

## 鼠羧肽酶原 B 在毕赤酵母中的表达、纯化与鉴定

# Expression, Purification and Characterization of Rat Procarboxypeptidase B in *Pichia pastoris*

王德解<sup>1,2</sup>, 苗 林<sup>2</sup>, 陈 宏<sup>3</sup>, 李彦英<sup>2</sup>, 陈惠鹏<sup>2</sup>, 方宏清<sup>2\*</sup>

WANG De-Jie<sup>1,2</sup>, MIAO Lin<sup>2</sup>, CHEN Hong<sup>3</sup>, LI Yan-Ying<sup>2</sup>, CHEN Hui-Peng<sup>2</sup> and FANG Hong-Qing<sup>2\*</sup>

1. 江西科技师范学院生命科学学院 南昌 330013

2. 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071

3. 西北农林科技大学动物科技学院 陕西 杨凌 712100

1. College of Life Sciences, Jiangxi Sci-Tech Normal University, Nanchang 330013, China

2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, ShaanXi 712100, China

**摘 要** 为了在毕赤酵母中表达鼠羧肽酶原 B (procarboxypeptidase B, proCPB) 蛋白, 以 RT-PCR 法从 SD 鼠胰腺细胞中克隆了 *proCPB* 基因, 将其插入 pPIC9 载体, PEG1000 介导转入毕赤酵母 GS115 细胞, 在甲醇的诱导下, 实现了 proCPB 在毕赤酵母中的成功表达。通过发酵条件的优化, 使用 BMGY (pH6.0) 培养基, 添加 0.5% 的酪蛋白水解物, 于 28℃, 在起始  $OD_{600}$  达 10.0 时, 每隔 12h 补加 0.5% 的甲醇, 重组酵母 GS115-proCPB 表达的产物量可达到最高 (500mg/L), 表达时间可达 120h, 表达的目的蛋白占总蛋白的 94% 以上。通过纯化条件的优化, 采用两步疏水层析, 可使目的蛋白的纯度达 96% 以上, 蛋白得率达 38%, 重组 proCPB 活化后所得 CPB 的比活力可达 110u/mg (CPB 标准品为 180u/mg)。相对分子量测定表明重组蛋白的分子量与理论值极相近, N-端氨基酸测序进一步表明 proCPB 基因在毕赤酵母中得到了正确的表达和翻译后加工修饰。

**关键词** 羧肽酶 B, 毕赤酵母, 表达优化, 蛋白纯化

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0061-06

**Abstract** Carboxypeptidase B is a metalloenzyme, which is widely used for commercial and research purposes. Commercially available CPB purified from porcine or bovine pancreas is very expensive, and is not totally free from other proteases. In order to express the rat proCPB in *Pichia pastoris*, total RNA extracted from SD rat pancreas cells was reversely transcribed to synthesize cDNA, and the *proCPB* ORF was synthesized by PCR. After digestion with *Xho* I and *Eco*R I, the fragment was inserted into pPIC9, and the recombinant plasmid was named as pPIC9-proCPB. By digestion with *Sac* I, the lined pPIC9-proCPB was transformed into *Pichia pastoris* strains GS115 with PEG1000 and integrated into their genomes. In the inducement of methanol, recombinant proCPB was successfully expressed in *Pichia pastoris*, and could be secreted into the supernatant in the culture. After optimizing the fermentation conditions, a higher production could be obtained when GS115-proCPB was induced in BMGY (pH6.0) at 28℃, with addition of 0.5% casein. The yield of recombinant protein reached 500mg/L, achieving over 94% of

Received: August 3, 2006; Accepted: September 7, 2006.

This work was supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2004AA215172).

\* Corresponding author. Tel: +86-10-66948824; E-mail: fanghongqing@vip.sina.com

国家高技术研究与发展项目基金 (No. 2004AA215172) 资助。

total protein in the culture supernatant. The purity of recombinant CPB can reach 96% after two step phenyl sepharose F F purification, and 38% of total protein can be obtained after optimizing the purification method. Comparing to the specific activity 180u/mg of CPB purchased from Sigma, the specific activity of recombinant CPB is 110u/mg. Mass spectrometry analyses showed the mass of the recombinant CPB was 35.1 kD, which is very close to the theory value 35.2 kD. Amino acid sequencing of N-terminal of recombinant CPB further indicated proCPB was expressed successfully and modified correctly after translation.

