

• 基础实验研究论著 •

自剪切重组麦芽糖结合蛋白-人鼻病毒 3C 蛋白酶融合蛋白在大肠杆菌表达系统中表达、纯化及活性检测*

董哲君^{1,2}, 赵海舰², 许小毛³, 方保民³, 郭健⁴, 肖飞^{4△}

(1. 北京协和医学院研究生院, 北京 100730; 2. 北京医院卫生部临床检验中心, 北京 100730; 3. 北京医院呼吸与危重症医学, 北京 100730; 4. 卫生部老年医学研究所, 北京 100730)

摘要:目的 利用大肠杆菌表达系统高效表达一种可以自剪切的重组的麦芽糖结合蛋白-人鼻病毒 3C 蛋白酶融合蛋白酶, 获得一种可溶性好、酶切特异性强, 且在低温下仍保持酶活性的新型基因工程工具酶。方法 将编码人鼻病毒 3C 蛋白酶的遗传微粒克隆入表达载体 pRSF-duet, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经镍柱亲和层析纯化得到人鼻病毒 3C 蛋白酶。通过自身体内酶切实验进行活性检测。结果 人鼻病毒 3C 蛋白酶在大肠杆菌表达系统中得到了高效的表达, 并可特异性识别及剪切人鼻病毒 3C 蛋白酶酶切位点。结论 获得了新型的基因工程工具酶。

关键词:人鼻病毒 3C 蛋白酶; 表达; 工具酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2721-03

Expression, purification and cleavage activity analysis of self-processed recombinant MBP-HRV 3C fusion protease in E. coli expression system

Dong Zhejun^{1,2}, Zhao Haijian², Xu Xiaomao³, Fang Baomin³, Guo Jian⁴, Xiao Fei^{4△}

(1. Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 2. National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, Beijing 100730, China; 3. Division of Respiratory and Critical Care Medicine, Beijing Hospital, Beijing 100730, China; 4. Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To obtain a novel tool-enzyme for genetic engineering with good solubility, strong specificity of enzyme digestion and maintaining the enzyme activity at low temperature by using E. coli expression system to express self-processed recombinant MBP-HRV 3C fusion protease. **Methods** The cDNA encoding HRV 3C protease was cloned into pRSF-Duet vector. The recombinant plasmid was transferred into E. coli BL21 (DE3) for expression. HRV 3C protease was obtained through Nickel column affinity purification. The cleavage activity of HRV 3C protease was determined by in vivo experiment. **Results** HRV 3C protease was highly expressed in E. coli expression system, and the obtained HRV 3C protease could recognize and digest HRV 3C site. **Conclusion** A novel tool-enzyme for genetic engineering is obtained.

Key words: HRV 3C protease; expression; tool-enzyme

随着人类基因组图谱的绘制完成, 人类已由基因组学时代进入蛋白质组学时代。蛋白质组学研究为研究者提供了许多具有重要生理及病理意义的靶蛋白。但这些蛋白的作用机制尚不清楚, 有待进一步的结构和功能研究。许多蛋白自身的原因, 如蛋白对细胞具有毒性、溶解性差等, 难以得到高纯度及高产率的蛋白, 阻碍了蛋白功能的研究。蛋白标签融合表达技术是目前被广泛应用的获得重组蛋白的重要手段, 与蛋白标签融合表达可使靶蛋白的表达量上升及增加溶解性^[1]。目前使用较多的蛋白标签有麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽转移酶、小泛素相关修饰物等。但这些融合标签可能对蛋白的结构和活性产生一定的影响, 因此在研究蛋白的结构和功能时需要将这些标签移除。

目前常用于移除这些蛋白标签的蛋白酶有凝血酶、凝血因子 Xa、肠激酶和烟草蚀纹病毒蛋白酶等。凝血酶、凝血因子 Xa 及肠激酶在酶切后虽不会留下多余氨基酸, 但是存在酶切非特异性的缺点, 而且这些蛋白酶的最适酶切温度在 25~37℃可导致靶蛋白降解^[2]。这些蛋白酶较为昂贵, 难以广泛应用。烟草蚀纹病毒蛋白酶特异性识别蛋白序列为谷氨酸-任

