

1784

· 研究报告 ·

重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的纯化及其性质研究[△]

李荣贵, 赵峰, 杨宏, 杜桂彩, 汪靖超, 王斌*

(青岛大学生物系, 山东 青岛 266071)

摘要:目的 表达、纯化重组沙蚕溶栓活性蛋白酶并对其性质进行研究。方法 将表达载体 pMAL-PPA 转化入 *E. coli* DH5 α 构建工程菌, IPTG 诱导工程菌大量表达麦芽糖结合蛋白-沙蚕溶栓活性蛋白酶(MBP-PPA), 细胞裂解液中融合蛋白经 Amylose-resin 亲和层析与 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析得到了纯化。用 Factor Xa 切割融合蛋白后经酪蛋白平板法检测其纤维蛋白溶酶原激活活性, 然后对其部分性质进行了研究。结果 构建了表达 MBP-PPA 的工程菌, 经纯化得到相对分子质量约 51kDa 的融合蛋白, Factor Xa 切割融合蛋白后, 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶(PPA)体外具有纤维蛋白溶酶原激活活性, 性质研究表明 PPA 热稳定性好, 最适 pH 为 8.0, 该酶在 pH6.0~9.0 范围内有较好的稳定性, 酶活在有机溶剂中至少维持 20d, 25 mmol·L⁻¹ PMSF 能完全抑制其活性。结论 证实 PPA 是一种纤溶酶原激活剂, 且将来有望成为一种新型溶栓药物。

关键词: 沙蚕; 溶栓活性蛋白酶; 纯化; 性质

中图分类号: Q959.19; TQ460 文献标识码: A 文章编号: 1002-3461(2007)02-0001-06

Purification and characterization of recombinant protease with thrombolytic activity of *Perinereis aibuhitensis* Grube

LI Rong-gui, ZHAO Feng, YANG Hong, DU Gui-cai, WANG Jing-chao, WANG Bin*

(Department of Biology, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: **Objective** To express and purify recombinant protease with thrombolysis activity of *Perinereis aibuhitensis* Grube and study on its characterization. **Methods** pMAL-PPA was introduced into *E. coli* DH5 α to construct engineering bacteria and overexpression of the protease of fused with maltose binding protein(MBP-PPA) was achieved with IPTG induction. The fusion protein was purified by affinity chromatography on amylose-resin column followed by chromatography on a DEAE-sepharose FF column. PPA cut with Factor Xa was assayed using casein plates supplied with plasminogen. **Results** Engineering bacteria expressing maltose binding protein-thrombolytic protease of *P. aibuhitensis* were constructed and overexpression of MBP-PPA was achieved with IPTG induction. A recombinant fusion protein of 51kD was purified, and PPA cut down from the fusion protein had a plasminogen-activating activity. The protease showed a good thermal stability with an optimal pH of 8.0. This enzyme was also relatively stable in a pH range of 6.0~9.0 and still active after stored in organic solvents for 20d. **Conclusion** PPA was verified as a plasminogen activator, and might be a new thrombolytic medicine in the future.

Key words: *P. aibuhitensis*; protease with thrombolytic activity; purification; characterization

△基金项目: 国家重点基础研究前期专项基金资助项目(2004CCA02400)

* 通讯作者: Tel: 0532-82991508; E-mail: wangbin31@yahoo.com

近年来,蛋白酶特别是丝氨酸蛋白酶及其抑制剂已成为研究热点。众多研究表明,蛋白酶在许多重要的生命活动过程中发挥着十分重要的作用。蛋白酶参与蛋白质的水解、消化、血液凝固与血栓溶解、血管形成、炎症、受精以及细胞生长和维持细胞的形态等,此外还与许多疾病的发病机理有关^[1]。丝氨酸蛋白酶是一类最有特色的蛋白酶家族。这个家族包括:胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,弹性蛋白酶,凝血酶,枯草杆菌蛋白酶,纤溶酶,组织纤溶酶原激活剂(tPA)和其它有关的酶类^[2]。血栓性疾病是中、老年人易发的疾病之一,而且目前青年病人的数量也在上升。目前治疗血栓病的主要方法就是溶栓疗法,即注射溶栓剂使血管再通,这种方法的优点是治疗后两周内死亡率较低。因此开发高效的溶栓药物在临床上具有重要意义^[3]。

