

蚯蚓纤溶酶基因(*Efp-I*)在大肠杆菌中的克隆、表达及活性分析 Cloning, Expression of Fibrinolytic Enzyme Gene *Efp-I* from *Eisenia fetida* in *Escherichia coli* and Activity Analysis

赵晓瑜* 李晓霞 侯 艳 静天玉

ZHAO Xiao-Yu*, LI Xiao-Xia, HOU Yan and JING Tian-Yu

河北大学生命科学学院, 保定 071002

College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

摘 要 从 GenBank 查询到的蚯蚓纤溶酶(earthworm fibrinolytic enzyme, EFE)基因序列中,只有 AY438624 翻译的蛋白质序列与天然 *Efp-I* 在 N-端具有较高的相似性。根据该基因的 5' 与 3' 序列设计引物,通过 RT-PCR 从赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)获得一个完整的基因(GenBank, DQ418454)。序列分析证明,由该基因编码蛋白质的 N-末端与天然 *Efp-I* 的 N-末端的氨基酸顺序完全相同。ScanProsite prediction programs 分析显示,该基因与 AY438624 相似性极高,二者均属于胰蛋白酶家族;不同的是,该基因编码蛋白质的序列中含有 N-糖苷键的结构域,所以 DQ418454 是 *Efp-I* 中的一个新基因。在此基础上,构建了该基因的原核表达载体 pMAL-c2X-*Efp-I* 并进行了转化、诱导和表达。Western blotting 证明,表达产物同时具有 MBP 和 *Efp-I* 的抗原特异性,是 MBP 和 *Efp-I* 的融合蛋白(MBP-*Efp-I*)。经亲和层析分离纯化的 MBP-*Efp-I* 在酪蛋白平板和纤维蛋白平板上表现出明显的纤溶酶活性。

关键词 赤子爱胜蚓, 蚯蚓纤溶酶, 基因克隆, 融合表达, 纤溶酶活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0452-05

Abstract Earthworm fibrinolytic enzyme (EFE) is a group of protease having fibrinolytic and plasminogen-activator activities isolated from earthworm. Molecular biology research showed that there were 21 EFE coding sequences, in which only one sequence, AY438624, whose translated protein had similar N-terminal amino-acid sequence to *Efp-I* purified from *Eisenia fetida*. To obtain coding sequence of *Efp-I*, we designed specific primers according to 5' and 3' sequences of AY438624. A new DNA sequence was obtained by RT-PCR, sequence analysis showed that the protein translated from the coding sequence had identical N-terminal amino-acid sequence with *Efp-I* purified from *Eisenia fetida* and *Lumbricus rubellus*. Analysis by using ScanProsite prediction programs proved that the sequence had high similarity to AY438624 and belonged to trypsin family of serine protease. But there was difference between two sequences, that was there was a domain of characteristic amino acids of N-glycosylation site Asn-Xaa-Ser/Thr (N-x-S/T) in the new sequence (DQ418454). Then the expressed vector pMAL-c2X-*Efp-I* was constructed by cloning the gene into the plasmid pMAL-c2X, and was transformed to *E. coli* TB1. After induction and expression of the recombinant, the product MBP-*Efp-I* was purified by MBP affinity chromatography. Western blotting analysis showed that the product reacted with both anti-MBP and anti-*Efp-I*-1 serum. Casein plate test and fibrin plate test showed that the protein expressed had fibrinolytic activity.

Key words *Eisenia fetida*, earthworm fibrinolytic enzymes, gene cloning, fusion expression, fibrinolytic activity

Received: September 25, 2006; Accepted: December 18, 2006.

This work was supported by the grant from the Key Subject of Biotechnology of Hebei Province.

