

牛肠激酶催化亚基工程菌的构建

张春香^{1△} 罗学刚² 童锦禄³ 蒋声海¹ 符玉梅¹ 杨道文¹

(1 南京医科大学附属江宁医院药剂科 江苏 南京 211100;2 天津科技大学生物工程学院 天津 300457;
3 上海市仁济医院消化科 上海 200127)

摘要 目的:构建牛肠激酶催化亚基工程菌。方法:将带有牛肠激酶催化亚基(bEKL)的结构基因进行克隆,将克隆产物纯化后,构建 bEKL 克隆质粒,后构建 bEKL 表达质粒,并将表达质粒制导入备感受态细胞,进行蛋白表达。结果:琼脂糖电泳验证牛肠激酶催化亚基基因已经成功地插入表达载体,序列与预期设计一致。结论:表达质粒构建成功。

关键词:牛肠激酶催化亚基;工程菌;构建

中图分类号:Q814,TQ925 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)03-489-04

Building Bovine Enterokinase Catalytic Subunit Engineering Bacteria

ZHANG Chun-xiang^{1△}, LUO Xue-gang², TONG Jin-lu³, JIANG Sheng-hai¹, FU Yu-mei¹, YANG Dao-wen¹

(1 Dept. of Pharmacy, Nanjing Jiangning Hospital attached to NanJing Medical University, Nanjing 211100, China;

2 Bioengineering Institute of TianJin Technological University, Tianjin 300457, China; 3 Dept. of Digest, Shanghai RenJi Hospital, Shanghai 200127)

ABSTRACT Objective: To build a Bovine Enterokinase Catalytic Subunit Engineering Bacteria. Methods: Clone the structural gene of Enterokinase Catalytic Subunit, and construct bEKL clonic plasmid. Then construct bEKL expressive plasmid, and translate the expressive plasmid into competent cell. Results: The agarose electrophoresis revealed that Bovine Enterokinase Catalytic Subunit gene had been successfully inserted expressive plasmid and the sequence was same with primary design. Conclusion: The expressive plasmids was successfully builded.

Key words: Bovine enterokinase catalytic subunit ; Engineering bacteria ; Building

Chinese Library Classification(CLC): Q814, TQ925 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)03-489-04

前言

自 1939 年 Kunitz^[1]证实肠激酶(Enterokinase,EK)是胰蛋白酶原的生理激活剂后,作为能激活其他蛋白酶原的激活剂之一,胰蛋白酶原的肠激酶,就被认为是消化系统的重要起始酶之一。

病理研究^[2]发现,十二指肠与胰腺的回流液中富集 EK 会激活过多的胰蛋白酶从而引起急性胰腺炎,而 EK 缺陷的机体将会出现腹泻、呕吐就、浮肿等症状,造成发育不良、血红蛋白不足症和贫血,因而对肠激酶的研究开始广泛开展起来。

牛肠激酶全酶^[3]是由一条结构亚基和一条催化亚基(bEKL)构成,二者通过一对二硫键连接而成。Vozza^[4]等发现,bEKL 体外实验证明有全酶酶切特异性,并且比天然肠激酶对底物蛋白的酶切活性还要强,加之天然提取的肠激酶极易污染蛋白酶,在切割融合蛋白的同时降解了目的产物,因而现在多采用基因工程的方法生产肠激酶催化亚基。

1 材料与方法

1.1 材料菌种、质粒、酶及常用试剂

(1)PUCm-T,克隆载体,SANGON;(2)pMK,带有肠激酶结

构亚基基因 AmpR,SANGON;(3)pTASH, Tac 启动子, 门冬酰胺酶信号肽,SANGON;(4) TaqDNA 聚合酶,Promega;(5) LB 培养基,1%胰化蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠;(6) PCR 仪,Mastercycle Eppendorf;

1.2 方法

1.2.1 bEKL 克隆质粒的构建 (1)加端 PCR 扩增肠激酶催化亚基结构基因 用加端 PCR 的方法从 pMK 中扩增出肠激酶催化亚基的结构基因 (708bp),并在其 5' 端引入限制性内切酶 Nhe I 酶切位点,3' 端引入限制性内切酶 Pst I 酶切位点和 6 个 His-tag

PCR 反应体系如下(100μ l)

Taq 酶(5U/μ l)	0.5μ l
10× Tag Buffer	10μ l
25mmol/L MgCL ₂	8.0μ l
DNTP Mixture (each 10Mm)	2μ l
模板(pMK)	4μ l
引物 Rorword (各 50μ m)	2μ l
引物 Reverse (各 50μ m)	2μ l
灭菌双蒸水	up to 100μ l

