

人胱硫醚 β 合成酶原核表达纯化及鉴定*

王伟 杜美 陈欢 陆婕[△]

(华中科技大学生命科学与技术学院生物物理所 湖北 武汉 430074)

摘要 目的 构建人胱硫醚 β 合成酶(human cystathionine β -synthase, hCBS)基因原核表达载体,在 *E. coli* BL21(DE3)中表达,并进行纯化和酶活性检测。方法 以胰腺细胞 cDNA 文库为模板,采用聚合酶链式反应(PCR)扩增 hCBS 基因蛋白编码区的全序列,克隆入原核表达载体 pET32a(+) 构建重组质粒 pET32a(+)-hCBS。经限制性内切酶双酶切及 DNA 序列分析鉴定目的基因后与人 CBS 基因(基因 bank 号 :BT007154.1)完全一致,转入 *E. coli* BL21(DE3)中,由 IPTG 诱导表达融合蛋白。结果 经 SDS-PAGE、Western blot 分析,证明诱导表达的蛋白为重组人 CBS(rhCBS)。再由 Ni-NTA 树脂亲和层析,并脱盐冷冻干燥后获得重组 rhCBS (约 19 mg/L 培养物),并测得其比活力约为 57 kU/g。结论 成功地表达纯化出具有功能活性的重组蛋白 rhCBS,为进一步研究该酶的相互作用蛋白以及其在生物学和临床科学的作用奠定了基础。

关键词 胱硫醚 β 合成酶;同型半胱氨酸;酶活力;原核表达;pET32a(+)

中图分类号 :Q75 Q78 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)05-830-04

Expression, Purification and Characterization of Recombinant Human CBS in *Escherichia coli**

WANG Wei, DU Mei, CHEN Huan, LU Jie[△]

(College of Life Science and Technology, Institute of Biophysics and Biochemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430074, China)

ABSTRACT Objective: To construct the human cystathionine β -synthase express vector, and to investigate the mechanism and pharmaceutical function. **Methods:** The gene encoding hCBS was amplified by RT-PCR from human pancreatic cell cDNA library, then was inserted into the expression vector pET32a (+) to construct the pET32a (+)-CBS. The recombinant human CBS (rhCBS) was expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). By restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis, the right recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and rhCBS was expressed by IPTG induction and purified by Ni-NTA affinity chromatography, determined by SDS-PAGE and Western blotting analysis. **Results:** The gene inserted into pET32a (+) was exactly as the same as hCBS gene. A total of 19 mg of high purity (over 98%) rhCBS was obtained from 1 L culture. **Conclusions:** The rhCBS with functional activity was successfully expressed, and laid the foundations for further study of its interacted protein and its roles in biology and clinical science research.

Key words: CBS; Hcy; Enzymic activity; Prokaryocyte expression; pET32a(+)

Chinese Library Classification(CLC): Q75 Q78 Document code:A

Article ID:1673-6273(2011)05-830-04

前言

CBS 定位于胞浆,由四个相同的亚基构成同源四聚体,相对分子量为 63 kDa,是一种磷酸吡哆醛(PLP)依赖酶^[1,2]。CBS 活性中心由第 37 位的谷氨酸(Glu)到第 413 位精氨酸(Arg)的多肽构成,该序列高度保守。人 cbs 基因定位于 21 号染色体靠近端粒的位置(21q22.3)^[3]。CBS 活性中心除了具有结合 Hcy, Ser 等底物位点外,还包含 PLP、S-腺苷蛋氨酸和亚铁血红素(heme)3 个配基结合位点。同型半胱氨酸(homocystein, Hcy)血浆浓度的升高已被认为是血管疾病,包括脑血管疾病,冠心病和血栓形成的独立危险因素^[4]。Hcy 代谢有 2 个途径:重新甲基化形成蛋氨酸,或者经转硫化生成胱硫醚,再进一步代

谢成为无机硫化物。转硫过程中,重要的第一步是由胱硫醚 β 合成酶(CBS)催化。CBS 催化丝氨酸与 Hcy 的缩合,生成胱硫醚,大约 50%的 Hcy 被 CBS 和胱硫醚酶不可逆的转化为半胱氨酸^[5]。当 CBS 缺乏或者突变时,其功能活性可能降低或丧失,HCY 血浆浓度升高,从而导致或参与血管系统疾病形成。

