

• 工业生物技术 •

肝素硫酸转移酶优化表达及其在动物源肝素硫酸化中的应用

周正雄^{1,2}, 王兵兵^{1,2}, 胥睿睿^{1,2}, 李青^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 康振^{1,2}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏, 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

周正雄, 王兵兵, 胥睿睿, 等. 肝素硫酸转移酶优化表达及其在动物源肝素硫酸化中的应用. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1784–1793.

Zhou ZX, Wang BB, Xu RR, et al. Optimized expression of heparin sulfotransferases and their application in sulfation of animal derived heparin. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1784–1793.

摘 要: 肝素是一种重要的凝血药物, 目前主要依赖于动物小肠粘膜的提取。动物源肝素含有的抗凝血活性五糖单位 GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S3S-Ido2S-GlcNS6S 少, 抗凝血活性低下。文中提出并验证了一种基于酶法催化动物源肝素, 提高其硫酸化程度和抗凝血活性的方法。通过比较 3 种硫酸转移酶肝素-2-硫酸转移酶 (Heparan sulfate-2-O-sulfotransferase, HS2ST)、肝素-6-硫酸转移酶 (Heparan sulfate-6-O-sulfotransferase, HS6ST)、肝素-3-硫酸转移酶 (Heparan sulfate-3-O-sulfotransferase, HS3ST) 在重组大肠杆菌及重组毕赤酵母中表达, 确定了毕赤酵母作为 3 种硫酸转移酶的表达宿主; 进一步通过 N 端融合麦芽糖融合蛋白 MBP 和硫氧还蛋白 TrxA, HS2ST 和 HS6ST 的酶表达水平分别提高至 (839±14) U/L 和 (792±23) U/L。通过 3 种硫酸转移酶 HS2ST、HS6ST 和 HS3ST 共同催化动物源肝素, 其抗凝血活性由 (76±2) IU/mg 提高至 (189±17) IU/mg。

关键词: 肝素, 抗凝血活性, 硫酸转移酶, 毕赤酵母, 异源表达

Optimized expression of heparin sulfotransferases and their application in sulfation of animal derived heparin

Zhengxiong Zhou^{1,2}, Bingbing Wang^{1,2}, Ruirui Xu^{1,2}, Qing Li^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, and Zhen Kang^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Heparin is a very important anticoagulant drug. Currently, heparin is mainly extracted from porcine mucosa. However, animal-derived heparin shows low anticoagulant activity due to the low proportion of the anticoagulant active unit,

Received: July 2, 2018; **Accepted:** September 6, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670092), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 1012050205181370).

Corresponding authors: Zhen Kang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

Guocheng Du. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: gcd@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31670092), 江南大学自主科研计划重点项目基金 (No. 1012050205181370) 资助。

网络出版时间: 2018-10-15

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181009.1318.001.html>

the GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S3S-Ido2S-GlcNS6S pentasaccharide. In this study we proposed an enzymatic strategy to sulfate the animal-sourced heparin to increase the proportion of anticoagulant pentasaccharide and the anticoagulant activity. First, three sulfotransferases HS2ST, HS6ST, and HS3ST were expressed tentatively in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. After measuring the sulfotransferase activity, we confirmed *P. pastoris* GS115 is the better host for sulfotransferases production. Then, the maltose binding protein (MBP) and thioredoxin (TrxA) were fused separately to the N-terminal of sulfotransferases to increase enzyme solubility. As a result, the yields of HS2ST and HS6ST were increased to (839 ± 14) U/L and (792 ± 23) U/L, respectively. Subsequent sulfation of the animal-sourced heparin with the recombinant HS2ST, HS6ST and HS3ST increased the anticoagulant activity from (76 ± 2) IU/mg to (189 ± 17) IU/mg.

Keywords: heparin, anticoagulant activity, sulfotransferase, *Pichia pastoris*, heterologous expression

肝素是一类由葡萄糖醛酸 (Glucuronic acid, GlcUA) 和 N-乙酰氨基葡萄糖 (N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) 经 β -1,4 和 α -1,4 糖苷键交替连接, 并经一定程度的硫酸化修饰而成的粘多糖^[1-2]。它广泛存在于细胞表面, 在细胞识别、信号传递、组织发育过程中起重要的作用^[3-4]。肝素的五糖结构 GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S3S-Ido2S-GlcNS6S 能与丝氨酸蛋白酶抑制剂 Antithrombin (AT) 结合、改变 AT 的结构并调控血液凝结, 因此, 在临床上肝素被用作手术后的抗凝血药物 (图 1)^[5-6]。

目前临床上使用的肝素多为从猪小肠等动物肠黏膜中提取得到。而超过 2/3 的动物来源的肝素活性单位 (小于 20 USP U/mg) 远低于医药级肝素活性单位的要求 ($120\sim180$ U/mg)^[7]。这是由于抗凝血活性特征结构单元占总结构单元的比例仅为 10% 左右^[8], 部分结构未被硫酸化或硫酸化程度偏低。单位质量的抗凝血活性较低导致临床使用过程中大量添加肝素容易诱导血小板减少、术后出血等并发症^[9-10]。因此, 提高肝素的硫酸化修饰程度可以降低使用剂量和感染并发症的风险。

