

## Ssp dnaB 蛋白质内含子介导的重组人脑钠素的制备

# Use of Ssp dnaB Mini-intein as a Fusion Partner for Preparation of Recombinant Human Brain Natriuretic Peptide

狄 浏<sup>1</sup> 张宏伟<sup>2</sup> 徐朗莱<sup>1\*</sup>

DI Lie<sup>1</sup>, ZHANG Hong-Wei<sup>2</sup> and XU Lang-Lai<sup>1\*</sup>

1 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095

2 江苏靖江市人民医院, 靖江 214500

1 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Jingjiang People's Hospital, Jingjiang 214500, China

**摘 要** 脑钠素(BNP)是临床治疗代偿失调性心衰竭的有效药物。将脑钠素与组氨酸标签(His-tag)以及具有自我剪切功能的 Ssp dnaB 微型蛋白质内含子进行融合表达。表达产物经 Ni-Sepharose 亲和层析及体外复性处理后,用 CM-纤维素对复性产物进行了浓缩,并通过改变 CM-纤维素柱内的 pH 及温度,诱导 Ssp dnaB 微型蛋白质内含子的剪切作用,使脑钠素从融合蛋白中释放并与载体蛋白(His-DnaB)分离,再经 C4 反相高效液相色谱法进一步纯化后,从每升培养液中获得了 2.8mg 纯度达 97% 的重组人脑钠素。体外活性测定结果表明,重组人脑钠素对兔胸主动脉条具有显著的血管舒张效应,其 EC<sub>50</sub> 为  $1.94 \times 10^{-6}$  mg/mL。

**关键词** 多肽制备,脑钠素,蛋白质内含子,蛋白质剪接

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0180-07

**Abstract** Human brain natriuretic peptide (hBNP) was used clinically for the treatment of acute decompensated congestive heart failure. In this paper, hBNP was expressed as a fusion protein with a histidine tag and Ssp dnaB mini-intein which was capable of self-cleavage. After affinity chromatography with Ni-Sepharose and renaturation, the fusion protein was enriched with CM-cellulose. Ssp dnaB mini-intein mediated peptide-bond hydrolysis was triggered by shifting the pH and temperature in the CM-cellulose column, which led to the release of hBNP from the fusion protein and the separation of hBNP from His-DnaB. The hBNP sample was further purified by C4 reverse phase HPLC, and 2.8 mg of the peptide with homogeneity of 97% was obtained from one liter of culture medium. The biological activity was assayed in vitro, which indicated that hBNP had a potent vasodilatory effect on rabbit aortic strips with an EC<sub>50</sub> of  $1.94 \times 10^{-6}$  mg/mL.

**Key words** polypeptide preparation, brain natriuretic peptide, intein, protein splicing

脑钠素(Brain natriuretic peptide, BNP), 又称 B-型利钠肽(B-type natriuretic peptide)是由 32 个氨基酸组成的多肽激素<sup>[1]</sup>。其分子量为 3464 D, 等电点

为 10.9。BNP 在体内主要由心肌细胞分泌, 具有提高肾小球的滤过速率, 增加尿钠排泄, 抑制血管紧张肽原酶的活性以及降低醛固酮和内皮素的分泌, 松

弛血管平滑肌,降低右心房以及肺动脉楔型压等功能<sup>[2]</sup>。BNP可用于临床治疗代偿失调性心衰竭<sup>[3,4]</sup>。

蛋白质内含子(intein)是一类具有自我剪接功能的多肽,它能将自身从前体蛋白中切除并催化其两侧的肽链之间形成肽键<sup>[5]</sup>。近年来,intein介导的自我剪接系统已被广泛用于蛋白质纯化<sup>[6]</sup>、蛋白质连接<sup>[7]</sup>、多肽的环化<sup>[8]</sup>以及配体分子的定量测定<sup>[9]</sup>等。在宿主菌中表达的目标多肽可以融合于intein的N-端或C-端,并可在体内及体外通过改变pH、温度或添加亲核试剂来诱导融合蛋白的剪切作用<sup>[10]</sup>,从而使目标肽段从融合蛋白中释放、分离出来,该方法在肽键裂解过程中无须使用蛋白水解酶或化学裂解试剂<sup>[6,10]</sup>。

