

重组刺桐胰蛋白酶抑制剂 a 的制备及其在 tPA 突变体纯化中的应用

王新* 屈贤铭 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 将基因工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3) pET22b-mETIa 高密度发酵, 用异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 重组刺桐胰蛋白酶抑制剂 a (rETIa) 蛋白在 *E. coli* 中得到较高水平表达, 表达量占菌体总蛋白的 40% 以上. 经菌体破碎、包涵体变性、复性, 二步柱层析纯化得到电泳纯的 rETIa 蛋白. 测得 rETIa 对 tPA 突变体 (NTA) 的抑制平衡常数 K_i 为 8.72×10^{-8} mol/L. 据此利用纯化的 rETIa 蛋白制备 rETIa-Sepharose 4B 亲和层析柱. 直接一步纯化 NTA 复性液, 纯化的 NTA 纯度达 90% 以上, 收率为 96.2%, 纯化倍数为 13.2, 比活为 (565.7 ± 71.3) U/ μ g.

关键词 重组刺桐胰蛋白酶抑制剂 a, 高效表达, 亲和层析, tPA 突变体 (NTA)

学科分类号 Q789, Q503

刺桐胰蛋白酶抑制剂 (ETI) 不仅可抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶, 也可抑制组织型纤溶酶原激活因子 (t-PA), 但不抑制尿激酶型纤溶酶原激活因子 (UPA)^[1]. ETI 作为多功能丝蛋白酶抑制剂被广泛地用于蛋白质结构和功能的研究^[2], 也可作为配体制成亲和层析柱纯化相应的丝氨酸蛋白酶^[3]. 天然的 ETIa 蛋白是从刺桐植物种子中提取的, 产量有限, 用基因工程技术可以解决这一问题. 我们利用 Kouzuma 博士惠赠的 rETIa 工程菌株, 高密度发酵, 大量制备了 rETIa 蛋白. 经测定 rETIa 对 t-PA 突变体 NTA (一种新型拟静脉注射抗血栓药物) 具有很强的抑制作用. 据此, 将制备的 rETIa 蛋白与 Sepharose 4B 偶联, 制成亲和层析柱, 直接一步纯化 NTA 复性液, 得到高纯度的 NTA.

1 材料和方法

1.1 材料

E. coli BL21 (DE3) pET22b-mETIa 由日本 Kouzuma 博士惠赠, 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) (Takara 公司), 二硫苏糖醇 (DTT)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) (华美生物工程公司) 酵母抽提物、蛋白胨 (日本制药株式会社), D-Ile-Pro-L-Arg-p-NA (S-2288) 购自 Sigma 公司. NTA 纯品和 NTA 复性液均由本室与珠海亚利生物技术公司合作生产. Q-Sepharose、Sephacryl S-100、CNBr 活化 Sepharose

4B (Pharmacia 公司). 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 制备 rETIa 蛋白和 rETIa 生物活性测定:

a. rETIa 工程菌株的高密度发酵和表达. 挑取单个 rETIa 工程菌株菌落, 接种于 3 ml LB (100 mg/L Amp) 中, 37℃ 250 r/min 培养过夜. 以 1:100 比例将过夜培养菌悬液接种于 300 ml LB (100 mg/L Amp) 中, 培养 12~16 h, 作为种子液. 按 1:20 比例将种子液接种于 15 L 发酵罐 (Braun 公司) 中, 分批补料, 37℃ 培养 6 h ($A_{600} = 20$ 左右), 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L 诱导表达, 继续培养 6 h (取样测定 A_{600}), 离心 (14 000 g, 20 min) 收集菌体. 取少量菌体, 用 15% 还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测. 用激光灰度扫描仪 (LKB 公司) 扫描凝胶, 确定表达的 rETIa 蛋白占菌体总蛋白的百分含量.

b. 菌体破碎和包涵体的变性、复性. 利用高压匀浆法和超声破碎菌体, 17 000 g 离心 30 min, 取沉淀. 用 2% Triton X-100 的 Tris-HCl 缓冲液反复洗涤沉淀, 得到 rETIa 包涵体. 用含 1 mmol/L DTT 的 8 mol/L 脲溶解包涵体, 采用稀释法复性.

c. 柱层析纯化. 采用 Q-Sepharose 阴离子柱和 Sephacryl S-100 凝胶过滤两步纯化 rETIa 复性液.

d. 蛋白质含量测定. 用改良的 Lowry's 法测

* 通讯联系人.

