

重组人载脂蛋白 $AI_{\text{米兰变体}}$ 在大肠杆菌中的高效表达*

丁满生^{1,2} 马文峰¹ 张梅芳² 刘大涛³ 郭美锦¹

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)¹

(上海凯曼生物科技有限公司 上海 200233)²

(上海信谊药业有限公司药研所 上海 200234)³

摘要: 通过大肠杆菌表达系统来生产重组人载脂蛋白 AI_M (proapolipoprotein AI_M , proapo AI_M)。整个 proapo AI_M 基因被分成两个片断, 通过 RT-PCR 的方法合成。在对该基因的上游部分进行改造后, 插入到表达载体 pBV220 中进行表达。蛋白的表达量达到 45% 左右, 蛋白的表达形式为包涵体。包涵体通过疏水柱进行柱上复性, 复性后的蛋白具有良好的生物活性。

关键词: 载脂蛋白 AI , Milano, 包涵体, 疏水柱, 复性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0107-05

Over-expression of Proapolipoprotein AI_{Milano} in *Escherichia coli* *

DING Man-Sheng^{1,2} MA Wen-Feng¹ ZHANG Mei-Fang² LIU Da-Tao³ GUO Mei-Jin¹

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237) ¹

(Shanghai Comman Pharma. Co. Ltd, Shanghai 200233) ²

(Shanghai Sine Pharma. Co. Ltd, Shanghai 200234) ³

Abstract: To facilitate the mutation of Milano site, the whole proapo AI_M gene was divided to two fragments to synthesize by RT-PCR. The optimization of upstream gene sequence was carried out to improve proapo AI_M expression level in *E. coli*. After induction with a shift of temperature, yields of recombinant proapo AI_M achieved about 45 % of total cell protein and the recombinant proapo AI_M was expressed as a form of inclusion body in cells. The renaturation of protein was carried with a hydrophobic interaction column, the results showed that recombinant proapo AI_M had similar functional properties identical to those of native protein.

Key words: Proapolipoprotein AI , Milano, Inclusion body, Hydrophobic, Renaturation

成熟人载脂蛋白 $AI_{\text{米兰变体}}$ (apolipoprotein AI_{Milano} , apo AI_M) 是第一例报道的人载脂蛋白 AI 变异体 (Arg¹⁷³→Cys), apo AI_M 单体的分子量大约为 28kD 左右。与 apo AI 相比, apo AI_M 易形成二聚体形式 (A-IM/A-IM); 无脂状态下的 A-IM/A-IM 比正常的 apo AI 二聚体含有更多的 α -螺旋, 并且其三级结构的折叠程度更高。此外, A-IM/A-IM 激发胆固醇逆向转运的效率要比 apo AI 要高, 激发 LCAT 酶的能力较 apo AI 弱, 具有该突变蛋白的人群其心血管类疾病的发病率大大低于正常人群。当正常人的 apo AI 发生

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA217021)

国家重大科技专项 (No. 2002AA2Z3451)

作者还有: 庄英萍¹ 储炬¹ 龚邦强²

通讯作者 Tel: 86-21-64851967-215, E-mail: dingmansheng@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-10-19, 修回日期: 2004-11-22

点突变成成为 apo AI_M后, 其抑制动脉粥样硬化病变的特性和体外 t-PA 的活性大大增加, 因此 apo AI_M是一种新型的用于防治动脉粥样硬化血管病的药物^[1]。

但在利用大肠杆菌表达系统表达 apo AI_M的过程中, 其转录形成的 mRNA 和其合成的蛋白与 apo AI 一样, 在大肠杆菌中的稳定性比较差^[2]。在这篇文献中, 一种带有 λ - $P_R P_L$ 双启动子的载体 pBV220 被用来高效表达成熟 apo AI_M的蛋白原 proapo AI_M。proapo AI_M相比成熟 apo AI_M蛋白而言, 在蛋白 N 端多了 6 个氨基酸组成的多肽 (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln), proapo AI_M在人体内经过某种金属酶的切割形成成熟蛋白。有文献报道表明 proapo AI_M N 端的多肽能大大增强蛋白在大肠杆菌中的稳定性^[3]。另外使用 $P_R P_L$ 启动子, 外源蛋白在升温表达过程中容易形成包涵体, 本文在纯化过程中采用柱上复性的方法使其复性, 其结果表明一步纯化就可使蛋白恢复活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