本文将化学合成的hBNP基因与编码多聚组氨酸标签(His-tag)和*Synechocystis* sp. PCC6803菌的*dnaB*基因(*Ssp dnaB*)的微型蛋白质内含子在大肠杆菌内融合表达。融合蛋白His-DnaB-hBNP经Ni-Sepharose亲和层析、体外复性处理后,用CM-纤维素浓缩富集融合蛋白,通过将CM-纤维素柱内的pH值调节至6.5并置25℃保温16h,诱导*Ssp dnaB*微型蛋白质内含子的自我剪切活性,使hBNP从融合蛋白中释放并与His-tag和*Ssp dnaB*微型蛋白质内含子(His-DnaB)分离,从而获得了具有天然氨基酸序列和生物活性的重组人脑钠素。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

质粒pTWIN1购自New England Biolabs;T4 DNA连接酶和限制酶购自TaKaRa公司;表达质粒pET28b及表达宿主菌*E. coli* BL21(DE3)购自Novagen公司;化学合成的BNP标准品购自American Peptide Company;质粒提取和DNA片段回收试剂盒为Qiagen公司产品;Ni-Sepharose购自Pharmacia Biotech;半制备型C4反相HPLC色谱柱(300mm×20mm)为Waters公司产品;胰蛋白胨、酵母抽提物、乙腈、三氟醋酸、IPTG购自Fisher Scientific公司;其余试剂均为国产分析纯;编码hBNP的基因及PCR引物由Invitrogen公司合成,序列如下:

上游引物:5'-GGTGGTGCTCTTCCAAC TCCCCG AAAATGGTTCAGGGTCTG-3' 其中GCTCTTC为*Sap* I的酶切位点。

下游引物:GGTGGTCTGCAGTTAGTGACGGCGCA GTACTTTACAAC-3' 其中CTGCAG为*Pst* I的酶切位点。

hBNP模板的序列为:TCC CCG AAA ATG GTT CAG GGT TCT GGC TGC TTC GGT CGT AAG ATG GAC CGT ATC TCC TCT AGC TCC GGC CTG GGT TGT AAA GTA CTG CGC CGT CAC TAA

### 1.2 方法

**1.2.1 pET28/his-dnaB-hBNP表达质粒的构建:**以化学合成的hBNP基因为模板,采用PCR扩增hBNP双链DNA。PCR反应条件为:0.01pmol hBNP模板,50pmol的上游引物和下游引物,2.0mmol/L dNTP,0.25u taq酶,94℃变性2min后进行以下26个循环:94℃、45s;52℃、1min;72℃、45s。扩增完毕,将PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收hBNP基因片段(120bp)。将PCR扩增的hBNP基因片段和pTWIN1质粒分别用*Sap* I和*Pst* I双酶切,酶切产物分别经2%和1%琼脂糖凝胶电泳纯化回收目标片段。将经过酶切和纯化处理的hBNP基因和pTWIN1质粒片段混和,加入T4 DNA连接酶,置16℃连接反应20h。取连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,根据氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆,抽提质粒,用PCR鉴定hBNP基因是否插入pTWIN1质粒,并对pTWIN1/dnaB-hBNP质粒进一步做DNA序列测定。

用*Nde* I/*Bam* H I双酶切pTWIN1/dnaB-hBNP质粒,纯化回收酶切产生的dnaB-hBNP基因片段,并将该片段与经过*Nde* I/*Bam* H I双酶切处理的表达质粒pET28b连接。取连接产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞,用*Nde* I/*Bam* H I酶切鉴定pET28/his-dnaB-hBNP阳性克隆。pET28/his-dnaB-hBNP的质粒构建及hBNP制备的流程见图1。

**1.2.2 His-DnaB-hBNP融合蛋白的表达:**用表达质粒pET28/his-dnaB-hBNP转化BL21(DE3)感受态细胞,将转化细胞涂布在含50 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB平板上。挑取单克隆接种于LB培养基中,置37℃摇床过夜培养,取过夜菌按2%的比例接种至含25 $\mu$ g/mL卡那霉素的LB培养基,37℃、200r/min振荡培养至菌液的OD<sub>600</sub>达到0.6左右,加入终浓度为1.0mmol/L的IPTG,继续培养3.5h,于4℃、5000r/min离心收集菌体。用SDS-PAGE检测融合蛋白的表达效率。

取1g菌体,悬浮在30mL 50mmol/L NaAc-HAc, pH5.0缓冲液中,置冰浴中超声破碎菌体,4℃、20000r/min离心25min,分别取上清液和沉淀进行SDS-PAGE,并用凝胶扫描仪对目标蛋白条带进行测定比较,分析融合蛋白在上清液和沉淀中的分布

