

重组蛋氨酸裂解酶原核体系的表达及纯化

胡振良, 张 芳, 田腊梅, 任晓丽, 田长富

(昆明医科大学生物医学工程研究中心, 基因与蛋白质工程研究室, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 建立 L-蛋氨酸 γ -裂解酶的原核表达、纯化体系. **方法** 合成 Metase 基因并构建重组质粒 pBSK-Metase. 通过分子克隆技术, 构建重组表达质粒 pBV220-Metase 和 pGEX-4T-1-Metase, 并将重组子转化到感受态大肠杆菌 Dh5 α 中. pGEX-4T-1-Metase 经异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导; pBV220-Metase 经 42 $^{\circ}$ C 温度诱导; 并对诱导条件进行优化, 获得大量表达; 建立蛋氨酸裂解酶纯化体系. **结果** 构建出 Metase 基因的两种高效原核表达体系 pBV220-Metase 和 pGEX-4T-1-Metase, 并优化各自的最佳诱导表达条件; 建立重组蛋氨酸裂解酶的纯化体系. **结论** 成功建立重组蛋氨酸裂解酶的原核表达、纯化体系; 获得高效原核表达重组子 pGEX-4T-1-Metase, 且获得纯度高达 95% 的蛋氨酸酶.

[关键词] 重组; 蛋氨酸裂解酶; 表达; 纯化

[中图分类号] Q812 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 06 - 0003 - 05

The Expression and Purification of Recombinant Methionine Lyase in the Prokaryotic System

HU Zhen-liang, ZHANG Fang, TIAN La-mei, REN Xiao-li, TIAN Chang-fu

(Proteins Engineering Research Center, Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To construct a prokaryotic expression and purification system of the L-methionine γ -lyase. **Methods** Metase gene was synthesized and a gene recombinant plasmid pBSK-Metase was constructed. The expression plasmids pBV220-Metase and pGEX-4T-1-Metase were constructed by molecular cloning technology, and were transformed into *e. coli* Dh5 α . The expression of pGEX-4T-1-Metase was induced by IPTG and pBV220-Metase was induced by incubation at 42 $^{\circ}$ C, the induction conditions were optimized. Through the study of the target protein purification, the methionine repressible enzyme purification system was established. **Results** Two highly efficient prokaryotic expression and purification system pBV220-Metase and pGEX-4T-1-Metase were established and their induction conditions were optimized. The methionine lyase purification system was established. **Conclusion** A prokaryotic expression and purification system of the L-methionine γ -lyase is established successfully, and pGEX-4T-1-Metase could express well and get purity as much as 95% of methionine enzymes.

[Key words] Recombinant L-methionine γ -lyase; Expression; Purification

蛋氨酸是人体必须氨基酸之一, 是细胞生长、蛋白合成的必须成分. 近年来细胞实验、动物实验及临床试验均证实, 蛋氨酸消除可以强烈抑制多种肿瘤细胞的生长并诱发其凋亡, 而对正常细胞生长及机体功能无明显影响^[1-3]. 据文献报道,

血液中引入 L-蛋氨酸 γ -裂解酶可降低蛋氨酸浓度水平, 抑制肿瘤细胞的生长, 其效果优于传统的饥饿疗法而且没有明显的毒副作用, 与其他药物合用具有协同作用, 有望成为新一代的抗肿瘤药物^[4,5].

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30760287); 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2009CC022)

[作者简介] 胡振良 (1986~), 男, 河南商水县人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究工作.

[通讯作者] 田长富. E-mail: tiancf@21cn.com

本研究通过分子克隆技术构建重组表达质粒 pBV220-Metase 和 pGEX-4T-1-Metase, 并转到感受态大肠杆菌 Dh5 α 中. 2 个重组子经分别诱导及对诱导条件进行优化, 获得高效表达. 通过目的蛋白的纯化和活性分析比较, 为深入了解原核蛋氨酸裂解酶的功能及酶学性质和临床研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和试剂

载体 pMD19-T 购自大连宝生物公司. 载体 pBV220 由中国医学科学院医学生物学研究所李鸿钧教授惠赠. 载体 pGEX-4T-1 由香港中文大学孔祥复教授惠赠. EcoRI、BamHI 等限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶购自宝生物公司. GST Resin 1ml (预装重力柱), 还原型谷胱甘肽, 氧化型谷胱甘肽购自上海生工. 蛋氨酸 γ -裂解酶购自 Sigama 公司. L-蛋氨酸 γ -裂解酶来自于假单胞菌株系, 根据 GenBank 核酸序列基因库 (序列号为 E13407), 委托上海捷瑞生物工程有限公司合成并克隆入 pBSK 载体.