以往研究往往关注于动物源肝素的组成、异源表达肝素合成的各种磺酸转移酶和变构酶以及这些酶催化反应机制。仅有陈敬华、陈萌、Fu 等^[11-13]证明通过异源表达的肝素 3-O-硫酸转移酶可以修饰动物源肝素并提高其抗凝血活性。

为了进一步提高动物源肝素的硫酸化程度以及抗凝血活性, 本研究在对动物源肝素二糖结构进行分析的基础上^[14], 通过优化肝素-2-硫酸转移酶 (Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase, HS2ST), 肝素-6-硫酸转移酶 (Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase, HS6ST), 肝素-3-硫酸转移酶 (Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase, HS3ST) 3 种硫酸转移酶, 建立了体外酶法催化动物源肝素, 提高其抗凝血活性的策略。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本实验所有的质粒构建都在 *Escherichia coli* JM109 中进行, 大肠杆菌重组菌株构建的出发菌株为 *E. coli* BL21, 毕赤酵母重组菌株构建的出发菌株为 *Pichia pastoris* GS115, 详情见表 1。

1.2 菌株构建

将密码子优化后的鸡来源 HS2ST (NP_989812.1)、HS6ST (NP_989813.1) 及老鼠来源 HS3ST (NP_034604.1) 经 PCR 扩增后 (所用引物见表 2), 酶切连接至 pET28a 建重组载体 pET28a-HS2ST、pET28a-HS6ST 和 pET28a-HS3ST。将来源于大肠杆菌的促融标签麦芽糖融合蛋白 (Maltose binding protein, MBP) 基因经 PCR 扩增后一步克隆至 pET28a-HS2ST、pET28a-HS6ST 构建重组质粒 pET28a-MBP-HS2ST 和 pET28a-MBP-HS6ST。

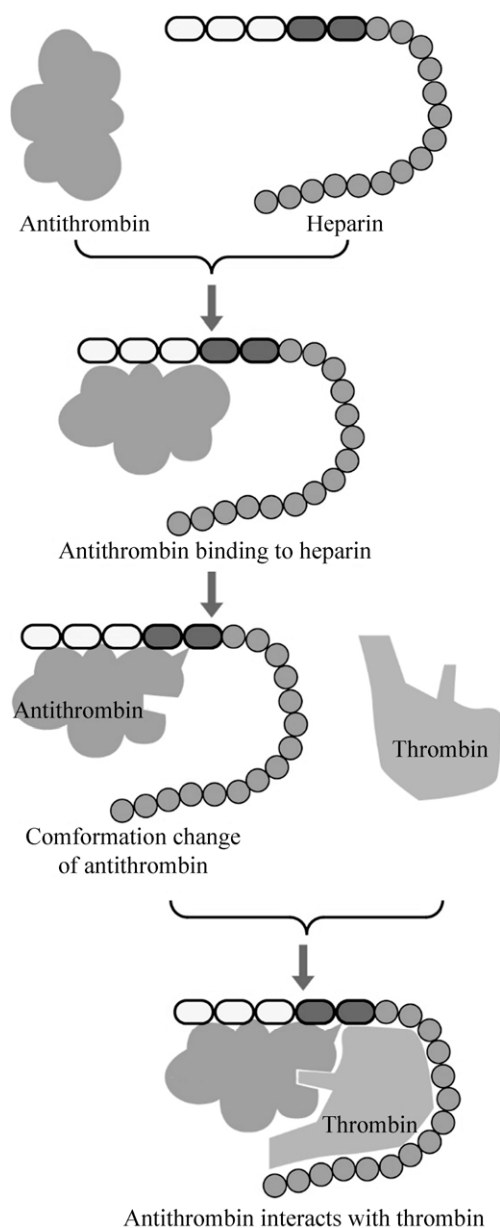


图1 肝素的抗凝血机理

Fig. 1 The anticoagulant mechanism of heparin. Binding of the pentasaccharide to antithrombin causes a conformational change in antithrombin that accelerates its interaction with thrombin. In addition, catalysis of antithrombin-mediated inactivation of thrombin requires the formation of a ternary heparin-antithrombin-thrombin complex.

将密码子优化后的鸡来源 HS2ST、HS6ST 及老鼠来源 HS3ST 经 PCR 扩增后, 酶切连接至 pPIC9k 构建重组载体 pPIC9K-HS2ST、pPIC9K-

HS6ST 和 pPIC9K-HS3ST。将来源于大肠杆菌的 MBP 及促进二硫键形成的硫氧还蛋白 (TrxA) 基因经 PCR 扩增后, 一步克隆至 pPIC9K-HS2ST 和 pPIC9K-HS6ST 构建重组质粒 pPIC9K-MBP-TrxA-HS2ST 和 pPIC9K-MBP-TrxA-HS6ST。

将 pET 系列的重组质粒 42 °C 热激 90 s 转化 *E. coli* BL21 构建硫酸转移酶的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21-pET28A-HS2ST、*E. coli* BL21-pET28A-HS6ST、*E. coli* BL21-pET28A-HS3ST、*E. coli* BL21-pET28A-MBP-HS2ST 及 *E. coli* BL21-pET28A-MBP-HS6ST 等。

