Vol. 29 高等学校化学学报 No. 7
2008 年 7 月 CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES 1390 ~ 1392

人 CuZn-SOD 的分子改造及在毕赤酵母中的表达

曲和之, 杜姗姗, 郝东云, 张 雷, 黄 露, 王晓平
(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021)

摘要 为了改善人 CuZn-SOD 的酶学性质, 在借鉴人细胞外超氧化物歧化酶的特性基础上, 利用分子生物学技术, 在人 CuZn-SOD 的 C 末端加入肝素亲和肽构建了人 CuZn-SOD 工程酶, 并在毕赤酵母中获得表达, 经纯化的工程酶具有较强的肝素亲和性.

关键词 人铜锌超氧化物歧化酶; 肝素亲和性; 分子改造; 工程酶
中图分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)07-1390-03

所有需氧生物在利用氧气时都会产生活性氧自由基(ROS), 它们与核酸、蛋白和不饱和脂肪酸等生物大分子发生反应, 破坏其结构与功能, 进而对机体造成损伤. 现代医学认为, ROS 与人类衰老和许多疾病具有密切的关系[1~3]. 超氧阴离子自由基($O_2^{-\cdot}$)是生物体内合成的第一个氧自由基, 是其它 ROS 的前体, 具有重要的生物学意义. 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是广泛存在于动物、植物和微生物中的一种金属酶[4], 可以有效地清除 $O_2^{-\cdot}$, 保护机体不受氧化伤害. 因此, 研究超氧化物歧化酶具有重要的理论意义和潜在的应用价值.

人铜锌超氧化物歧化酶(hCuZn-SOD)是存在于人细胞质中的一类含 Cu 和 Zn 原子的 SOD 酶类. 它可以清除细胞内的 $O_2^{-\cdot}$, 避免细胞受到活性氧伤害. 但是该酶的半衰期较短, 只有 6 ~ 10 min, 极大地限制了其在临床上的应用. 研究发现, 人体中有一种 CuZn-SOD 同工酶, 由于其含有肝素亲和位点使得其半衰期大大增加[5]. 我们在 hCuZn-SOD 的 C 末端接上人肝素亲和肽, 构建了人 CuZn-SOD 工程酶, 以增加其在生物体内的半衰期和稳定性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

DEAE-Sepharose Fast Flow, Sephacryl S-100 H. R, Heparin-Sepharose 预装柱为 Amersham 产品; 引物由上海生工公司合成; 所需要酶均购自大连 TaKaRa 公司; *pichia pastries* GS115(His4, Mut^+), pPIC9 vector 为 Invengen 产品; 所用试剂均为国产分析纯.

PCR 仪(Biometra 公司); Spectrophotometer Shimadzu UV-2550(日本岛津公司); 高速冷冻离心机(美国 NKM 公司, J2-21M); 恒温摇床(美国 Forma Scientific 公司); Arthur McView(美国 Perkin Elmer 公司); MicroPulser(美国 BioRad 公司).

1.2 实验过程

1.2.1 *目的基因的构建* 利用 PCR 方法(引物 5′TGCACTGCAGGCGAC GAAGGCCGTG3′和 5′CGCGGATCCTTGGGCGATCCGAACTAC3′)将 hCuZn-SOD 全基因从质粒 pBV-SOD(本实验室构建)中钓出, 经 *Pst* Ⅰ与 *BamH* Ⅰ双酶切, 与载体 pUC18(*Pst* Ⅰ/*BamH* Ⅰ)连接, 获得重组质粒 pUCSOD, 转入 JM109 中. 将合成的肝素亲和位点(5′GCGATCGCGCAGGGTCCGGGTCTCTGGGGCGGAGGAGGAGGTGGTGGC3′和 5′CGGAATTCTTAGAGACGACGGCGGCGACGACGGCCACCACCTCCTTCC3′)退火补齐; 用 *Mbo* Ⅰ和 *EcoR*

收稿日期: 2007-09-28.
联系人简介: 王晓平, 女, 副教授, 主要从事功能蛋白质的基因工程方面研究. E-mail: wangxiaoping@jlu.edu.cn

Ⅰ双酶切，连入 pUCSOD(*BamH* Ⅰ/*EcoR* Ⅰ)中，获得重组质粒 pUCHBSOD，转化入 JM109 中.

