

## 人基质金属蛋白酶-2 的表达、纯化和性质鉴定

丁秀云\* 李春海 孙丽亚 王红丽

(军事医学科学院附属医院 北京 100850)

**摘 要** PCR 方法扩增人基质金属蛋白酶-2(MMP-2)不含信号肽的表达序列,酶切和测序鉴定正确后,构建酵母重组表达质粒 pPIC9/MMP-2,电击法转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞得到阳性克隆,甲醇诱导获得含大量基质金属蛋白酶-2 的培养上清,经 Sephacryl S-200 纯化后,纯度达到电泳纯。明胶酶谱和 SDS-PAGE 分析说明重组 MMP-2 能够降解明胶和 IV 型胶原,表明重组蛋白具有与天然 MMP-2 相似的底物特异性。糖基化分析和 SDS-PAGE 表明,表达产物的分子量约为 50kD,重组 MMP-2 的 C-末段可能发生了降解。

**关键词** 基质金属蛋白酶-2, 表达, 毕赤酵母

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0643-05

基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMPs)是一类依赖于  $Zn^{2+}$  的蛋白水解酶类,能够降解细胞外基质和基底膜,参与许多生理和病理过程(如肿瘤细胞的侵袭和转移,自身免疫性疾病等)。现在已经发现有 17 种基质金属蛋白酶,按照它们的结构、底物特异性和水解特性,可以分为胶原酶,明胶酶,Stromelysin 和膜型的基质金属蛋白酶(MT-MMPs)等 4 类<sup>[1]</sup>。明胶酶有 2 种:72kD 的明胶酶 A(又称金属蛋白酶-2 或 MMP-2)和 92kD 的明胶酶 B(又称金属蛋白酶-9 或 MMP-9)。明胶酶是以酶原的形式分泌的,同其他的金属蛋白酶一样,在激活时,需要在 N-末端除去大约 80 个氨基酸的前肽。明胶酶 A(MMP-2)能够降解变性的胶原,包括 IV, V, VII, X 和 VI 型胶原,以及弹性蛋白等。实验结果表明, MMP-2 的活性水平与肿瘤转移的程度密切相关,因此,弄清其结构、激活和作用特点对研究和治疗肿瘤转移具有重要意义。目前虽然有许多学者都致力于明胶酶的区域结构性质和结合催化活性以及激活机制的研究,而对于明胶酶整体的结构特性、结合催化机理、激活机制的研究,由于样本量的限制,未能很好地进行。本研究在利用毕赤酵母表达系统对 MMP-2 进行成功表达的基础上,对其表达的特点和性质进行了研究,为进一步研究其结构和功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

毕赤酵母工程株 GS115 ( $His^+ Mut^+$ )、分泌型表达载体 pPIC9 均为 Invitrogen 产品。Sephacryl S-200 及相关的纯化设备为 Pharmacia 公司产品, YNB 为 DIFCO 产品, PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、测序试剂盒和 pGEM-T 连接试剂盒和各种限制酶购自 Promega 公司,大肠杆菌 JM109、HT1080 细胞由本室保存。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 目的片段的获得:**根据 MMP-2 的编码序列,设计合成 PCR 反应引物:

正链:5'CTGAATTCGCGCCGTCGCCCATCATCA3',

负链:5'CGGAATTCTCAGCAGCCTAGCCAGT3';

利用 PCR 反应从 pBluescript/MMP-2 质粒上扩增目的片段, 100 $\mu$ L 标准反应体系, 反应条件: 97 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 68 $^{\circ}$ C 5min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.2 编码片段的测序:**采用测序试剂盒,方法见说明书。