**Key words** carboxypeptidase B, *Pichia pastoris*, expression optimization, protein purification

羧肽酶 B (carboxypeptidase B, CPB) 是一类水解蛋白或多肽底物 C-端 Lys 或 Arg 的金属蛋白酶<sup>[1]</sup>。羧肽酶 B 由胰腺细胞分泌, 起初以含信号肽及前肽的前羧肽酶原 B (preprocarboxypeptidase B) 形式存在, 在转运至内质网的过程中被信号肽酶切除掉信号肽而形成无活性的羧肽酶原 B (procarboxypeptidase B, proCPB)。羧肽酶原 B 在小肠经胰蛋白酶特异水解剪切前肽后而被活化<sup>[2]</sup>。成熟的鼠羧肽酶 B 含 307 个氨基酸, 其前体中的信号肽和前肽分别由 13 个氨基酸及 95 个氨基酸组成<sup>[3]</sup>。每摩尔羧肽酶 B 中含一个锌原子, 它是羧肽酶 B 发挥功能活性所必须的。

当前, 羧肽酶 B 已广泛应用于蛋白质、多肽的末端修饰<sup>[4]</sup>, 急性胰腺炎及胰腺植皮排斥的血清标记<sup>[5]</sup>, 尤其在胰岛素原活化为胰岛素的过程中, 羧肽酶 B 是不可缺少的双酶(胰蛋白酶及羧肽酶 B)之一<sup>[6]</sup>。CPB 活性的高低及其稳定性是影响胰岛素原活化得率的重要因素。到目前为止, 商业途径获得的羧肽酶 B 主要从猪胰脏中提取, 使得产品价格昂贵, 同时也不可避免地混杂有其它蛋白酶, 如胰蛋白酶, 胰凝乳蛋白酶。

除了从胰腺组织中直接提取外, 羧肽酶 B 也可通过重组工程途径获得。Eaton<sup>[7]</sup>和 Ventura<sup>[8]</sup>等曾在毕赤 (*Pichia pastoris*) 酵母中分别表达了人血浆羧肽酶原 B 和猪胰腺羧肽酶原 B, 但表达量较低。目前, 国内外有关鼠 CPB 重组表达的研究较少, 仅 Hartman<sup>[9]</sup>、Li<sup>[10]</sup>等研究了鼠 CPB 在大肠杆菌中的原核表达, 但其在真核系统中的表达还未见报道。本实验实现了鼠羧肽酶原 B 全长蛋白在毕赤酵母表达系统中的成功表达, 产物性质稳定, 表达量高达 500mg/L, 重组蛋白的氨基酸序列测序及活性测定结果表明鼠 proCPB 基因在毕赤酵母中实现了正确地表达及后修饰加工过程, 这些结果为规模化生产羧肽酶 B 奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SD 鼠购自军事医学科学院实验动物中心。质

粒 pPIC9, 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ , 毕赤酵母菌株 *P. pastoris* GS115 均为本实验室保存。总 RNA 提取试剂盒及 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒为上海生工公司产品; DNA 回收试剂盒为 Q. Biogene 公司产品; 质粒快速提取试剂盒为 Promega 公司产品。

DNA 聚合酶, T4 连接酶及其它限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品; 酵母抽提物及蛋白胨为 Oxid 公司产品, YNB 为 Difco 公司产品, CPB 标准品及 Biotin 为 Sigma 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

常规分子生物学操作参照《分子克隆实验指南》进行。

**1.2.1 SD 鼠胰腺总 RNA 提取及 cDNA 合成:** 取 SD 鼠新鲜胰脏, 剪碎后液氮速冻, 提取操作按上海生工公司 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒指南进行; 第一 cDNA 链的合成按上海生工公司 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒操作指南进行。扩增目的基因时, 以合成的 cDNA 为模板, 用上游引物 RCPB1 (5' CCGCTCGAGAAAAGACATGCTTCCGAGGAGCAC 3', 含 *Xho* I 位点) 和下游引物 RCPB2 (5' CGGAATCTTAATATAGATGTTCTCGGACATAATT 3', 含 *Eco*R I 位点) 扩增 *proCPB* 基因。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