Tel: 021-64700892-364, E-mail: wx3@263.net

收稿日期: 2001-09-20, 接受日期: 2001-10-28

定蛋白质浓度^[4].

e. rETIa 抑制 NTA 活性的测定. 以 S-2288 为底物测定 NTA 的活力^[5]. rETIa 和 NTA 作用 5 min 后, 取 50 μ l 加入到装有 450 μ l 0.1 mmol/L S-2288 溶液的石英比色皿中, 在 DU7500 型分光光度计 (温度保持在 30 $^{\circ}$ C) 上, 动态测定 A_{405} , 从而确定酶的残余活力和 rETIa 的抑制平衡常数 K_i ^[6].

1.2.2 rETIa-Sepharose 4B 亲和层析柱的制作和纯化 NTA:

a. rETIa-Sepharose 4B 亲和层析柱的制作. 称取 2 g 冻干的 CNBr 活化 Sepharose 4B, 加入适量的 1 mmol/L HCl 吸胀, 再用 0.1 mol/L, pH 8.3 NaHCO₃ 抽洗. 将此吸胀好的活化胶与 38 mg 纯化的 rETIa 蛋白交联, 制成 rETIa-Sepharose 4B. 取 5 ml rETIa-Sepharose 4B 用 TST (50 mmol/L, Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 mol/L NaCl) 平衡, 真空除气泡装柱.

b. NTA 复性液的制备. 将 NTA 包涵体用 8 mol/L 脲溶解, 采用稀释法复性, 再用截止分子质量为 10 ku 的膜超滤浓缩.

c. 亲和层析纯化 NTA. 取 23 ml NTA 复性液上 rETIa-Sepharose 4B 柱, 柱流速为 0.6 ml/min. 过柱后, 用 TST 洗至基线; 再用 5 mmol/L, pH 5.0 NH₄Ac 进一步洗除杂蛋白; 最后用 0.5 mol/L, pH 3.4 HAc-NH₄Ac 缓冲溶液洗脱目的蛋白. 用 12% 非还原 SDS-PAGE 检测洗脱的蛋白峰, 经激光灰度扫描凝胶, 确定纯化后 NTA 蛋白的纯度.

d. NTA 活性测定. 利用上海医科大学的 t-PA 活性试剂盒检测.

2 结 果

2.1 rETIa 蛋白的表达

rETIa 工程菌株在高密度发酵情况下仍能高效表达 (收获时 A_{600} 达到 56.4), 表达量占菌体总蛋白的 40% 以上 (图 1).

2.2 rETIa 蛋白的纯化

rETIa 复性液经两步柱层析纯化达到电泳纯 (图 1).

2.3 rETIa 抑制 NTA 的抑制活性

NTA 的浓度和 S-2288 的浓度恒定, 通过增加 rETIa 的浓度, 测定酶的残余活力, 结果表明 rETIa 对 NTA 具有较强的抑制作用 (图 2), 并且

测得 30 $^{\circ}$ C 时, rETIa 抑制 NTA 的抑制平衡常数 K_i 为 8.72×10^{-8} mol/L (图 3), 据此 rETIa 可作为 NTA 的配体制成亲和层析柱, 用于纯化 NTA.

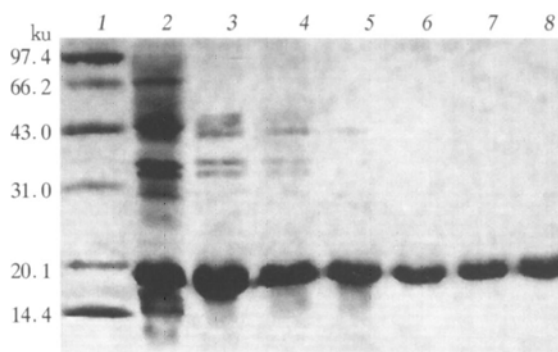


Fig. 1 Analysis of expression of induced cell and purified rETIa at different steps by SDS PAGE under reducing conditions

1: protein marker; 2: induced cell lysate; 3: precipitate of induced cell lysate; 4: inclusion body of rETIa; 5: reactivation mixture of rETIa; 6: purified rETIa by anion-exchange chromatography; 7: purified rETIa by gel filtration; 8: freeze dried rETIa after being purified by gel filtration.