PCR 扩增条件:94℃ 2min 预变性;94℃ 45s 变性;55℃ 30s 退火;72℃ 30s 延伸;30 cycles。结束后取 5μ l 反应液于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。目的基因片段的分离采用 1.0%(W/V)琼脂糖凝胶水平板电泳。胶中加入 0.5μ g/ml 溴乙

△通讯作者:张春香(1973-),女,主管药师,硕士研究生。研究方向:临床药学。E-MAIL:luckyzcx@126.com
(收稿日期:2010-11-05 接受日期:2010-11-30)

锭为染料,1× TAE 电泳缓冲液,电压为 8V/cm。

电泳后将含目的基因的凝胶条切下置于 1.5ml 离心管中并置于 -20℃ 冰箱中,反复冻融数次之后将胶捣碎使目的基因从胶中释放,使用酚、氯仿抽提目的基因片段,低温下无水乙醇沉淀 PCR 产物,使用乙酸钠助沉,冷冻离心机 20000g 离心 20min,70%乙醇沉淀后,晾干沉淀,将沉淀的 DNA 溶于双蒸水并保存于 -20℃ 冰箱中。

(2) PCR 产物与 pUCm-T 载体的连接

连接反应体系为(10μ l)

T4 连接酶	0.5μ l
10× ligase buffer	1.0μ l
pUCm-T 载体	1.0μ l
PCR 产物	5.0μ l
灭菌双蒸水	up to 10μ l

16℃ 反应过夜,65℃ 保温 10min,终止反应。取连接液转化感受态细胞。(本实验感受态细胞采用的是大肠杆菌 E.coli JM109)

(3) CaCl₂ 法制备感受态细胞及质粒转化

按照《分子克隆实验指南》的操作制备感受态细胞和转化^[9]。将细菌涂布在预先用 20μ l 100mM 异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷(IPTG)和 100μ l 20mg/ml 5- 溴-4- 氯-3- 吡啶-β-D- 半乳糖苷(X-gal) 涂布的 LB/Amp(含氨苄青霉素的 LB 培养基)平板上,37℃ 倒置培养过夜。

(4) 筛选阳性克隆

选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落,用牙签调至含氨苄青霉素的液体培养基,37℃、200-225rpm 培养过夜(当外源 DNA 片段插入到 pUCm-T 中后,由于外源 DNA 的核酸序列存在改变了 LacZ 基因的编码,从而影响了其产物 β- 半乳糖苷酶 α- 片段的活性,因此重组克隆在 X-gal/IPTG 平板上呈现为白色,而非重组克隆呈蓝色)。

(5) 碱裂解法抽提重组质粒

具体操作见《分子克隆实验指南》^[5,6],取 5μ l 于 1%琼脂糖凝胶电泳检测其余 -20℃ 保存。

(6) DNA 序列测定

以引物:5't ata aag cta gct gga gga agt gac 3' (31mer)和 M13/PUC 反向引物 PCR 扩增筛选插入方向正确的阳性 pT-EKL (这样可以利用 T 载体的限制性内切酶 HindⅢ 位点作为目的基因下游的克隆位点),筛选出 pT-EKL 阳性转化子后送生物技术公司测序。

1.2.2 bEKL 表达质粒的构建

(1) pTASH 及 pT-EKL 的双切酶及连接

pT-EKL 和 pTASH 质粒均用 HindⅢ 和 Nhe I 进行双酶切。酶切反应体系组成如下(20μ l):

HindⅢ 和 Nhe I	各 0.5μ l
MULTICORE 10× burre	2.0μ l
pT-EKL 和 pTASH 质粒	1μ g
BSA	适量
灭菌双蒸水	Up to 20μ l

将酶切反应体系混匀后,放置于 37℃ 培养箱中反应

2-6h,65℃ 保温 10min 终止反应,双切酶液分别进行琼脂糖凝胶电泳(1%),电泳后将含 bEKL 基因片断(789bp)与(约 3292bp)的凝胶回收试剂盒分别回收 bEKL 基因片段和载体片段。将回收得到的片段在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳检测,检测片段大小正确后方可进行连接。

连接反应体系为(20μ l):

