

重组巴曲酶在毕赤酵母中的高效表达 Recombinant Batroxobin Expressed Highly in *Pichia pastoris*

李招发, 于学玲, 黄金路, 方宏清*, 陈惠鹏*

LI Zhao-Fa, YU Xue-Ling, HUANG Jin-Lu, FANG Hong-Qing* and CHEN Hui-Peng*

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

摘要 以毕赤酵母为表达系统, 建立生产重组巴曲酶的技术工艺路线。通过递归式 PCR 的方法, 人工合成了巴曲酶基因, 将其插入 pPIC9 表达质粒中, 转化至毕赤酵母 GS115(his4), 筛选出的表达株经甲醇诱导, 表达了重组巴曲酶, 并得以纯化。从每升发酵液中可纯化得到 10 mg 重组巴曲酶, 其比活为 238 NIH units/mg, 分子量为 30.55kD。重组巴曲酶在体外可使纤维蛋白凝固, 在体内缩短小鼠出血时间。为开发重组的蛇毒类凝血酶止血剂打下了基础。

关键词 毕赤酵母, 重组巴曲酶, 蛇毒类凝血酶, 止血剂

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0483-04

Abstract Methylophilic yeast, *Pichia pastoris* was used to express recombinant batroxobin, and a technology route of producing recombinant protein was finally established. We synthesized batroxobin gene artificially by means of recursive PCR. pPIC9-batroxobin was constructed and transformed into *Pichia pastoris* GS115(his4). Recombinant batroxobin was expressed in yeast engineering strain and it was purified from the culture supernatant. 10mg of recombinant batroxobin was purified from 1 liter fermentation media, it exhibited specific activity of 238 NIH units/mg and had molecular weight of 30.55 kD. The purified recombinant protein converted fibrinogen into fibrin clot *in vitro*, and shortened bleeding time *in vivo*. This study laid a foundation of development of hemostatic of recombinant snake venom thrombin-like enzyme.

Key words *Pichia pastoris*, recombinant batroxobin, snake venom thrombin-like enzyme, hemostatic

1963 年 Klobusitzki 和 Konig 从美洲矛头蝮蛇 *B. atrox moojenii* 毒液中分离得到一种丝氨酸蛋白水解酶, 即巴曲酶(Batroxobin)。迄今为止, 已得到几十种蛇毒类凝血酶的氨基酸序列, 它们的一级结构非常相似。都能够酶切哺乳动物的血浆纤维蛋白原, 使其转变为纤维蛋白, 从而影响动物的出血-凝血过程^[1-3]。

巴曲酶的特异性作用底物是纤维蛋白原, 与凝血酶不同的是, 它只切割纤维蛋白原的 α 链, 而不作用 β 链。当它水解血浆纤维蛋白原 α 链中的 Arg16-Gly17 位键时, 能够释放出纤维蛋白肽 A, 从而将血液中的纤维蛋白原转变成纤维蛋白, 纤维蛋白首尾相连聚集成疏松的软凝块而封闭伤口, 实现

快速止血的功效。这种软凝块易被水解酶降解, 导致血中纤维蛋白原浓度降低, 从而改善血液黏度和血液的流体力学特性, 起到降纤酶的功效。基于这些生物化学特性, 巴曲酶已经被成功地开发成止血药和降纤药。在欧洲, 巴曲酶正在替代人凝血酶作为止血药物。目前在我国上市的有从蛇毒毒液中分离纯化的共 7 种类凝血酶抑制剂^[3-5]。

虽然研究者对巴曲酶的性质有了比较多的了解, 但是, 对这种蛇毒成分的分子生物学研究一直进展缓慢。1991 年, 日本科学家 Maeda 等首次利用重组 DNA 技术得到了 *B. atrox moojenii* 巴曲酶的基因, 并克隆到大肠杆菌中获得融合表达^[6]。2002 年, 杨青等报道长白眉蝮类凝血酶 Gussruobin 和

大连蛇岛蝮蛇类凝血酶 Glosedobin 在 *Pichia pastoris* (毕赤酵母) 中获得表达^[7]。2004 年, K. H. Chung 等采用毕赤酵母表达巴曲酶, 具有与天然巴曲酶相同的生物学活性^[8]。本研究中根据 Genbank 中公开的巴曲酶(X12747)的氨基酸序列资料, 选择酵母较喜欢的遗传密码子, 人工合成了巴曲酶的全长基因, 在毕赤酵母中高效表达, 并进行了纯化和分析。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 、GS115(his4)和 pPIC9 为本室保存。青霉素、生物素和各种限制性内切酶均购自上海宝生物公司; 各种培养基成分和各种纯化介质均购自 Amersham 公司。

