

融合牛肠激酶轻链 EK_L 包涵体蛋白的复性纯化

Refolding of the Fusion Protein of Recombinant Enterokinase Light Chain rEK_L

易进华^{1,2*} 张元兴¹

YI Jin-Hua^{1,2*} and ZHANG Yuan-Xing¹

1 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 上海复旦张江生物医药股份有限公司, 上海 201203

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

2 Shanghai Fudan-Zhangjiang Bio-Pharmaceutical Co., Ltd, Shanghai 201203, China

摘 要 大肠杆菌高密度发酵表达肠激酶轻链融合蛋白 DsbA- rEK_L , 主要以包涵体形式存在。包涵体经 4mol/L 尿素和 0.5% Triton X-100 洗涤, 以 6mol/L 盐酸胍、100mmol/L DTT 溶解, 在胱氨酸存在下, 以脉冲加样方式复性。融合蛋白复性在 6mmol/L 胱氨酸存在下、脉冲加量 0.03mg/mL 和复性终蛋白浓度 0.3mg/mL 为最佳复性方案。复性的融合蛋白加 2mmol/L $CaCl_2$ 后快速自切。经 IDA-Sepharose 及 Q-Sepharose 纯化, rEK_L 纯度可达 95% 以上, 可高效酶切重组瑞特普酶融合蛋白 Trx-rPA。实现了大规模生产 rEK_L , 每升发酵液经复性及纯化后, 可得 rEK_L 60mg/L 以上, 使以融合蛋白表达 rPA 等药用蛋白成为现实。

关键词 融合蛋白, 肠激酶, 复性, 包涵体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0811-05

Abstract The fusion protein of enterokinase light chain, DsbA- rEK_L , was expressed mainly in inclusion body in *E. coli*. The recombinant bacteria was fermented to high density, with high expression of the fusion protein. After being washed with 0.5% Triton X-100 and 4mol/L urea, the inclusion body was dissolved in 6mol/L guanidine and 100mmol/L DTT, derivatized by cystine and refolded by pulse refolding. The strategy of pulse refolding involved the addition of 0.03mg/mL of fusion protein until its final concentration reached 0.3mg/mL. The refolded protein was autocleaved and the active EK_L molecule was released after adding 2mmol/L $CaCl_2$. Using the two-step purification processes of IDA-Sepharose chromatography and Q-Sepharose chromatography, the purity of rEK_L was found to be above 95%, with a high activity to cleave the recombinant reteplase fusion protein Trx-rPA. The yield of purified rEK_L was more than 60mg/L of cultures. As a result, the therapeutic proteins like rPA could be produced on a large-scale in a way such as expressed in the form of fusion proteins.

Key words fusion protein, enterokinase, refolding, inclusion body

以融合蛋白形式表达蛋白质或多肽是基因工程研究中一种重要的手段。将要表达的目的蛋白连接在宿主可以稳定表达的蛋白融合头(Fusion tag)3'端, 由后者提供稳定表达所需的信号, 表达出的融合

蛋白含有融合头。为使表达的蛋白具有完全正常的功能, 如作为药物使用等, 须将融合头切去^[1]。早期较多采用化学裂解法去除融合头, 但化学裂解位点一般不专一, 另外裂解的化学试剂有可能对目的蛋

白产生不必要的修饰,因此化学裂解法逐渐为酶法所取代^[2]。

基因工程融合蛋白融合头与目的蛋白之间的连接肽一般都含有特异性蛋白酶识别位点的序列,常用的特异性蛋白酶有 Xa 因子、凝血酶和肠激酶。肠激酶(Enterokinase, EK)识别的序列为(Asp)₄-Lys, 具有较高的专一性,酶切反应的条件比较温和,一定浓度的蛋白质变性剂如尿素等对酶活性影响不大,在较广的范围内如 pH4.5~9.5、4~45℃条件下亦能有效地酶切融合蛋白,此外 EK 酶切位点在识别序列的 C-末端,可以得到完整的蛋白。因此在基因工程制药领域 EK 成为融合蛋白表达时下游纯化的首选工具酶之一。