T4 连接酶	0.5μ l
10× burre	2.0μ l
载体 DNA 片段:插入 DNA 片段	约 1:3
灭菌双蒸水	Up to 20μ l

16℃ 反应过夜,65℃ 保温 10min 终止反应。取连接液转化感受态细胞。

(2) JM109 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化

CaCl₂(0.1mol/L)法制备大肠杆菌感受态细胞,将构建的重组质粒 pTASEK 转化至 E.coli JM109 菌株,涂布 LB/Amp 平板后培养(方法如前述),挑选阳性克隆培养。

(3) 碱裂解法小量抽取重组质粒 DNA,命名为 pTASEK。

抽提方法如前。将抽提的质粒进行琼脂糖电泳(1%)检测,其余置于 -20℃ 保存。

(4) 双切酶进行验证

提取的重组质粒 pTASEK 分别用限制性内切酶 EcoR I 和 Nhe I 双酶切,然后进行琼脂糖凝胶电泳(1%)检测,方法及反应体系同上。

(5) DNA 序列的测定

测序引物为 5'-ga gct gtt gac aat taa tc-3' 和 M13/PUC 反向引物。具体工作由生物技术公司完成。

1.2.3 pTASEK 重组质粒的转化

(1) CaCl₂ 法制备 JM109 感受态细胞;(2) 重组质粒转化 JM109;(3) 碱裂解法小量抽提质粒 DNA;(4) 双酶切验证:提取的质粒 DNA 分别用 HindⅢ 和 EcoR I 酶切验证,方法如前。

2 结果

2.1 牛肠激酶催化亚基克隆引物的设计合成

使用下列引物将牛肠激酶催化亚基从质粒 pMK 中扩增出来,同时在其 5' 端加入 Nhe I 酶切位点 gctatc,3' 端引入 6 个 His-tag atgatgatgatgatgatg 和 Pst I 酶切位点 ctgcat。上游引物:EF:5'tataaa gctagctattgtcggaggaaagtgac3',下游引物:ER:5'aaaaact-gcag tta atgatgatgatgatgatg tagaaaactttgtatccactc 3'。PCR 产物经电泳验证得到了约 747bp 的目的片段,见 Fig 1。

2.2 牛肠激酶催化亚基克隆质粒的构建和验证

将 PCR 产物连接入 pUCm-T 载体,挑选出阳性克隆,经菌体 PCR 和双酶切验证后对 pT-EKL 测序验证,结果表明,牛肠激酶催化亚基已经成功插入 pUCm-T 的 Nhe I 和 Pst I 酶切位点,序列与预期设计完全一致,对质粒 pT-EKL 测序结果如下 Fig 2。

2.3 牛肠激酶催化亚基表达质粒的构建验证

Nhe I 和 HindⅢ 分别酶切 pTASH 和 pT-EKL 质粒,回收 pTASH 的载体大片断(3292bp)和 pT-EKL 的 EKL 的基因片段(789bp),用 T4 连接酶构建表达质粒 pTASEK。见 Fig 3。

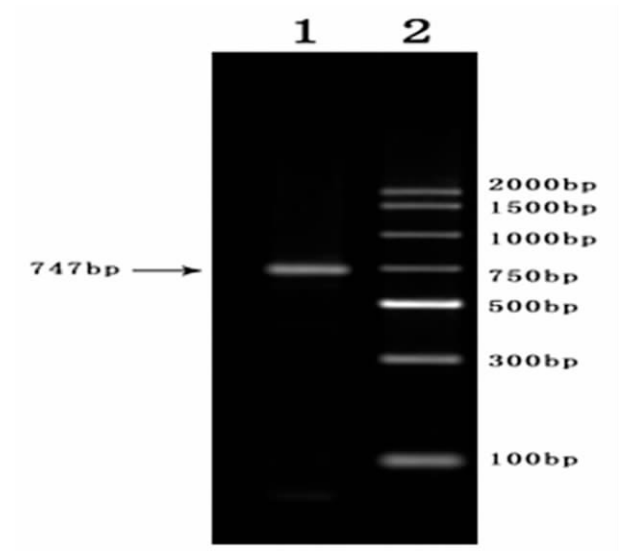


图 1 EKL 基因扩增产物:1:EKL 基因扩增产物 2:Marker
Fig 1 PCR amplification of EKL gene: 1.PCR amplification of EKL gene
2. Marker