**1.2.2 重组表达载体的构建与鉴定:** 将以玻璃奶回收的 PCR 扩增目的片段经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后与经相同的酶双酶切的 pPIC9 穿梭载体在 12 $^{\circ}$ C 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取阳性转化子的重组质粒, 进行双酶切及质粒 PCR 鉴定, 鉴定条件与原条件相同, 同时送上海博亚公司进行 DNA 测序。

**1.2.3 酵母细胞的转化、筛选与鉴定:** 按 Invitrogen 公司操作手册, 以 PEG1000 法将经 *Sac* I 线性化后的 pPIC9-*proCPB* 重组质粒转入毕赤酵母 GS115 中, 转化产物涂布选择性 MM 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4d。毕赤酵母 GS115 为 His 缺陷型菌株, 只有重组质粒

pPIC9-proCPB 整合入其基因组中,表达 His 后,菌种才能在不含 His 的选择性平板 MM 或 MD 上生长而起筛选作用。通常,以 Sac I 线性化的重组质粒转化 GS115 后的重组子为 Mut<sup>+</sup>型,即甲醇利用型。筛选时,挑选出既能在 MM 平板生长,又能在 MD 平板上生长的重组子,便为 Mut<sup>+</sup>型。鉴定时,以 Mut<sup>+</sup>型重组子为模板,用原引物按原条件进行 PCR 反应,来确定 GS115 酵母重组子基因组中是否含有外源目的基因。

**1.2.4 重组酵母的诱导表达与分析** 挑取重组酵母单菌落于 YPD 培养基中活化后,接种于 BMGY 培养基中,28℃,220r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 达 1.0 左右,开始以每 24h 一次的速度加入终浓度为 0.5% 的甲醇进行诱导,培养 60h 后,取上清作 SDS-PAGE 电泳分析,筛选出表达量高的菌株。

**1.2.5 表达条件的优化** 选取表达量最高的一株 GS115-proCPB,分别从甲醇诱导浓度、起始诱导菌密度、最适表达时间、添加酪蛋白水解物及 PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride, 苯甲基磺酰氟,一种蛋白酶抑制剂)的浓度 5 个方面进行表达条件的优化。

**1.2.6 表达产物的纯化:**

(1) 重组 proCPB 蛋白的纯化:

将培养菌液离心后,进行 phenyl sepharose FF 疏水层析或 DEAE FF 离子交换层析。疏水层析时,平衡液 A 为 20 mmol/L Tris-HCl,含 1 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0,洗脱液 B 为 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0,离子交换层析时,平衡液 C 为 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0,洗脱液 D 为 20 mmol/L Tris-HCl,含 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0。

(2) 纯化后 proCPB 的活化:

以双缩脲法测定纯化后 proCPB 的浓度,计算出 proCPB 的质量。活化时以 1:200 (trypsin:proCPB) 的质量比加入胰蛋白酶,在 37℃ 反应 2h 后,以终浓度为 0.1 mmol/L 的 PMSF 终止反应。

(3) 活化产物 CPB 的纯化:

活化后的 CPB 也进行 phenyl sepharose FF 疏水层析或 DEAE FF 离子交换层析。各步纯化后的样品进行 SDS-PAGE 电泳,样品纯度分析用 GeneGenius 凝胶成像系统进行。

**1.2.7 重组 CPB 的相对分子质量测定及 N 端氨基酸测序** 纯化后的重组 CPB 经 Sepharacryl S-100 HR 脱盐,收集峰尖,样品送中国医学科学院实验中心进行相对分子质量测定及 N 端氨基酸测序。

**1.2.8 重组 CPB 的活性鉴定** :CPB 活力测定以 1 mmol/L N-马脲酰精氨酸 (Hippuryl-L-Arg, BGA) 为底物,在 25 mmol/L Tris (含 0.1 mol/L NaCl, pH 7.65) 溶液中,常温条件下检测 CPB 与 N-马脲酰精氨酸的反应产物在波长 254 nm 处单位时间内的吸收值变化<sup>[11]</sup>。每隔 30s 读数 1 次,5 min 内吸收值的增值应呈线性,否则酶液应稀释后再测。

