文章编号:1673-1689(2006)06-0018-05

利用 his-tag 纯化和复性基因工程产物肠激酶

顾玮彦， 黄 磊， 徐志南*， 岑沛霖
(浙江大学 生物工程研究所,浙江 杭州 310027)

摘 要: 构建了融合表达肠激酶轻链(EKLC)的基因工程大肠杆菌,将该菌于 37 ℃在含 30 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中培养,当细胞密度(OD_{600}) 达到 0.5～0.6 时加入最终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 并降温至 26 ℃进行诱导表达,4 h 后目的蛋白质的表达量可达菌体总蛋白质的 40%以上,但所表达的重组产物大多以包涵体形式存在于菌体中。利用产物 N 端携带 6 个组氨酸标签与金属螯合层析介质中镍离子的亲和性,应用镍离子金属螯和层析对样品包涵体进行了纯化和复性研究。实验结果表明,在变性条件下纯化的样品在柱上不经洗脱,直接用复性液洗涤 6 h,可以使 EKLC 在得到提纯的同时实现复性,得到了电泳纯度为 96%的具有生物活性的 EKLC,最高活性为 712 U。

关键词: 牛肠激酶;纯化;复性
中图分类号: Q 819 **文献标识码**: A

Purification and Refolding *Escherichia coli* Produced Enterokinase Inclusion Bodies Immobilized by Nickel Chelating Chromatography

GU Wei-yan, HUANG Lei, XU Zhi-nan*, CEN Pei-lin
(Institute of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: A genetic strain E. coli BL21 (DE3), which over－expression enterokinase gene, was constructed. When cell density (OD 600) reached at 0.5—0.6 in LB medium which contained 30 mg/L kanamycin, IPTG was feed to the fermentation broth to 0.4 mmol/L and then temperature changed to 26 oC. After induction for 4 h, the expressed fusion protein concentration was 40% of the total bacteria proteins and in the form of inclusion bodies. The inclusion bodies were further purified under denaturing conditions with affinity of 6 histidine residues at its N-terminal to metal chelate chromographic matrixes. The results showed that the purified recombinant protein under denaturing conditions was refolded in Ni-NTA column by using refolding buffer. The enterokinase activity and purity was 712 U and 96%, respectively.

Key words: enterokinase; purification; refolding

Enterokinase(EK)是哺乳动物消化系统中最基础的丝氨酸蛋白水解酶之一,由重链和轻链组成,两条链通过一对二硫键相连。重链参与 EK 在消化道细胞膜上的锚定以及与胰蛋白酶的结合[1],

收稿日期:2005-12-29; **修回日期**:2006-03-20.
基金项目:国家自然科学基金项目(30370039).
作者简介: 顾玮彦(1982-),男,江苏张家港人,生物化工硕士研究生; * 为通讯作者.

万方数据

轻链具有催化活性[2]。EK 对 Asp-Asp- Asp- Asp-Lys-序列表现出高度特异性,反应条件温和,而且切出的目标产品首位氨基酸完全忠实于天然蛋白质,因此在基因工程制药领域已经成为融合表达时下游纯化的首选工具酶。目前市售的 EK 价格极其昂贵,从十二指肠组织中纯化的 EK 常含有其它蛋白水解酶的污染,从而限制了其广泛应用[3]。

最早关于肠激酶的研究是从牛十二指肠肠激酶提纯开始的。近年来国外许多实验室对重组肠激酶进行了研究,所做的尝试多是克隆与表达 235 个氨基酸的具有酶学活性的肠激酶轻链(EKLC)。Lava L I E 和 Vozza L A 等先后报道了用大肠杆菌 *E. coli* 和甲醇酵母 *Picha pastoris* 制备肠激酶的方法[4-5],当以大肠杆菌为宿主菌时,发现 EKLC 只有和担体蛋白 DsbA 形成融合蛋白并分泌表达于大肠杆菌的细胞周质腔时才具有活性。