沙蚕属环节动物门、多毛纲、游走目、沙蚕科,又称海蚯蚓、海蜈蚣、海百脚等。我国的沙蚕种类有约 80 多种^[4],但国内外有关沙蚕蛋白酶的研究报道却并不多。目前国内的研究主要集中在对沙蚕的人工育苗、养殖以及沙蚕毒素等方面^[5,6]。日本学者从几种沙蚕中分离出了多种具有生物活性的多肽,这些多肽的生物活性主要表现在对环节动物的食管具有较强的收缩作用,有望开发为新型胃动力药^[7]。此外还有少数文献报道从沙蚕体内纯化出了一些功能蛋白^[7~12],其中张伟云等^[7]首次从双齿围沙蚕体内提取出一种纤溶酶。该酶为一种酸性蛋白,等电点为 4.5 左右,由两条肽链组成,其相对分子质量分别为 33kDa 和 14.4kDa^[7]。潘卫冬等^[8]从沙蚕的匀浆液中提取分离出一种命名为 Perin-erin 的新型抗菌肽,能有效抑制革兰阳性、阴性细菌及真菌的生长。

尽管沙蚕的营养成分丰富、应用价值广泛^[13],但近几年来国内外对沙蚕深度开发的研究报道并不多。作为与沙蚕同属环节动物门的蚯蚓,从中提取的蚓激酶已经作为药品推向市场^[14],因此对沙蚕中的功能蛋白尤其是溶栓类物质的研究值得我们倍加关注。随着当代分子生物技术迅猛发展及其在生物医

学领域的广泛应用,它为人们应用基因工程技术来获得功能蛋白提供了新的方法,并且为我们的研究开拓了一片广阔的前景。Li 等^[15]从沙蚕中克隆出了一种丝氨酸蛋白酶的 cDNA,并证明它的表达产物确实有纤维蛋白溶酶原激活活性,但对这种蛋白的性质还知之甚少,本研究我们对这种蛋白酶进行了表达、纯化,并对其部分酶学性质进行了研究,以期使该蛋白得到开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒与主要试剂

E. coli DH5 α 菌种购自 Novagen 公司并由本实验室保存,编码溶栓活性蛋白酶的 cDNA 克隆及重组表达载体 pMAL-PPA 的构建参照 Li 等^[15]的方法进行。中等标准分子量蛋白购自 Fermentas 公司,Amilose-Resin 购自 New England BioLabs 公司,DE-AE-Sephrose FF 为 GE 公司产品,丙烯酰胺、甲双叉丙烯酰胺、TEMED、人血清纤维蛋白酶原均为 Sigma 公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

高速冷冻离心机(日本 Hitachi 公司, CR21G 型),超声波细胞粉碎机(宁波新芝 JY92-II),蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司, Mini-Protein II 型),蛋白纯化工作站(美国 GE 公司, AKTA Purifier 型)。

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pMAL-PPA 在大肠杆菌中的表达

表达载体 pMAL-PPA 转化 *E. coli* DH5 α ,挑取转化菌单菌落接种于含 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,于次日按 1:20 的比例接种到同样液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ $\approx$ 1.0,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol $\cdot$ L⁻¹,继续培养 3 h,冷冻离心收集菌体,于 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存备用。

1.2.2 重组沙蚕激酶 PPA 与麦芽糖结合蛋白融合蛋白 MBP-PPA 的分离纯化

经 IPTG 诱导表达的菌体按 1:25(W/V) 比例重悬于柱缓冲溶液 ($20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA), 于低温下超声波破碎细胞, 细胞裂解液 $15,000\text{g}$ 离心 30min 取上清, 然后参照文献^[15]中介绍的方法先后使用 Amylose-Resin 和 DEAE-Sepharose FF 层析柱对融合蛋白 MBP-PPA 进行分离纯化, 收集到的目的蛋白立即于 -20°C 下保存。

