

重组人超氧化物歧化酶的基因克隆、表达及产物纯化研究

张 翊 王军志 吴勇杰*

(中国药品生物制品检定所 北京 100050)

摘 要 为了克隆人 SOD cDNA,构建表达载体,实现其在大肠杆菌中的高效稳定表达,通过抽提人肝组织总 RNA,RT-PCR 扩增人 SOD cDNA,构建含 rhSOD cDNA 的表达质粒 pLY-4/rhSOD,转化大肠杆菌 JF1125 进行表达研究。结果克隆到的 rhSOD cDNA 序列与文献报道一致,在宿主菌中获得高效表达,表达水平达 68% 以上,蛋白复性纯化工艺高效快速, rhSOD 纯品纯度达 98% 以上,比活性达到 2529u/mg,为用基因工程方法生产 rhSOD 打下基础。

关键词 重组人超氧化物歧化酶,基因克隆,基因表达,包含体,复性,纯化

中图分类号 Q816 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0557-04

超氧化物歧化酶(SOD)是机体内超氧自由基的天然清除剂^[1,2],对炎症、缺血再灌注损伤、辐射损伤均有一定疗效,还可减少抗癌药物对细胞和心脏的毒副作用^[3,4]。rhSOD 作为药物酶制剂,具有医用价值及临床应用前景,但作为生物大分子,动植物来源的 rhSOD 均存在抗原等安全问题,可能诱发免疫反应。近年来,美日等国已开发出基因工程产品,并进入临床实验阶段。其临床适应症为早产儿氧中毒引起的呼吸系统疾病及神经系统疾病^[5]。此外,对 rhSOD 在基因治疗及作为 AIDS 的辅助治疗等方面的研究也正在进行中^[6,7]。我国除开展直接从人血中提取 SOD 外,也开展重组人 SOD 的研究^[8,9]。我们从人肝组织中克隆到人 Cu-ZnSOD cDNA,并在大肠杆菌中得到表达。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 JF1125,质粒 pLY-4 由上海医科大学宋后燕教授惠赠。

1.2 主要试剂

TRIZOL Reagent 购自 Life Technologies 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;其它工具酶均购自 Life Technologies 公司。

1.3 引物设计与合成

正向引物 5'...ATTGAATTCATGGCGACGA AGGCC...3'

反向引物 5'...ATTGGATCCTTATTGGGCG ATTCC...3'

引物两端分别设计 EcoRI 和 BamHI 位点。

1.4 人 SOD cDNA 的克隆及表达载体的构建

取新鲜人肝组织 80mg,用 TRIZOL Reagent 抽提总 RNA,RT-PCR 扩增 rhSODcDNA,参照 Sambrook 等方法^[10]构建含 rhSOD cDNA 的 pUC19 重组质粒,进行核苷酸序列分析。从阳性克隆质粒中回收 hSOD cDNA 片段,与表达载体 pLY-4 重组,构建表达质粒,转化大肠杆菌 JF1125,构建成 pLY-4/rhSOD 工程菌。

1.5 pLY-4/rhSOD 工程菌的发酵培养

pLY-4/rhSOD 工程菌菌种单克隆接种于 LBA 种子培养液(1% Tryptone,0.5% Yeast Extract,1% NaCl,100μg/mL Amp),于 30℃ 恒温培养 12 h,至 OD₆₀₀ = 4.0。将 pLY-4/rhSOD 工程菌种子菌液按 1/100(V/V)比例接种于 4000mL 发酵培养液(0.08mol/L Na₂HPO₄,0.02mol/L KH₂PO₄,0.05mol/L NaCl,0.02mol/L MgSO₄,1% Glucose,1% Casion,1.1mg/mL Vitm B1,0.1% NH₄Cl,0.1% trace element solution,pH6.8),于 5L 生物反应器(Bioflo III, NBS, Co. USA)中发酵培养。30℃ 扩增,42℃ 诱导培养。离心收集 pLY-4/rhSOD 工程菌。经 SDS-PAGE 电泳分析后,-20℃ 保存。

