

研究简报

日本囊对虾 Kunitz 型蛋白酶抑制剂在毕赤酵母中的表达纯化及活性分析

陈丹丹^{1,2}, 何南海^{1,2}, 张名昌^{1,2}

1 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

2 国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物工程重点实验室, 厦门 361005

摘要: SKPI(shrimp Kunitz-type protease inhibitor)是日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)体内的一个小分子多肽, 含有一个 Kunitz 型结构域, 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂。目前已知丝氨酸蛋白酶抑制剂在节肢动物免疫系统中起着非常重要的作用, 为了了解 SKPI 在对虾天然免疫系统中的作用, 首先对其进行了重组表达。从日本囊对虾肝胰腺中扩增 *skpi* 的 cDNA 片段, 插入改造后的 pPIC9K 酵母表达载体, 获得的重组质粒转化至毕赤酵母 GS115 进行表达。由于改造的 pPIC9K 载体加入了 6-His 标签, 因此利用 Ni Sepharose High Performance 对 SKPI 进行了高效纯化。初步的活性研究表明, 重组表达的 SKPI 能特异性地抑制胰蛋白酶的水解活性。

关键词: 日本囊对虾, Kunitz 型蛋白酶抑制剂, 毕赤酵母, 胰蛋白酶

Expression of a Shrimp Kunitz-type Protease Inhibitor in *Pichia pastoris* and Activity Analysis

Dandan Chen, Nanhai He, and Mingchang Zhang

1 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration (SOA), Xiamen 361005, China

Abstract: SKPI (shrimp Kunitz-type protease inhibitor) from *Marsupenaeus japonicus* is a member of serine protease inhibitors which play an important role in the arthropod immunity. To fully understand its function in the innate immunity of shrimp, the *skpi* gene was cloned into a modified pPIC9K vector with a 6-His tag and expressed by *Pichia pastoris* GS115. The secretory SKPI was purified from the medium with high purity by using Ni Sepharose High Performance. This results also indicated that the purified SKPI could inhibit the activity of trypsin specifically.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*, Kunitz-type protease inhibitor, *Pichia pastoris*, trypsin

对虾是海产品中产值最高的品种之一, 日趋严重的对虾病害给对虾养殖业造成了巨大的经济损失。由于使用抗生素等药物有安全性和抗药性等方

面的考虑, 因此国内外研究学者希望通过研究对虾的天然免疫机制, 提高对虾本身的抗病能力来解决病害问题。本研究小组在前期的工作中利用抑制性

Received: July 16, 2007; **Accepted:** September 17, 2007

Supported by: the National High Technology Research and Development Program (No. 863-2006AA100311), and the Main Science Foundation of Fujian (No. 2006N0039).

Corresponding author: Dandan Chen. Tel: +86-592-2195318; E-mail: lemon_dandan@hotmail.com

国家高新技术研究与发展计划项目 (No. 2006AA100311)和福建处科技厅资助重点项目 (No. 2006N0039)。

差减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)的方法,得到了许多与日本囊对虾天然免疫相关的基因,其中有些更是首次在对虾中发现^[1,2], *skpi* 就是其中之一(GenBank accession No. AY435042)。

skpi 编码区全长 243 bp, 编码一个由 15 个氨基酸的信号肽和 Kunitz 蛋白酶抑制剂结构域组成的小分子多肽。Kunitz 结构域中含有 4 个半胱氨酸所形成的 2 对二硫键, 含有此结构域的蛋白广泛存在于动植物当中, 是一类丝氨酸蛋白酶抑制剂^[3-6]。研究发现, 节肢动物的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以保护宿主免受病原的感染。有些可能是通过抑制真菌或细菌的蛋白酶; 有些可能是调节内源的蛋白酶, 而这些蛋白酶参与了体内的凝集反应、酚氧化酶激活反应或是细胞因子的激活反应^[7]。另外, 丝氨酸蛋白酶抑制剂也是治疗一些病毒性疾病的潜在药物^[8]。由此可见, 丝氨酸蛋白酶抑制剂在宿主的免疫系统中起着重要的作用。为了了解 SKPI 在日本囊对虾中的功能, 本研究首先利用毕赤酵母表达系统成功地对其进行了表达, 并获得了高纯度的重组蛋白。进一步研究发现, 此重组蛋白能明显的抑制胰蛋白酶的水解活性, 但不能抑制蛋白酶 K 和枯草菌溶素。

1 材料与方法

1.1 质粒及菌株

大肠杆菌 Top10F' 为本实验室保存, 毕赤酵母菌 GS115 购自 Invitrogen 公司, 改造的 pPIC9K 酵母表达载体由中国科技大学周丛照教授馈赠。

