

# $\beta$ -内酰胺酶抑制多肽的串联表达及抑制活性研究\*

许明飞 谢丽萍 杨 涛 朱春宝 朱宝泉 胡又佳\*\*

(上海医药工业研究院 创新药物与制药工艺国家重点实验室 上海 200437)

**摘要** 细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素及  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂产生耐受性使新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂成为抗生素领域的研究热点。之前的研究通过酵母双杂交系统筛选到了一个  $\beta$ -内酰胺酶的结合多肽 SIPIS04-01, 体外实验表明其具有抑制氨苄西林的活性, 为提高多肽的表达量, 以基因串联表达方式-随机定向串联法成功构建密码子改造之后的小肽 SIPIS04-01 编码基因 SIPIS04-01N 的双拷贝质粒 pYG563, 使表达产物中融合蛋白占细菌蛋白总量的比例较单拷贝表达提高了 48.4%。纯化所得小肽 SIPIS04-01N 对 TEM-1 类型的  $\beta$ -内酰胺酶具有体外抑制活性, 并测定了抑制常数  $K_i$ 。

**关键词**  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂 串联表达  $\beta$ -内酰胺酶

**中图分类号** Q78

细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素及  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂产生耐受性已成为影响抗生素临床疗效、危害人类健康的棘手问题。细菌耐药的原因有多种, 其中表达  $\beta$ -内酰胺酶仍然是革兰氏阴性菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的最重要原因<sup>[1,2]</sup>。抗生素与  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的联合用药一度成为解决这类细菌耐药性的有效途径。然而, 随着细菌染色体基因突变或外源易变基因的插入, 细菌有可能产生新型的  $\beta$ -内酰胺酶从而耐药, 开发新的  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂成为抗生素领域的研究热点。

实验室曾利用酵母双杂交方法筛选到一个由 24 个氨基酸构成的小肽<sup>[3]</sup>, 命名为 SIPIS04-01, 将其克隆至 pGEX4T-1 内诱导表达, 发现它对 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶具有一定抑制活性<sup>[4]</sup>。由于以融合形式表达, 此小肽在整个融合蛋白中所占比例很小, 不利于后续表达纯化工作。因此考虑将此小肽串联表达, 以获得更多量的小肽并研究不同的串联表达方式对小肽表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3) 和 pET-32a(+) 质粒由本实验室保存。

收稿日期: 2009-02-05 修回日期: 2009-04-20

\* 国家自然科学基金(30572277)、上海市科委项目(04DZ05902, 07DZ22002)资助项目

\*\* 通讯作者, 电子信箱: bebydou@126.com

1.1.2 主要生化试剂 各种限制性内切酶、*Taq* 酶、*T<sub>4</sub>* DNA ligase、DL2000 DNA Marker、蛋白 Marker 均购自 TaKaRa 公司; 透析袋(截留分子量 12kDa) 购自 Sigma 公司; NTA 树脂购自上海申能博彩生物科技公司; 重组肠激酶购自源智生化科技有限公司; TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶为自制<sup>[5]</sup>; 其他化学试剂为国产分析纯。

1.1.3 引物 随机定向串联法引物(斜体处为 *Xho* I 酶切位点):

上游引物 P<sub>1</sub>XS: 5'-TATCTCGAGAAGGAGATGGCG CCCAACAGTC-3';

下游引物 P<sub>2</sub>XH: 5'-ATTCTCGAGGTCGACTATCTA GAGAAGGAAGTACCGT-3'

### 1.2 方法

1.2.1 小肽 SIPIS04-01 编码基因的串联表达 小肽 SIPIS04-01 基因双拷贝质粒 pYG563 的构建: 在分析了小肽 SIPIS04-01 编码基因序列的基础上, 以大肠杆菌密码子偏爱性为指导原则, 在不改变其氨基酸序列前提下, 对其基因序列进行改造(命名为 SIPIS04-01-N)。新旧序列比对见图 1。

将化学合成的目的基因 SIPIS04-01-N, 两侧引入 *Eco*R I, *Sal* I 酶切位点插入到质粒 pET-32a(+), 命名为 pET132, 以此单拷贝载体为基础, 采用随机定向串联法, 在串联基本单位 pET132 两侧设计了含有相同酶切位点 *Xho* I 的一对引物: 上游引物 P<sub>1</sub>XS 和下游引物