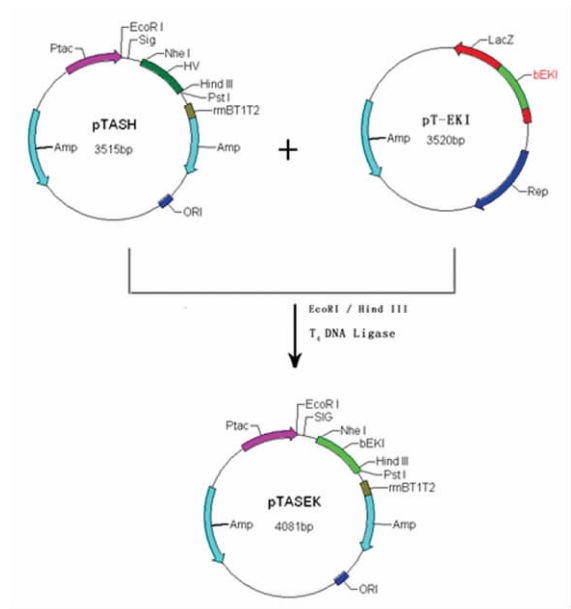


图 3 pTASEK 构建
Fig 3 Construction of pTASEK

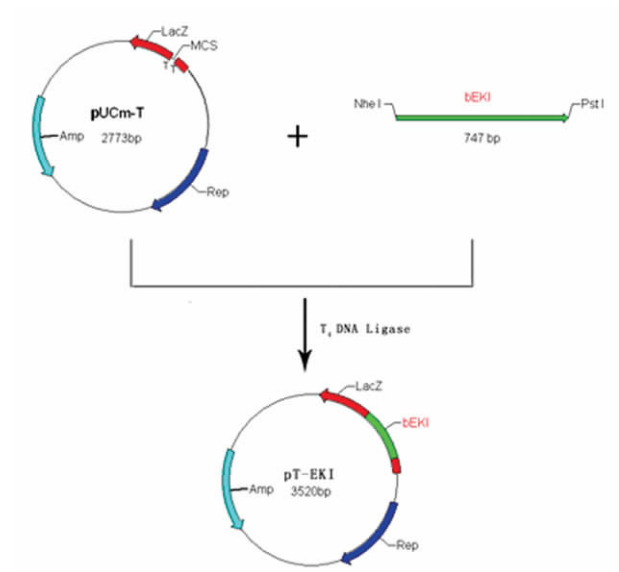


图 2 pT-EKL 的构建
Fig 2 Constrcture of pT-EKL

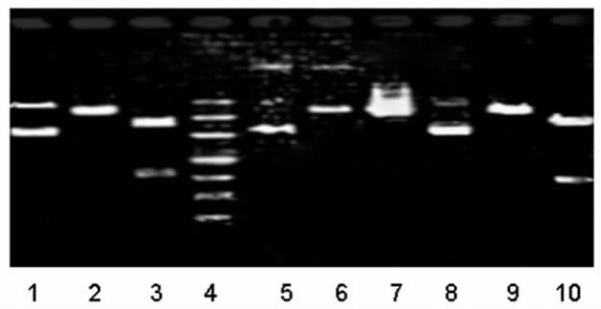


图 4:pTASEK 凝胶电泳:1.pTASEK 质粒; 2. Hind III 单酶切 pTASEK; 3. Hind III 和 EcoR I 双酶切 pTASEK; 4.Marker; 5.pTASHz 质粒; 6. Hind III 单酶切 pTASH; 7. Hind III 和 Nhe I 双酶切 pTASH; 8.pT-EKL 质粒; 9. Hind III 单酶切 pT-EKL; 10. Hind III 和双酶切 pT-EKL
Fig 4 Agarose electrophoresis of pTASEK: 1.pTASEK plasmid; 2. pTASEK digested by Hind III; 3. pTASEK digested by Hind III and EcoR I; 4.Marker; 5.pTASHz plasmid; 6. pTASH digested by Hind III; 7. pTASH digested by Hind III and Nhe I; 8.pT-EKL plasmid; 9. pT-EKL digested by Hind III; 10. pT-EKL digested by Hind III

转化宿主菌 JM109 后用碱裂解法抽提重组质粒, 然后用 Hind III 和 EcoR I 双酶切 pTASH 进行验证, 经琼脂糖电泳可见到 858bp 与 3223bp 的片段。电泳结果见 Fig 4。

阳性克隆经菌体 PCR 和双酶切验证后对 pTASEK 测序验证, 结果表明: 牛肠激酶催化亚基已经成功插入表达载体, 序列与预期设计完全一致。

3 讨论

在构建表达质粒应用加端 PCR 分别在牛肠激酶结构亚基的 5' 端引入 Nhe I 酶切位点, 3' 端引入 Hind III 与 His-tag, His-tag 的引入可以应用 Ni²⁺ 金属螯合柱亲和纯化反应就可得到纯度较高的 bEKL。另外, 实验未将 PCR 产物直接装入表达载体, 而是先接入了 pUCm-T 载体然后再装入表达载体, 这是

