm<sup>2</sup>,破菌。涂片,革

兰氏染色镜检,破菌率 90% 以上。离心收获 IBS,悬浮于破菌缓冲液,以 Telfon 匀浆器(Potter-Evlvehji-am)反复匀浆研磨 IBS,以去除可溶性核酸及菌体膜蛋白等杂质。离心收获纯化的 IBS。

### 1.7 rhSOD 蛋白的提取及复性

纯化后的 IBS 溶解于 IBS 溶解缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4, 6mol/L guanidine hydrochloride, 0.1 mol/L  $\beta$ -ME),以 Telfon 匀浆器反复匀浆研磨均匀。离心,以去除不溶性杂质。溶解上清按一定比例缓慢加入复性缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4 2.5% Sucrose, 0.1 mol/L  $\beta$ -巯基乙醇),4℃ 缓慢搅拌复性。以分子量截留为 5kD 的超滤浓缩系统(Milli-plate, Millipore, Co. USA)浓缩样品。离心去除少量析出的不溶性杂质。

### 1.8 rhSOD 蛋白的柱层析纯化

**1.8.1 pLY-4/rhSOD 蛋白的 G-50 凝胶过滤柱层析纯化:**复性浓缩后的样品,以 G-50 凝胶过滤层析柱纯化,以去除小分子量核酸、杂蛋白及残留盐酸胍、蔗糖等杂质。纯化洗脱过程由 Waters 650 蛋白纯化系统(Waters, Co. USA)控制;流速为 20cm/h;流动相为缓冲液 A(0.05mol/L PB pH7.4)。

**1.8.2 rhSOD 蛋白的 Q-Sepharose 离子交换柱层析纯化:**G-50 纯化后的样品用 Q-Sepharose 离子交换层析柱(Pharmacia Co, Sweden)纯化。由 Waters 650 蛋白纯化系统控制;流速为 50cm/h;以流动相 A(0.05mol/L PB pH7.4)流动相 B(0.05mol/L PB pH7.4, 1 mol/L NaCl)进行 NaCl 线性梯度洗脱。收集样品,经 SDS-PAGE 电泳检定为 rhSOD 蛋白。样品分装及冻干后 4℃ 保存待用。

### 1.9 rhSOD 蛋白含量测定及酶活性测定<sup>[11]</sup>

采用 Lowry 法及改良的邻苯三酚自氧化法。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的提取和目的基因的克隆

取健康人肝组织匀浆,提取总 RNA,RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定在 480bp 处可见一扩增条带,与 rhSOD cDNA 大小相同(图 1)。

### 2.2 目的基因的克隆和序列测定

目的基因经过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后与 pUC19 经过双酶切连接,进行核苷酸序列分析,序列测定结果与文献报道一致<sup>[12]</sup>。

### 2.3 表达质粒的构建和表达

表达载体 pLY-4 经过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后与目的基因连接转化,经酶切连接鉴定后确认为

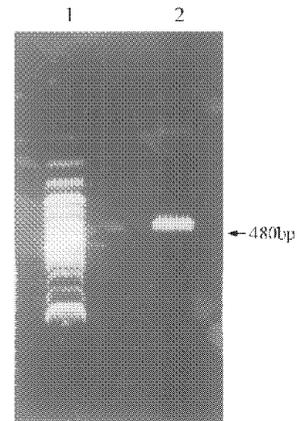


图 1 RT-PCR 结果

Fig.1 Results of RT-PCR

1. DNA marker 100bp ladder ;
2. Band of PCR result (about 480bp)

阳性克隆(图 2)。

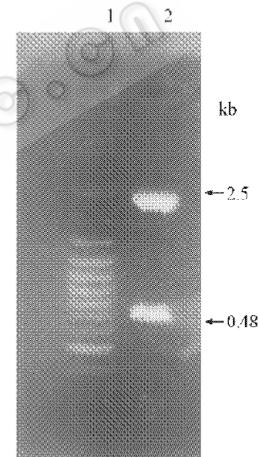


图 2 重组质粒 pLY-4/rhSOD 的酶切鉴定分析

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pLY-4/rhSOD by restriction enzyme digestion

1. DNA Marker 100bp ladder ;
2. pLY-4/rhSOD digested by *Eco*RI and *Bam*HI

### 2.4 表达产物的电泳分析

pLY-4/rhSOD 转化大肠杆菌 JF1125 后,温度诱导表达,产物经电泳分析(图 3),扫描后表达量占菌体总蛋白的 68.6%,产物以包涵体形式存在。

### 2.5 rhSOD 蛋白的复性及纯化

rhSOD 蛋白复性纯化工艺高效快速,经过凝胶和阴离子交换柱纯化后(图 4),rhSOD 样品电泳纯度达 98% 以上(图 5)。

### 2.6 rhSOD 的蛋白含量及活性测定

采用 Lowry 法测定蛋白含量为 0.85mg/mL,活性为 2250u/mL,比活性达到 2529u/mg,活性与动物组织来源提取 SOD 相比基本一致。

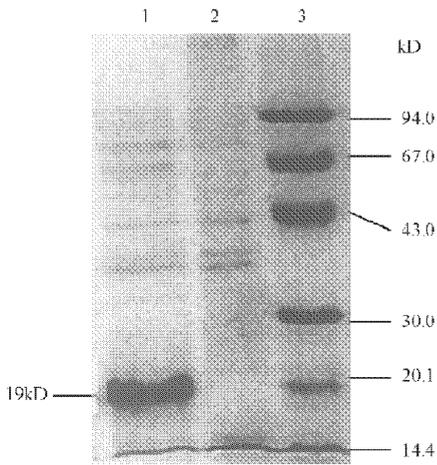


图 3 pLY-4/rhSOD 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression products of pLY-4/rhSOD