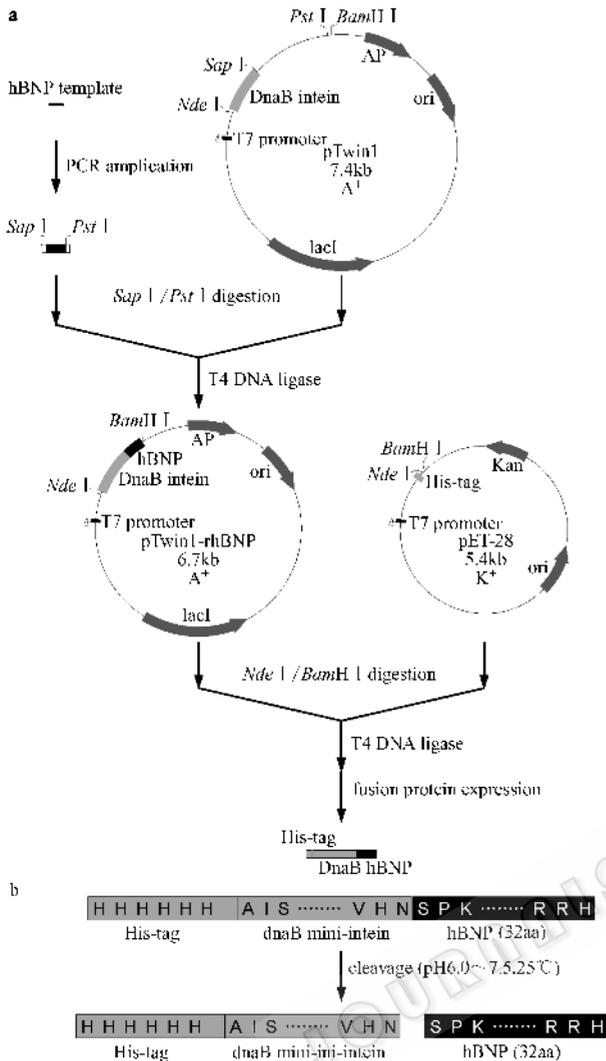


图1 His-DnaB-hBNP融合蛋白的构建及dna B mini-intein介导的蛋白质剪接

Fig. 1 His-DnaB-hBNP fusion protein construct design and dna B mini-intein induced splicing

(A) Construction of plasmid pET28/his-dnaB-hBNP ; (B) the cleavage of Asn-Ser peptide bond between dnaB and hBNP led to the release of hBNP from the His-DnaB-hBNP fusion protein.

情况。

**1.2.3 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的亲亲和层析:**将50mL 裂解缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 6mol/L 盐酸胍, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, pH7.9)与6g 菌体混合,置冰浴中用超声破菌,裂解的菌液在4℃、20000r/min 离心25min,收集上清液。将上清液上样至预先用平衡缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 6mol/L 盐酸胍, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 5mmol/L 咪唑, pH7.9)平衡的Ni-Sepharose 层析柱(2.0cm  $\times$  5.0cm)经20倍床体积的洗涤缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑,

8mol/L 尿素, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, pH7.9)充分洗涤后,用洗脱缓冲液(25mmol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 300mmol/L 咪唑, 8mol/L 尿素, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, pH7.9)洗脱。收集 His-DnaB-hBNP 融合蛋白,用胶浓度为13%的 SDS-PAGE 检测其纯度。

**1.2.4 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的复性:**将从 Ni-Sepharose 柱收集的 His-DnaB-hBNP 样品溶液按1:50的比例加入复性缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, 2mmol/L EDTA, 1mol/L 尿素, 0.5mol/L 盐酸胍, 0.25mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 1mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH8.5),混匀,置4℃复性20h后,将复性样品对25mmol/L NaAc-HAc, pH5.0 缓冲液充分透析。复性样品透析后产生的沉淀物通过4℃、15000r/min 离心20min 去除。

通过测定融合蛋白复性前的  $OD_{280}$  以及复性样品透析后上清液的  $OD_{280}$  来估算融合蛋白的复性效率。

**1.2.5 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的CM-纤维素浓缩、裂解和纯化:**在层析柱(2.5  $\times$  8cm)中加入10mL CM-阳离子交换纤维素并用50mL 平衡缓冲液(25mmol/L NaAc-HAc, pH5.0)平衡柱体。将 His-DnaB-hBNP 融合蛋白复性样品按0.5mL/min 流速上样。上样完毕,加入100mL 裂解缓冲液(20mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1mmol/L EDTA, pH6.5)快速洗涤柱体。关闭层析柱出口,在层析柱中加入10mL 裂解缓冲液以及1mmol/L 的PMSF,置25℃保温16h。