由于实验中发现 PCR 产物 pUCm-T 后很容易得到含有特定酶切位点的目的片段并能成功将 bEKL 结构基因导入表达载体。牛肠激酶的轻链在人、牛和猪中保守, 其识别序列在脊椎动物中有很强的保守性, 正是因为 EK 能专一性识别 DDDDK^[7]位点进行酶切, 并且切割后对下游的纯化不产生影响, 因而 EK 正成为当前基因工程领域融合蛋白表达后切割纯化的重要工具之一^[8-10]。天然提取的 EK 不仅成本造价高, 而且在提取过程中易为其他蛋白酶污染, 所以传统的以提取为主的制取 EK 的生产方法已经不能适应需要, 而通过 DNA 重组技术将肠激酶基因导入合适的载体进行高效表达, 不仅可以降低成本, 加快生产速度, 还可以提高药品质量, 使肠激酶的质量达到更高的标准, 从而可以提升市场的占有率和竞争力^[11-13]。因此, 运用基因工程的方法研发牛肠激酶催化亚基有着很好的前景。

参 考 文 献(References)

- [1] Schepovalnikoff NP. Activation of pancreatic enzymes [J]. Maly's Jahresber, 1990, 29:378-389
- [2] Kunitz M. Formaton of tryptone from mterkinase [J]. Gen Physiol , 1993, 22:429-446
- [3] 谈宁馨, 刘社际等. 重组肠激酶在甲醇酵母中高效表达的培养条件研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2003, 39:55-57
Tan Ning-Xin, Liu She-Ji et al. Research of Efficient expression cultivate condition about recombination enterokinase in methanol yeast [J]. Journal of LanZhou University (Nature Science Edition), 2003, 39: 55-57
- [4] Vozza LA, Wittwer L, Higgins DR, et al. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology, 1996, 14:77
- [5] 萨姆布鲁克, 弗里奇. 分子克隆实验指南[M]. 冷泉港实验室出版社, 纽约, 2005:03
Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005:03
- [6] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编生物学实验指南[M]. 约翰威立出版有限公司, 纽约, 2007:01
Ausubel FM., Brent R, Robert E, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. John Wiley & Sons, Inc, New York, 2007:01
- [7] Kitomoto Y, Yuan X, Wu Q, et al. Enterkinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease compose of a distinctive assortment of domains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:7588-7592
- [8] Ann SH, Rma LB, Andrey M, et al. Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness [J]. Oncogene, 2003, 22(48):7677-7686
- [9] Ulloa L, Batliwalla FM, Andersson U, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokine, and potential therapeutic target in arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48:876-881
- [10] Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, et al. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: D54-8
- [11] Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI reference sequence: a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: D501-504
- [12] Souza ID, Schellenberg GD. Regulation of tau isoform expression and dementia[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1739(2-3): 104-109
- [13] Wang Y, Wang J, Gao L, et al. Tau exons 2 and 10, which are mis-regulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra-beta1[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 14230-14239

(上接第 455 页)

- [8] 张福君, 吴沛宏, 赵明, 等. CT 引导下植入 ^{125}I 治疗胰腺癌[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(14): 223-227
Zhang Fu-jun, Wu Pei-hong, Zhao Ming, et al. CT guided radioactive seed ~ (^{125}I) implantation in treatment of pancreatic cancer [J]. National Medical Journal of China, 2006, 86(14): 223-227
- [9] 张辉, 莫日根. TACE 联合 CT 导向下 ^{125}I 放射性粒子植入治疗肝癌[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18(9): 702-704
Zhang Hui, Mo Ri-gen. TACE combined with CT-guided ^{125}I radioactive particle implantation for the treatment of hepatic [J]. CancerJ Intervent Radiol, 2009, 18(9): 702-704
- [10] 宋进华, 顾建平, 曹秀峰, 等. ^{125}I 粒子植入联合肝动脉栓塞化疗治疗肝癌, 中华放射学杂志, 2008, 42(8): 802-806
Song jin-hua, Gu jian-ping, Cao xiu-feng, et al. Treatment of hepatic carcinoma using iodine-125 seeds in conjunction with the transcatheter arterial chemoembolization[J]. Chinese Journal of radiology, 2008, 42(8): 802-806