由于 CBS 功能型酶蛋白,其天然状态含量低,分离获得大量的天然产物比较困难。而合成多肽成本高,限制了其应用前景。为此,本研究构建其原核表达载体 pET32a(+)-CBS,在 *E. coli* BL21(DE3)中可溶性表达,并纯化出具有活性的重组蛋白,为今后的研究奠定基础。

1 材料和方法

* 基金项目 湖北省自然科学基金(2009CDB076) 华中科技大学自主创新研究基金(2010MS009)

作者简介:王伟(1980-)男,博士,主要研究方向:分子免疫学, E-mail: bioww@yahoo.cn

[△]通讯作者:陆婕, E-mail: lujie.jane@163.com

(收稿日期:2010-12-03 接受日期:2010-12-28)

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 pET32a(+)质粒购自 Novagen 公司;大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存。

1.1.2 酶及试剂 *Nde* I, *Xho* I, T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;DNA marker、蛋白 marker、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Tiangen 公司;IPTG 购自 Merck 公司;Ni-NTA 树脂购自 Qiagen 公司;anti-6His 抗体购自 MBL 公司,羊抗鼠 IgG 二抗购自武汉三英公司;人胰腺 cDNA 文库 (Human Pancreas Matchmaker cDNA Library)购自 Clontech 公司。Ser、Hcy、胱硫醚、PLP、S-腺苷蛋氨酸购自 Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器 冻干机(美国 Savant);高速冷冻离心机(长沙英泰);分析兼半制备型高效液相色谱仪(美国 Agilent);分光光度计(美国 Thermo)

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体 pET32a(+)-hCBS 的构建 根据 hCBS 的编码区序列设计特异性引物,上游引物序列为 5'-GCCATATGATGCCTTCTGAGACCC-3'(下划线部分为 *Nde* I 酶切位点);下游引物的序列为:5'-ATACTCGAGCTTCTGGTCCCGTCTCTG-3'(下划线部分为 *Xho* I 酶切位点),引物均由上海生工公司合成。以人胰腺 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增,反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 *Nde* I、*Xho* I 分别酶切 PCR 产物与 pET32a(+)质粒,经琼脂糖凝胶回收,将载体和目的片段用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接的重组质粒 pET32a(+)-hCBS 转化 *E. coli* DH5 α ,在含有 40 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂糖培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑选阳性克隆,扩增后提取质粒,并用 *Nde* I 与 *Xho* I 酶切鉴定,由上海生工测序,确认得到正确的重组质粒。

1.2.2 rhCBS 的诱导表达及纯化 将重组质粒 pET32a(+)-hCBS 转化 *E. coli* BL21 (DE3),在含 40 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜,后以 1:100 转接到 1 L 新鲜的含 40 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基。37 $^{\circ}$ C 摇菌 2 h 后,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mM,30 $^{\circ}$ C 诱导 2 h,5 000 rpm 离心 10 min 收菌。诱导表达出的融合蛋白 C 末端包含一个 6His 片段,适用 Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化目的蛋白。适量体积缓冲液 (20 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, 10 mM 咪唑, pH 7.4) 重悬,以超声 5 s,间隔 5 s,保护温度 0 $^{\circ}$ C 超声破菌,15 000 rpm 离心 20 min,取上清加入 Ni-NTA 树脂中,4 $^{\circ}$ C 结合 1 h,加入 5 倍柱体积的 Washing Buffer (20 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, 20 mM 咪唑, pH 7.4) 在柱上洗涤 10 min 后,分别用含有 40 mM,100 mM,200 mM 咪唑的 Elution Buffer (20 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 7.4) 进行梯度洗脱。

1.2.3 western blot 检测 将纯化后的 rhCBS 蛋白进行 SDS-PAGE 胶电泳,300 mA 转膜 2 h,50 g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,anti-6His 抗体(一抗,1:1 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,羊抗鼠 IgG(二抗,1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min。加入发光剂后曝光、显影。

1.2.4 rhCBS 活性检测及酶活测定 酶反应体系参照已有方法^[6,7]略加改进。取 40 μ L 反应缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.6),加入 0.1 mol/L 丝氨酸 80 μ L,12.5 mmol/L PLP 8 μ L,12.5

mmol/L S-腺苷蛋氨酸 8 μ L,0.1 mmol/L 分离纯化的 rhCBS 10 μ L;对照组不加 CBS,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后,再加入 0.2 mol/L 的 Hcy 40 μ L,1 mol/L DTT 1 μ L,用水定容到 400 μ L。于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,冰浴 5 min。取 50 μ L 样品用高效液相色谱(HPLC)分析,分离柱为 Vydac 218 TP54 C18 柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, Agilent 1000 HPLC system),流动相分别为含 0.1%三氟乙酸(TFA)的超纯水和乙腈,流速 0.8 ml/min,0-10%乙腈洗脱 10 min。