将 pPIC9K 系列的重组质粒经 *Sal* I 酶切线性化后 1 500 V 电转 *P. pastoris* GS115 构建硫酸转移酶的重组毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-pPIC9K-HS2ST、*P. pastoris* GS115-pPIC9K-HS6ST、*P. pastoris* GS115-pPIC9K-HS3ST、*P. pastoris* GS115-pPIC9K-MBP-TrxA-HS2ST 及 *P. pastoris* GS115-pPIC9K-MBP-TrxA-HS6ST。

1.3 培养基组分

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 5, NaCl 5, 用于大肠杆菌的培养; TB 培养基 (g/L): 酵母粉 24, 蛋白胨 12, 甘油 4 mL, KH_2PO_4 2.31, K_2HPO_4 12.54, 用于大肠杆菌工程菌株的培养; YPD 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 用于毕赤酵母的培养; MD 培养基 (g/L): 琼脂 20, YNB 13.4, 生物素 4×10^{-4} , 葡萄糖 20, 用于重组毕赤酵母转化子的筛选; BMGY 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, K_2HPO_4 3, KH_2PO_4 11.8, YNB 13.4, 生物素 4×10^{-4} , 甘油 10 mL, 用于重组毕赤酵母的种子培养; BMMY 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 20, K_2HPO_4 3, KH_2PO_4 11.8, YNB 13.4, 生物素 4×10^{-4} , 甲醇 5 mL, 用于重组毕赤酵母的诱导培养。同时在培养基中根据质粒的抗性需要添加一定浓度的抗生素: 氨苄青霉素 100 mg/L, 卡那霉素 50 mg/L, 遗传霉素 4 mg/mL 等。

表 1 本文所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pET28a	Expression vector, <i>kan^R</i>	Lab stock
pET28a-HS2ST	pET28a containing HS2ST	This work
pET28a-HS6ST	pET28a containing HS6ST	This work
pET28a-HS3ST	pET28a containing HS3ST	This work
pET28a-MBP-HS2ST	pET28a containing MBP and HS2ST	This work
pET28a-MBP-HS6ST	pET28a containing MBP and HS6ST	This work
pPIC9K	Expression vector, <i>kan^R</i> , <i>Amp^R</i>	Lab stock
pPIC9K-HS2ST	pPIC9K containing HS2ST	This work
pPIC9K-HS6ST	pPIC9K containing HS6ST	This work
pPIC9K-HS3ST	pPIC9K containing HS3ST	This work
pPIC9K-MBP-HS2ST	pPIC9K containing MBP and HS2ST	This work
pPIC9K-MBP-HS6ST	pPIC9K containing MBP and HS6ST	This work
pPIC9K-MBP-TrxA-HS2ST	pPIC9K containing MBP, TrxA and HS2ST	This work
pPIC9K-MBP-TrxA -HS6ST	pPIC9K containing MBP, TrxA and HS6ST	This work
Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21	Expression host	Lab stock
<i>E. coli</i> BL21-pET28a-HS2ST	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a-HS2ST	This work
<i>E. coli</i> BL21-pET28a-HS6ST	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a-HS6ST	This work
<i>E. coli</i> BL21-pET28a-HS3ST	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a-HS3ST	This work
<i>E. coli</i> BL21-pET28a-MBP-HS2ST	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a-MBP-HS2ST	This work
<i>E. coli</i> BL21-pET28a-MBP-HS6ST	<i>E. coli</i> BL21 harboring pET28a-MBP-HS6ST	This work
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Expression host	Lab stock
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-HS2ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-HS2ST	This work
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-HS6ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-HS6ST	This work
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-HS3ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-HS3ST	This work
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-MBP-HS2ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-MBP-HS2ST	This work
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-MBP-HS6ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-MBP-HS6ST	This work
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-MBP-TrxA-HS2ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-MBP-TrxA-HS2ST	This work
<i>P. pastoris</i> GS115-pPIC9K-MBP-TrxA-HS6ST	<i>P. pastoris</i> GS115 harboring pPIC9K-MBP-TrxA-HS6ST	This work

1.4 重组菌株培养

1.4.1 重组大肠杆菌的培养

挑取单菌落接种于 50 mg/L 卡那霉素的 3 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 过夜培养。按 1% (V/V) 接种于新鲜的 50 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–1.0, 添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 培养 6 h 诱导重组蛋白的表达。

1.4.2 重组毕赤酵母的培养

重组毕赤酵母的培养参考毕赤酵母分泌表达手册 (A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression, Invitrogen)。

1.5 硫酸转移酶粗酶液制备

对于在大肠杆菌中进行胞内表达的重组硫酸转移酶的粗酶液获取主要由以下步骤组成: 1) 离心 5 min 收集菌体 (8 000×g, 4 °C); 2) 20 mmol/L

