

人 β -分泌酶 (BACE1) 在毕赤酵母中分泌表达及纯化

王鹏, 赵颖, 朱平, 方唯硕

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室 卫生部天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050

摘要: 为了获得活性良好的重组人 β -分泌酶 (β -secretase, BACE1), 用于研究其与抑制剂的作用模式, 构建了携带 β -分泌酶 proBACE1 和 BACE1 编码序列的重组表达质粒 pPIC9K-MetBACE22 和 pPIC9K-MetBACE46, 通过电击法转入毕赤酵母 GS115 中, 分别得到重组子 9k-B22 和 9k-B46。重组菌株在诱导表达培养基中诱导外源基因表达, 结果显示 9k-B22 的上清活性明显高于 9k-B46 的上清活性。9k-B22 表达上清浓缩后经 HisTrap 亲和柱纯化得到的蛋白具有良好的 BACE1 活性, SDS-PAGE/高碘酸-希夫试剂染色发现其为糖蛋白, 并且其糖基侧链可以被 Endo H_F 完全切除, 得到 50 kDa 左右的两条蛋白带。肽质量指纹图谱鉴定发现, 这两个蛋白分别与 proBACE1 和 BACE1 匹配。活性检测发现糖基化 BACE1 和去糖基化 BACE1 的活性均低于 HEK-293 细胞表达的商品 BACE1, 这说明糖基化及其类型对 BACE1 的活性非常重要。然而已知的 BACE1 抑制剂对三者的抑制率无显著差异, 这说明糖基化并不影响与抑制剂的相互作用。经过一系列培养条件优化 BACE1 纯化产量提高到 1 mg/L, 这为发现并优化 BACE1 新型抑制剂的相关研究奠定了物质基础。

关键词: β -分泌酶, 糖基化, 毕赤酵母, 肽质量指纹图谱

Expression and purification of human β -secretase (BACE1) in *Pichia pastoris*

Peng Wang, Ying Zhao, Ping Zhu, and Weishuo Fang

State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines & Ministry of Health Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: To generate active recombinant human β -secretase (BACE1) for studying its interaction with its inhibitors, we constructed two recombinant plasmids, pPIC9K-MetBACE22 (bearing *pro-bace1* gene) and pPIC9K-MetBACE46 (bearing *bace1* gene). These two plasmids were then transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation to obtain the recombinant strains 9k-B22 and 9k-B46. After induction in buffered methanol complex medium, we found the supernatant activity of 9k-B22 significantly higher than that of 9k-B46. The culture filtrate of 9k-B22 was concentrated, and then purified by HisTrap affinity column. The purified proteins, showing good BACE1 protease activity, were found to be a mixture of glycoproteins because they can be stained by periodic acid-Schiff reagent. After this mixture was treated with Endo H_F (a

Received: March 30, 2011; **Accepted:** June 27, 2011

Supported by: Specialized Research Fund for the Doctoral Program (New Teachers) of Higher Education of China (No. 20070023078).

Corresponding author: Weishuo Fang. Tel/Fax: +86-10-63165229; E-mail: wfang@imm.ac.cn

教育部高等学校博士学科点 (新教师类) 专项科研基金 (No. 20070023078) 资助。

recombinant protein of endoglycosidase H), we found two new adjacent bands around 50 kDa on SDS-PAGE. These two bands were cut and subjected to peptide mass fingerprint analysis, and identified as proBACE1 and BACE1 proteins. Enzyme assays revealed that the activities of both BACE1 proteins in glycosylated and deglycosylated form were lower than that of commercial BACE1 (expressed in HEK-293), inferring glycosylation and the type of glycosylation are crucial to the activity. However, we found no apparent difference in the inhibition of those all above three enzyme forms by one known BACE1 inhibitor. This observation demonstrated that the glycosylation of BACE1 by *Pichia pastoris* does not affect its interaction with this inhibitor. After optimization of culture conditions, the production of BACE1 in *Pichia pastoris* was enhanced to about 1 mg/L. This work enables us to further investigate the interaction of BACE1 and its inhibitors, and assists in discovering and optimizing BACE1 inhibitors as anti-Alzheimer's disease agents.

Keywords: β -secretase, glycosylation, *Pichia pastoris*, peptide mass fingerprint

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与衰老相关, 以认知功能下降为特征的渐进性脑退行性疾病, 是引起老年痴呆的最常见疾病^[1-2]。其重要的病理特征为神经细胞内神经原纤维缠结 (Neurofibrillary tangles, NFTs) 和神经细胞外老年斑 (Senile plaques, SPs) 的形成, 以及皮层神经元的大量减少^[1-2]。老年斑的核心为 38~43 个氨基酸残基的 β 淀粉样肽 (β -Amyloid peptide, A β)^[1]。其中 A β 42 是老年斑的主要成分, 是引起 AD 的重要致病因子^[2]。A β 是由 β 淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, β -APP) 先后经过 β -分泌酶 (β -secretase, BACE1) 和 γ 分泌酶 (γ -secretase) 水解产生的^[1-2]。阻断 β -分泌酶和/或 γ 分泌酶的作用, 可以抑制 A β 的形成, 并可能阻止或延缓 AD 的进程^[3]。BACE1 是启动 A β 生成的第一个蛋白酶, 敲除 *bace1* 基因的小鼠不产生 A β , 并且表型正常^[4]。因此, 研发 BACE1 的抑制剂是治疗 AD 的一个重要策略。而这一研究需要大量获得活性良好的纯化 BACE1 蛋白。

目前, 氨基酸序列稍有不同的 BACE1 已经在大肠杆菌^[5-8]、昆虫细胞^[9-11]和哺乳动物细胞^[12-16]中表达并纯化。大肠杆菌表达的 BACE1 以包涵体的形式存在, 需要经过复杂的变复性操作才能恢复活性^[5-8]。昆虫细胞和哺乳动物细胞表达的 BACE1 可以被正确折叠, 但是这两类细胞的培养条件较为苛刻, 成本较高。毕赤酵母表达系统相对其他两类表达系统具有诸多优点: 可以对外源蛋白进行翻译后

加工、折叠和修饰, 并且毕赤酵母生长快、培养基廉价, 易于培养和操作。另外, 毕赤酵母表达外源蛋白可以分泌到胞外, 易于纯化。另据文献报道, 酵母细胞中不含内源的 β 分泌酶、 γ 分泌酶活性蛋白, 仅具有 α -分泌酶活性蛋白 (由酵母内源基因 *mkc7* 和 *yps1* 编码)^[17-18]。到目前为止, 仅见到利用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* H. 生长选择系统筛选 BACE1 抑制剂的报道^[18-19], 而未见使用毕赤酵母大量表达并纯化 BACE1 的相关报道。

