

重组 hepcidin 的分离纯化及鉴定

朱亚平¹ 袁其朋¹ 张 怀²

(北京化工大学制药工程系 北京 100029)¹ (北京科技大学生物科学与技术系 北京 100083)²

摘要: 建立了重组 hepcidin 的分离纯化方法, 并鉴定其抗菌活性。经金属螯合初步纯化的重组蛋白在 cysteine/cystine 氧化还原体系中氧化形成二硫键, 用变性条件下的凝胶过滤除去多聚体, 稀释复性后用于肠激酶酶切反应, 得到重组 hepcidin。融合蛋白 His-hepcidin 经氧化、复性后的总收率为 50%, 纯度大于 95%。酶切后所得重组 hepcidin 经抑菌圈试验检验, 对枯草芽孢杆菌具有抗菌活性。LC-ESI-MS 与园二色光谱检测显示重组 hepcidin 与天然 hepcidin 相对分子质量相同、二级结构相似。

关键词: 重组 hepcidin, 二硫键, 复性, 纯化

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0129-05

Isolation, Purification and Identification of Recombinant Human Heparin

ZHU Ya-Ping YUAN Qi-Peng ZHANG Huai

(Department of Pharmaceutical Engineering, College of Life Science and Technology,
Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)¹

(Department of Biological Science and Technology, University of Science and
Technology Beijing, Beijing 100083)²

Abstract: Method of isolation and purification of recombinant hepcidin was described, and the bioactivity of the protein was assayed in this paper. The oxidation of his-hepcidin was carried out in the cysteine-cystine system, and the multimers were removed through gel filtration under denaturation condition. Then the protein was refolded by continuous dilution and digested by enterokinase. The total yield of his-hepcidin before enterokinase cleavage is 50%, and the purity is above 95%. Through agar diffusion assay, the recombinant hepcidin displayed obvious antibacterial activity against *B. subtilis*. The LC-ESI-MS analysis of recombinant hepcidin showed that the measured molecular weight accorded with the calculated molecular weight, and the CD spectrum indicated that the secondary structure of recombinant hepcidin is similar with native hepcidin.

Key words: Recombinant hepcidin, Disulfide bonds, Refolding, Purification

Hepcidin 是 2000 年发现的一个主要在肝脏表达的含有 8 个半胱氨酸的小分子多肽, 和许多富含半胱氨酸的抗菌肽类似具有显著的抗菌作用^[1,2]。然而随后的研究表明 hepcidin 是机体铁稳态调控途径中关键性的效应分子, 其主要生物学功能在于调节小肠细胞对于铁的吸收^[3]。Hepcidin 表达的缺乏会导致组织铁沉积, 而高表达 hepcidin 的转基因鼠则出现了严重的铁缺乏^[4,5]。因此, hepcidin 可能成为一种治疗机体铁代谢相关性疾病重要靶分子, 而且其本身对于防止遗传性血色病等铁负荷增多症具有重要的医疗应用

* 通讯作者 Tel: 010-64437610, E-mail: yuanqp@buct.edu.cn

收稿日期: 2005-10-09, 修回日期: 2005-12-02

价值。虽然 hepcidin 可从尿液中获得, 但尿液中 hepcidin 质量浓度仅为 $10 \sim 30 \mu\text{g/L}$ ^[2], 采用基因工程方法制备 hepcidin 将具有很大优势。

本实验室构建的人 hepcidin 融合表达载体 pET-hpc 在大肠杆菌中表达为包涵体, 融合蛋白 N 端带有 6 个组氨酸, 可通过金属螯合亲和层析 IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) 对表达的融合蛋白进行初步纯化^[6,7]。天然 hepcidin 分子内含有 8 个半胱氨酸形成的 4 对二硫键, 在 His-hepcidin 融合蛋白中, 所设计的 hepcidin N 端担体蛋白氨基酸序列中不含半胱氨酸残基, 担体序列不会参与二硫键的形成, 因此可以采用先氧化形成二硫键, 再用肠激酶切除 $6 \times \text{His-tag}$ 的方法制备 hepcidin 单体。本文对重组 hepcidin 的复性、纯化进行了研究, 并验证了重组 hepcidin 的抗菌活性, 为 hepcidin 的生产提供了新的方法。

1 材料

1.1 实验仪器

Waters PrepLC 制备液相色谱, Waters 2487 双波长紫外检测器, Bio-Rad Mini Protean 3 垂直电泳槽, LC-ESI-MS 液质联用仪 (Agilent 1100 HPLC, Thermo Finnigan LCQ DecaXP ion trap mass spectrometry), Jasco 810 偏振分光计 (Japan Spectroscopic)。