意氨基酸-任意氨基酸-酪氨酸-任意氨基酸-谷氨酰胺-甘氨酸/丝氨酸, 在谷氨酰胺(P1)与甘氨酸(P1')之间切, 但 P1' 位置并非专一的是甘氨酸或丝氨酸, 若 P1' 位置上为脯氨酸, 会显著影响烟草蚀纹病毒蛋白酶的剪切效果^[3]。人鼻病毒 3C 蛋白酶具有高度的酶切特异性, 且在低温下具有较高的酶活性, 其特异性识别序列为亮氨酸-谷氨酸-缬氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸-谷氨酰胺↓-甘氨酸-脯氨酸^[4]。

人鼻病毒属于肠道病毒属, 是人类普通感冒的主要致病病毒, 其基因组为单股正链 RNA 分子, 编译一个病毒多聚蛋白, 这个多聚蛋白前体经病毒本身编码的蛋白酶 2A 及 3C 进一步的切割产生各个病毒蛋白, 人鼻病毒 3C 蛋白酶为病毒复制过程所必需^[5]。本研究通过与麦芽糖结合蛋白融合高效表达人鼻病毒 3C 蛋白酶并且构建重组人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF-Duet 克隆及表达系统。该原核表达系统是基于 pRSF-Duet 原核表达载体, 加入人鼻病毒 3C 蛋白酶酶切位点及两个可供纯化的亲和标签: 组氨酸标签和麦芽糖结合蛋白。表达时, 麦芽糖结合蛋白可增加蛋白表达效率及提高靶蛋白的溶解性。纯化时, 组氨酸标签和麦芽糖结合蛋白可进行双重纯化。最终得

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81170050)。 作者简介: 董哲君, 女, 硕士研究生, 从事临床检验方法学研究。 △ 通讯作者, E-mail: xiaofei@bjhmoh.cn。

到高纯度且无多余氨基酸的靶蛋白(见图 1)。

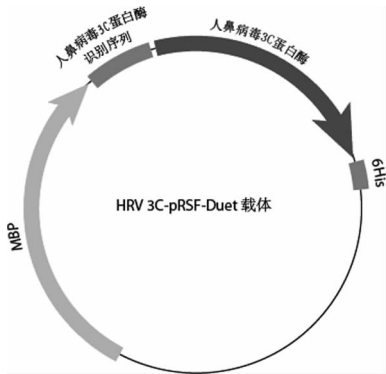


图 1 重组人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF Duet 克隆载体示意图

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 改造后的重组人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF Duet 载体,大肠杆菌 10B、BL21(DE3)感受态细胞均为本室保存。

1.1.2 引物 根据人鼻病毒 3C 序列设计引物,引物由 Invitrogen 公司合成。引物 P1:GTC AGG ATC CAA TAC CGA ATT TGC TCT GTC T;引物 P2:GTC AAA GCT TCT GTT TTT CTA CGA AGT ACT G,下划线部分为引入的酶切位点。

1.1.3 试剂 Pfx DNA 聚合酶及 PCR 相关试剂购自美国 Invitrogen 公司;T4 DNA 连接酶,限制性内切酶及 DNA 和蛋白 Marker 购自日本 Takara 公司;质粒提取及 DNA 凝胶回收纯化试剂盒购自德国 Kiagen 公司;镍柱购自上海生工生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 人鼻病毒 3C 蛋白酶基因克隆重组人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF Duet 表达载体 以 pRSF-GFP-HRV 14 3C 质粒作为模板,以 P1、P2 引物扩增人鼻病毒 3C 蛋白酶基因。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收纯化。纯化得到的人鼻病毒 3C 蛋白酶基因经 BamH I、Hind III 双酶切,连接到经双酶切的重组人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF Duet 表达载体上。连接产物转化 10B 感受态细胞。将转化菌涂布于含卡那霉素(50 mg/mL)的 LB 平板上。提质粒,经 BamH I、Hind III 双酶切鉴定重组质粒。阳性重组质粒送 Invitrogen 公司进行测序。