1.2.3 酪蛋白平板法检测酶的活性

采用酪蛋白平板法对沙蚕溶栓活性蛋白酶的活性进行检测, 具体方法在参考文献^[16]的基础上稍加改动: 取 20mL Tris-HCl 缓冲液 ($20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0) 加入 0.2g 琼脂糖、0.3g 脱脂奶粉加热充分溶解后, 倒入平皿中摇匀使液面平整无气泡, 冷却后用直径 3mm 打孔器在平板上均一打孔 2 个备用。取 $50\mu\text{g}$ 融合蛋白 MBP-PPA ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入 1 单位的 Factor Xa 混匀后等分成两份, 一份加入 $2\mu\text{L}$ 人血清纤维蛋白酶原 ($2\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 另一份加入相同比例的上述 Tris-HCl 缓冲液 ($20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0) 作为对照。分取两样品点样于酪蛋白平板, 28°C 保温 16h 后取出, 比较溶圈大小, 酶的活性与透明圈直径呈正相关, 以透明圈的直径代表酶活性。

1.2.4 沙蚕溶栓活性蛋白酶的最适 pH

配制 pH3.0~11.0 的 9 个酪蛋白平板 (pH3.0~6.0 的平板用 NaAC-HAC 缓冲液配制; pH7.0~11.0 的平板采用 Tris-HCl 缓冲液配制, 浓度为 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 取等量的融合蛋白 MBP-PPA、Factor Xa、纤维蛋白酶原混合体系 (比例如上所述) 分别点样于 8 个平板, 28°C 保温 16h 后测量溶圈垂直直径取平方。

1.2.5 pH 对沙蚕溶栓活性蛋白酶稳定性影响

将 $50\mu\text{L}$ 融合蛋白 MBP-PPA ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 放入 8 个 eppendorf 管内, 再分别加等量不同 pH 值 (pH3.0~pH10.0) 的缓冲液混匀, 室温下放置 24 h 后, 各管用 Tris-HCl 缓冲液 ($1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 调 pH 为 8.0, 按

1.2.3 中的方法测定酶活性, 量取溶圈垂直直径取平方。

1.2.6 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的热稳定性

取 8 个 eppendorf 管, 加入 $50\mu\text{g}$ 融合蛋白 ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别置于 $10\sim 80^{\circ}\text{C}$ 的水浴中保温 30min, 取出后放置 4°C 冷却 30min。然后 1.2.3 中的方法测定酶活性, 量取溶圈垂直直径取平方。

1.2.7 抑制剂对沙蚕溶栓活性蛋白酶的活性影响

取 $50\mu\text{g}$ 融合蛋白 ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 于 6 个 eppendorf 管内, 在其中 5 只管中分别加入苯甲基磺酰氟 (PMSF) 至终浓度分别为 2.5, 5, 10, 20, $25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 Tris-HCl 缓冲液 ($20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0) 均补足体积至 $70\mu\text{L}$ 。另一个 eppendorf 管中仅加入 Tris-HCl 缓冲液 ($20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0) 作为对照。然后按 1.2.3 中所述方法测定酶活性, 量取溶圈垂直直径取平方。

1.2.8 有机溶剂对沙蚕溶栓活性蛋白酶稳定性的影响

参照文献^[17]介绍的方法, 取 5 个 eppendorf 管, 分别加入等体积的沙蚕蛋白酶样品, 再分别加入 25%(v/v) 的甲醇、1,2-丙二醇、正己烷、丙酮、Tris-HCl 缓冲液 ($20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0) 混合后置于 4°C 保存, 每隔 10d 从 5 个管中分别取出样品 $20\mu\text{L}$ 按 1.2.3 中的方法测定酶活性, 量取溶圈垂直直径取平方。

2 结果

2.1 重组融合蛋白 MBP-PPA 的表达、纯化

工程菌经 IPTG 诱导、超声波细胞破碎、冷冻离心后上清与沉淀分别进行 SDS-PAGE, 结果显示融合蛋白 MBP-PPA 主要以可溶性蛋白的形式存在, 菌体裂解液经离心后的上清经 Amylose-resin 亲和层析与 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析纯化, 得到了电泳纯的融合蛋白 MBP-PPA (图 1)。

