

提高 Xa 因子酶切效率的策略*

余榕捷 高 媛 洪 岸**
(暨南大学生物工程研究所 广州 510632)

摘要 Xa CBD-IGF CBD-PACAP ,
, Xa (Ile-Glu-Gly-Arg ↓) 7
(Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly) 。
, Xa 、 。 :
CBD-IGF CBD-PACAP Xa ; CBD-IGF Xa
CBD-PACAP 。 Xa 。

关键词 Xa

目前,应用与纯化标签或分子伴侣融合表达目的蛋白,再用蛋白酶或化学试剂裂解融合蛋白,释放目的蛋白的策略被广泛应用。可选择的蛋白裂解试剂有溴化氰、甲酸等;蛋白水解酶有胰蛋白酶、凝血酶、Xa 因子等^[1]。其中 Xa 因子的酶切位点在识别位点的末端(Ile-Glu-Gly-Arg ↓),可使产生的目的蛋白不含有任何多余的氨基酸残基,因此被广泛采用。提高 Xa 因子的酶切效率成为此策略应用的关键。本研究构建并表达了人类胰岛素生长因子 I(human insulin like growth factor I, hIGF-1) 和人垂体腺苷酸环化酶激活肽(pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, PACAP) 分别同纤维素结合域(cellulose binding domain, CBD) 的融合蛋白;各分两组,一组在纯化标签 CBD 和目的蛋白之间只引入 Xa 因子的识别位点;另一组在 Xa 因子的识别位点前添加 7 个氨基酸组成的富含甘氨酸短肽(Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly)。通过比较 Xa 因子对两组蛋白的酶切效率发现,在识别位点前引入富含甘氨酸的短肽不同程度地提高对融合蛋白对 Xa 因子的敏感性。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 *Hind* III、*Eco* RI、*Sac* II、Tag 酶和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; PCR Purification Kit、Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 购自 QIAGEN 公司; CB_N D 900 Cartridges 和 Factor Xa(2U/μl) 购自 NOVAGEN 公司。IGF 单抗购自 R&D Systems 公司; PACAP 单抗购自 SANTACRUZ 公司。浓缩管(3000Da 和 5000Da) 购自 MILLIPORE 公司。

1.1.2 质粒和菌种 质粒 pET-35b(+) 购自 NOVAGEN 公司;含有 hIGF-1 基因的质粒 pUC-IGF 和含有 PACAP 基因的质粒 pUC-PAC、菌株 *E. coli* DH5α、和 *E. coli* BL21(DE3) pLysS⁻ 均为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 表达质粒的构建 通过引物设计构建表达 2 组融合蛋白的质粒(见图 1):A 组,在 CBD 和目的蛋白之间引入 Xa 因子的识别位点,分别构建:表达载体 pET-IGF(A),表达融合蛋白 CBD-IGF(A);表达载体 pET-PACAP(A),表达融合蛋白 CBD-PACAP(A);B 组,在 Xa 因子的识别位点前引入短肽 Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly, 分别构建:表达载体 pET-IGF(B),表达融合蛋白 CBD-IGF(B);表达载体 pET-PACAP(B),表达融合蛋白 CBD-PACAP(B)。各重组质粒均经测序鉴定。

收稿日期: 2004-08-05 修回日期: 2004-09-23
* 广东省自然科学基金重点项目(021202)和广东省重大专项项目(2004A10902002)
** 通讯作者, 电子信箱: ojdk@jnu.edu.cn