胱硫醚 β 合成酶酶活测定方法为:取孵育 2 h 后的反应体系 200 μ L 冰浴 5 min,标准管另取 1 μ mol/L 胱硫醚 200 μ L,各管加 3.3 ml 茚三酮乙醇溶液(1 g 茚三酮溶于 100 ml 乙醇),沸水浴 5 min 显色,冰浴 5 min 终止反应,室温静置 20 min 后,用分光光度计于 453 nm 波长测定吸光度值。每组 5 管,重复 3 次。胱硫醚 β 合成酶酶活单位(U)定义为:在 37 $^{\circ}$ C 1 h 催化 1 μ mol 胱硫醚生成所需的酶量为 1 个单位,酶活性单位计算公式为:胱硫醚(μ mol) = ($A_{453\text{nm}}$ 实验组 - $A_{453\text{nm}}$ 对照组) / ($A_{453\text{nm}}$ 胱硫醚 \times 2)。rhCBS 比活力 = 胱硫醚(μ mol) / 体系中 rhCBS 质量(g)。

1.2.5 统计学处理 采用 PEMS 3.1 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示,组间两两比较采用 Student's *t*-test 检验分析。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定

将重组质粒用 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切后,经琼脂糖凝胶电泳分析表明,质粒片段约为 5 300 bp,hCBS 基因片断约为 1700 bp,均符合预期的结果(图 1)。

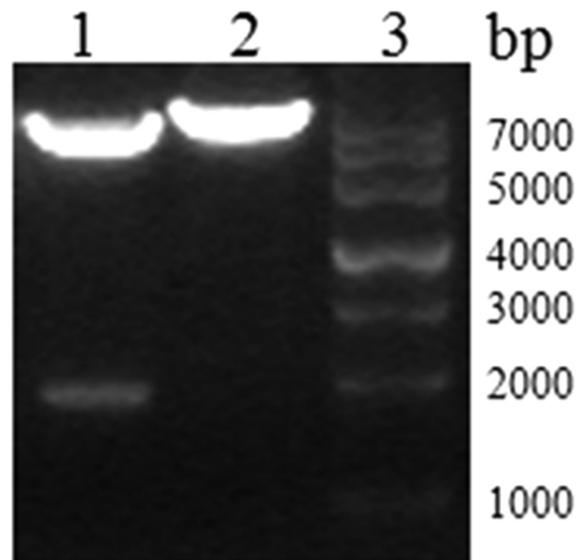


图 1 重组质粒 pET32a(+)-CBS 的酶切鉴定:1: pET32a(+)-CBS 双酶切 *Nde* I + *Xho* I 鉴定; 2: pET32a(+)-CBS 单酶切 *Xho* I 鉴定; 3: DNA marker

Fig. 1 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pET32a(+)-daintain/AIF-1: 1: pET32a (+)-daintain/AIF-1 identification with *Nde* I and *Xho* I; 2: pET32a(+)-daintain/AIF-1 identification with *Xho* I; 3: DNA marker

2.2 重组质粒 pET32a(+)-CBS 的诱导表达及纯化

加 IPTG 后,30 $^{\circ}$ C 诱导表达,诱导时间为 2 h,表达产物经 SDS-PAGE 电泳后染色,经 IPTG 诱导 2 h 裂解。菌体裂解后的

上清与 Ni-NTA 树脂结合后,经咪唑梯度洗脱后获得较纯的目的蛋白。如图 2 所示。组分 4 经 G-25 层析柱脱盐后,冷冻干燥获得蛋白干粉,称重后计算出产量为 19 mg/L 培养物。