表 2 本文所用引物

Table 2 Primers in this study

Name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
H2(28a) F	CGCGGATCCGATGGTCCTAGACAAGAAGTTGC	<i>Bam</i> H I
H2(28a) R	GTGCTCGAGTTAATTAGATTTAGGATAAATTTTTTCATAGAAGAAATTTTG	<i>Xho</i> I
H6(28a) F	GTCGCGGATCCGCTTTTCGATATGAAAGGTGAAGATG	<i>Bam</i> H I
H6(28a) R	GTGCTCGAGTTACCACTTTTCAATAATATGAGACATGTAATCTTCAG	<i>Xho</i> I
H3(28a) F	TCGCGGATCCAAGGGTGGTACTAGAGCTTTGTTG	<i>Bam</i> H I
H3(28a) R	GTGCTCGAGTTAATGCCAATCAAAAGTTCTACCAACCAA	<i>Xho</i> I
H2(9K) F	CGCTACGTACACCACCACCACCACGATGGTCCTAGACAAGAAGTTGC	<i>Sna</i> B I
H2(9K) R	TGGCGGGCCGCTTAATTAGATTTAGGATAAATTTTTTCATAGAAGAAATTTTG	<i>Not</i> I
H6(9K) F	GCTACGTACACCACCACCACCACGCTTTTCGATATGAAAGGTGAAGATG	<i>Sna</i> B I
H6(9K) R	GTGGCGGGCCGCTTACCACTTTTCAATAATATGAGACATGTAATCTTCAG	<i>Not</i> I
H3(9K) F	GCTACGTACACCACCACCACCACCAAGGGTGGTACTAGAGCTTTGTTG	<i>Sna</i> B I
H3(9K) R	GTGGCGGGCCGCTTAATGCCAATCAAAAGTTCTACCAACCAA	<i>Not</i> I
MBP(28a-H2) F	CCATATGGCTAGCATGACTGGTGAATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGG	---
MBP(28a-H2) R	GCAACTTCTTGTCTAGGACCATCAGTCTGCGCGTCTTTCAGG	---
MBP(28a-H6) F	CCATATGGCTAGCATGACTGGTGAATGAAAATCGAAGAAGGTAAACTGG	---
MBP(28a-H6) R	CATCTTCACCTTTCATATCGAAAGCAGTCTGCGCGTCTTTCAGG	---
MBP(9K-H2) F	CTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGCACCACCACCACCACACAAAATCGAAGAAGGTAAACTGG	---
MBP(9K-H2) R	GCAACTTCTTGTCTAGGACCATCAGTCTGCGCGTCTTTCAGG	---
MBP(9K-H6) F	CTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGCACCACCACCACCACACAAAATCGAAGAAGGTAAACTGG	---
MBP(9K-H6) R	CATCTTCACCTTTCATATCGAAAGCAGTCTGCGCGTCTTTCAGG	---
TrxA(H2) F	CCTGAAAGACGCGCAGACTATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACG	---
TrxA(H2) R	GCAACTTCTTGTCTAGGACCATCGGCCAGGTTAGCGTCGAGG	---
TrxA(H6) F	CCTGAAAGACGCGCAGACTATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACG	---
TrxA(H6) R	CATCTTCACCTTTCATATCGAAAGCGGCCAGGTTAGCGTCGAGG	---

Underlines represent the restriction site.

Tris-HCl (pH 7.4) 洗涤菌体 2 次; 3) 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 重悬菌体至 $OD_{600}=20$; 4) 高压匀浆破碎细胞 (800 bar, 5 min); 5) 12 000×g 离心 20 min 收集上清测酶活及纯化。

对于在毕赤酵母中进行分泌表达的重组硫酸转移酶的粗酶液获取: 8 000×g、4 °C 离心 10 min 收集上清即为粗酶液。

1.6 重组蛋白的亲纯化

首先用 25 mL 溶液 A (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑) 平

衡 Ni-NTA 柱后上样过 0.22 μm 的粗酶液, 分别用 10%、40%、100% 的溶液 B (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑) 进行洗脱并收集相应的洗脱液。并对得到的洗脱液进行脱盐处理, 所用脱盐缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 脱盐柱为 G10。

1.7 硫酸转移酶酶活测定

硫酸转移酶酶活测定采用分光光度计检测对硝基苯酚的生成量^[15-16]。标准反应条件为 900 μL 的底物母液 (50 mmol/L PNPS, 0.5 mmol/L 3',5'-

二磷酸腺苷, 0.5 mg ASST IV 和 10 mg 肝素溶解在 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 中), 37 °C 预热 5 min 后加入 100 μ L 1 g/L 的硫酸转移酶液, 37 °C 反应 1 h 后加入 0.2 mL 10 mol/L 氢氧化钠溶液终止反应。12 000 \times g 离心 10 min 后去除沉淀, 400 nm 下测定酶联反应产生的对硝基苯酚的吸光值。一个硫酸转移酶的活性单位定义为在 pH 7.4、37 °C 条件下, 每小时释放 1 μ mol/L 对硝基苯酚所需要的酶量。对照反应为相同条件下加入等量已灭活的酶液。每个反应均做 3 个生物学重复, 取平均值为最终的酶活值。

1.8 酶法修饰肝素

在 1 mL 底物母液中, 单独或共同加入 300 μ g 硫酸转移酶, 37 °C 反应 48 h 后加入 100 μ L 10 mol/L NaOH 终止反应。