图1 SIPIS04-01 与 SIPIS04-01-N 序列比对图

Fig.1 Sequence alignment of SIPIS04-01 and SIPIS04-01-N

1: Original sequence of SIPIS04-01;  
2: Modified sequence of SIPIS04-01-N

P<sub>2</sub>XH,以单拷贝表达载体 pET132 为模板,PCR 扩增出模板基因(图2),用 Xho I 酶切后,与同样经 Xho I 酶切成线性的 pET132 载体连接后形成双拷贝质粒 pYG563。这样 pYG563 中每一个串联拷贝体都具有各自独立的启动子、融合蛋白基因以及目的小肽基因。质粒构建示意图3。

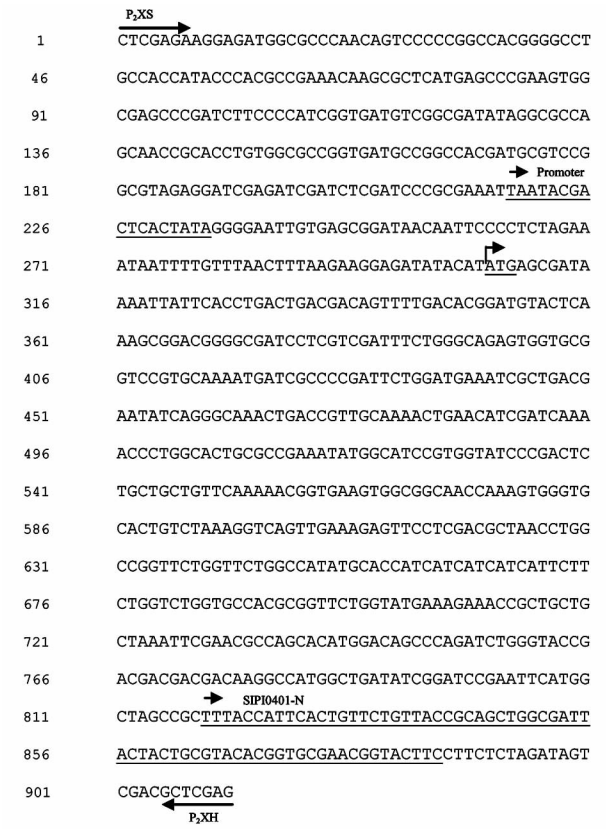


图2 构建串联表达质粒的模板基因序列

Fig.2 Template sequence for tandem repeat expression plasmid construction

Primer sites, promoter, translation initiation region and coding region of SIPIS04-01-N were shown by arrows