1.2 高效原核表达重组子 pBV220-Metase 的构建及鉴定

因 pBSK-Metase 与载体 pBV220 没有相匹配的酶切位点, 故重新设计引物, 通过亚克隆在 Metase 上引入酶切位点 EcoRI 和 BamHI. 为提高连接效率, 把目的片段先与中间 pMD19-T 载体连接获得大量扩增后, 再与 pBV220 载体连接.

1.2.1 重组质粒 pMD19-T-Metase 的构建及鉴定

(1) PCR 亚克隆: 根据基因编码序列 (从起始密码 ATG 到终止密码 TAA) 自行设计引物, 上游引物 5' 端引入 EcoRI 酶切位点, 下游引物 5' 端引入 HindIII 酶切位点. 所用引物序列如下: 上游引物为 5'-GAATTCATGCACGGCTCCAACAAGC-3', 下游引物为 5'-GGATCCTCAGGCACTCGC CTTGAG-T-3'. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 67 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 进行 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 凝胶成像仪下观察并记录结果. PCR 亚克隆按常规加 A 尾并胶回收. (2) Metase 目的片段与 pMD19-T 的连接: 目的片段与载体 pMD19-T 按常规连接, 构建重组质粒 pMD19-T-Metase. 阳性克隆送上海生工测序.

1.2.2 目的片段 Metase 与原核表达载体 pBV220 的连接

用酶 EcoRI、BamHI 双切 pMD19-T -

Metase (2692bp+1209bp) 获得长度为 1 209 bp 的目的片段 EcoRI-Metase-HindIII, 与经同样双切的 pBV220 载体 (3 656 bp) 以摩尔数为 3:1 的比例用 T4-DNA 连接酶连接, 构建原核表达重组子 pBV220-Metase. 以扩增引物进行 PCR 鉴定和 EcoRI、BamHI 双酶切鉴定. 阳性克隆送上海生工测序.

1.3 高效原核表达重组子 pGEX-4T-1-Metase 的构建

用酶 EcoRI 和 HindIII 双切 pBSK-Metase, 与同样经双切的载体 pGEX-4T-1 以 3:1 的比例在 T4-DNA 连接酶作用下, 构建原核表达重组子 pGEX-4T-1-Metase. 以扩增引物 [上游引物 (含 EcoRI): 5'-GAATTCATGCACGGCTCCAACAAGC-3' 下游引物 (含 BamHI): 5'-GGATCCTCAGGCACTCGCCTTGAGT-3'] 进行鉴定和用酶 EcoRI 和 HindIII 双切鉴定. 阳性克隆送上海生工测序.

1.4 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

1.4.1 重组子 pBV220-Metase 的诱导表达

将重组子 pBV220-Metase 质粒转入到大肠杆菌 Dh5 α 中. 无菌条件下, 将其菌液接种至含 1/1 000 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 培养基中, 置振荡培养箱, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 活化过夜. 次日, 按 1:50 接种到新的 LB 培养基中^[6-8], 继续培养至 OD_{600nm} = 0.5 左右, 迅速升温至 42 $^{\circ}$ C, 按下列诱导时间取样: 0 h、4 h、6 h、8 h. 收集上述菌体沉淀.

1.4.2 重组子 pGEX-4T-1-Metase 的诱导表达

将重组子 pGEX-4T-1-Metase 的大肠杆菌接种到含 1/1000 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600nm} = 2 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 按下列诱导时间取样: 0 h、4 h、6 h、8 h. 收集上述菌体沉淀.

1.5 蛋白提取

参照 Benjamin Dias、Bart Weimer 的方法^[9]. 置 35% CaCl₂ 冰浴中超声破碎 (超声破碎仪: 美国 SONICS VCX130), 工作强度 50%, 超声方式为超声 6 s, 间歇 6 s, 共进行 24 min, 4 000 r/min 离心 30 min. 收集上清和沉淀电泳 SDS-PAGE.