1.2.2　目的基因转入 *pichia* 酵母　利用 PCR 方法(引物 5′CCGCTCGAGAAAAGAGCG ACCAAGGCCGTG3′和 5′CGGAATTCTTAGCGACGACGGCGGCG3′)钓取 HBSOD 基因，经 *EcoR* Ⅰ与 *Xho* Ⅰ双酶切，连入 pPIC9(*EcoR* Ⅰ/*Xho* Ⅰ)中，获得重组质粒 pPIC9HBSOD. 将重组质粒 pPIC9HBSOD 用 *Sac* Ⅰ酶切，电转化入 *pichia pastries* GS115 中.

1.2.3　目的蛋白的表达　挑取 pPIC9HBSOD 阳性转化子接种于 MGY 培养基中，于 30 ℃摇床培养至 OD_{600} = 2 ~ 6，收集细胞. 用 MM 培养基重悬，于 30 ℃培养至 OD_{600} = 1.0，诱导表达 72 h. 每隔 24 h 补加甲醇至终质量分数为 0.5%.

1.2.4　目的蛋白的纯化　大量培养工程菌，收获诱导 72 h 后的培养液，采用热变性除去部分杂蛋白，以 20 mmol/L，pH = 7.0 的磷酸缓冲液透析除盐. 用经过 20 mmol/L，pH = 7.0 的磷酸缓冲液平衡完全的 DEAE-Sepharose Fast Flow 分离柱(1 cm × 20 cm)分离，并用含有 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱目的蛋白；将含有目的蛋白的洗脱液浓缩至 3 mL，用经过 10 mmol/L 含有 0.15 mol/L NaCl，pH = 7.4 的磷酸缓冲液平衡的 Sephacryl S-100 H. R. 分子筛柱分离，分段收集并检测蛋白峰的酶活. 以上操作均在 4 ℃下进行.

1.2.5　纯度、酶活及蛋白质浓度的检测　重组酶的浓度采用 Lowry 法检测[6]，采用邻苯三酚自氧化法检测酶活性[7]，利用 SDS-PAGE 检验蛋白纯度.

2　结果与讨论

2.1　目的基因的构建

将构建的目的基因用质量分数为 1.0% 的琼脂糖电泳验证，结果如图 1 所示. 目的基因的大小应为 548 bp. 将其定向克隆于 pUC19，转入 JM109 中，重组子经上海生工公司测序，测得基因序列结果与设计相符.

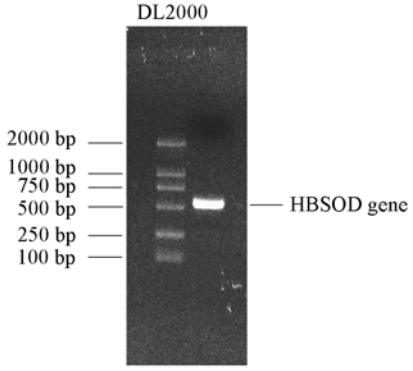

Fig. 1　Analysis of HBSOD gene on a 1.0%(mass fraction) agarose gel

2.2　目的蛋白的表达纯化

收集诱导表达 72 h 后的 GS115 菌液上清液，浓缩后经 SDS-PAGE 电泳检验，结果如图 2(A)所示. 重组蛋白表观分子量约为 21800，电泳图谱经凝胶扫描显示，工程酶占可溶性总蛋白的 15% 左右.

大量培养工程菌，收集上清液，经过热变性及 DEAE-Sepharose Fast Flow 与 SephacrylS-100 H. R. 分子筛纯化，得到电泳纯的 HBSOD 酶[图 2(B)]，亚基分子量为 21800.