## 2 结果

### 2.1 proCPB 基因的克隆

RNA 模板的完整性是获得全长 cDNA 及 PCR 扩增成功的基础。将所提的总 RNA 作甲醛变性琼脂糖电泳,结果如图 1-a 所示,可见有清晰的 28S 及 18S rRNA 条带,二者之比约 2:1,表明 RNA 基本没降解。紫外分光光度计测定 A<sub>260</sub>:A<sub>280</sub> > 1.8,表明其纯度符合逆转录要求。

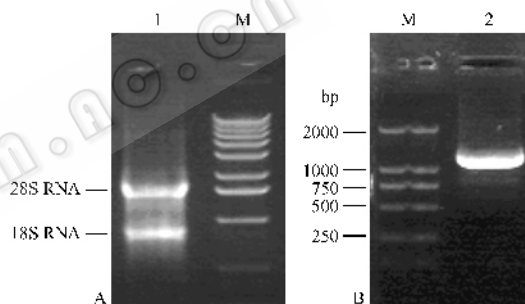


图 1 总 RNA 甲醛变性电泳及 proCPB 基因的琼脂糖电泳

Fig.1 Formaldehyde denatured agarose electrophoresis analysis of total RNA and normal electrophoresis of proCPB gene. M. DNA Marker; 1: Total RNA of SD rat pancreas; 2: Amplification production of proCPB gene.

cDNA 合成时,以总 RNA 为模板,在禽类成髓纤维病毒逆转录酶 (AMV-RT) 催化下,采用热启动法进行。逆转录前先将 RNA 于 70℃ 加热变性 5 min,然后冰浴,逆转录反应在 37℃ 条件下进行 1h。以 cDNA 为模板,用 RCPB<sub>1</sub> & RCPB<sub>2</sub> 引物进行 PCR 扩增,得到一条 1200 bp 左右的条带(图 1-b)。扩增所用的上游引物 RCPB<sub>1</sub> 和下游引物 RCPB<sub>2</sub> 分别引入了 Xho I 和 EcoR I 的酶切位点,可使 PCR 扩增片段插入到 pPIC9 穿梭载体的相应酶切位点中,并保证 proCPB 片段插入到表达载体阅读框内的正确性。

### 2.2 表达载体的构建与鉴定

proCPB 基因的 PCR 扩增片段经 Xho I 和 EcoR I 双酶切,与经相同的酶双酶切后的表达载体 pPIC9 进行连接,转化大肠杆菌 DH5α,重组质粒命名为 pPIC9-proCPB,重组质粒 pPIC9-proCPB 的构建过

程如图 2 所示。鉴定时,提取重组质粒以相应的引物及条件进行 PCR 鉴定,同时用 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定,PCR 扩增出了约为 1200bp 的片段,双酶切时切出了约为 1200bp 的 *proCPB* 基因片段和 8000bp 左右的载体片段(图 3),结果与预期所能得到的片段大小相符。测序结果与预期的序列(GenBank 号:NM\_012533)一致,未发现有碱基突变,鉴定结果说明了表达载体构建的正确性。

