

蛇毒类凝血酶 calobin 在毕赤酵母中的表达

袁盛凌, 王芃, 陶好霞, 展德文, 王艳春, 王令春, 刘纯杰, 张兆山

中国人民解放军军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 蛇毒类凝血酶是临床上防治血栓栓塞性疾病的有效药物。参照朝鲜蝮蛇(*Agkistrodon caliginosus*, Korean Viper) 类凝血酶 calobin 基因序列(GenBank Accession No. U32937.1), 将人工合成的 calobin 基因克隆到酵母表达载体 pPICZαA, 于毕赤酵母中表达, 得到了分子量约为 32 kD 的重组 calobin 蛋白, 经甲醇诱导培养, 表达产物可获得 3.5 g/L 的高表达量。重组蛋白经过阴离子交换柱 Q-Sepharose Fast Flow 和分子筛 Sephacryl-S-100 凝胶过滤层析等纯化步骤进行了初步纯化。纯化后的重组 calobin 可以在纤维蛋白原平板上形成水解圈, 经 SDS-PAGE 实验显示, 重组蛋白能水解纤维蛋白原的 Aα 链, 产生一条约 40 kD 左右的降解带。在实验中未能发现重组 calobin 对纤维蛋白原的凝固作用。

关键词: 蛇毒类凝血酶, 毕赤酵母, calobin, 纤维蛋白原

Expression of snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Pichia pastoris*

Shengling Yuan, Peng Wang, Haoxia Tao, Dewen Zhan, Yanchun Wang, Lingchun Wang, Chunjie Liu, and Zhaoshan Zhang

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Thrombin-like enzymes (TLEs) are studied widely because of their therapeutic potential in myocardial infarction and thrombotic diseases. We synthesized the DNA fragment encoding thrombin-like enzyme calobin from *Agkistrodon caliginosus* (Korean Viper) venom by fusion PCR and expressed it in *Pichia pastoris*. After induction by 0.5% methanol for 48 h, the expression level of recombinant calobin reached 3.5 g/L in medium. The recombinant calobin was purified by Q-Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography and Sephacryl-S-100 gel filtration chromatography. Purified sample had a molecular weight of 32 kD shown in SDS-PAGE. It hydrolyzed fibrinogen and formed a light white hydrolysis circle in fibrinogen plate. SDS-PAGE analysis showed that recombinant calobin cleaved Aα-chain of fibrinogen specifically, and produced an appropriately 40 kD new band. However, we failed to find its fibrin-clot formation activity.

Keywords: thrombin-like enzyme, *Pichia pastoris*, calobin, fibrinogen

蛇毒中含有丰富的蛋白水解酶, 其中一类属于丝氨酸蛋白酶, 它们常常与蛇伤后机体血凝失调、激肽释放等毒理作用有关^[1]。在上述蛇毒丝氨酸蛋白酶中, 类凝血酶(Thrombin-like enzyme)特别受人

关注。类凝血酶不仅精氨酸酯酶活性高, 更重要的是它与凝血系统关系密切。它在体外起凝血作用, 能够直接作用于纤维蛋白原, 水解释放血纤肽 A(Fibrinopeptide A, FPA)或血纤肽 B(Fibrinopeptide

Received: August 14, 2008; Accepted: February 13, 2009

Corresponding author: Chunjie Liu. Tel/Fax: +86-10-63833521; E-mail: Liucj@nic.bmi.ac.cn

B, FPB), 导致纤维蛋白的单体首尾聚合而凝固, 其作用效果类似于凝血酶, 所以被称为类凝血酶。但它在体内不激活凝血因子 XIII, 由它水解生成的纤维蛋白凝块不产生侧链交联, 对纤溶酶的消化高度敏感, 很容易被天然网状内皮系统或正常的纤溶作用所清除, 因此导致胞浆中纤维蛋白原浓度显著下降, 表现降纤、抗凝的效果。又因为它不凝集血小板, 故机体仍能维持正常的止血功能, 故而在临床上, 蛇毒类凝血酶已成为防治血栓栓塞性疾病的有效药物^[2,3]。此外, 由于蛇毒类凝血酶对纤维蛋白原的作用方式不同于血浆凝血酶, 它也被用作研究纤维蛋白凝聚机制的重要工具酶。

