

重组羧肽酶 B 应用于 CP 制备工艺中的研究

刘梅香, 牛 丁

通化东宝药业股份有限公司, 吉林通化 134123

【摘要】通过 RT-PCR 克隆小鼠羧肽酶 B (CPB) 的原核 cDNA 编码序列, 并重新组装到原核表达质粒 PT7-473 中, 其在大肠杆菌中表达。SDS-PAGE 电泳和灰度扫描显示质粒中 6His 的表达量占总蛋白的 35%。在变性条件下使用 Ni-NTA 柱纯化 CPB 原。在归化液中稀释再归化后, 具有酶活性的 CPB 经胰蛋白酶 (tps) 分离, 经 DEAE-FF 纯化, 得到比活为 13.5U/mg 的纯 CPB (28.5mg/L)。对胰岛素原 c 肽 (CP) 三聚体 tps 脱 CPB 的水解产物进行高效反相液相色谱分析, 证明重组 CPB 可以替代提取的 c 肽羧肽酶提取物制备 c 肽。

【关键词】羧肽酶原 B; CPB; 融合表达; 分离纯化; CP

【中图分类号】TQ464 **【文献标识码】**A **【DOI】**10.12325/j.issn.1672-5336.2022.16.036

羧肽酶 B (Carboxypeptidase B, CPB, EC3.4.17.2) 是一种含锌肽酶, 可特异性水解肽链的 C 端碱基氨基酸 (AA) (精氨酸、赖氨酸或鸟氨酸酶)。CPB 含有 307 个 AA, 相对分子质量为 35KU。天然 CPB 是由羧基肽酶 B (preproxy-peptidase B) 合成的, 其 N 端片段含有 108 个 AA (其中 13 个为信号肽序列, 95 个 AA 构成肽的活性部分), c 端与 CPB 结合。CPB 被转运到内质网后, 信号肽裂解得到 CPB (pCPB), 没有酶活性 B, 然后酶促降解为酶活性 CPB, 并由肽分解为活性类 tps。因为 CPB 以酶的形式分泌蛋白水解酶, CPB 的直接表达会影响表达系统, 而 pCPB 的表达会中断 tps 产生酶活性^[1]。目前使用的 CPB 来源于动物胰腺, 价格昂贵, 不能完全去除其他蛋白酶。本研究通过克隆 CPB 表达羧肽酶原, 并使用蛋白酶切获得 CPB。这种方法简单而富有表现力, 通过 DEAE-FF 的一步纯化产生每升 28.5mg 重组 CPB, 而后 CPB 重组形

成 CP, 与 CPB 的自然提取具有相同的效果。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

质粒: PMD-18T, Takara, PT7-473-PCPB, 中科院生物工程中心建。表达载体 PT7-473、克隆 DH5a 株和表达株 BL21 (DE31), 中科院生物工程中保存。

1.1.2 酶及关键试剂 (见表 1)

1.1.3 引子 (见表 2)

引物合成及测序均在上海博亚公司进行。

1.2 实验方法

1.2.1 pCPB 基因的获取

摘除颈部后, 大鼠死亡, 立即打开腹腔, 取出胰腺, 切成约 0.1g, 液氮研磨, 收集粉末约 30mg, 匀浆, 用酶标仪提取总 RNA, 随机交互索引的转录组接收 cDNA。以

表 1 本研究中所使用的酶及关键试剂

酶及关键试剂	规格	生产厂家
猪 CPB	176U/mg	Sigma
马尿酸-L 赖氨酸	/	Sigma
tps	250NF.U/mg	AmrescoBBST 分装
限制性内切酶 NdeI.HindI 及连接酶试剂盒	/	宝生物工程 (大连) 有限公司
RNA 提取设备	/	Qiaogen
反转录试剂盒 ThermoscriptTTM	/	Invitrogen
Ni 亲和柱, DEAEsepharoseM 快速释放凝胶	/	Amasia 中国有限公司
还原型、氧化谷胱甘肽	/	Amresco 分装
CP 三聚体	/	本室表达制备

