

蛇毒纤溶酶ALF基因在大肠杆菌中的表达^{*}

张守涛, 史 婧, 李 楠, 郭蔼光

(西北农林科技大学 农业分子生物学陕西省重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 根据蛇毒纤溶酶(A l f i n e p r a s e, A L F)氨基酸序列和大肠杆菌密码子偏爱性, 设计了14条单链DNA, 采用重叠延伸PCR方法人工合成了A L F基因编码区。通过克隆使其分别连接在融合标签NusA, Thioredoxin, Skp, His Tag和信号肽peB的C端, 构建成了多种A L F表达载体p43-A l f, p25-A l f, p32-A l f, p15-A l f和pSkp-A l f, 转化大肠杆菌后进行了诱导表达, 并对表达产物进行了SDD-PAGE分析。实验结果表明, 合成的A L F基因长度为603 bp; 构建的表达载体在大肠杆菌中均获得了很好的表达, 其中pSkp-A l f表达量最高, 目的蛋白含量高达菌体总蛋白的45%。

[关键词] 蛇毒纤溶酶; 循环延伸PCR; 基因表达; Skp

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0021-04

周围动脉硬化闭塞病(peripheral A r t e r i a l o c c l u s i v e, P A O)是指周围动脉粥样硬化导致动脉狭窄甚至闭塞, 从而使远端组织出现相应缺血痉挛或坏死。国外老年人P A O的患病率为12.4%~25%^[1], 在老年高危人群中P A O患病率更高。P A O和其他一些与年龄有关的心脑血管疾病一样危险, 是全身血管系统动脉粥样硬化的一个标志。随着社会老龄化程度的增加, 此病的发病率呈上升趋势。

F i b r o l a s e是来自美国铜头蝮蛇毒的一种锌金属蛋白酶, 具有纤溶活性而无出血活性^[2-3]。F i b r o l a s e的溶栓机制与现在临床上应用的溶剂t-P A和链激酶等不同, 其直接作用于血栓, 专一裂解纤维蛋白(原)A α -链的lys413-leu414键^[4]。在动物试验中, F i b r o l a s e能快速持久地溶栓而不引起生理学改变, 且副反应很少^[5]。

蛇毒纤溶酶(A l f i n e p r a s e A L F)蛋白是F i b r o l a s e的N端突变体(前3个蛋白的氨基酸EQ R由Ser取代), 与F i b r o l a s e具有同样的溶栓功能, 现已开始用于P A O治疗的III期临床试验。A L F蛋白的II期临床试验结果显示, A L F蛋白能快速地使病人动脉血再灌注, 再通率高且再灌注时间短, 可以与其他溶栓药物配合使用^[6]。这些都显示A L F蛋白很有希望成为第一个蛇毒基因工程溶栓药物。

L o a y z a等^[3]在酵母中表达了r F i b r o l a s e, 但迄今为止尚未见在大肠杆菌中表达A L F的报道。本实验

在成功克隆A L F全基因序列的基础上, 将其分别融合在不同的融合Tag或信号肽后构建了多个表达载体, 并对其进行转化筛选和诱导表达, 研究了在不同元件或Tag下A L F在大肠杆菌中的表达情况, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及主要试剂 大肠杆菌菌株XL1-blue, O r i g a m i B (D E 3)及表达载体pET43-1a, pET25b(+), pET32a和pET15b(+)均由西北农林科技大学农业分子生物学陕西省重点实验室保存; pBS-T载体, Pfu DNA聚合酶、质粒提取和胶回收试剂盒均购自天为时代公司; 限制性内切酶和T4 DNA连接酶为Promega公司产品。

1.1.2 引物 根据S K P基因序列(GenBank No. M21118)设计1对引物, 用于S K P基因序列的合成。正向引物: 5'-cgc tca **taa** gaa aaa gtt gtt att agc tgc ag-3'; 反向引物: 5'-cgc gaa **ttc** gga **tcc** att att taa cct gtt tca gta cgt c-3' (正向和反向引物中下划线分别表示Nde I和EcoR I酶切位点, 黑体分别表示起始密码子和终止密码子)。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 A L F基因的合成

根据A L F蛋白的氨基酸序列(GenBank No.