表达载体 pBV220 以及大肠杆菌 DH5 α 由上海凯曼生物科技有限公司保藏; PCR-Kit 购于 TaKaRa 公司, 限制性内切酶、Taq 酶、T4DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶及 DNA 分子量标准分别购自 TaKaRa 公司、Promega 公司和晶美公司; PCR 引物由上海生化细胞研究所合成; 标准分子量蛋白购自 Fermentas 公司; 标准 apo AI 蛋白购自 Academy Bio-Medical 公司; t-PA 诊断试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司; 纯化系统 (AKTA Explore) 为 Amersham Biosciences 公司产品。

1.2 寡聚核苷酸引物的设计

通过分析整段 proapo AI 基因, 发现将 Val¹⁶² 进行改造 (GTC→GTC), 就可以在 proapo AI 基因中引入一个 *Sal*I 内切酶位点, 这样可以将整段基因分为两段来制备, 以方便对基因进行 Milano 定点突变。同时在设计上游引物时, 综合考虑大肠杆菌编码蛋白质密码子的偏好性以及 proapo AI_M起始翻译区 (Translation initiation region, TIR) 的 GC 含量, 在不改变氨基酸序列的前提下, 对该基因 N 端氨基酸的部分编码子的第 3 位摇摆碱基进行改造, 得到的两对引物序列如下:

上游引物 1: 5' GAA TTC ATG CG (G→T) CAT TTC TGG CA (G→A) CAA CA (T→C) GAA CC (C→G) CC (C→G) CAG 3';

下游引物 1: 5' GTC (C→G) AC GTG AGC ACG CGC ACC GTC ACG CAT CTC 3'。

上游引物 2: 5' GT (G→C) GAC GCG CTG CGT ACC CAC CTG GCT CCT TAC ACC GAC GAG CTG CGT CAG [] TTG 3',

↑

Milano 突变位点

下游引物 2: 5' GGA TCC TTA TCA CTG GGT GTT GAG CTT CTT GGT 3'。

1.3 目的基因的克隆

首先从人源细胞 HepG2 中提取总 RNA, 进行逆转录后, 以 cDNA 为模板, 分别以上述两对引物进行 PCR 扩增。将得到的 proapo AI_M基因的两个片段分别亚克隆到 pGEM-T 载体上, 然后转化入 DH5 α 宿主细胞, 培养后挑取菌落, 提取质粒进行限制性内切酶酶切鉴定, 再将酶切鉴定正确的重组质粒进行 DNA 序列测定。然后将正确的 cDNA 片段分别以 *Eco*RI/*Sal*I、*Sal*I/*Bam*HI 限制性内切酶分别从 pGEM-T 载体上切下, 再将

表达载体 pBV220 用 *EcoRI*/*Bam*HI 限制性内切酶消化后与 cDNA 片段进行拼装连接, 再转入感受态细胞 DH5 α , 进行酶切鉴定。具体感受态细菌的制备、连接产物的转化、重组子的筛选以及酶切鉴定等操作都参照分子克隆 (第三版)^[4]。

1.4 重组 proapo AI_M 的表达和鉴定

将鉴定正确的基因工程菌 DH5 α , 接种于 3 mL 的 LB 培养基中 (含 100 μ g/mL 氨苄青霉素), 在 30 $^{\circ}$ C 下摇床培养过夜。取过夜后的培养液按 2% 的比例接到装有 10 mL 新鲜 LB 培养基的摇瓶中, 在 30 $^{\circ}$ C 下摇床培养。当菌体密度 OD_{600} 达到 0.5 左右将培养温度从 30 $^{\circ}$ C 迅速升高到 42 $^{\circ}$ C 进行诱导, 诱导培养 4 h 后收集菌体, 用超声破碎后离心, 用 12% 的 SDS-PAGE 检测上清和沉淀, 确定蛋白是否是以包涵体形式表达。