**1.2.3 重组质粒的构建和鉴定:**见参考文献[2]。

**1.2.4 重组质粒线性化和转化:**具体操作见手册<sup>[3]</sup>。

收稿日期:2001-04-26,修回日期:2001-08-27。

基金项目:国家重大基础研究发展计划项目(973 项目, G1998051105)。

\* 通讯作者。 BP:010-96309-31306; E-mail: dingxiyun@mailexcite.com

**1.2.5 重组蛋白表达:**阳性克隆培养 2d 后加入甲醇至终浓度 0.5%, 30℃ 诱导 48h 后收集上清, SDS-PAGE 分析表达量。

**1.2.6 重组 MMP-2 蛋白的纯化:**Sepharycal S-200 柱用两倍于柱体积的平衡液 TBS (50mmol/L Tris-HCl, 0.2mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 0.02% NaN<sub>3</sub>) 进行平衡, 然后取 12mL 平衡好的样品上样, 平衡液洗脱, 流速为 30mL/h, 洗脱样品用 SDS-PAGE 进行分析鉴定。合并目的蛋白组分, 双蒸水透析, 透析后的样品用冷冻干燥机干燥, -20℃ 保存。

**1.2.7 重组蛋白性质鉴定:**

(1) 明胶酶活性鉴定: 采用明胶酶谱法。配制 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, 其中含 0.1% 明胶, 将培养上清与上样缓冲液混合后直接上样, SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 以蒸馏水漂洗凝胶后移入 100mL 2.5% Triton X-100 溶液中, 摇床摇动 30min 以洗脱 SDS。蒸馏水洗, 凝胶移入 100mL 明胶酶缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1μmol/L ZnCl<sub>2</sub>) 中, 37℃ 温育 12~17h, 0.1% 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色至出现明显的负染酶带<sup>[4]</sup>。

(2) IV 胶原水解活性: IV 型胶原水解反应体系: 50mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5), 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 200mmol/L NaCl, 10μg IV 型胶原和一定量的 MMP-2 重组蛋白, 总体积为 20μL。37℃ 反应 24h 后, 加入样品缓冲液, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳观察蛋白降解条带。

(3) 糖基化鉴定 (过碘酸-雪夫试剂染色): 普通 SDS-PAGE 后, 取下凝胶固定液中过夜, 7.5% 乙酸中作用 30min, 0.2% 过碘酸中 4℃ 暗中反应 1h, 弃过碘酸, 加入 Schiff's 试剂继续反应 1h, 7% 乙酸脱色, 考马斯亮蓝复染。

## 2 实验结果

### 2.1 重组质粒的构建与鉴定

PCR 产物经纯化后直接连接到 pGEM-T 载体上, 构建 pGEM-T/MMP-2 重组质粒, *EcoRI* 酶切后连接到经同样酶切的酵母穿梭质粒 pPIC9 上构建重组表达质粒 pPIC9/MMP-2, 构建过程见图 2。利用 *EcoRI*, *XhoI* 和 *BamHI* 分别进行重组质粒的单酶切和双酶切鉴定, 如图 1。可以看出, 重组质粒插入片段大小为 1900bp 左右, 插入方向与表达载体的阅读框架一致。

### 2.2 重组质粒的转化和阳性克隆的筛选

重组质粒经 *SalI* 线性化后, 电击法转化酵母工

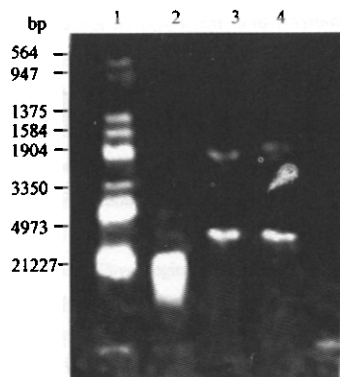


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pPIC9/MMP-2 by digestion with restriction endonucleases

1. DNA marker ( $\lambda$ DNA/*Hind*III + *Eco*RI); 2. pPIC9/MMP-2 (non-digested); 3. pPIC9/MMP-2 (digested with *Eco*RI); 4. pPIC9/MMP-2 (digested with *Xho*II + *Bam*HI)