* [收稿日期] 2005-12-09

[作者简介] 张守涛(1972-), 男, 河南开封人, 在读博士, 主要从事生物技术药物研究。

[通讯作者] 郭蔼光(1943-), 女, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学研究。E-mail: gaguang@nw.suaf.edu.cn

P28891, 图1)及大肠杆菌密码子的偏爱性, 设计并合成14段长度均约为60 bp的片段(由上海生工生物工程有限公司合成), 2个相邻片段之间的重叠区域约为15 bp, T_m 值45~50, 并在5'端依次加上酶切位点 *Bam* H I 和肠激酶识别位点, 3'端加上终止密码子 TAA 和酶切位点 *Hind* III。在进行循环PCR^[7]合成全长 *ALF* 基因时, 2个临近的片段互为引物进行第一轮PCR扩增, 再以2个临近的PCR产

```

1  SFPQRYVQLV IVADHRMNTK YNGSDSKIRQ WWHQIVNTIN
41 EIYRPLNIQF TLVGLIWSN QDLITVTSVS HDTLASFGNW
81 RETDLLRRQR HDNAQLLTAI DFDGDTVGLA YVGGMCQLKH
121 STGVIQDHSA INLLVALTMA HELGHNLMGN HDGNQCHCGA
161 NSCVMAAMLS DQPSKLFSDC SKKDYQTFLT VNNPQCILNK
201 P

```

图1 *ALF* 蛋白的氨基酸序列

Fig 1 Amino acid sequence of *ALF*

1.3 *ALF* 基因表达载体的构建

1.3.1 融合标签 *SKP* 表达载体的构建 按照文献[8]的方法, 提取大肠杆菌 XL1-Blue 的基因组DNA作为模板, 通过PCR扩增得到 *SKP* 基因, 纯化的PCR产物经 *Nde* I/*Eco*R I 消化连接到载体 pET25b(+) 中, 得到重组表达质粒 pETSkp, 并送上海博亚生物公司测序。

1.3.2 *ALF* 表达载体的构建 从 pBS-T 载体上用 *Bam* H I/*Hind* III 酶切下 *ALF* 基因, 分别连接到经同样双酶切并胶回收的表达载体 pET43-1a, pET32a 和 pETSkp 上。产物经 *Bam* H I/*Hind* III 双酶切鉴定后, 正确的克隆分别命名为 p43-A lf, p32-A lf 和 pSkp-A lf。再将 *ALF* 基因从 p43-A lf 上用 *Nco* I/*Xho* I 双酶切下, 并分别连接到 pET25b(+) 和 pET15b(+) 载体中, 构建表达载体 p25-A lf 和 p15-A lf。上述各表达载体用化学转化法转化表达菌株 *Origami B* (DE3), 并进行菌落PCR和双酶切鉴定。

1.4 *ALF* 的诱导表达

挑取鉴定后的阳性单菌落, 在含 100 mg/L Amp 的 2×YT 培养基中, 于 37 和 180 r/min 条件下培养过夜, 再以体积分数 10% 的接种量接种到同样的培养基中, 培养 4 h 左右加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 下诱导表达 4 h 后, 12 000 r/min 离心 1 min, 收获菌体, 进行 SDD-PAGE 电泳分析。

物为模板, 以这2个PCR产物的最外侧的2个DNA片段为引物进行下一轮扩增, 以此类推, 最后通过4轮PCR合成全长 *ALF* 编码序列(图2), 对各步扩增产物进行电泳鉴定。最后一轮PCR产物经PCR产物纯化试剂盒回收纯化后, 连接到 pBS-T 载体上, 转化大肠杆菌 XL1-Blue, 阳性克隆送上海博亚生物公司测序, 序列正确的克隆命名为 pBS-A lf。

