

东方鲈 Factor C 中的结构域在结合脂多糖中的作用

孙向军^{1,2)} 王东宁²⁾ 张惟杰²⁾* 吴祥甫³⁾*

(¹⁾上海交通大学农业与生物技术学院, 上海 2001101; ²⁾上海交通大学生命科学与技术学院, 上海 200030;

³⁾中国科学院上海生命科学研究院, 生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 Factor C 是鲈血细胞中的一种丝氨酸蛋白酶原, 因其能以高亲和力结合脂多糖 (LPS), 在医药产品的内毒素检测中起着重要的作用. 以往研究表明处于 N 端的 3 个 Sushi 结构域对 Factor C 的 LPS 结合活性起着关键作用, 而 Factor C N 端的其他 3 个结构域, 包括 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域和 Lectin-like 结构域对 LPS 结合活性的影响尚不清楚. 利用 Bac-to-Bac 昆虫细胞表达系统可使 rFactor C 及其 4 个截短的片段 rCES123L, rCES123, rS123L 和 rS123 获得表达, 并且可采用亲和层析柱将这 5 个重组表达产物纯化. 通过测定 5 个重组表达产物的 LPS 结合活性及抑菌活性, 可以确定 Factor C 的 LPS 结合位点位于 S123 区域. 尽管 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域和 Lectin-like 结构域中不存在 LPS 结合位点, 但当这 3 个结构域同时存在时, 可提高 Factor C 或 CES123L 的 LPS 结合能力, 因此 rCES123L 具有与 rFactor C 非常相近的 LPS 结合能力. 实验结果表明, rCES123L 在昆虫细胞中的表达量比 rFactor C 高出 4 倍, 预示出 rCES123L 在医药领域的应用前景.

关键词 LPS 中和, LPS 结合活性, LPS 结合位点, 体外抑菌活性

学科分类号 Q789

细菌内毒素是革兰氏阴性菌 (G⁻ 菌) 细胞外壁的主要成分, 又称为脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS). LPS 是 G⁻ 菌造成的败血症或脓毒性休克病理中最重要的致病因素. 实验证明, LPS 的组成成分脂质 A 能增强内毒素引起的病理效应^[1~3]. 在大多数 G⁻ 菌的种属中, 脂质 A 的免疫与生化活性是相似的. 因此, 具有中和 LPS 中脂质 A 活性的物质可以对不同种类 G⁻ 病原菌提供防护, 这类物质也将成为理想的抗 LPS 药物^[4~6]. Factor C 是鲈

血细胞中的一种对内毒素敏感的丝氨酸蛋白酶原, 能以高亲和力结合 LPS, 并能中和脂质 A 的生物活性^[7,8]. Factor C 由 1 019 个氨基酸组成, 它的结构中包括 N 端的一段由 25 个氨基酸残基组成的信号肽、富半胱氨酸区 (Cys-rich)、类表皮生长因子结构域 (EGF-like)、5 个 “Sushi” 结构域、1 个类凝集素结构域 (Lectin-like) 和位于 C 端的 1 个典型的丝氨酸蛋白酶结构域. 图 1 呈现了 Factor C 的 “马赛克” 结构.

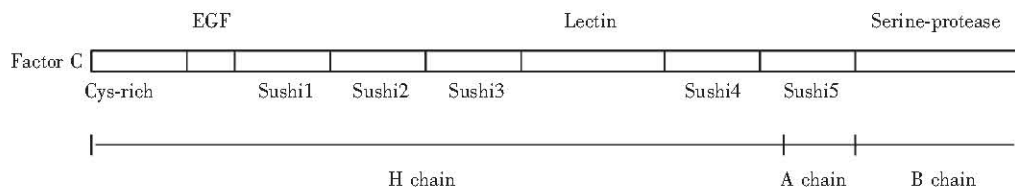


Fig. 1 The domain structure of Factor C

Factor C 以单链和双链两种形式存在, 它的催化位点位于双链的轻链上, 而 LPS 结合位点则在靠近 N 端的重链区. 当它以双链形式存在时, 一旦重链结合了 LPS, 就会催化轻链上的特定位点 Phe-Ile 断裂为 A 链和 B 链^[9].

近年来, 有很多研究证实了 Sushi 结构域的 LPS 结合活性^[10,11], 但是 Factor C 中的其他结构域

在结合 LPS 中的作用仍不清楚. 我们分别克隆了 Factor C 及其 4 个截短的片段 (CES123L,

* 通讯联系人.