从牛和猪十二指肠纯化的 EK 是二硫键相连的异源二聚体。化学修饰分析表明 EK 分子中组成丝氨酸蛋白酶活性中心的 Ser、His 和 Asp 等都位于轻链 Light 和 Fonsa 等^[3]将牛 EK 部分还原,分离的轻链具有 EK 的酶活性与底物专一性。Collins-Racie 等^[4]首先以 DsbA-连接序列-rEK_L 融合蛋白的形式在 *E. coli* 中表达 EK_L,纯化后的融合蛋白自切得到的 EK_L 具有完整的 EK 酶活性,但收率很低。毕赤酵母(*P. pastoris*)也可分泌表达 EK_L,表达量比 *E. coli* 高,但经纯化也仅可得 6.3mg/L 发酵液^[5]。

商品的 EK 酶价格较高,难以应用于生产药用蛋白质。本研究表明构建了的 rEK_L 融合蛋白在 *E. coli* 表达系统中,虽然表达载体 pET39b(+)-EK_L 是一个分泌型表达载体,低温发酵时有可溶性的融合蛋白产生,但可溶部分比例很低,融合蛋白主要以包涵体形式存在。因此需要对 rEK_L 融合蛋白包涵体进行复性纯化研究,以获得大量的 EK_L,使以融合蛋白形式生产药用蛋白成为可能。

1 材料和方法

1.1 工程菌株

大肠杆菌菌株 BL21(DE3)pET39b(+)-EK_L,本实验室保存。

1.2 BL21(DE3)pET39b(+)-rEK 菌的发酵及表达

取 -80℃ 保存的甘油种子,于含 50μg/mL 卡那霉素的 10mL LB 培养基中,30℃ 和 150r/min 培养过夜作为一级种子。将一级种子转接于含 50μg/mL 卡那霉素的 500mL LB 培养基中,37℃ 和 250r/min 培养至 OD₆₀₀ 达到 1.0~2.0 作为二级种子。将二级种子转接于 8L 基础培养基中,控制发酵温度为 35℃,空

气流量 10L/min,罐压 0.01MPa,以自动调节转速控制溶解氧 30%,以 2mol/L 氨水调节 pH6.0~7.0。当 pH 开始升高,流加补料培养基,控制 pH6.0~7.0。当 OD₆₀₀ 大于 20 时,加入 IPTG (Inalco 公司产品)至 0.5mmol/L,继续培养 4h,停止发酵。菌液在 4000 r/min 下离心 20min,收集菌体备用。

1.3 包涵体复性

取湿菌体,加入破菌液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2mmol/L EDTA),冰浴,超声 5min/次,共 4 次。10 000r/min 下离心 15min,取沉淀。以洗涤液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 4mol/L 尿素)洗涤,离心,10 000r/min, 15min,取沉淀。重复洗涤 1 次。

取上述包涵体,加缓冲液 A(6mol/L Gdm-HCl, 20mmol/L Tris-HCl, pH8.5, 100mmol/L DTT),室温搅拌 3h。8000r/min, 10min,取上清。以 2mol/L HCl 调 pH3.0,对冷水(4℃)充分透析。分别加相应试剂,配制成含 8mol/L Urea, 50mmol/L Tris-HCl, pH8.5, 5mmol/L 胱氨酸的溶液,25℃, 2h。2mol/L HCl 调 pH3.0,对冷水(4℃)充分透析。

取上述衍生透析液,按每次增加 0.03mg/mL 的量,以脉冲方式加至缓冲液 B(0.7mol/L 精氨酸, 5mmol/L 半胱氨酸, 1mol/L Tris-HCl, pH8.6)中,间隔 30min,共 10 次,复性溶液的最终蛋白质浓度为 0.3mg/mL。10℃ 放置 20h 以上。以分子量截留值 30kD 的膜超滤浓缩,并对缓冲液 C(20mmol/L Tris-HCl, pH7.4)充分透析。加入 CaCl₂ 至 2mmol/L, 10℃ 放置 15min。离心,取上清备用。

1.4 层析纯化

IDA-Sepharose (Amersham Pharmacia),以 1.5 床体积的 0.1mol/L NiSO₄ 溶液洗涤,以蒸馏水洗涤 5 个床体积,以含 20mmol/L 咪唑的缓冲液 C 平衡柱备用。将上述复性溶液加咪唑至 20mmol/L 过柱,并以含 20mmol/L 咪唑的缓冲液 C 洗涤,收集 A₂₈₀ ≥ 0.1 的流出液。