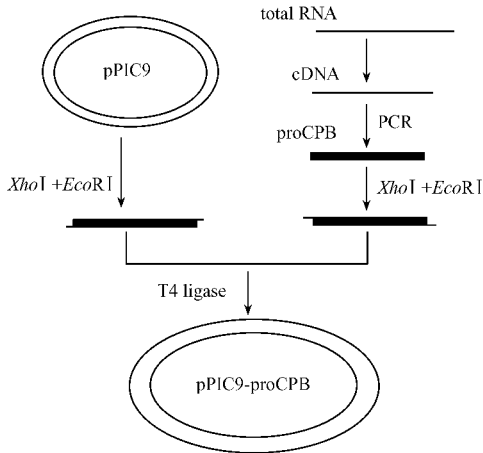


图 2 表达载体 pPIC9-proCPB 的构建示意图

Fig. 2 Construction illustration of pPIC-proCPB expression vector

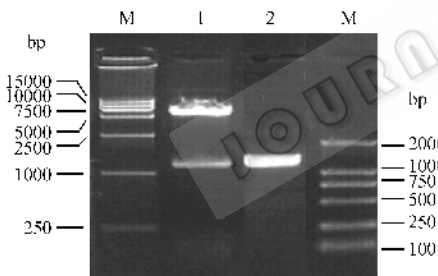


图 3 重组质粒的双酶切及 PCR 鉴定

Fig. 3 Digestion and PCR characterization of pPIC9-proCPB

M: DNA Marker DL15000 and DL2000; 1: digested products by *Eco*R I / *Xho* I; 2: PCR products of *proCPB* gene.

### 2.3 重组酵母的诱导表达及表达条件优化

按 1.2.3 所述方法转化酵母细胞,转化子以 PCR 法鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果表明 90% 的转化子为阳性转化子。从 MD 平板上挑取转化重组子 8 株,根据 Invitrogen 公司提供的 *P. pastoris* 酵母表达操作指南,在 BMGY 培养基中于 28°C, 220r/min 培养至  $OD_{600}$  达 1.0 左右,开始每隔 24h 补加 0.5% (V/V) 甲醇诱导目的蛋白表达,诱导表达 60h 后,离心取上清作 SDS-PAGE 还原电泳,考马斯亮蓝 G-250 染色,选取表达量最高的一株重组子进行表达条件的优化。

在优化表达条件时,分别从甲醇诱导浓度、添加酪蛋白水解物及 PMSF(一种蛋白酶抑制剂)的浓度、最适表达时间、起始诱导菌密度 5 个方面进行。结果显示:每 12h 添加 0.5% 的甲醇诱导时表达量最高,每 24h 添加 1.0% 时次之,每 12h 添加 1.0% 时随后,每 24h 添加 0.5% 的甲醇诱导时表达量最低(图 4 a);在培养基中添加 0.5% 的酪蛋白水解物时,可促进目的蛋白的表达,增至 1.0% 时,无明显差异,添加量达 2.0% 时,表达量反而降低(图 4 b);在培养基中添加 3mM 的 PMSF 时无明显差异,添加 1mmol/L 或 5mmol/L 时表达量反而下降(图 4 c);在诱导 36h 后开始有表达带,且随着诱导时间的延长,表达量呈逐渐增加的趋势,且目的蛋白很少降解,诱导可持续 120h(图 4 d);随着起始菌密度的增加,表达量有增加的趋势,但当起始菌密度达 20  $OD_{600}$  时,表达量反而下降,这可能是引起培养基中溶氧量及营养供应的限制所致(图 4 e)。

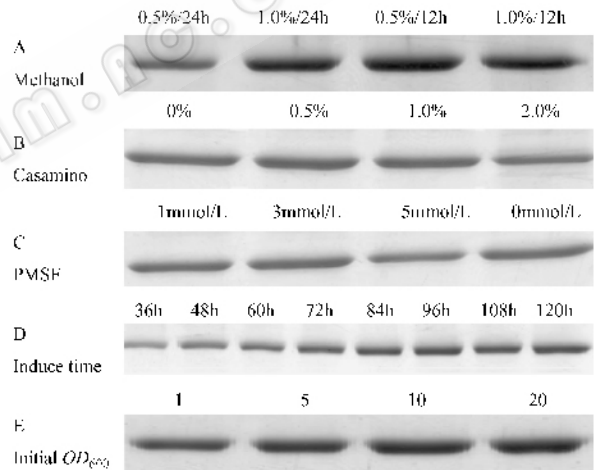


图 4 不同条件下重组酵母表达 *proCPB* 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression supernatant of GS115-proCPB under different conditions

a ~ c: Expression supernatants with different concentration of methanol, casamino acid and PMSF; d: Expression supernatants with different induce time; e: Expression supernatants with different induce initial  $OD_{600}$