2.3 rhCBS 的 Western blot 分析

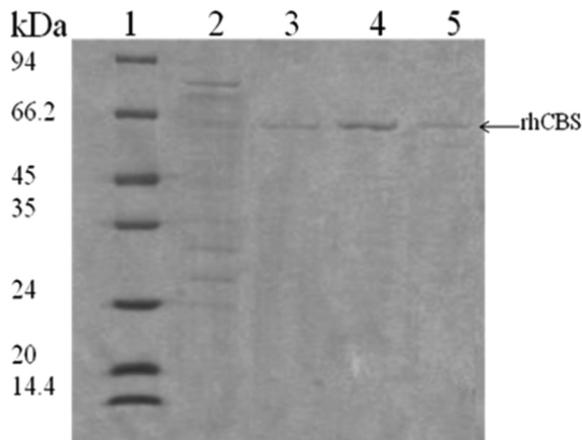


图 2 梯度洗脱 Ni-NTA 树脂结合蛋白 :1 蛋白 marker 2-5 分别用含 20 ,40 ,100 ,200 mM 咪唑的 Elution Buffer 依次洗脱,箭头表示 rhCBS
Fig. 2 Eluted by a linear gradient imidazole :1: Protein molecular mass markers; 2-5:Eluted by a linear gradient of 20, 40, 100, 200 mmol/L imidazole in elution buffer; arrow rhCBS

按 1.2.4 方法,胱硫醚的出峰时间为 2.039 min。与阴性对照组相比,rhCBS 活性检测组在 2.03-2.04 min 这个时间段的峰

以 anti-6His 为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行免疫印记分析。Western blot 结果显示,纯化后的 rhCBS 含有带着 His 标签的 C 末端。结果如图 3 所示。

2.4 rhCBS 的活性检测

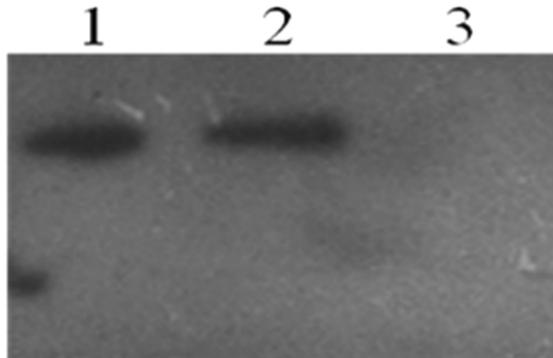


图 3 重组蛋白 Western blot 分析 :1 纯化后的 rhCBS 2 IPTG 诱导后的重组菌裂解产物 3 未经诱导的重组菌裂解产物
Fig. 3 Analyzing of rhCBS by Western blot :1: Purified rhCBS 2: Lysates of BL21(DE3)[pET32a(+)-CBS]] induced by IPTG 3: Lysates of BL21 (DE3)[pET32a(+)-CBS]] without IPTG induction