1.2 主要试剂

逆转录酶购自 Invitrogen 公司, 限制性内切酶、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司。蛋白质定量试剂盒购自 PIERCE 公司。Ni Sepharose High Performance 购自 Amersham 公司。低分子量蛋白标准物及胰蛋白酶购自上海生工。BAPNA 购自 Sigma 公司。

1.3 引物设计及目的基因的扩增

实验室前期的 SSH 工作获得了 *skpi* 的全长 cDNA 序列, 利用 SignalP 3.0 软件进行了信号肽分析, 然后结合改造的 pPIC9K 载体序列设计引物。上游引物为: YSKPI-F: 5'-CCGGAATTCCAAATTCA CCCGAAAGAA -3' (*EcoR* I), 下游引物为: YSKPI-R: 5'-CGCGGATCCGCGCTCGCAAAGCCACAT-3' (*Bam*H I)。取日本囊对虾肝胰腺, 按 Trizol 试剂操作

说明抽提总 RNA。取 2 μ g 总 RNA 为模板进行逆转录, 再以逆转录产物为模板进行 PCR 扩增。

1.4 表达质粒 pPIC9K-SKPI-His 的构建

回收后的 PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 与同样双酶切过的 pPIC9K-His 连接, 转化大肠杆菌 Top10F' 感受态细胞, 用含 Amp(100 μ g/mL) 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆。重组质粒经 *EcoR* I / *Bam*H I 双酶切鉴定后, 送 TaKaRa 公司测序鉴定。

1.5 重组质粒 pPIC9K-SKPI-His 的电转化及筛选

重组质粒 pPIC9K-SKPI-His 用 *Sal* I 线性化后, 经 BTX 电穿孔仪电击转化 GS115。酵母感受态的制备参照文献^[9]。电击条件: 电压 1500 V, 电容 50 μ F, 电阻 189 Ω 。电击后的酵母菌涂 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 放置 2~3 d。用 PCR 法筛选阳性转化子。

1.6 重组酵母的诱导表达与小量检测

挑取阳性酵母单菌落到 20 mL 的 BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养至 OD_{600} 达到 2~6, 离心后弃上清, 菌体重悬于 100 mL BMMY 培养基, 28 $^{\circ}$ C 250 r/min, 每 24 h 补加终浓度为 1%(V/V) 的甲醇。取诱导 48 h 和 72 h 的培养基 1 mL, 用台式离心机 12 000 g 离心 5 min, 上清用三氯乙酸(TCA)浓缩 10 倍后, 进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳。考马斯亮蓝染色和 Western blot 鉴定目的蛋白的表达, 鼠抗 6 \times His 的单克隆抗体为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠多克隆抗体为二抗, 用 NBT/BCIP 显色。

1.7 产物的纯化与鉴定

诱导后的培养基 1 L 离心后取上清, 借助蠕动泵自动上样, 用 Ni Sepharose High Performance 纯化蛋白。洗脱的样品装入截留分子量为 3 kD 的透析袋后, 放入 1 L 0.9% NaCl 溶液中, 4 $^{\circ}$ C 透析。透析后的样品进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳和蛋白质定量。

1.8 重组蛋白的活性鉴定

蛋白酶抑制活性鉴定主要参照文献^[10]。重点介绍测定胰蛋白酶抑制剂活性的方法, 操作如下: 取 3 个 1.5 mL 离心管, 分别加入 480 μ L 0.2 mol/L 三乙醇胺缓冲液 pH 7.8(内含 0.02 mol/L $CaCl_2$), 然后在 1 号离心管中加入 60 μ L 的 0.001 mol/L HCl 和 60 μ L 的 0.9% NaCl(空白组), 在 2 号离心管中加入 60 μ L 胰蛋白酶溶液(用预冷的 0.001 mol/L HCl 配制)和 60 μ L 的 0.9% NaCl(未抑制组), 在 3 号离心管中加入 60 μ L 胰蛋白酶溶液和 60 μ L 的 SKPI 溶液(抑制

组), 混匀后 25 ℃ 温育 5 min, 然后分别加入 300 μL 的 0.1%(W/V) BAPNA, 立即混匀并迅速倒入比色杯中, 测定 5 min 内的 $A_{405\text{nm}}$, 根据下列公式计算 SKPI

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\Delta A_{450\text{nm}} / \text{minute未抑制组} - \Delta A_{405\text{nm}} / \text{minute抑制组}}{\Delta A_{450\text{nm}} / \text{minute未抑制组} - \Delta A_{405\text{nm}} / \text{minute空白组}} \times 100$$

