

利用重组基因工程菌制备降血压肽的工艺研究

吴亚丽¹, 邓毛程¹, 梁世中²

(1. 广东轻工职业技术学院, 广东 广州 510300) (2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文利用正交实验方法, 对重组降血压肽基因工程菌细胞破碎所得上清液中的融合蛋白 GST-AHP, 进行亲和层析吸附上柱条件研究。在此基础上, 借助高效液相色谱对融合蛋白凝血酶酶切条件进行了研究, 并对此分离条件下所得的降血压肽段的体外生物学活性进行初步确定。实验表明, 基因工程菌细胞破碎上清液中的融合蛋白 GST-AHP 进行亲和吸附的最佳上柱条件为上柱量为 4 mg/mL, 上柱流速为 1.5 mL/min, 上柱 1 次, 此条件下融合蛋白的吸附量达 3.86 mg/mL, 洗脱后其回收率达 96.5%; 凝血酶酶切的最佳工艺条件为 1 mg GST-AHP 融合蛋白添加凝血酶 15 U, 22 °C 酶切 8 h, 此条件下可得降血压肽段 102 μg。分离纯化所得降血压肽段的体外生物学活性良好。

关键词: 降血压肽; 亲和层析; 融合蛋白; 凝血酶

中图分类号: Q503; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0055-04

Processing Technologies for Preparation of Antihypertensive Peptides from Recombinant *E.coli* BL21

WU Ya-li¹, DENG Mao-cheng¹, LIANG Shi-zhong²

(1. Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China) (2. South China University of Science and Technology, College of Biology Science and Engineering, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The preparation of AHP from recombinant *E.coli* BL21 by affinity chromatography and thrombin mediated cleavage was studied through orthogonal experiment. RP-HPLC was used to detect the antihypertensive peptides in AHP. The optimum loading quantity of sample and flow rate were 4 mg (GST-AHP)/mL (medium bed) and 1.5 mL/min, respectively, under which, the absorption capacity of fusion protein was 3.86 mg/mL (medium bed) with a recovery rate of 96.5%. The optimum cleavage conditions of fusion protein by thrombin were as follows: thrombin dosage of 15 U /mg GST, reaction time of 8 h and temperature of 22 °C, under which 102 μg of AHP could be obtained using 1 mg GST-AHP. In addition, bioactivity of recombinant AHP was studied. The obtained AHP showed high bioactivity in vitro with IC₅₀ and Km of 4.6 μmol/L and 1.95 mmol/L, respectively.

Key words: antihypertensive peptides; affinity chromatography; fusion protein; thrombin

降血压肽 (antihypertensive peptide, AHP) 是一种血管紧张素转换酶抑制肽, 它源于食品, 能够降低人体血压, 且毒副作用小^[1]。近年来研究者采用酶解法已从牛奶、乳酪、大豆等不同的天然蛋白质中获取得到了具有较好 ACE 抑制活性的酶解降血压肽, 但其提取步骤繁多、产率低, 限制了降血压肽的研究和开发^[2,3]。近年来, 基因工程技术的发展为降血压肽的开发利用带来了契机。本研究室利用基因工程手段将高活性的降血压肽单体克隆到大肠杆菌融合表达载体 pGEX-4T-2 之上, 构建了重组降血压肽基因工程菌^[4]。

基因工程菌由 IPTG 诱导表达所得融合蛋白 GST-

收稿日期: 2007-10-18

作者简介: 吴亚丽 (1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事工业生物技术方面的研究

AHP, 经 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 亲和层析剂进行纯化, 然后用凝血酶将融合蛋白 N 端的 GST 亲和配基切下来。在分离纯化过程中的诸多因素如细胞破碎条件、层析条件和酶解条件等对 AHP 的最终得率影响很大。本研究在已确定的细胞破碎条件基础上, 重点对细胞破碎上清液亲和层析条件和酶切条件进行了研究。另外, 对分离纯化所得的重组 AHP 生物学活性进行初步研究, 证明了在原核表达系统中表达源于真核的蛋白多肽 (KVLPVP 来源于牛乳) 仍具有降血压生物学活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

