

重组鲑鱼降钙素前体多肽的制备及其性质研究

刘深基 陈松森* 狄 旭 熊安琪 张友鸿

(中国医学科学院 中国协和医科大学 基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 硫氧还原蛋白的第38位Met突变为Ala的Trx-sCT-Gly基因在*E. coli* BL 21 (DE3)中得到高效表达.用ThioBind亲和树脂纯化表达的融合蛋白.结果说明38位的Met突变为Ala不影响融合蛋白与树脂的特异性结合,融合蛋白的纯度达90%以上.在含有3 mol/L尿素的70%甲酸中,室温48 h,至少80%融合蛋白被溴化氰裂解开.采用CM-纤维素吸附,用稀盐酸解吸附,得到纯度为92%的降钙素前体多肽sCT-Gly.氨基酸的序列分析结构表明,重组sCT-Gly的N端10个氨基酸与预期一致.在强酸性条件下,没有发生氨基酸的脱酰胺反应,氨基酸组成分析与预期基本一致.质谱法测定的分子量为3492,毛细管电泳测定的等电点pI为6.46,大鼠降钙素比活性为190 IU/mg左右,与天然的人降钙素相当.

关键词 重组降钙素前体, 制备, 性质

中图分类号 Q 57, Q 78

Preparation and Characterization of Recombinant Salmon Pre-calcitonin Peptide

L U Shen-ji, CHEN Song-sen*, D I Xu, X I D N G A n-q i, Z H A N G You-hong

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract The methionine at position 38 in the Trx-sCT-Gly was mutated into alanine and the mutated gene was cloned into the expressing vector pET30a. It was expressed in high level in *E. coli* BL 21 (DE3). The fusion protein (Trx-sCT-Gly) was purified with ThioBind affinity resin and it was found that the mutation of methionine to alanine does not affect the recombinant protein to the ThioBind resin. The fusion protein was cleaved by cyanogen bromide in presence of 3 mol/L urea in 70% formic acid for 48 hours in room temperature, at least 80% of the recombinant protein was cleaved. The cleaved peptide sCT-Gly was purified by CM-cellulose absorption and the peptide had the purity about 92%. N-terminal amino acid sequencing result of sCT-Gly shows that at least 10 amino acid residues are the same as natural sCT. No deamidation reaction occurred in the preparation. The pI measured by capillary electrophoresis was 6.46. Modified mass spectra result showed that the molecular weight was 3492. Bioassay in rats showed that special bioactivity was 190 IU/mg, almost the same as that of natural human calcitonin.

Key words Recombinant pre-calcitonin, Preparation, Characterization

鲑鱼降钙素(salmon calcitonin, sCT)是临床上防治老年性骨质疏松、高钙血症、Paget's病及各种原因引起的骨痛、椎管狭窄症等的重要药物,并作为胃溃疡、急性胰腺炎等的辅助治疗药物^[1,2].目前许多实验室都在尝试用基因工程的方法生产重组降钙素的研究.我们在以往工作的基础上^[8],将硫氧还原蛋白(Trx)第38位Met突变为Ala的Trx-sCT-

Gly基因在大肠杆菌中得到高效表达的重组融合蛋白进行了纯化,并且用溴化氰(CNBr)化学裂解的方

* 联系人 Tel: (010) 65296433

E-mail: can_ike@public.bta.net.cn

刘深基,男,1968年生,博士

收稿日期:1999-11-19,修回日期:2000-04-24

法将融合蛋白裂解成目的多肽, 用 CM-纤维素纯化得到高纯度的重组多肽 sCT-Gly, 并对其理化性质、生物学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体