Metase 酶液总蛋白测定: 用 image lab 软件对图片 6、7 进行蛋白含量计算分析比较目的蛋白的表达率和存在的主要形式. 同时也便于在测定酶活性时调整目的蛋白浓度使其具有可比性.

1.6 Metase 蛋白的纯化

用上海生工的 GST Resin 1 mL (预装重力柱) 纯化目的蛋白, 步骤如下: 用 10 倍柱体积的预冷

PB 缓冲液洗 GST 树脂; 3 mL 蛋白酶液过柱, 再重复 1 次; 以 20 倍柱体积的 PB 缓冲液冲洗; 用 10 倍柱体积的洗脱 buffer 洗脱目的蛋白; 再以 20 倍柱体积的 PB 缓冲液冲洗柱子^[10]. 取各步样品 10 μ L 样品跑 SDS-PAGE 胶观察纯化情况.

1.7 Metase 酶液活性测定

参照 Tomoaki Takakura、Yamamoto N、Tan Y Y 方法^[11-13], 用微量核酸蛋白定量仪 DN-1000 在最大吸收波长 $\lambda_{\max} = 315 \text{ nm}$ 处测定 α -酮丁酸的吸光度值. 实验数据用 SPSS 软件包进行处理.

2 结果

2.1 高效原核表达重组子 pBV220-Metase 的鉴定

用酶 EcoRI、BamHI 大量双切 pMD19T-Metase, 与经同样双切的高效原核表达载体 pBV220 连接, 构建重组子 pBV220-Metase. 以扩增引物经 PCR 扩增, 可见 1 209 bp 目的片段; 经 EcoRI、BamHI 双酶切后, 可见 3 656 bp、1 209 bp 两条目的片段, 大小均与理论相符 (见图 1). 经测序与 pMD19-T-Metase 的测序结果相一致. 结果表明 Metase 基因 (EcoRI-Metase-BamHI) 已正确插入到表达载体 pBV220 中.

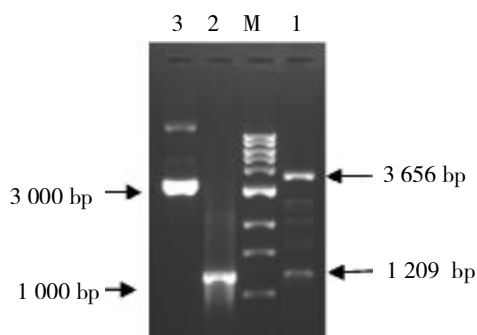


图 1 pBV220-Metase 双酶切鉴定

Fig. 1 Double enzyme digestion identification of pBV220-Metase

1: EcoRI、BamHI 双酶切 pBV220-Metase (3656bp + 1209bp); M: 1kb DNA Ladder; 2: 对照: Metase 的 PCR 扩增产物 (EcoRI-Metase-BamHI 1209bp); 3: 对照: 完整质粒 pBV220-Metase.

2.2 高效原核表达重组子 pGEX-4T-1-Metase 的鉴定

直接用酶 EcoRI、XhoI 酶切 pBSK-Metase 质粒, 与经同样双切的高效原核表达载体 pGEX-4T-1 连接, 构建重组子 pGEX-4T-1-

1-Metase. 以扩增引物经 PCR 扩增, 可见 1 209 bp 目的片段; 经 EcoRI、XhoI 双酶切后, 可见 4 954 bp、1 229 bp 两条目的片段, 大小均与理论相符 (见图 2). 经测序与 pBSK-Metase 序列相一致. 结果表明 Metase 基因 (EcoRI-Metase-XhoI) 已正确插入到表达载体 pGEX-4T-1 中.