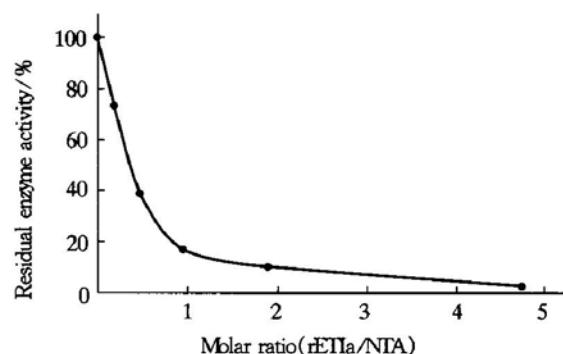


Fig. 2 Inhibitory activity of rETIa to NTA

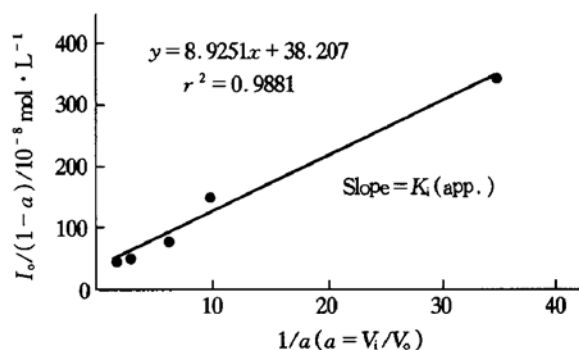


Fig. 3 A plot of determination of inhibitory constant of rETIa against NTA in accordance with equation

$$[I_0] / (1-a) = K_i (\text{app.}) / a + [E_0], K_i = K_i (\text{app.}) / (1 + [S] / K_m).$$

2.4 用 rETIa-Sepharose 4B 亲和层析纯化 NTA

23 ml NTA 复性液全部上亲和层析柱后, 用约

5 个柱体积平衡液洗至基线, 再用 5 mmol/L NH_4Ac 洗出少量杂蛋白 (图 4 中峰 II), 最后用酸性洗脱液洗出一尖峰 (图 4 中峰 III), 经 12% 非还原 SDS-PAGE 检测洗出的蛋白峰是 NTA 单体蛋白 (图 5). 用激光灰度扫描凝胶, 纯化后的 NTA 蛋白纯度达 90% 以上.

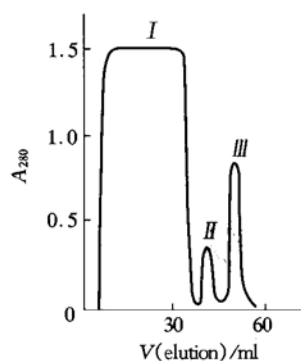


Fig. 4 Affinity chromatography of tPA deletion variant (NTA) on rETIa-Sepharose 4B

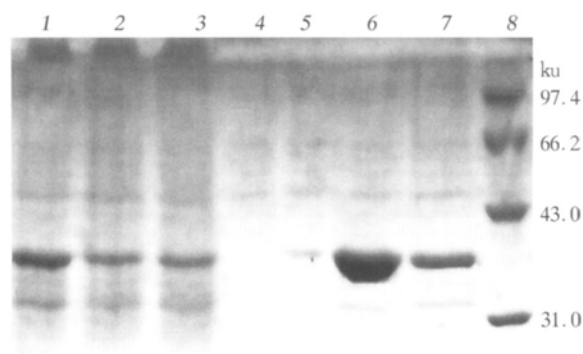


Fig. 5 SDS PAGE analysis of NTA in the absence of reducing agent

I: reactivation mixture of NTA; 2: fractions of former region (peak I); 3: fractions of latter region (peak I); 4: fractions of former region (peak II); 5: fractions of latter region (peak II); 6: fractions of central region (peak III); 7: fractions of latter region (peak III); 8: protein marker.

经亲和层析纯化 NTA, 结果见表 1, 一步纯化使 NTA 比活提高了 13.2 倍, 收率为 96.2%, 比活达 $(565.7 \pm 71.3) \text{ U}/\mu\text{g}$.

Table 1 Purification of tPA deletion variant (NTA) by affinity chromatography on rETIa-Sepharose 4B

	Total volume / ml	Total protein / mg	Specific activity / $\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	Purification / fold	Recovery / %
Renaturing solution	23.0	26.0	42.74 ± 5.12		
pH 3.4, $\text{HAc-NH}_4\text{Ac}$ eluate	5.1	1.89	565.7 ± 71.3	13.2	96.2

3 讨 论

刺桐胰蛋白酶抑制剂 a 基因可以在 *E. coli* 中直接表达^[2], 经实验检测 rETIa 的表达稳定、高效, 可以进行大规模的表达. 利用重组表达可以大批量制备 rETIa 蛋白, 完全可以克服天然 ETIa 蛋白不足的问题. 我们成功地进行了该工程菌株的高密度发酵, 经包涵体变性、复性, 柱层析纯化得到了电泳纯的 rETIa 蛋白, 产率达到 0.95 g/L 发酵液. 以 S-2288 为直接发光反应底物, 测得 rETIa 蛋白对 tPA 突变体 (NTA) 具有很强的抑制作用.