蛇毒类凝血酶在原核表达系统的可溶性和功能性表达困难重重, 但酵母表达系统的进展却让人们看到了希望。Yang 等报道长白眉蝮类凝血酶 gussurin 和大连蛇岛蝮类凝血酶 glosheobin 在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中获得表达^[4,5], 这 2 种酵母重组类凝血酶都保持了较高的酰胺裂解活性。You 等^[6]和李招发等^[7]在酵母系统中表达了巴曲酶, 得到的重组酶和其天然蛋白一样, 具有使纤维蛋白原凝固的活性, 比活单位均在 200 NIH 以上。

朝鲜蝮蛇(*Agkistrodon caliginosus*, Korean Viper) 类凝血酶 calobin 于 1996 年从朝鲜蝮蛇毒腺中克隆出, 有较高的凝血活性(226 NIH)^[8]。它对纤维蛋白原 A α 链水解很快, 而对 B β 链水解很慢。本实验室在前期的工作中采用人工合成的办法拼接出类凝血酶 calobin 的全长基因序列^[9], 在研究酵母系统中重组表达的朝鲜蝮蛇类凝血酶 calobin 的活性时, 发现重组 calobin 能够专一地水解纤维蛋白原的 A α 链, 但却不能使底物凝结。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 JM109 由本室保存, 毕赤酵母宿主 GS115 和载体 pPICZ α A 由本单位周晓巍博士提供。限制性内切酶和高保真 Taq 酶 Pyrobest 为 TaKaRa 公司产品。酵母氮基(含硫酸铵/无氨基酸)为 Difco 公司产品, D-生物素来自 Japan, 蜗牛酶为国产分装, 山梨醇为上海化学试剂站中心化工厂产品。YPD 培养基、BMGY、BMMY 培养基的配制, 见 Invitrogen EasySelectTM *Pichia* Expression Kit 的使用说明指南。

凝血酶(From bovine, 52 U/mg)、纤维蛋白原(From bovine)为 Sigma 公司产品, 电泳纯长白眉蝮类凝血酶 ussurin 来源于中国科学院沈阳应用生态研究所(10 U/支)。

1.2 方法

1.2.1 pPICZ α A-calobin 载体的构建

上游引物(Y-F): 5'-CCGCTCGAGAAAAGAGT CATTGGTGGTGATGAATG-3', 引入 *Xho* I 酶切位点。下游引物(Y-R): 5'-GCTCTAGA $\overline{\text{A}}$ ACTCACGGCG GGCAGGACGCATCAG -3', 引入 *Xba* I 酶切位点。人工拼接的全序列正确的蛇毒类凝血酶基因 calobin 保存在原核表达质粒 pET22b(+)-calobin 上^[10], 在实验中, 以此质粒为模板, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 热变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 59 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经过回收纯化以后, 用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切, 再经过回收, 与同样双酶切的载体 pPICZ α A 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 涂布于含 25 μ g/mL 的 Zeocin 抗性的低盐 LB 平板, 16 h 后, 挑选克隆做质粒的酶切鉴定。

1.2.2 重组质粒的电击转化

质粒提取参照 Promega DNA Purification System 质粒提取试剂盒说明。酵母感受态细菌的制备: 参照 Invitrogen EasySelectTM *Pichia* Expression Kit 的使用说明指南。pPICZ α A-calobin 重组质粒以 *Bgl* II 或 *Sac* I 酶切线性化后纯化, 用尽量少的灭菌去离子水溶解, 保证浓度在 1 μ g/ μ L 左右, 将 80 μ L 感受态酵母菌和 5 μ g 线性 DNA 混合, 置于冰预冷的电极杯中, 1500 V、25 μ F、100 ohms 条件下电击 4.2 s 左右, 立即加入 1 mL 冰预冷的 1.0 mol/L 山梨醇, 混匀后静置于 30 $^{\circ}$ C 温箱中, 1~2 h 左右取出, 离心浓缩至 200 μ L 后, 涂于 YPDS 平板, 29 $^{\circ}$ C 培养 36 h。

1.2.3 重组酵母菌的 PCR 鉴定和序列鉴定

参照 Invitrogen EasySelectTM *Pichia* Expression Kit 的使用说明指南提取酵母基因组 DNA。用 2 对引物扩增检测: 一对是 α -factor 中部序列 5'-GAAGC TGTCATCGGTTACTCAGAT-3' 和 3' AOX1 primer 组成一对引物; 另一对是扩增目的基因的 Y-F、Y-R 上下游引物。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 75 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经过切胶纯化, 用 3' AOX1 primer 作为测序引