2 结果

2.1 阳性酵母转化子的筛选鉴定

pPIC9K-SKPI-His 用 *Sal* I 线性化后, 电转化 GS115 宿主菌, 涂布 MD 平板, 菌落 PCR 鉴定(引物 YSKPI-F/YSKPI-R)。鉴定结果见图 1, 阳性转化子可以扩增出约 200 bp 条带。

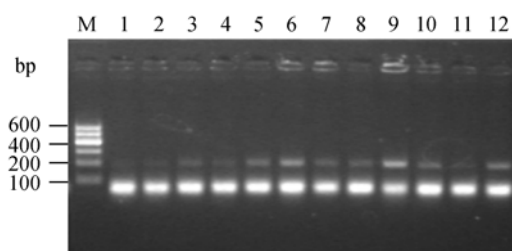


图 1 pPIC9K-SKPI-His 转化 GS115 后菌落 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of positive clones by PCR

M: DNA marker (100–600 bp);
1~12: 12 different clones tested by PCR

2.2 诱导后小量检测及 Western blot 结果

预计重组 SKPI 的分子量只有 8.7 kD, 用常规的 SDS-PAGE 电泳无法得到理想的电泳分辨率, 因此所有蛋白质电泳均采用 Tricine-SDS-PAGE 电泳系统。考马斯亮蓝染色结果显示(图 2), 诱导 48 h 后已出现一条明显的差异条带(图 2A), 且诱导 72 h 后差异条带表达量增加(图 2B)。Western blot 结果证明此差异条带即是 SKPI(图 3)。

2.3 纯化产物的 Tricine-SDS-PAGE 分析及定量

经 Ni Sepharose High Performance 纯化后, 得到约 4 mL 的样品, 用 Tricine-SDS-PAGE 进行分析, 结果表明纯化的 SKPI 达到了电泳纯(图 4)。PIERCE 蛋白质定量试剂盒测定样品的浓度为 400 μg/mL, 即表达产物的产率约为 1.5 mg/L 培养基。

2.4 重组蛋白的蛋白酶抑制剂活性分析

测试了重组蛋白对 3 种丝氨酸蛋白酶的抑制活性, 结果显示 SKPI 不能抑制蛋白酶 K 和枯草菌溶素, 但可以显著抑制胰蛋白酶的水解活性。通过改变

的抑制百分率。调整 SKPI 和胰蛋白酶的摩尔比, 绘制抑制曲线。

SKPI 和胰蛋白酶溶液的摩尔比(0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25), 证实 SKPI 属于单头抑制剂, 即一分子的 SKPI 可以结合一分子的胰蛋白酶(见图 5)。

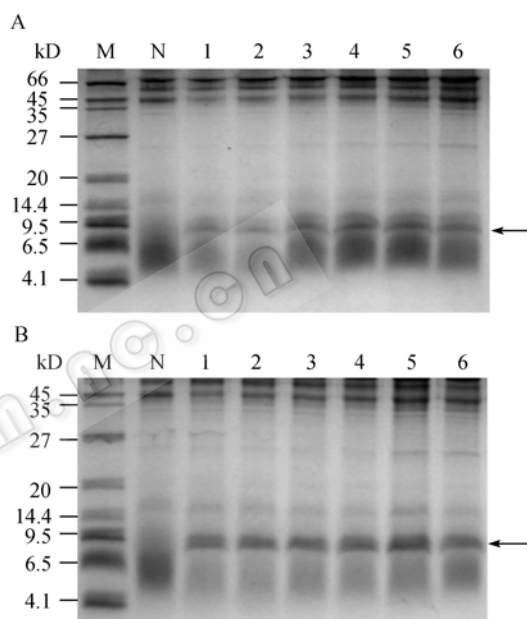


图 2 Tricine-SDS-PAGE

Fig. 2 Tricine-SDS-PAGE analysis

(A) induction with methanol for 48 h; (B) induction with methanol for 72 h. M: protein marker (4.1–66 kD); 1~6: recombinant *Pichia* strains with *skpi* gene; N: recombinant *Pichia* strain (no insertion)

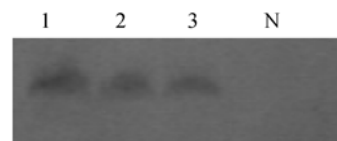


图 3 Western blot

Fig. 3 Western blot analysis

1~3: three samples (expression of recombinant *Pichia* strain with *skpi* gene); N: negative control (expression of recombinant *Pichia* strain without insertion)