E. coli BL 21, 表达质粒 pET-T_{rx}-sCT-Gly (其中38位Met突变为Ala) 为本室构建。

1.1.2 试剂

丙烯酰胺, N, N', -二甲叉丙烯酰胺, SDS, 过硫酸铵, TEM ED, 低分子量蛋白质标准物, dNTP 等为国产或进口分析纯试剂。预染的小分子量标准物为 Amersham Pharmacia 生物技术公司产品, 尿素为 Gibco/BRL 公司产品, 酵母提取物, 蛋白胨 Unipath 公司产品。血清钙测定试剂盒为北京中生生物工程高技术公司生产。考马斯亮蓝 G-250 和 R 250 均为 BioRad 公司产品, 兔抗鲑鱼降钙素血清为本实验室用重组 GST-sCT-Gly 免疫动物制备, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔第二抗体为北京中山生物技术有限公司产品。

1.1.3 分离介质

ThioBind 为 Invitrogen 公司产品, CM-cellulose 为 Whatman 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 表达菌体的获得

含有表达质粒 pET-T_{rx}-sCT-Gly 的 *E. coli* BL 21 工程菌株, 过夜培养, 以4%的比例转接, 培养 16~ 20 h, 离心, 收集菌体。

1.2.2 融合蛋白的分离纯化

表达融合蛋白的菌体悬浮于 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L ME 缓冲液中, 超声破碎。按 ThioBind 的树脂说明书, 纯化融合蛋白 T_{rx}-sCT-Gly, 并用 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.3 融合蛋白的化学裂解

纯化的融合蛋白 T_{rx}-sCT-Gly 对水透析除盐, 冷冻干燥后加入终浓度为70%的甲酸, 3 mol/L 尿素, 数十毫克 CNBr, 通氮气, 封闭, 避光室温反应 48 h, 加水稀释 10~ 15 倍后, 冷冻干燥, 溶解, 再次冷冻干燥。

1.2.4 裂解小肽的分离纯化

CNBr 裂解产物经过两次冷冻干燥后, 调 pH 值为 4.0~ 5.0, 加入 CM-纤维素, 搅拌吸附。树脂用水洗一次, 加入稀 HCl 解吸附, 收集解吸附液, 冷冻干

燥两次, 所得的样品进行小分子蛋白电泳和毛细管电泳分析。

1.2.5 重组多肽 T_{rx}-Gly 的理化性质鉴定

重组蛋白质 N 端氨基酸序列测定由北京大学植物基因工程与蛋白工程国家重点实验室用 Beckman LF 3000 Protein Sequencer 进行测定。氨基酸组成分析由中国医科院药物研究所分析室用 Hitachi L-8500 氨基酸分析仪进行测定。重组蛋白的等电点测定由本所中心仪器室用 Beckman 毛细管电泳仪测定。蛋白分子量的质谱法测定由中国科学院化学研究所质谱中心用 Pharmacia Modi TOF 质谱仪进行测定。圆二色 (CD) 光谱由清华大学生物技术与科学系用 JA SCD Spectropolarimeter 进行测定。

1.2.6 重组多肽的生物活性测定

Wistar 雌性大鼠, 体重 120~ 150 g 待测样品溶于 PBS 或生理盐水, 皮下注射, 90 min 后, 心脏取血, 凝固以后离心, 收集血清用于测定血钙。

血钙测定按试剂盒说明进行。将试剂 I 和试剂 II 等体积混合, 30 预保温作为工作液, 每管 3 ml 分装, 加入 50 μ l 血清, 混匀, 30 保温 5 min, 612 nm 测定吸收值。与标准样品吸光值比较, 计算血钙浓度, 并根据降钙素活性单位的定义计算比活性。

2 结果

2.1 融合蛋白的分离纯化

SDS-PAGE 结果表明, 用含有 5, 10, 50, 100 mmol/L ME 的裂解液洗脱, 可将融合蛋白洗脱下来, 200 mmol/L 以上不再有融合蛋白洗下来。扫描结果说明, 融合蛋白的纯度可达到 90% (Fig. 1)。