BACE1 是一种跨膜蛋白, 属于天冬氨酸蛋白酶^[2,4]。人 preproBACE1 由信号肽、前酶区 (Prodomain)、成熟区、跨膜区 (Transmembrane domain) 以及胞内区 (Cytoplasmic region) 组成^[4] (图 1)。人脑中纯化得到的 BACE1 是被高度糖基化的^[2,13], 从稳定转化的 293T 细胞系中得到的 BACE1 的 4 个 N-糖基化位点全部被糖基化 (图 1), 而未检测到 O-糖基化^[2,20-22]。有文献报道 BACE1 糖基化对其活性有相当重要的作用^[21-22]。proBACE1 活性略小于成熟型 BACE1, 与严格的酶原不同, proBACE1 的前酶区并不抑制 BACE1 活性, 而对其正确折叠^[14] 以及 proBACE1 从内质网中的排出^[23-24]起着相当重要的作用。Tomasselli 等利用大肠杆菌表达不含信号肽和前酶区的 BACE1 需要的折叠时间 (21 d) 比含有上述两个区域的 BACE1 (3~4 d) 明显延长^[8]。在人体内, FURIN 是将 proBACE1 切割为成熟型的主要蛋白酶^[2,23-24]。酵母体内也有与 FURIN 功能类似的蛋白——KEX2 表达^[24-25]。在酵母体内 KEX2 也

可以将 α -factor 信号肽切除 (图 1)^[25-27]。KEX2 与 FURIN 几乎可以在相同程度上将 proBACE1 加工为成熟型^[24]。此外, 有文献报道 proBACE1 可以在体外自催化生成成熟型 BACE1^[5,10]。

本研究将 *pro-bace1* 基因序列 (除去跨膜区和胞内区以使可溶性 BACE1 被顺利分泌到细胞外) 按照 α -factor 信号肽编码序列的读码框克隆到 pPIC9K 载体上, 从而构建表达序列为 α -factor-YVEFM-BACE22-454-HHHHHH 的重组 BACE1 (图 1 中 pp-proBACE1)。在重组蛋白加工过程中, KEX2 可以在位点 EKRLAEAE 将 α -factor 信号肽切除, 随后 STE13 二肽酶可以将 EA 重复序列切除^[25-27], 并且前酶区序列也可能被 KEX2 切除^[24]。本研究还同时将 BACE1 成熟蛋白编码序列克隆到 pPIC9K 载体上, 从而构建表达序列为 α -factor-YVEFM-BACE46-454-HHHHHH 的重组 BACE1 (图 1 中 pp-BACE1)。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和培养基

大肠杆菌 *Escherichia coli* TG1, 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和毕赤酵母分泌型表达质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen。含有全长的人 BACE1 cDNA 的质粒 PE-BACE1-MycHis 由 Weihong Song 教授 (The

University of British Columbia, Canada) 馈赠。LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 等培养基均按照 Invitrogen 公司毕赤酵母表达操作手册配制。

1.2 酶和主要试剂

Not I、*Eco*R I 和 *Sac* I 等 DNA 限制性内切酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶和糖苷内切酶 *Endo* H_f 购自 NEB 公司; HEK-293 表达的重组人 BACE1 购自 Sigma 公司; 荧光肽底物 IV 购自 R&D 公司; 咪唑购自 Sigma-Aldrich 公司; HisTag 单克隆抗体购自 Novagen 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自碧云天公司; ECL 反应液和 HisTrap HP 购自 GE healthcare 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 构建毕赤酵母表达质粒

根据 BACE1 cDNA 序列 (EMBL Accession No. AF190725) 与 pPIC9K 载体序列, 设计引物 BACEF (含前酶区编码序列)、BACEF46 (不含前酶区编码序列) 和 BACER, 向上游引物 BACEF 和 BACEF46 中引入 *Eco*R I 酶切位点, 向下游引物 BACER 中引入 6 \times His 标签以及 *Not* I 酶切位点, 使可溶型 *pro-bace1* 基因与 pPIC9K 载体中 α -factor 信号肽基因读码框相吻合, 从而使其表达的重组 BACE1 可以被分泌到细胞外。引物由 Invitrogen 公司合成 (表 1)。

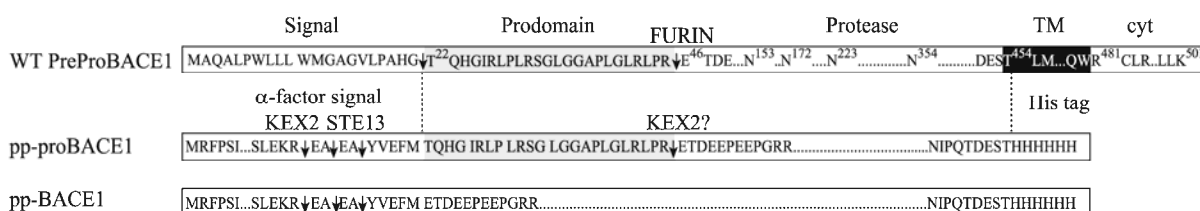


图 1 人 preproBACE1 和在毕赤酵母中表达的重组人 BACE1 的一级结构

Fig. 1 Overview of primary structures of human preproBACE1 and recombinant human BACE1 expressed in *Pichia pastoris*. The first line shows a schematic diagram of the BACE1 protein domain structure, including the signal peptide, prodomain, mature enzyme domain (protease), transmembrane region (TM), and cytoplasmic region (cyt). The signal peptide cleavage site and the FURIN cleavage site are indicated by arrows. The four glycosylated asparagines are indicated in the first line, and the structure of pp-proBACE1 and pp-BACE1 are shown in the second and third lines. The KEX2 cleavage site (EKRLAEAE) and STE13 cleavage sites (EA) are indicated by arrows.