2.2 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶活性的初步检测

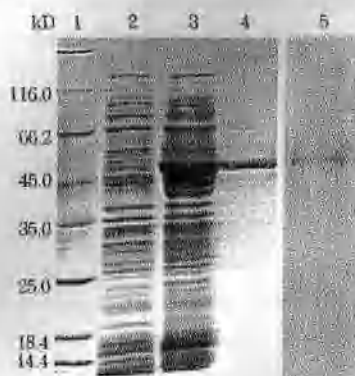


图 1 重组融合蛋白 MBP-PPA 的表达纯化

1 标准分子蛋白; 2 未经诱导表达的 *E. coli* 全蛋白; 3 经 IPTG 诱导表达的工程菌全蛋白; 4 从 Amylose-resin 层析柱洗脱的蛋白; 5 从 DEAE-Sepharose FF 离子交换柱洗脱的 MBP-PPA

Fig. 1 Expression and purification of MBP-PPA
1 Protein markers; 2 Total proteins of *E. coli*; 3 Total proteins of engineering bacteria induced by IPTG; 4 Proteins eluted from Amylose-Resin column; 5 MBP-PPA eluted from DEAE-Sepharose FF column

用酪蛋白平板对加有纤维蛋白溶酶原和未加纤维蛋白溶酶原的沙蚕溶栓活性蛋白酶样品同时进行活性检测, 经比较发现, 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶是一种纤溶酶原激活剂, 未加入人血清纤维蛋白溶酶原的沙蚕溶栓活性蛋白样品本身并不表现出酪蛋白水解活性(图 2)。

2.3 沙蚕溶栓活性蛋白酶作用最适 pH

按方法 1.2.4 用不同 pH 的缓冲液配制酪蛋白平板来检测沙蚕溶栓活性蛋白酶的相对活性, 结果显示: pH 6.0 以下重组沙蚕溶栓活性蛋白酶未表现出活性, 随 pH 的升高重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的活性逐渐增大, 在 pH 8.0 左右活性最强, 高于这个 pH 活性则开始下降(图 3)。

2.4 pH 对沙蚕溶栓活性蛋白酶稳定性影响

将适量的融合蛋白分别溶于不同 pH 的缓冲溶液中, 室温放置 24h 后再调 pH 至 8.0, 然后测定重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的残留活性。结果表明, 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶在不同的 pH 下稳定性不同, 在 pH 6.0~

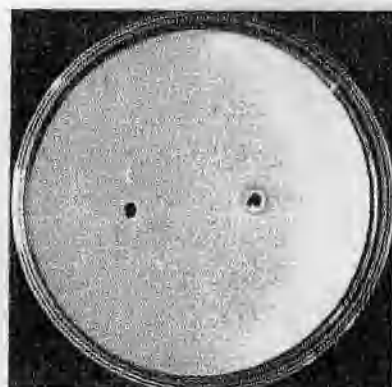


图 2 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶活性的检测

1 MBP-PPA; 2 MBP-PPA、纤维蛋白溶酶原与 Factor Xa 的混合液

Fig. 2 Detection of the activity of recombinant thrombolytic protease from *P. aibuhitensis*

1 MBP-PPA; 2 Mixture of MBP-PPA, plasminogen and Factor Xa

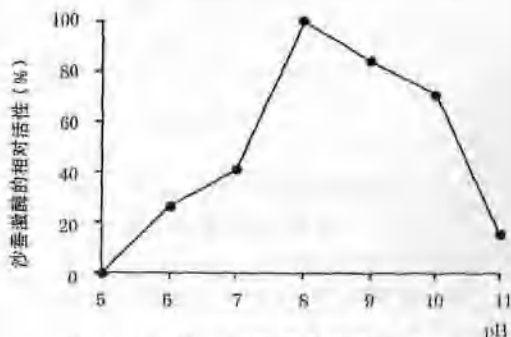


图 3 沙蚕溶栓活性蛋白酶的最适 pH

Fig. 3 The optimal pH of thrombolytic protease from *P. aibuhitensis*

9.0 的范围内有较好的稳定性, 而在这个范围以外酶活性下降比较显著(图 4)。

2.5 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的热稳定性

取等量的融合蛋白 MBP-PPA 分别在不同温度下保温 30min, 然后按照方法 1.2.6 测其残留相对酶活。结果表明: 低于 30℃ 时, 随着温度的升高, 酶活性有明显的提高, 但具体机理尚不清楚。当温度达到 30℃ 时, 随着温度的升高, 酶的活性开始下降, 但高于 60℃ 时, 总体看酶活性下降幅度不大, 80℃ 时酶活仍可保持在 90% 以上(图 5), 可见重组沙蚕溶栓活性蛋白酶有比较好的热稳定性。