1.9 肝素二糖结构鉴定

取 100 μ L 的酶法修饰液, 加入 10 μ L 4 U/mL 的肝素裂解酶 I 和 4 U/mL 的肝素裂解酶 III, 37 °C 反应至 OD_{232} 吸光值不再增加, 12 000 \times g 离心 20 min 收集上清备测 LC-TOF-MS^[17]。LC 洗脱条件为 60 min 内甲醇浓度由 0 上升线性至 40%。MS 条件为在负离子模式下进行 100–900 m/z 扫描, 其中氮气为载气。

1.10 肝素抗凝血活性测定

肝素效价的测定方法参考中国药典《1208 肝素生物测定法》APTT 法^[18]: 取血浆 50 μ L 加入酶法修饰肝素反应液 50 μ L, 混合均匀, 加入 APTT 试剂 50 μ L, 37 °C 预热 3 min, 加入 50 μ L 25 mmol/L $CaCl_2$ 后立即用血液凝固分析仪测定凝结时间。每个反应均做 3 个生物学重复, 取平均值为最终的肝素效价。

2 结果与分析

2.1 硫酸转移酶的表达

为了研究不同宿主对硫酸转移酶表达的影响,

原核表达宿主 *E. coli* BL21 和真核表达宿主 *P. pastoris* GS115 作为两个代表性宿主表达来源于鸡和老鼠的硫酸转移酶。

以 *E. coli* BL21 为表达宿主时, 重组蛋白 HS2ST、HS6ST 在诱导性启动子 T7 的诱导下均以包涵体的形式存在 (图 2A、2B)。在两种硫酸转移酶的 N 端融合促融标签 MBP 后, 在重组 *E. coli* 胞内上清中有明显条带 (图 2C、2D), 此结果与文献报道一致^[19-20], 表明融合表达 MBP 有助于动物源基因在微生物细胞中的可溶表达。重组蛋白 HS3ST 在诱导性启动子 T7 的诱导下有清晰的可溶表达条带 (图 2D)。

以 *P. pastoris* GS115 为表达宿主时, 对 3 种硫酸转移酶进行分泌表达。在诱导性启动子 AOX 作用下, 重组 *P. pastoris* 胞外未见符合 HS2ST、HS6ST 大小的条带 (结果未展示), 这一点与在乳酸克鲁维酵母 *Kluyveromyces lactis* 中表达硫酸转移酶结果较为一致^[19]。鉴于在重组 *E. coli* 中融合 MBP 提高上述两种硫酸转移酶的可溶表达, 在 *P. pastoris* 中异源表达上述两种蛋白时也在 N 端融合 MBP, 得到了清晰的条带 (结果未展示)。同时, 根据在线预测网站 <http://disulfind.dsi.unifi.it/> 预测上述两种硫酸转移酶的二级结构表明分别存在 2 对、6 对二硫键。因此在 MBP 的 C 端、硫酸转移酶的 N 端融合 TrxA 促进二硫键的形成^[21]。由此在重组 *P. pastoris* 胞外发酵液上清中见到符合 MBP-TrxA-HS2ST (87 kDa)、MBP-TrxA-HS6ST (97 kDa) 大小的条带 (图 2E)。重组蛋白 HS3ST 在重组 *P. pastoris* 中, 以 AOX 为启动子时成功地实现了胞外的分泌表达 (图 2F)。

对于不容易电离的待测生物大分子蛋白, 经基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 鉴定上述条带均为目的条带。