表 2 本研究所使用的引子情况

pCPBs	5'-GCGGGATCCCATGCTTCCGAGGAGCACTTTGATGGC-3'	含 BamH I 酶切位点和编码 N 端 9 个 proCPB 的 AA 的核苷酸序列
pCPBa	5'-CGCAAGCTTTCACTAATATAGATGTTCTCGGACATAATT-3'	含 Hind III 的酶切位点和编码 C 端 10 个 AA 的核苷酸序列

2 μ L 为模板, 设计了 PCPB-S 和 PCPB-A 的 PCR 特异性引物, PCR 产物基于 1% 低温琼脂糖固化。通过凝胶电泳鉴定 1200bp 的条带并连接到通用载体 PMD-18T。将连接产物转化为 DH5a 克隆, 用 LB(Amp') 板包被并在 37°C 培养箱中培养过夜。选择单个菌落并在液体 LB(Amp) 培养基中生长过夜。基因库大鼠胰腺的 BLAST 和 proCPB 证实了序列结果。

1.2.2 重组质粒

构建由 pt7-473-pCPB 限制性内切酶 BamHI 和 Hind 鉴定的质粒 PMD-18T-PCPB, 并通过电泳鉴定, 找到 pCPB 的 1200bp 酶片段, 通过同一酶与 pt7-473 连接转化酶。DH5a 受体细胞, 并分泌少量质粒。通过用 BamHI

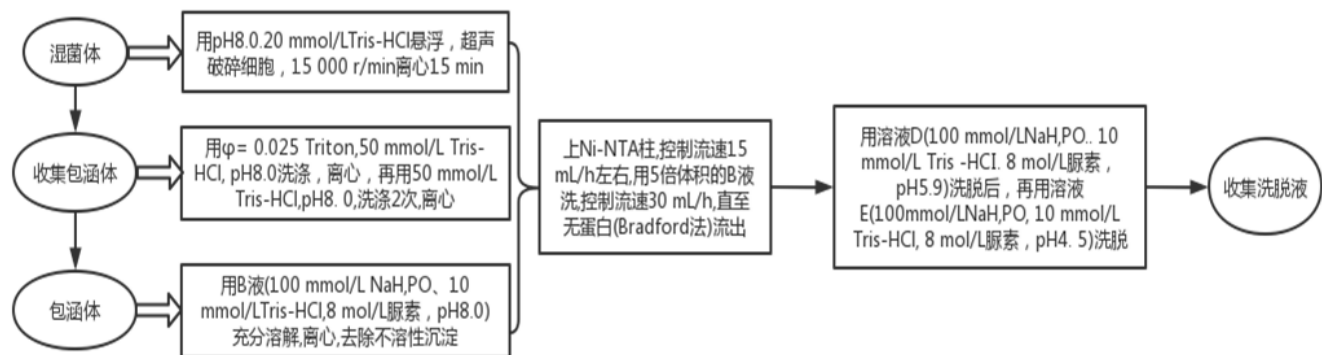


图 1 pCPB 包涵体的溶解及变性条件下 Ni-NTA 柱亲和纯化流程

用 NaOH 调节洗脱液 pH 至 9.5, 加入复性液 (复性液为 1mmol/L GSH、0.2mmol/L GSSG、0.2mmol/L ZnCl₂、0.1mol/L 甘氨酸, pH9.5) 至 0.1-1mg/mL, 25°C, 蛋白浓度。调节 pH 至 8.5, 加入 tps 至终浓度为 201g/mL, 37°C 反应 1h, 加入 0.1mmol/L 苯甲磺酰氟 (PMSF) 完成反应。

1.2.6 DEAE-FFSephrose 分离纯化 CPB

DEAE-FFSephrose 在上柱前用 20mmol/L Tris-HCl, 1, pH8.0 平衡。将再复性液直接上样到柱上并用含有 80mmol/L NaCl, pH8.0 的 20mmol/L TrisHCl 洗脱。收集并测量 OD₆₀₀ 和每个收集管的活性。