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
BACEF	TGAATTCATGACCCAGCACGGCATCC
BACEF46	TGAATTCATGGAGACCGACGAAGAG
BACER	AGCGGCCGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGG TGGGTTGACTCATCTG

以质粒 PE-BACE1-MycHis 为模板, 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物通过 TA 克隆直接连接到 T 载体 (pEASY-T1 Simple) 上, 转入大肠杆菌感受态 TG1, 进行蓝白斑筛选。随后使用菌落 PCR, 筛选转入重组质粒 pEASY-T1S-MetBACE22 或 pEASY-T1S-MetBACE46 的菌株, 并由北京擎科生物技术有限公司测序验证。用 *EcoR* I 和 *Not* I 分别对重组质粒和 pPIC9K 载体双酶切。用乙醇沉淀回收酶切产物, 用 T4 DNA 连接酶将酶切片段重新连接, 然后将重组质粒转入大肠杆菌感受态 TG1, 做菌落 PCR 筛选, 得到转入重组质粒 pPIC9K-MetBACE22 或 pPIC9K-MetBACE46 的菌株, 并由北京擎科测序验证。

1.4 将重组质粒转入毕赤酵母并诱导其分泌表达

按照 Invitrogen 毕赤酵母表达手册, 使用限制性内切酶 *Sac* I 对重组质粒 (pPIC9K-MetBACE22 和 pPIC9K-MetBACE46) 和空载体 pPIC9K 分别进行线性化, 并用电击法转化毕赤酵母感受态细胞 GS115。将转化菌体均匀涂布于 MD 固体培养基, 进行初筛。然后使用含有 G418 的 YPD 培养基 (G418 浓度梯度为 0, 2 g/L, 4 g/L) 筛选多拷贝重组毕赤酵母。在 4 g/L G418 的 YPD 平板上挑选长势最好的单菌落, 转接至 25 mL BMGY 培养基, 28 °C 摇床培养 18 h。离心收集 7 mL 上述发酵液中的菌体, 转接至 100 mL BMMY 培养基 (含 1% 甲醇 V/V) 中, 即按照 7% (V/V) 的接种量转接。每隔 24 h 加入甲醇至 1% (V/V), 28 °C 摇床培养 7 d, 诱导外源蛋白表达。培养上清经 TCA 法浓缩后, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。超滤浓缩培养基上清, 初步测定表达蛋白的活性。

1.5 镍柱亲和纯化重组蛋白

毕赤酵母表达上清经冷冻干燥法浓缩, 透析除盐, 再超滤浓缩后, 使用 HisTrap HP 纯化。纯化按照 HisTrap HP 操作手册进行, 使用 10 倍柱体积的结合缓冲液 25 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, pH 8.5) 平衡 HisTrap 预装柱, 以 1 mL/min 的流速加入上述浓缩上清, 分别用 10 倍柱体积的结合缓冲液和 5 倍柱体积的 50 mmol/L 咪唑缓冲液 (50 mmol/L 咪唑, 25 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, pH 8.5) 洗去非特异性结合, 最后用 5 倍柱体积的洗提缓冲液 (500 mmol/L 咪唑, 25 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, pH 8.5) 洗脱结合蛋白。超滤浓缩洗提液, 并置换为结合缓冲液, -80 °C 保存。Bradford 法测定总蛋白浓度。

1.6 BACE1 蛋白酶活性以及抑制率测定

BACE1 蛋白酶活性测定采用荧光共振能量转移法。具体为: 100 μL 反应体系中包含 50 mmol/L NaOAc 缓冲液 (pH 4.0), 适量待测蛋白, 4 μmol/L 荧光肽底物 IV。设定荧光酶标仪 (TECAN infinite F200) 激发波长 320 nm, 发射波长 400 nm, 温度 25 °C, 测定 1 h 内荧光强度随时间的变化, 以测定曲线的斜率 k 表示样品活性。

若进行抑制率测定, 则向上述反应体系中加入预溶于二甲基亚砜 (Dimethylsulfoxide, DMSO) 的 BACE1 抑制剂至设定浓度, 以加入同体积 DMSO 的反应体系为对照, 同上测定荧光强度变化并计算曲线的斜率 k 。按照公式 $I(\%) = (1 - k_j/k_{\text{DMSO}}) \times 100\%$, 计算抑制率。其中 j 为样品编号, k_j 为编号 j 样品测定曲线的斜率, k_{DMSO} 为对照测定曲线的斜率。

1.7 糖苷内切酶 Endo H_f 去除重组蛋白的 N-糖基化

根据 Endo H_f 说明书, 在变性条件下去除纯化蛋白的糖基化。SDS-PAGE 电泳分离后, 一部分凝胶先使用高碘酸-希夫试剂 (Periodic acid-Schiff, PAS) 显色法对糖蛋白染色^[28], 然后用常规考马斯亮蓝染色; 将另一部分凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜

上,使用 HisTag 单克隆抗体做 Western blotting 检测。

天然状态下去糖基化: 预实验考察了缓冲液 pH、温度、Endo H_f 的量以及孵育时间对去除糖基化的程度和活性保留进行了正交优化。结果显示在 pH 7.5 的柠檬酸钠缓冲液中, 每微克糖基化 BACE1 加入 0.3 μ L Endo H_f, 4 $^{\circ}$ C 反应 30 min 以上, 可以完全去除 BACE1 的糖基化, 并保留较好的活性。

1.8 肽质量指纹图谱鉴定重组蛋白

上述去糖基化反应液经 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色后, 用手术刀小心切取目的条带, 置于 1.5 mL 离心管中 (加入少量 ddH₂O), 由北京华大蛋白质研发中心有限公司做肽质量指纹图谱鉴定。

2 结果与分析

2.1 重组酵母表达上清的活性比较与分析

相同体积的实验组 (转入重组质粒 pPIC9K-MetBACE22 和 pPIC9K-MetBACE46) 表达上清与对照组 (转入 pPIC9K 空载体的毕赤酵母) 表达上清超滤浓缩后, 测定其对 BACE1 的荧光肽底物 IV 的酶切活性。结果表明转入 *pro-bace1* 基因 (菌株 9k-B22) 和成熟型 *bace1* 基因 (菌株 9k-B46) 的酵母上清均有活性, 且 9k-B22 活性明显高于 9k-B46 的活性, 而转入空载体的对照菌株 (菌株 9k) 无活性 (图 2)。这说明毕赤酵母自身分泌的组分不能切割荧光肽底物 IV, 9k-B22 和 9k-B46 具有切割荧光肽底物 IV 的活性是转入相应基因引起的。因此, 可以初步判断 proBACE1 和 BACE1 已在毕赤酵母中成功表达。proBACE1 的前酶区对其正确折叠以及运输起着至关重要的作用, 9k-B46 的上清活性较低可能与此有关。本研究后续实验仅围绕重组菌株 9k-B22 展开。