金属螯合层析是近年来发展起来的蛋白质分离技术,是纯化 *E. coli* 表达系统中具有多组氨酸目的蛋白质的一种有用工具[6-7]。除亲和提纯蛋白质外,金属螯合层析在蛋白质复性方面也获得了应用。研究发现,许多难以复性的蛋白质,通过金属螯合层析后成功地实现了复性[7]。

作者应用 pET 表达系统成功地构建了能高效表达肠激酶轻链(EKLC)的大肠杆菌菌株,但所表达的蛋白质大多以无活性的包涵体形式存在,必须经过复性处理后才能获得具有生物活性的产物。据此,应用 Ni-NTA 金属螯合层析介质,使目的蛋白质纯化与复性通过金属螯合层析一步完成,并分析和比较不同复性条件对重组目的蛋白质复性结果的影响。

1　实验材料

1.1　菌种与质粒

菌种为 *E. coli* BL21 (DE3)。质粒 pET39-sBEKLC 由作者所在实验室构建,目标 EKLC 蛋白质和 DsbA 配体相连进行融合表达,使用 T7 启动子,质粒带有卡钠抗性和 6his 亲和标签。质粒 pET39- sBEKC 按标准步骤转入 *E. coli* BL21 (DE3),构建成 EKLC 基因工程菌。

1.2　材料

1.2.1　培养基　Luria-Bertani (LB) medium:0.5 g/dL yeast extract, 1 g/dL tryptone, 1 g/dL NaCl。用于 EKLC 基因工程菌的培养、目的蛋白质的表达。

1.2.2　仪器和试剂　Power PAC 300 型电泳仪和 Gel Doc 2000 型凝胶图像处理系统为美国 Biorad 公司产品;Sorvall Super T21 型冷冻离心机为美国 DuPont 公司产品。

GSSG(氧化型谷胱甘肽)、GSH(还原型谷胱甘肽)购自上海生物工程技术服务有限公司。人防御素-4 融合蛋白质(HBD4),用于复性酶活性的鉴定,由作者所在实验室自制,该融合蛋白质中含有肠激酶的识别序列 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-。其余试剂均为市售分析纯。

1.2.3　分离材料　Ni-NTA Agarose,购自 QIAGEN 公司。所有层析操作均在 Explorer 层析工作站(Amersham Pharmacia Biotech)上进行。

2　实验方法

2.1　工程菌的培养扩增与诱导表达

挑单菌落于 30 mL LB 培养基中(含 Kanamycin 30 mg/L),37 ℃,200 r/min,培养 OD_{600} 至 0.6～0.8 时,以 3%接种量接种于含 60 mL LB 的 500 mL 的摇瓶(37 ℃,200 r/min),当菌体密度增至 OD_{600} 0.5～0.6 时,降低温度至 26 ℃条件下继续培养,同时加入最终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。

2.2　EKLC 融合蛋白包涵体的分离与洗涤

取已用 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h 的菌体,每 40 mL 菌液的菌体用 3 mL 破胞缓冲液(50 mmol/L Tris、10 mmol/L 溶菌酶,pH 7.6)重悬并在冰浴中静置 20 min。冰浴下超声破碎细胞,然后于12 000 r/min 离心 20 min,取沉淀。

沉淀物经包涵体洗涤液(3 mol/L 尿素、0.6%的 Triton X-100、50 mmol/L Tris-Cl、2 mmol/L EDTA ,pH 8.0)洗涤 1 h 后,于12 000 r/min 离心 20 min。取沉淀即得到较纯的 EKLC 包涵体。

2.3　EKLC 融合蛋白包涵体的变性溶解

用蛋白质变性液(8 mol/L 尿素、100 mmol/L GSH、50 mmol/L Tris-Cl,pH 8.0)重悬所得到的包涵体。充分打散后于 25 ℃,100 r/min 的摇床上变性 2 h。然后于12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,质量浓度约为 2.0 mg/mL。用稀释液(50 mmol/L Tris-Cl,pH 8.0)将上清液中尿素浓度稀释至 4 mol/L(溶液 1)。