1. Production of engineering bacteria of rhSOD after induction ;
2. Production of engineering bacteria of rhSOD before induction ;
3. Molecular weight marker

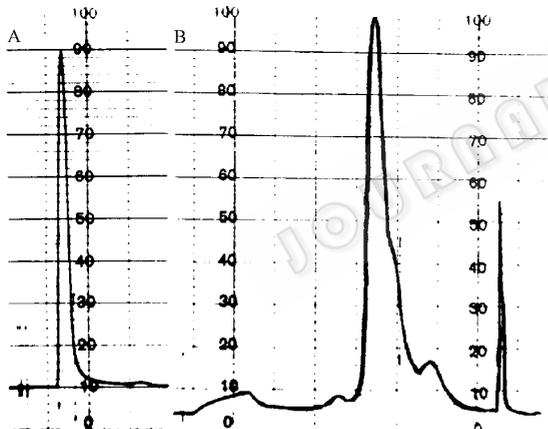


图 4 rhSOD 经 Sephadex G-50 凝胶过滤层析和 Q-sepharose 离子交换层析纯化

Fig.4 Purification of rhSOD by Sephadex G-50 Gel filtration and Q-Sepharose Ion-exchange

A. The renatured rhSOD was applied to a Sephadex G-50 column.  
 B. rhSOD purified with Sephadex G-50 column was subjected to a Q-sepharose column (4.5cm × 60cm), which with Solution A (0.5mol/L PB pH7.4) at 15cm/h was equilibrated with Solution A (0.5mol/L PB pH7.4) and was eluted with a 10L linear gradient of protein composition by SDS-PAGE.

NaCl from 0mol/L to 0.5mol/L with Solution B (0.05mol/L PB pH7.4, 1mol/L NaCl) at 40cm/h. Fraction II of 1580mL was collected and analyzed for protein composition by SDS-PAGE.

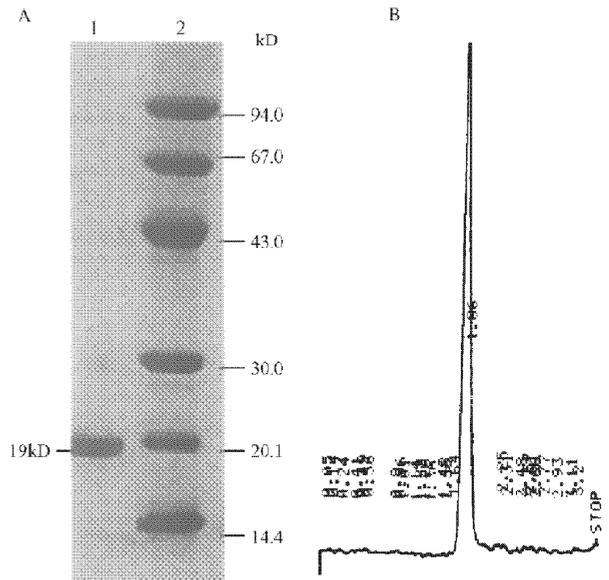


图 5 rhSOD 纯化产物的 SDS-PAGE 电泳及光密度扫描

Fig.5 Purified production of rhSOD analyzed by SDS-PAGE and Density Scanning

- A. rhSOD analyzed by SDS-PAGE
- B. rhSOD analyzed by Density Scanning
1. Molecular weight marker
2. Purified rhSOD after Ion-exchange

### 3 讨论

#### 3.1 基因克隆及工程菌的构建

我们查阅了 Genbank, 发现人的肝组织 SOD 含量较高, PCR 模板的制备充分考虑到 SOD 的组织特异性, 选用人新鲜肝组织, 为便于克隆, 在进行引物设计时在两端增加了 2 个限制酶的位点, PAY4 质粒为温度诱导质粒, 在今后操作中较简便, 成本较低, 是一种高效表达质粒, 在完成克隆和构建后, 我们进行了小试表达筛选, 最终筛选出表达量 47% 的阳性克隆作为工程菌。