2.2 重组毕赤酵母 9k-B22 表达条件优化

本研究在一般培养条件 (无酸水解酪蛋白、培养基初始 pH 为 6.0、甲醇浓度 1.0%、接种量 7%、培养温度为 28 $^{\circ}$ C) 的基础上, 对 9k-B22 菌种进行单因子表达条件优化, 分别考察培养基中酸水解酪

蛋白含量 (图 3A)、培养基初始 pH (图 3B)、甲醇浓度 (图 3C)、瓶塞类型 (图 3D)、接种量 (图 3E) 以及培养温度 (图 3F) 对酵母表达上清活性的影响。培养 8 d 后, 取上清测定活性, 结果见图 3。

有文献报道在培养基中添加适量的酸水解酪蛋白可以抑制毕赤酵母本身分泌蛋白酶活性^[29-30]。但是由图 3A 可以看出, 随着培养中酸水解酪蛋白浓度的增加, 超滤浓缩后酵母上清的活性反而逐渐降低, 推测酸水解酪蛋白可能抑制了 BACE1 的表达分泌或者活性。培养基 pH 主要是通过影响毕赤酵母对营养成分的利用率、细胞结构和蛋白酶活性, 从而影响外源蛋白的表达^[29]。由图 3B 可知培养基初始 pH 为 7.0 时活性最好, pH 为 5.5 时活性最差, 这可能是由于 proBACE1 在酸性条件下不稳定, 并且其等电点接近 5.5。甲醇是毕赤酵母在诱导表达外源蛋白时的唯一碳源和能源, 并且只有在甲醇存在时才能激活启动子进行表达^[27], 因此甲醇的添加量对外源蛋白的表达水平起着决定作用。图 3C 可见当甲醇浓度为 1.0%~1.2% 时上清活性最好。接种量、温度、瓶塞类型对上清活性的影响不明显, 最佳条件分别

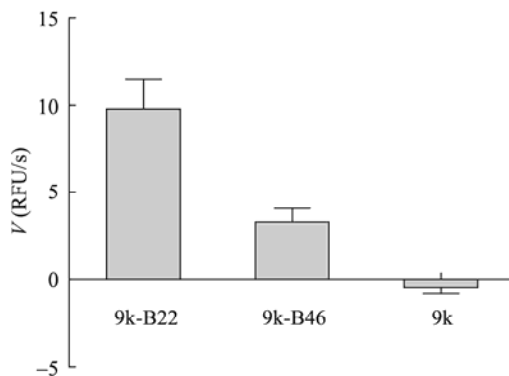


图 2 转入不同质粒重组酵母的发酵液上清活性比较

Fig. 2 The supernatant activity in different yeast strains cultures after transformation of recombinant plasmids. 9k-B22, 9k-B46 and 9k (mock transformant) stand for the strains transformed by plasmid pPIC9K-MetBACE22, pPIC9K-MetBACE46 and pPIC9K, respectively. RFU is the abbreviation for relative fluorescence unit (the same definition applied to all other figures). The data were derived from the same volume of supernatants for these strains.

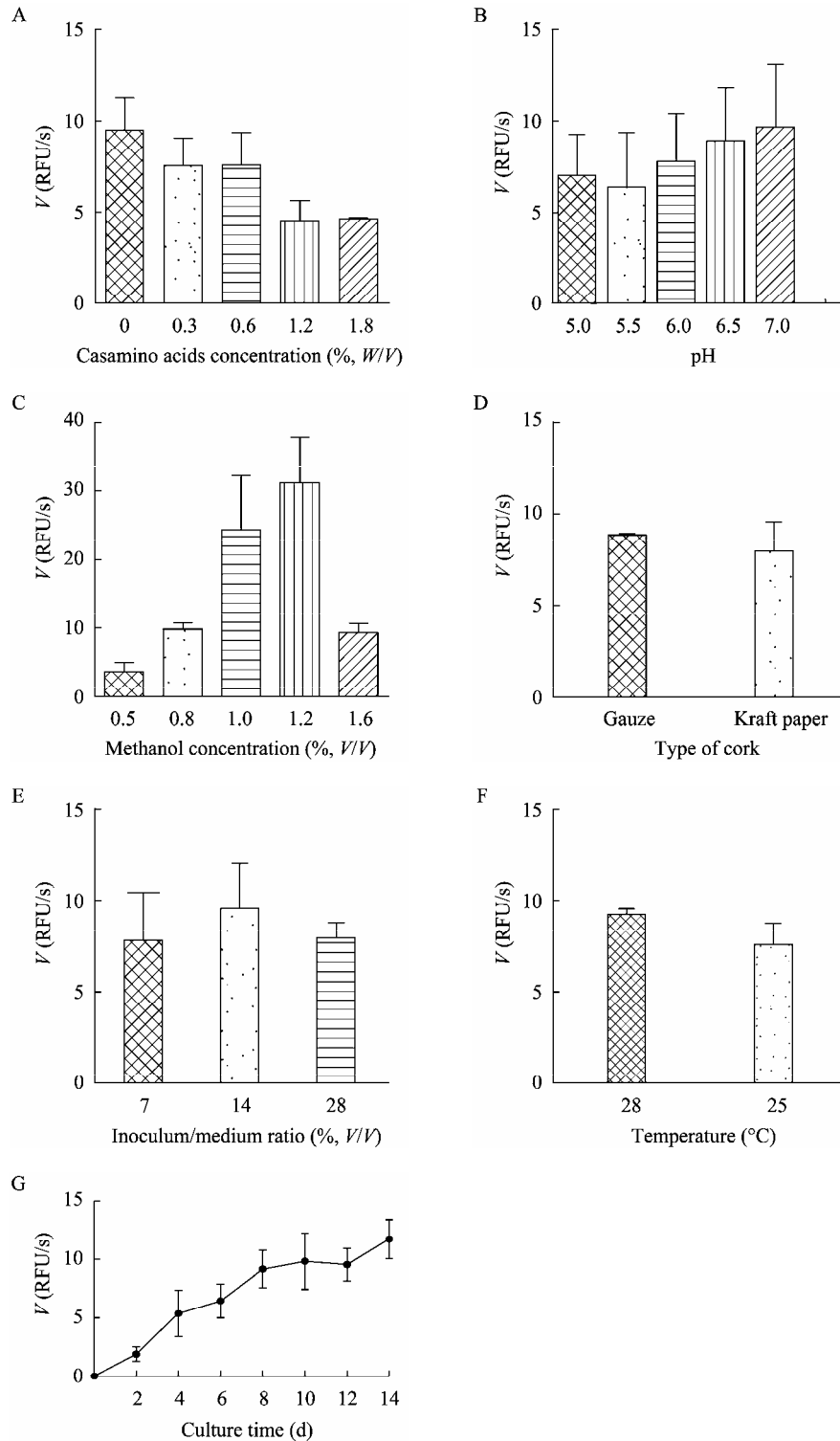


图3 培养条件对重组毕赤酵母9k-B22中BACE1表达的影响

Fig. 3 The influence of different culture conditions on BACE1 expression in recombinant strain 9k-B22. Supernatant activity in different culture conditions are shown in A-F: casamino acids concentration (A), medium pH (B), methanol concentration (C), type of cork (D), inoculum/medium ratio (E), temperature (F). Supernatant activity with optimized culture condition on different days are shown in (G). All data were derived from the same volume of supernatants.

为: $2\times$ 接种量, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和纱布塞。图 3G 显示了上清活性随培养时间的变化, 结果显示培养 8~10 d 上清活性开始进入平台期。但是当培养到 12~14 d 时上清活性仍然有所提高, 这可能是由于培养过程中水分不断蒸发以及衰老酵母细胞的破裂造成的。因此, 本研究确定的最佳培养时间为 8~9 d。

在上述实验的基础上, 对培养基初始 pH、甲醇浓度和接种量做三因子三水平正交分析。结果显示, 甲醇浓度对上清活性影响最大, 甲醇浓度为 1.2% 时最佳。最佳培养条件为: 酸水解酪蛋白含量 0%, 甲醇含量 1.2% (V/V), 培养基 pH 7.0, 接种量 7% (V/V), 培养温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 纱布塞, 培养时间为 8~9 d。在最佳培养条件下, 上清活性增加约 50%。

2.3 HisTrap 亲和柱纯化重组蛋白并初步鉴定

预实验采用不同咪唑浓度的洗提液进行梯度洗脱: 20 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L, 200 mmol/L 和 500 mmol/L 咪唑缓冲液各 3 mL。活性测定结果显示 100 mmol/L 咪唑洗脱部分的浓缩液具有明显活性, 而在 SDS-PAGE 上表现为以 85 kDa 为中心从 66 kDa 到 112 kDa 的分散条带 (如图 4 的泳道 4)。后续实验简化为两步梯度洗脱, 即 5 倍柱体积 50 mmol/L 咪唑溶液洗去非特异性结合, 5 倍柱体积的 500 mmol/L 咪唑洗提特异结合; 然后以超滤法浓缩 500 mmol/L 咪唑洗脱液, 并置换为结合缓冲液, Bradford 法测定总蛋白含量。1 L 初始培养物最终可纯化得到约 1 mg 蛋白。

BACE1 中存在 4 个 N-糖基化位点 (NXS/T 结构, X 为任意氨基酸)^[20-21,31-32]。文献报道从稳定转化 *bace1* 基因的 HEK-293 细胞中得到的 BACE1 蛋白的 4 个 N-糖基化位点全部被糖基化^[2], 在哺乳动物细胞 CHO (Chinese hamster ovary) 以及昆虫细胞 SF9 中表达的 BACE1 同样是被糖基化的^[21]。在毕赤酵母表达的蛋白也可以被糖基化^[32]。据此推测本研究在毕赤酵母中表达的 BACE1, 其 4 个

糖基化位点不均一地糖基化造成了其在 SDS-PAGE 上呈现出分散的条带。经 HisTrap 亲和柱纯化得到的蛋白通过 SDS-PAGE 分离后, 使用可以对糖蛋白进行特异染色的高碘酸-希夫试剂对其染色时, 此分散条带被染成红色 (图 4 的泳道 2), 进一步验证了上述猜想。

在毕赤酵母中表达蛋白的 N-糖基侧链一般为高甘露糖型^[32-33], 可以被糖苷内切酶 Endo H_f 切除, 并在原糖基化位点保留 GlcNAc 结构 (203 Da)^[33]。用 Endo H_f 切除本研究表达的 BACE1 的 N-糖基侧链后, SDS-PAGE 检测发现 66 kDa~112 kDa 分散条带消失, 而在 50 kDa 左右出现两条蛋白带 (即分子量为 53 kDa 的 BH 和 51 kDa 的 BL, 图 4 的泳道 3), 并且不能再被高碘酸-希夫试剂染色 (图 4 的泳道 1), 说明糖基侧链已被切除。使用 HisTag 单克隆抗体做 Western blotting 检测, 糖基化 BACE1、去除糖基化的 BACE1 均被显色 (图 4 panel C), 这说明二者均带有 His 标签, 而 Endo H_f 不显色, 这也进一步证明了纯化得到的蛋白为正确的重组蛋白。

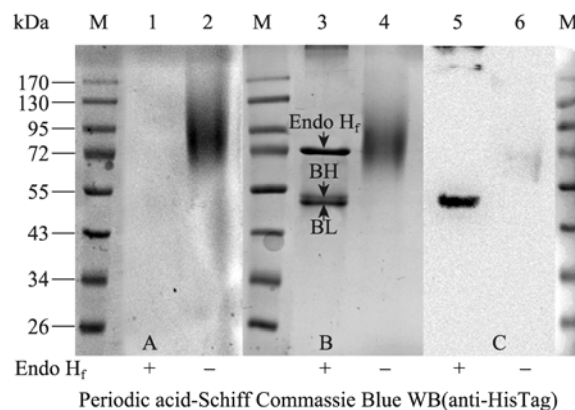


图 4 重组蛋白 BACE1 的 SDS-PAGE (A,B) 和 Western blotting (C) 分析

Fig. 4 Analysis of the recombinant BACE1 by SDS-PAGE (A,B) and Western blotting (C). Panel A: stained by Periodic acid-Schiff; Panel B: stained by Coomassie Blue; Panel C: hybridized by anti-His-tag antibody. M: Protein marker; 1, 3 and 5: BACE1 deglycosylated by Endo H_f; 2, 4 and 6: the glycosylated BACE1. BH: proBACE1; BL: BACE1.