2.4　EKLC 融合蛋白包涵体的复性

2.4.1　EKLC 融合蛋白变性产物的亲和复性

1) 平衡柱子:取 10 mL Ni-NTA Agarose 树脂装柱,用 3～4 倍柱体积的平衡液 1(50 mmol/L Tris-Cl、20 mmol/L Imidazole、300 mmol/L NaCl、

万方数据

2 mol/L urea)平衡。

2) 上样:取 15 mL 溶液 1 上金属螯合柱,体积流量为 1 mL/min,样品过柱后,继续以平衡液 1 冲柱,直至基线走平。

3) 复性:基线走平后,用复性液(50 mmol/L Tris-Cl、20 mmol/L Imidazole、300 mmol/L NaCl、2 mol/L urea、3 mmol/L GSH、0.6 mmol/L GSSG,pH 8.0)以 0.5 mL/min 的体积流量继续过柱 6 h。

4) 洗脱:复性完毕,用洗脱液 1(50 mmol/L Tris-Cl、300 mmol/L Imidazole、300 mmol/L NaCl,pH 8.0)将目标蛋白质从亲和柱上洗脱,收集样品。目标蛋白质洗脱完毕后,用洗脱液 2(50 mmol/L Tris-Cl、600 mmol/L Imidazole、500 mmol/L NaCl,pH 8.0)继续过柱洗去残留蛋白质。

2.4.2 *目的蛋白质的 G10 柱脱盐*

1) 平衡柱子:取 60 mL G10 葡聚糖装柱,以 3~4 倍柱体积的平衡液 2(50 mmol/L Tris-Cl、2 mmol/L $CaCl_2$、50 mmol/L NaCl,pH 7.8)平衡。

2) 上样:取 2 mL 亲和洗脱液,体积流量为 1 mL/min 进样,完毕后,继续以平衡液 2 过柱,体积流量保持 1 mL/min,直至蛋白质洗出,收集蛋白质组分。

2.4.3 *金属螯合层析复性条件的优化* 改变复性液(50 mmol/L Tris-Cl、60 mmol/L Imidazole、300 mmol/L NaCl、2 mol/L urea、3 mmol/L GSH、0.6 mmol/L GSSG)中尿素浓度,以及 GSH 和 GSSG 比例及复性时间,考察这些因素对复性效果的影响。

2.5 复性产物生物活性的鉴定

以 SDS-PAGE 电泳以及薄层扫描检测复性产物的纯度,以考马氏亮兰法测定蛋白质含量。

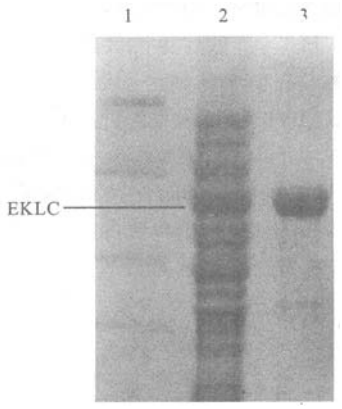
2.5.1 *活性测定* 以具有肠激酶酶切位点的人防御素-4 融合蛋白质作为酶切底物与复性产物进行酶切反应。以 SDS-PAGE 电泳薄层扫描检测酶切结果。定义:25 ℃温浴 30 h 时,100 μL 质量浓度为 0.05 mg/mL 的肠激酶酶切 0.5 mL 的 0.2 mg/mL 人防御素-4 融合蛋白质,每酶切 0.1%人防御素-4 融合蛋白质为 1 个酶活单位,即 1 U。

2.5.2 *EKLC 融合蛋白质的自催化活性* 将已脱盐的 EKLC 质量浓度调整到 0.1 mg/mL,在缓冲体系中(50 mmol/L Tris-Cl、2 mmol/L $CaCl_2$、50 mmol/L NaCl,pH 7.8)温浴 24 h,考察融合蛋白质的自催化活性。