1.2 重组巴曲酶真核细胞中表达载体的构建

为使目的基因能插入 pPIC9 载体, 在巴曲酶的 5'-端添加限制酶 *Xho* I 的切点, 3'-端添加 TAA 终止密码以及 *Eco*R I 切点, 另在 *Xho*I 切点与巴曲酶蛋白 N-端第一个氨基酸 Val 密码子之间加入 KEX2 蛋白酶识别序列 Lys-Arg 对应的密码子 AAA AGA, 这就确保目的蛋白在分泌到发酵上清液中时能够顺利地切除 α -信号肽序列, 使工程菌表达的巴曲酶具有同蛇毒中提取的该蛋白同样的 N-端氨基酸序列。

基因的拼接过程采用递归式 PCR 方法, 将最终 PCR 产物回收, 经 *Xho* I / *Eco*R I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶回收符合设计巴曲酶长度的 DNA 片段, 插入到 pPIC9 载体中, 挑选 LA(LB + 100 μ g/mL Amp +) 平板上的单克隆, 用 α -factor priming 和 3'-AOXI priming 测序引物分别从巴曲酶基因的 5'-端和 3'-端进行测序, 最终得到一个完全合乎原设计要求的克隆。

1.3 工程菌的构建和重组巴曲酶的表达

pPIC9-Batroxobin 用 *Bgl* II 线性化, 电转化毕赤酵母 GS115(his4) 宿主菌, 涂布 MD 平板, 菌落 PCR 鉴定。将阳性克隆接入有 3mL BMG 酵母培养液的试管中, 培养 24h, 用 0.5% 甲醇诱导 48h, 用人标准血浆进行酶活性测定。用在试管中筛选出的高表达的工程菌(表型为 His⁺ Mut^s, 表达量为 20min 左右), 接种到 200mL 摇瓶中增殖作为种子液, 再转接至有 3L 发酵液的 BIostat[®] B5 发酵罐中, 按甲醇酵母发酵的常规方法进行中试规模的发酵。

1.4 发酵条件的优化

1.4.1 pH 的影响 毕赤酵母表达异源蛋白质的优势之一在于它能在较大的 pH 范围内生长, 不同的 pH 值(特别是酸性 pH)对细胞的生长速度影响很小, 有时甚至没有影响。这为表达外源蛋白提供了很大的选择范围。在酸性 pH 下, 细胞分泌的蛋水质解酶的活性大多丧失或降低, 从而保护了目的蛋白。但如果目的蛋白并不耐酸, 较低的 pH 值则会

使其失活, 因此 pH 值成为影响蛋白表达的一个重要因素。实验中, 分别选取不同的 pH 值: 5.0, 6.0, 6.9 进行了对比研究。

1.4.2 培养基成份的影响 毕赤酵母可以在简单培养基中生长良好和表达有生物活性的重组巴曲酶。但在简单培养基中分泌的重组蛋白易发生降解, 使产物的得率降低。实验中, 分别选取大豆蛋白胍和山梨醇进行了对比研究。

1.4.3 培养时间的影响 随着发酵时间的延长, 宿主细胞的蛋白水解酶浓度也会随之增加, 使分泌的重组蛋白发生降解, 使产物的得率降低。实验中, 用人标准血浆进行酶活性测定, 记录自诱导起 0 ~ 90h 的实验结果, 以选择收获发酵液的最佳时机。

1.5 重组巴曲酶的纯化 将发酵上清液加入 2mol/L 硫酸铵等预处理后, 先经过预先用 10mmol/L PBS (pH 6.0) 和 2mol/L 硫酸铵平衡过的疏水层析介质 (STREAMLINE[™] Phenyl), 用含 2 ~ 0mol/L 硫酸铵的 PBS 梯度洗脱, 收集活性峰; 再经过用 10mmol/L PBS (pH 6.0) 平衡过的阳离子交换介质 (SP Sepharose[™] FF), 用含 0 ~ 0.5mol/L 氯化钠的 PBS 梯度洗脱, 收集活性峰; 再经过用 10mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 肝素亲和介质 (Heparin Sepharose FF), 用含 0 ~ 0.5mol/L 氯化钠的 Tris-HCl 梯度洗脱, 收集活性峰; 最后再进行一步用含 0.15mol/L NaCl 的 10mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 凝胶过滤层析 (S-100[®] Sephacryl), 添加 50% 的甘油, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 巴曲酶的测活方法