#### 3.2 rhSOD 的纯化研究

在完成了人 SODcDNA 的克隆及表达、工程菌构建的基础上, 我们进行了发酵、复性及纯化工艺的研究, 利用 NBS 5L BIO III 发酵罐对工程菌进行高表达发酵研究, 在该表达体系中, 由于 rhSOD 基因的表达为温度控制  $P_L$ - $P_R$  启动子所调控<sup>[13]</sup>, rhSOD 工程菌在 30℃ 培养时大量扩增, 但不表达 rhSOD 基因, 在 42℃ 诱导时则大量合成 rhSOD 蛋白。通过控制发酵培养的温度<sup>[14]</sup>、pH、溶解氧(DO)等参数, 诱导后的 rhSOD 工程菌经 SDS-PAGE 电泳及凝胶黑度扫描, rhSOD 表达量占菌体总蛋白的 68% 以上。

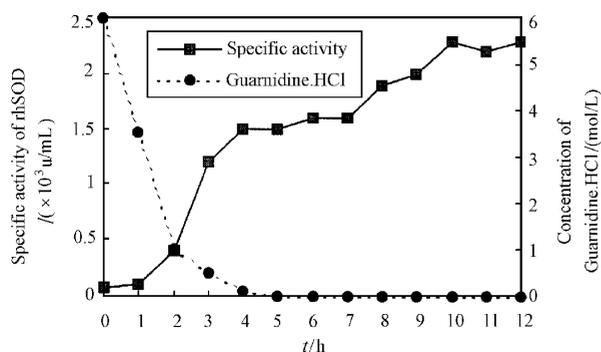


图6 在复性过程中 rhSOD 的活性与盐酸胍浓度与时间的关系曲线

Fig. 6 The time curve shows the specific activity of rh-SOD vs the concentration of Guanidine. HCl in the course of the refolding procedure

明显高于国内同类研究水平<sup>[9]</sup>。

rhSOD 作为一种人源性重组蛋白质,由于在大肠杆菌中过度表达等原因,使 rhSOD 工程菌合成的 rhSOD 蛋白质分子不能及时折叠形成其正确天然二、三级空间结构,表达产物形成包涵体,其最大的优点是易纯化,但需要经过特异的复性过程,使其转化为可溶性的有活性状态<sup>[15]</sup>。研究表明,在 0.1 mol/L 左右盐酸胍浓度条件下, rhSOD 蛋白样品逐渐恢复其原有空间构象并恢复其生物活性(图 6)。

rhSOD 的等电点为 5.6,所以我们选用阴离子交换柱进行纯化,在此之前,我们采用 G-50 柱进行脱盐,以保证阴离子柱的吸附性能,通过不断调整洗脱梯度和盐浓度,达到了较好的纯化效果。

我们已经完成了 rhSOD 的基因克隆、工程菌构建、蛋白表达及表达产物纯化等一些基础工作,进一步的开发研究工作正在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] Kushleika J, Checkoway H, Woods J S *et al.* *Ann Neurol*, 1996, **39**(3): 378~381
- [2] Noda J, Otagiri M, Akaike T *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **279**(1): 162~171
- [3] Poduslo J F, Curran G L. *J Neurochem*, 1996, **67**(2): 734~741
- [4] Rocca M, Giavaresi G, Caliceti P *et al.* *Int Artif Organs*, 1996, **19**(12): 730~734
- [5] Davis J M, Rosenfeld W N, Richter S E *et al.* *Pediatrics*, 1997, **100**(1): 24~30
- [6] Edeas M A, Emerit I, Khalfoun Y *et al.* *Free Radic Biol Med*, 1997, **23**(4): 571~578
- [7] Prakash O, Teng S, Ai M *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1997, **343**(2): 173~180
- [8] 赵敏顺. 基础医学与临床, 1990, **10**(4): 23~26
- [9] 施惠娟, 范力强, 魏东芝等. 生物化学与生物物理学报, 1999, **31**(1): 16~18
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Lab Manual* (2nd ed). NY: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989
- [11] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 医药工业, 1988, **19**(5): 217~219
- [12] Sherman L, Dafni N, Lieman-Hurwitz J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(18): 5465~5469
- [13] Mrooka Y, Mitani I. *J Biotechnol*, 1985, **17**(2): 303~316
- [14] Shiloach J, Bayer S. *Biotechnology and Bioengineering*, 1975, **17**(3): 227~239
- [15] Kane J F, Hartley D L. *Trends in biotechnol*, 1988, **23**(6): 96~101

## Gene Cloning, Expression and Purification of Its Production of Recombinant Human Superoxide Dismutase

ZHANG Yi WANG Jun-Zhi WU Yong-Jie

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

**Abstract** Human SOD cDNA was cloned and constructed an expression plasmid with high sufficient and stability expression in *E. coli*. The rhSOD cDNA was amplified by RT-PCR with the template of the total RNA extracted from human liver tissue. The expression plasmid, pLY-4/rhSOD, containing rhSOD cDNA, was transformed into the *E. coli* JF1125. The sequence of the cloned rhSOD cDNA was identified with the reported data. The expression level reached to more than 68% of total bacteria proteins; The technology for protein renature and purification was efficiency and fast. The purity of the final products reached more than 98%. The value of bioactivity was determined as 2529 u/mg. This study gave enough support for production of rhSOD by biotechnology.

**Key words** Recombinant human superoxide dismutase, gene cloning, gene expression, inclusion body, renature, purification