Capell 等^[23]发现在 HEK-293 (Human embryonic kidney) 细胞中表达的完全糖基化的 BACE1 (~75 kDa) 不能被 Endo H 去糖基化, 而不完全糖基化 BACE1 (~70 kDa) 却可以被 Endo H 去糖基化。而本研究在毕赤酵母中表达的 BACE1 (~85 kDa) 可以被 Endo H_f 去除糖基化, 其糖基化程度略高于 HEK-293 细胞表达的 BACE1。

2.4 肽质量指纹图谱鉴定重组蛋白

对 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色后显示的 BH 和 BL 两条蛋白带分别进行了肽质量指纹图谱鉴定。华大蛋白公司提供的初始检索结果显示 (检索程序为 Mascot: <http://www.matrixscience.com>, 数据库为 NCBIInr): BH 与蛋白 NP_620429.1 (β -site APP-cleaving enzyme 1 isoform D preproprotein [*Homo sapiens*]) 匹配, 得分为 120 (Expect: 2.2e-07); BL 与蛋白 3BRA_A (Chain A, Bace-1 Complexed With Compound 1) 匹配, 得分为 132 (Expect: 1.4e-08)。从质谱图 (图 5) 上可以看出 BH 比 BL 明显多出一个 997.594 (m/z) 的质谱峰, 此质谱峰恰好与 BACE1 前酶区序列 SGLGGAPLGLR (计算值为 997.579 Da) 匹配。因此, 可以确定 BH 和 BL 分别为前酶型和成熟型的 BACE1 蛋白。

根据本研究表达的 proBACE1 的氨基酸序列,

使用 MS-Digest (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>) 预测虚拟酶切结果, 然后将计算结果与测定结果进行比对, 但是仍有部分丰度较高的测定肽段不能与计算值对应。在这些匹配的序列中可以确定一个 N-糖基化位点 (图 5 中阴影表示的天冬酰胺残基), 此位点所在的肽段计算值 (2 276.167 Da) 与测定值相差 203 Da。由于其他 3 个潜在糖基化位点所在的肽段较长 ($m/z > 4\ 000$) 不能被有效测定, 因而不能确定这 3 个位点是否被糖基化。

综上所述, *pro-bace1* 基因已在毕赤酵母中成功表达, 并且经过纯化得到活性较高的糖基化的 proBACE1 与 BACE1 的混合蛋白 (图 4 的泳道 3)。其中成熟型 BACE1 所占比例较高, 根据图 4 第 3 泳道计算去除糖基化后 BACE1 (BL) 约占总蛋白的 65%。

2.5 不同类型 BACE1 之间活性的比较

毕赤酵母表达的 BACE1 以及去糖基化的 BACE1 的比活力明显低于商品 BACE1 (购自 Sigma, HEK-293 表达), 商品 BACE1 的比活力是糖基化 BACE1 的 4.5 倍, 是去糖基化 BACE1 的 7.3 倍。去除糖基化后 BACE1 活性降低了约 40% (图 6A), 这与 Charlwood 等^[21]观察到的现象一致。他们

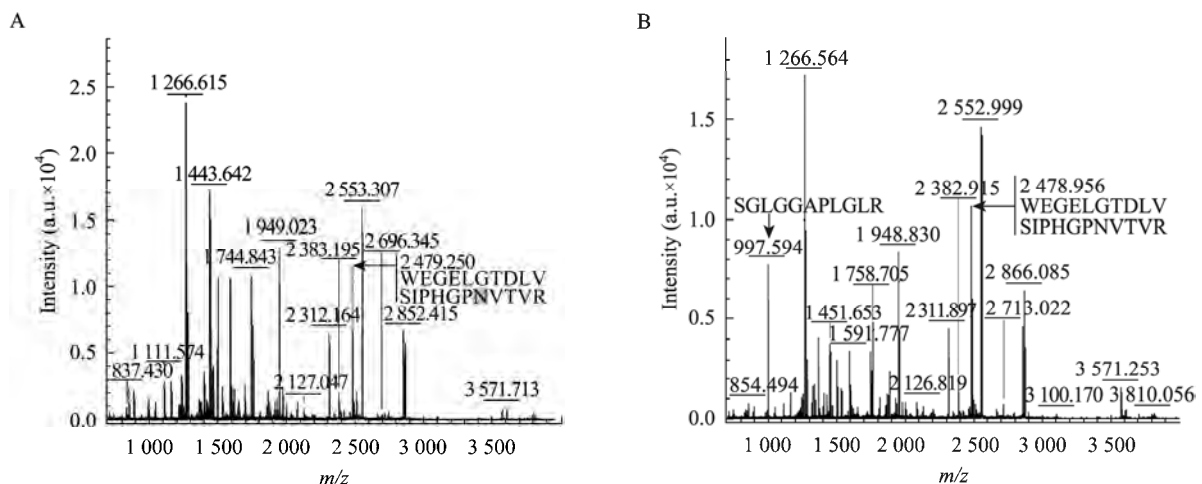


图 5 BL (A) 和 BH (B) 的肽指纹图谱

Fig. 5 Peptide mass fingerprint for BL (A) and BH (B).

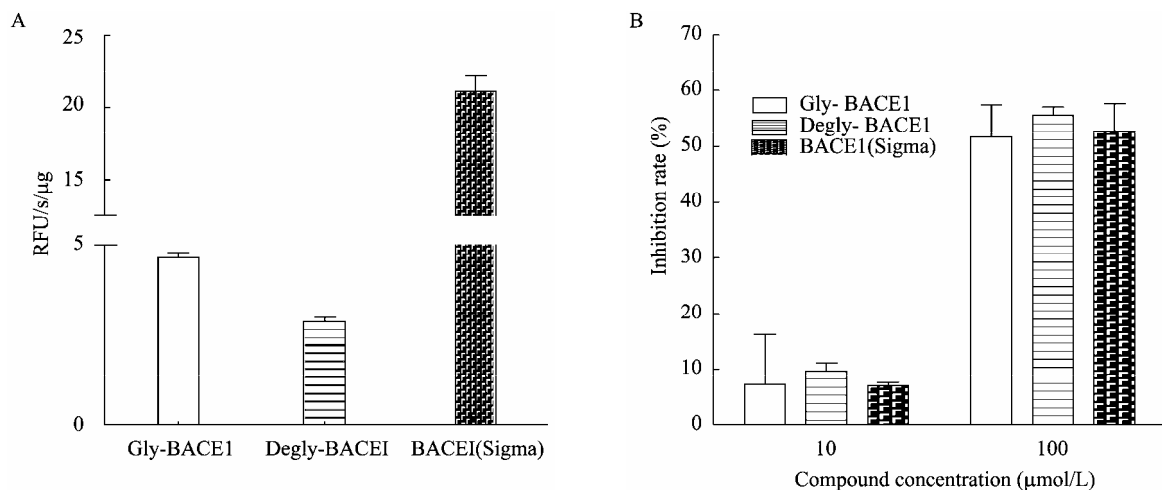


图 6 不同 BACE1 的活性以及抑制剂 (AV-4-1) 对 BACE1 的抑制率

Fig. 6 Activities of different BACE1s (A) and the inhibition rates of an inhibitor (AV-4-1) on these BACE1s (B). Gly-BACE1: glycosylated BACE1; Degly-BACE1: deglycosylated BACE1; BACE1(Sigma): commercial BACE1 from Sigma (expressed in HEK-293).