3 结果与讨论

3.1 EKLC 融合蛋白质的高效表达

工程菌用 LB 培养基培养,当 OD_{600} 为 0.5~0.6 时,加入最终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h,即可获得高效表达。表达量占菌体总蛋白质的 40%以上,见图 1 所示的电泳图谱,表达产物主要以包涵体形式存在于菌体中。



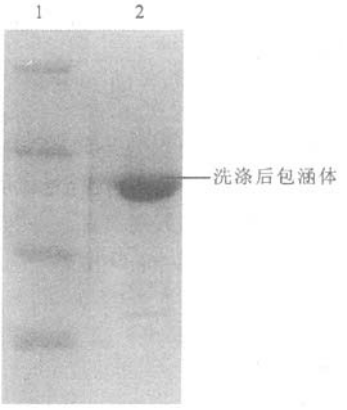
Lane 1:marker116,66.5,45,35 kD;
Lane 2:经 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后的可溶蛋白质的表达;
Lane 3:经 0.4 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后的不可溶蛋白质的表达.

图 1 0.4 mmol/L IPTG 诱导表达

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of EKLC expression

3.2 包涵体的初步纯化

菌体经超声破碎后,于 12 000 r/min 离心 20 min,沉淀物用包涵体洗涤液洗涤 1 h 后用变性液溶解,离心取上清液,经 SDS-PAGE 分析(见图 2),上清液中目标蛋白质质量分数在 85%以上。



Lane 1:marker 116, 66.5,45,35 kD;
Lane 2:洗涤后的包涵体

图 2 SDS-PAGE 分析洗涤后包涵体

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of inclusion bodies after washing

万方数据

3.3 目的蛋白质的复性与分离纯化

将变性液溶解后的包涵体上样于 Ni-NTA 金属螯合柱，复性液以 0.5 mL/min 的体积流量过柱 6 h，然后用洗脱液 1 洗脱，即可得到复性后的目的蛋白质。通过 SDS-PAGE 分析得目的蛋白质的纯度为 96%。

3.4 蛋白质复性条件的优化

3.4.1 *尿素浓度对 EKLC 复性的影响*　在蛋白质体外折叠的过程中，变性剂浓度是非常重要的因素。变性剂可以降低蛋白质的稳定性，有提高蛋白质复性率的作用，但高浓度的变性剂往往会使蛋白质完全去折叠而破坏原有的天然构象[6]。研究中选用尿素为变性剂，考察了尿素浓度对复性效果的影响。在其他条件不变的情况下（复性液：50 mmol/L Tris-Cl、20 mmol/L Imidazole、300 mmol/L NaCl、3 mmol/L GSH、0.6 mmol/L GSSG，pH 8.0，复性 4 h），改变复性液中的尿素浓度，酶切鉴定复性所得 EKLC 的活性。图 3 所示的结果表明，当复性液中尿素浓度为 2 mol/L 时，复性产物的活性最大，达到 626 U。