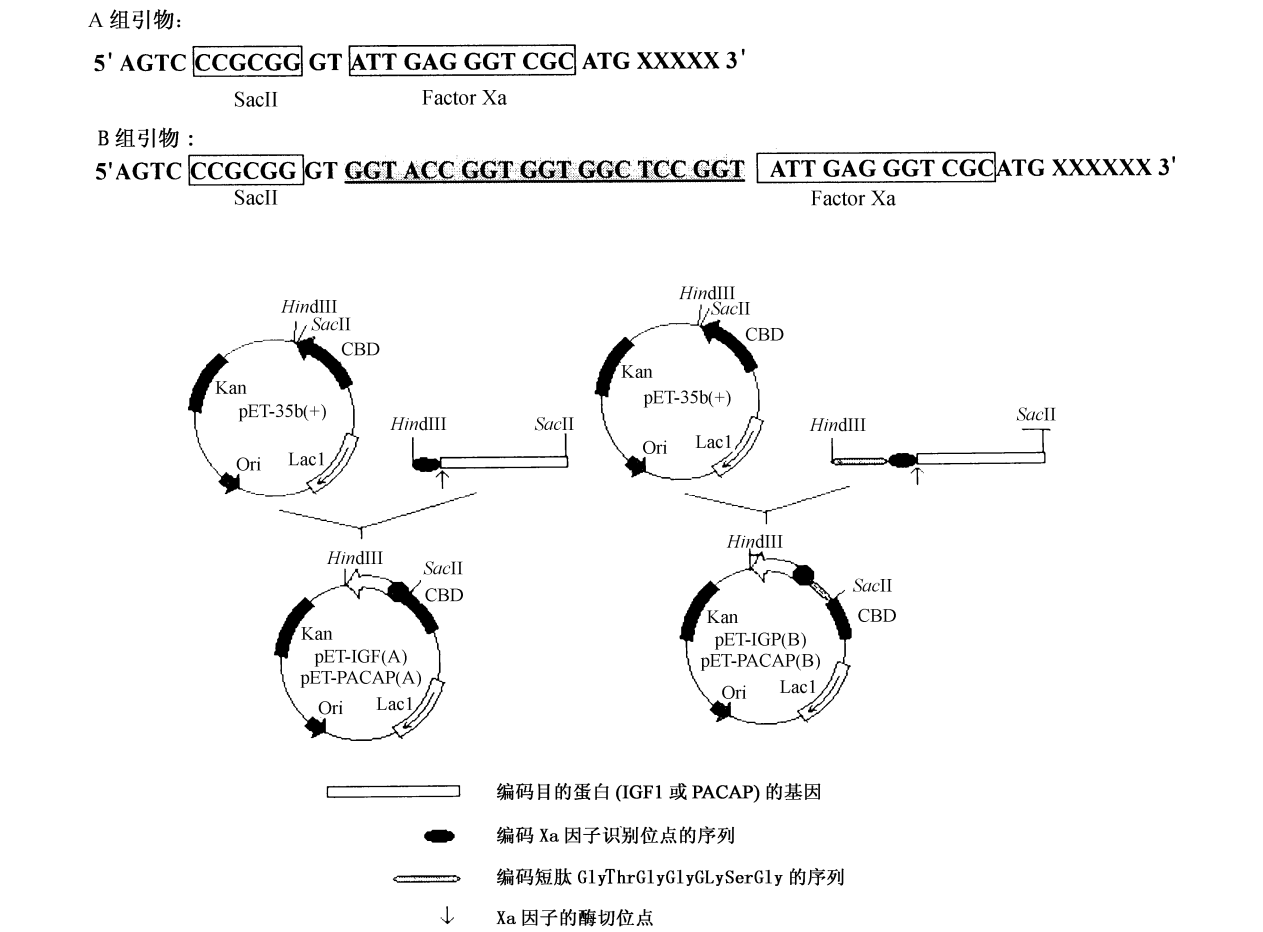


图 1 表达质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of expression plasmids

1.2.2 融合蛋白的表达 表达质粒分别转表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS⁻, 挑取单克隆摇菌培养过夜, 以 1: 20 接于 500ml 含 50mg/ml 卡那霉素的 LB 培养基, 37℃ 摇菌至 OD 为 0.3~ 0.5, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 30℃ 诱导 3h。离心收集菌体, 20mmol/L Tris·HCl (pH 7.5) 重悬, 超声破碎, 离心取上清 SDS-PAGE 检测可溶性。

1.2.3 融合蛋白的纯化 用 NOVAGEN 公司的 CBND 900 Cartridges 配合注射器进行纯化。5ml Binding Buffer (20mmol/L Tris·HCl, pH 7.5) 平衡 Cartridges, 以 < 0.5ml/min 流速缓慢上样, 用 5ml Binding Buffer 和 5ml Washing Buffer (20mmol/L Tris·HCl, 0.8mol/L NaCl, pH 7.5) 洗柱, 3ml 去离子水洗脱目的蛋白, SDS-PAGE 检测并分别用 IGF 和 PACAP 特异抗体 western blot 鉴定。