我们进行了中试规模制备 rETIa 蛋白, 主要目的是将其应用到 NTA 纯化工艺中去. 在纯化 t-PA 及其突变体药物中, 常用方法有离子交换、凝胶过滤^[7]、小分子配基亲和层析^[8]和 ETI 亲和层析^[3]等, 其中 ETI 亲和层析效果较好. Heussen^[3]利用天然的 ETI 蛋白制成的亲和层析柱, 进行一步纯

化黑色素瘤细胞表达上清中的 tPA, 提纯倍数达 270 倍, 收率达 90% 以上, 提纯效果强于其他类型的层析方法. 但不足的是天然 ETI 蛋白产量有限, 这就限制了它在 t-PA 纯化领域中的大规模应用. 我们利用 rETIa 蛋白制成亲和层析柱分离 NTA, 也获得了相当满意的分离效果, 收率与 Heussen 的结果相当, 提纯倍数虽只有 13.2 倍, 这主要由于分离的是包涵体复性形式的 NTA, 此形式中杂蛋白相对较少. 我们制备的 rETIa-Sepharose 4B 胶稳定性很强, 即使在 4℃ 保存 1 年以上, 柱效也没有明显降低. 鉴于 rETIa 蛋白可以抑制许多种丝氨酸蛋白水解酶, 我们下一步工作将致力于研究将 rETIa-Sepharose 4B 亲和柱应用到其他丝氨酸蛋白水解酶纯化中去.

致谢 感谢 Kouzuma 博士惠赠 *E. coli* BL21 (DE3) pET22b-mETIa 工程菌株.

参 考 文 献

- 1 Kouzuma Y, Suetake M, Kimura M, *et al.* Isolation and primary structure of proteinase inhibitors from *Erythrina variegata* orientalis seeds. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56** (11): 1819 ~ 1824
- 2 Kouzuma Y, Yamasaki N, Kimura M. The tissue-type plasminogen activator inhibitor ETIa from *Erythrina variegata*: structural basis for the inhibitory activity by cloning, expression, and mutagenesis of the cDNA encoding ETIa. *J Biochem*, 1997, **121** (3): 456~ 463
- 3 Heussen C, Joubert F, Dowdle E B. Purification of human tissue plasminogen activator with erythrins trypsin inhibitor. *J Biol Chem*, 1984, **259** (19): 11635~ 11638
- 4 Hartree E F. Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*, 1972, **48** (2): 422~ 427
- 5 Kohnert U, Rudolph R, Verheijen J H, *et al.* Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded tPA deletion variant BM 06. 022. *Protein Engineering*, 1992, **5** (1): 93~ 100
- 6 Bieth J. Some kinetic consequences of the tight binding of proteinase inhibitors to the determination of dissociation constants. In: Fritz H, eds. *Proteinase Inhibitors*. Heidelberg: Springer, 1974. 463~ 469
- 7 Rijken D C, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem*, 1981, **256** (13): 7035~ 7041
- 8 Husain S S. A single-step separation of the one- and two-chain forms of tissue plasminogen activator. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **285** (2): 373~ 376

Preparation of Recombinant ETIa and Its Application in Purification for tPA Deletion Variant (NTA)

WANG Xin^{*}, QU Xian-Ming, YANG Sheng-Li

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

Abstract Being cultured in high cell density, *E. coli* BL21 (DE3) harboring plasmid PET22b-mETIa were induced by IPTG and then recombinant ETIa were highly expressed. Expressed rETIa were above 40% of total bacterial protein. After primary purification through breaking *E. coli*, dissolving inclusion bodies, refolding, and further purification by two-step chromatographies, rETIa of electrophoretic purity has been obtained. Inhibitory activity of rETIa against tPA deletion variant (NTA) has been detected and inhibitory constant (K_i) was 8.72×10^{-8} mol/L. So affinity chromatography column of rETIa-Sepharose 4B was prepared for purification of NTA. After only one-step purification with this column from refolded NTA, 13.2-fold purified NTA with the specific activity of (565.7 ± 71.3) U/ μ g and above 90% of purity, have been obtained with the recovery rate of 96.2%.

Key words rETIa, high cell density, affinity chromatography, tPA deletion variant (NTA)

^{*} Corresponding author. Tel: 86-21-64700892-364, E-mail: wx3@263.net

Received: September 20, 2001 Accepted: October 28, 2001