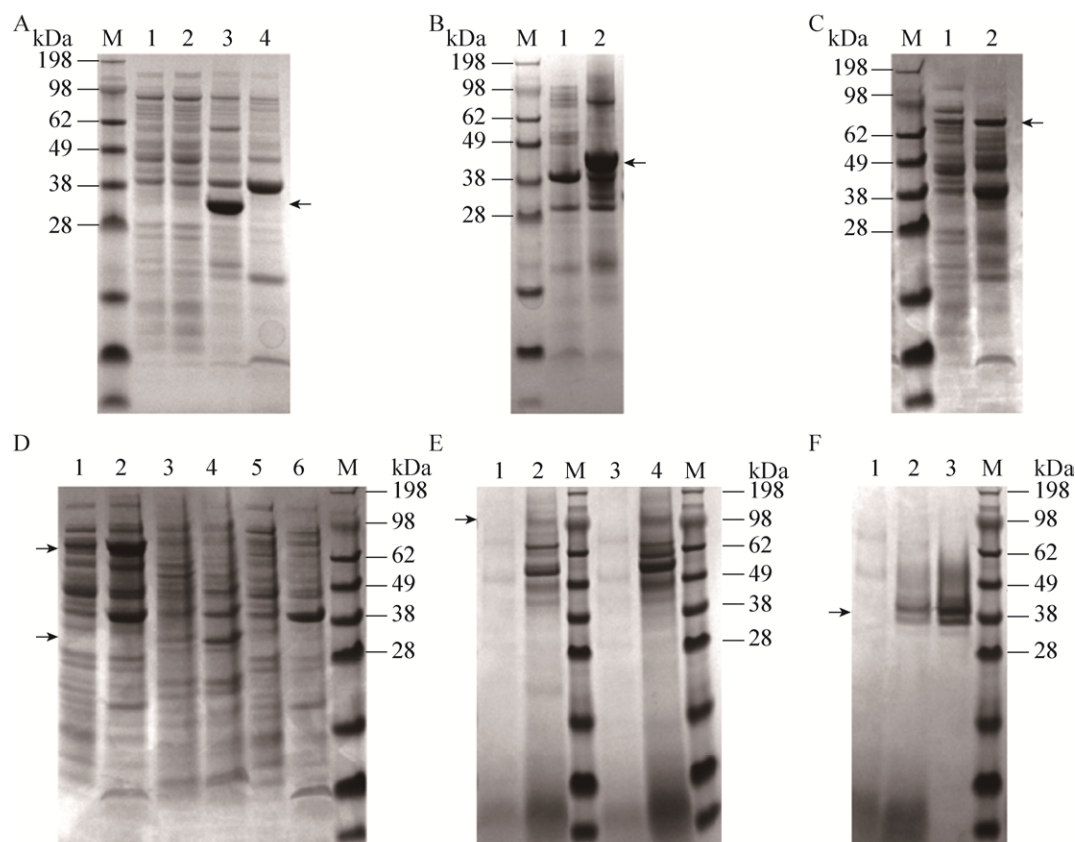


图2 硫酸转移酶异源表达蛋白胶图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of sulfotransferases expressed in *E. coli* and *P. pastoris*. (A) SDS-PAGE analysis of HS2ST expressed in *E. coli* BL21. M: marker; 1: supernatant of control; 2: supernatant of HS2ST; 3: precipitation of HS2ST; 4: precipitation of control. (B) SDS-PAGE analysis of HS6ST expressed in *E. coli* BL21. M: marker; 1: precipitation of control; 2: precipitation of HS6ST. (C) SDS-PAGE analysis of MBP-HS2ST. M: marker; 1: supernatant of control; 2: supernatant of MBP-HS2ST. (D) SDS-PAGE analysis of MBP-HS6ST and HS3ST expressed in *E. coli* BL21. 1: supernatant of control; 2: supernatant of MBP-HS6ST; 3: supernatant of control; 4: supernatant of HS3ST; 5: precipitation of control; 6: precipitation of HS3ST; M: marker. (E) SDS-PAGE analysis of MBP-TrxA-HS2ST and MBP-TrxA-HS6ST expressed in *P. pastoris* GS115. 1: supernatant of control; 2: supernatant of MBP-TrxA-HS2ST; 3: supernatant of control; 4: supernatant of MBP-TrxA-HS6ST; M: marker. (F) SDS-PAGE analysis of HS3ST expressed in *P. pastoris* GS115. 1: supernatant of control; 2: supernatant of HS3ST; 3: purified HS3ST; M: marker.

2.2 硫酸转移酶酶活测定

以重组 *E. coli* 胞内可溶表达得到的 MBP-HS2ST、MBP-HS6ST 及 HS3ST 和重组 *P. pastoris* 胞外分泌表达得到的 MBP-HS2ST、MBP-HS6ST、HS3ST 及 MBP-TrxA-HS2ST、MBP-TrxA-HS6ST 进行硫酸转移酶活性测定。以肝素为底物，通过偶联酰基磷酸转移酶 ASSTIV，在此过程中生

成的显色物质作为硫酸转移酶活性定量指标。其中 HS2ST 催化 IdoA 2 号位羟基硫酸化形成 Ido2S，HS6ST 催化 GlcNS 6 号位羟基硫酸化形成 GlcNS6S，HS3ST 催化 GlcNS6S 形成 GlcNS6S3S，从而形成抗凝血活性的核心五糖结构 GlcNS6S-GlcA-GlcNS6S3S-Ido2S-GlcNS6S。由图 3A 可见重组 *P. pastoris* 分泌表达的 MBP-

HS2ST、MBP-HS6ST、HS3ST 粗酶液酶活明显高于重组 *E. coli* 胞内表达的上述重组蛋白的酶活, 分别达到了 (321 ± 13) U/L、 (270 ± 8) U/L、 (749 ± 26) U/L。这也说明真核细胞更易于表达得到高活性的硫酸转移酶, 与在 *K. lactis* 中异源表达得到的硫酸转移酶活性高于 *E. coli* 中异源表达得到的硫酸转移酶酶活的结论一致^[19]。因此后续针对重组蛋白的改造都集中在重组 *P. pastoris* 中进行。

以 N 端融合伴侣分子 TrxA 的重组 *P. pastoris* MBP-TrxA-HS2ST、*P. pastoris* MBP-TrxA-HS6ST 的胞外上清粗酶进行催化反应得到上述两种粗酶液的酶活分别是 (839 ± 14) U/L 和 (792 ± 23) U/L, 比没有融合 TrxA 的重组 *P. pastoris* 胞外上清粗酶液酶活高 (图 3B)。因此, 几种硫酸转移酶共同催化肝素磺酸化修饰时采用重组 *P. pastoris* 分泌表达的 MBP-TrxA-HS2ST (比酶活 $(20\ 975 \pm 350)$ U/mg)、MBP-TrxA-HS6ST (比酶活 $(4\ 400 \pm 128)$ U/mg) 及 HS3ST (比酶活 (489 ± 17) U/mg)。上述硫酸转移酶在 *P. pastoris* 中异源表达得到的比酶活也大