曾观察到 CHO 细胞表达的非糖基化 BACE1 的活性仅为糖基化 BACE1 的 40%。通过基因突变改变 4 个糖基化位点中的 2 个, 发现此突变 BACE1 活性也明显降低。在昆虫细胞中表达的高甘露糖型糖基化 BACE1 的活性是哺乳动物细胞中表达 BACE1 的 50%, 在大肠杆菌中表达重新折叠的 BACE1 (非糖基化) 的活性大约是哺乳动物表达 BACE1 的 10%^[21]。这说明糖基对 BACE1 的活性非常重要, 并且糖基化的类型可能也对其活性有影响^[21]。毕赤酵母中表达的 BACE1 也是高甘露糖型糖基化, 与哺乳动物细胞的糖基化类型不同, 这可能是造成其活性比商品 BACE1 活性低的一个原因。

此外还考察了毕赤酵母糖基化是否影响 BACE1 与小分子的相互作用。本研究分别测定了 10 μmol/L 和 100 μmol/L 浓度下, 一个已知的 BACE1 抑制剂 (AV-4-1)^[34] 的抑制率 (图 6B)。结果显示该抑制剂对三者的抑制率无显著差异。这说明毕赤酵母对 BACE1 的糖基化不会影响抑制剂与其相互作用, 可以将表达的 BACE1 蛋白用于进一步研究。

2.6 proBACE1 自催化现象的初步探讨

究竟是什么原因造成了转入 proBACE1 的毕赤酵母可以表达成熟型 BACE1? 综合文献报道, 可能有两点原因: 一是毕赤酵母自身表达的 KEX2 将 proBACE1 加工为成熟型^[24]; 二是 proBACE1 存在自催化现象^[5,10,15,35]。Jordan Tang 课题组报道大肠杆菌表达的 proBACE1 在 0.1 mol/L NaOAc (pH 4.0) 缓冲液中, 22 °C 反应 16 h 就可以自身催化为成熟型 BACE1^[5,35]。与此类似, Sidera 等发现 HEK-293 细胞表达并纯化的 BACE 可以在 pH 5 的条件下发生两步自身剪切得到成熟型 BACE1^[15]。然而, Benjannet 等使用 HEK-293 细胞表达的小鼠可溶型 BACE, 无论在粗提液中还是部分纯化后均不能自身催化生成成熟型蛋白^[24]。Sardana 等^[7]以及 Tomasselli 等^[8]使用大肠杆菌表达可溶型 proBACE1 时, 并没有发现 proBACE1 的自身催化现象。他们推测 Jordan Tang 观察到的自身催化现象可能是残留的大肠杆菌蛋白酶造成的^[8]。

总之, proBACE1 是否可以自身催化为成熟型 BACE1 存在一定争议。本文对此也进行了初步探讨。经研究发现, proBACE1 在 pH 8.5 的结合缓冲

液中 4 °C 放置 24 h 后, 成熟型 BACE1 相对比例增加, 但是在 42 kDa 和 39 kDa 分别出现两条新的蛋白条带。当 proBACE1 在 pH 4.0 的 50 mmol/L NaOAc 缓冲液中室温放置 24 h 时, 50 kDa 左右的 BACE1 仅见一条, 而同样在 42 kDa 和 39 kDa 处出现两条明显的蛋白带 (图 7)。这说明 proBACE1 存在一定的自催化现象, 然而其自催化位点似乎不是单一位点, 因而出现 42 kDa 和 39 kDa 两条蛋白带。

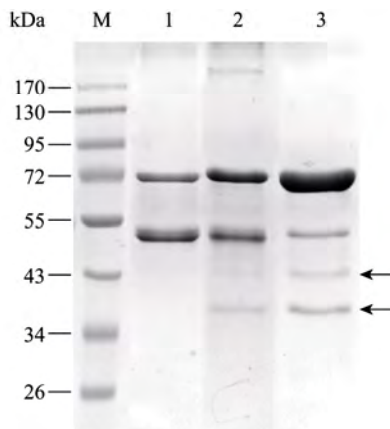


图 7 proBACE1 自催化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the autocatalytic products of proBACE1. M: protein marker; 1: ProBACE1 deglycosylated under denatured conditions; 2: ProBACE1 was first incubated in binding buffer (pH 8.5) for 24 h (4 °C), then deglycosylated under denatured conditions; 3: ProBACE1 was first incubated in 50 mmol/L NaOAc (pH 4.0) 24 h (4 °C), then deglycosylated under denatured conditions.

3 结论

本研究首次实现了 *pro-bace1* 基因在毕赤酵母中表达, 通过纯化得到了活性良好的糖蛋白。通过糖苷内切酶 Endo H_f 去除糖基侧链和肽质量指纹图谱鉴定, 发现此活性蛋白为 proBACE1 和 BACE1 的混合蛋白。本研究的初步结果显示 proBACE1 的自催化现象可能是 proBACE1 被加工为成熟型的一个原因, 但是毕赤酵母内源蛋白 KEX2 在 proBACE1 加工为成熟型的过程中起到何种作用还有待于进一步研究。活性检测发现糖基化 BACE1 和去糖基化

BACE1 的活性均低于 HEK-293 细胞表达的商品 BACE1, 去除糖基化后活性降低了 40%, 这说明糖基化及其类型对 BACE1 活性非常重要。不过, 采用本课题组分离得到的 BACE1 抑制剂 AV-4-1 对糖基化 BACE1、去糖基化 BACE1 以及商品 BACE1 的抑制率检测表明无显著差异, 这说明糖基化并不影响与该类抑制剂的相互作用。本研究得到活性蛋白可以用于 BACE1 抑制剂的相关研究。