用洗涤缓冲液(20mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100mmol/L NaCl, pH6.5)洗涤CM-纤维素柱至流出液的  $OD_{280}$  小于0.02,加入50mL 洗脱缓冲液(20mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300mmol/L NaCl, pH6.5)洗脱从 His-DnaB-hBNP 融合蛋白中裂解释放出来的 hBNP。将收集的 hBNP 样品对5mmol/L 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液充分透析、冻干,用胶浓度为16%的 Tricine SDS-PAGE 测定 hBNP 样品的纯度<sup>[11]</sup>。

**1.2.6 hBNP 的反相高效液相色谱(RP-HPLC):**将冻干的 hBNP 样品溶解在4.0mL 缓冲液A(0.1%三氟醋酸)中,用C4反相高效液相色谱柱(300  $\times$  20mm)进行纯化。以10mL/min 的流速用缓冲液A平衡C4制备柱,待基线稳定后上样。用缓冲液A和缓冲液B(0.1%三氟醋酸, 90%乙腈)进行线性梯度洗脱,在40min内,缓冲液B的浓度由0上升至40%。用215nm作为检测波长,收集 hBNP 样品峰,用NaOH调节pH至5.0,对5mmol/L 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  透

析、冻干。

以化学合成的 BNP 标准品为对照,用 16% 的 Tricine SDS-PAGE 和 C18 反相高效液相色谱测定 hBNP 样品的纯度。hBNP 样品在 C18 分析柱的梯度洗脱条件为:在 25min 内缓冲液 B 的浓度从 15% 上升到 35%,洗脱液的流速为 1.0mL/min,检测波长为 215nm。

**1.2.7 hBNP 的活性测定** 利用 hBNP 的血管舒张效应来测定其生物活性,测定步骤参照 Baumanis 等的方法<sup>[12]</sup>。取兔胸主动脉剪成 3cm 左右的血管条,在麦氏浴槽内加入 20mL 台氏溶液(8.0g NaCl、0.2g KCl、0.26g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.065g  $NaH_2PO_4$ 、1.0g Glucose、0.2g  $CaCl_2$ ,定容至 1000mL,调 pH 为 7.4)置 37℃ 恒温,并通入空气。对血管条加挂 1.0g 负荷,保持 1h,每隔 20min 更换一次台氏液,用记录仪监测血管条的张力变化,待基线稳定后,加入肾上腺素至终浓度为 0.15 $\mu$ g/mL,当血管条的张力升至最高并稳定 10min 后,记录其血管张力变化。充分洗去麦氏浴槽中的肾上腺素并重新加入 20mL 台氏液,按累积浓度加样法加入 hBNP 样品(设置系列浓度为:  $5 \times 10^{-7}$  mg/mL、 $1.5 \times 10^{-6}$  mg/mL、 $3.0 \times 10^{-6}$  mg/mL、 $5 \times 10^{-6}$  mg/mL、 $1 \times 10^{-5}$  mg/mL、 $2 \times 10^{-5}$  mg/mL、 $3.5 \times 10^{-5}$  mg/mL、 $5.5 \times 10^{-5}$  mg/mL),记录血管张力的变化。计算 hBNP 标准样品和待测样品的  $EC_{50}$ 。

## 2 结果

### 2.1 pET28/his-dnaB-hBNP 表达质粒的构建

以化学合成的 hBNP 基因为模板,用 PCR 扩增 hBNP 双链 DNA(图 2)。PCR 产物通过 *Sap* I/*Pst* I 酶切位点插入质粒 pTWIN1 中 *Ssp* dnaB 微型蛋白质内含子基因序列的下游。由于 hBNP 基因的插入导致 pTWIN1 载体上的 *Sap* I 酶切位点消失,因此我们首先采用 PCR 鉴定转化质粒中是否存在 hBNP 基因(图 2),对阳性克隆用基因测序作进一步的确认。结果表明,pTWIN1/hBNP 质粒中的 hBNP 基因序列完全正确。

通过 *Nde* I/*Bam*H I 双酶切,我们从 pTWIN1/hBNP 质粒中切出编码 dnaB-hBNP 的基因片段(图 3)并克隆至质粒 pET28b 中编码 His-tag 的基因序列下游(图 3)。在表达质粒 pET28/his-dnaB-hBNP 中,His-tag、dnaB 蛋白质内含子、hBNP 位于同一阅读框架,从而使表达产生的 His-DnaB-hBNP 融合蛋白可以用 Ni-Sepharose 进行亲和纯化。