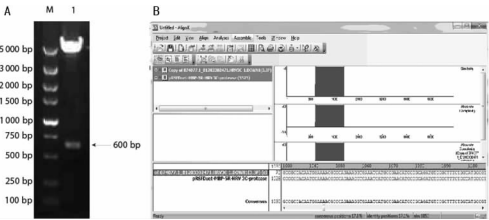
1.2.2 人鼻病毒 3C 蛋白酶的表达及纯化 将测序鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落接种到 5 mL 含卡那霉素(50 mg/mL)的 LB 液体培养基中,37 ℃ 过夜培养。将 5 mL 过夜培养液接种于 200 mL LB 液体培养基中,37 ℃ 继续培养,当 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 h,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 37 ℃ 继续诱导 4 h。6 000 r/min 离心 20 min 收菌,高压破菌。离心后上清液与平衡好的 1 mL 镍柱在 4 ℃ 结合 1 h,用 10 倍柱床体积的洗涤缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 氯化钠、50mmol/L 咪唑)洗柱 2 次,分别用 0.2、1 mL 洗脱液(20 mmol/L 磷酸钠、500 mmol/L 氯化钠、150 mmol/L 咪唑)洗脱靶蛋白。经 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白产量、纯度及溶解性。-80 ℃ 保存蛋白。

1.2.3 人鼻病毒 3C 蛋白酶活性的检测 本研究将人鼻病毒

3C 蛋白酶与麦芽糖结合蛋白标签融合表达,该融合蛋白含有人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切位点,若人鼻病毒 3C 蛋白酶有活性,可将其自身从麦芽糖结合蛋白上剪切下来,经镍柱纯化后仅得到重组人鼻病毒 3C 蛋白酶;若人鼻病毒 3C 蛋白酶无活性,经镍柱纯化后得到的是麦芽糖结合蛋白与人鼻病毒 3C 蛋白酶的融合蛋白。经 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切效果。

2 结果

2.1 人鼻病毒 3C 蛋白酶基因的扩增表达、鉴定及载体构建 以 pRSF-GFP 重组人鼻病毒 3C 蛋白酶为模板,P1、P2 为引物,经 PCR 扩增得到约 600 bp 大小的片段,与预期相符,结果未示出。重组质粒经双酶切鉴定,可见约 600 bp 大小片段,见图 2A。经测序鉴定,人鼻病毒 3C 蛋白酶基因序列正确无突变且读码框位置正确,见图 2B。



A:重组人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切鉴定结果;B:重组人鼻病毒 3C 蛋白酶的测序结果

图 2 重组人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切及测序鉴定结果

2.2 人鼻病毒 3C 蛋白酶的表达及纯化 含有人鼻病毒 3C 蛋白酶基因重组质粒的大肠杆菌 BL21 经异丙基硫代半乳糖苷诱导表达,15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,可见相对分子质量 20×10^3 及 40×10^3 处有明显表达条带,见图 3。对比纯化后和裂解后样本,表明经镍柱得到了高浓度且较纯的人鼻病毒 3C 蛋白酶。将纯化得到的蛋白酶样品置于冰上保存,过夜前后样本对比,可见低温下蛋白酶稳定性较好。