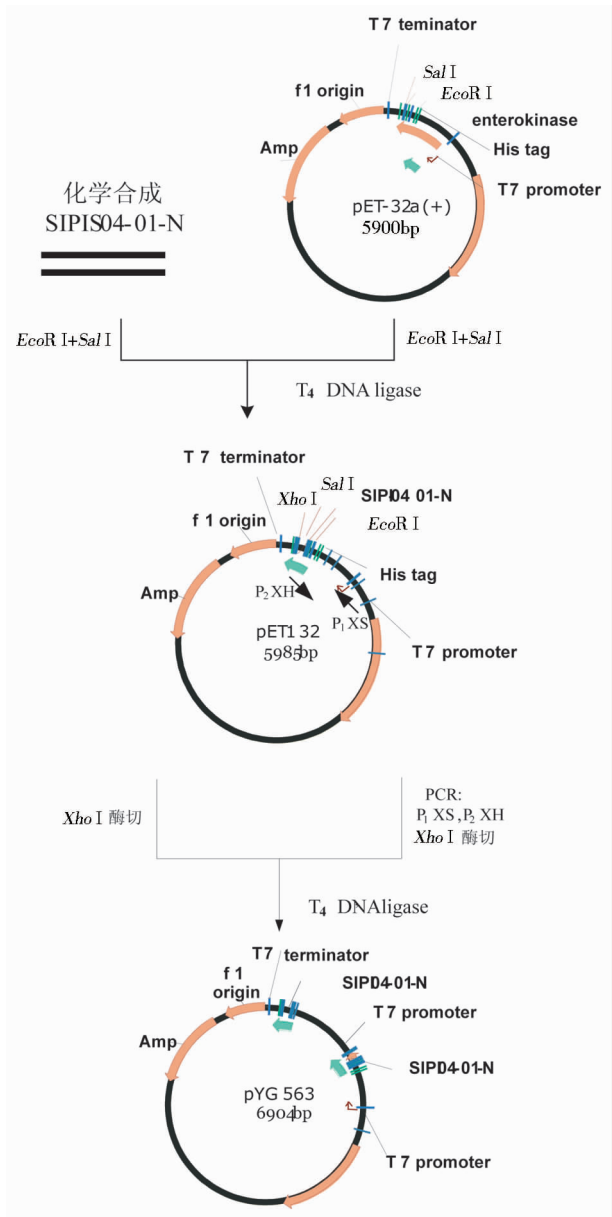


图3 双拷贝质粒 pYG563 的构建

Fig.3 Construction of the plasmid pYG563

双拷贝串联表达质粒 pYG563 的诱导表达:将 pYG563 转化 DE3,得到重组菌 pYG563/DE3。按 1% 接种量将过夜培养的 pYG563/DE3 转接入装有 100ml LB 培养基(含 100 $\mu$ g/ml Amp)的 250ml 摇瓶,37 $^{\circ}$ C,220r/min 培养 4h 后,加入 IPTG(终浓度为 0.8mmol/L)诱导 3h。

pYG563 表达产物分离以及目的小肽的切割:用金属螯合亲和层析的方法在天然条件下分离纯化 pYG563 表达产物中可溶性融合蛋白部分<sup>[6]</sup>,菌体经超声破壁后离心,收集上清与 NTA 树脂,孵育 1h 后装柱,

先用5ml NTA-0 冲洗,随后分别用2ml 的 NTA-20,NTA-40,NTA -60,NTA -80,NTA -100,NTA -200 梯度洗脱。NTA-200 的洗脱液经过透析后用肠激酶酶切融合蛋白,然后用 10.0kDa 离心超滤管超滤,7000g × 7min,收集下层液进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳<sup>[7]</sup>,确证该产物是否为目的小肽。

**1.2.2 小肽 SIPIS04-01-N 对 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶的抑制作用** 抑制作用测定:通过 UV 分光光度法测定 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶的活性。在磷酸盐缓冲体系中,将不同浓度的短肽与 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶混合,25℃ 温浴 2h,使之充分结合,加入 1mg 氨苄西林为底物,通过 A235 检测底物水解<sup>[8]</sup>。

抑制常数( $K_i$ ):利用 Dixon 双倒数作图法求抑制常数  $K_i$  值<sup>[9]</sup>。分别测定两种底物 Amp 浓度[低浓度底物( $S_1$ ) = 25 $\mu$ mol/L,高浓度底物( $S_2$ ) = 50 $\mu$ mol/L]下,不同小肽浓度(0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0  $\mu$ mol/L)对适当稀释 50 $\mu$ l TEM-1 酶液在 200 $\mu$ l 体系中的抑制常数。

## 2 结果

### 2.1 双拷贝串联表达质粒 pYG563 的构建以及鉴定

以此单拷贝载体 pET132 为基础,将  $T_7$  启动子至小肽尾部终止密码子作为一个整体克隆。这个串联基本单位包含了  $T_7$  promoter、SD、融合蛋白基因。这样,每一个串联拷贝体都具有各自独立的启动子和开放阅读框(ORF)。通过随机定向串联法希望能拿到更多串联拷贝,但事实上只获得了二个拷贝的重组质粒 pYG563。

用 *EcoR* I 酶切构建所得的 pYG563 质粒,获得与理论值相符的 919bp、5985bp 两条带,酶切验证正确(图4)。

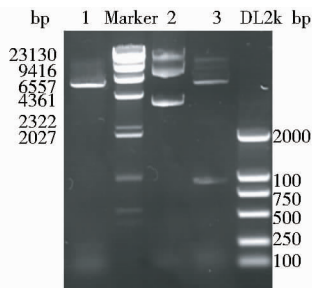


图4 双拷贝质粒 pYG563 的酶切鉴定

Fig. 4 Digestion of pYG563 with the enzyme *EcoR* I

Marker:  $\lambda$  DNA/*Hind* III; 1: pET132/*EcoR* I;

2: pYG563; 3: pYG563/*EcoR* I

### 2.2 双拷贝串联表达质粒 pYG563 的诱导表达

分别取 1ml 诱导前后的培养液进行电泳分析(图5)。可以看出,双拷贝质粒 pYG563 表达出大小约为 23kDa 的融合蛋白,与理论值相符。在表达量上,的确比单拷贝质粒 pET132 高,但表达量并不是成倍数增加。灰度分析表明:双拷贝质粒表达产物量占总蛋白比例较单拷贝提高了 48.4%。