Q-Sepharose (Amersham Pharmacia)以缓冲液 C 平衡柱,并将上述 IDA-Sepharose 层析收集液过柱,以缓冲液 C 洗涤至流出液 A₂₈₀ ≤ 0.05。以含 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液 C 洗脱,收集 A₂₈₀ ≥ 0.1 的流出液。

1.5 rEK_L 酶解 Trx-rPA

将 Trx-rPA (本实验室制备)的浓度调整为 0.1mg/mL,对酶切缓冲液(0.1mol/L 精氨酸, 0.2% Tween

20, 20mmol/L NaAC-HAC, pH 5.0)充分透析,按 Trx-rPA:rEK_L = 500:1(W/W)加入 rEK_L, 10℃放置 16h。

1.6 蛋白质浓度测定

以 Bradford 法测定蛋白浓度,BSA 为标准品。

1.7 SDS-PAGE

参照 Laemmli 的方法进行,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12.5%,以考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

2 结果

2.1 融合蛋白 DsbA-rEK_L 的表达

融合蛋白表达的关键在于细菌比生长速率的控制,较慢的生长速率会有较高的表达。当比生长速率大于 $0.5h^{-1}$ 时,表达量较低(图 1)。将比生长速率控制在 $0.2 \sim 0.3h^{-1}$,可以得到高密度发酵及高表达。IPTG 的浓度在一定范围内对表达量的影响不大,较高的 IPTG 浓度对细菌有一定毒性,表现为诱导后菌体生长减慢,高密度发酵时 IPTG 的最适加量为 $0.5 \sim 1mmol/L$ 。IPTG 诱导后,30min 即有融合蛋白产生,但诱导后 3h 到 5h,融合蛋白的表达量变化不大(图 2)。

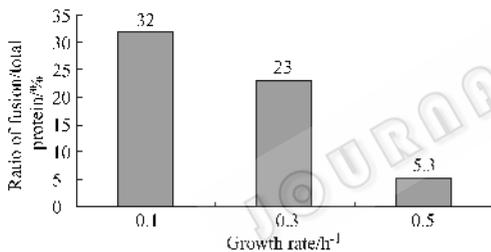


图 1 重组菌在不同比生长速率下的融合蛋白 DsbA-rEK_L 产量

Fig.1 Effect of the growth rate on the yield of fusion protein

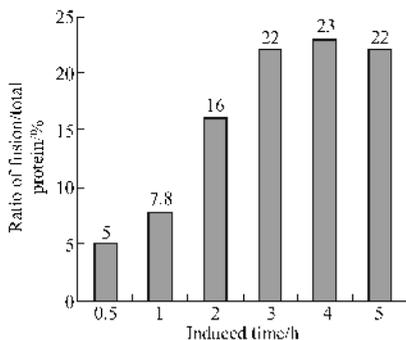


图 2 IPTG 诱导时间对 DsbA-rEK_L 产量的影响

Fig.2 Effect of the induced time of IPTG on the yield of the fusion protein

2.2 胱氨酸衍生对复性的影响

经破菌及洗涤后,包涵体蛋白中 DsbA-rEK_L 的

纯度为 50% 以上(图 3),可直接用于复性。

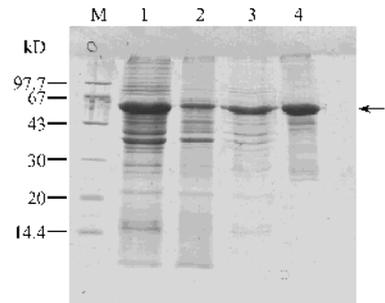


图 3 DsbA-rEK_L 包涵体洗涤

Fig.3 Washing inclusion body of DsbA-rEK_L

M: protein marker; Lane 1: pellete of lysates; 2, 3: supernatant of washing; 4: precipitate of washing; arrow: fusion protein, 55kD.