### 2.4 表达产物的纯化及优化

重组酵母 GS115-proCPB 诱导后的表达产物按前述方法进行纯化。凝胶薄层扫描分析结果显示,表达上清中的 *proCPB* 占总蛋白的 94%,经活化及 2 步层析后的 CPB 样品纯度可达 96% 以上。表达产物各纯化步骤样品的 SDS-PAGE 结果见图 5。在纯化过程中我们发现,随着纯化步骤的增加,蛋白得率也相应降低。通过分析各步骤的蛋白得率,结合

SDS-PAGE 电泳结果,在优化纯化步骤时省去了两步使蛋白损失极大的离子交换层析,而保留了第一步的疏水层析,因为上清中的色素较易被疏水层析而不是离子交换去除,优化后的蛋白得率由 9.7% 提高到 38%,提高了近 4 倍(结果见表 1)。因为羧肽酶原 B 无活性,须经胰蛋白酶切割前肽后才显示羧肽酶 B 活性,所以没有用总酶活来衡量纯化效果,而是用蛋白得率衡量。

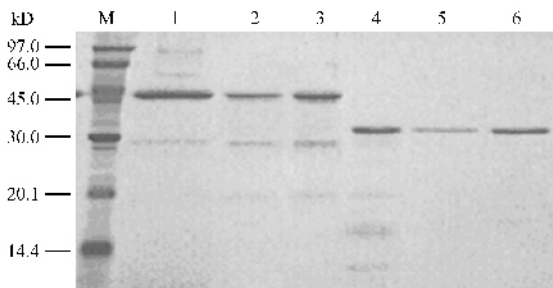


图 5 重组蛋白各步纯化样品的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of proCPB56 and CPB56 after each step purification

M: Low molecular protein marker; 1: Expression supernatant of proCPB; 2: Recombinant proCPB after phenyl sepharose FF; 3: Recombinant proCPB after DEAE sepharose FF; 4: Recombinant CPB after activated by trypsin; 5: Recombinant CPB after phenyl sepharose FF; 6: Recombinant CPB after DEAE sepharose FF.

## 2.5 重组 CPB 的相对分子质量测定及 N 端氨基酸测序

经测定,重组 CPB 的相对分子质量为 35.1kD,与理论值(35.2kD)相差 0.28%。N 端氨基酸测序显示重组 CPB N-端的 4 个氨基酸为 ASGH,与理论值完全相符。

## 2.6 重组 CPB 的活性鉴定

测定时以时间( $t$ )为横坐标, $A_{254}$ 为纵坐标作图,在直线部分任选一个时间间隔( $t$ )与相应的光吸收值变化( $\Delta A_{254}$ ),按如下公式计算 CPB 的活力单位和比活力。

$$\text{酶的活力单位}(u) = \frac{\Delta A_{254}}{t \times 0.12}$$

$$\text{酶比活力单位}(u/\text{mg}) = \frac{\Delta A_{254} \times 1000}{t \times \varepsilon \times 0.12}$$

0.12 为光密度值每增加 0.12 定义为 1 个 BGA 活力单位,1000 为 CPB 的  $\mu\text{g}$  数转换成  $\text{mg}$  数的转换值  $\varepsilon$  为测定时所用 CPB 量( $\mu\text{g}$ )。一个酶活力单位( $u$ )定义为在 25mmol/L Tris(含 0.1mol/L NaCl, pH7.65)溶液中,25 $^{\circ}\text{C}$  条件下,每分钟催化 1 $\mu\text{mol/L}$  Hippuryl-L-Arg 底物引起反应物在 254nm 处吸收值增加 0.12 的酶量。经测定,CPB 标准品的比活力为 180u/mg,重组 CPB 的比活力为 110u/mg。重组 CPB 及 CPB 标准品的活力测定曲线见图 6。

表 1 重组 proCPB 和 CPB 的纯化

Table 1 Purification of recombinant proCPB and CPB

Purification step	Total protein(mg)	Total activity(u)	Specific activity(u/mg)	Protein yield(%)
Culture supernatant	340	-	-	100
Phenyl Sepharose FF	146	-	-	43
Activation	146	6570	45	43
Phenyl Sepharose FF	130	14300	110	38