张惟杰, Tel: 021-54742771, Fax: 021-64783085

E-mail: yrszhang@hotmail.com

吴祥甫, Tel: 021-54921253, Fax: 021-64338357

E-mail: xfwu@sunm.shenc.ac.cn

收稿日期: 2004-02-26, 接受日期: 2004-03-31

CES123, S123L 和 S123), 并首次在粉蝶夜蛾细胞 (Tn 细胞) 中将它们表达出来. 通过测定上述 5 个重组蛋白质的 LPS 结合活性及体外抑菌活性, 我们分析了 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域在结合 LPS 中的作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种: Bac-to-Bac 表达系统为 Gibco BRL 公司 (Grand Island, NY, USA) 产品. 大肠杆菌 K12D31 为中国科学院上海生物工程中心惠赠. Factor C 基因由中国科学院生物化学与细胞生物研究所吴祥甫教授实验室保存.

1.1.2 试剂及工具酶: Taq 酶为 Promega 公司 (2800 Woods Hollow Road, Madison WI, USA) 产品. 6 × His 单克隆抗体, AKP 标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体及 Ni²⁺-树脂为 Sigma 公司 (3050 Spruce street Saint Louis, Missouri 63103 USA) 产品. 检测 LBP 竞争结合试剂盒为 Hbt 公司 (Frontstraat 2a

5405 PB Uden, The Netherlands) 产品.

1.2 方法

1.2.1 构建表达载体: 采用 BAC-TO-BAC™ 昆虫细胞表达系统表达重组蛋白质. 以 PSK-FC 为模板, 通过 PCR 分别克隆 rFactor C、rCES123L、rCES123、rS123L 和 rS123, 4 个截短片段的结构说明列于表 1, PCR 引物列于表 2. 将 PCR 产物通过 Nco I 和 EcoR I 位点插入 pFastBac 载体, 形成 pFastBac-FC (Factor C)、pFastBac-CES123L、pFastBac-CES123、pFastBac-S123L 和 pFastBac-S123.

Table 1 Domain structures of four truncated fragments of Factor C

Domain structures	Abbreviation
Cys-EGF-Sushi1-Sushi2-Sushi3	CES123
CES-EGF-Sushi1-Sushi2-Sushi3-Lectin	CES123L
Sushi1-Sushi2-Sushi3	S123
Sushi1-Sushi2-Sushi3-Lectin	S123L

Table 2 List of primers

Primers used in cloning of Factor C	5' primer: ATCCATGGGAAGAGGAGATCTGG 3' primer: TAGAATTCGCTCAAATGAACTGCCTAATCC
Primers used in cloning of CES123	5' primer: ATCCATGGGAAGAGGAGATCTGG 3' primer: TAGAATTCTCAACAGGATGGCTGTGATCC
Primers used in cloning of CES123L	5' primer: ATCCATGGGAAGAGGAGATCTGG 3' primer: TAGAATTCTCACAAATCCATCATGCAAGC
Primers used in cloning of S123	5' primer: ATCCATGGGATGTCCTCTTCTTCCATCE 3' primer: TAGAATTCTCAACAGGATGGCTGTGATCC
Primers used in cloning of S123L	5' primer: ATCCATGGGATGTCCTCTTCTTCCATCE 3' primer: TAGAATTCTCACAAATCCATCATGCAAGC

underlined sequences are restriction enzyme sites: Nco I, EcoR I.

1.2.2 转染 Tn 细胞: 将 5 μl bacmid DNA 和 6 μl lipofectin 混合后, 向其中加入 1 ml 无血清培养基. 将上述混合物加到含有 9 × 10⁵ 个细胞的 35 mm 培养皿中. 转染后的细胞培养 72 h.

1.2.3 重组表达产物 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 及蛋白质印迹检测: SDS-PAGE 以 12% 的聚丙烯酰胺凝胶为分离胶, 用考马斯亮蓝染色. 蛋白质印迹分析以 6 × His 单克隆抗体为一抗, 碱性磷酸酶 (AKP) 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 野生病毒转染的细胞样品作为对照.