1.2.7 CPB 活性和蛋白质含量的测定

采用 Folk 法, 以 1mmol/L Marulacil-L-赖氨酸 (含 0.1mol/L NaCl) 为底物, 25°C 下进行测定。活性被定义为在 25°C 下每分钟催化 1 个 pmol 底物 malanil-lysine (或 malanil-l-arginine) 水解, 光吸收率在 254nm 处增加, 路径长度为 1cm。酶 0.12 的量定义为酶活性的单位。Bradford 使用牛血清白蛋白测定蛋白质含量。

1.2.8 用重组 CPB 制备 CP

纯化后, 将含有胰岛素-C 肽三聚体的融合蛋白以 1:200 和 1:200 的质量比溶解在 1.5mg/ml 酶溶剂缓冲液 (含 100mmol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液, q=0.001 tween-20) 中。

和 Hind 双重消化判断准确变化的受体细胞 PT7-473-PCPBBL21 (DE3)。

1.2.3 重组菌株在摇瓶中的表达

根据分子克隆的实验方法, 在液体培养基 5ml LB (含 100ug/mL 氨苄青霉素) 中选择单个菌落, 培养于 37°C 培养基中 24h。将 1% 的细菌接种到 250ml 的抗 LB 培养基中 24h, 37°C OD₆₀₀=0.3-0.5 培养, IPTG 诱导, 离心 2.5h, 收集细菌。

1.2.4 pCPB 包涵体的溶解及变性条件下 Ni-NTA 柱亲和纯化

具体操作流程见图 1。

1.2.5 复性及酶解

溶解在酶缓冲液中, 以 100 的比例添加 tps 和 CPB 标准品 / 重构物, 25°C 溶解 2h。进行 RP-HPLC 分析 (250mm KromasilC8 柱: 内径 4.6mm; 粒径 7 μ m; 孔径 10nm, HewlettPackard 1100HPLC (Grenoble, France) 分析系统)。40°C 柱温, 梯度洗脱, 流动相为 q=0.1~0.4 的乙腈溶液 (含三氟乙酸 (ϕ 0.001)), 流速为 1mL/min, 检测波长为 214nm。

2 结果与分析

2.1 pCPB 基因的克隆与鉴定

通过 RT-PCR 提取和鉴定小鼠胰腺的总 RNA。扩增条带约为 1200bp。克隆和测序结果表明, 小鼠 pCPB 基因编码长度为 1209bp, 与前人报道一致。BLAST 结果显示, genbank (EntryNumber: P19223) 中有 5 个不同于 pCPB 基因的核苷酸, 这导致了两个 AA 的变化, 其中 Lys 变为 Asn, Arg 变为 Glu。该酶切割产生的序列, 然后与表达血浆结合。分别采用 Hind 酶切单酶切法和 BamHI / Hind III 双酶切法鉴定质粒表达, 得到相应的限制带。

2.2 重组菌的诱导表达

经 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) 诱导后, pCPB 以包涵体形式表达, 每升培养基可获得 1.4g 包涵体, pCPB 的绝对表达量为 0.36g/L。灰度扫描显示 pCPB 表达



图2 人CP与人CP融合蛋白 trinserAA 序列示意图

的蛋白质约占细菌总蛋白质的35%。

2.3 pCPB的Ni-NTA亲和纯化、复性和酶解

在变性条件下,大部分pCPB被溶液D结合纯化,而大部分蛋白质被溶液E结合,pCPB的加工率约为30%。tps裂解后,相对分子量为45KU,在CPB中发酵,相对分子量为35KU。

2.4 CPB对DEAE-FF的纯化和活性

酶解经DEAE-FF纯化,用0.1mol/LNaCl稀释得到CPB。由于添加了流动样品和酶水解样品浓度低,该步骤CPB蛋白的平均回收率为35%。合并洗脱液的平均比活性为13.5U/mg蛋白质,在相同条件下测定的标准CPB(Sigma)活性为14.2U/mg蛋白质。