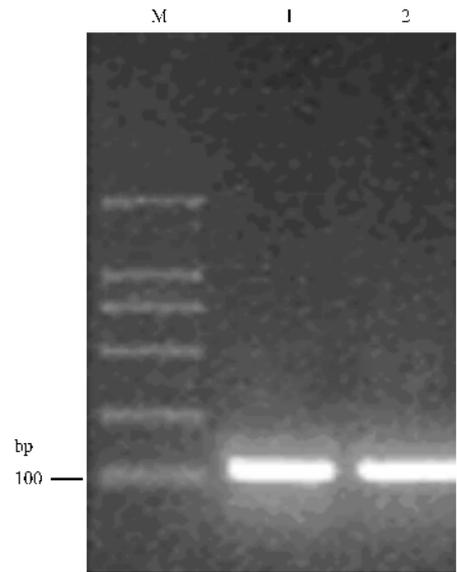


图 2 用合成的 hBNP 基因及质粒 pTWIN1/hBNP 为模板形成的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR products using synthesized hBNP gene (lane 1) and pTWIN1/hBNP plasmid (lane 2) as templates

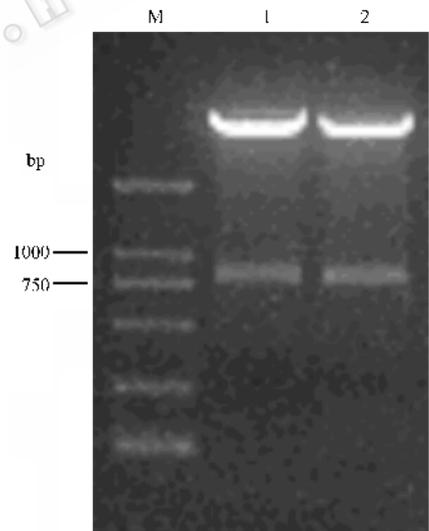


图 3 质粒 pTWIN1/dnaB-hBNP 及 pET28/his-dnaB-hBNP 经 *Nde* I/*Bam*H I 水解后的琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose electrophoresis of plasmid pTWIN1/dnaB-hBNP (lane 1) and pET28/his-dnaB-hBNP (lane 2) digested with *Nde* I/*Bam*H I

### 2.2 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的表达

用 pET28/his-dnaB-hBNP 表达质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3),挑取单菌落接种于 LB 培养基,在 37℃ 经 IPTG 诱导后,His-DnaB-hBNP 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 24%(图 4)。His-DnaB-hBNP 融合蛋白在大肠杆菌内主要形成无活性不可溶的包涵体,仅约 31% 以可溶形式存在(图 4)。

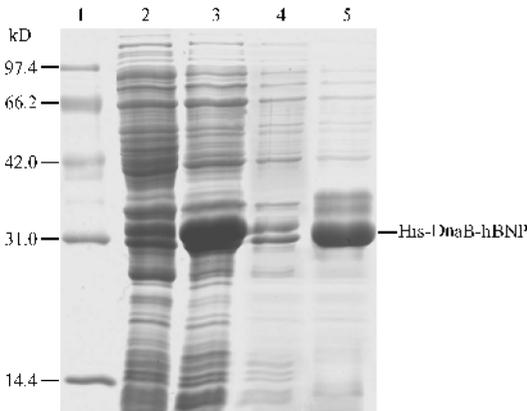


图4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的表达和纯化

Fig.4 Analysis of the expression and purification of His-DnaB-hBNP fusion protein by SDS-PAGE

1: molecular weight marker; 2: total lysate of non-induced cells; 3: total lysate of induced cells; 4: soluble fraction of the lysate from induced cells; 5: insoluble fraction of the lysate from induced cells.