1.2.4 重组表达产物的体外抑菌活性测定: 活化

大肠杆菌 K12D31 (它是一种具有链霉素抗性的典型的革兰氏阴性菌, 常被用作抑菌实验的指示菌). 从活化菌中取部分转接于新鲜的 LB 培养基中, 37℃ 培养至对数期. 收集被重组病毒感染的 Tn 细胞, 进行超声处理. 将裂解液离心, 去除沉淀. 分别向 0.5 ml K12D31 悬浮液中加入含有 rFC, rCES123, rCES123L, rS123 和 rS123L 的细胞裂解液, 使重组蛋白的终浓度达到 80 mg/L. 将混合物在 37℃ 温育 1 h, 稀释后涂布于 LB 平板, 37℃ 培养 24 h. 通过平板菌落计数, 计算在 rFC, rCES123, rCES123L, rS123 和 rS123L 存在条件下

K12D31 的存活率, 存活率 (survival) = (样品平板上的菌落数/对照平板菌落数) $\times 100\%$ 。同时, 向 K12D31 悬浮液中加入野生病毒感染的细胞裂解液, 其平板上的菌落数作为抑菌实验的对照。每次实验做 3 组平行实验, 且实验重复 3 次后取平均值。

1.2.5 重组表达产物的纯化: 离心收集约 9×10^7 个被重组病毒感染的细胞, 重新悬浮于 15 ml 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 10% (体积比) 甘油) 中, 超声处理, 裂解液于 30 000 *g* 离心 20 min。上清液经 0.45 micron membrane 过滤, 上 nikel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) 亲和层析柱纯化。层析柱经缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L imidazole, 500 mmol/L KCl, 10% (体积比) 甘油) 洗涤, 再用洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L imidazole, 100 mmol/L KCl, 10% (体积比) 甘油) 洗脱。收集流出液, 并用 SDS-PAGE 检测。

1.2.6 重组表达产物的体外 LPS 中和活性测定:

采用 Endoblock LBP ELISA Test Kit 进行 LPS 中和活性测定, 该试剂盒是基于重组表达蛋白质抑制 LBP 与 LPS 结合的原理设计的。将 25 μg LBP 加入到微量滴定板的每孔中, 同时将纯化后不同浓度的重组表达蛋白质与定量的 LPS 在 eppendorf 管中温育 30 min (37 $^{\circ}\text{C}$)。将 1 $\times$ PBS (磷酸缓冲液) 替代重组表达蛋白质与定量的 LPS 在 eppendorf 管中温育, 作为阴性对照。将上述温育后的混合物加入到已被 LBP 包被的微量滴定板的每孔中, 温育 1 h。加入链霉抗生物素——过氧化物酶偶联物, 之后加入 100 μl TMB 底物, 温育 30 min 后加入 100 μl 2.0 mol/L 柠檬酸终止反应。用分光光度计测定波长为 450 nm 的吸光度。每次实验每个样品为 3 个孔, 且实验重复 3 次后取平均值。

2 结果与讨论

2.1 重组蛋白质的表达及纯化

SDS-PAGE 及蛋白质印迹检测结果显示 5 个重组蛋白质皆获得表达 (图 2a, 2b)。

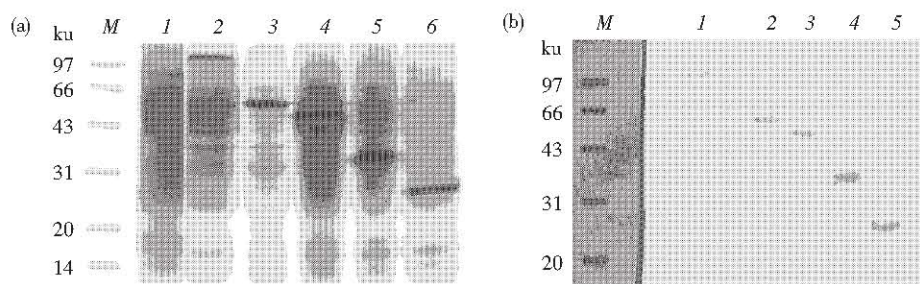


Fig. 2 SDS-PAGE (a) analysis and Western-blot analysis (b) of recombinant proteins expression in Tn cells

M: molecular mass marker; 1: Tn cell sample infected by wild-type virus; 2: rFC, 110 ku; 3: rCES123L, 47 ku; 4: rS123L, 45 ku; 5: rCES123, 33 ku; 6: rS123, 22 ku.

N 端融合了 6 $\times$ His 的重组表达产物经 nikel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) 亲和层析柱后被纯化

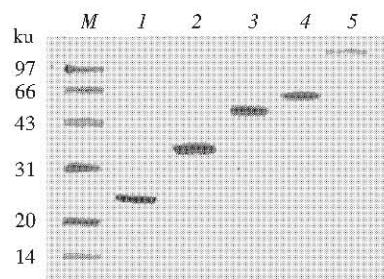


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins

M: Molecular mass marker; 1: rS123; 2: rCES123; 3: rS123L; 4: rCES123L; 5: rFC.

(图 3), 纯度达到 95%, 表达量 200 ~ 700 $\mu\text{g/L}$, 与 Factor C 整个片段相比, 截短的片段能够较好地表达在 Tn 细胞中表达。

2.2 Factor C 结构域对抑菌活性的影响

从图 4 可以看出重组表达产物表现出不同的抑菌能力。rFC 的抑菌活性与 rCES123L 的抑菌活性无明显差别, 说明 FC 的活性部位位于 CES123L 片段中。此外, rCES123、rS123 及 rS123L 的抑菌活性之间也无明显不同, 可推断出 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域并不存在活性位点。因此, Factor C 全长或其截短片段 CES123L 中的活性区域应位于 S123 中, 这与以往的研究结

果相符。值得关注的是, rCES123L 的抑菌活性明显高于 rS123 的抑菌活性。由此可断定尽管 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域中不存在活性位点, 但当它们同时存在时可提高 S123 结构域的抑菌活性。

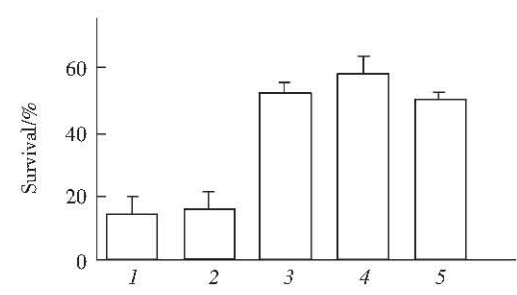


Fig. 4 Recombinant proteins displayed different bactericidal ability
1: rFC; 2: rCES123L; 3: rCES123; 4: rS123; 5: rS123. The suspension of K12D31 was mixed with Tn cells lysates containing recombinant peptides (80 mg/L) respectively, and the mixture was incubated at 37 °C for 1 h. K12D31 incubated with lysate of Tn cells infected with wild type virus was served as control.

2.3 Factor C 结构域对 LPS 结合活性的影响

为了深入探讨 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域的功能, 我们采用 ELLSA Kit (Hbt, Frontstraat 2a 5405 PB Uden, The Netherlands) 测定 5 个表达产物的 LPS 结合活性 (图 5)。

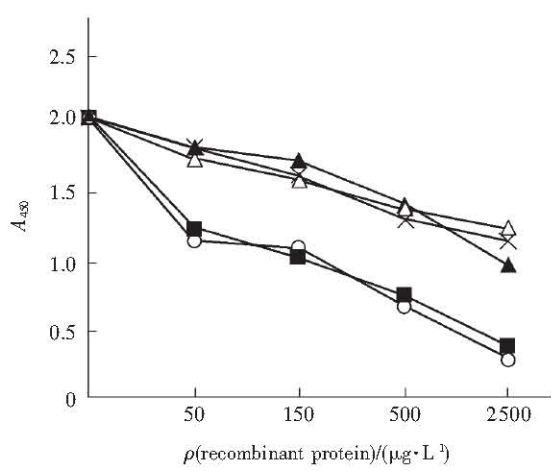


Fig. 5 LPS-neutralizing curve of five recombinant peptides
LPS-neutralizing ability of the five recombinant peptides was measured by ELISA Kit. ○—○: Fc; ■—■: CES123L; ▲—▲: S123L; △—△: CES123; ×—×: S123.

实验结果显示, rFC 的 LPS 中和曲线与 rCES123L 的中和曲线非常相似, 可以推断 Factor C

的 LPS 结合位点位于 CES123L 区域。图 5 还表明 rCES123、rS123 及 rS123L 的 LPS 中和曲线之间无明显差别, 由此可判定 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域并不存在 LPS 结合位点, 也就是说 Factor C 全长或其截短片段 CES123L 中的 LPS 的结合位点应位于 S123 区域中。此外, 实验结果也清楚地表明, rCES123L 的 LPS 中和曲线与 rS123 的 LPS 中和曲线有显著差别, 即 rCES123L 的 LPS 中和能力明显高于 rS123 的 LPS 中和能力。因此可以做出合理推断: 尽管 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域中不存在 LPS 结合位点, 但当它们同时存在时可提高 S123 结构域的 LPS 结合能力。这是首次发现 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域对 Factor C 结合 LPS 能力的影响。LPS 中和实验的结果与体外抑菌实验的结果是一致的, 这进一步说明 5 个重组表达产物的抑菌活性源于它们的 LPS 结合能力。