1.2 材料与试剂

Hepcidin 融合表达载体 pET-hpc 及大肠杆菌 BL21 (DE3) 为本实验室构建与保存, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 为北京化工大学微生物实验室提供。

Chelating Sepharose Fast Flow、Sepharose S-100 HR、Sephadex G-25 Fine、肽分子量标准蛋白均购自 Amersham Biosciences。

重组肠激酶购自杭州华东医药集团公司基因技术研究所。

Vydac C18 反相柱 (218TP54)。

2 方法

2.1 包涵体的制备与纯化

按文献 [6, 7] 的方法进行包涵体的制备与纯化。

2.2 氧化与复性

将 IMAC 纯化所得的 His-hepcidin 用氧化缓冲 (3 mol/L 尿素, 2 mmol/L 半胱氨酸, 0.1 mmol/L 胱氨酸, 25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 稀释至终浓度 $50 \mu\text{g/mL}$, 在室温条件下温和搅拌 60 h, 空气氧化形成二硫键。用 50 mmol/L Tris-HCl 平衡 Ni^{2+} -IDA-Sepharose 柱 ($1 \times 10 \text{ cm}$), 将氧化产物过柱吸附浓缩。用 8 mol/L 尿素, 300 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗脱吸附的蛋白。

分子间二硫键的错配会产生二聚体及多聚体, 可通过凝胶过滤去除氧化蛋白中的多聚体。用层析缓冲 (8 mol/L 尿素, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 平衡 Sepharose S-100 HR 凝胶过滤柱, 将浓缩蛋白上样, 以 0.46 mL/min 的流速洗脱。洗脱液在波长 280 nm 下检测, 收集单体组分。

收集到的单体组分蛋白采用连续稀释进行复性。用复性缓冲 A (4 mol/L 尿素, 100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH8.3) 将蛋白浓度调整为 $100 \mu\text{g/mL}$ His-hepcidin, 在 10 h 内用复性缓冲 B (100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH8.30) 连续

稀释到 2 mol/L 尿素, 50 μg/mL 蛋白。复性蛋白用 Ni²⁺-IDA-Sepharose 柱浓缩, 并用 2 mol/L 尿素, 300 mmol/L 咪唑洗脱。用 Sephadex G-25 柱 (1 × 12 cm) 将蛋白缓冲液更换为裂解缓冲 (2 mol/L 尿素, 50 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0), 即可用于肠激酶酶切。

2.3 酶切反应及反相纯化

单体蛋白中加入 2 mmol/L 的 CaCl₂ 后, 以 8U/mg 蛋白的比例加入肠激酶进行酶切反应, 切除融合蛋白的单体。混合物 37℃ 反应 16 h, 反应产物上样至 Ni²⁺-IDA-Sepharose 柱以去除 6 × His-tag。由于 hepcidin 分子内富含半胱氨酸, 也可被螯合树脂吸附。用 80 mmol/L 咪唑从螯合树脂上洗脱 hepcidin 后, 用于 Vydac C18 柱 (218TP54)。洗脱流速为 1 mL/min, 40min 内梯度从 100% 洗脱液 A (10% acetonitrile, 0.1% TFA) 线性升高至 100% 洗脱液 B (40% acetonitrile, 0.1% TFA)。洗脱液在波长 214nm 下检测。用 LC-ESI-MS 液质联用分析确定并验证 hepcidin 洗脱峰。将纯化后的蛋白洗脱液冷冻干燥后置于 4℃ 保存。

2.4 圆二色光谱

将纯化后的重组 hepcidin 溶于 pH 7.4 的 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液中, 蛋白浓度为 0.2 mg/mL, 从 185 nm 到 250 nm 以 1 mm 的光程测定重组 hepcidin 的圆二色光谱。

2.5 抗菌试验

用枯草芽孢杆菌和大肠杆菌 BL21 (DE3) 试验重组 hepcidin 的抗菌活性。将处于对数生长期的细菌细胞均匀涂布于 2 × YT 琼脂平板上, 将吸收有 20 μg 重组 hepcidin 的滤纸片置于平板上, 同时以吸收 20 μL 无菌水的滤纸片作为阴性对照。平板于 37℃ 培养 12 h, 观察抑菌圈生成情况。

3 结果

3.1 氧化 His-hepcidin 单体的分离

采用 cysteine/cystine 氧化还原体系对 His-hepcidin 融合蛋白进行氧化, 二硫键形成后所得到的单体蛋白可占总蛋白含量的 63%。在变性条件下通过凝胶过滤除去蛋白二聚体及多聚体 (图 1), 其中峰 1、2 为二聚体及多聚体蛋白吸收峰, 峰 3 为单体蛋白吸收峰。单体收率为 58.9%。Tricine-SDS-PAGE 结果显示氧化单体纯度大于 95%。