1.6 pLY-4/rhSOD 工程菌破菌及包涵体(Inclusion Body Solution,IBS)提取纯化

pLY4/rhSOD 工程菌悬浮于破菌缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4,0.15mol/L NaCl),于高压匀质机(APV, Co UK)500kg/cm²破菌。涂片,革

兰氏染色镜检,破菌率 90% 以上。离心收获 IBS,悬浮于破菌缓冲液,以 Telfon 匀浆器(Potter-Evlvehji-am)反复匀浆研磨 IBS,以去除可溶性核酸及菌体膜蛋白等杂质。离心收获纯化的 IBS。

1.7 rhSOD 蛋白的提取及复性

纯化后的 IBS 溶解于 IBS 溶解缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4, 6mol/L guanidine hydrochloride, 0.1 mol/L β -ME),以 Telfon 匀浆器反复匀浆研磨均匀。离心,以去除不溶性杂质。溶解上清按一定比例缓慢加入复性缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4 2.5% Sucrose, 0.1 mol/L β -巯基乙醇),4℃ 缓慢搅拌复性。以分子量截留为 5kD 的超滤浓缩系统(Milli-plate, Millipore, Co. USA)浓缩样品。离心去除少量析出的不溶性杂质。

1.8 rhSOD 蛋白的柱层析纯化

1.8.1 pLY-4/rhSOD 蛋白的 G-50 凝胶过滤柱层析纯化 复性浓缩后的样品,以 G-50 凝胶过滤层析柱纯化,以去除小分子量核酸、杂蛋白及残留盐酸胍、蔗糖等杂质。纯化洗脱过程由 Waters 650 蛋白纯化系统(Waters, Co. USA)控制;流速为 20cm/h;流动相为缓冲液 A(0.05mol/L PB pH7.4)。

1.8.2 rhSOD 蛋白的 Q-Sepharose 离子交换柱层析纯化 G-50 纯化后的样品用 Q-Sepharose 离子交换层析柱(Pharmacia Co, Sweden)纯化。由 Waters 650 蛋白纯化系统控制;流速为 50cm/h;以流动相 A(0.05mol/L PB pH7.4)流动相 B(0.05mol/L PB pH7.4, 1 mol/L NaCl)进行 NaCl 线性梯度洗脱。收集样品,经 SDS-PAGE 电泳检定为 rhSOD 蛋白。样品分装及冻干后 4℃ 保存待用。

1.9 rhSOD 蛋白含量测定及酶活性测定^[11]

采用 Lowry 法及改良的邻苯三酚自氧化法。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取和目的基因的克隆

取健康人肝组织匀浆,提取总 RNA,RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定在 480bp 处可见一扩增条带,与 rhSOD cDNA 大小相同(图 1)。

2.2 目的基因的克隆和序列测定

目的基因经过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后与 pUC19 经过双酶切连接,进行核苷酸序列分析,序列测定结果与文献报道一致^[12]。

2.3 表达质粒的构建和表达

表达载体 pLY-4 经过 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后与目的基因连接转化,经酶切连接鉴定后确认为

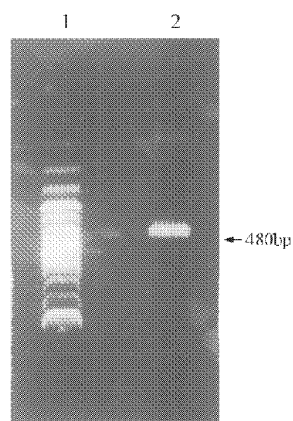


图 1 RT-PCR 结果

Fig. 1 Results of RT-PCR

1. DNA marker 100bp ladder ;
2. Band of PCR result (about 480bp)

阳性克隆(图 2)。

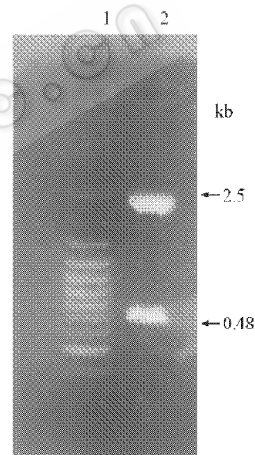


图 2 重组质粒 pLY-4/rhSOD 的酶切鉴定分析

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pLY-4/rhSOD by restriction enzyme digestion