* Corresponding author. Tel: +86-312-5079735; E-mail: yuoaix@yahoo.com.cn

河北省生物工程重点学科资助。

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

蚯蚓纤溶酶(earthworm fibrinolytic enzymes, EFE)是一组从蚯蚓体内分离到的具有纤维蛋白溶解和纤溶酶原激活活性的蛋白酶,不同组分的性质和结构各有差异^[1-6]。根据研究推测,这些组分至少来源于4种基因,但这些组分与基因的一一对应关系至今尚未弄清。目前 GenBank 报道了21条与EFE相关的核酸序列,根据阅读框翻译后的N-末端氨基酸序列比对,绝大部分序列与 Nakajima^[2]从 *Lumbricus rubellus* 获得的3个组分一致(F-III-1、F-III-2和F-II)在这些序列中,只有AY438624(来源于 *Eisenia fetida*)编码蛋白质的N-端为II GGT_DASPGEFPWQL,与 Nakajima 报道的F-I-1和F-I-2的N-端II GGS_NASPGEFPWQL相近,但二者的蚓种不同。本室^[7]分离纯化的两个组分 *Efp-I*-1、*Efp-I*-2,以及王锋^[5]报道的组分d和e都是从 *Eisenia fetida* 获得,然而它们的N-末端氨基酸序列均与F-I-1和F-I-2相同,即II GGS_NASPGEFPWQL。从已报道的EFE基因比对得知,相近组分基因的前导序列相似性极高。为了证明编码序列是否与蚓种有关,本文利用AY438624的一些序列信息设计引物,通过RT-PCR从 *Eisenia fetida* 的mRNA中获得一个新基因,尽管该基因与AY438624的相似性达92%,但编码蛋白的N-末端氨基酸序列却与天然 *Efp-I* 的N-末端氨基酸序列相同。

1 材料和方法

1.1 材料

赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)为本室养殖; *E. coli* JM109为本室保存;pMAL-c2X、抗MBP抗血清、Amylose Resin和 *E. coli* TB1购自NEB公司;pMD19-T、Taq DNA聚合酶、*EcoR* I、*Pst* I、T4 DNA连接酶、BcaBEST RNA PCR Kit和Agarose Gel DNA Purification Kit购自TaKaRa公司;纤维蛋白原购自SIGMA公司;凝血酶购自中国药品生物制品检定所;TRIzol试剂购自Invitrogen公司;EFE、天然 *Efp-I*-1以及抗 *Efp-I*-1抗血清为本室制备。

1.2 方法

1.2.1 蚯蚓纤溶酶基因(*Efp-I*)的获得及序列分析:参考lumbrokinase-5 precursor的序列(GenBank: AY438624),利用Primer Premier5.0软件设计引物,上游引物P1为:5'-TGCTCTCAGCCTTTGCC-3',下游引物P2为:5'-TTACGAGTTGTTGGCGA-3'。采用两步法RT-PCR获得目的基因,即以蚯蚓(*Eisenia fetida*)总RNA为模板,用oligo-dT进行反转录合成第一条

cDNA链,特异引物P1、P2进行PCR。扩增产物回收纯化后,与pMD19-T载体于16℃连接过夜,转化受体菌JM109。经筛选和鉴定的pMD19-T-*Efp-I*阳性重组质粒,委托北京华大基因研究中心测序。利用NCBI和SWISS-PROT中的BLAST和ScanProsite prediction programs对得到的序列进行相关的生物信息分析。

1.2.2 pMAL-c2X-*Efp-I*融合表达质粒的构建:根据上述测序结果,按照编码序列设计带有*EcoR* I、*Pst* I酶切位点的特异引物,上游引物P3为:5'-CGGAATTCATGGGTGGTGAGCACT-3',下游引物P4为:5'-CCTGCAGTTACGAGTTGTTGG-3',以测序的重组质粒为模板进行PCR。获得的DNA片段与质粒pMAL-c2X连接,并转化受体菌 *E. coli* TB1。阳性重组质粒通过PCR和双酶切进行筛选和鉴定。

1.2.3 融合蛋白的表达、纯化和鉴定:将含pMAL-c2X-*Efp-I*质粒的重组菌,按1%的接种量转接LB液体培养基,37℃振荡培养过夜。次日按1%接种量转接40mL新鲜培养基,37℃振荡培养至 $OD_{600} = 0.6$,加入IPTG至终浓度为1mmol/L,20℃诱导表达12h。离心收集菌体,超声破菌、离心,对上清和沉淀分别进行12% SDS-PAGE分析。可溶性融合表达产物通过亲和载体(Amylose Resin)进行纯化,并用抗 *Efp-I*-1和MBP抗血清进行Western blotting^[8]鉴定。

1.2.4 纤溶酶活性检测:分别采用酪蛋白平板法^[9]和纤维蛋白平板法^[10]对纯化的融合表达产物进行纤溶酶活性检测。

2 结果

2.1 目的基因的获取

如图1所示,以蚯蚓总RNA为模板,分别用oligo-dT和引物P1、P2进行两步法RT-PCR反应,产

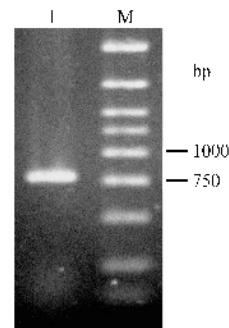


图1 琼脂糖凝胶(1%)电泳检测RT-PCR扩增产物

Fig.1 Product of RT-PCR

I: the product of RT-PCR; M: markers DL3000(3000bp, 2000bp,

1500bp, 1250bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp). journals. im. ac. cn

物用琼脂糖凝胶电泳(1.0%)检测。结果表明,反应产物的分子量约为0.8kb,大小与预期一致。

2.2 测序分析及同源性比较

将上述DNA片段克隆至pMD19-T中,获得阳性重组质粒pMD19-T-Efp-I。对该质粒进行序列测定,结果表明,目的片段的全长为793bp,编码242个氨基酸,其中前6个氨基酸为前导肽。计算其编码

蛋白质分子量为24832D,等电点为4.613。以该基因序列为查询序列,在NCBI中用BLAST进行检索和比对,得到与已知EFE核酸序列及其编码蛋白序列的相似性,列入表1。本研究得到的基因序列,与AY438624非常相近(核酸序列相似性为92%;成熟蛋白质序列为93%,其中相同的氨基酸为88%、性质相似的氨基酸变异为5%),而与其他序列相差甚远。

表1 目的基因与其他蚯蚓纤溶酶核酸和蛋白质氨基酸序列的相似性比对

Table 1 Similarity of nucleotide and amino acid sequences of the target gene to that of other EFE genes

Accession No.	Similarity of nucleotide sequences of CDS/%	Similarity of mature peptides/%	Name of fibrinolytic enzyme (earthworm species)
AY438624	92	93	Lumbrokinase-5 precursor(<i>Eisenia fetida</i>)
AY172839	83	71	ARSP1 precursor(<i>Eisenia fetida</i>)
AY438623	83	69	Lumbrokinase-4 precursor(<i>Eisenia fetida</i>)
AF393512	66	61	Fibrinolytic enzyme component A(<i>Eisenia fetida</i>)
AF109648	66	62	P ₃₀ (<i>Lumbricus binastus</i>)
AY438625	65	61	Lumbrokinase-6 precursor(<i>Eisenia fetida</i>)
AB045720	50	28	Fibrinolytic enzyme F-III-1(<i>Lumbricus rubellus</i>)
AY438622	50	25	Lumbrokinase-3 precursor(<i>Eisenia fetida</i>)

根据PROSITE的ScanProsite prediction programs (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>)分析,在该基因编码的蛋白中,H⁴⁷是丝氨酸蛋白酶的组氨酸活性位点,S¹⁹²是丝氨酸蛋白酶的丝氨酸活性位点,而D⁹⁶为胰蛋白酶的结构域。因此,该酶应属于丝氨酸蛋白酶的胰蛋白酶家族。这些分析结果与AY438624的几乎完全相同,但二者之间存在一个明显差异,即该基因编码蛋白质序列的第6-8位NAS为N-糖苷键的结构域(N-X-T/S),而AY438624没有。因此该基因很可能是一个新基因,但与AY438624同属于Efp-I,其GenBank登陆号为DQ418454。

2.3 pMAL-c2X-Efp-I融合表达载体的构建

以重组质粒pMD19-T-Efp-I为模板,用带酶切

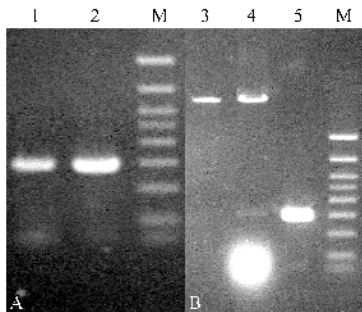


图2 重组质粒pMAL-c2X-Efp-I的PCR(A)及双酶切B鉴定
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pMAL-c2X-Efp-I by PCR(A) and digesting with *EcoRI*/*PstI*(B)

1: PCR product using recombinant plasmid as template; 2: gene *Efp-I* (positive control); M: marker DL3000; 3: pMAL-c2X digested with *EcoRI*/*PstI*; 4: recombinant plasmid digested with *EcoRI*/*PstI*; 5: gene *Efp-I*.

位点的引物P3和P4进行PCR,获得了750bp的Efp-I基因片段。将该片段与载体pMAL-c2X进行定向克隆,构建pMAL-c2X-Efp-I融合表达质粒。经蓝白斑筛选、PCR和酶切鉴定,获得阳性克隆(图2)。

2.4 融合蛋白诱导表达、纯化和鉴定

培养含pMAL-c2X-Efp-I的重组菌,用1mmol/L IPTG、20℃诱导12h,超声破菌并离心,上清和沉淀分别进行12% SDS-PAGE检测。如图3所示,在分子量为70kD左右处出现了明显的表达区带,与预测的融合蛋白大小相同,相当于42kD的MBP与26kD的Efp-I之和;同时该表达蛋白存在于菌裂解液的

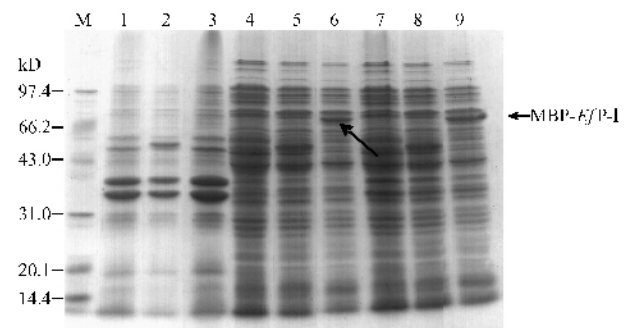


图3 重组菌pMAL-c2X-Efp-I诱导表达情况的分析(12% SDS-PAGE)

Fig.3 SDS-PAGE(12%) of the target fusion protein MBP-Efp-I

M: protein molecular mass markers; 1, 4, 7: the pellet, supernatant and total protein of uninduced cells with pMAL-c2X; 2, 5, 8: the pellet, supernatant and total protein of induced cells with pMAL-c2X; 3, 6, 9: the pellet, supernatant and total protein of induced cell with pMAL-c2X-Efp-I (The arrowhead pointed the target fusion protein).

离心上清中(如图3中箭头所示)。

重组菌裂解液离心上清液经 Amylose Resin 亲和层析纯化, 获得了单一的目的融合蛋白 MBP-*Efp-I* (图4)。根据纯化后的蛋白质浓度估算, 表达量约为 5g/L 发酵液。

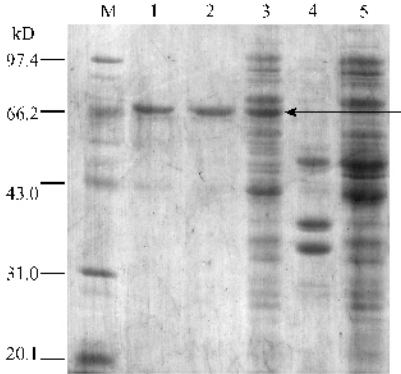


图4 亲和层析纯化 pMAL-c2X-*Efp-I* 表达产物的鉴定(12% SDS-PAGE)

Fig.4 Purification of MBP-*Efp-I* fusion protein

M: protein molecular mass markers; 1, 2: purified MBP-*Efp-I*; 3: supernatant of cell lysate induced pMAL-c2X-*Efp-I*; 4, 5: pellet and supernatant of cell lysate induced pMAL-c2X; MBP-*Efp-I*. (The arrowhead pointed the target fusion protein).

同时将上述样品 SDS-PAGE 后转印 PVDF 膜, 分别用抗 MBP 抗体和抗 *Efp-I*-1 抗体进行 Western blotting。结果如图5显示, 该蛋白不仅与抗 MBP 抗体反应, 同时也与抗 *Efp-I*-1 抗体反应, 证明该蛋白确实是 MBP 和 *Efp-I* 的融合蛋白。

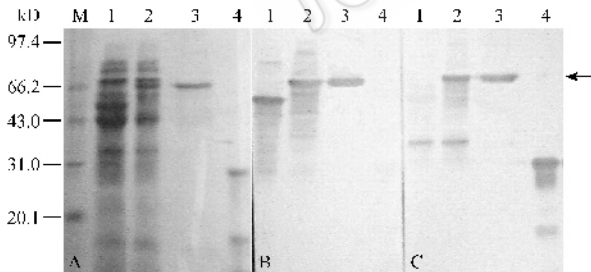


图5 融合表达蛋白 MBP-*Efp-I* 的 Western blotting 分析

Fig.5 Western blotting analysis of MBP-*Efp-I* fusion protein
A: stained by Coomassie Brilliant Blue; B: reacted with anti-MBP serum; C: reacted with anti-*Efp-I*-1 serum. M: protein molecular mass markers; 1: supernatant of induced cells with pMAL-c2X; 2: supernatant of induced cells with pMAL-c2X-*Efp-I*; 3: purified MBP-*Efp-I*; 4: natural *Efp-I*-1 purified from *Eisenia fetida* (positive control).

2.5 融合蛋白纤溶酶活性的检测

由于融合蛋白 MBP-*Efp-I* 的分子量为天然 *Efp-I*-1 的 1.3 倍, 为了比较它们的纤溶酶活性, 分别按相同质量和相同摩尔数在酪蛋白平板上进行活性测定。如图6所示, 纯化的 MBP-*Efp-I* 在酪蛋白平板上具有明显的溶圈, 但小于 *Efp-I*-1。

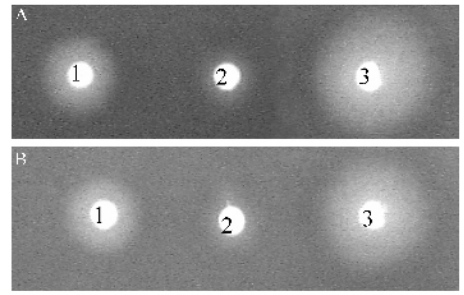


图6 融合蛋白 MBP-*Efp-I* 与天然组分的活性比较(0.2% 酪蛋白平板)

Fig.6 Activity Comparison between MBP-*Efp-I* and natural *Efp-I*-1 (0.2% casein plate)

A: load 2 μ g protein in each hole; B: load 0.3nmol protein in each hole. 1: purified MBP-*Efp-I*; 2: maltose eluent (negative control); 3: natural *Efp-I*-1.

图7为纤维蛋白平板测定 MBP-*Efp-I* 的纤溶酶活性。孔1周围出现了透明圈, 说明纯化的 MBP-*Efp-I* 具有纤溶酶活性, 但其透明度不如天然 *Efp-I*-1 的清晰, 这可能是洗脱液中麦芽糖干扰所致, 因为在阴性对照孔的周围也有明显的麦芽糖的白色沉积。

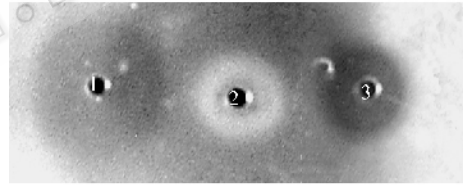


图7 纤维蛋白平板法测定纤溶活性

Fig.7 Fibrinolytic activity assay on fibrin agarose plate

1: purified MBP-*Efp-I*; 2: the maltose eluent (negative control); 3: natural *Efp-I*-1 (positive control).

3 讨论

本文通过 RT-PCR 获得了 *Efp-I* 基因 (DQ418454)。由该基因编码的蛋白质序列与已知 EFE 蛋白质序列(除 AY438624 外)相似性均小于 90%, 其 N-末端氨基酸序列不仅与 Nakajima 从 *Lumbricus rubellus* 分离纯化的 F-I-1 和 F-I-2 一致, 并且与本室和王锋从 *Eisenia fetida* 得到的 *Efp-I*-1、*Efp-I*-2, 以及组分 d 和 e 相同, 均为 II GGSNASPGFEPWQL。该基因是根据 AY438624 的序列设计引物获得的, 二者编码蛋白质序列的长度一样, 但它们有 7% 的氨基酸完全不同。特别值得注意的是, 该基因编码蛋白质的 N-末端氨基酸序列 II GGSNASPGFEPWQL 中恰恰存在一个编码 N-糖苷键的结构域 (N-X-T/S), 这与本室对天然 *Efp-I*-1 研究结果一致^[11]: *Efp-I*-1 是一个糖蛋白, 含糖量为

6% 糖链可以被 N-Glycosidase F 消化,消化后的产物仍有纤溶活性。尽管生物信息预测分析结果证明,该基因编码的蛋白质绝大部分性质还是与 AY438624 相同,说明局部的变异并未影响到它们的一些性质和功能,因此 DQ418454 是一条与 AY438624 相似性极高的新基因,同属于 *Efp-I*。考虑到本室和王锋均报道 *Efp-I* 中有 2-4 个组分,这些组分之间是编码序列的差异还是翻译后糖基化修饰的差异,还需进一步研究。

实验发现,融合表达载体 pMAL-c2X 表达外源基因产物的可溶性易受诱导温度的影响,随着诱导温度的升高,表达产物的可溶性降低。当 IPTG 终浓度为 1mmol/L, 20℃ 诱导 12h 时, pMAL-c2X-*Efp-I* 的表达量最高,而且表达产物完全以可溶性的形式存在。Western blotting 分析表明,该蛋白同时具有 MBP 和 *Efp-I* 的抗原特异性,确为 *Efp-I* 与 MBP 的融合蛋白,因而可以很方便地用与 MBP 特异性结合的直链淀粉树脂(Amylose Resin)进行亲和层析纯化。酪蛋白和纤维蛋白平板检测显示,纯化的 MBP-*Efp-I* 具有纤溶酶活性,说明 *Efp-I* 的 N 端与 MBP 的融合并未对该蛋白的纤溶活性产生较大影响。尽管本研究同时还构建了非融合表达载体,但表达产物为包含体,需要作复性研究。相比之下,融合表达具有一定的优势,但该产物与天然蛋白在体内外是否具有相同的药理、药效作用,有待深入研究。

REFERENCES(参考文献)

[1] LiXF(李兴发),JiaFF(贾飞飞),LiuJR(刘建蓉),*et al.*. Current status of lumbrokinase. *Chinese Journal of New Drugs*

(中国新药杂志)2002,14(8):964-968.

- [2] Nakajima N, Mihara H, Sumi H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm. *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem*,1993,57(10):1726-1730.
- [3] Zhao XY(赵晓瑜),Jing TY(静天玉). Component analysis of fibrinolytic enzyme from earthworm. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报),1998,14(4):407-411.
- [4] Zhou YC(周元聪),Zhu H(朱洪),Chen YC(陈远聪),*et al.*. Purification and biochemical characterization of fibrinolytic enzymes from the earthworm *Eisenia fetida*. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报),1988,20(1):35-41.
- [5] Wang F(王锋),Wang C(望超),Li M(李梅),*et al.*. Isolation, Purification and Preparation Technics of A Group of Earthworm Fibrinolytic Enzymes. China Patent 02153848.4 2004.6.16.
- [6] Cho IH,Choi ES,Jim HG,*et al.*. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*,2004,37:199-205.
- [7] Zhao XY(赵晓瑜),Liu ZM(刘泽民),Jing TY(静天玉),*et al.*. A component of earthworm fibrinolytic enzyme from earthworm. *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报)2006,41(11):1068-1073.
- [8] Lu SX(卢圣栋).Current Protocols for Molecular Biology. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社),1993,pp.403-406.
- [9] Wu JX(武金霞),Zhao XY(赵晓瑜). Casein-plate method for determination of earthworm fibrinolytic enzyme. *Ziran Zazhi*(自然杂志)2004,26(3):184-185.
- [10] Deogny L, Weidenbach A, Hampton JW. Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements: use of bentonite precipitation and agar solidification. *Clin Chim Acta*,1975,60:85-89.
- [11] Wu JX, Zhao XY, Pan R, He RQ. Glycosylated trypsin-like proteases from earthworm *Eisenia fetida*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2006, Available online.