### 2.3 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的亲亲和纯化

为了同时回收菌体内以可溶及不溶形式存在的 His-DnaB-hBNP 融合蛋白,我们在变性还原条件下 (25mmol/L Tris-HCl, 6mol/L 盐酸胍, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 0.5mol/L NaCl, pH7.9) 用超声波裂解菌体,使菌体表达的融合蛋白彻底溶解。裂解液上样至 Ni-Sepharose 亲和柱后,先用低浓度的咪唑 (20mmol/L) 及高浓度的盐 (0.5mol/L NaCl) 洗去非特异性吸附的杂质成分,再通过提高咪唑浓度使融合蛋白洗脱。从每升细菌培养液中可回收 His-DnaB-hBNP 融合蛋白 62mg,纯度达到 83% (图 5)。

### 2.4 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的复性

在变性纯化条件下,融合蛋白中的 dnaB 蛋白内含子不能形成活性构象,因而没有蛋白质剪接功能。此外, hBNP 也须形成二硫键才具有生物活性。我们采用稀释法对融合蛋白进行复性处理,并在复性液中加入氧化型和还原型谷胱甘肽,促进融合蛋白中的二硫键形成。His-DnaB-hBNP 融合蛋白的复性效率可达 63%。

### 2.5 His-DnaB-hBNP 融合蛋白的浓缩和裂解

BNP 的等电点为 10.9,对 CM-纤维素具有很强的静电吸附力,因此可使用 CM-阳离子交换层析对复性的融合蛋白进行浓缩。上样完毕,用 pH6.5 的磷酸缓冲液洗涤平衡 CM-纤维素柱,从而启动 dnaB 蛋白内含子的自我剪接反应活性。在 25°C 放置 16h 后, dnaB 的剪接反应基本完成。此时用洗涤缓冲液可将融合蛋白中释放出来的 His-DnaB 从 CM-纤

维素柱上去除,而仍吸附在 CM-纤维素柱上的 hBNP 则通过提高盐浓度进行洗脱 (图 5)。从每升培养液可制备得到 hBNP 6.7mg,其纯度达 56%。

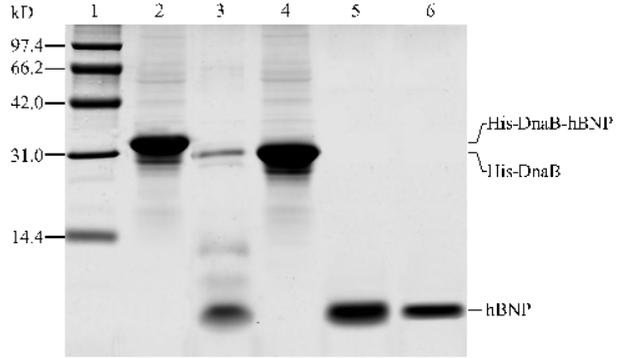


图5 Tricine SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 hBNP 的纯化

Fig.5 Analysis of hBNP purification by Tricine SDS-PAGE

1: molecular weight marker; 2: His-DnaB-hBNP fusion protein purified with Ni-Sepharose; 3: hBNP purified with CM-cellulose after released from His-DnaB-hBNP fusion protein; 4: His-DnaB eluted from CM-cellulose; 5: hBNP purified with C4 reverse phase HPLC; 6: hBNP standard.

### 2.6 hBNP 的反相高效液相色谱 (RP-HPLC)

从 CM-阳离子交换层析柱洗脱的 hBNP 样品进一步用制备型 C4 反相高效液相色谱柱纯化 (图 6), hBNP 在 29.5% 的乙腈梯度时被洗脱。收集的 hBNP 样品在 Tricine SDS-PAGE 上呈现一条带 (图 5),用分析型 C18 反相色谱柱测定其纯度达到 97% (图 7)。从 1L 大肠杆菌培养液中可获得 hBNP 样品 2.8mg。

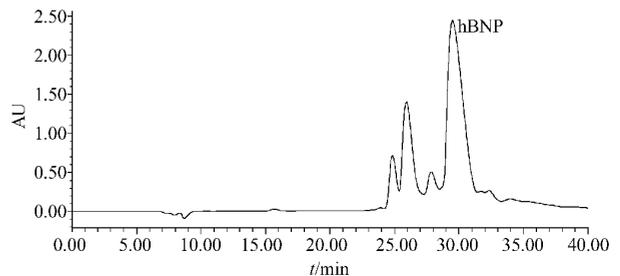


图6 用 C4 反相 HPLC 纯化 hBNP

Fig.6 hBNP purification with C4 reverse phase HPLC

### 2.7 hBNP 的鉴定

hBNP 与化学合成的 BNP 标准品在 Tricine SDS-PAGE 具有相同的迁移率 (图 5)。hBNP 在分析型 C18 反相色谱柱的保留时间为 20.8min,与化学合成的 BNP 标准品相同 (图 7)。活性测定结果显示, hBNP 和化学合成的 BNP 标准品对兔胸主动脉条均具有强烈的血管舒张效应,二者的  $EC_{50}$  分别为  $1.94 \times 10^{-6}$  mg/mL 及  $2.12 \times 10^{-6}$  mg/mL,说明我们制备的