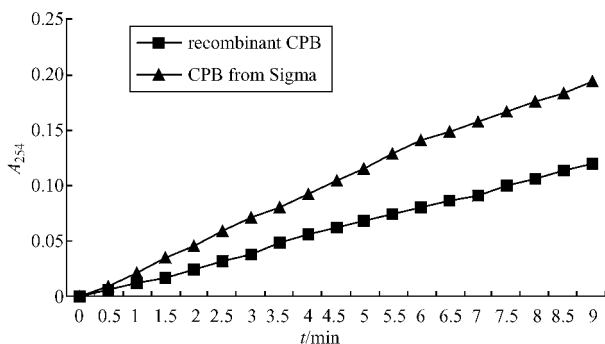


图 6 CPB 活力测定曲线

Fig. 6 The activity determination curve of recombinant CPB56 and standard CPB

核表达系统,它具有(1)培养方法成熟、廉价(2)表达量高(3)表达的内源蛋白含量少,产物易于纯化;(4)对表达的产物可进行加工折叠和修饰等特点,已有数百种蛋白在毕赤酵母中成功表达,且数量在不断增加<sup>[12,13]</sup>。

提高外源蛋白在毕赤酵母中的表达量一直是众多研究者的关注点。Guarna 等<sup>[14]</sup>发现,按照每 24h 添加 0.5%(V/V)甲醇的添加量,甲醇将在 10h 之内耗完,剩下的 14h 菌体都处于甲醇饥饿状态,影响目的蛋白的表达。我们的实验结果也证实每 24h 添加 0.5% 的甲醇时表达量最低,而以每 12h 添加 0.5% 的甲醇诱导时表达量最高。根据 Invitrogen 公司提供的 *P. pastoris* 酵母表达操作指南, Mut<sup>+</sup> 型酵母重组子诱导起始菌密度在 1.0 OD 即可,但一般来说,

## 3 讨论

毕赤酵母系统是一个近年来发展很快的优秀真

高的生物量可相应地增加总的蛋白表达量。在通过比较诱导起始菌密度( $OD_{600}$ )分别为 1.0, 5.0, 10 及 20 的 4 组培养菌液在 48h, 60h 和 72h 时目的蛋白的表达量差异后发现, 随着起始菌密度的增加, 表达量也相应增加。毕赤酵母有 3 种主要的蛋白水解酶, 即蛋白酶 A、B 及羧肽酶 Y。在表达过程中, 由于少量细胞破裂, 有部分蛋白酶释放到培养基中, 导致表达产物不稳定或被降解。根据文献 [15] 的报道, 在培养基中添加 1.0% 的酪蛋白水解物或添加终浓度为 3mmol/L 的 PMSF 时, 可明显提高目的蛋白的表达量。本实验显示, 当培养基中酪蛋白水解物的添加量为 0.5% 时, 表达量高于对照组, 而非 1.0%。PMSF 是一种蛋白水解酶抑制剂, 本实验发现在培养基中添加 PMSF 并未提高目的蛋白的表达。这可能是因为表达的羧肽酶原 B 很稳定, 即使在诱导 120h 后降解也很轻微的结果。

能从成千上万种蛋白质混合物中纯化出一种蛋白质的原因是不同蛋白质在他们的许多物理和化学性质上有着极大的不同。这些性质是由于蛋白质的氨基酸数目和序列不同造成的<sup>[16]</sup>。巴斯德毕赤酵母能够对表达产物进行正确的翻译后加工, 我们采用分泌型表达, 这就省去了对表达产物进行复性处理等步骤, 给下游纯化带来了极大的方便。羧肽酶原 B 无活性, 必须经过胰蛋白酶的特异切割后才能显示其固有的催化活性, 因此从表达上得到 CPB 纯品的过程也是对 proCPB 及 CPB 两种蛋白进行纯化的过程, 这样就相应地增加了纯化步骤, 降低了蛋白的得率。实验时, 我们按照文献 8~10 报道的方法对 proCPB 及 CPB 均进行了疏水层析和阴离子交换层析两步处理, 最后得到的重组 CPB 的纯度大于 95%, 但蛋白得率仅有 9.7%。于是我们在优化纯化步骤时省去了两步使蛋白损失极大的离子交换层析, 而保留了其中的疏水层析, 最后使蛋白得率提高了近 4 倍(由 9.7% 升到 38%)。