2.5 重组CPB在CP制备中的应用

构建了CP的 trinser 基因并与大肠杆菌融合(图2)。纯化后,使用双 tps/CPB 溶液得到c肽单体(图3(a))。由于C-肽序列中没有碱性AA,因此在设计C-肽序列时,在每个个体的每一端添加两个氨基酸作为CPB的一部分。如图3(a)所示,酶切过程从CPB和 tps 在氨基酸残基点的分离开始,然后肽C的溶液末端在肽C的天然结构之外被切割。同样的结果可以与CPB公布的结果。结果具有可比性。图3(b)不同时间酶产品分析,表明酶解可在140分钟内完成。

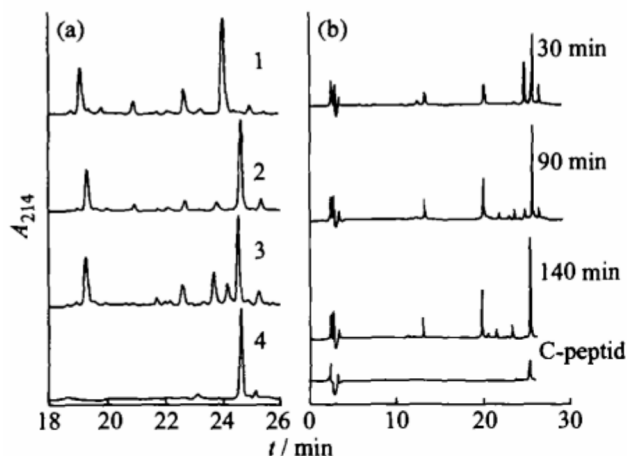


图3 FP-CP3融合蛋白水解产物的Rp-hplc分析

3 讨论

人、猪、牛和小鼠的胰腺CPB具有相同或基本相同的AA序列和相同的功能。因此,本实验选择小鼠胰腺提

取pCPB基因。通过RT-PCR克隆了小鼠pCPB的互补DNA序列。最初的13个AA在羧肽酶之前完成,还包括一个信号肽序列,但pCPB表达的信号肽和克隆的复律没有效果。在生物体中,信号肽在内质网过程中被裂解在前原基CPB中,活性pCPB由细胞分泌,然后在活性心脏中被tps消化。克隆了全长1209bp的编码序列。与李素霞等人(2003)公布的小鼠羧肽酶原B序列(GeneticBankentrynumber: P19223)相比,有5个核苷酸差异,导致2个AA变化,一个是CPB中的第11个裂解物。AA变成Asn,一个是139Arg变成Glu。与相关CPB研究中描述的活性方法不同,这两个AA突变不是罐装AA或与活性方法密切相关的残基,而是与活性部分中的锌原子相连的His.69、Glu-72和His196的协调作用。Arg-127和Glu-270、Arg-145、Asn-144和tyr248参与催化反应和底物结合,Asp-255可以确定碱性AA的特异性。

CPB活性的测定通常涉及两种底物:马尿酸-L-精氨酸和马尿酸-L-赖氨酸,两个反应的Km值相差10倍左右^[2]。本试验用马尿酸-L-赖氨酸为底物,测定的标准CPB的比活为每毫克蛋白14.2u,与用马尿酸-L-精氨酸为底物测得的每毫克蛋白176u(Sigma提供的数据)相差12倍。重组CPB的活性与标准CPB的活性相似在相同的分析条件下。

本文对利用基因工程方法生产重组CPBs进行了提前讨论,并取得了良好的效果。所涉及的包涵体具有高度的表现力,易于纯化。一旦CPB以酶原的形式表达,通过酶解获得活性CPB,避免了CPB直接表达对宿主细菌的负面影响。表达的CPB可以替代昂贵的猪CPB进行进一步研究,例如通过基因工程生产胰岛素或其他活性肽。

参考文献:

- [1] 秦百君,陈月桥,刘铠荣,杨昕,谭琦,陈蕊,卜献忠,陈国忠.尿液CPB激活肽作为急性重症胰腺炎早期诊断的潜在标志物:一项具有试验序贯分析的Meta分析[J].胃肠病学和肝病学杂志,2022,31(02):208-216.
- [2] 於瑞梅,辛瑜,顾正华,吴松,李由然,丁重阳,石贵阳,张梁.重组大肠杆菌分泌表达鼠源CPB及其培养基优化[J].生物加工过程,2020,18(06):681-689.