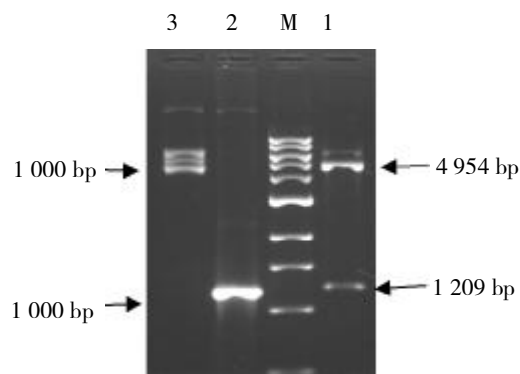


图 2 pGEX-4T-1-Metase 双酶切鉴定

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of pGEX-4T-1-Metase

1: EcoRI、XhoI 双酶切 pGEX-4T-1-Metase (4954bp + 1229bp); M: 1kb DNA Ladder; 2: 对照: Metase 的 PCR 扩增产物 (EcoRI-Metase-HindIII 1208bp); 3: 对照: 完整质粒 pGEX-4T-1-Metase.

2.3 重组子诱导条件的优化

重组子 pBV220-Metase 为非融合性表达载体, 因此表达产物只是 Metase 基因 (42.6 kD) 本身的大小; 而重组子 pGEX-4T-1-Metase 为融合性表达载体, 含有 GST 标签, 因此表达产物是 Metase 基因 (42.6kD) 本身和 GST 标签 (26 kD) 两者的大小.

对转化大肠杆菌 Dh5 α 诱导后, 经 SDS-PAGE 胶分析大小分别为 42.6 kD 和 68.6 kD. 结果表明 Metase 目的蛋白成功表达, 并且从图 3、4 可以看到 pBV220-Metase 和 pGEX-4T-1-Metase 的最佳诱导时间都是 8 h 最好.

2.4 Metase 目的蛋白的存在形式

在最佳诱导时间诱导超声破碎后收集沉淀和上清, 经 SDS-PAGE 胶, 并用 image lab 软件对图片进行蛋白含量计算, 见表 1 和图 5、6: pBV220-Metase 目的蛋白 70.09% 存在在沉淀里; pGEX-4T-1-Metase 目的蛋白 75.57% 存在于上清中. 由于包涵体蛋白不具有蛋白活性, 需要复性后才具有蛋白功能. 而且相比 pBV220-Metase 非融合型表达载体来说, 重组子 pGEX-4T-1-Metase 载体含有 GST 标签, 纯化方便简单.

2.5 Metase 蛋白的纯化

pGEX-4T-1-Metase 上清经过预装重力柱纯化后, 目的蛋白条带单一, 纯度达到 95.42%, 见图 7.

2.6 pGEX-4T-1-Metase 蛋氨酸酶活性分析

据结果计算, 纯化过的重组子 pGEX-4T-1-Metase 目的蛋白酶单位为 0.805 2 IU/mg [标准品为 sigama (编号为 M2570-1VL 0.2 IU/mg) 的蛋氨酸 γ -裂解酶].

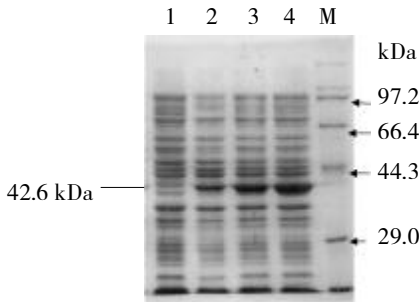


图 3 pBV220-Metase 不同诱导时间蛋白表达 (42°C)
Fig. 3 Expression of pBV220-Metase after induction at 42°C for different time

1:42°C 时, 0 h 的诱导; 2:42°C 时, 4 h 的诱导; 3:42°C 时, 6 h 的诱导; 4:42°C 时, 8 h 的诱导; M:蛋白分子量 marker.

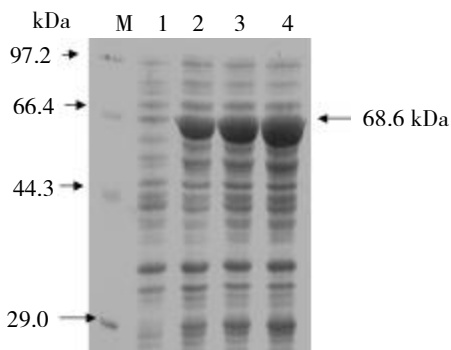


图 4 pGEX-4T-1-Metase 不同诱导时间蛋白表达 (IPTG)

Fig. 4 Expression of pGEX-4T-1-Metase after induction by IPTG for different time

M:蛋白分子量 marker; 1:37°C IPTG 0h 的诱导; 2:37°C IPTG 4 h 的诱导; 3:37°C IPTG 6 h 的诱导; 4:37°C IPTG 8 h 的诱导.