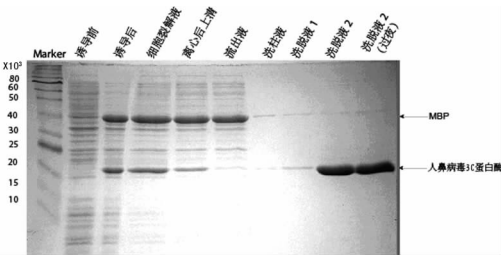


图 3 重组人鼻病毒 3C 蛋白酶蛋白酶的表达与纯化结果

2.3 人鼻病毒 3C 蛋白酶活性的鉴定 麦芽糖结合蛋白-人鼻病毒 3C 蛋白酶融合蛋白含有人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切位点,将纯化产物经 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,可见在约相对分子质量 20×10^3 处有一蛋白条带,见图 3。这与预期结果相符,提示人鼻病毒 3C 蛋白酶将其自身从麦芽糖结合蛋白融合蛋白上剪切,表明纯化得到的人鼻病毒 3C 蛋白酶具有较好的活性。

3 讨论

蛋白重组技术是目前研究蛋白结构和功能的重要手段,被广泛应用于生物及医学领域。大肠杆菌原核表达系统因生长速度快、培养简单、价格低廉等优点,作为重组蛋白表达系统的首选。但由于缺乏真核系统的翻译后修饰功能,外源蛋白常错误折叠或形成不溶性包涵体,人们就利用蛋白标签融合表达增加外源蛋白的产量和溶解性,在研究蛋白结(下转第 2725 页)

β -catenin 介导的转录能被 Chibby 负向调节, TC-1 能够与 Chibby 相拮抗,使得 Chibby 对 β -连环蛋白拮抗能力减弱,进而上调该通路的下游有关的靶基因 (MMP-7、MMP-14、VEGF、CyclinD1 等)表达,促进癌细胞的增殖及转移。

β -catenin 是一种细胞骨架蛋白,也是 Wnt 信号通路的关键信号元件。正常情况下, β -catenin 大部分与突出细胞膜上的钙黏蛋白结合,维持着同种细胞的黏附作用,其中小部分会与 Axin、APC 和 GSK-3 β 组成一个多蛋白的复合体,其能够降解 β -catenin。正常情况下 β -catenin 主要位于细胞膜中,胞浆内游离的 β -catenin 极少,当细胞质中游离的 β -catenin 积聚并进入细胞核启动下游靶基因 cyclinD1 的转录,导致细胞的过度增殖,从而参与肿瘤的形成^[10]。CyclinD1 是 G1 期细胞周期素,是细胞从 G1 期进入 S 期促进细胞分裂增殖的重要调控因子。CyclinD1 被认为是一种原癌基因,其持续性高表达,将导致 G1 期缩短,提前进入 S 期,使细胞增殖失控,最终形成肿瘤^[11]。

本实验研究结果显示: TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 在 NSCLC 组织中的表达水平明显高于正常肺组织,说明 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 可能在 NSCLC 的发病机制中发挥重要作用,TC-1 可能激活 Wnt/ β -catenin 通路并且能够诱导其相关靶基因 CyclinD1 的高表达,为 NSCLC 的靶向治疗提供了新的研究思路。

参考文献

[1] 徐新娟,丁文柏. Wnt 信号转导通路与肺癌的研究近况[J]. 医学综述,2008,14(2):217-220.
[2] Gordon MD,Nusse R. Wnt signaling:multiple pathways,multiple receptors, and multiple transcription factors[J]. J Biol Chem, 2006,281(32):22429-22433.
[3] Ye L,Ryo R,Huang HK,et al. Loss of pin1 function in the mouse