参照从蛇毒中提取的巴曲酶的测活方法, 用加入了柠檬酸钠的人标准血浆可以对发酵上清液中表达出的酶活性进行测定, 这即可以对克隆进行筛选, 也可以对工程菌的产量高低进行测评。具体测定活性的标准就是, 以人凝血酶为标准品, 37 $^{\circ}$ C 下, 将 100 μ L 的样品加入到 300 μ L 含柠檬酸钠的人标准血浆中, 混匀后, 观察凝固所需的时间。

1.7 重组巴曲酶蛋白对小鼠出血时间的影响

试验鼠为 20 ~ 25g 的雄性小鼠, 分别尾静脉注射重组巴曲酶蛋白(2 NIH units/kg)和 PBS 对照, 60min 后, 距尾尖 2mm 处横切, 固定后浸入 37 $^{\circ}$ C 生理盐水中 1.5cm, 记录出血时间。

2 结果

2.1 表达载体的构建

采用递归式 PCR 方法, 将最终 PCR 产物回收, 长度约 700 bp (见图 1), 与预期值相符。 *Xho* I / *Eco*R I 双酶切 PCR 产物与 pPIC9 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞; 利用 pPIC9 系统的测序引物对转化产物进行菌落 PCR 鉴定和测序, 结果与所设计的序列完全一致。 pPIC9-Batroxobin 用 *Bgl* II

线性化,电转化 GS115 宿主菌,涂布 MD 平板,菌落 PCR 鉴定(见图 1)。

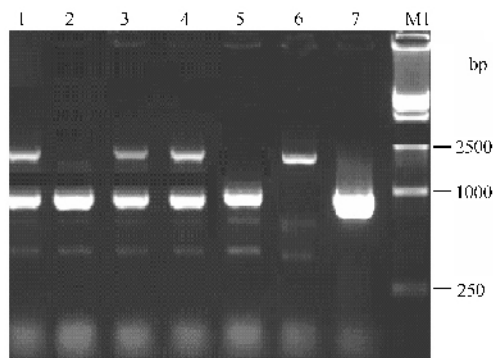


图 1 巴曲酶 PCR 产物和 pPIC9-Batroxobin 转化 GS115(his4)后菌落 PCR 鉴定

Fig.1 PCR product of recombinant and After pPIC9-Batroxobin transformed into *Pichia pastoris* GS115(his4), identification of colony by PCR

1, 3, 4: His⁺ Mut⁺ phenotype; 2, 5: His⁺ Mut^S phenotype; 6: GS115 (his4) host cell; 7: PCR product of recombinant batroxobin; M1: DL15000 DNA marker.

2.2 发酵条件的优化和重组巴曲酶的表达

将筛选出的高表达的工程菌进行发酵条件的优化(pH、培养基成份的和培养时间,见图 2 A 和 B)。然后,将高表达的工程菌接入有 3mL BMG 的试管中,培养 24h;接种到 200mL BMG 摇瓶中增殖作为种子液;再转接至 3L 发酵液中,在甲醇酵母发酵常规方法的基础上,在诱导时,将 pH 值调整为

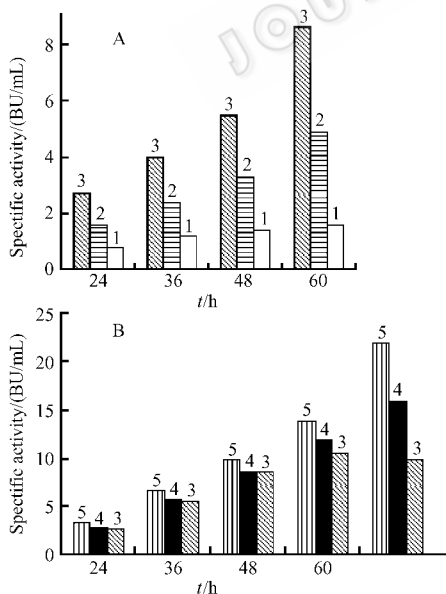


图 2 pH、培养基成分的和培养时间对重组巴曲酶表达的影响

Fig.2 The effect of recombinant batroxobin on expression of pH, element of culture medium and culture time

1: pH 5.0; 2: pH 6.0; 3: pH 6.9; 4: pH 6.9, added to soybean peptone; 5: pH 6.9, added to soybean peptone and sorbol.