1.2.4 Xa 因子水解融合蛋白效率比较 利用超滤管调节两个对比的融合蛋白达到相同的浓度 (10 ~ 20μg/μl), 调节 Xa 因子的工作浓度 0.01 ~

10U/mg, 分别对融合蛋白进行酶切, 20℃ 酶切 16h。SDS-PAGE 后用 Chemilnager V5.5 图像采集及分析软件测定残留未被切割融合蛋白占蛋白总量的百分比 (*R*), 同时以相同起始浓度的融合蛋白和对应浓度的加热变性因子 Xa 的混合物作为参照, 测定起始融合蛋白占蛋白总量的百分比 (*I*)。按下式计算酶切效率 (*E*): $E = (1 - R/I) \times 100\%$

2 结 果

2.1 表达质粒 CBD-IGF(A)、CBD-IGF(B)、CBD-PACAP(A) 和 CBD-PACAP(B) 的构建及鉴定 (图 2)

2.2 融合蛋白的表达、纯化和鉴定

按方法 1.2.2 和 1.2.3 表达和纯化 CBD-IGF(A/B) 和 CBD-PACAP(A/B) 蛋白 (图 3、图 4)。分别用 IGF 和 PACAP 的单抗对融合蛋白进行 western blot 鉴定 (图省)。

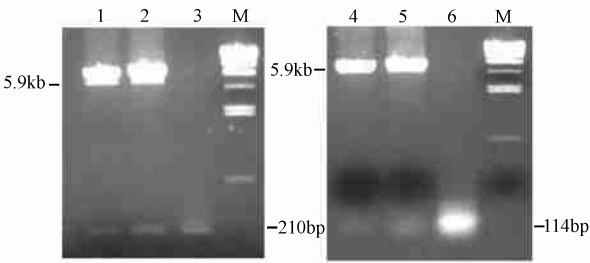


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmids

1: CBD-IGF(A)/Sac II + Hind III; 2: CBD IGF(B)/Sac II + Hind III; 3: PCR amplification of hIGF1 gene; 4: CBD PACAP(A)/Sac II + Hind III; 5: CBD PACAP(B)/Sac II + Hind III; 6: PCR amplification of PACAP gene; M:ADNA/Hind III marker

2.3 酶切效率的比较

当 Factor Xa 工作浓度为 5U/mg 时, 20℃ 酶切 16h 后, 取样进行 SDS-PAGE 分析。结果显示多肽的引入均提高了融合蛋白对 Xa 因子的敏感性(图 5, 图 6)。

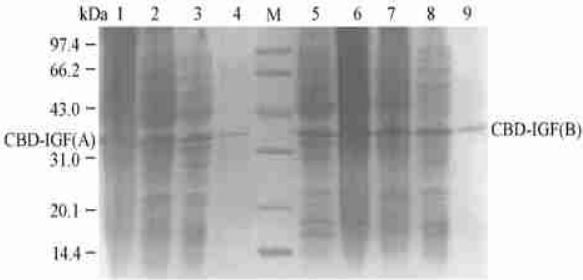


图 3 CBD IGF(A) 和 CBD IGF(B) 融合蛋白的表达和纯化

Fig. 3 Expression and purification of CBD IGF(A) and CBD IGF(B) fusion proteins

1: Deposit of ultrasonicated pET-IGF(A)/BL21; 2: Supernant of ultrasonicated pEF IGF(A)/BL21; 3: Induced product of pEF IGF(A)/BL21; 4: Purified CBD-IGF(A) protein; M: Protein marker; 5: Induced product of pEF IGF(B)/BL21; 6, 7: Deposit of ultrasonicated pEF IGF(B)/BL21; 8: Supernant of ultrasonicated pEF IGF(B)/BL21; 9: Purified CBD-IGF(B) protein