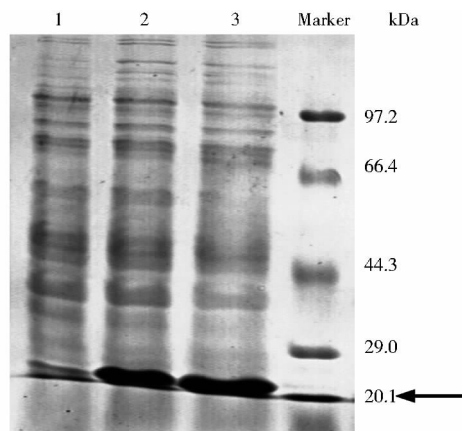


图5 单拷贝质粒 pET132 与双拷贝质粒 pYG563 诱导表达蛋白差异

Fig. 5 Expression difference between pET132 and pYG563

1: Expression of pYG132/DE3 before induction;

2: Expression of pYG132/DE3 after induction;

3: Expression of pYG563/DE3 after induction

### 2.3 pYG563 表达产物小肽 SIPIS04-01-N 的分离

用肠激酶酶切融合蛋白,理论上应得到 17.4kDa 的大片段和约 4.3kDa 的含有小肽 SIPIS04-01 的小片段。由于肠激酶分子量约为 28kDa,因此经过 10.0kDa 超滤管离心,收集的穿透液应该只含有 4.3kDa 的目标小片段,将其进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳(图6),可以看出有单一的目的条带,分子量稍大于 4.1kDa Marker 的条带,推测是目的小片段,此结果表明用肠激酶可以将目的短肽从融合蛋白中切下来。

### 2.4 小肽 SIPIS04-01-N 对 TEM-1 型 $\beta$ -内酰胺酶的体外抑制作用

比较了有无小肽 SIPIS04-01-N 存在时 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶降解氨苄青霉素的快慢,从图7中可以看出,加入小肽后氨苄青霉素的降解速率明显变小(加入小肽与不加小肽相比,TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶使氨苄青霉素的降解速率经 Excel 中 F 检验及 T 检验均表明  $P < 0.01$ ,有显著差异),表明短肽对酶活性有抑制作用。

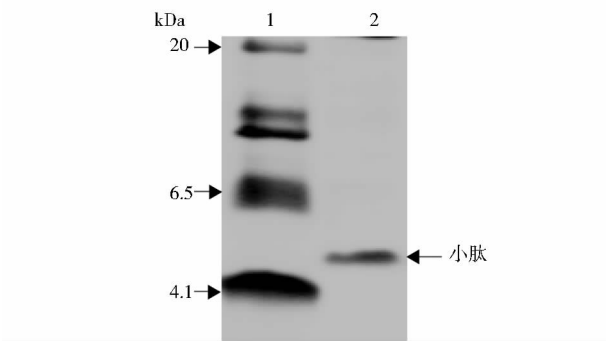


图6 小肽 SIPIS-04-01-N 的 Tricine - SDS-PAGE 图

Fig.6 Tricine-SDS-PAGE of SIPIS-04-01-N

1:Protein marker;2:Purified peptide SIPIS04 -01 -N

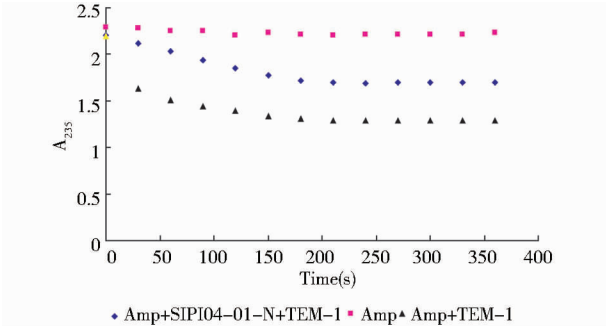


图7 SIPIS04-0-N 与 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶的相互作用

Fig.7 Interaction between SIPIS04-0-N and TEM-1  $\beta$ -lactamase

2.5 SIPIS04-01-N 对 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶的抑制常数 ( $K_i$ )

不同小肽浓度(0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0  $\mu\text{mol/L}$ )对适当稀释 50 $\mu\text{l}$  TEM-1 酶液在 200 $\mu\text{l}$  体系中的抑制常数。SIPIS04-01-N 是 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶的竞争性抑制剂,其抑制常数( $K_i$ )为 379 nmol/L(图 8)。