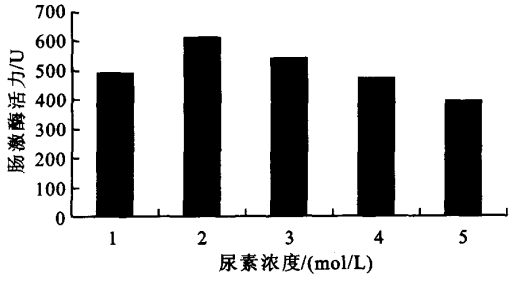


图 3　尿素对 EKLC 复性的影响

Fig. 3　Effects of urea concentration on EKLC renaturation

3.4.2 *氧化还原环境（GSH 和 GSSG 量比例）对 EKLC 复性的影响*　含有多对二硫键的蛋白质，在复性过程中应尽可能促进二硫键的形成。复性液中的氧化还原系统对蛋白质的复性具有较大的影响。氧化型试剂能够促进二硫键的形成，而还原剂能够催化错误配对的二硫键进行重排，其浓度及比例应有合适的范围。复性液还原性太强时二硫键将难以形成；氧化型太强则不利于二硫键的正确配对[7]。选用 GSH/GSSG 氧化还原系统，在其他条件不变的情况下（复性液：50 mmol/L Tris-Cl，20 mmol/L Imidazole，300 mmol/L NaCl，3 mmol/L GSH，0.6 mmol/L GSSG，pH 8.0，复性 4 h）复性液中 GSH 为 3 mmol/L，改变复性液中 GSSG 的浓度，考察 GSH 和 GSSG 的量比例对 enterokinase 复性的影响，结果如图 4 所示。实验数据表明，在 GSH 和 GSSG 的量比例为 5∶1 时所得复性产物的活性达到最大，活性为 633 U。

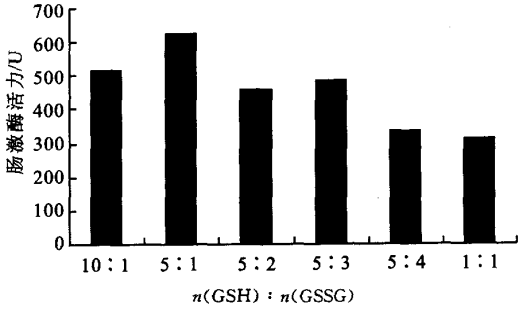


图 4　GSH 和 GSSG 的量比例对 EKLC 复性的影响

Fig. 4　Effects of GSH/GSSG on EKLC renaturation

3.4.3 *时间对 EKLC 复性的影响*　在复性过程中，复性时间对蛋白质复性效率具有较大的影响。复性时间太短，蛋白质复性不充分；时间太长，则酶又有可能在其他因素的影响下失活。在其他条件相同的情况下，考察了复性时间对蛋白质复性效果的影响，从图 5 中可以看到，复性 6 h 后，酶活基本稳定，最大酶活为 712 U。

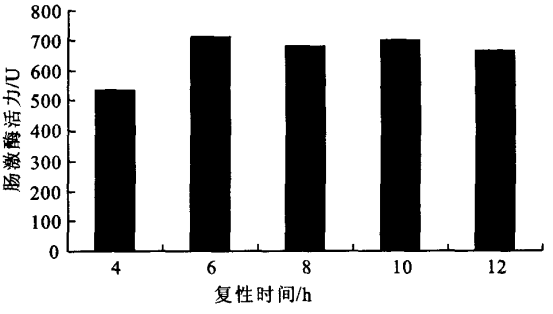


图 5　复性时间对 EKLC 复性的影响

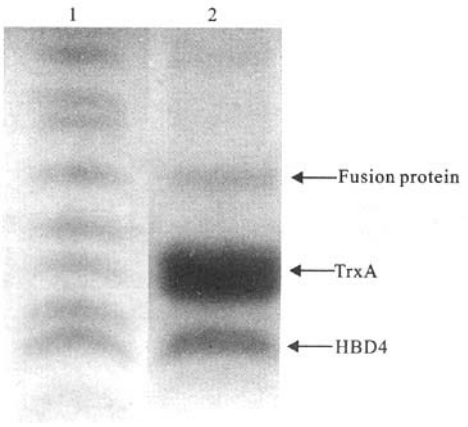
Fig. 5　Effects of refolding time on EKLC renaturation

3.5 EKLC 生物活性检测

以具有肠激酶酶切位点的人防御素-4 融合蛋白质作为酶切底物与复性后的肠激酶产物进行酶切反应，以 SDS-PAGE 电泳以及薄层扫描检测酶切结果，结果如图 6 所示。从电泳图谱中可以观察到人防御素-4 融合蛋白质（HBD4）已经被 EKLC 切割成两部分，得到了具有抗菌活性的 HBD4（另外报道）。在优化条件下，复性产物的最高活性为 712 U。