值有明显增强,如图 4 所示。由此我们可以判定反应体系中有胱硫醚的形成,即 rhCBS 融合蛋白具有胱硫醚合成活性。

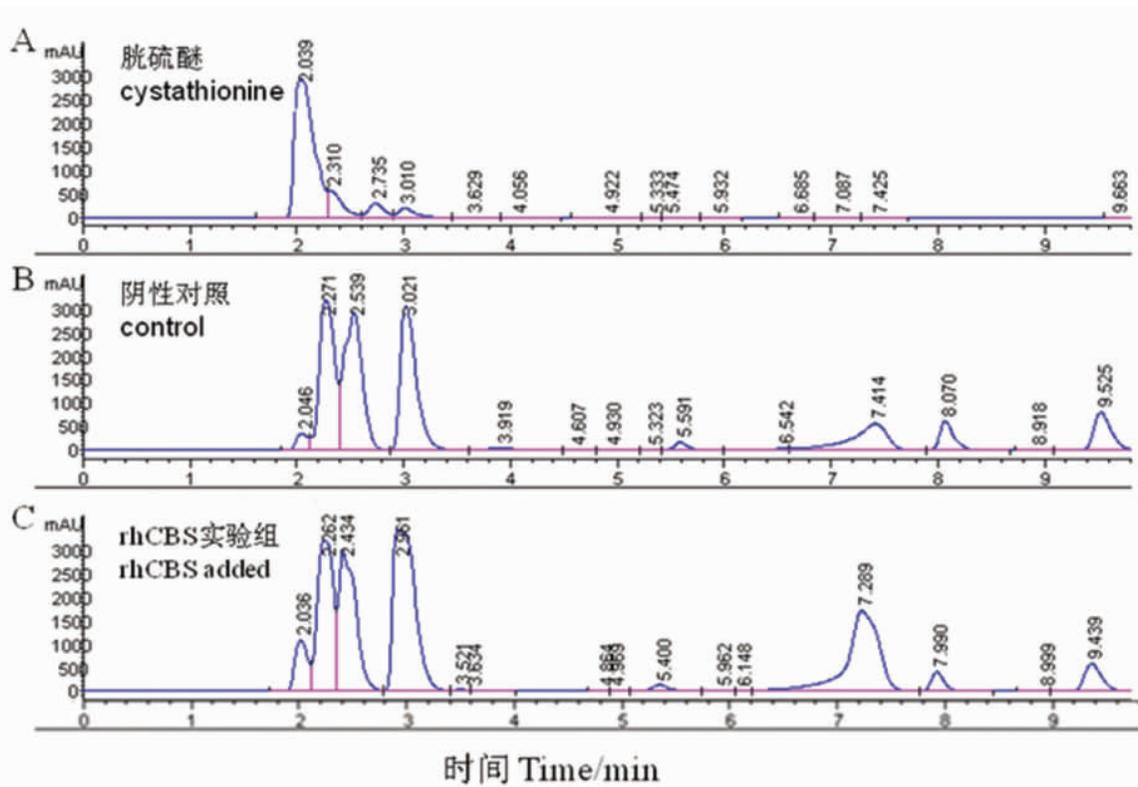


图 4 HPLC 色谱分析图 :A 胱硫醚组 2 未加 rhCBS 的反应体系作为阴性对照组 3 rhCBS 活性检测组
Fig. 4 RhCBS activity analyzed by HPLC :1: Cystathionine 2: Reactions without rhCBS as negative control 3: Reactions with rhCBS

2.5 酶活测定

在 453nm 波长下测得:标准品 1 μmol/L 胱硫醚的光吸收值为 2.1 ± 0.1,在终浓度为 2.5 μmol/L rhCBS 的作用下,反应

产物的光吸收值为 0.33 ± 0.3 远高于未加 rhCBS 的阴性对照组光吸收值为 0.18 ± 0.1(n = 5 p < 0.05)。经计算 rhCBS 的比活力 = 57 kU/g。

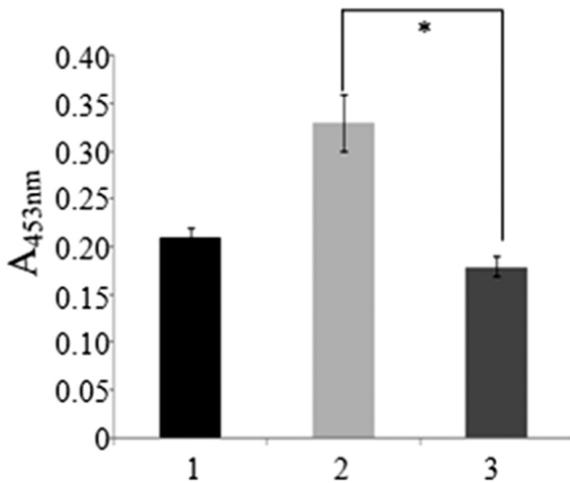


图5 波长453nm下的光吸收图谱:1:1 μmol/L 胱硫醚 2:反应产物 3:未加rhCBS反应体系。n=5,*P<0.05,误差线表示±SD
Fig. 5 Absorbance at A_{453nm}:1:1 μmol/L cystathionine 2: Reaction products 3: Reaction products (without rhCBS) as negative control. n=5,*P<0.05,error bar means ±SD

3 讨论

目前,大肠杆菌表达系统广泛用于重组蛋白的生产,其优点是表达水平较高、操作简单,有多种菌株突变体可供选择。而pET32a(+)是Novagen公司的代表产品之一,被设计用来克隆和高表达蛋白序列,具有快速、高效、蛋白可溶性高、易于二硫键形成等优点^[8]。由于daintain/AIF-1是个具有EF-hand等二级结构的小分子功能性蛋白,其空间构象的正确与否直接关系到该蛋白的生物学活性。因此本研究选用pET32a(+)作为表达载体,以期能够获得具有功能的重组蛋白。