2.2 融合蛋白的化学裂解

裂解产物先经小分子蛋白电泳, 然后进行光密度扫描。结果表明, 80% 以上的融合蛋白裂解成为 T_{rx} 和 sCT-Gly (Fig. 2)。

2.3 裂解 sCT-Gly 的分离纯化

SDS-PAGE 结果表明, 稀盐酸解吸附液中 sCT-Gly 多肽分子量与预期一致, 吸附后的残余液中几乎不含有 sCT-Gly 多肽。毛细管电泳结果显示所得 sCT-Gly 多肽的纯度在 92% 左右。该方法简便易行, 回收率高, 产物纯度高, 具有实际的应用价值。

2.4 重组 sCT-Gly 的理化性质测定

2.4.1 sCT-Gly 分子量的测定

Modi-Tof 质谱法测定的结果显示, 重组降钙素前体的分子量为 3 492, 与预期值一致。

2.4.2 sCT-Gly 等电点的测定

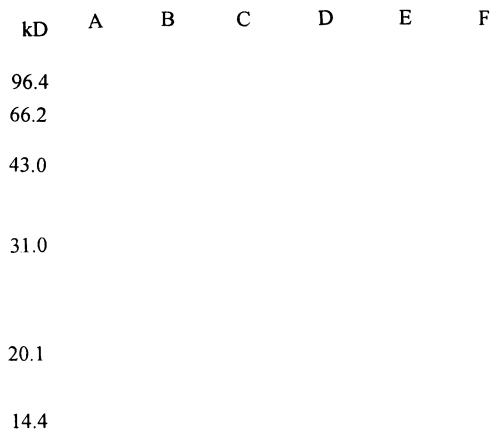


Fig 1 Purification of recombinant fusion protein Trx-sCT-Gly by Thiobind resin
 A: Low range protein marker;
 B—F: Fusion protein washed by 5, 10, 50, 100, 200 mol/L 2-mercaptoethanol (ME)

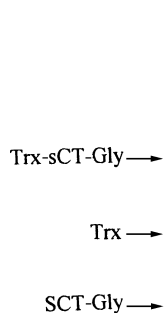


Fig 2 Chemical cleavage of the mutated fusion protein
 A: Cleaved peptide
 B: Fusion protein (Trx-sCT-Gly)

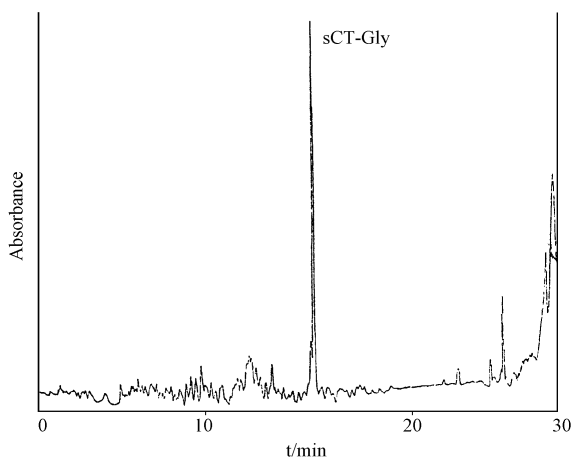


Fig 3 Identification of purity of sCT-Gly by capillary electrophoresis

毛细管电泳结果表明, sCT-Gly 多肽的等电点为6.46, 酰胺化降钙素的等电点为9.47. 酰胺化的过程中, 前体分子 sCT-Gly C 端甘氨酸留下氨基, 其余部分以丙酮酸的形式释放. 酰胺化前后相差一个有机酸分子, 造成等电点的不同.

2.4.3 sCT-Gly 的氨基酸序列分析

CM-纤维素分离得到的重组多肽, 经 Superdex 30 柱再次纯化, 仅出一个峰, 收集, 冷干, 用于序列测定. 氨基酸序列测定结果表明, sCT-Gly N 端10个氨基酸残基为 Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly, 与预期相符. 第三位的 Asn 在分离、纯化过程中没有发生脱酰胺反应.