6.9,同时加入 2g 大豆蛋白胨,并在甲醇中加入 0.2%山梨醇进行诱导表达,诱导 90h 后,活力约为 22BU/ mL 发酵液(1 BU = 0.17 NIH units),离心收集上清。

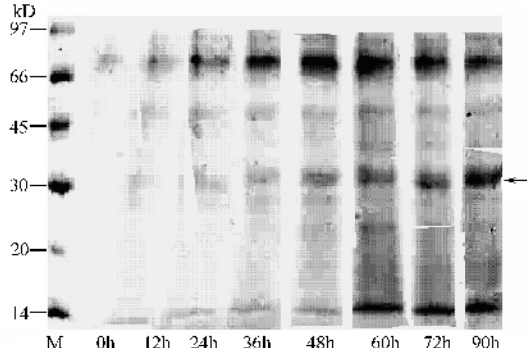


图 3 重组巴曲酶在不同发酵时间(0~90 h)的 SDS-PAGE
Fig.3 SDS-PAGE of recombinant batroxobin in the different fermentation time

2.3 重组巴曲酶的纯化

经 STREAMLINE™ Phenyl、SP Sepharose™ FF、Heparin Sepharose FF 和 Sephacryl® S-100 纯化后的 SDS-PAGE(见图 4)和质谱分析(见图 5)。

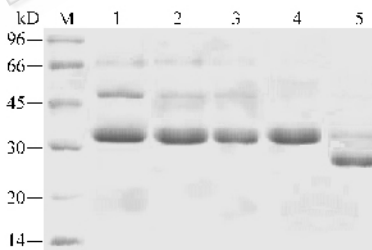


图 4 重组巴曲酶蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of recombinant batroxobin

M: protein marker 1: purified of STREAMLINE™ Phenyl 2: purified of SP Sepharose™ FF 3: purified of heparin Sepharose FF; 4: purified of Sephacryl® S-100; 5: deglycosylated recombinant batroxobin.

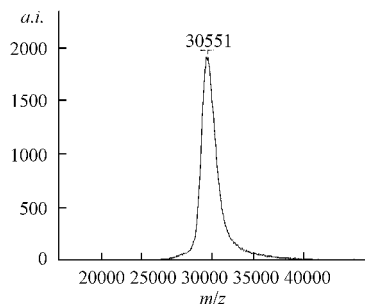


图 5 重组巴曲酶蛋白的分子量质谱图

Fig. 5 MS of recombinant batroxobin

2.4 重组巴曲酶的测活

按上述的测活方法,纯化的重组巴曲酶蛋白的比活为 238 NIH units/mg(见表 1)。

2.5 重组巴曲酶蛋白对小鼠出血时间的影响

如图所示,注射 PBS 的对照组小鼠出血时间约

表 1 重组巴曲酶与天然提取巴曲酶^[9]
分子量、糖基化比率和比活的对比

Table 1 Identity of recombinant batroxobin and
nature batroxobin^[9]

	Nature batroxobin	Recombinant batroxobin
Molecular weight/kD	34.7	30.55
Glycosylated ratio/%	27	16.5
Specific activity/(NIH units/mg)	230	238

90s, 注射天然巴曲酶蛋白和重组巴曲酶蛋白(2 NIH units/mg)的小鼠出血时间均约为60s。结果表明:重组巴曲酶蛋白缩短了小鼠的出血时间,促进止血(见图6)。

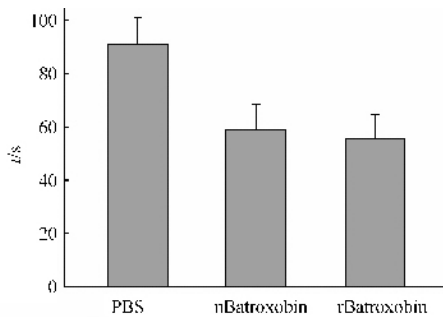


图 6 重组巴曲酶蛋白对小鼠出血时间的影响

Fig. 6 The effect of recombinant batroxobin
on bleeding time of rats

Rats ($n = 10$, 20 ~ 25g) were pretreated by the intravenous injection of nature batroxobin (2 NIH units/kg), recombinant batroxobin (2 NIH units/kg) and PBS. After 1 h, the bleeding time were measured as above described.