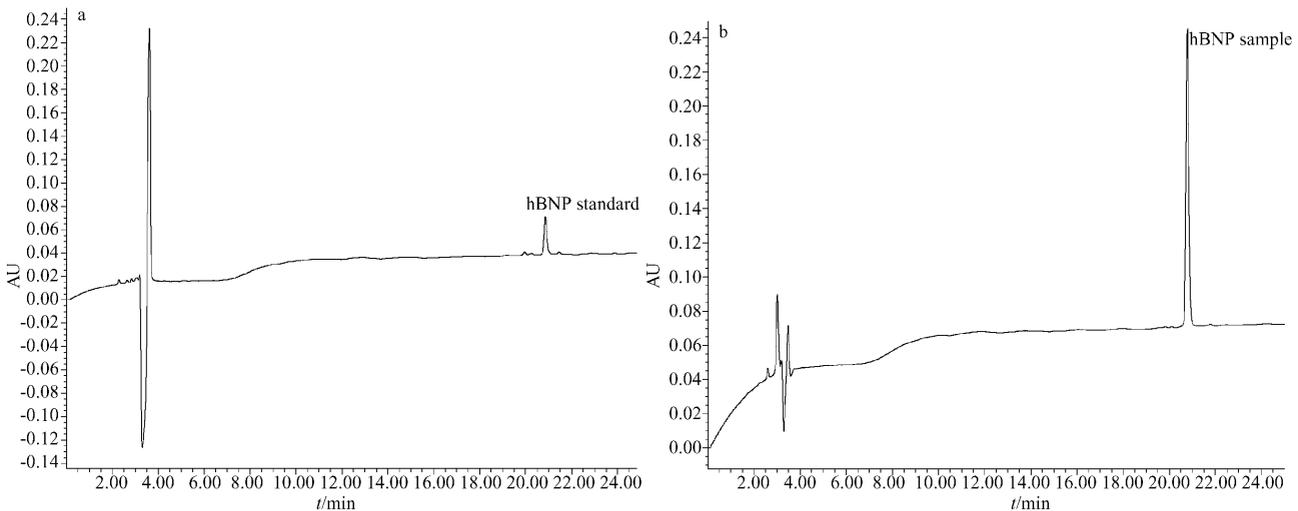


图 7 用 C18 反相 HPLC 分析 hBNP

Fig. 7 Analysis of hBNP with C18 reverse phase HPLC

(a) hBNP standard ; (b) hBNP purified by C4 reverse phase HPLC.

hBNP 样品具有和 BNP 标准品相似的生物活性。

### 3 讨论

与目前常用的治疗心衰竭的药物相比, hBNP 具有疗效快, 副作用小, 不产生药物依赖性等特点。由于 hBNP 分子中没有糖基化或磷酸化位点, 因此我们选用大肠杆菌表达系统来制备 hBNP。大肠杆菌作为表达宿主菌, 具有操作方便, 表达效率高, 生产成本低廉等优点。但在大肠杆菌中单独表达低分子量多肽时存在翻译效率低, 表达产物不稳定, 易受蛋白水解酶降解, 纯化工艺复杂等缺陷<sup>[13]</sup>。目前人们一般采用两种方法克服上述不足, 一是通过融合蛋白表达, 二是通过多肽基因串联表达。但上述两种方法在制备低分子量多肽时, 均须通过蛋白水解酶或化学裂解试剂处理以获得目标多肽单体。

特异性的蛋白水解酶通常价格比较昂贵, 并且有时存在非特异性的酶解作用<sup>[14]</sup>。而化学裂解试剂的反应条件一般比较剧烈, 往往引起目标肽段的化学修饰或结构破坏, 导致小肽产率的降低或生物活性的丧失<sup>[15]</sup>。

孙自勇等用对蛋白质折叠具有促进作用的硫氧化-还原蛋白 (Trx) 作为表达 hBNP 的载体蛋白。Trx-hBNP 融合蛋白在菌体内主要以可溶形式存在, 经 Zn-sepharose 亲和纯化后, 用肠激酶将 hBNP 从融合蛋白中释放出来<sup>[16]</sup>。该方法的优点是融合蛋白不需经复性处理, 缺点是在制备过程中必须使用昂贵的高纯度的肠激酶。