各取包涵体溶解、透析好的等份溶液,分别加相应试剂,配制成含 $8mol/L$ 尿素, $50mmol/L$ Tris, pH8.6 的溶液,其中胱氨酸的浓度分别为 0、3、6 及 $9mmol/L$, $25^{\circ}C$ 2h。脉冲稀释复性及加入 $CaCl_2$ 后,直接取样,加至含 Trx-rPA 的酶切缓冲液中, $10^{\circ}C$ 放置 16h。Trx-rPA 是 rPA 的重组融合蛋白,分子量 $57kD$, rPA 置于连接序列的 EK 酶切位点(Asp)₄-Lys 之后, EK 酶切 Trx-rPA 可释放 $39.6kD$ 的 rPA 和 $18kD$ 的融合头,因此,可以 Trx-rPA 酶切的效果评价 rEK_L 复性的效率。结果胱氨酸浓度越高的复性液,酶切效率也越高,而不加胱氨酸处理,则酶切效率最低(图 4 A)。若酶切反应后样品中 Trx-rPA 残留的量以 SDS-PAGE 胶密度扫描的面积百分比 A_1 表示, A_0 和 A_3 分别表示不加和加 $3mmol/L$ 胱氨酸复性的酶切反应后样品中的 Trx-rPA 含量,余类推。以 $(1 - A_1) / (1 - A_0)$ 表示相对复性效率,则加胱氨酸浓度至 $9mmol/L$ 时,相对复性效率可达 18.4 倍;当胱氨酸浓度为 $6mmol/L$ 以上时,相对复性率大致相同(图 4 B)。

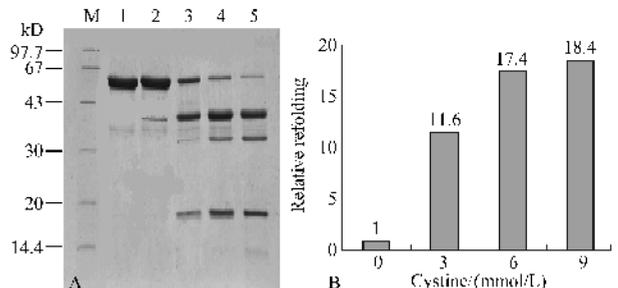


图 4 胱氨酸浓度对复性的影响

Fig.4 The effect of the cystine concentration on the refolding A: analysis of SDS-PAGE. M: molecular marker; 1: control; 2: without cystine; 3: $3mmol/L$; 4: $6mmol/L$; 5: $9mmol/L$. B: calculating the relative refolding efficiency based on the area of differential scanning calorimetry.

2.3 脉冲每次加量对复性的影响

经变性透析后的溶液,分别按每次增加 0.005mg/mL、0.01mg/mL、0.03mg/mL、0.06mg/mL、0.09mg/mL 及 0.12mg/mL 的量,加入复性缓冲液中,复性液蛋白终浓度为 0.36mg/mL。10℃放置 20h。复性结束及加入 CaCl₂ 后,直接取样,加至含 Trx-rPA 的酶切缓冲液中,10℃放置 16h 以上。结果每次加量越小,酶切 Trx-rPA 的效果越好(图 5 A)。同上述 2.2 评价胱氨酸浓度对复性的影响类似,以每次增加 0.12mg/mL 的复性溶液作为基准,计算相对复性效率。当每次加量为 0.005mg/mL 时,复性效率可增加 70%(图 5 B)。

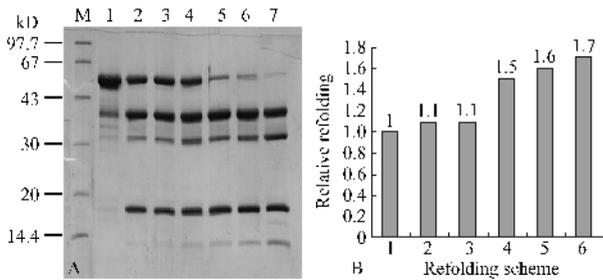


图 5 脉冲每次加量对复性效率的影响

Fig.5 The effect of pulse addition on the refolding efficiency at 0.36 mg/mL end protein

A SDS-PAGE analysis. M: protein marker; 1: control; 2: 0.12mg/mL; 3: 0.09mg/mL; 4: 0.06mg/mL; 5: 0.03mg/mL; 6: 0.01mg/mL; 7: 0.005mg/mL. B: calculating the relative refolding efficiency based on the area of differential scanning calorimetry.