总之, 本实验以毕赤酵母为表达系统, 利用醇氧化酶 I (AOX1, alcohol oxidase 1) 强启动子成功地表达了目的蛋白羧肽酶原 B, 并在  $\alpha$ -因子信号肽的引导和 KEX2 的切割作用下分泌到胞外, 表达的重组蛋白不易降解。通过诱导培养条件的优化, 得到了一个较优的表达条件, 该条件下重组蛋白的表达量高达 500 mg/L。经过两步纯化, 重组蛋白的得率达到 38%, 纯度高达 96%, 其比活力为 110u/mg (CPB 标准品为 180u/mg)。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Aviles FX, Vendrell J. Carboxypeptidase B. In: Barrett A J, Rawlings N D, Woessner J F. Handbook of Proteolytic Enzymes. San Diego: Academic Press, 1998, pp. 1333 - 1335.
- [ 2 ] Pedro BP, Sonia SM, Coll M, et al. Human Procarboxypeptidase B: Three-dimensional Structure and Implications for Thrombin-activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI). *Journal of Molecular Biology* 2002, **321**(3): 537 - 547.
- [ 3 ] Clauser E, Gardell SJ, Craik CS, et al. Structural characterization of the rat carboxypeptidase A1 and B genes. Comparative analysis of the rat carboxypeptidase gene family. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, **263**(33): 17837 - 17845.
- [ 4 ] Skidgel RA, Erdos EG. Cellular carboxypeptidases. *Immunological Reviews*, 1998, **161**(1): 129 - 141.
- [ 5 ] Saez J, Martinez J, Trigo C, et al. A comparative study of the activation peptide of carboxypeptidase B and trypsinogen as early predictors of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas*, 2004, **29**(1): 9 - 14.
- [ 6 ] Chen JQ, Zhang HT, Hu MH, et al. Production of human insulin in an *E. coli* system with Me-Lys-human proinsulin as the expressed precursor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995, **55**(1): 5 - 9.
- [ 7 ] Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, et al. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasm. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(32): 21833 - 21838.
- [ 8 ] Ventura S, Villegas V, Sterner J, et al. Mapping the pro-region of carboxypeptidase B by protein engineering. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(28): 19925 - 19933.
- [ 9 ] Hartman J, Fulga N, Mendelovitch S, et al. Production of Enzymatically Active Recombinant Carboxypeptidase B. USA: 5948668, 1999 - 09 - 07.
- [ 10 ] Li SX, Zhang YJ, Gong Y, et al. Cloning and Expression of a New Rat Procarboxypeptidase B Gene in *E. coli* and Purification of Recombination Carboxypeptidase B. *Protein and Peptide Letters*, 2003, **10**(6): 581 - 590.
- [ 11 ] Folk JE, Piez KA, Gladner JA, et al. Carboxypeptidase B. *Journal of Biological Chemistry*, 1960, **235**(8): 2272 - 2277.
- [ 12 ] Gregg MJ, Cereghino JL, Shi JY, et al. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, **16**(2): 23 - 52.
- [ 13 ] Ding YR (丁云菲), Liu Y (刘勇), Dai CB (戴长柏). Advances in *Pichia pastoris* expression system. *Chinese Bulletin of Life Sciences* 2003, **15**(1): 26 - 31.
- [ 14 ] Guarna MM, Cote HC, Amandoron EA, et al. Engineering factor X fusions for expression in *Pichia pastoris*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1996, **1**(12): 397 - 400.
- [ 15 ] Woo JH, Liu YY, Neville DM, et al. Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002, **25**(2): 270 - 282.
- [ 16 ] Marshak DR, Kadonaga RR, Burgess RR, et al. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, pp. 1 - 4.