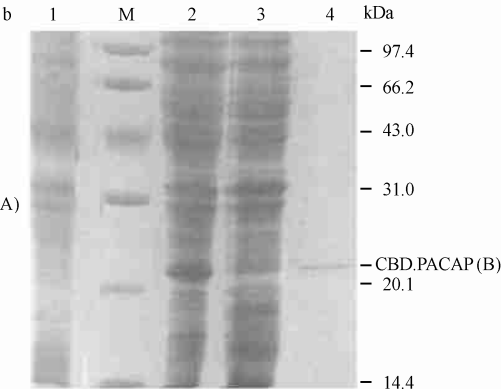
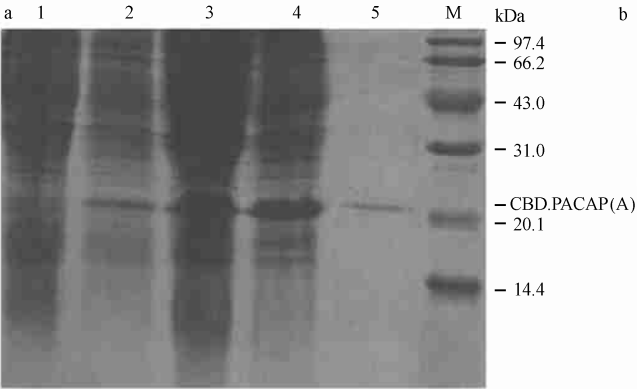


图 4 CBD PACAP(A) 和 CBD PACAP(B)融合蛋白的表达和纯化

Fig. 4 Expression and purification of CBD PACAP(A) and CBD PACAP(B) fusion proteins

a: 1: Uninduced product of pEF PACAP(A)/BL21; 2: Supernant of ultrasonicated pET-PA CAP(A)/BL21; 3: Diposit of ultrasonicated pEF PACAP(A)/BL21; 4: Induced product of pEF PACAP(A)/BL21; 5: Purified CBD-PACAP(A) protein; M: Standard protein maker
b: 1: Uninduced product of pEF PACAP(B)/BL21; 2: Induced product of pEF-PACAP(B)/BL21; 3: Supernant of ultrasonicated pET- PACAP(B)/BL21; 4: Purified CBD PACAP(B) protein; M: Protein marker

调节 Xa 因子的工作浓度: 0.01~ 10 U/mg, 20℃ 酶切 16h, SDS-PAGE 后用 Chemilnager V5. 5 图像采集及分析软件测定残留未被切割融合蛋白占蛋白总量的百分比(R), 同时以相同起始浓度的融合蛋白和对应浓度的加热变性因子 Xa 的混合物作为参照, 测定起始融合蛋白占蛋白总量的百分比(I), 计算酶切效率(E): $E = (1 - R/I) \times 100\%$ 。以 Xa 因

子的工作浓度为横坐标, 酶切效率(E)为纵坐标, 制作图谱分析引入柔性短肽对 Xa 因子的酶切效率的影响。结果显示, 柔性短肽的引入不同程度地提高了融合蛋白对 Xa 因子的敏感性(图 7、图 8)。相比较, 引入短肽后, CBD-IGF 酶切效率的提高比 CBD-PACAP 要明显, 但总体上 CBD-IGF(A/B)对 Xa 因子的敏感性比 CBD-PACAP(A/B)低。

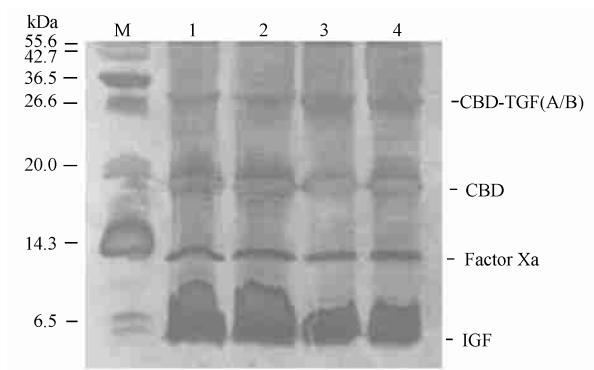


图 5 Factor Xa (5U/mg) 对 CBD IGF(A/B) 酶解效率的比较

Fig. 5 Cleavage efficiency of Factor Xa (5U/mg) to CBD IGF(A/B)