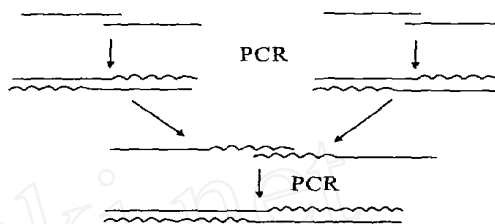


图2 *ALF* 基因合成示意图

Fig 2 Amplification of *ALF* gene

2 结果与分析

2.1 *ALF* 基因与 *SKP* 基因的获得

由图3可知, 合成的 *ALF* 基因长度为 603 bp, 与预期结果一致(图3)。合成的 *ALF* 基因克隆进 pBS-T 载体后进行测序验证, 结果显示, 最后得到的片段与设计结果完全一致。pETSkp 测序结果显示, 所获得的 *SKP* 基因与 GeneBank 上登录的相同且读码框正确。

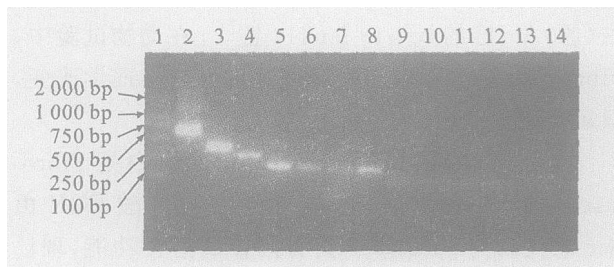


图3 合成 *ALF* 基因的电泳鉴定

1 DNA Marker; 2 全长 *ALF* 基因; 3~4 第三轮PCR产物; 5~8 第二轮PCR产物; 9~14 第一轮PCR产物

Fig 3 Electrophoresis analysis of synthesized *ALF* gene
1 DNA Marker; 2 *ALF* gene of full length; 3~4 PCR products of third circle; 5~8 PCR products of second circle; 9~14 PCR products of first circle

2.2 *ALF* 基因表达载体的鉴定

表达载体 p43-A lf, p25-A lf, p32-A lf, p15-A lf 和 pSkp-A lf 的菌落PCR和双酶切鉴定结果显示, 所选择克隆全为阳性, 且双酶切所产生的小片段均约为 603 bp (图4), 与预期的结果一致, 说明各表达载体

已经构建成功, 可进行诱导表达。

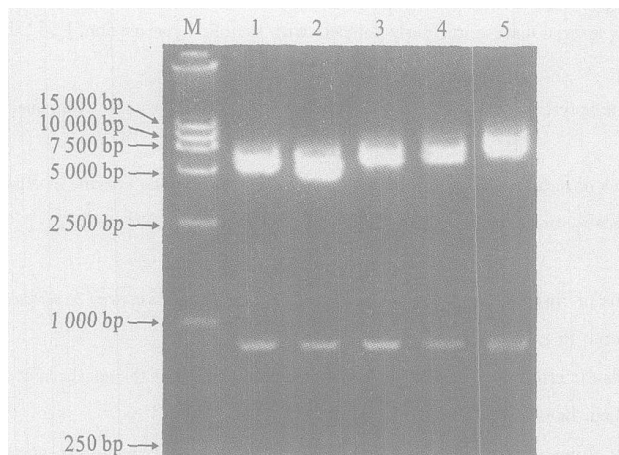


图4 重组表达载体的 $BamH I$ / $HindIII$ 酶切鉴定

M. DNA 分子量标样; 1~ 5 分别为重组表达载体p15-A lf, p25-A lf, p32-A lf, pSkp-A lf, p43-A lf 的酶切产物

Fig. 4 Digestion analysis of the recombinant expression vectors by $BamH I$ and $HindIII$