以脉冲加量为 0.03mg/mL,分别测试复性溶液蛋白终浓度分别为 0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL 和 0.5mg/mL 时的复性效率。随复性溶液蛋白终浓度的升高,单位复性蛋白浓度的复性效率降低,但考虑到有效利用复性液,因此选择复性溶液蛋白终浓度为 0.3mg/mL(图 6)。

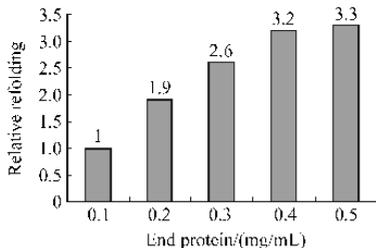


图 6 复性液蛋白终浓度对复性效率的影响

Fig.6 The effect of end protein on the relative refolding efficiency

2.4 rEK_L 的分离纯化

复性自切后,融合蛋白裂解为 35kD 的 rEK_L 及

融合头,自切比较完全。融合头带有 His₆ 序列,在 IDA-Sepharose 上亲和吸附较强,而在 20mmol/L 咪唑条件下,IDA-Sepharose 不能吸附 rEK_L,因此 rEK_L 在上样流出液中。IDA-Sepharose 以 0.4mol/L 咪唑处理,收集液 SDS-PAGE 检测,无明显 rEK_L。Q-Sepharose 层析,既可浓缩 rEK_L,又有进一步纯化作用。0.5mol/L NaCl 洗脱收集液中,rEK_L 的纯度大于 95%,适于从融合蛋白制备药用蛋白(图 7)。

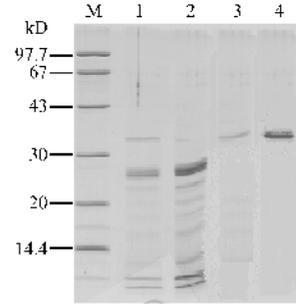


图 7 IDA-Sepharose 和 Q-Sepharose 层析纯化

Fig.7 Purification by IDA-Sepharose and Q-Sepharose chromatography

M: protein marker. 1: auto-cleaved of refolded protein; 2: eluate of IDA-Sepharose by 0.4mol/L imidazole; 3: breakthrough of IDA-Sepharose; 4: eluate of Q-Sepharose by 0.5mol/L NaCl; arrow: rEK_L, 35kD.

2.5 rEK_L 酶解 Trx-rPA

纯化获得的 rEK_L 专一性裂解融合蛋白 Trx-rPA,酶切效率 85% 以上,释放 39.6 kD 处的单链 rPA(图 8)。

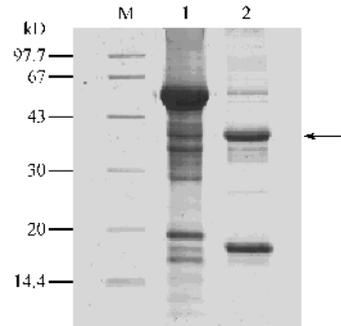


图 8 rEK_L 酶切 Trx-rPA

Fig.8 Cleavage of Trx-rPA by rEK_L

M: protein marker; 1: control; 2: after cleaving; arrow: sc rPA, 39.6kD.

3 讨论

构建 DsbA-rEK_L 融合蛋白在 *E. coli* 中表达 EK_L,目的是获得可溶的、具有生物活性的 rETL 蛋

白。我们的研究表明 37℃ 表达时,几乎无可溶形式的融合蛋白产生。以 LB 培养基 200mL 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 左右时,将温度降低至 30℃,加 IPTG 0.5mmol/L 诱导 12h,收集菌体,超声波破菌,10 000r/min 离心 10min,上清液中融合蛋白的比例很低,主要的融合蛋白在沉淀中,这与文献的报道一致^[4]。因此,只收集并纯化可溶形式的融合蛋白无实际意义。

牛 EK_L 含有 8 个 Cys,因此 DsbA-rEK_L 融合蛋白容易形成包涵体,而且包涵体也难以溶解。我们在实验中发现,使用 9mol/L 尿素、100mmol/L DTT,仍有较多的包涵体不能溶解。使用 6mol/L 盐酸胍、100mmol/L DTT 可溶解大部分 DsbA-rEK_L 包涵体。将溶解的包涵体溶液调 pH3.0 后对冷水透析,一是低 pH 下-SH 及-S-S-比较稳定,另一方面透析除去 DTT,可使下一步操作受到的干扰较小。融合蛋白复性时先以胱氨酸处理,可使复性收率提高至少 10 倍以上,这可能是胱氨酸的处理减少了错配的二硫键^[6]。融合蛋白正确折叠的几率增加。以 GSSG 代替胱氨酸,复性的收率稍高,但考虑到 GSSG 价格要贵几十倍,因此复性时还是以胱氨酸为最佳。