1. DNA Marker 100bp ladder ;
2. pLY-4/rhSOD digested by *Eco*RI and *Bam*HI

2.4 表达产物的电泳分析

pLY-4/rhSOD 转化大肠杆菌 JF1125 后,温度诱导表达,产物经电泳分析(图 3),扫描后表达量占菌体总蛋白的 68.6%,产物以包涵体形式存在。

2.5 rhSOD 蛋白的复性及纯化

rhSOD 蛋白复性纯化工艺高效快速,经过凝胶和阴离子交换柱纯化后(图 4),rhSOD 样品电泳纯度达 98% 以上(图 5)。

2.6 rhSOD 的蛋白含量及活性测定

采用 Lowry 法测定蛋白含量为 0.85mg/mL,活性为 2250u/mL,比活性达到 2529u/mg,活性与动物组织来源提取 SOD 相比基本一致。

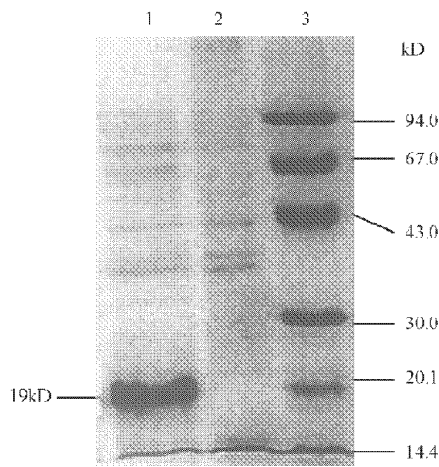


图 3 pLY-4/rhSOD 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression products of pLY-4/rhSOD

- 1. Production of engineering bacteria of rhSOD after induction ;
- 2. Production of engineering bacteria of rhSOD before induction ;
- 3. Molecular weight marker

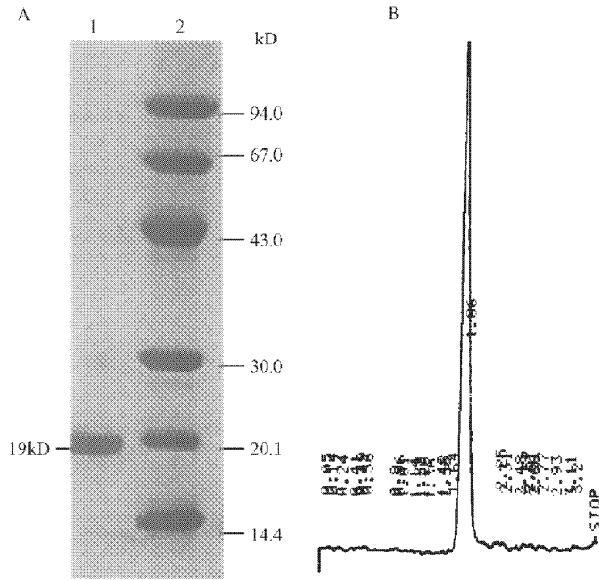


图 5 rhSOD 纯化产物的 SDS-PAGE 电泳及光密度扫描

Fig.5 Purified production of rhSOD analyzed by SDS-PAGE and Density Scanning

- A. rhSOD analyzed by SDS-PAGE
- B. rhSOD analyzed by Density Scanning
- 1. Molecular weight marker
- 2. Purified rhSOD after Ion-exchange