含重组质粒 pGEX-4T-2-AHP 的基因工程菌 *E. coli* BL21 由深圳职业技术学院分子生物学实验室构建保存。

1.1.2 主要仪器和药品

高效液相色谱型号是 Agilent 1100; 凝血酶 (thrombin 2.188 Nih units/mg pro), 购自 Amersham 公司产品; Everest C18 反相柱 (4.6 mm×250 mm, 238TP54)、保护柱 (guard column), 购自美国 Vydac 公司; 亲和层析填料 Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow、洗脱剂 Reduced Glutathione 购自 Amersham 公司; 三氟乙酸 (TFA), 色谱纯, 购自日本东京化学工业株式会社; 乙睛, 色谱纯, 购自天津协和昊鹏色谱科技有限公司。其它为市售分析纯试剂。

1.2 工程菌的表达及菌体细胞破碎

1.2.1 工程菌的诱导表达

从平板挑取单菌落接种于含有 100 μg/mL 氨苄青霉素 (Amp) 的 25 mL 种子培养基中, 37 °C、250 r/min 培养过夜, 次日按照 1:100 (V/V) 比例转接入含有 100 μg/mL Amp 的 100 mL 发酵培养基中, 37 °C、转速 250 r/min, 培养 OD₆₀₀ 值 1.5, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L, 30 °C 诱导 6 h 结束。

1.2.2 菌体细胞破碎^[5]

每克湿菌体的细胞沉淀悬于 3 mL 1×PBS 中, 加溶菌酶至终浓度 1 mg/mL, 冰上放置 30 min, -70 °C 反复冻融 7 次。每冻融一次, 镜检计算破碎率, 同时取样 1 mL, 用针筒将 20% Triton X-100 强行注入粘的细胞裂解物中至 Triton X-100 为 1%, 温和混合 30 min。加入 DNase 和 RNase 至其终浓度为 5 μg/mL, 4 °C 震荡温育 10 min。4 °C 12000 r/min 离心 10 min, 去除细胞碎片, 离心收集上清液进行亲和层析吸附条件研究。

1.3 融合蛋白 GST-AHP 亲和层析条件优化

参考 GST Gene Fusion System Handbook^[6], 亲和吸附柱柱床体积一定时, 影响 GST 融合蛋白亲和吸附的因素主要有上柱量、上柱流度以及上柱次数。据此, 固定柱床体积为 1 mL, 采用正交设计实验法进行亲和层析条件的优化。

(1) 选用 L₉(3⁴) 进行正交实验, 因素水平见表 1。固定柱床体积为 1 mL, 样品上柱前用 0.45 μm 的膜过滤, 按表 1 进行融合蛋白上柱优化实验。

(2) 用 1×PBS 洗脱杂蛋白至紫外检测仪检测吸光值不变。

(3) GST 融合蛋白吸附后, 用 1 倍柱床体积还原型谷胱甘肽洗脱缓冲液洗脱, 反应 10 min, 收集洗脱液。重复洗脱 3 次, 洗脱液收集在一起。

取洗脱液分别进行 SDS-PAGE 电泳和 Bradford 法测定其蛋白总浓度, 用 Gene Tool 分析电泳融合蛋白条带的百分含量, 计算亲和柱吸附的 GST-AHP 量。

表 1 融合蛋白上柱因素水平表

因素	A(上柱量/mg)	B(上柱流速 mL/min)	C(上柱次数)
水平 1	2	0.5	1
水平 2	4	1.0	2
水平 3	6	1.5	3
水平 4	8	2.0	4