M. DNA Marker; 1- 5 Digestion fragments of the recombinant expression vectors p15-A lf, p25-A lf, p32-A lf, pSkp-A lf, p43-A lf

2.2 表达载体的诱导表达

结果(图5)显示, 构建的5个ALF 表达载体在Origi mi B (DE3) 中均获得了很好的表达, 其中pSkp-A lf 融合蛋白表达量最高, 达到菌体总蛋白的45%左右, p43-A lf, p25-A lf, p32-A lf 和p15-A lf 的表达量分别为20%, 22%, 35%和15%。

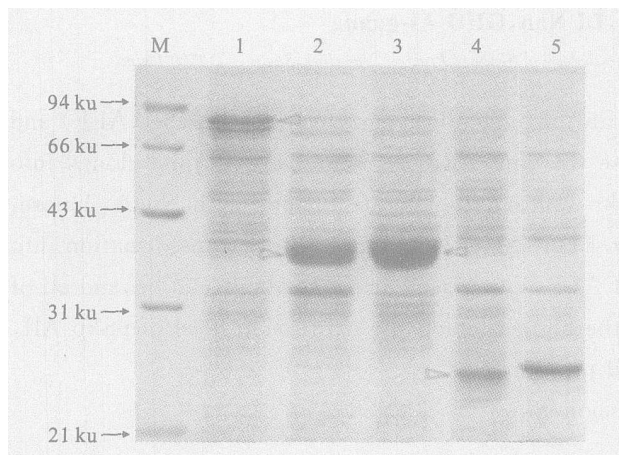


图5 ALF 诱导表达产物的SDS-PAGE 分析

M. 蛋白分子量标样; 1~ 5 分别为p43-A lf, p32-A lf, pSkp-A lf, p15-A lf 和p25-A lf 载体在大肠杆菌中的表达产物

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression of ALF in *E. coli*

M. Protein Marker; 1- 5 The expression products of the recombinant vector p43-A lf, p32-A lf, pSkp-A lf, p15-A lf and p25-A lf

3 讨论

本研究采用循环PCR 技术, 合成了编码ALF 的DNA 片段, 在设计合成单链DNA 片段时, 每片段平均长度约60 bp, 该长度可以保证化学合成的准确率和高产率。相邻引物的重叠区域为15 bp 左右, 可以保证PCR 引物特异性良好, 并且PCR 反应的起始若干个循环, 各个PCR 反应有相近的退火温度, 以便于初始合成的几个小片段可以在同一PCR 仪上应用同一程序扩增。在进行PCR 循环延伸的前几轮扩增时, 本研究选用Pfu DNA 聚合酶, 由于其与Taq 酶等不同, PCR 产物为平端, 3 端没有多出的碱基A, 这样可以保证后面PCR 的顺利进行, 避免造成错配而引入突变。

大肠杆菌表达外源蛋白是一个复杂的过程, 与转录和翻译的多种因素有关, 如菌株种类、启动子强弱、SD 序列(Shine-Dalgarno)、mRNA 稳定性、质粒拷贝数及转录下游区域等, 因此本研究采用了背景基本相同的pET 系列载体。另外, 为了能高效表达ALF, 本研究构建了多种表达载体p43-A lf, p25-A lf, p32-A lf, p15-A lf 和pSkp-A lf, 通过转化筛选后对各表达菌进行诱导表达。结果发现, 与SKP 融合能显著提高ALF 蛋白的表达量, 分析其中的原因, 可能有以下几点。第一, 转录的开始阶段和起始复合物决定基因表达的效率, 转录开始部分的序列起决定性作用, 转录起始位点的下游区域(Downstream Region, DR)作用巨大。Stenström 等^[8]在14 种不同的DR 后面融合上同一种蛋白, 进行表达, 发现起始密码子ATG 后紧跟5 个以上的A 时, 转录效率最强、蛋白表达量最高, 也就是说, 蛋白质最佳的翻译起始位点是ATG AAA AA, 而本研究所构建的载体pSkp-A lf 正好符合此特点。第二, 大肠杆菌SKP 蛋白具有分子伴侣的活性, 在外膜蛋白折叠中起着重要作用, 能促进目的基因转录和表达。并且SKP 有类似于SecA 的作用, 能抑制蛋白前体的错误折叠, 减轻SecA 的压力^[9]。有研究^[10-11]表明, 在大肠杆菌中共表达SKP 能促进重组蛋白的正确折叠, 增加重组单链抗体的分泌表达。