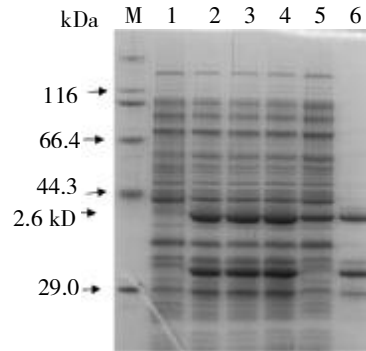


图 5 pBV220-Metase 不同诱导时间蛋白表达和破碎后上清沉淀、蛋白含量 (42°C)

Fig. 5 Expression of pBV220-Metase after induction at 42°C for different time, and protein content in supernatant and sediment after lysis

M:蛋白分子量 marker; 1:42°C 0 h 的诱导; 2:42°C 4 h 的诱导; 3:42°C 6 h 的诱导; 4:42°C 8 h 的诱导; 5:42°C 8 h 破碎后的上清; 6:42°C 诱导 8 h 破碎后的沉淀.

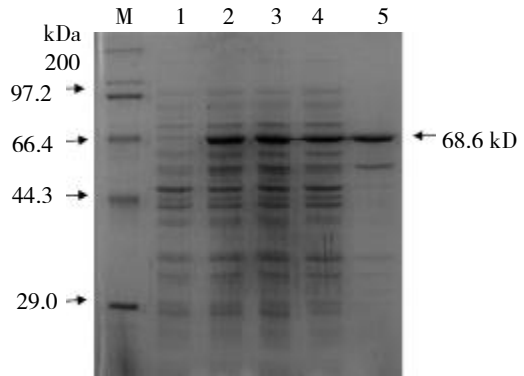


图 6 pGEX-4T-1-Metase 不同诱导时间蛋白表达和破碎后上清沉淀、蛋白含量 (IPTG)

Fig. 6 Expression of pGEX-4T-1-Metase after induction by IPTG for different time, and protein content in supernatant and sediment after lysis

M:蛋白分子量 marker; 1:37°C IPTG 0h 的诱导; 2:37°C IPTG 4 h 的诱导; 3:37°C IPTG 6 h 的诱导; 4:37°C IPTG 8 h 破碎后的上清; 5:37°C IPTG 8 h 破碎沉淀.

表 1 重组子蛋白含量定量结果 (%)

Tab. 1 The protein content of recons (%)

重组子	分类	各部分目的蛋白占各部分总蛋白	目的蛋白占总目的蛋白的百分比
pBV220-Metase	上清	9.44	29.91
	包涵体	14.66	70.09
	总蛋白	12.56	100
pGEX-4T-1-Metase	上清	15.02	24.43
	包涵体	65.0	75.57
	总蛋白	18.65	100

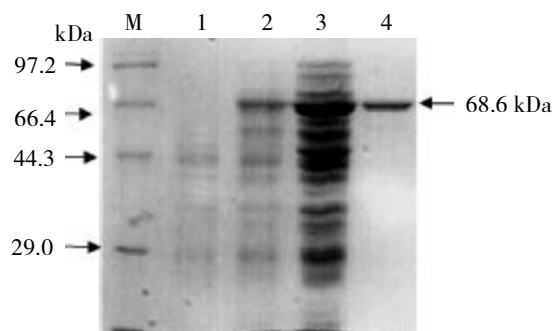


图7 pGEX-4T-1-Metase 上清纯化图

Fig. 7 The purification of pGEX-4T-1-Metase in supernatant

M: 蛋白分子量 marker; 1: 0 h 的诱导; 2: 6 h 的诱导; 3: 8 h 诱导破碎后上清; 4: 纯化过的上清.