3 讨 论

过去十多年来,人们发现了许多具有广谱抗菌活性的肽类抗生素,利用基因重组技术在体外大量制备具有活性功能的多肽已成为当前生物制品研究的热点之一。通过酵母双杂交筛选获得了一种具有  $\beta$ -内酰胺酶抑制作用的小肽 SIPIS04-01,但由于小肽较短,与 GST 融合表达时只占很少的比例,无法获得足够量的多肽用于进一步的实验。同时对于许多小分子肽类抗生素,用常规的方法来构建单拷贝基因的重组质粒,一方面目的蛋白会对宿主产生毒性,另一方面表达产物

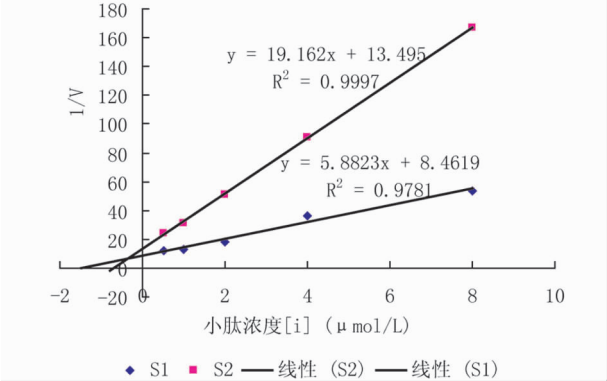


图8 SIPIS04-01-N 对 TEM-1 型  $\beta$ -内酰胺酶的抑制常数 ( $K_i$ )

Fig.8 Interaction between SIPIS04-0-N and TEM-1  $\beta$ -lactamase

的分子太小,在细胞中不稳定,极易被宿主蛋白酶降解。因此为了解决这一矛盾,人们通常采用串联表达的策略,将目的蛋白编码基因串联起来,诱导表达形成一个相对稳定的多域蛋白。通过这种方法可以以相对稳定的形式合成小肽,并且使其表达量有一定提高。

尝试了多种串联表达策略希望实现小肽 SIPIS04-01 编码基因的串联表达,如将目的基因串联于同一启动子下及通过与合适的承载分子构成融合基因后串联于同一启动子控制下均未表达成功,因此本实验采用另一种方法即随机定向串联法的表达策略,成功地构建了小肽融合蛋白的双拷贝表达载体 pYG563,且使表达产物中小肽占融合蛋白总量的比例较单拷贝表达提高了 48.4%。这种定向串联法即利用 PCR 的方法,在目的基因两侧设计裂解位点,并在裂解位点外侧设计相同的两个粘性内切酶位点。PCR 扩增获得单拷贝后,利用限制性内切酶的粘性末端,使单拷贝自身随机串联,可以得到含有不同拷贝数的串联体。

但由于 pYG563 已接近 7kb,而每个串联基本单位大小 900bp 左右,因此在实验中并没有如预期般获得更多串联拷贝的表达质粒。同时也发现,基因序列及密码子对基因的表达有较大的影响,密码子未改变之前无论是哪种串联表达策略、甚至是单拷贝均无法得到表达,而改变之后也只有这一串联方式得到了表达。

串联体不表达的原因十分复杂。除了质粒稳定性外,表达体系,表达蛋白自身的高级结构,诱导纯化条件等都可能影响到终产物的表达与否。饶贤才等<sup>[10]</sup>在构建肽抗生素 hPAB- $\beta$  串联表达载体时,工程菌多次传

代后,目的蛋白表达产量逐渐降低,直至不表达。Xu 等<sup>[11]</sup>尝试将人防御素 HBD-2 串联体分别克隆到 pQE、pET、pGEX 等表达系统中,最终只在 pGEX 载体中观测到目的蛋白条带。

通过改变密码子,并用随机定向串联的方法能成功表达目的蛋白并提高了小肽的表达量,且串联的多肽同样具有体外抑制活性。并进一步测定了体外抑制常数, SIPIS04-01-N 对 TEM-1 的抑制常数为 379nmol,与文献报道的 BLIP( $\beta$ -内酰胺酶抑制蛋白,  $\beta$ -lactamase inhibitor protein)抑制活性相比,目的小肽的抑制活性约为 BLIP 活性的  $10^{-3}$ 。这可能与 SIPIS04-01-N 自身结构有必然联系。BLIP 是由 165 个氨基酸构成的具有抑制 TEM-1 等 A 型  $\beta$ -内酰胺酶作用的蛋白,由两个结构域构成,对 TEM-1 的抑制常数  $K_i$  ( $0.3 \sim 0.5$ nmol)。BLIP 上与几种 A 型  $\beta$ -内酰胺酶结合都起关键作用的: 5 个位点: Phe<sup>36</sup>, His<sup>41</sup>, Asp<sup>49</sup>, Tyr<sup>53</sup> 和 Trp<sup>150</sup> 主要集中在 Domain1 上的  $\beta$  转角结构。而在 BLIP Domain2 上的四个位点 Trp<sup>112</sup>, His<sup>148</sup>, Arg<sup>160</sup>, Trp<sup>162</sup> 对于二者间的结合同样至关重要<sup>[12]</sup>。而利用酵母双杂交获得的小肽 SIPIS04-01 仅仅包含 BLIP Domain1 上的部分核心序列,缺乏其他能促进肽-酶结合的序列。这也提示出如能克隆 BILP 另一个 Domain2,将两个域同时表达或者将一些发挥重要功能的氨基酸进行替换可获得抑制效果更好的  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂。