2.4.4 sCT-Gly 的氨基酸组成分析

sCT-Gly 氨基酸组成分析如下: Asp 2.32(2), Thr 4.68(5), Ser 3.70(4), Glu + Gln 3.10(3), Gly 3.88(4), Cys 0.61(2), Val 1.10(1), Tyr 0.75(1), Lys 2.08(2), His 1.02(1), Arg 1.05(1), Pro 1.95(2), Leu 4.50(5)

(注: 括号内数值为理论值)

此结果中除了 Cys 由于易被破坏而测定值明显偏低外, 其余氨基酸组成与理论值基本相符.

2.4.5 sCT-Gly 的圆二色 (CD) 光谱分析

CD 光谱结果表明, 在水相中, 重组 sCT-Gly 多肽大部分以 β 折叠的结构存在, 占48.8%, 其次是无规卷曲, 占40.4%, α 螺旋和 β 转角分别占4.1%和6.8%. 据报道, 在含有机物溶液中, 降钙素可以形成较多的 α 螺旋.

2.5 重组多肽的生物活性测定

Wistar 雌性大鼠(120~150 g), 颈部皮下注射10 μ g 纯化的重组小肽, 1.5 h 后取血, 用邻甲酚酞络合酮法测定血清钙的浓度, 同时以生理盐水作为阴性对照, 以2 IU 鳗鱼降钙素 (elcalcitonin, 比活性3500 IU/mg) 作为阳性对照. 结果重组多肽使大鼠血钙下降了19.6%, 降低血钙作用明显, 其比活性为190 IU/mg. 实验中鳗鱼降钙素的生物活性低于理论值.

Table 1 Bioassay of recombinant sCT-Gly

	137 mmol/L NaCl	sCT-Gly	Elcalcitonin
Serum calcium /mg·dl ⁻¹	9.62 ± 0.26	7.63 ± 0.18	8.29 ± 0.15
Number of rats	8	8	5
Serum calcium lower (%)	/	19.6	13.8

Note: Recombinant sCT-Gly, 10 μ g per animal
 Elcalcitonin, 2 IU per animal

3 讨 论

随着分子生物学技术的发展, 克隆一个基因并在细菌中进行表达已经不是困难的事情了, 随之而来的是下游蛋白分离纯化工作的瓶颈. 传统的蛋白分离纯化方法因为蛋白的性质千差万别, 其方案的制定和优化是很费时的, 所以近年来人们大多从基因入手设计蛋白的纯化方法. 常用的一种方案是在目的蛋白序列中加入一段含有6个组氨酸的短肽序列作为组氨酸标签, 与目的蛋白融合表达, 融合蛋白由于组氨酸标签而具有了与金属离子螯合的共同性质, 可以用金属螯合层析进行分离纯化^[3]. 由于组氨酸标签序列很短, 对目的蛋白的性质影响不大, 因而所得的蛋白可以直接用于蛋白的功能研究或制备抗体. 另外一种思路是根据融合蛋白中配体蛋白的性质设计亲和层析介质. 硫氧还原蛋白抗体也被尝试用于亲和层析分离其融合蛋白^[4,5]. 常用的 pGEX 表达载体中的配体蛋白是谷胱甘肽硫转移酶, 利用其底物谷胱甘肽固定于树脂, 可以作为亲和层析法分离纯化其融合蛋白的介质^[6].

ThioBind 树脂是以琼脂糖为基质, 共价结合了 4-氨基苯基氧化膦 (4-aminophenylarsine oxide, PAO) 的亲和树脂, 可用于纯化一级或高级结构中有相邻两个巯基的蛋白. 自由巯基由蛋白中半胱氨酸提供, 相邻的两个巯基可以和镉、汞等金属离子或膦化合物等结合或形成二硫键. 硫氧还原蛋白活性中心附近有 Cys-Gly-Pro-Cys 序列, 两个相邻的半胱氨酸可以选择性地可逆地与 PAO 结合, 其融合蛋白也具有同样的性质. 洗去非结合性的蛋白质后, 树脂上结合的硫氧还原蛋白融合蛋白可以通过增加巯基乙醇的浓度洗脱下来, 得到纯度较高的蛋白产物^[7].