人源 SOD 具有较强的耐热性[8]，加热至 70 ℃时仍能保持较高活性. 收集培养液上清液，浓缩后加

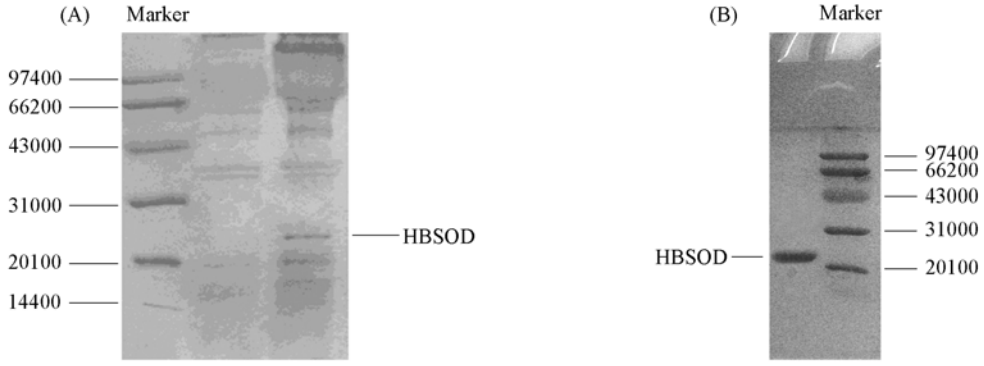

Fig. 2　HBSOD on a 12%SDS-PAGE

(A) Analysis of the expressed HBSOD on a 12% SDS-PAGE; (B) identification of the purified HBSOD.

热至 70 ℃, 保温 15 min, 离心, 可除去大量杂蛋白. 结果表明, 所构建的工程酶保留了原酶的耐热性.

2.3 酶活性和肝素亲和性检测

对纯化的重组酶活性进行检测, 结果如表 1 所示.

Table 1 Purification protocol for HBSOD

Method	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U · mg^{-1})	Yield(%)	Purification(fold)
Crude Extract	466.0	158400	339.91	—	—
Heat Denaturation	266.0	130920	492.18	84.9	1.45
DEAE-Sepharose	17.5	55280	3158.86	32.9	9.29
Sepharyl S-100	6.5	27640	4252.30	17.4	12.51

hCuZn-SOD 中 Cu 原子对维持 SOD 的活性具有重要意义. 为了使表达的 HBSOD 具有较高的活性, 在培养基中添加终浓度为 3 mmol/L Cu 离子和 30 μmol/L Zn 离子.

HBSOD 的另一个重要的性质就是具有肝素亲和性. 将 HBSOD 经 Heparin-Sepharose 柱(1 mL 预装柱), 用含有 NaCl 的磷酸盐缓冲液进行线性梯度洗脱, NaCl 的洗脱浓度则反映肝素亲和性的强弱[9]. 实验结果显示, 其洗脱液 NaCl 的浓度范围在 0.4 ~ 0.5 mol/L 之间. 说明 C 端加人肝素的 hCuZn-SOD 具有较强的肝素亲和性.

参 考 文 献

[1] Heistad D. D.. Arterioscler Thromb Vasc Biol. [J], 2006, **26**(4): 689—695

[2] Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1993, **90**: 7915—7922

[3] CrowJ. P., Beckman J. S.. Adv. Exp. Med. Biol. [J], 1996, **387**: 147—161

[4] McCord J. M., Fridovich I.. J. Biol. Chem. [J], 1969, **244**(22): 6056—6063

[5] Karlsson K., Sandstrom J., Edlund A., *et al.*. Free Rad. Biol. Med. [J], 1993, **14**: 185—190

[6] Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., *et al.*. J. Biol. Chem. [J], 1951, **193**: 256—275

[7] Marklund S. L., Marklund G.. Eur. J. Biochem. [J], 1974, **47**: 469—474

[8] Tibell L., Aasa R., Marklund S. L.. Arch. Biochem. Biophys. [J], 1993, **304**: 429—433

[9] Marklund S. L.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1982, **79**: 7634—7638

Molecular Modification and Expression of Human CuZn Superoxide Dismutase in *pichia pastries*

QU He-Zhi, DU Shan-Shan, HAO Dong-Yun, ZHANG Lei, HUANG Lu, WANG Xiao-Ping*

(*Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering*, *Ministry of Education*, *Jilin University*, *Changchun* 130021, *China*)

Abstract CuZn Superoxide dismutase(CuZn-SOD) is the enzyme that can catalyze the removal of superoxide radicals, which are generated in a variety of biological oxidations. It is a ubiquitous enzyme and provides a defense against oxygen toxicity. To dismutate superoxide radical effectively in and around vascular endothelial cells, we constructed a fusion gene encoding a hybrid SOD(namely HBSOD) consisting of human CuZnSOD and a C-terminal basic peptide that binds to heparin-like proteoglycans. The fusion gene was expressed successfully in *pichia pastries*. The purified HBSOD exhibited a normal SOD activity. The protein also possessed a high binding affinity to heparin proteoglycans.

Keywords Human CuZn superoxide dismutase; Heparin-affinity; Molecular modification; Engineering enzyme

(Ed.: H, J, Z)