1.4 凝血酶酶切 GST-AHP 条件优化

为从 *E. coli* BL21 (pGEX-4T-2-AHP) 表达的融合蛋白中获得 AHP 单体, 需对经亲和层析纯化所得的 GST-AHP 进一步凝血酶切, 用反相-高效液相色谱 (reversed-phase ion-pair chromatography, RP-IPC) 从凝血酶切后的溶液中分离出 AHP。样品用 0.45 μm 的膜过滤。柱温 30 °C, 自动进样量为 40 μL。液相色谱条件为: 流动相, φ(CAN)=12%、φ(TFA)=0.05%; 流速, 1.0 mL/min; 此条件下, 保留时间为 11.3 min, 分离度 R 达 1.56, 可实现完全分离。

GST-AHP 经亲和吸附、还原型谷胱甘肽洗脱后, 取四份含 1 mg GST-AHP 的洗脱液, 添加不同单位凝血酶, 22 °C 酶切, 每 4 h 取样, 采用 RP-HPLC 检测所得 AHP 的量。

标准曲线: 委托西安美联多肽合成有限公司采用固相多肽合成 (SPPS) 方法合成降血压肽 AHP 标准品 (序列为 KVLVPAHP, 纯度 95% 以上), 利用合成的标准品作标准曲线。见图 1。

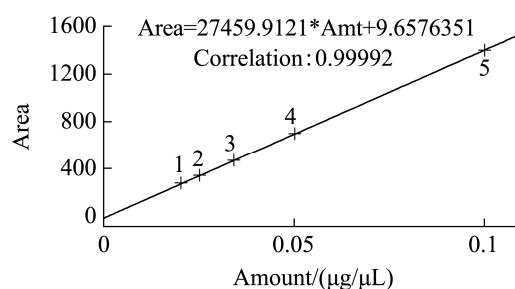


图 1 AHP 标准曲线

1.5 重组 AHP 性质研究

1.5.1 AHP ACE 体外抑制活性的测定

在反应体系中分别加 AHP 至终浓度为 0 μmol/L、3 μmol/L、6 μmol/L、9 μmol/L、12 μmol/L、15 μmol/L, 测定抑制率, 以降血压浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标做曲线, 从曲线查得 IC₅₀。

1.5.2 重组 AHP 抑制作用动力学初步研究

以 0 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L 的 HHL 为底物 (用

S 表示), 分别添加 AHP 至 5 μmol/L 与 ACE 反应, 同时作对照实验, 根据反应中生成的马尿酸量, 计算反应速度, 作 1/v 对 1/[S] 的双倒数图, 判断 AHP 的抑制类型。

2 结果与分析

2.1 GST-AHP 亲和层析上柱条件优化结果

按照由表 1 所形成正交表的上柱条件吸附 GST 融合蛋白后, 进行平行洗脱, 并进行 SDS-PAGE 电泳分析, 同时采用 Bradford 法测定洗脱液中蛋白质总浓度, 计算 GST-AHP 吸附量。电泳结果见图 2, 正交实验分析结果见表 2、3。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

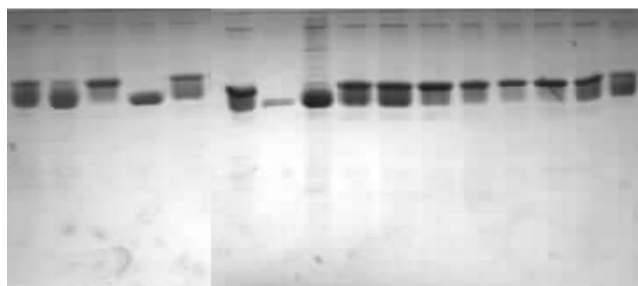


图 2 亲和纯化条件对 GST-AHP 吸附量影响电泳分析

表 2 亲和层析 L16(45) 正交实验结果

实验号	A	B	C	GST 蛋白的吸附量 (/mg/mL)
1	1	1	1	0.9467
2	1	2	2	1.7845
3	1	3	3	1.8795
4	1	4	4	2.0328
5	2	1	2	2.2471
6	2	2	1	3.7635
7	2	3	4	2.9332
8	2	4	3	2.7857
9	3	1	3	2.2576
10	3	2	4	0.9831
11	3	3	1	3.7269
12	3	4	2	2.0489
13	4	1	4	0.3127
14	4	2	3	3.1933
15	4	3	2	1.6875
16	4	4	1	2.9274
K ₁	1.661	1.441	2.841	
K ₂	2.932	2.431	1.942	
K ₃	2.254	2.557	2.529	