于在 *K. lactis* 中异源表达得到比酶活^[19]。

2.3 肝素结构鉴定

经硫酸转移酶催化后的反应液通过阴离子交换树脂 DEAE 纯化后得到肝素改性样品。肝素裂解酶 I、III 共同作用于肝素改性样品得到分子量小于 2 000 Da 的肝素二糖。鉴于肝素二糖在中性及弱碱性条件下带负电荷, 因此通过 LC-TOF-MS 的负离子模式对得到的二糖结构及含量进行鉴定和计算 (图 4)。

经 MBP-TrxA-HS2ST 催化肝素后, Δ U2S-GINS 提高了 36% 至占总二糖结构的 16.3%, 经 MBP-TrxA-HS6ST 催化肝素后 Δ U2S-GINS6S 提高了 7% 至占总二糖结构的 62.0%, 经 HS3ST 催化肝素后, Δ U2S-GINS6S3S 提高了 115% 至占总二糖结构的 36.6%。MBP-TrxA-HS6ST 和 HS3ST 共同催化肝素时, Δ U2S-GINS6S3S 提高了 121% 至占总二糖结构的 37.6%; MBP-TrxA-HS2ST、MBP-TrxA-HS6ST 和 HS3ST 等 3 个硫酸化酶共同催化肝素时, Δ U2S-GINS6S3S 提高了 123% 至占总二糖结构的 37.9%。

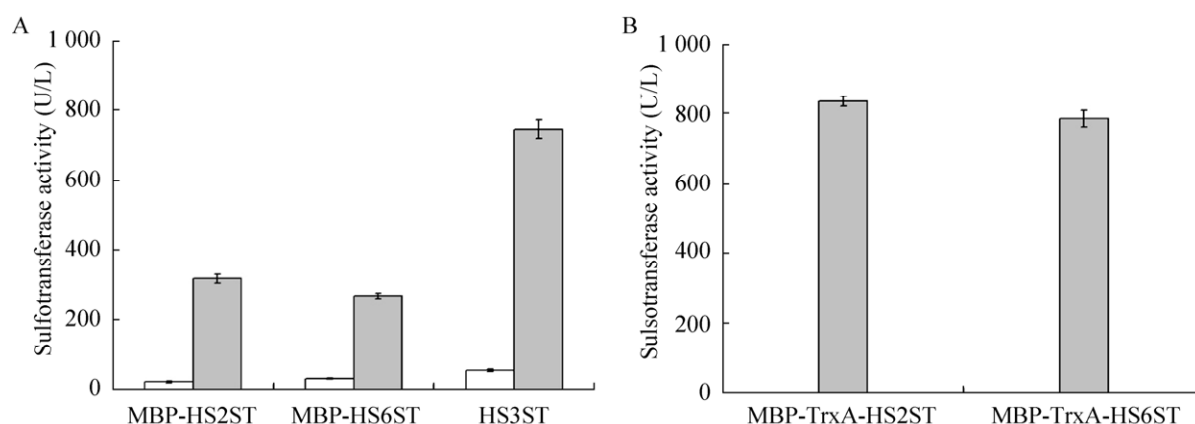


图 3 不同宿主异源表达硫酸转移酶的酶活差异

Fig. 3 Enzymes activities assay of sulfotransferases expressed in *E. coli* and *P. pastoris*. (A) Comparison of the enzyme activity between *E. coli* and *P. pastoris*-expressed sulfotransferases: □: *E. coli*; ■: *P. pastoris*. (B) The effect of TrxA on sulfotransferases activities.

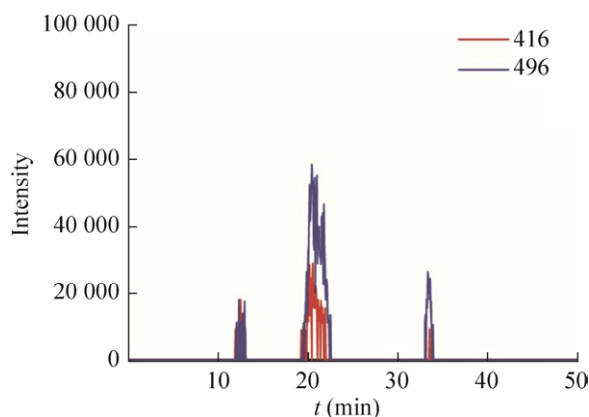


图4 肝素二糖结构解析

Fig. 4 The structure of heparin disaccharides.