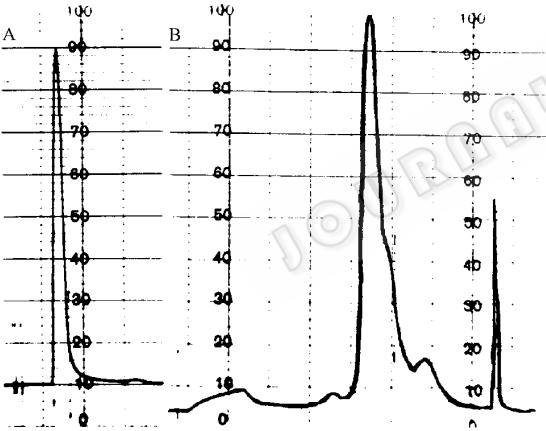


图 4 rhSOD 经 Sephadex G-50 凝胶过滤层析和 Q-sepharose 离子交换层析纯化

Fig.4 Purification of rhSOD by Sephadex G-50 Gel filtration and Q-Sepharose Ion-exchange

A. The renatured rhSOD was applied to a Sephadex G-50 column. B. rhSOD purified with Sephadex G-50 column was subjected to a Q-sepharose column (4.5cm × 60cm), which was equilibrated with Solution A (0.5mol/L PB pH7.4) at 15cm/h. Fraction of 940mL was collected and analyzed for protein composition by SDS-PAGE. NaCl from 0mol/L to 0.5mol/L with Solution B (0.05mol/L PB pH7.4, 1mol/L NaCl) at 40cm/h. Fraction II of 1580mL was collected and analyzed for protein composition by SDS-PAGE.

3 讨 论

3.1 基因克隆及工程菌的构建

我们查阅了 Genbank ,发现人的肝组织 SOD 含量较高 ,PCR 模板的制备充分考虑到 SOD 的组织特异性 ,选用人的新鲜肝组织 ,为便于克隆 ,在进行引物设计时在两端增加了 2 个限制酶的位点 ,PAY4 质粒为温度诱导质粒 ,在今后操作中较简便 ,成本较低 ,是一种高效表达质粒 ,在完成克隆和构建后 ,我们进行了小试表达筛选 ,最终筛选出表达量 47% 的阳性克隆作为工程菌。

3.2 rhSOD 的纯化研究

在完成了人 SODcDNA 的克隆及表达、工程菌构建的基础上 ,我们进行了发酵、复性及纯化工艺的研究 ,利用 NBS 5L BIO III 发酵罐对工程菌进行高表达发酵研究 ,在该表达体系中 ,由于 rhSOD 基因的表达为温度控制 P_L - P_R 启动子所调控^[13] ,rhSOD 工程菌在 30℃ 培养时大量扩增 ,但不表达 rhSOD 基因 ,在 42℃ 诱导时则大量合成 rhSOD 蛋白。通过控制发酵培养的温度^[14]、pH、溶解氧(DO)等参数 ,诱导后的 rhSOD 工程菌经 SDS-PAGE 电泳及凝胶黑度扫描 ,rhSOD 表达量占菌体总蛋白的 68% 以上。

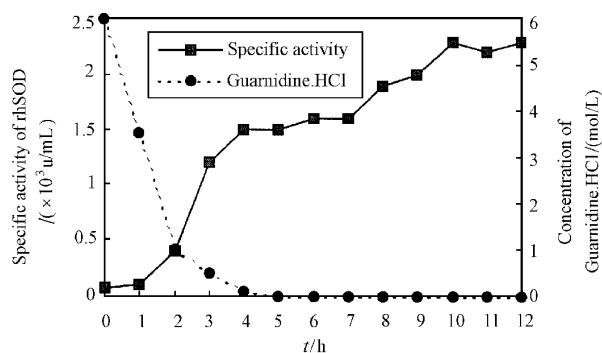


图6 在复性过程中 rhSOD 的活性与盐酸胍浓度与时间的关系曲线

Fig.6 The time curve shows the specific activity of rh-SOD vs the concentration of Guarnidine. HCl in the course of the refolding procedure