活性小肽的基因工程, 除了考虑融合蛋白的纯化外, 还应该考虑裂解后小肽的分离纯化. 我们前面构建的 TRX-sCT-Gly 融合蛋白设计用 CNBr 化学裂解, 切出 sCT-Gly 分子. 但是由于硫氧还原蛋白本身 38 位为一个 Met, 化学裂解后会得到长度分别为 33、38、84 个氨基酸的 3 个片段, 其中长度为 33 个氨基酸的多肽为 sCT-Gly, 分离纯化很困难^[8]. 为了下游的工作方便, 我们用定点突变的方法将 38 位 Met 突变为 Ala, 并将突变后的基因克隆于 pET30a 载体的 Nde I 和 Hind III 切点之间, 表达质粒转入菌体 BL21 中, 在 IPTG 的诱导下, 融合蛋白的表达水平可达到 56%. 在 pET-TRX 表达体系中, 我们还发

现了有意义的“表达渗漏”现象, 即在不影响菌体正常生长的情况下, 不使用诱导剂, 通过较长时间的培养, 也能够高水平地表达重组蛋白, 表达水平高达 51%. 这一发现对于用基因工程方法表达重组蛋白在实际工艺中具有应用价值. 用 ThioBind 亲和树脂纯化表达的蛋白, 生物活性说明 38 位的 Met 突变为 Ala 不影响融合蛋白与树脂的特异性结合, 纯化的融合蛋白纯度可达到 90% 以上. 比较不同条件的融合蛋白裂解, 我们认为在含有 3 mol/L 的尿素的 70% 甲酸中, 室温 48 h, 融合蛋白裂解较好, 虽然 Met 之后是不利于裂解的 Cys, 在以上条件下, 至少 80% 的蛋白被 CNBr 裂解开^[9]. sCT-Gly 的分离纯化是另外一个难点, 不仅因为其分子小, 而且在许多分离介质上有严重的非特异性吸附. 在实验中我们采用了 CM-纤维素作为分离介质, 避免了非特异性吸附, 而且用稀盐酸解吸附可以在冷冻干燥时除去, 避免了脱盐的麻烦. 该方法可以得到纯度 92% 的 sCT-Gly, 而且产率也在 90% 以上, 我们认为 CM-纤维素很适合降钙素的分离纯化^[10]. N 端 10 个氨基酸的序列分析说明, 表达、分离的产物与预期一致, 在强酸性条件下没有发生脱酰胺反应. 关于重组 sCT-Gly 的 C-端酰胺化问题正在研究中.

参考文献 (References)

- 1 Azria M, Copp D H, Zanelli J M. 25 years of salmon calcitonin: from synthesis to therapeutic use *Calcif Tissue Int*, 1995, **57**: 405~ 408
- 2 Silveiman S L. Calcitonin *Am J Med Sci*, 1997, **313**(1): 13~ 16
- 3 Lu Z, D Blasio E A, Grant K L. Histidine patch thioredoxin *J Biol Chem*, 1996, **271**(9): 5059~ 5065
- 4 William G, Ruegge N, Birch A. Dissection of the extracellular human interferon γ receptor α chain into two immunoglobulin-like domains. Production on in *Escherichia coli* Thioredoxin gene fusion system and recognition by neutralizing antibodies *Biochemistry*, 1995, **34**(5): 1787~ 1797
- 5 Dickason R R, Edwards R A, Bryan J. Versatile *E. coli* thioredoxin specific antibodies afford convenient analysis and purification of prokaryote expressed fusion protein *J Immunol Methods*, 1997, **185**: 237~ 244
- 6 狄旭, 陈松森, 宋飞, 张劲秋, 陈卫东. 鲑鱼降钙素基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 中国医学科学院学报 (Di Xu, Chen Song-sen, Song fei, Zhang Jin-qiu, Chen Weidong. The cloning and expression of salmon calcitonin gene in *Escherichia coli*, *Acta Acad Med Sin*), 1996, **18**(6): 423~ 428
- 7 马雪梅, 黄秉仁. ThioFusion 表达系统-大肠杆菌中表达可溶性蛋白的突破. 生命的化学 (Ma Xue-mei, Hunag Bing-ren. ThioFusion expression system-advance of expression soluble protein in *E. coli*, *Chin life*), 1995, **15**(3): 35~ 37