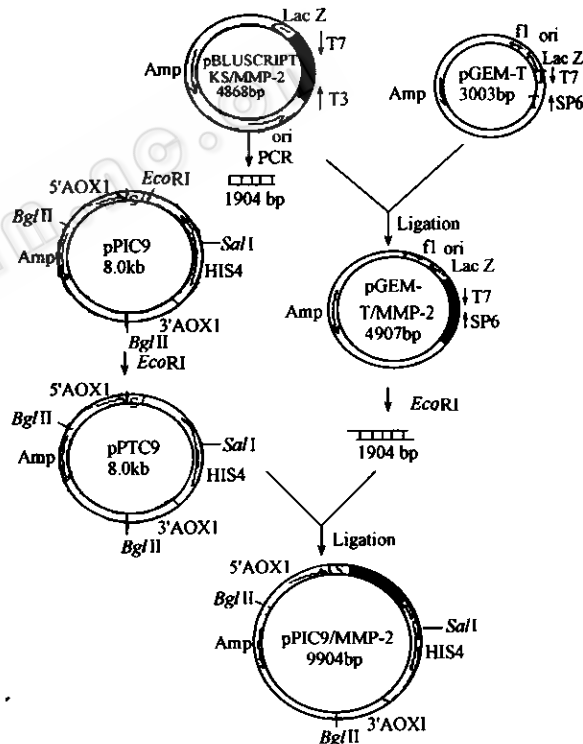


图 2 重组质粒的构建过程

Fig. 2 The scheme for construction of recombinant plasmid pPIC9/MMP-2

程株 GS115, 经组氨酸缺陷培养基培养初步筛选后, 利用甲醇诱导阳性克隆, 通过对酵母培养上清明胶酶谱电泳进行活性筛选, 从 30 个克隆中筛选出 2 个阳性克隆, 其中一个见图 3。从图 3 可以看出, 9 号克隆的表达产物具有较强的明胶酶活性, 共有 2 条带, 推测可能是发生了酶原激活或酶本身降解。

### 2.3 重组蛋白的表达与纯化

利用甲醇诱导, 大量表达重组 MMP-2 蛋白。培

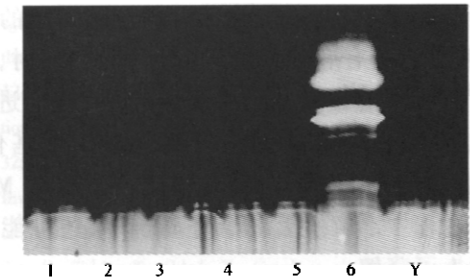


图 3 阳性克隆的筛选

Fig.3 Screening for expression clones

Y, negative control; 6, No. 9 clone; 1, 2, 3, 4, 5, Transformants

养上清经 Sepharocryl S-200 柱, TBS 洗脱后出现 2 个洗脱峰, 见图 4。对这 2 个峰进行明胶酶谱电泳, 发现第二个峰具有明胶酶活性。洗脱液经透析冻干后进行 SDS-PAGE, 结果见图 5。从图中可以看出, 纯化蛋白经考马斯亮蓝染色后只有一条蛋白带, 分子量在 50kD 左右, 比天然蛋白的激活形式(66kD)小, 这可能是在纯化过程中, 蛋白酶由于操作等因素发生了降解。

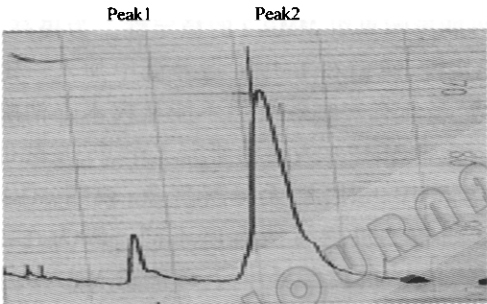


图 4 MMP-2 Sephacryl S-200 洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of MMP-2 purified by chromatography on Sephacryl S-200

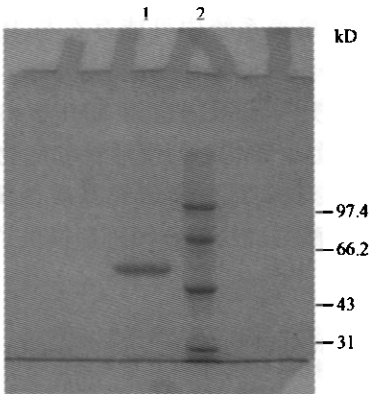


图 5 纯化 MMP-2 的分子量鉴定

Fig.5 Identification of molecular mass of purified MMP-2

1. Purified MMP-2; 2. Protein maker

2.4 重组蛋白性质鉴定

2.4.1 重组蛋白的明胶酶活性分析: 用明胶酶谱方

法鉴定重组蛋白明胶水解活性, 在经过考马斯亮蓝染色后, 凝胶上出现一条明显的负染带, 说明重组蛋白具有明胶酶活性。与人纤维肉瘤 HT1080 细胞培养上清中的天然 MMP-2 比较, 重组蛋白的分子量小, 约 50kD 左右, 结果见图 6。