2.6 抑制剂对沙蚕溶栓活性蛋白酶活性的

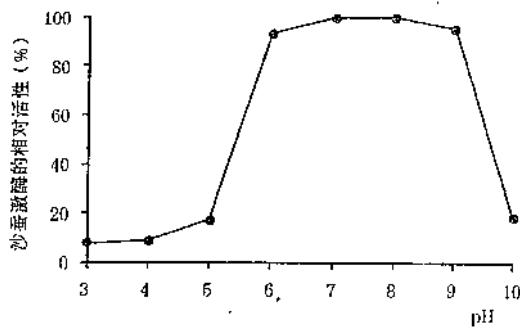


图 4 pH 对沙蚕溶栓活性蛋白酶稳定性影响

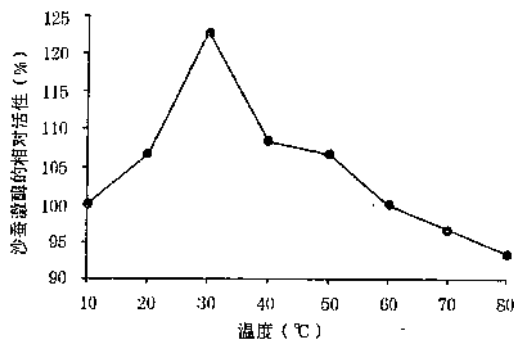
Fig. 4 Effect of pH on the stability of thrombolytic protease from *P. aibuhitensis*

图 5 重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的热稳定性

Fig. 5 Thermo-stability of thrombolytic protease from *P. aibuhitensis*

影响

选用丝氨酸蛋白酶抑制剂来研究其对重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的抑制作用,结果显示:当 PMSF 浓度低于 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该酶对抑制剂不敏感,当 PMSF 达到 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制作用较为显著,只有当 PMSF 浓度达到 $25\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时才可完全抑制重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的活性,与其它丝氨酸蛋白酶相比^[18],该蛋白酶完全被抑制所需抑制剂的浓度要高出一数量级,表明该酶不是一种典型的丝氨酸蛋白酶(图 6)。

2.7 有机溶剂对沙蚕溶栓活性蛋白酶稳定性的影响

经测定 4 种有机溶剂对重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的稳定性影响比较显著,尽管如此,在 20d 内重组沙蚕溶栓活性蛋白酶的活性却仍能保留在 40% 以上(图 7)。

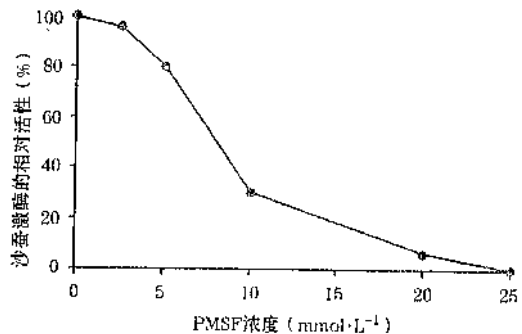


图 6 PMSF 对沙蚕溶栓活性蛋白酶活性的影响

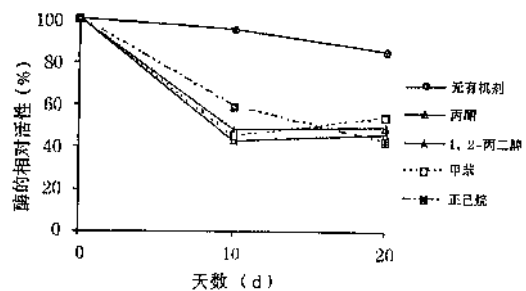
Fig. 6 Effect of PMSF on the activity of thrombolytic protease from *P. aibuhitensis*

图 7 有机溶剂对沙蚕溶栓活性蛋白酶稳定性的影响

Fig. 7 Effect of organic solvents on the stability of thrombolytic protease from *P. aibuhitensis*