2.4 肝素抗凝血活性测定

来源于动物肠黏膜组织提取的肝素经3种硫酸化酶催化改性后,由APTT法测定其抗凝血活性。结果表明通过HS3ST催化后,肝素抗凝血活性由 (76 ± 2) IU/mg提高至 (140 ± 8) IU/mg,高于2017年Fu等^[13]利用HS3ST催化牛小肠来源肝素提高肝素抗凝血活性至105 IU/mg;经MBP-TrxA-HS6ST及HS3ST催化后的肝素抗凝血活性达到

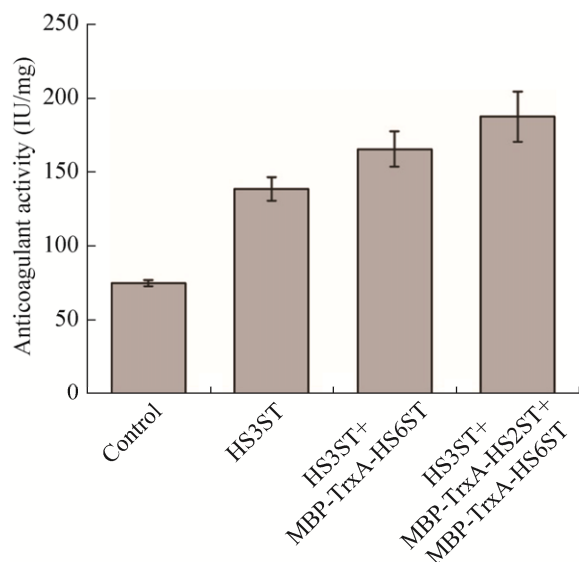


图5 酶法修饰对肝素抗凝血活性的影响

Fig. 5 Effect of sulfotransferases modification on heparin anticoagulant activity.

(167 ± 12) IU/mg; 由MBP-TrxA-HS2ST、MBP-TrxA-HS6ST及HS3ST共同催化的肝素抗凝血活性最高达到 (189 ± 17) IU/mg,近似国标及美国标准的肝素使用标准180 IU/mg(图5)。

3 结论

通过分析动物源肝素的二糖结构,我们证明了动物源肝素中大量糖残基未被硫酸化,导致其抗凝血活性低。本研究中,通过优化鸡HS2ST、HS6ST和老鼠HS3ST在重组*P. pastoris* GS115中的异源表达,建立了酶法催化动物源肝素硫酸化的策略。通过重组HS2ST、HS6ST和HS3ST催化后,动物源肝素的抗凝血活性提高至 (189 ± 17) IU/mg,达到临床使用标准。基于HS2ST、HS6ST和HS3ST多酶催化动物源肝素的策略为修饰动物源肝素提高其抗凝血活性提供了一条有效路径。

REFERENCES

- [1] Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*, 2002, 19(3): 312–331.
- [2] Kang Z, Zhou ZX, Wang Y, et al. Bio-based strategies for producing glycosaminoglycans and their oligosaccharides. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(8): 806–818.
- [3] Zulueta MML, Lin SY, Hu YP, et al. Synthetic heparin and heparan sulfate oligosaccharides and their protein interactions. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(6): 1023–1029.
- [4] Sasisekharan R, Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4(6): 626–631.
- [5] Liu HY, Zhang ZQ, Linhardt RJ. Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(3): 313–321.
- [6] Sinaý P. Synthetic chemistry: sugars slide into heparin activity. *Nature*, 1999, 398: 377–378.
- [7] Linhardt RJ. 2003 Claude S. Hudson award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J Med Chem*, 2003, 46(13): 2551–2564.

- [8] De Agostini AI, Dong JC, De Vantéry Arrighi C, et al. Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-*O*-sulfated chains with anticoagulant activity. *J Biol Chem*, 2008, 283(42): 28115–28124.
- [9] Kay R, Wong KS, Yu YL, et al. Low-molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 1995, 333(24): 1588–1594.
- [10] Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med*, 1995, 332(20): 1330–1336.
- [11] Chen JH, Liu WC, Wang M, et al. Enzymatic synthesis of high anticoagulant activity of low molecular heparin: CN, 201210172930.6. 2012-05-31 (in Chinese).
陈敬华, 刘卫超, 王敏, 等. 一种酶法制备高活性低分子量肝素的方法. 中国专利, 专利申请号: 201210172930.6. 2012-05-31.
- [12] Chen Y. A method for the improved anticoagulant of heparin: CN, 201810039595.X. 2018-01-16 (in Chinese).
陈荫. 一种提高肝素抗凝血活性的方法. 中国专利, 专利申请号: 201810039595.X. 2018-01-16.
- [13] Fu L, Li K, Mori D, et al. Enzymatic generation of highly anticoagulant bovine intestinal heparin. *J Med Chem*, 2017, 60(20): 8673–8679.
- [14] Volpi N, Cusmano M, Venturelli T. Qualitative and quantitative studies of heparin and chondroitin sulfates in normal human plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1243(1): 49–58.
- [15] Paul P, Suwan J, Liu J, et al. Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403(6): 1491–1500.
- [16] Zhou ZX, Li Q, Huang H, et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(6): 1561–1570.
- [17] Zhang ZQ, McCallum SA, Xie J, et al. Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(39): 12998–13007.
- [18] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 167–168 (in Chinese).
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 167–168.
- [19] Zhou XX, Chandarajoti K, Pham TQ, et al. Expression of heparan sulfate sulfotransferases in *Kluyveromyces lactis* and preparation of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. *Glycobiology*, 2011, 21(6): 771–780.
- [20] Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 1999, 8(8): 1668–1674.
- [21] Raje S, Thorpe C. Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. *Biochemistry*, 2003, 42(15): 4560–4568.

(本文责编 陈宏宇)