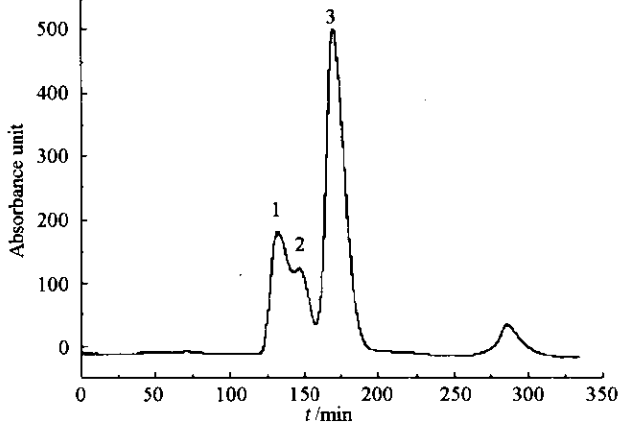


图 1 Sephacryl S-100 HR 凝胶过滤对单体蛋白的分离

His-hepcidin 融合蛋白经连续稀释复性后, 用 IMAC 浓缩, 咪唑洗脱所得收率为 85.1%。连续复性后的蛋白在 2mol/L 尿素中为完全可溶状态, 并且 2 mol/L 尿素对肠激酶活性没有影响。

3.2 肠激酶酶切反应及 hepcidin 纯化

酶切反应产物的 Tricine-SDS-PAGE 分析结果显示, 加入肠激酶 16 h 后融合蛋白消化完全 (图 2), 其中分子量较小的带为 hepcidin。Ni²⁺-IDA-Sepharose 吸附除去 His-tag 后, 用反相色谱纯化 hepcidin (图 3)。最终 5 mg His-hepcidin 可得 970 μg hepcidin。

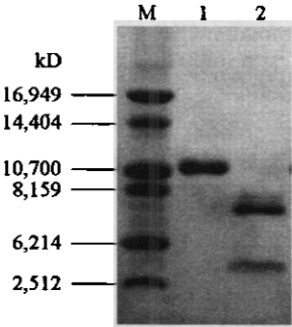


图 2 肠激酶对融合蛋白的切割

M 分子量标准, 1 融合蛋白, 2 肠激酶酶切产物

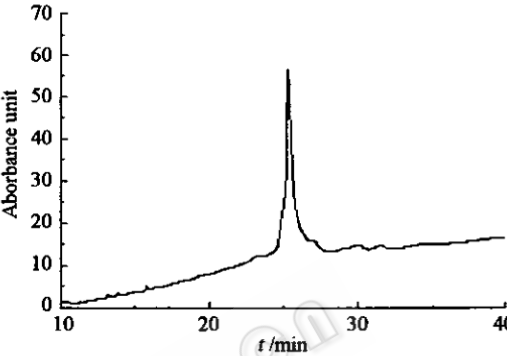


图 3 重组 hepcidin 的反相纯化

LC-ESI-MS 结果显示该峰分子量为 2789.0, 与理论计算的 hepcidin 分子量 2789.35 一致。RP-HPLC 中 hepcidin 只有一个峰, 但是可能存在二硫键不同配对的异构体 (图 4)。

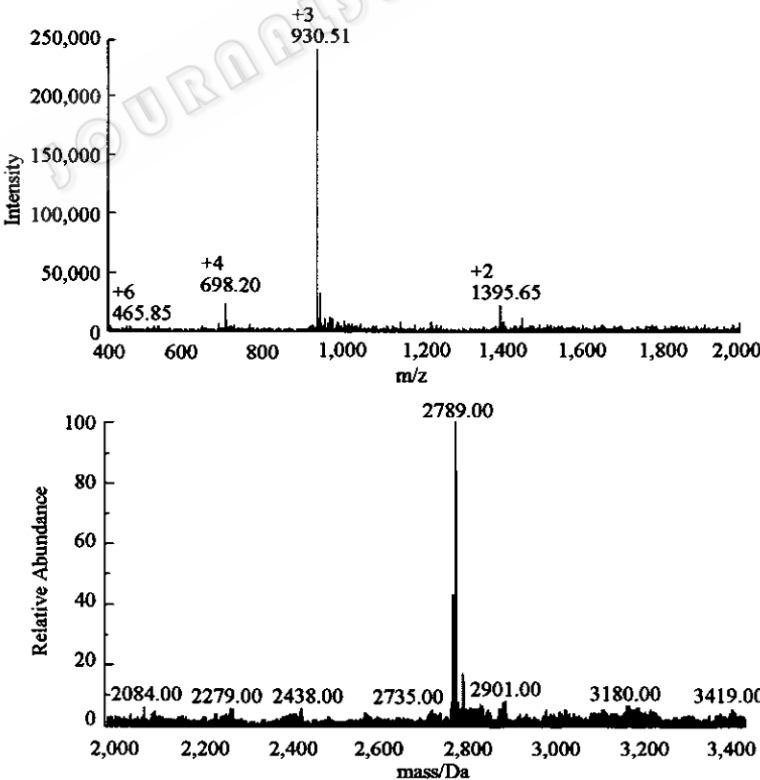


图 4 重组 hepcidin 的 ESI-MS 分析

重组 hepcidin 的圆二色光谱如图 5 所示, 结果显示蛋白二级结构含有 β -折叠与 β -转角。与 Park 等所测天然 hepcidin 谱图相似^[2], 表明了两者的二级结构的相似。

以抑菌圈试验测定重组 hepcidin 对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抗菌效果, 结果显示重组 hepcidin 对枯草芽孢杆菌有明显的抑菌作用 (图 6), 而对大肠杆菌无抗菌效果。测定的重组 hepcidin 抗菌能力与 Krause 等报道的结果一致^[8], 表明制备的重组 hepcidin 具有生物活性。

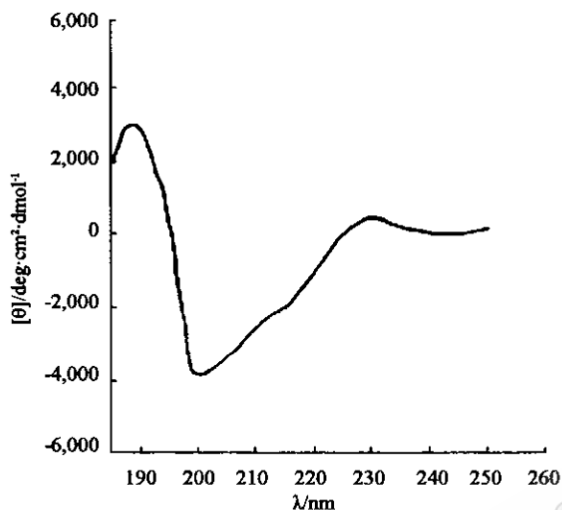


图 5 重组 hepcidin 的圆二色光谱

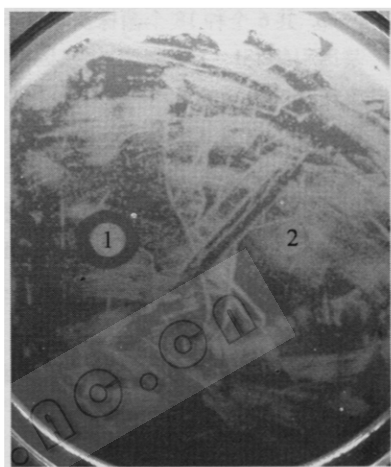


图 6 重组 hepcidin 对枯草芽孢杆菌的抗菌效果

1 Hepcidin, 2 水

4 讨论

通过重组载体表达的融合蛋白除 hepcidin 分子内的 8 个半胱氨酸外不含有其他半胱氨酸残基, 担体序列不会参与二硫键的形成, 因此在本实验中, 先将还原态的 His-hepcidin 氧化形成二硫键, 然后分离只形成了分子内二硫键的单体融合蛋白, 再切除担体蛋白。和先切除担体蛋白, 再氧化复性的方法相比, 这种方法可以节省 50% 价格昂贵的肠激酶。另外, 担体蛋白 N 端带有组氨酸标签, 在其切除之前, $6 \times \text{His}$ 的存在可使得融合蛋白的回收和浓缩十分方便。

Hepcidin 是一种铁调节激素, 同时它也具有抗菌活性。本实验通过基因工程菌表达的融合蛋白制备 hepcidin, 总收率为 50%, 所得蛋白纯度大于 95%, 经检测具有明显的抗菌活性, 为 hepcidin 的生产提供了新的方法。

参考文献

- [1] Krause A, Neitz S, Magert H J, *et al.* FEBS Lett, 2000, **480**: 147 ~ 150.
- [2] Park C H, Valore E V, Waring A J, *et al.* J Biol Chem, 2001, **276** (11): 7806 ~ 7810.
- [3] Fleming R E, Sly W S. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (15): 8160 ~ 8162.
- [4] Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (15): 8780 ~ 8785.
- [5] Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (7): 4596 ~ 4601.
- [6] 张 怀, 袁其朋, 朱亚平, 等. 中国生物工程杂志, 2005, **25** (3): 44 ~ 48.
- [7] 张 怀, 袁其朋, 朱亚平, 等. 北京化工大学学报, 2005, **32** (5): 26 ~ 30.
- [8] Krause A, Neitz S, Magert H J, *et al.* FEBS Lett, 2000, **480**: 147 ~ 150.