3 讨论

尽管目前已经开发出诸如链激酶、t-PA、u-PA 等多种溶栓剂,但这些溶栓剂容易引起全身性出血、过敏反应、且半衰期短等,因此亟待开发出新型的纤溶酶原激活剂,本课题组前期曾克隆了沙蚕的一种蛋白酶的 cDNA 并构建了表达载体 pMAL-PPA,初步证实了这种沙蚕溶栓活性蛋白酶体外有激活纤维蛋白酶原的活性^[15]。本文我们在已有工作的基础上表达、纯化了这种重组沙蚕溶栓活性蛋白酶,对其部分性质进行了研究。研究结果显示,该酶在较宽的 pH 范围内和很高的温度下都有很好地稳定性,且较强的抵抗有机溶剂的能力,提示该蛋白酶除了有可能开发成新型溶栓制剂外,在其他领域也可能存在广泛的用途。

参考文献:

- [1] 陈安和. 几种蛋白酶活力测定新方法[J]. 生命的化学, 1997, 17(6): 41.
- [2] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(上) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 405.
- [3] 焦建伟, 茹炳根. 溶栓剂研究的新进展[J]. 生物工程进展, 2002, 22(1): 30.
- [4] 顾晓英, 蒋筱敏, 郑忠明, 等. 双齿围沙蚕(*Perinereis aiuhitensis* Grube)的生物学特征和开发利用现状[J]. 现代渔业信息, 2002, 17(8): 33.
- [5] 张永靖, 童丽娟, 郑周数, 等. 养殖环境中底栖生物丰度与双齿围沙蚕生化组成的相关性研究[J]. 水产科学, 2005, 24(2): 5.
- [6] 韩招久, 韩召军, 姜志宽, 等. 沙蚕毒素类杀虫剂的毒理学研究新进展[J]. 现代农药, 2004, 3(6): 5.
- [7] 张伟云, 陈颖, 汪水娟, 等. 沙蚕纤溶酶的一种纯化方法[J]. 中草药, 2001, 32(8): 673.
- [8] Pan W, Liu X, Ge F, et al. Perinerein, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aiuhitensis* grube and its partial characterization[J]. J Biochem, 2004, 135(3): 297.
- [9] Ebina S, Matsubara K, Nagayama K, et al. Carbohydrate gluing, an architectural mechanism in the supramolecular structure of an annelid giant hemoglobin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(16): 67.
- [10] Matsubara K, Yamaki M, Nagayama K, et al. Wheat germ agglutinin-reactive chains of giant hemoglobin from the polychaete *Perinereis aiuhitensis*[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1290(3): 15.
- [11] Yamaki M, Matsubara K, Shibuya A, et al. Identification of the subunit loci in the extracellular multisubunit hemoglobin from annelid *Perinereis aiuhitensis*[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 335(1): 23.
- [12] Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, et al. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family[J]. Eur J Biochem, 1999, 259: 456.
- [13] 刘向辉, 戈峰, 潘卫东. 沙蚕组织内几种营养成分的分析[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(6): 35.
- [14] 胡燕, 孟小林, 徐进平, 等. 蚯蚓纤溶酶基因的 cDNA 克隆及其序列分析[J]. 武汉大学学报(理学版), 2004, 50(2): 211.
- [15] Li R, Qian D, Guo D, et al. Isolation of a cDNA encoding a protease from *Perinereis aiuhitensis* Grube[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2006, 38(8): 543.
- [16] 武金霞, 赵晓瑜. 酪蛋白平板法检测蚯蚓纤溶酶活性[J]. 自然杂志, 2003, 26(3): 184.
- [17] Nakajima N, Ishihara K, Sugimoto M, et al. Further stabilization of earthworm serine protease by chemical modification and immobilization[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(12): 2739.
- [18] Zhang Y, Cui J, Zhang R, et al. A novel fibrinolytic serine protease from the polychaete *Nereis (Neanthes) virens* (Sars): Purification and characterization[J]. Biochimie, 2006, 88(10): 1.

(收稿日期: 2006-07-05)

欢迎订阅 2007 年《中国海洋药物》杂志