融合蛋白质的自催化活性：复性后的产物经脱盐处理，在缓冲体系（50 mmol/L Tris-Cl、2 mmol/L $CaCl_2$、50 mmol/L NaCl，pH 7.8）温浴 24 h 后，经 SDS-PAGE 分析。如图 7 所示，由于 EKLC 融合蛋白质中设计有 EK 的酶切位点，在此体系中融合蛋白质发生自切反应，融合蛋白质酶解为担体蛋白质 DsbA 和目的蛋白质 EK_L，这进一步表明复性后的包涵体蛋白质具有自催化的生物活性。

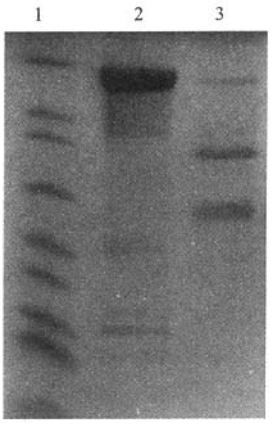
万方数据



Lanel: marker 66, 45, 35, 27, 20, 14.4, 9.5, 6.5,4.1 kD;
Lane 2:复性后 EKLC 融合蛋白质在 25 ℃酶切 HBD4 融合蛋白质

图 6 EKLC 活性鉴定图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of EKLC activity



Lane 1: marker 66, 45, 35, 27, 20, 14.4, 9.5,6.5,4.1 kD;
Lane 2: 复性后的 EKLC 融合蛋白质
Lane 3:EKLC 融合蛋白质的自切割反应(24 h, 25 ℃)

图 7 EKLC 的自切割活性

Fig. 7 Auotocatalytic cleavage EKLC activity EKLC

4 结 语

综上所述,利用金属螯合层析成功地复性了EKLC,得到了电泳纯度为96%的具有生物活性的EKLC,在优化条件下(复性液:50 mmol/L Tris-Cl、20 mmol/L Imidazole、300 mmol/L NaCl、2 mol/L urea、3 mmol/L GSH、0.6 mmol/L GSSG,pH 8.0,复性 6 h)得到最高活性为 712 U 的 EKLC。纯化与复性一步完成,从而简化了纯化步骤。此外由于制备的 EKLC 易于和酶解产物分离,因此在融合蛋白质的酶切加工方面具有一定的应用价值。

参考文献:

[1] Lu De-shun, Yuan Xin, Zheng Xing-long, et al. Bovine proenteropeptidase is activated by trypsin, and the specificity of enteropeptidase depends on the heavy chain [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1997, 272:31293－31300.

[2] Albert Light A, Fonseca P. The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1984, 259:13195－13198.

[3] Kitamoto Y, McCourt D W, Sadler J E,et al. Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**,1994,91:7588－7592.

[4] Vozza L A, Wittwer L, David R, et al. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast Pichia Pastoris[J]. **Biotechnology**, 1996,14:77－81.

[5] Lisa A, Collins-Racie, Edward R, et al. Production of recombinant bovine enteropeptidase catalytic subunit in Escherichia coli using the novel secretory fusion partner DsbA[J]. **Biotechnology**, 1995,13:982－987.

[6] Zouhar J, Nanak E, Brzobohaty B. Expression, single-step purification, and matrix-assisted refolding of a maize cytokinin glucoside-specific beta-glucosidase[J]. **Protein Expression and Purification**, 1999, 17:153－162.

[7] Rogl H, Kosemund K, Kuhlbrandt Collinson W. Refolding Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography [J]. **FEBS Letters**, 1998, 432:21－26.

[8] Sunitha K, Chung B H, Jang K-H, et al. Refolding and purification of zymomoas mobilis levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression and purification**, 2000,18:338－393.

[9] Misawa S, Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies[J]. **Biopolymers**, 1999, 51:297－307.

(责任编辑:秦和平,杨 萌)

万方数据