- 8 刘深基, 陈松森, 张松, 狄旭. 鲑鱼降钙素基因在大肠杆菌中的可溶性高效表达. 基础医学与临床 (Liu Shen-ji, Chen Song-sen, Zhang Song, Di Xu. Soluble and high expression of salmon calcitonin gene in *E. coli*, *Basic Med Sci Clin*), 1999, **19** (2): 89 ~ 93
- 9 Gross E. The Cyanogen Bromide Reaction *Methods in Enzymology*, 1967, **11**: 238~ 255
- 10 李元, 郭强, 王醒. 鸡降钙素的分离及纯化研究. 中国药理学杂志 (Li Yuan, Guo Qiang, Wang Xing. Study on isolation and purification of chicken calcitonin. *Chin J Pharmacol*), 1997, **32** (7): 404~ 406

《中国新药杂志》2001年征订启事 洞察二十一世纪国内外新药的窗口

中国医药科技出版社
中国医药集团公司 联合主办
中国药学会

国家一级综合性、学术性、情报类刊物
统一刊号: CN 11- 2277R、ISSN 1003- 3734
国外总发行: 中国国际图书贸易总公司
(北京399信箱)

《中国新药杂志》自1984年创刊来, 由于其有别于其他刊物的特色内容, 获得了订户的广泛赞誉, 读者群体逐年扩展. 本刊主要报道: 国内外新药的科研、生产及技术成果、临床研究及评价; 质量规范; 市场调研预测; 新药管理及信息. 辟有论坛、综述、实验研究、临床药学、新药与临床、药物不良反应、新药之窗、药品管理、药品保护、市场动态等十几个栏目.

为了更全面、深入报道我国新药研究开发新成果, 本刊除了保留原栏目内容外, 决定进一步从学术研究角度, 加大药物化学、生物技术、质量标准研究、国内外新药讯息的报道力度和广度. 为此, 我们将新增充实以下栏目:

1. 药物化学: 包括新药设计与合成, 天然药物提取及有效成分研究, 抗生素筛选分离等.
2. 制剂研究: 新制剂、新剂型研究开发、工艺、辅料等研究.
3. 生物技术: 生物技术新方法及其应用, 基因工程, 基因治疗.
4. 质量与标准: 新药新制剂的质量标准研究, 含量测定、分析检验.
5. 讲座: 新药研究开发、报批、临床研究、药理毒理研究等有关实验设计、新技术、新方法.

充实后的本刊将以大信息量、广覆盖面、快报道速度的崭新面目, 迎接二十一世纪, 为更多的读者提供全方位的优质服务.

本刊以高中级医药卫生工作者及广大从事药品研究、生产、临床、管理、经营、情报资料工作人员为读者对象.

本刊为月刊, 大16开本, 每期定价8.00元, 全年96.00元(含邮资), 国内邮发代号82- 488, 国外代号M 4240, 国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京399信箱). 2001年征订工作已经开始, 欢迎订阅.

《中国新药杂志》编辑部地址: 北京崇文区永外三元西巷甲12号, 邮编100077, 电话(010) 87274021、(010) 67254449转2633. 银行汇款: 工商银行北京新街口北展分理处, 帐号: 144018- 31, Email: cndj@public.fhnet.cn.net