REFERENCES

- [1] Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, 1999, 399(6738): A23-A31.
- [2] Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 1999, 286(5440): 735-741.
- [3] Dominguez DI, De Strooper B, Annaert W. Secretases as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Amyloid*, 2001, 8(2): 124-142.
- [4] Ghosh AK, Gemma S, Tang J. β -secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2008, 5(3): 399-408.
- [5] Lin XL, Koelsch G, Wu SL, et al. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1456-1460.
- [6] Patel S, Vuillard L, Cleasby A, et al. Apo and inhibitor complex structures of BACE (β -secretase). *J Mol Biol*, 2004, 343(2): 407-416.
- [7] Sardana V, Xu B, Zugay-Murphy J, et al. A general procedure for the purification of human β -secretase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, 34(2): 190-196.
- [8] Tomasselli AG, Paddock DJ, Emmons TL, et al. High yield expression of human BACE constructs in *Escherichia coli* for refolding, purification, and high resolution diffracting crystal forms. *Protein Pept Lett*, 2008, 15(2): 131-143.
- [9] Mallender WD, Yager D, Onstead L, et al. Characterization of recombinant, soluble β -secretase from an insect cell expression system. *Mol Pharmacol*, 2001,

- 59(3): 619–626.
- [10] Bruinzeel W, Yon J, Giovannelli S, et al. Recombinant insect cell expression and purification of human β -secretase (BACE-1) for X-ray crystallography. *Protein Expr Purif*, 2002, 26(1): 139–148.
- [11] Chang KH, Baek NI, Yang JM, et al. Expression and characterization of recombinant β -secretase from *Trichoplusia ni* BTI Tn5B1-4 cells transformed with cDNAs encoding human β 1,4-galactosyltransferase and Gal β 1,4-GlcNAc α 2,6-sialyltransferase. *Protein Expr Purif*, 2005, 44(2): 87–93.
- [12] Yan RQ, Bienkowski MJ, Shuck ME, et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature*, 1999, 402(6761): 533–537.
- [13] Sinha S, Anderson JP, Barbour R, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature*, 1999, 402(6761): 537–540.
- [14] Shi XP, Chen E, Yin KC, et al. The pro domain of β -secretase does not confer strict zymogen-like properties but does assist proper folding of the protease domain. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 10366–10373.
- [15] Sidera C, Liu C, Austen B. Pro-domain removal in ASP-2 and the cleavage of the amyloid precursor are influenced by pH. *BMC Biochem*, 2002, 3: 25–36.
- [16] Emmons TL, Shuck ME, Babcock MS, et al. Large-scale purification of human BACE expressed in mammalian cells and removal of the prosegment with HIV-1 protease to improve crystal diffraction. *Protein Pept Lett*, 2008, 15(2): 119–130.
- [17] Zhang W, Espinoza D, Hines V, et al. Characterization of β -amyloid peptide precursor processing by the yeast Yap3 and Mkc7 proteases. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1359(2): 110–122.
- [18] Lüthi U, Schaerer-Brodbeck C, Tanner S, et al. Human β -secretase activity in yeast detected by a novel cellular growth selection system. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1620(1/3): 167–178.
- [19] Middendorp O, Ortler C, Neumann U, et al. Yeast growth selection system for the identification of cell-active inhibitors of β -secretase. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1674(1): 29–39.
- [20] Haniu M, Denis P, Young Y, et al. Characterization of Alzheimer's β -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21099–21106.
- [21] Charlwood J, Dingwall C, Matico R, et al. Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's β -secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 16739–16748.
- [22] Sun XL, Tong YG, Qing H, et al. Increased BACE1 maturation contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J*, 2006, 20(9): 1361–1368.
- [23] Capell A, Steiner H, Willem M, et al. Maturation and pro-peptide cleavage of β -secretase. *J Biol Chem*, 2000, 275(40): 30849–30854.
- [24] Benjannet S, Elagoz A, Wickham L, et al. Post-translational processing of β -secretase (β -amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid- β production. *J Biol Chem*, 2001, 276(14): 10879–10887.
- [25] Nakayama K. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J*, 1997, 327(3): 625–635.
- [26] Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, et al. α -factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(15): 4642–4646.
- [27] Invitrogen. *Pichia* expression kit: for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*[EB]. [2009]. Invitrogen website: http://toolszh.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf.
- [28] Cao ZW. Staining of the glycoproteins in gel after the SDS-PAGE. *Biotechnol Bull*, 2006(5): 87–89. 曹佐武. 糖蛋白 PAGE 分离后的糖基显色法. *生物技术通报*, 2006(5): 87–89.
- [29] Morel N, Massoulié J. Expression and processing of vertebrate acetylcholinesterase in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem J*, 1997, 328(Pt 1): 121–129.
- [30] Yang JL, He HX, Zhu HX, et al. Optimization on the production of analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch in *Pichia pastoris*. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 44(1): 91–94. 杨金玲, 何惠霞, 朱慧新, 等. 蝎毒镇痛活性肽在毕赤酵母中表达条件的优化. *药理学学报*, 2009, 44(1): 91–94.
- [31] Haniu M, Bennett BD, Denis P, et al. Characterization of

- Alzheimer's β -secretase protein BACE: processing and other post-translational modifications//Iqbal K, Sisodia SS, Winblad B. Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 2001: 739-745.
- [32] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45-66.
- [33] Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, et al. Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J Biol Chem, 1991, 266(34): 22807-22817.
- [34] Lv L, Yang QY, Zhao Y, et al. BACE1 (β -secretase) inhibitory chromone glycosides from *Aloe vera* and *Aloe nobilis*. Planta Med, 2008, 74(5): 540-545.
- [35] Hong L, Koelsch G, Lin XL, et al. Structure of the protease domain of memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor. Science, 2000, 290(5489): 150-153.

~~~~~

### 本 期 广 告 索 引

| 企 业              | 版 位 | 企 业             | 版 位 |
|------------------|-----|-----------------|-----|
| GE Healthcare 公司 | 封 底 | 生物谷网站           | 内 页 |
| 宝生物工程（大连）有限公司    | 封 二 | 艾本德（上海）国际贸易有限公司 | 内 页 |
| 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司 | 封 三 | 镇江东方生物工程公司      | 内 页 |
| 安琪酵母股份有限公司       | 内 页 |                 |     |