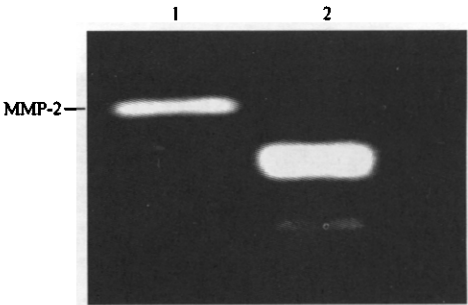


图 6 纯化 MMP-2 的明胶酶活性鉴定

Fig.6 Identification of gelatinase activity of purified MMP-2

1. Supernatant of HT1080 cells; 2. purified MMP-2

2.4.2 重组蛋白的 IV 胶原水解活性分析: MMP-2 又称 72kD 的 IV 型胶原酶, 其特异性底物是 IV 型胶原, 来源于人胎盘的酸溶性 IV 型胶原, 经 SDS-PAGE 分离主要有 4 条蛋白带: 200kD, 180kD, 120kD 和 100kD。将纯化的重组 MMP-2 与 IV 型胶原混匀, 37℃ 孵育 24h 后, SDS-PAGE 电泳发现 180kD、120kD 和 100kD 的蛋白带发生了降解, 生成 110kD、94kD、50kD 和 36kD 左右的蛋白带, 见图 7。IV 型胶原水解程度与酶量相关, 50ng 的重组酶即开始水解 IV 型胶原, 随着酶量增加, 水解更加彻底。这说明重组蛋白具有天然 MMP-2 的底物特异性和水解特异性。

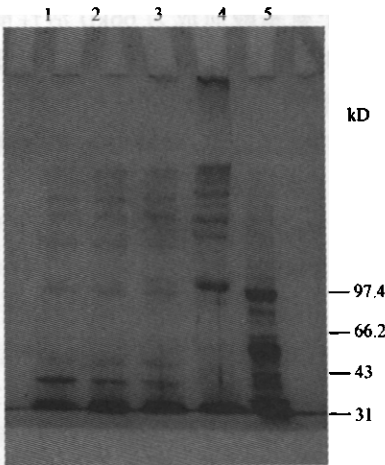


图 7 MMP-2 的 IV 型胶原水解活性鉴定

Fig.7 Analysis of catalytic activity of MMP-2 on IV collagen

1. 200ng MMP-2; 2. 100ng MMP-2; 3. 50ng MMP-2; 4. Without MMP-2; 5. Protein marker

2.4.3 重组蛋白的糖基化分析: *Pichia pastoris* 与其他高等生物一样能够对蛋白质进行翻译后修饰, 尤

其是对有糖基化位点的蛋白,能在其糖基化处以 N-糖基化的方式加入 8~14 个甘露糖<sup>[5]</sup>;由于所克隆的人 MMP-2 基因 C-末端含有两个潜在的糖基化位点,可用过碘酸-雪夫试剂染色来验证重组蛋白是否发生了糖基化。实验结果如图 8 所示,图中表明,重组蛋白未发生糖基化。

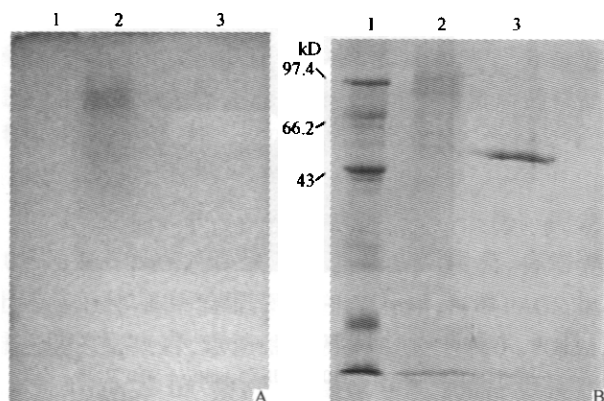


图 8 纯化 MMP-2 的糖基化分析

Fig. 8 Glycosylation analysis of purified MMP-2

A. Staining with Schiff's reagent; B. Staining with Schiff's reagent and Coomassie Brilliant Blue

1. Protein marker; 2. Positive control; 3. Purified MMP-2

## 4 讨 论

MMP-2 是一种蛋白水解酶,以酶原的形式分泌到细胞外,在体内由 MT-MMPs<sup>[4,5]</sup>或由其它的激活剂如 uPA<sup>[8]</sup>通过一系列的反应使其激活;在体外,  $H_2NPhHg$  是 MMP-2 的激活剂,能使 MMP-2 在 N-末端水解掉 80 个氨基酸而成为 66kD 活性酶,如继续作用,则变为 45kD、36kD 和 31kD 的活性形式<sup>[9]</sup>;加入 EDTA 可抑制酶活性和酶的这种降解。Koti Sreekrishna<sup>[3]</sup>等人的研究认为,降解发生在 N-末端,是由蛋白质的过量水解造成。

在对重组 MMP-2 的性质进行鉴定过程中,发现 MMP-2 有部分水解现象,而且随培养时间加长,酶降解程度随之增加,但是酶活性和底物特异性并没有改变;为寻找重组 MMP-2 发生降解的位置,我们首先分析了人 MMP-2 结构组成:人 MMP-2 cDNA 编码 660 个氨基酸,含有 13 个外显子和 12 个内含子,前面 29 个氨基酸为信号肽序列;第二个外显子编码 80 个氨基酸的前肽区,能够保持酶原形式,在酶原激活过程中被水解掉;以后是催化区域,主要参与酶的催化功能;明胶酶结合区,由外显子 5~7 所编码,使基质金属蛋白酶-2 具有底物结合特异性;最后一个区域是血红素样的 C-末端区(CTD)。具体结构如

图 9 所示。有实验证明<sup>[10,11]</sup>,在缺少 CTD 的情况下,MMP-2 仍具有底物特异性和酶活性;同时,根据 MMP-2 的 2 个潜在糖基化位于 C-末端,我们进行了糖基化实验,发现重组 MMP-2 C-末端无糖基化,因而,综合这两个方面的结果,我们认为重组 MMP-2 除激活过程中水解掉第二个外显子外,还可能在 C-末端发生了降解。

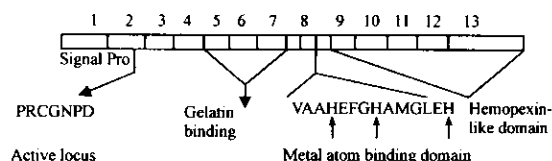


图 9 MMP-2 的结构组成

Fig. 9 Structure of MMP-2

产物的稳定性主要与两方面因素有关,一是重组蛋白本身的特点,MMP-2 作为酶原分泌到培养上清中,其 N-末端存在激活位点,易于被外界其它蛋白酶所识别而发生降解;另一方面是培养上清中蛋白酶可能影响重组 MMP-2 的稳定性。为提高 MMP-2 的稳定性,我们在 BMMY 培养液中加入一定量的山梨醇,虽然有一些效果但不能从根本上消除酶的降解。参考 MMP-9 表达的研究工作<sup>[12]</sup>,在酵母系统中表达 MMP-9 时,则无降解现象,说明 MMP-9 和 MMP-2 的激活机理可能有所不同。因为在 BMMY 中含有 pH6.0 的磷酸缓冲液,可能对 MMP-2 发生降解有一定的作用,为此曾用 MM 培养基来诱导 MMP-2 的表达,结果发现该培养液并不能诱导 MMP-2 的表达,同样培养基中加入 EDTA, MMP-2 的表达也受抑制,说明这两种培养液与 MMP-2 降解无关。推测在酵母表达及培养系统中可能存在与 MMP-2 自身降解有关的因子。

尽管本研究中获得的重组 MMP-2 出现了部分降解现象,但重组 MMP-2 的酶活性和底物特异性并没有改变,这为我们进一步研究基质金属蛋白酶-2 的降解特性和酶与底物的作用机理提供了实验材料和实验依据。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Anlta E Yu, Rujbert E Hewitt, David E Kleiner *et al.* Molecular regulation of cellular invasion role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem Cell Biol*, 1996, 74: 823 ~ 831
- [2] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, Beijing: Science press, 1995, pp. 34 ~ 60
- [3] Koti Sreekrishna, Kobert G, Brankamp, Keith E Kropp *et al.* *Strat-*

- egies for optimal synthesis and secretion of heterogenous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**:55 ~ 62
- [ 4 ] Kleiner De, Stetler-tevenson W G. Quantitative Zymography: Detection of pictogram quantities of gelatinase. *Anal Biochem*, 1994, **218**: 325 ~ 329
- [ 5 ] Invitrogen, *Pichia* Expression Kit, a manual of method for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, 1996
- [ 6 ] Sato H, Takino T, Odada Y, Cao J *et al*. Matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, 1994, **370**: 61 ~ 65
- [ 7 ] Strongin A Y, Collier I, Bannikov G, Marmer B L *et al*. Mechanism of cell surface activation of 72kD type IV collagenase, Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem*, **270**:5331 ~ 5338
- [ 8 ] Vassalli J D, Sappino A P, Belin D. The plasminogen activator/plasminsystem. *J Clin Invest*, 1991, **88**:1067 ~ 1072
- [ 9 ] Yasunori Okada, Tatsuhsa Mokodomi, Jan J enghilkd *et al*. Matrix metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts-purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem*, 1990, **194**:721 ~ 730
- [ 10 ] Friedman Fuerst, Tir Bird R E *et al*. Domain structure of human 72kD gelatinase/type IV collagenase characterization of preteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. *J Biol Chem*, 1992, **267**:15398 ~ 15405
- [ 11 ] Murphy, Willenbrock F, Ward R V *et al*. The C-terminal domain of 72kD gelatinase A is not required for catalysis but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Bioche J*. 1992, **263**:637 ~ 641
- [ 12 ] YAN C H(颜春洪), LI C H(李春海). Expression and Identification of Human Matrix Metalloproteinase-9 *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学和分子生物学报), 2000, **16**(2): 194 ~ 199

## Expression, Purification and Identification of Human Matrix Metalloproteinase-2

DING Xiu-Yun\* LI Chun-Hai SUN Li-Ya WANG Hong-Li

(Affiliated hospital of Academia of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**Abstract** The expression sequence of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) has been obtained by PCR amplifying, restriction enzyme cut and sequencing analysis demonstrate that the sequence is correct. The recombinant expression plasmid pPIC9/MMP-2 containing MMP-2 is constructed and transformed the yeast *Pichia pastoris*. Recombinant matrix metalloproteinase-2 protein was expressed in *Pichia pastoris* in great deal after induction by methanol. The purity of the recombinant MMP-2 filtrated through Sephacryl S-200 reached to electrophoresis purity. With the ability to degrade gelatin and IV type collagen, recombinant MMP-2 has the similar substrate specificity with natural MMP-2. The recombinant MMP-2 with 50kD molecular weight is smaller than natural MMP-2, which suggested degradation occurred to it.

**Key words** matrix metalloproteinase-2, expression, *Pichia pastoris*

Received: April 26, 2001

The work was supported by Grant from National Key Basic Research and Development Program of China (G1998051105)

\* Corresponding author. Bp:010-96309-31306; E-mail: dingxiyun@mailexcite.com

### 欢迎订阅《应用与环境生物学报》

ISSN 1006-687X  
刊号 邮发代号: 62-15  
CN 51-1482/Q

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评。读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部。本刊获中国科学院科学出版基金资助。

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊)。双月25日出版,每期96页,2001年起改为大16开,高档铜版纸印刷。定价仍为每期11.00元,年定价66.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。新订户可向本刊编辑部补购1995、1996、1997、1998、1999、2000年各卷(卷价分别为32.00元、44.00元、44.00元、44.00元、66.00元和66.00元)。以及1999年增刊(环境微生物学研究),订价每册22.00元。编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部。邮编:610041,电话:(028)5229903,5237341(联系人:刘东渝)。