M: Standard protein maker; 1, 2: CBD IGF(B); 3, 4: CBD IGF(A)

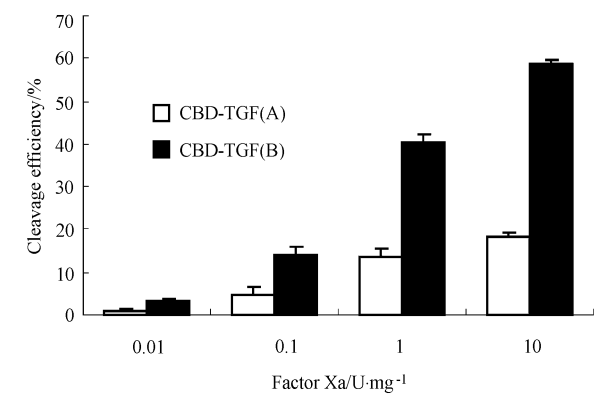


图 7 Factor Xa 对 CBD IGF(A) 和 CBD IGF(B) 酶解效率的比较

Fig. 7 Cleavage efficiency of Factor Xa on CBD IGF(A) and CBD IGF(B)

3 讨论

Xa 因子的酶切效率受融合蛋白构象的影响^[2]。有报道 0.01% SDS 能使融合 BMP-IL-2 的结构松散, 从而有效地提高 Xa 因子对融合蛋白的酶切效率^[3]。用枸橼酸酐修饰融合蛋白, 使蛋白质部分变性, 可溶性增强, 也提高融合蛋白对凝血酶的敏感性^[4]。这些研究结果都表明从外部改变蛋白质的空间构象, 使融合蛋白结构松散, Xa 因子识别位点暴露, 易于被 Xa 因子靠近时, 酶切效率会提高。

蛋白分子的空间结构归根结底是一级结构决定的。本研究从蛋白的一级结构入手, 在融合蛋白 Xa 因子的识别位点(Ile-Glu-Gly-Arg↓)前引入富含

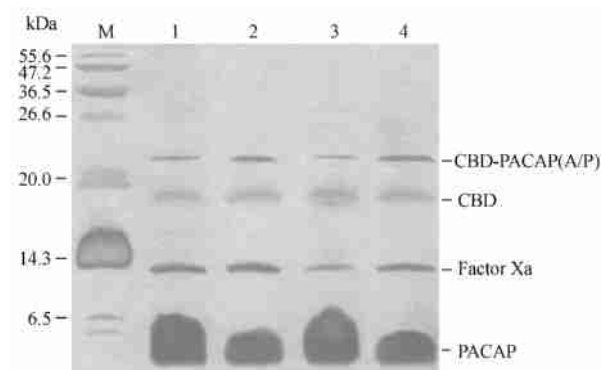


图 6 Factor Xa (5U/mg) 对 CBD PACAP(A/B) 酶解效率的比较

Fig. 6 Cleavage efficiency of Factor Xa (5U/mg) to CBD PACAP(A/B)

M: Standard protein maker; 1, 3: CBD PACAP(B); 2, 4: CBD-PACAP(A)

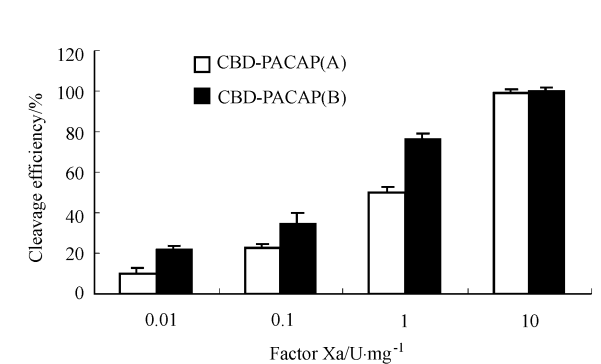


图 8 Factor Xa 对 CBD PACAP(A) 和 CBD PACAP(B) 酶解效率的比较

Fig. 8 Cleavage efficiency of Factor Xa on CBD PACAP(A) and CBD PACAP(B)