resembles the cyclin d-null phenotypes[J]. ProNatl Acad Sci USA,2002,99(3):1335-1340.
[4] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev,2000,14(1): 1837-1851.
[5] 海红艳,胡雪君,侯科佐,等. 非小细胞肺癌组织 EGFR 和 VEGF 及 Cbl 表达的临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,17(3):209-212.
[6] Akiri G,Cherian MM,Vijayakumar S,et al. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma [J]. Oncogene, 2009, 28 (21):2163-2172.
[7] De Melo MP,Parise JO,Peroira HC,et al. C8orf4/TC-1(thyroid cancer-1)gene expression in thyroid cancer and goiter[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat,2007,69(2):127-130.
[8] Wang YD,Bian GH,Lv XY,et al. TC1 (C8orf4) is involved in ERK1/2 pathway-regulated G(1)-to S-phase transition[J]. BMB Rep,2008,41(10):733-738.
[9] Jung Y,Bang S,Choi K,et al. TC1 (C8orf4) enhances the Wnt/beta-catenin pathway by relieving antagonistic activity of Chibby [J]. Cancer Res,2006,66(2):723-728.
[10] Deiros Bronte L,Baquero-Artigao F,García-Miguel MJ,et al. Parapneumonic pleural effusion: an 11-year review[J]. Anales de pediatria (Barcelona, Spain;2003),2006,64(1):40-45.
[11] Lange C,Huttner WB,Calegari F. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1,delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors[J]. Cell Stem Cell,2009,5(3):320-331.

(收稿日期:2014-04-08)

(上接第 2722 页)

构和功能时需要移去这些蛋白标签,常用的肠激酶、凝血酶及凝血因子 Xa 不但存在非特异性切割,而且价格昂贵。因此本研究选中人鼻病毒 3C 蛋白酶作为新一代的工具酶。人鼻病毒 3C 蛋白酶不仅具有较高的酶切特异性而且在低温下仍保持较高的酶活性。

本研究在大肠杆菌原核系统中成功表达和制备了有良好活性且纯度高的人鼻病毒 3C 蛋白酶。本研究还发现人鼻病毒 3C 蛋白酶在低温下的酶切效果优于常温,且蛋白酶 N 端及 C 端结构域是保持蛋白酶活性所必须,结果未示出。人鼻病毒 3C 蛋白酶与麦芽糖结合蛋白融合表达,增加了人鼻病毒 3C 蛋白酶的表达量及溶解度,免除了包涵体变性及复性步骤,简化了蛋白酶制备流程,并且保持了蛋白酶的活性。人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切特异性较好,本研究构建的麦芽糖结合蛋白-人鼻病毒 3C 蛋白酶融合蛋白含有人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切位点,可被人鼻病毒 3C 蛋白酶特异性识别,并将其自身从麦芽糖结合蛋白上剪切。人鼻病毒 3C 蛋白酶在低温(4℃)下保持了较高的酶活性,在移除蛋白标签的同时避免了靶蛋白的非特异性降解,是理想的标签移除工具酶。本研究初步建立了人鼻病毒 3C 蛋白酶基因工程的制备工艺,开发了一种新型的工具酶,大大节省了实验经费开销。本研究还构建了人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF 克隆和表达载体,只需将靶蛋白的遗传微粒克隆

入表达载体,就可高效表达靶蛋白与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白,经人鼻病毒 3C 蛋白酶移除麦芽糖结合蛋白标签,就可得到较纯的靶蛋白,为基因工程表达和基因工程药物开发的研究奠定了基础。

参考文献

[1] Fox JD,Routzahn KM,Bucher MH,et al. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers[J]. FEBS Lett,2003,537(1/3):53-57.
[2] He M,Jin L,Austen B. Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins[J]. J Protein Chem,1993,12(1):1-5.
[3] Kapust RB,Tozsér J,Copeland TD,et al. The P1' specificity of tobacco etch virus protease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,294(5):949-955.
[4] Orr DC,Long AC,Kay J,et al. Hydrolysis of a series of synthetic peptide substrates by the human rhinovirus 14 3C proteinase, cloned and expressed in Escherichia coli[J]. J Gen Virol,1989,70 (Pt 11):2931-2942.
[5] Wang QM,Johnson RB. Activation of human rhinovirus-14 3C protease[J]. Virology,2001,280(1):80-86.

(收稿日期:2014-03-15)