1.5 表达产物的纯化及活性鉴定

将收集的菌体与配好的溶菌酶溶液 (1 mg/mL, 10 mmol/L Tris buffer, pH 8.0) 按 1 : 10 (w/v) 的比例混匀, 冰浴 0.5 h, 然后通过超声进行破碎。破菌结束后, 以 12,000 r/min 在 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 弃上清。用 0.5% Triton X-100 (v/v) 洗涤 3 次后, 将包涵体以 5 ~ 10 (w/v) 溶解于含 8 mmol/L urea 缓冲液中。包涵体的复性采用疏水柱 (HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP) 进行柱上复性, 控制流速为 1 mL/min, 洗脱后收集蛋白峰。进一步通过反相层析柱 (RESOURCE 15RPC 3 mL) 进行纯化, 柱子平衡液为 0.065% TFA 的水溶液, 洗脱液为 0.05% TFA 的乙腈, 控制流速为 2 mL/min。收集洗脱峰, 用 SDS-PAGE 进行分析。

Proapo AI_M 活性检测采用 t-PA 诊断试剂盒, 人源 apo AI 为标准品, 测定方法参照说明书。

1.6 工程菌的遗传稳定性和表达稳定性

从含 Amp 的 LB 平板上挑取单克隆, 接种至含 Amp 的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养至菌密度为 5×10^9 , 稀释 1×10^4 倍后, 接种至非选择性 LB 培养基, 生长 20 代 (12 h) 后, 转接至新鲜 LB 培养基, 继续培养 20 代, 依次类推。每隔 20 代均取培养物涂布在非选择性 LB 平板上, 30 $^{\circ}$ C 生长过夜后, 从每个平板上挑取 100 个菌落至含有 Amp 的选择性 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养, 计数长出的菌落数。从抗性平板上长出的单菌落中随意挑出 20 个进行诱导表达, 通过 SDS-PAGE 分析重组菌株的表达稳定性。

2 结果

2.1 目的基因的扩增和克隆

Proapo AI_M 两段基因片段经过 PCR 扩增后, 通过 0.9% 琼脂糖电泳可分别看见 490 bp 和 270 bp 处看见一清晰条带, 然后将正确的 cDNA 片段分别以 *EcoRI*/*Sall*、*Sall*/*Bam*HI 限制性内切酶分别从 pGEM-T 载体上切下, 再将表达载体 pBV220 用 *EcoRI*/*Bam*HI 限制性内切酶消化后与 cDNA 片段进行 3 段拼接后, 进行酶切鉴定, 插入大小与预计吻合 (图 1)。

2.2 目的蛋白的表达和纯化

经过 5 h 的表达后, 通过 SDS-PAGE 分析其含量达到 45% 左右。将收集的菌体进行破碎, 发现目的产物基本都在沉淀当中, 所以可以确认目的蛋白的表达形式为包涵体 (图 2)。经过疏水柱和反相柱纯化后, 出现单一条带 (图 3), 其纯度达到 98% 左右。

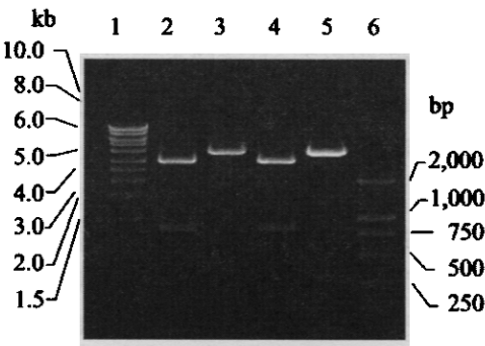


图 1 重组质粒酶切鉴定图谱

1、6 为 DNA 分子标准, 3、5 为重组质粒, 2、4 为重组质粒采用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切产物, 其中 2、4 切出了 760bp 正确插入基因片段