总之, Factor C 的 LPS 结合活性位于 S123 结构域中。尽管 Cys-rich 结构域、EGF-like 结构域及 Lectin-like 结构域中不存在 LPS 结合位点, 但当它们同时存在时可提高 S123 结构域的 LPS 结合能力。由于这 3 个结构域的影响, rCES123L 的抑菌活性与 rFactor C 非常相近, 明显高于 rS123。而且, rCES123L 在 Tn 细胞中的表达量明显高于 rFC。这些实验结果预示出 rCES123L 在医药领域的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Wang D N, Liu J W, Zhang W J, et al. Cloning of anti-LPS factor C cDNA from *Tachypleus tridentatus*, expression in *Bombyx mori* larvae and its biological activity in vitro. Mol Biotech, 2002, 21 (1): 1~6
- 2 王东宁, 刘杰武, 张惟杰, 等. 抗内毒素治疗新策略. 生物工程学报, 2001, 17 (3): 241~245
Wang D N, Liu J W, Zhang W J, et al. Chin J Biotechnology, 2001, 17 (3): 241~245
- 3 Elsbach P, Weiss J. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide, Immunobiology. 1993, 187 (3~5): 417~429
- 4 Pui A W M, Ho B, Ding J L. Yeast recombinant factor C from horseshoe crab binds endotoxin and causes bacteriostasis. J Endtxn Rsreh, 1997, 4 (6): 391~400
- 5 Nakamura T, Morita T, Iwanaga S. Lipopolysaccharide-sensitive serine-proteasw zymogen (factor C) found in limulus hemocytes. Eur J Biochem, 1986, 154 (3): 511~521
- 6 Tokunaga F, Miyata T, Nakamura T. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease of horseshoe crab hemocytes. Eur J Biochem, 1987, 167 (3): 405~416

- 7 Morita T, Ohtsubo S, Nakamura T. Intracellular proclotting enzyme in limulus hemocytes. J Biochem, 1985, **97** (6): 1611 ~ 1620
- 8 Nakamura T, Horiuchi T, Morita T. Purification and properties of intracellular clotting factor from horseshoe crab. J Biochem, 1986, **99** (3): 847 ~ 857
- 9 Muta T, Miyata T, Misumi Y, *et al.* Limulus factor C. J Biol Chem, 1991, **226** (10): 6554 ~ 6561
- 10 Tan N S, Ho B, Ding J L. High-affinity LPS binding domain (s) in recombinant factor of a horseshoe crab neutral neutralizes LPS-induced lethality. FASEB, 2000, **14** (7): 859 ~ 870
- 11 Tan N S, Patricia Ng M L, Yau Y H, *et al.* Definition of endotoxin binding sites in horseshoe crab factor C recombinant sushi proteins and neutralization of endotoxin by sushi peptides. FASEB, 2000, **14** (9): 1801 ~ 1813

Role of Domains in Factor C From *Tachypleus tridentatus* in Neutralization Endotoxin

SUN Xiang-Jun^{1,2)}, WANG Dong-Ning²⁾, ZHANG Wei-Jie²⁾*, WU Xiang-Fu³⁾*

⁽¹⁾ College of Agriculture and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China;

²⁾ College of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China;

³⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Factor C is a serine protease enzymogen presented in the circulating blood cell of horseshoe crab. Owing to its extreme sensitivity to endotoxin, Factor C (FC) plays an important role in pyrogen-detection in pharmaceutical products. Previous study has shown that three Sushi domains (S123) in the N-terminal of FC are critical for its LPS-recognition activity. The effect of three other domains in N-terminal of FC, namely Cys-rich, EGF-like and Lectin-like, on its LPS-neutralization function was not clear. The recombinant FC and its four truncated fragments were expressed using Bac-to-Bac baculovirus expression system in Tn cells. The five recombinant peptides were then purified and tested for the LPS-binding activity and bactericidal activity *in vitro*. The experiments showed that the LPS-binding site of Factor C resides in the S123 region. Even though Cys-rich, EGF-like and Lectin-like domains do not harbor LPS-binding site, the presence of all three domains can improve LPS-binding activity of S123. Recombinant peptide rCES123L containing Cys-rich, EGF-like, S123, and Lectin-like domains exhibits almost the same LPS-binding activity as that of the full-length parental FC. Provided the fact that rCES123L has 4-fold higher production yield than that of recombinant FC in Tn cells, this peptide has a potential in biotechnology and pharmaceutical application for LPS-neutralization.

Key words LPS-neutralization, LPS-binding activity, LPS-binding site, bactericidal activity *in vitro*

* Corresponding author.

ZHANG Wei-Jie, Tel: 86-21-54742771, Fax: 86-21-64783085, E-mail: yrszhang@hotmail.com

WU Xiang-Fu, Tel: 86-21-54921253, Fax: 86-21-64338357, E-mail: xfwu@sunm.shenc.ac.cn

Received: February 26, 2004 Accepted: March 31, 2004