3 讨论

由于目前缺乏稳定的虾细胞系且直接从虾体内分离蛋白的成本极高, 因而目的蛋白的获得依赖于体外的重组表达。本研究中, 最初使用过 pGEX-4T-2

和 pET-His 对 SKPI 进行原核表达, 但表达的重组蛋白全部以包涵体的形式存在, 最后利用毕赤酵母表达系统成功地对 SKPI 进行了分泌表达。从大体积培养基中纯化蛋白时, 我们使用了 Ni Sepharose High Performance, 和传统的 Ni 柱相比它具有更强的结合能力; 此外, 不需要和样品预先结合 1 h, 因此使用简易的装置即可利用蠕动泵自动上样, 大大节省了劳动力和缩短了纯化时间, 且获得了高纯度的目的蛋白, 使得相关的功能研究得以顺利开展。

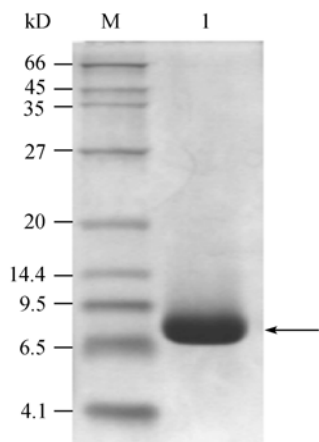


图 4 纯化产物的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of purified SKPI by Tricine-SDS-PAGE
M: protein marker (4.1–66 kD); I: the purified protein (SKPI)

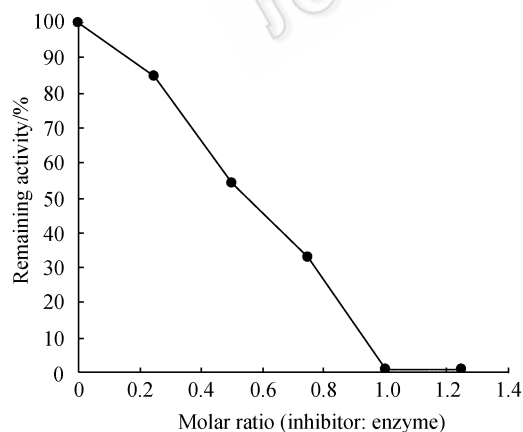


图 5 SKPI 抑制胰蛋白酶水解活性的抑制曲线

Fig. 5 Stoichiometry of the inhibition of trypsin by the purified SKPI

由于 SKPI 是由一个 Kunitz 结构域组成, 因此预测它具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性。通过初步的活性研究, 我们发现在摩尔比为 1:1 的条件下, 重组表达的 SKPI 能完全抑制胰蛋白酶的水解活性, 证实

SKPI 确实属于丝氨酸蛋白酶抑制剂; 同时发现 SKPI 不能抑制蛋白酶 K 和枯草菌溶素的水解活性, 说明 SKPI 的丝氨酸蛋白酶抑制活性具有一定的特异性。前期的 SSH 结果显示, 在受微生物胁迫的日本囊对虾中, *skpi* 基因的表达量显著增加^[1], 因而我们推测 SKPI 在日本囊对虾抵抗微生物感染的天然免疫过程中起着重要的作用。节肢动物的丝氨酸蛋白酶抑制剂一般被认为可能是通过抑制微生物的蛋白酶或是通过调节一些内源性的蛋白酶, 从而保护宿主免受病原的感染^[7]。目前, 我们正在开展一系列的研究工作, 旨在更全面、更深入地阐明 SKPI 在日本囊对虾天然免疫中的功能及作用机制。

REFERENCES

- [1] He NH, Liu HP, Xu X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, **17** (2): 121–128.
- [2] He NH, Qin QW, Xu X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, 2005, **66**(1): 39–45.
- [3] Kunitz M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 1945, **101**(2635): 668–669.
- [4] Kido H, Yokogoshi Y, Katunuma N. Kunitz-type protease inhibitor found in rat mast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263**(34): 18104–18107.
- [5] Stallings-Mann ML, Burke MG, Trout WE, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of a Kunitz-type proteinase inhibitor secreted by the porcine uterus. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269** (39): 24090–24094.
- [6] Milstone AM, Harrison LM, Bungiro RD, et al. A broad spectrum kunitz type serine protease inhibitor secreted by the Hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(38): 29391–29399.
- [7] Michael R. Kanost. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, **23**(4): 291–301.
- [8] Kido H, Okumura Y, Yamada H, et al. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, **13**(3): 403–412.
- [9] Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc, 1995.
- [10] Mitsudo K, Jayakumar A, Henderson Y, et al. Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 2003, **42**(13): 3874–3881.