脉冲稀释复性是 DsbA-rEK_L 包涵体蛋白复性的最佳方式,倍比稀释或连续流加等方式复性,复性的效率要低很多。考虑到该融合蛋白中含有 His₆ 序列,尝试过利用金属螯和层析在柱上复性,结果也不成功。比较 pH8.0、8.6 及 9.3 三个条件下的复性情况,pH8.6 复性要好。脉冲每次加量越小,则复性效率越高,但复性加样的时间更长,实际无法控制,因此选择脉冲每次加量为 0.03mg/mL。另外,复性溶液蛋白终浓度为 0.3mg/mL,是综合考虑单位蛋白浓度的复性效率及复性缓冲液的有效利用的最佳方式。本研究按此方式复性,每升发酵液(发酵终止时菌液 OD₆₀₀ 为 30 左右时)经纯化可得纯度 95% 以上的 rEK_L 达 60mg 以上。

包涵体蛋白的纯度对融合蛋白复性的影响较大,包涵体蛋白纯度 35% 时,按脉冲每次加量 0.03mg/mL,复性溶液蛋白终浓度 0.3mg/mL 进行,相对复性效率只达包涵体较好洗涤(纯度 50% 以上)的 40%。本研究以 4mol/L 的尿素和 0.5% Triton X-100 洗涤包涵体,融合蛋白有一定的损失,可能是洗涤液溶解了部分包涵体蛋白,但降低尿素和 Triton

X-100 的浓度,洗涤效果不好。此外,融合蛋白的连接序列部分含有 His₆ 序列,因此金属螯合层析进行包涵体蛋白的纯化也是一种选择,但这将明显延长生产时间,增加生产成本。

我们也尝试以 Trx-EK_L 融合的方式表达 EK_L,以 LB 培养基小试时表达量可达 30% 以上,但表达的融合蛋白主要是以包涵体形式存在。这种方式的融合蛋白,按本研究所述的方法进行体外复性,复性收率很低。可能 DsbA 作为二硫键异构酶,对融合蛋白 DsbA-rEK_L 的正确折叠有一定的促进作用。

Trx-rPA 是硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)与 rPA 的融合蛋白,两者之间的连接序列中含有 EK 的酶切识别位点^[7],因此选择 Trx-rPA 作为底物,检测 rEK_L 的生物活性。本研究经复性并纯化后得到的 rEK_L,在酶解 Trx-rPA 时有较高的活性,按蛋白浓度计算,1mg 的 rEK_L 可裂解 500mg 的 Trx-rPA,酶切效率 85% 以上,并且在酶切过程中,单链 rPA 并不会降解为双链 rPA,因此完全满足以融合蛋白 Trx-rPA 制备药用 rPA 的需要。

REFERENCES(参考文献)

- [1] LaVallie ER, Rehemtulla A, Racie LA *et al.* Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J Biol Chem*, 1993, **268**(31): 23311 - 23317
- [2] Nilsson J, Nilsson P, Williams Y *et al.* Competitive dilution of protein A fusions allows specific recovery under mild conditions. *Eur J Biochem*, 1994, **224**: 103 - 108
- [3] Light A, Fonseca P. The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J Biol Chem*, 1984, **259**(21): 13195 - 13198
- [4] Collins-Racie LA, McColgan JM, Grant KL *et al.* Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Bio/Technol*, 1995, **13**: 982 - 987
- [5] Vozza LA, Wittwer L, David R *et al.* Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technol*, 1996, **14**: 77 - 81
- [6] Wetlaufer DB, Branca PA, Chen GX. The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential. *Protein Eng*, 1987, **1**(2): 141 - 146
- [7] Su Y(苏勇), Yi JH(易进华), Li J(李军) *et al.* Expression of human tissue-type plasminogen activator derivative fused with thioredoxin cDNA in *E. coli*. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展) 2000, **20**(6): 63 - 67