3 讨论

在实验中采用大肠杆菌 Dh5 α 进行诱导表达, 为提高 pBV220-Metase、pGEX-4T-1-Metase 在大肠杆菌中的表达水平, 对表达条件进行了优化. 但在实验中, 通过菌体破碎后 SDS-PAGE 发现, pBV220-Metase 表达的蛋白存在形式主要是以包涵体形式而存在, 占总蛋白的 70.09%, 而 pGEX-4T-1-Metase 表达的蛋白主要以游离形式存在, 占总蛋白的 75.57%. 与带有 GST 融合表达载体 pGEX-4T-1 不同, 表达载体 pBV220 作为以非融合蛋白形式表达外源基因的高效表达载体, 给纯化过程带来很多的不便纯化, 因此决定只做重组子 pGEX-4T-1-Metase 纯化.

目的蛋白作用于底物后产生 α -酮丁酸和氨, 但因为本底氨的存在, 使精确度受到影响^[14]. 因此本实验用微量核酸蛋白定量仪 DN-1000 在最大吸收波长处测定 α -酮丁酸的吸光度检测 α -酮丁酸的生成量来计算酶活性. 其原理是在 α -酮丁酸 1M 的醋酸钠缓冲液 (pH=5.2) 中与 0.05% 3-甲基-2-苯并噻唑酮 (MBTH) 反应, 生产物在 315 nm 处有最大吸收.

本研究将构建成功 Metase 原核表达载体转化到大肠杆菌 Dh5 α , 分别经温度和 IPTG 诱导, 通过 SDS-PAGE 电泳表明所构建的重组子可以很好的表达. 通过对表达条件的优化、蛋白表达形式的分析, 挑选出高效原核重组子 pGEX-4T-1-Metase. 通过对目的蛋白的纯化和活性研究, 为制做多克隆抗体和单克隆抗体以及为深入研究蛋氨酸裂解酶在临床上的抗肿瘤作用奠定基础.

[参考文献]

- [1] 李郑武, 曲洪琴. 肿瘤生物治疗药物研究进展[J]. 中国药业, 2005, 14(3): 75.
- [2] LUCA RONDA, NATALIA P. Bazhulina. Exploring methionine γ -lyase structure-function relationship via microspectrophotometry and X-ray crystallography [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1814: 834 - 842.
- [3] 厉保秋, 杨志坚. 猕猴静脉注射重组蛋氨酸酶后的药代动力学、免疫原性及系统毒性 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3): 278.
- [4] CELLARIER E, DURANDO X, VASSON M P, et al. Methionine dependency and cancer treatment [J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(6): 489 - 499.
- [5] YAMAMOTO N, GUPTA A, XUM, et al. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(6): 445 - 450.
- [6] 程太平, 荣俊, 刘晓娜. IBDV VP2 基因重组质粒 pBV220 表达条件的优化[J]. 动物医学进展, 2007, 28(4): 9 - 13.
- [7] 何炜, 章茜, 张朝. 重组原核表达载体 pGEX-4T-1/Metase-1 的构建及表达 [J]. 郑州大学学报, 2006, 41(3): 491 - 494.
- [8] 马百坤, 王红兵. 蛋氨酸裂解酶基因在大肠杆菌中高效表达[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(4): 353 - 359.
- [9] BENJAMIN DIAS, BART WEIMER. Purification and characterization of L-Methionine γ -Lyase from Brevibacterium linens BL2 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, (64)9: 327 - 331.
- [10] 李鸿钧, 王文举, 施锐. 人鼻病毒 3C 蛋白酶基因的克隆、表达、纯化及活性[J]. 中国生物制品杂志, 2007, 20(4): 240 - 243.
- [11] TOMOAKI TAKAKURA, KENJI MITSUSHIMA, SHIGEO YAGI, et al. Assay method for antitumor L-methionine γ -lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine [J]. Analytical Biochemistry, 2004, 327(2): 233 - 240.
- [12] YAMAMOTO N, GUPTA A, XU M, et al. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10: 445 - 450.
- [13] TAN Y Y. Total γ -homocysteine enzymatic assay [J]. Clinical Chemistry, 2000, 46(10): 1686 - 1688.
- [14] 孔晨虹, 夏立亮, 徐顺利. 重组蛋氨酸裂解酶的表达、复性及活性研究[J]. 生物技术通报, 2010, 4(4): 189 - 193.

(2012-03-09 收稿)