本文选用 dnaB 微型蛋白内含子作为表达 hBNP

的载体蛋白, 它介导的 C-末端剪切作用呈现温度和 pH 依赖性, 在 25℃ 及 pH 6.0~7.5 区间具有较高的剪切效率, 剪切反应条件温和且易于操作。

DnaB-hBNP 融合蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达。由于菌体中的融合蛋白在可溶和不溶部分均有分布, 因此我们选择在变性条件下用超声波裂解细菌, 这样原先无论是可溶或不溶的融合蛋白均可被 Ni-Sepharose 吸附并纯化, 从而提高融合蛋白的回收效率。

在变性条件下纯化的融合蛋白必须经复性处理才能使 His-DnaB-hBNP 形成活性构象并使 Ssp dnaB 蛋白质内含子恢复剪接活性。我们选用 CM-纤维素柱对融合蛋白复性样品进行浓缩富集, 且通过改变柱内的 pH 至 6.5 并在室温放置 16h 来诱导蛋白质内含子的剪切作用。利用 His-DnaB (pI 6.6) 和 hBNP (pI 10.9) 在 CM-纤维素柱上吸附能力的差异, 用不同离子强度的缓冲液进行洗脱, 从而使 hBNP 得到了很好的分离和纯化。

随着越来越多的小肽药物的问世, 采用重组 DNA 技术研发低成本的小肽生产系统已引起人们极大的兴趣。对由 25 个以上氨基酸残基组成的多肽而言, 采用基因工程制备的成本通常低于化学合成<sup>[17]</sup>。此外, 化学合成往往还会造成环境污染。在本研究中, 我们用 Ssp dnaB 蛋白质内含子作为载体蛋白制备了具有生物活性的 hBNP, 该制备方法的一个特点是在使目标多肽从融合蛋白中释放时无须采用蛋白水解酶或化学裂解试剂。上述结果说明微型蛋白质内含子对低分子量多肽的生产制备具有重要

价值。

致谢 在实验和论文写作过程中,得到了南京大学分子医学研究所孙自勇教授的指导与帮助,在此表示衷心的感谢。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature*, 1988, **332**: 78 – 81
- [ 2 ] Colucci WS, Elkayam U, Horton DP *et al.* Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. *The New England of Medicine* 2000, **343**: 246 – 253
- [ 3 ] Yoshimura M, Yasue H, Morita E *et al.* Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 1991, **84**: 1581 – 1588
- [ 4 ] Abraham WT, Lowes BD, Ferguson DA *et al.* Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 1998, **4**: 37 – 44
- [ 5 ] David R, Richter MP, Beck-Sickinger AG. Expressed protein ligation. Method and applications. *Eur J Biochem*, 2004, **271**: 663 – 677
- [ 6 ] Xu MQ, Paulus H, Chong S. Fusions to self-splicing inteins for protein purification. *Methods in Enzymology*, 2000, **326**: 376 – 418
- [ 7 ] Noren CJ, Wang J, Perler FB. Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications. *Angew Chemi Int Ed Engl*, 2000, **39**: 450 – 466
- [ 8 ] Evans TC Jr, Benner J, Xu MQ. The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 18359 – 18363
- [ 9 ] Burbulis I, Yamaguchi K, Gordon A, Carlson R, Brent R. Using protein-DNA chimeras to detect and count small numbers of molecules. *Nature Methods*, 2005, **2**: 31 – 37
- [ 10 ] Xu MQ, Evans TC Jr. Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. *Methods*, 2001, **24**: 257 – 277
- [ 11 ] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Alal Biochem*, 1987, **166**: 368 – 379
- [ 12 ] Baumanis V, Jansone I, Skangals A, Mandrika I, Berzins V. Synthesis of recombinant atrial natriuretic peptide (rANP) using hybrid fusion protein-phage fr coat/ANP (CP/ANP). *Peptides*, 1997, **18**: 1229 – 1235
- [ 13 ] Gottesman S. Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, 1989, **23**: 163 – 198
- [ 14 ] Chong S, Montello GE, Zhang A *et al.* Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Research*, 1998, **26**: 5109 – 5115
- [ 15 ] Nygren PA, Stahl S, Uhlen M. Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol*, 1994, **12**: 184 – 188
- [ 16 ] Sun ZY (孙自勇), Zhu ZH (朱镇华), Chen JY (陈均勇). Expression, purification and characterization of recombinant human natriuretic peptide in *E. coli*. *Journal of Nanjing University (南京大学学报)*, 2004, **40**: 34 – 40
- [ 17 ] Latham PW. Therapeutic peptides revisited. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 755 – 757