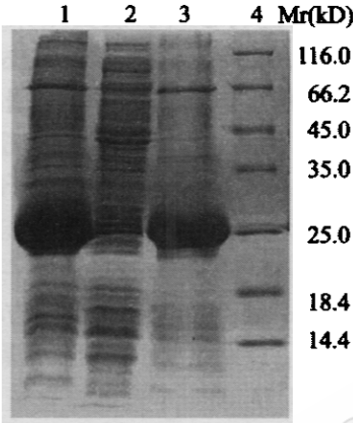


图 2 菌体破碎后的 SDS-PAGE 图谱

1 诱导后的菌体总蛋白, 2 破碎后的上清样品, 3 破碎后的沉淀样品, 4 标准分子量蛋白

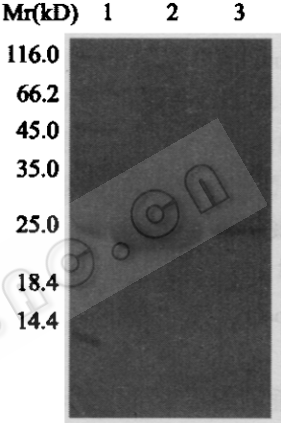


图 3 重组 proapo AI_M 的 SDS-PAGE 图谱

1 标准分子量蛋白, 2 疏水柱下来的 proapo AI_M, 3 反相柱下来的 proapo AI_M

2.3 重组蛋白活性检测

经检测人源 apo AI 的活性为 1.1×10^2 IU/mg, 重组人 proapo AI_M 的活性为 4.1×10^{-2} IU/mg。重组人 proapo AI_M 的活性高于人源 apo AI 的活性, 是由于 proapo AI_M 是 apo AI 的突变体, 其 t-PA 活性会大幅增加, 经疏水复性后, proapo AI_M 活性已经恢复。

2.4 工程菌的稳定性

传代 20、40、60、80、100、120、140 代次测定结果表明质粒稳定性为 100%。对抗性平板长出的 20 个单菌落的表达进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示所有 20 个工程菌均可以稳定表达 proapo AI_M, 具体表现在各工程菌菌株的表达产量及表达的 SDS-PAGE 蛋白条带模式无明显差异 (图略), 提示着工程菌具有良好的表达稳定性。

3 讨论

人 apo AI_M 在人血浆中的半衰期比人 apo AI 要长, 因此在治疗急性动脉粥样疾病上有更好的疗效。但根据目前的临床研究表明一个患者大概要注射 45mg 蛋白/kg 人体重^[5], 这个剂量比一般蛋白药物用量要大得多, 因此选择有效的方法来生产 apo AI_M 显得意义重大。然而如同 apo AI 一样, apo AI_M 在大肠杆菌中极其不稳定, 一般直接表达

apo AI_M往往很难在细胞中检测到。所以表达 proapo AI_M是本文的一个有效尝试,为了提高 proapo AI_M的表达量,综合考虑大肠杆菌编码蛋白质密码子的偏好性以及 proapo AI_M基因的 TIR 的 GC 含量,对蛋白 N 端氨基酸对应的碱基做了优化设计,使其表达量提高到 45% 左右,这是目前国内针对该蛋白在大肠杆菌中表达量最高的报道。

同时本文采用的表达载体 pBV220 已被用于多种重组蛋白的高效表达上^[6],但表达产物往往是包涵体形式,本文中 proapo AI_M的表达也不例外。包涵体复性的传统做法是稀释、透析或采用凝胶层析法,但是以稀释、透析法复性后形成的大体积蛋白溶液给后续纯化带来极大不便。凝胶层析法由于其柱本身的负荷相对有限,而且其复性周期也过长,故很少应用于大规模纯化过程中。我们采用了疏水层析的方法对包涵体进行复性。在复性过程中,疏水填料上的疏水基团从高盐溶液中吸附变性的 proapo AI_M蛋白,使其快速与变性剂分离。在复性过程中,同时完成了大部分杂蛋白和其他杂质的去除,一步纯化就可使蛋白恢复活性,且其收率可达 75%,这是其他复性方法无法达到的。整个复性过程在 30min 内完成,大大缩短了漫长的复性过程和操作周期,因此,本方法有良好的工业化大规模应用前景。

参 考 文 献

- [1] Calabresi L, Vecchio G, Longhi R, *et al.* J Biol Chem, 1994, **269** (51): 32168 ~ 32174.
- [2] Isacchi A, Sarmientos P, Lorenzetti R, *et al.* Gene, 1989, **81** (1): 129 ~ 137.
- [3] Moguilevsky N, Roobol C, Loriau R, *et al.* DNA, 1989, **8** (6): 429 ~ 436.
- [4] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] Nissen S E, Tsunoda T, Tuzcu E M, *et al.* JAMA, 2003, **290** (17): 2292 ~ 2300.
- [6] 陈宜顶, 闫长伟, 王连结, 等. 微生物学通报, 2003, **30** (5): 64 ~ 68.