明显高于国内同类研究水平^[9]。

rhSOD 作为一种人源性重组蛋白质,由于在大肠杆菌中过度表达等原因,使 rhSOD 工程菌合成的 rhSOD 蛋白质分子不能及时折叠形成其正确天然二、三级空间结构,表达产物形成包涵体,其最大的优点是易纯化,但需要经过特异的复性过程,使其转化为可溶性的有活性状态^[15]。研究表明,在 0.1 mol/L 左右盐酸胍浓度条件下, rhSOD 蛋白样品逐渐恢复其原有空间构象并恢复其生物活性(图 6)。

rhSOD 的等电点为 5.6,所以我们选用阴离子交换柱进行纯化,在此之前,我们采用 G-50 柱进行脱盐,以保证阴离子柱的吸附性能,通过不断调整洗脱梯度和盐浓度,达到了较好的纯化效果。

我们已经完成了 rhSOD 的基因克隆、工程菌构建、蛋白表达及表达产物纯化等一些基础工作,进一步的开发研究工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Kushleika J, Checkoway H, Woods J S *et al.* *Ann Neurol*, 1996, **39**(3): 378~381
- [2] Noda J, Otagiri M, Akaike T *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, **279**(1): 162~171
- [3] Poduslo J F, Curran G L. *J Neurochem*, 1996, **67**(2): 734~741
- [4] Rocca M, Giavaresi G, Caliceti P *et al.* *Int Artif Organs*, 1996, **19**(12): 730~734
- [5] Davis J M, Rosenfeld W N, Richter S E *et al.* *Pediatrics*, 1997, **100**(1): 24~30
- [6] Edeas M A, Emerit I, Khalfoun Y *et al.* *Free Radic Biol Med*, 1997, **23**(4): 571~578
- [7] Prakash O, Teng S, Ai M *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1997, **343**(2): 173~180
- [8] 赵敏顺. 基础医学与临床, 1990, **10**(4): 23~26
- [9] 施惠娟, 范立强, 魏东芝等. 生物化学与生物物理学报, 1999, **31**(1): 16~18
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning a Lab Manual* (2nd ed). NY: Cold Spring Harbor Lab Press, 1989
- [11] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 医药工业, 1988, **19**(5): 217~219
- [12] Sherman L, Dafni N, Lieman-Hurwitz J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**(18): 5465~5469
- [13] Mrooka Y, Mitani I. *J Biotechnol*, 1985, **17**(2): 303~316
- [14] Shiloach J, Bayer S. *Biotechnology and Bioengineering Vool*, 1975, **17**(3): 227~239
- [15] Kane J F, Hartley D L. *Trends in biotechnol*, 1988, **23**(6): 96~101

Gene Cloning, Expression and Purification of Its Production of Recombinant Human Superoxide Dismutase

ZHANG Yi WANG Jun-Zhi WU Yong-Jie

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

Abstract Human SOD cDNA was cloned and constructed an expression plasmid with high sufficient and stability expression in *E. coli*. The rhSOD cDNA was amplified by RT-PCR with the template of the total RNA extracted from human liver tissue. The expression plasmid, pLY-4/rhSOD, containing rhSOD cDNA, was transformed into the *E. coli* JF1125. The sequence of the cloned rhSOD cDNA was identified with the reported data. The expression level reached to more than 68% of total bacteria proteins; The technology for protein renature and purification was efficiency and fast. The purity of the final products reached more than 98%. The value of bioactivity was determined as 2529 u/mg. This study gave enough support for production of rhSOD by biotechnology.

Key words Recombinant human superoxide dismutase, gene cloning, gene expression, inclusion body, renature, purification