### 参考文献

[1] Helfand M S, Bonomo R A. Beta-lactamases: a survey of protein diversity. Current drug targets, 2003, 3(1):9~23

- [2] Dajani A S. Beta-lactam resistance: clinical implications for pediatric patients. The Journal of International Medical Research, 2002, 30(1):2~9
- [3] Sun W, Hu Y J, Gong J W, et al. Identification of  $\beta$ -Lactamase inhibitory peptide using yeast two-hybrid system. Biochemistry, 2005, 70(7):912~921
- [4] 孙伟, 龚家玮, 朱春宝, 等.  $\beta$ -内酰胺酶抑制短肽 SIPIS04-01 的表达, 纯化与抑制作用测定. 中国抗生素杂志, 2005, 30(3):129~133
- Sun W, Gong J W, Zhu C B, et al. Chinese Journal of Antibiotics, 2005, 30(3):129~133
- [5] 孙伟, 龚家玮, 朱春宝, 等. TEM-1 型  $\beta$  内酰胺酶的克隆、表达及酶的纯化. 中国医药工业杂志, 2004, 35(1):16~19
- Sun W, Gong J W, Zhu Ch B, et al. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2004, 35(1):16~19
- [6] 杨涛, 胡又佳, 谢丽萍, 等. 来自肺炎克雷伯菌的 SHV 型  $\beta$  内酰胺酶的克隆、表达及酶的纯化. 中国医药工业杂志, 2008, 39(5):334~338
- Yang T, Hu Y J, Xie L P, et al. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2008, 39(5):334~338
- [7] Hermann S, Gebhard V J. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry, 1987, 166, 368~379
- [8] Samuni A. A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the  $\beta$ -Lactamase reaction. Anal Biochem, 1975, 63(1):17~26
- [9] Athel C B. A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Non-Competitive Inhibitors. Biochem J, 1974, 137:143~144
- [10] 饶贤才, 金晓琳, 胡晓梅. 一个承载分子的设计与肽抗生素 hPAB- $\beta$  的高效表达. 第三军医大学学报, 2002, 24(4):389~392
- Rao X C, Jin X L, Hu X M. Acta academiae medicinae militaris tertiae, 2002, 24(4):389~392
- [11] Xu Z, Wang F, Peng L, et al. Expression of human beta-defensin-2 with multiple joined genes in *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol, 2006, 120(1):1~13
- [12] Ness S, Martin R, Kindler A M, et al. Structure-based design guides the improved efficacy of edacylation transition state analogue inhibitors of TEM-1 beta-Lactamase. Biochemistry, 2000, 39(18):5312~5321

## Tandem Repeat Expression and Inhibitory Activity of a $\beta$ -lactamase Inhibitory Peptide

XU Ming-fei XIE Li-ping YANG Tao ZHU Chun-bao ZHU Bao-quan HU You-jia

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai 200437, China)

**Abstract**  $\beta$ -lactamase inhibitor research is popular for its potential on  $\beta$ -lactam antibiotics resistant strain. A  $\beta$ -lactamase binding peptide SIPIS04-01 was obtained by the yeast two-hybrid system. *In vitro* assay showed that it can inhibit the  $\beta$ -lactamase activity. In order to improve the expression level of the recombinant peptide, a two-copy expression plasmid pYG563 was constructed by random orientation tandem repeat method after codon modification, the two-copy plasmid was successfully expressed and the product was increased by 48.4% than that of one-copy plasmid. Purified peptide showed inhibitory activity against TEM-1  $\beta$ -lactamase *in vitro* and the inhibitory constant  $K_i$  was measured.

**Key words**  $\beta$ -lactamase inhibitor Tandem repeat expression  $\beta$ -lactamase