3 讨论

巴曲酶蛋白虽然只有一条肽链,但是巴曲酶分子中有12个半胱氨酸,形成六对分子内二硫键;还有两个N-糖基化位点:Asn146-Asn147-Thr148和Asn225-Lys226-Thr227。采用基因工程的手段生产富含二硫键和糖基化修饰的蛋白一直都是一个技术难题,这是因为在原核生物中二硫键配对错误率很高,得到的几乎全是包涵体,且不能进行糖基化修饰。真核细胞表达系统(酵母、CHO和昆虫细胞等)能保证正确的二硫键配对和糖基化修饰。

我们在 *Pichia pastoris* 中成功地表达出了有生物学活性的重组巴曲酶蛋白。通过多个克隆的筛选,获得一株表型为 MutS,表达量为20min左右的高活性菌株。通过优化发酵过程中的一系列条件。结果表明,pH接近中性有利于重组巴曲酶蛋白维持活性,而过碱会导致无机盐沉淀,因此将诱导pH改为6.9,诱导时加入一定量的山梨醇和大豆蛋白胨,提高了表达水平,从每升发酵液中可纯化得到10mg重组巴曲酶,这一产量超过了其它已发表和

报道的表达水平(如韩国报道的表达水平为每升发酵液中可纯化得到6.95mg重组巴曲酶^[8]),具备了规模化生产的要求。其原因可能有两点,一是山梨醇和大豆蛋白胨能提供更好的营养条件,产生细胞密度更高的发酵产物,获得更高的产量;另一个可能的原因是大豆蛋白胨中的多肽能抑制溶蛋白活性,保护目的蛋白。

成熟的巴曲酶分子是由231个氨基酸残基组成的单链蛋白,理论计算出其分子量为25.5kD,等电点为7.39,国外从 *B. atroxmoojuni* 毒液中生物提取的巴曲酶的实际分子量为34.7kD,这种分子量的偏差是由于有27%的糖基化修饰的缘故^[5,9]。毕赤酵母表达的重组巴曲酶蛋白分子量为30.55kD,有16.5%的糖基化修饰,糖基化修饰程度的不同会导致表达产物不均一(如图5所示质谱峰较宽),但重组巴曲酶经去糖基化酶PNGase F(New England BioLabs)水解后为均一条带,分子量约25.5kD(见图4,5)。虽然重组巴曲酶与天然提取巴曲酶的糖基化修饰程度和糖的种类均不同,但比活却比较接近(见表1)。重组巴曲酶蛋白在体外试验中可使人血浆凝固(见表1),在体内试验中可缩短了小鼠的出血时间,促进止血(见图6),具有与天然蛇毒类凝血酶一样的生物学活性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Itoh N, Tanaka N, Mihashi S, Yamashina I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 3132 - 3135.
- [2] Stocker KF, Meier J. Thrombin-like Snake Venom Enzymes in Hemostasis and Animal Venoms. Pirkle H, Markland FS, eds. Marcel Dekker, New York, 1988, pp. 67 - 83.
- [3] Pirkle H, Stocker K. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. *Thromb Haemost*, 1991, **65**: 444 - 450.
- [4] Marsh NA. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism - a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994, **5**: 339 - 410.
- [5] Yuan SL(袁盛凌), Zhang ZS(张兆山). Molecular biological advances in the research and application of the thrombin-like enzyme from snake venom. *Letters in Biotechnology(生物技术通讯)*, 2003, **14**(5): 419 - 421.
- [6] Maeda M, Satoh S, Suzuki S, et al. Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J Biochem*, 1991, **109**: 632 - 637.
- [7] Yang Q(杨青), Hu XJ(胡学军), Xu XM(许小明), et al. Cloning expression and purification of gussurinobin from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*. *Acta Biochim Biophys Sin(生物化学与生物物理学报)*, 2002, **34**(1): 6 - 10.
- [8] You WK, Choi WS, Koh YS, et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*, 2004, **571**: 67 - 73.
- [9] Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated