

# 双顺反子翻译偶联表达载体的构建及蚓激酶基因 F238 在大肠杆菌中的可溶性表达

黎明\* 宋馨宇 王晓娟 刘建军 张建中 刘萌 黄云雁

(天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室 工业酶国家工程实验室 天津 300457)

**摘要:** 为了实现外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达, 利用硫氧还蛋白作为分子伴侣构建双顺反子翻译偶联表达载体 pDICT。将大肠杆菌硫氧还蛋白基因插入到 pET22b 载体 *Nde* I 和 *Eco*R I 位点之间, 同时在硫氧还蛋白编码基因的终止密码子前加入核糖体结合位点, 构建成双顺反子翻译偶联表达载体 pDICT。将蚓激酶基因 F238 克隆到该载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)并诱导表达。SDS-PAGE 结果表明, 所表达的蚓激酶 F238 是可溶性蛋白。利用血纤维蛋白法对表达产物进行活性测定, 重组蚓激酶 F238 不仅具有纤溶酶活性, 而且具有激活纤溶酶原的激酶活性。该双顺反子翻译偶联表达载体的构建, 为在大肠杆菌中可溶性表达外源蛋白提供了新方法。

**关键词:** 蚓激酶, 分子伴侣, 双顺反子, 可溶性表达

## Construction of translation-coupled bicistronic expression vector and soluble expression of lumbrokinase F238 in *E. coli*

LI Ming\* SONG Xin-Yu WANG Xiao-Juan LIU Jian-Jun ZHANG Jian-Zhong  
LIU Meng HUANG Yun-Yan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, National Engineering Laboratory for Industry Enzyme, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In order to express soluble foreign proteins in *E. coli*, a bicistronic translation-coupled expression vector pDICT was constructed by using thioredoxin as a molecular chaperone. In this study, the expression vector pDICT was built by inserting thioredoxin gene into the pET22b vector between *Nde* I and *Eco*R I sites, and adding ribosome binding site before the stop codon of thioredoxin. Lumbrokinase gene F238 was cloned into this vector, and transformed into *E. coli* BL21(DE3), then the recombinant protein was induced by IPTG. SDS-PAGE results showed that the Lumbrokinase F238 was

基金项目: 天津市教委基金项目(No. 20040805); 天津科技大学自然科学基金项目(No. 118099)

\* 通讯作者: Tel: 86-22-60601958; ✉: liming09@tust.edu.cn

收稿日期: 2010-12-02; 接受日期: 2011-02-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

soluble expressed. The fibrinolytic activity was measured by using artificial fibrin plates, and the result indicated that Lumbrokinase could directly dissolve fibrous protein, and also had fibrinokinase activity which could indirectly dissolve fibrous protein. Construction of the bicistronic translation-coupled expression vector provides a new method to achieve soluble expression of heterologous proteins in *E. coli*.

**Keywords:** Lumbrokinase, Molecular chaperones, Bicistronic, Soluble expression

蚓激酶(Lumbrokinase, LK)是一类具有纤维蛋白溶酶和类似组织型溶酶原激活物活性的多组分酶类。1983年 Mihara<sup>[1]</sup>等应用现代分离手段从蚯蚓蛋白粗提物中首次分离,并命名为“蚓激酶”。蚓激酶既可以直接溶解纤维蛋白,又可以激活纤溶酶原,间接溶解纤维蛋白,现在已经制成口服胶囊,作为一种新型溶栓药物应用于临床<sup>[2]</sup>。目前所用蚓激酶均是从蚯蚓体内提取的蛋白质混合物,不仅提取过程繁杂,而且含有一些不必要的蛋白组分,同时还受蚯蚓生长周期的影响,因此研究蚓激酶的新生产方法势在必行。

近年来,国内外已陆续尝试通过基因工程的方法开发蚓激酶。Sugimoto M<sup>[3]</sup>、赵明明<sup>[4]</sup>等在毕赤酵母中成功表达出了蚓激酶,表达产物的纤溶活性与天然形式的酶并无差异,但表达量却特别低。已有多位学者<sup>[5-6]</sup>尝试在大肠杆菌系统中表达蚓激酶基因,产物均为包涵体。大肠杆菌表达系统是一个广泛运用的表达系统,能够在较短时间内获得基因表达产物,而且所需成本相对较低廉,但外源基因在大肠杆菌中表达时多肽链通常无法折叠成正确构象,形成没有活性的包涵体。常规的方法是将包涵体变性、复性,然后才能获得有活性的重组蛋白,这种方法复性困难而且收率很低。还有研究<sup>[7-10]</sup>构建含有分子伴侣的融合表达载体,帮助外源蛋白的正确折叠,但是,最后必须将融合标签除去,增加了生产成本。

本研究在目的基因上游连接一个硫氧还蛋白-1(Thioredoxin-1, TrxA)基因作为分子伴侣,并在 *trxA* 的终止密码子前加入核糖体结合位点 RBS 2,构建成双顺反子翻译偶联表达载体 pDICT,并通过密码子的重叠实现翻译偶联,这样分子伴侣既可以帮助表达的外源蛋白质的正确折叠,又不会融合到外源蛋白。利用该载体研究蚓激酶在大肠杆菌表达体系

中的表达情况,证明该方法可以实现蚓激酶 F238 的可溶性表达,而且没有融合分子伴侣 TrxA,减少了除去分子伴侣的过程。该双顺反子翻译偶联表达载体的构建,为其他外源蛋白在大肠杆菌中的非融合的可溶性表达提供了新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:** 含蚓激酶基因的重组质粒 pPIC9-F238、含有硫氧还蛋白基因的重组质粒 pT-Trx、大肠杆菌表达载体 pET22b、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  及表达宿主菌 BL21(DE3)均为天津科技大学微生物实验室保藏。

**1.1.2 主要试剂:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、IPTG 等购自 TaKaRa (大连)公司,十二烷基磺酸钠、考马斯亮蓝 R-250 均购自 Sigma 公司,纤维蛋白原、凝血酶均购自中国药品生物制品检定所,其它化学试剂或生物制剂均为分析纯或电泳纯。

### 1.2 引物设计及 PCR

根据硫氧还蛋白-1 基因 *trxA* 和蚓激酶基因 *f238* 成熟肽及 pET22b 的特征和酶切位点,设计引物(表 1)并委托 TaKaRa (大连)公司合成: 引物 TrxF、TrxR 用于扩增硫氧还蛋白-1 基因 *trxA*。引物 TrxF 加入了 *Nde* I 酶切位点(下划线表示),引物 TrxR 除加入了 *Eco*R I 酶切位点外,还加入了核糖体结合位点 RBS 2(方框表示)和 *Bam*H I 酶切位点(斜体表示)。引物 LKF'和 LKR 用于扩增蚓激酶基因 *f238* 的成熟肽,为了连接到 pET22b,分别加入了 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点。引物 LKF 和 LKR 用于扩增蚓激酶基因 *f238* 的成熟肽,为了连接到 pDICT,分别加入了 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点。

### 1.3 表达载体 pET22b-F238 重组质粒的构建

以质粒 pPIC9-F238 为模板,将 LKF 和 LKR 扩

增出的蚓激酶成熟肽基因 *f238* 与 pET22b 质粒同时经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切产物经回收后连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布含有 Amp 抗性的 LA 培养基筛选阳性转化子, 提取阳性转化子质粒进行 PCR 和酶切鉴定。再将鉴定正确的质粒进一步测序检验, 充分证实表达载体 pET22b-F238 构建成功。

表 1 本文所用引物 Table 1 Primers used in this paper		
Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)
TrxF	CGCCATATGAGCGATAAAATTATTA TTCACCTG	33
TrxR	TTGAATTCTCTCTTA)CCGGATCCCGC CAGGTAGCGTCGAGGAAC	46
LKF	GGGAATTCTAATGATCGTTGGTGGC ATTGAAGCCAGACCATAC	43
LKF'	GGCATATGATCGTTGGTGGCATTGA AGCCAGACCATAC	38
LKR	CCAAGCTTCTATTAGTTGTTGGTGA TAGTGTCGGTGATC	39

1.4 大肠杆菌双顺反子表达载体 pDICT 的构建

用引物 TrxF 和 TrxR 从 pT-Trx 质粒中扩增出硫氧还蛋白-1 基因 *trxA*, 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切回收后与同样双酶切回收的 pET22b 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 通过 Amp 抗性平板筛选阳性转化子, 提取阳性转化子质粒进行 PCR 和酶切鉴定。将鉴定后的质粒测序, 进一步验证 ORF 和酶切位点的正确性。验证正确的重组质粒即大肠杆菌双顺反子表达载体命名为 pDICT。

1.5 表达载体 pDICT-F238 重组质粒的构建

用引物 LKF 和 LKR 从质粒 pPIC9-F238 中扩增出蚓激酶的成熟肽基因 *f238*, *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切回收后连接到同样酶切的 pDICT 质粒中, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。挑阳性转化子质粒进行酶切和测序验证, 验证正确的质粒即表达载体 pDICT-F238。

1.6 高效表达 F238 的大肠杆菌工程菌的构建及重组 F238 的诱导表达

表达载体 pET22b-F238、pDICT-F238 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取阳性转化子进行诱导表达。挑阳性转化子接种 LB 培养基, 37 °C 培养过夜, 然后将重组菌按 1:100 接种于 20 mL 含有 50 mg/L Amp 的 LB 培养液, 振荡培养至 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.6–1.0, 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 °C 诱导表达 4 h。

分别以质粒 pDICT、pET22b 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 进行诱导表达作为对照。

诱导表达的菌液 1 mL, 离心收集菌体, 进行全菌体的 SDS-PAGE 分析。再取剩余菌液 1 mL, 离心收集菌体, 用 PBS buffer (pH 8.0)将菌体重悬, 冰浴, 超声破碎菌体, 14 000 r/min 离心 15 min 后分别取上清和沉淀(沉淀用 PBS buffer 洗涤 3 次), 部分进行 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达。

1.7 纤溶活性的测定

依照 Astrup 法<sup>[11]</sup>并稍加改进制作标准曲线。制作标准曲线时, 将浓度为 5、10、20、40、60、80、100 U/mL 的尿激酶标准品各 10  $\mu$ L 点样于纤维平板上, 放置 10 min, 移入 37 °C 培养箱, 保温 18 h 后取出。测量溶圈直径, 通过指数回归得到方程  $Y=0.105\ 2e^{4.013x}$ ,  $R^2=0.996\ 5$ ; *Y* 代表酶活力, 以 U/mL 表示; *X* 为溶圈直径, 单位为 cm。

参照陈飞<sup>[12]</sup>等人的方法, 分别制备加热(80 °C, 30 min) 和不加热两种琼脂糖-纤维蛋白平板。取诱导表达后进行超声后的上清和沉淀(沉淀用 PBS Buffer 悬浮)各 10  $\mu$ L, 分别加样于加热和不加热两种纤维蛋白原平板上, 置 37 °C 保温 18 h。通过测溶圈直径, 检验上清液和沉淀物的蚓激酶活力。

2 结果

2.1 表达载体 pET22b-F238 重组质粒的构建及鉴定

构建的重组质粒 pET22b-F238 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经 Amp 平板筛选得到转化子, 小提质粒, 经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切验证, 结果如图 1 所示, 得到 2 条条带, 大小分别对应于 pET22b 载体 5.5 kb 和目的基因 0.717 kb, 与预期值大小相符。

2.2 大肠杆菌双顺反子表达载体 pDICT 的构建

通过 PCR 从 pT-Trx 质粒中扩增出约 330 bp 的硫氧还蛋白-1 基因 *trxA*, 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切回收后插入到 pET22b 的 *Nde* I 和 *Eco*R I 位点之间, 构建出双顺反子翻译偶联表达载体 pDICT(图 2)。经过转化、酶切鉴定和测序, 序列正确, 阅读框架也正确, 表明表达载体构建成功。为了基因操作方便和实现翻译偶联, 在 *trxA* 序列末端加入了 *Bam*H I

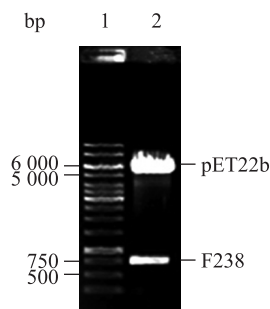


图 1 重组质粒 pET22b-F238 的鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid pET22b-F238

注: 1: 核酸分子量标准; 2: pET22b-F238 经 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切结果.

Note: 1: DNA Marker; 2: pET22b-F238/*Nde* I+*Hind* III.

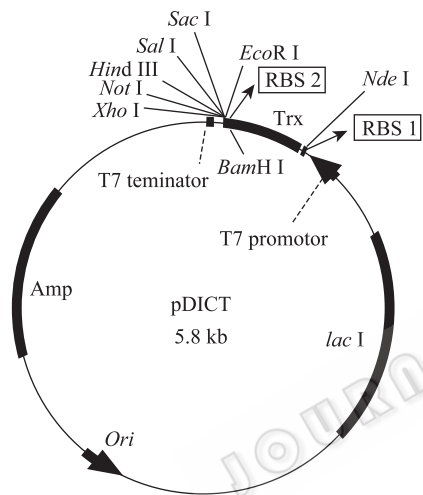


图 2 双顺反子翻译偶联表达载体 pDICT

Fig. 2 Bicistronic translation-coupled expression vector pDICT

酶切位点和核糖体结合位点 RBS 2 (图 3), 终止密码子 TAA 和目的基因起始密码子 ATG 重叠, 保证目的基因的表达。

2.3 表达载体的构建及重组子的鉴定

以含蚓激酶基因的重组质粒 pPIC9-F238 为模板, PCR 扩增蚓激酶基因 F238, 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切回收后与 pDICT 连接, 构建表达载体 pDICT-F238。连接产物转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆, 质粒小提后, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳检测得到一条大小为 5–6 kb 和一条 750 bp 的片段(图 4), 大小分别对应于空载体 5.8 kb 和目的基因 717 bp。进一步测序表明基因序列及阅读框架均正确, 证明表达载体 pDICT-F238 构建成功。为了翻译偶联, F238 的起始密码子和 *trxA* 的终止密码子重叠(图 3)。

2.4 高效表达 F238 的大肠杆菌工程菌的构建及重组 F238 的诱导表达

分别将表达载体 pET22b-F238、pDICT-F238 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取阳性转化子进行诱导表达; 并同时将 pET22b、pDICT 转化大肠杆菌 BL21(DE3)作为对照, 对比分子伴侣对蚓激酶表达的影响。37 °C 诱导表达 4 h, 收集诱导表达的菌体, 分别以全菌体、菌体破碎后的上清部分和沉淀部分进行 SDS-PAGE (分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%)检测, 图 5 为 SDS-PAGE 检测 BL21/pET22b-F238 表达蚓激酶结果, 图 6 为 BL21/pDICT-F238 表达结果。

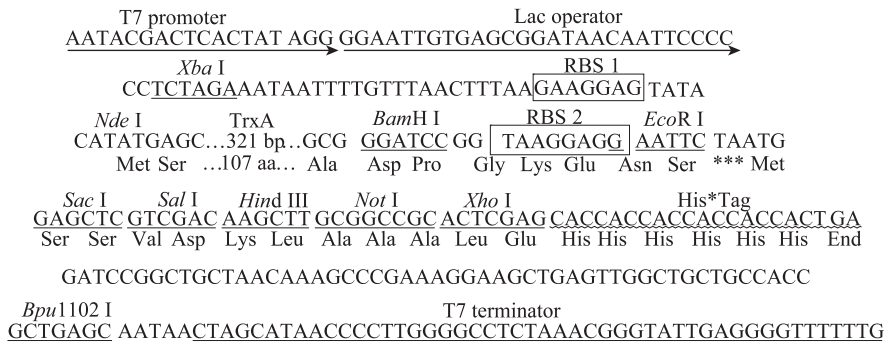


图 3 pDICT 多克隆位点

Fig. 3 Multiple cloning sites of pDICT

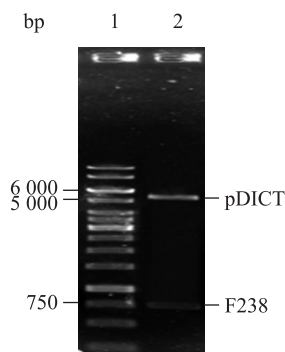


图4 重组质粒 pDICT-F238 的鉴定

**Fig. 4 Identification of the recombinant plasmid pDICT-F238**

注: 1: 核酸分子量标准; 2: pDICT-F238 经 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切结果.

Note: 1: DNA marker; 2: pDICT-F238 /*EcoRI* + *HindIII*.

如图 5 结果所示, 全菌体和菌体沉淀部分在分子量约为 28 kD 处出现特异性蛋白质条带, 与预期蚓激酶 F238 蛋白大小一致; 对比破碎菌体的上清和沉淀部分的电泳情况, 发现破碎后上清中几乎没有出现相应的蛋白条带, 说明诱导产生的 F238 以包涵体形式聚集在细胞内。

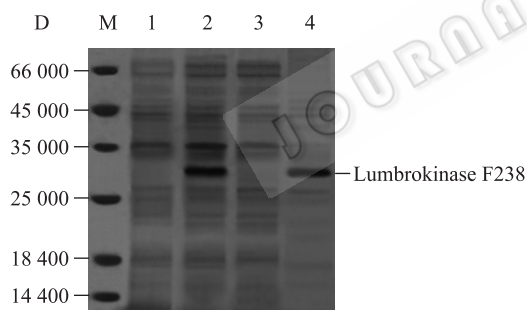


图5 SDS-PAGE 分析

**Fig. 5 SDS-PAGE analysis**

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 阴性对照; 2: BL21/pET22b-F238 全菌体; 3: 细胞破碎后上清; 4: 细胞破碎后沉淀.

Note: M: Protein marker; 1: Negative control; 2: Whole cell protein of BL21/pET22b-F238; 3: Supernatant from cell disruption; 4: Precipitated from cell disruption.

如图 6 结果所示, 全菌体和菌体上清部分在分子量约为 28 kD 处出现特异性蛋白质条带, 与 F238 的理论分子量基本一致, 而对照(BL21/pDICT)全菌体蛋白中无此条带, 说明 F238 在大肠杆菌中得到表达。同时, 对比破碎菌体的上清和沉淀部分的电泳

情况, 沉淀部分 28 kD 处没有明显的蛋白条带出现, 说明诱导产生的 F238 主要存在于细胞破碎后的上清中, 也就是说, 表达产物 F238 是可溶性的蛋白质。通过 BL21/pDICT-F238、BL21/pET22b-F238 表达蚓激酶的情况对比, 说明分子伴侣 TrxA 可帮助蚓激酶在大肠杆菌内进行正确折叠, 从而实现蚓激酶在大肠杆菌中的可溶性表达。

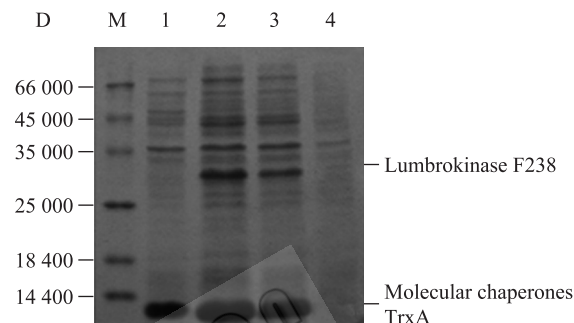


图6 SDS-PAGE 分析

**Fig. 6 SDS-PAGE analysis**

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 阴性对照; 2: BL21/pDICT-F238 全菌体; 3: 细胞破碎后上清; 4: 细胞破碎后沉淀.

Note: M: Protein marker; 1: Negative control; 2: Whole cell protein of BL21/pDICT-F238; 3: Supernatant from cell disruption; 4: Precipitated from cell disruption.

## 2.5 重组蛋白 F238 酶活性测定

取 BL21/pET22b-F238、BL21/pDICT-F238 诱导表达后进行超声破碎后的上清及沉淀(沉淀用 PBS Buffer 悬浮)各 10  $\mu$ L, 分别加样于加热和不加热两种纤维蛋白平板上, 置 37  $^{\circ}$ C 保温 18 h, 根据溶圈直径测定酶活。结果发现, 诱导后的 BL21/pET22b-F238 的上清和沉淀部分在纤维蛋白平板上都没有出现溶圈, 说明细胞内没有合成有活性的蚓激酶, 进一步证明 pET22b-F238 表达蚓激酶为包涵体, 与图 5 结果一致。BL21/pDICT-F238 破碎后沉淀在两平板上也都没有溶圈出现, 而上清部分却出现溶圈, 说明上清部分具有蚓激酶活性, 沉淀部分没有蚓激酶活性, 进一步证明 BL21/pDICT-F238 表达的蚓激酶是可溶性的, 与图 6 结果一致。这些结果表明, 分子伴侣 TrxA 有助于蚓激酶在大肠杆菌中的可溶性表达。图 7 还表明, 上清在不加热平板中出现的溶圈面积明显大于加热平板中的溶圈面



积,这是由于 80 °C 加热后平板中的血纤维蛋白原被破坏,当加入样品溶液时,不能发挥蚓激酶的间接激活纤溶酶原活性,只能发挥直接溶解纤维蛋白的作用,所以加热平板的溶圈面积较小,测定的活性也比较小(图 7A),约 42 U/mL(尿激酶单位)。而当未加热平板加入样品溶液时,样品既起到直接溶解纤维蛋白的作用,又激活了纤维蛋白原中的纤维酶原,产生间接溶解的作用,故溶圈面积较大,显示更大的活性,约 180 U/mL(尿激酶单位)(图 7B),前者是后者的 1/4。由此可以看出,F238 对纤维蛋白酶的激活作用大于直接溶解纤维蛋白的作用。琼脂糖-纤维蛋白平板的测定结果证明,重组蛋白 F238 不仅具有激活纤溶酶原的作用,而且具有直接水解纤维蛋白活性。

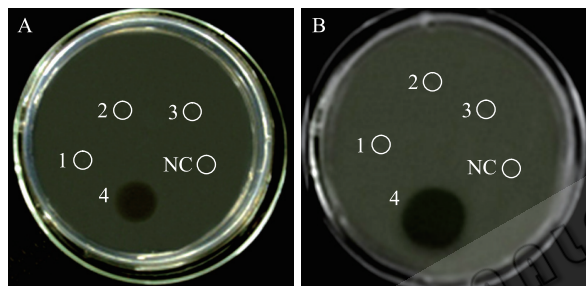


图 7 纤维蛋白原平板检测

Fig. 7 Detection of the fibrinolytic activity

注: A: 加热平板; B: 不加热平板。1: BL21/pET22b-F238 破碎后上清; 2: BL21/pET22b-F238 破碎后沉淀; 3: BL21/pDICT-F238 破碎后上清; 4: BL21/pDICT-F238 破碎后沉淀; NC: 阴性对照。

Note: A: Fibrinogen plate with preheating; B: Fibrinogen plate without heating. 1: Supernatant from BL21/pET22b-F238; 2: Precipitation from BL21/pET22b-F238 disruption; 3: Supernatant from BL21/pDICT-F238 disruption; 4: Precipitation from BL21/pDICT-F238 disruption; NC: Negative control.

### 3 讨论

心脑血管病是现代社会的严重危害人类身心健康和生命安全的多发病和常见病,发病率高,危害性大,死亡率已经超过癌症。因此,通过基因工程方法获得纯度高、成分单一的蚓激酶仍然是科学工作者的重要课题。一直以来,大肠杆菌表达系统以其不可替代的优势得到青睐,但是外源蛋白在大肠杆菌中通常形成不溶性的包涵体,必须经过繁琐的变性-复性过程才可以获得具有生物活性的目标产物,

存在蛋白质终产量偏低、生产成本较昂贵的弊端。如 Cho HI 等<sup>[13]</sup>从 *L. rubellus* 中克隆出蚓激酶基因并在大肠杆菌中进行表达,重组蛋白为包涵体,经过繁琐的变性和复性后得到有活性的蛋白产物,但回收率极低。本文构建 pET22b-F238 表达载体,在大肠杆菌表达蚓激酶时也只得没有活性的蚓激酶包涵体,这和其他一些研究者的结果是一致的。为了实现蚓激酶的可溶性表达,一些研究者在大肠杆菌中融合表达蚓激酶。例如徐义辉等<sup>[7]</sup>构建了表达载体 pTrxFUS-PV242,在大肠杆菌中实现了融合蛋白 Trx/PV242 的可溶性表达,表达产物纯化后经纤维蛋白平板检测具有溶纤活性,培养液经纯化后检测到融合蛋白活性为 10 U/L; Li DH 等<sup>[14]</sup>克隆蚯蚓纤溶酶基因 F-III-2 cDNA 至大肠杆菌表达载体 pET-28a 中,并转化 BL21 诱导表达,获得融合蛋白活性为 139.7 U/mg。但是,这些融合到蚓激酶上的一段多肽序列,最后必须切除。

分子伴侣是一种能介导靶蛋白质正确折叠并使其获得正确构型的蛋白质。这一功能是靶蛋白质在装配过程中结合在其暴露的反应表面,并阻止这些反应表面与其它区域作用产生不正确的构型来实现的。重要的是它们介导其它蛋白质的正确装配,而本身却不成为最后功能结构中的组分。硫氧还蛋白 TrxA 的相对分子质量为 11.7 kD,是一类存在于大肠杆菌体内的耐热分子伴侣,溶解度很高,还原态的 TrxA 具有很强的蛋白二硫键氧化还原酶活性,作为核酸还原酶的供氢体在 DNA 的合成与复制中起重要作用。已有研究者设计了由 TrxA 作为分子伴侣与外源蛋白基因融合表达的载体,如 pET-32、pET-48,并利用该载体在大肠杆菌中高效表达了可溶性的外源蛋白。但是所得外源蛋白均为融合蛋白,必须切下 TrxA 后才可以获得活性物质或者被进一步应用。融合的外源蛋白切割既增加了操作的难度,又提高了生产成本。

为了解决融合蛋白的切割问题,本研究在分子伴侣 TrxA 的终止密码子前加入了一个核糖体结合位点 RBS 2,同时为了更改 RBS 2 的方便,在 RBS 2 的前面增加 BamH I 酶切位点,让 TrxA 的终止密码

子和目的基因的起始密码子重叠一个碱基 A, 构成一个双顺反子翻译偶联表达载体 pDICT, 形成了“*rbs1*-TrxA-*rbs2*-F238”结构。当翻译分子伴侣 TrxA 时, 核糖体结合于 *rbs1* 位点开启翻译过程, 当翻译至 TrxA 的 C-末端时, 由于增加了第二个核糖体结合位点 *rbs2* 以及终止密码子和目的基因起始密码子重叠, 核糖体移动到 TrxA 的终止密码子时不会离开 mRNA 链, 而是向后移动一位碱基开始翻译目的基因。将 F238 基因克隆至 pDICT 进行表达, SDS-PAGE 和活性鉴定表明: 表达产物确实为可溶性蛋白且具备激酶和纤溶酶的生物活性。可见, 在 TrxA 的 C-末端引入 *rbs2* 序列后并不影响 TrxA 的分子伴侣功能。pDICT 表达载体的构建, 解决了大肠杆菌表达外源蛋白容易形成包涵体以及与分子伴侣进行融合表达的难题。这样可以在大肠杆菌表达系统中经济、简捷地获得高产量的可溶性目的产物, 为今后利用大肠杆菌可溶性表达外源蛋白奠定了基础, 以此来研究更多有价值的生物活性物质。

本文实现了蚓激酶在大肠杆菌中的高效可溶性表达, 发酵液的酶活力达到 180 U/mL, 为开发蚓激酶产品奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Mihara H, Sumi H, Akazawa T, et al. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm[J]. *Thromb Haemostas*, 1983, 50: 258-263.
- [2] Chul KL, Jang SS, Byung SK, et al. Antithrombotic effects by oral administration of novel proteinase fraction from earthworm *Eisenia andrei* on venous thrombosis model in rats[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2007, 30(4): 475-480.
- [3] Sugimoto M, Nakajima N. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65(7): 1575-1580.
- [4] 赵明明, 黎明, 韩振林, 等. 蚓激酶基因的克隆及在毕赤酵母中的表达[J]. *微生物学报*, 2006, 46(4): 581-585.
- [5] Dong GQ, Yuan XL, Shan YJ, et al. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding fibrinolytic enzyme-3 from earthworm *Eisenia foetida*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, 36(4): 303-308.
- [6] 姜琼, 易增兴, 陈武. 蚓激酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(31): 13557-13558.
- [7] 徐义辉, 梁国栋, 孙兆军, 等. 蚯蚓纤溶酶新基因 PV242 的克隆与表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(4): 610-614.
- [8] Jurado P, de Lorenzo V, Fernandez LA. Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*: Evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 357(1): 49-61.
- [9] Jing XL, Luo XG, Tian WJ, et al. High-Level Expression of the Antimicrobial Peptide Plectasin in *Escherichia coli* [J]. *Current Microbiology*, 2010, 61(3): 197-202.
- [10] Wang AP, Su YP, Wang S, et al. High efficiency preparation of bioactive human  $\alpha$ -defensin 6 in *Escherichia coli* Origami(DE3) pLysS by soluble fusion expression[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(5): 1935-1942.
- [11] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40(2): 346-351.
- [12] 陈飞, 孟宪志, 李莉, 等. 蚯蚓纤溶酶基因 P239 的原核表达、纯化及活性测定[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(1): 19-21.
- [13] Cho HI, Choi ES, Lee HH. Molecular cloning, sequencing and expression of a fibrinolytic serine-protease gene from the earthworm *Lumbricus rubellus*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(5): 574-581.
- [14] Li DH, Tong W, Yang YF. Functional expression of an earthworm fibrinolytic enzyme in *Escherichia coli*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 613-618.