K ₄	2.030	2.449	1.565
R	1.271	1.116	1.276

表 3 亲和层析条件方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	F _{0.05}	显著性
上柱量	3.429	3	0.966	3.860	
上柱流速	3.268	3	0.921	3.860	
上柱次数	3.948	3	1.113	3.860	
总和	10.64	9			

结果显示, 影响 GST 融合蛋白亲和吸附的因素依次是: 上柱次数>上柱量>上柱流速。随着上柱量和上柱流速的增加, GST 被吸附的量先增加后减小, 上柱次数的增加反而使吸附量大大降低, 这与文献报道^[6]不符。理论上样品上柱流速越低, 样品中的 GST 蛋白被吸附的越多, 增加上柱量和上柱次数都可增加 GST 的吸附量。发生这种现象可能是因为样品中杂蛋白尤其是大分子杂蛋白对 GST 的吸附影响很大, 杂蛋白非特异性吸附在亲和层析填料上, 而且这种非特异性吸附的速度比特异性吸附快, 上样量增加、流速过慢和上柱次数增加都会导致吸附的非特异性蛋白增多, 从而影响了对 GST 蛋白的吸附。

融合蛋白亲和吸附最佳工艺条件是: A₂B₃C₁, 即上柱量为 4 mg/mL, 上柱流速为 1.5 mL/min, 上柱 1 次。重复实验表明, 此条件下融合蛋白吸附量达 3.86 mg/mL, GST-AHP 回收率达 96.5%。

2.2 凝血酶酶切条件优化结果

凝血酶的酶切位点为: P4-P3-Pro-Arg/Lys ↓P1'-P2' (其中 P3、P4 是疏水性氨基酸, P1'、P2' 是非酸性氨基酸), 其酶切位点与胰蛋白酶相同。酶切的最适温度为 22~25 °C, 最适 pH 为 7.3。此外, 酶切效果还与酶切时间和酶用量有关。凝血酶添加量与酶切时间对酶切反应的影响结果见图 3。

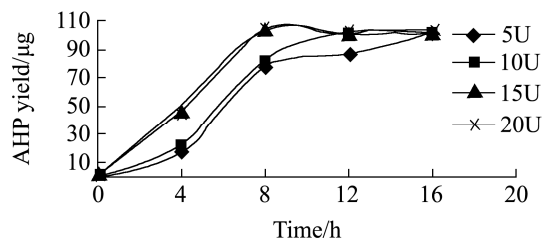


图 3 酶切条件对酶切反应的影响

结果表明: (1) AHP 的量随着酶切时间的延长而增加。酶切时间 12 h 时, AHP 量达到最大, 继续酶切至 16 h 时, AHP 量无明显增加甚至还有减少, 这可能是由于凝血酶的非特异性酶解造成的; (2) 酶切相同时间, AHP 的量随着酶用量的增加而越多。

1 mg GST-AHP 酶量为 5 U 时, 在 16 h 时, 其酶

切得 AHP 量最大;而酶量为 10 U,当酶切时间为 12 h 时,所得 AHP 量达到最多,与酶量 15 U,酶切 8 h 相近,而当酶量添加至 20 U 时,其酶切效果与 15 U 相同。考虑节约成本及缩短酶切时间,因此选择 1 mg GST 融合蛋白添加凝血酶 15 U,酶切 8 h 为最优。在此条件下,可得 AHP 量 102 μg ,与理论降 AHP 产量 (105 μg) 接近,说明酶切完全。