甘氨酸的短肽(Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly)。此柔性短肽均由不带电荷的中性小氨基酸组成, 避免短肽内部形成复杂的二级结构, 保证伸展的状态; 两端的极性氨基酸(Thr 和 Ser) 增加柔性肽的水溶性^[5]。理论上此柔性短肽易于在水中保持伸展的状态, 从而影响整个融合蛋白的构象, 特别改变了 Xa 因子识别位点的附近结构, 有助于提高了融合蛋白对 Xa 因子的敏感性。实验结果也证明此短肽的引入不同程度地提高了两个融合蛋白 CBD-IGF 和 CBD-PACAP 对 Xa 因子的敏感性。

短肽的引入使 Xa 因子对 CBD-IGF 的酶切效率明显提高。但总体上 CBD-IGF(A/B) 对 Xa 因子的敏感性比 CBD-PACAP(A/B) 低, 这可能与 IGF 和 PACAP 本身的序列差别有关。IGF 由 70 个氨基酸

组成,含 5 个半胱氨酸; PACAP 由 38 个氨基酸组成,不含半胱氨酸; IGF 的序列的复杂性影响 CBD-IGF 的空间构象,使其对 Xa 因子的敏感性比 CBD-PACAP 低。此外, Xa 因子识别位点的 C 端的序列也会影响蛋白酶切的效率^[6]。

有报道在 Xa 因子识别位点(Ile-Glu-Gly-Arg ↓)后添加 6 个甘氨酸可有效地提高蛋白对 Xa 因子的敏感性^[2,7],但这样切下的目的蛋白前带有 6 个甘氨酸。将富含甘氨酸的短肽加在 Xa 因子识别位点(Ile-Glu-Gly-Arg ↓)之前,不影响酶切后产生的非融合蛋白的序列,这是提高融合蛋白对 Xa 因子敏感性的一种新方法。

参考文献

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理(下册)(第二版). 北京: 科学出版社, 2001. 144~ 151

- [2] Guan K L, Dixon J E. Eukaryotic proteins expressed in *E. coli* an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione *S*-trans-ferase. *Anal Biochem*, 1991, 27 (5): 192~ 262
- [3] Zheng Rong, Hu Yi, Zhu Chunbao, et al. Cloning of IL-2 gene in plasmid pMAL-cR1 and expression and purification of IL-2 protein. *Chinese Journal of Pharmaceutics*, 1994, 25(6): 243~ 246
- [4] Feng Dan, Yuan Yong, Zhang Yingmei, et al. Citraconic anhydride modification on the recombinant protein expressed in *E. coli*. *Prog Biochem Biophys*, 1996, 23(6): 541~ 544
- [5] Newton D L, Xue Y, Olson K A, et al. Angiogenin single chain immunofusions influence of peptide linkers and spacers between fusion proteins domains. *Biochemistry*, 1996, 35(2): 545~ 553
- [6] He M, Jin L, Austen B. Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins. *J Protein Chem*, 1993, 12(1): 1~ 5
- [7] Liu Xuebo, Li Shenghua, Liang Xiaobing, et al. A system of efficient expression and rapid purification of recombinant polypeptides. *Bull Acad Med Sci*, 1996, 120(1): 62~ 65

A New Strategy for Improving the Cleavage Efficiency of Factor Xa

GAO Yuan YU Rong jie HONG An

(Bioengineering Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract In order to improve the cleavage efficiency of factor Xa on fusion protein CBD-IGF and CBD-PACAP and produce non fusion recombinant peptides efficiently, a short flexible peptide abundant in Gly (Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly) was added before the recognized site by factor Xa using gene engineering technology. All fusion proteins were purified by cellulose affinity chromatography. The compare of the cleavage efficiency of factor Xa on both two group fusion proteins indicated that the short peptide help to improve the sensitivity of fusion protein to factor Xa in different degree. The sensitivities of CBD-IGF fusion proteins were lower than CBD-PACAP fusion proteins as a whole. A strategy of promoting the cleavage efficiency of factor Xa was presented.

Key words Factor Xa Fusion protein Cleavage efficiency Short flexible peptide