如果把目的基因直接插入pET32a(+)的多克隆位点区,表达出的融合蛋白将包含Trx-, His-, S-Tags和2个His-Tag标签蛋白。这样得到融合蛋白在纯化过程中需要增加肠激酶酶切步骤,纯化后的产物中不可避免的会含有少量肠激酶。并且所获蛋白N末端仍有数个酶切后的氨基酸残基残留。为避免这些缺点,本研究利用RT-PCR技术获得完整人CBS蛋白的编码序列,并在其N末端添加Nde I酶切位点(CATATG),C末端添加Xho I酶切位点。PCR产物经限制性内切酶Nde I和Xho I双酶切后,插入同样酶切后的pET32a(+)中。这样重组质粒中Trx-, His-, S-Tags和1个His-Tag序列被切除,T7启动子序列后的转录起点为Nde I酶切位点中的ATG,翻译出的Met即是人CBS N端首个蛋白。为避免C末端产生突变,本研究在目标蛋白的C末端加入6个His片段进行保护,并且利用该片段进行分离纯化。通过这种设计,成功表达出具有活性的目标蛋白,为今后尝试采用pET32a(+)质粒表达可溶性、具有天然N末端的有着复杂结构的多肽或蛋白提供了一种新的载体构建方法。本研究采用HPLC来检测CBS的胱硫醚合成活性。与传统方法相比,其优点在于该方法更加灵敏,理论上可以检测到0.01 ng 胱硫醚含量。但由于反应体系中含有多种分子,产物含量在较高背景的影响下难以确定精确数值,且这种方法对仪器条件要求较高,存在一定的局限性,因此本研究采用紫外-可见分光光度计法来测定rhCBS酶活。本文所纯化出的rhCBS比

活力为57 kU/g,低于从人肝中用生化方法纯化的CBS比活力160 kU/g,这可能与蛋白表达、分离和纯化过程对蛋白质活性的影响有关。

CBS基因突变可能导致CBS活性降低或丧失,引起高同型半胱氨酸血症。血浆中过高的同型半胱氨酸促进动脉粥样硬化发生发展^[9]。本实验室曾发现在一定条件下,炎症多肽daintain能够与CBS相结合,而daintain对小鼠动脉粥样硬化进程的促进作用也曾有人报道^[10]。因此rhCBS的成功表达,对研究二者之间的相互作用有着重大的意义。

本文详细介绍了rhCBS的原核表达纯化过程,成功表达出天然N末端、C末端含有6His并具有生物学功能活性的rhCBS。目前,国内外对CBS的研究大都集中在其在动脉血管病变的机理研究,且主要关于CBS基因突变方面对动脉粥样硬化的影响,而对CBS在体内的相互作用蛋白的研究方面还较少。因此高效率获得具有生物学功能活性的rhCBS,将对筛选与其相互作用的蛋白以及后续的基础、临床研究起到重要作用。

参考文献(References)

- [1] Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals, distribution of homocysteine between competing pathways [J]. J Biol Chem, 1984, 259(15): 9508-9513
- [2] Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, et al. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects[J]. Lancet, 1995, 345(8943):149-151
- [3] Munke M, Kraus JP, Ohura T, et al. The gene for cystathionine β-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17 [J]. Am J Hum Genet, 1988, 42(4): 550-559
- [4] Fowler B. Homocysteine-an independent risk factor for cardiovascular and thrombotic diseases[J]. Ther Umsch, 2005, 62(9):641-646
- [5] 吴淑庆, 钱令嘉. 胱硫醚β-合成酶基因表达调控研究进展 [J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(3):165-167
WU Shu-qing, QIAN Ling-jia. Advances in the research of regulation of cystathionine β-synthase gene expression [J]. J Med Mol Biol, 2004, 1(3):165-167
- [6] Kraus J, Packman S, Fowler B, et al. Purification and properties of cystathionine beta-synthase from human liver. Evidence for identical subunits[J]. J Biol Chem, 1978, 253(18):6523-6528
- [7] 李丽帆, 方显明, 顾国龙, 等. 胱硫醚β-合酶活性测定及应用[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(9):863-864
LI Li-fan, FANG Xian-ming, GU Guo-long, et al. Assay and applications of cystathionine β-synthase activities [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2009, 30(9):863-864
- [8] LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm[J]. Nature Biotechnology, 1993, 11(2): 187-193
- [9] Antoniadis C, Antonopoulos AS, Tousoulis D, et al. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials[J]. Eur Heart J. 2009, 30(1):6-15
- [10] Mishima T, Iwabuchi K, Fujii S, et al. Allograft inflammatory factor-1 augments macrophage phagocytotic activity and accelerates the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice[J]. Int J Mol Med, 2008, 21(2):181-187