2.3 重组 AHP 性质

2.3.1 重组 AHP 的 IC₅₀ 测定结果

不同量重组 AHP 对 ACE 的抑制率见图 4。从曲线查出,当抑制率为 50%时,降血压的浓度为 4.6 $\mu\text{mol/L}$ 。与文献报道的从乳源蛋白中提取的 KVLVPV 的 IC₅₀ 相近。

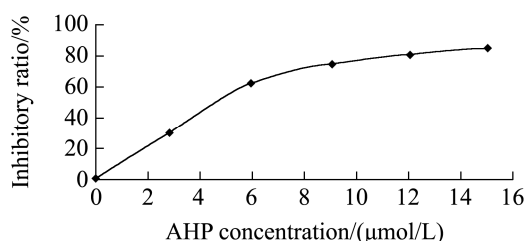


图 4 重组 AHP 对 ACE 的抑制率

2.3.2 重组 AHP 抑制动力学方程

重组 AHP 对 ACE 的抑制反应动力学见图 5。由图 5 可见,对照组和添加 AHP 的 2 条线与 Y 轴交于一点,表明重组 AHP 为竞争性抑制剂,与临床使用的 ACE 抑制剂类药物的抑制动力学相同。从图 5 查得 Km 为 1.95 mmol/L。

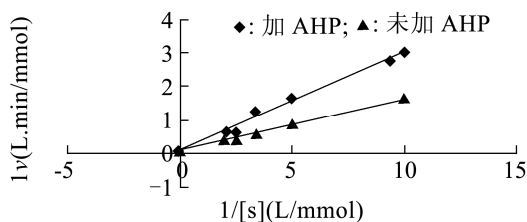


图 5 不同底物浓度下 AHP 对 ACE 活性抑制速度双倒数图

3 结论与展望

本文对重组降血压肽基因工程菌采用反复冻融与

溶菌酶结合的方法进行细胞破碎,所得上清液中的融合蛋白 GST-AHP 进行亲和层析吸附,其最佳上柱条件为 4 mg/mL,上柱流速为 1.5 mL/min,上柱 1 次,此条件下融合蛋白的吸附量达 3.86 mg/mL,洗脱后其回收率达 96.5%。融合蛋白酶切的最佳工艺条件为 1 mg GST-AHP 融合蛋白添加凝血酶 15 U,22 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 8 h,此条件下可得降血压肽段 102 μg 。测得降血压肽段的 IC₅₀ 为 4.6 $\mu\text{mol/L}$,与文献报道的从乳源蛋白中提取的 KVLVPV 的 IC₅₀ 相近;对 ACE 的抑制反应动力学方程表明,抑制类型为竞争性抑制剂,Km 为 1.95 mmol/L,与临床使用的 ACE 抑制剂类药物的抑制动力学相同。说明此分离纯化方法所得的降血压肽段 AHP 的生物学活性良好。

为了实现此高效降血压肽的工业化生产,必须降低降血压肽的生产成本。尝试用适于大规模生产的膜分离技术代替昂贵的亲和层析技术是今后研究的一个方向。

参考文献

- [1] Kula S. Atrial natriuretic peptide levels in rheumatic mitral regurgitation and response to ACE. *Can J Cardiol.* 2003, 19(4): 405-408
- [2] Nobuyuki Matoba, Naomi Doyama, Yuko Yamada. Design and production of genetically modified soybean protein with antihypertensive activity by incorporating potent analogue of Ovokinin (2-7). *FEBS Letters*, 2001, 497: 50-54.
- [3] Yanewa J. Characterization of inhibiton and stability of soyprotein derived angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides[J]. *Food Research Internation*, 2002, 35(4): 367-372
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国科学技术部. 中华人民共和国国家统计局编著. 中国居民营养与健康状况[调查报告], 2002, 北京: 人民卫生出版社, 2005: 15-16
- [5] 刘冬. 两种细胞破碎方法对重组降血压肽基因工程菌破碎效果的比较[J]. *河南工业大学学报*, 2006(3): 53-56
- [6] Amersham Biosciences. GST Gene Fusion System Handbook (Edition AA)