总之, 本研究通过克隆表达等系列过程实现了ALF 在大肠杆菌中的高效表达, 这不仅为以后ALF 的表达、纯化、结构和功能研究提供了依据, 而且也为ALF 蛋白的开发利用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Newman A B, Sutton-Tyrre K, Rutan G R, et al Lower extremity arterial disease in elderly subjects with systolic hypertension[J]. J Clin Epidemiol, 1991, 44(1): 15-20
- [2] Ahmed N K, Gaddis R R, Tennant K D, et al Biological and thrombolytic properties of Fibrinase: a new fibrinolytic protease from snake venom [J]. Haemostasis, 1990, 20(6): 334-340
- [3] Loayza S L, Trikha M, Markland F S, et al Resolution of isoforms of natural and recombinant Fibrinase, the fibrinolytic enzyme of *Agkistrodon contortrix* snake venom and comparison of their EDTA sensitivities and chromatographies[J]. J Chromatogr, 1994, 662 (2): 227-243
- [4] Retzius A D, Markland F S. Fibrinolytic enzymes from the venoms of *Agkistrodon contortrix contortrix* and *Crotalus basiliscus basiliscus*: cleavage site specificity towards the alpha chain of fibrin[J]. Thromb Res, 1994, 74(4): 355-367.
- [5] Guan A L, Retzius A D, Henderson G N, et al Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*) [J]. Arch Biochem Biophys, 1991, 289(2): 197-207.
- [6] Deitcher S R, Moll S, Homesley H D, et al Safety and efficiency of alteplase for restoring function in occluded central venous catheters: interim results of a phase 2, multicenter, randomized, double-blind study (NuCath) [J]. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2004, 104(11): 1768
- [7] Prodromou C, Pearl L H. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis[J]. Protein Eng, 1992, 5(8): 827-829
- [8] Stenstrom C M, Isaksson L A. Influences on translation initiation and early elongation by the messenger RNA region flanking the initiation codon at the 3' side[J]. Gene, 2002, 288(1/2): 1-8
- [9] Thome B M, Müller M. Skp is a periplasmic *Escherichia coli* protein requiring SecA and SecY for export[J]. Mol Microbiol, 1991, 5(11): 2815-2821.
- [10] Bothmann H, Plückthun A. Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression [J]. Nat Biotech, 1998, 16(4): 376-380
- [11] Schfer U, Beck K, Müller M. Skp, a Molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(35): 24567-24574

Expression of snake venom fibrinolytic enzyme alteplase in *E. coli*

ZHANG Shou-tao, SHI Jing, LI Nan, GUO Ai-guang

(Northwest A & F University, Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology in Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: According to the amino acid sequence of fibrinolytic enzyme Alteplase (ALF) and optimal codon usage of *E. coli*, the cDNA of alteplase was amplified by recursive PCR, and cloned into pET43 1a, p25b(+), pET32a, pET15b(+) and pETSkp vectors to generate fusions with NusA, Thioredoxin, Skp, 6×His and signal peptide pelB respectively. Expression was induced after transformation into the *E. coli* strain. The results showed that the length of ALF coding sequence was about 603 bp, and all of the fusion vectors had high level expression in *E. coli*, the highest being the expression level of pSkp-ALF, reaching as high as 45 percent in proportion to the total protein.

Key words: alteplase; recursive PCR; gene expression; Skp