物, 送样测序。

1.2.4 重组酵母菌的诱导表达

参照 Invitrogen EasySelect™ Pichia Expression Kit 的使用说明指南进行酵母转化子的诱导培养。分别在 0、3、12、24、48、72、96、120、168 h 取样 1 mL, 每取完样后补加水至终浓度为 0.5%。样品在 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清 10 μ L, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.5 诱导产物的纯化

培养物 4°C、1500 \times g 离心 10 min, 上清冰浴后, 采用 70% 固体硫酸铵沉淀蛋白, 4°C 保存过夜, 6000 r/min、4°C 离心 10 min, 沉淀用 1/10 体积的 0.02 mol/L Tris·Cl (pH 7.45) 溶液溶解, 并在此溶液中进行透析 24 h, 12 h 更换 1 次透析液。阴离子交换柱 Q-sepharose Fast Flow (2.0 cm \times 20 cm) 预先平衡, 透析好的表达上清浓缩液以 20 mL 分步上样, 用 0.02 mol/L Tris·Cl (pH 7.45) 溶液平衡 5 个柱体积后, 以 20 个柱体积, NaCl 梯度从 0~1.0 mol/L 洗脱, 收集目的蛋白, 电泳检测后, 透析除盐。浓缩后复上相同条件的 Q-sepharose Fast Flow 阴离子交换柱, 用分步 NaCl 梯度洗脱: 2 个柱体积 NaCl 从 0~0.15 mol/L, 20 个柱体积的 NaCl 从 0.15~0.45 mol/L, 3 个柱体积 NaCl 从 0.45~1.0 mol/L。收集目的蛋白峰后, 超滤浓缩至 0.5 mL 以内, 上 0.05 mol/L Tris·Cl (pH 7.45) 溶液预平衡的 Sephacryl S-100 (1.6 cm \times 90 cm), 用相同缓冲液洗脱, 收集目的峰, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 纯化产物酶活性的测定

1) 平板法^[11]: 50 mmol/L Tris·Cl (pH 7.45) 溶液+1% 琼脂, 加热溶化以后, 冷却至 45°C 左右, 取 10 mL 倒入 D=90 mm 的平板下层。配 50 mmol/L Tris·Cl (pH 7.45) 溶液+2% 琼脂, 加热溶化以后, 45°C 保温; 同时配制在同样缓冲液中溶解的 0.8% 的纤维蛋白原溶液, 45°C 保温。2 种溶液等体积混合后, 以 10 mL 倒平板上层。等上层底物完全凝固后, 在培养基上打小孔, 加入一定量的反应液, 37°C 保温, 观察白色不透明圈的产生。

2) 试管法: 配置 50 mmol/L Tris·Cl 溶液 (pH 7.45) 溶解的 0.4% 的纤维蛋白原溶液, 加入反应液 100 μ L, 37°C 放置, 观察凝固效果。

3) SDS-PAGE 法: 底物溶液: 0.5% 的纤维蛋白原溶液 [50 mmol/L Tris·Cl (pH 7.45) 溶解], 酶反应液: ① 重组 calobin: 380 μ g/mL; ② 牛凝血酶: 0.4 U/mL; ③ ussurin: 0.4 U/mL。在 10 个 1.5 mL 小离心管中, 各加入 25 μ L 的底物溶液和 25 μ L 酶反应液, 混合后室温放置, 在不同的时间取其中一管, 加入 2 \times SDS 上样缓冲液, -20°C 暂存。阴性对照为 25 μ L 的底物溶液和 25 μ L 50 mmol/L Tris·Cl (pH 7.45)。样品在 100°C 沸水浴中煮 3 min, 冷却后 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清 6 μ L 上样。

2 结果

2.1 pPICZ α A-calobin 载体的构建

从模板上扩增 calobin 基因, 使扩增片段的两端各带 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点, 并选择在 α -factor 信号肽的 Kex2 切割位点的下游位置置换上 calobin 的基因序列。PCR 结果如图 1A 所示, 得到了大小为 720 bp 左右的产物。PCR 产物经过回收, 用 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切, 并与载体 pPICZ α A 连接。连接产物转化大肠杆菌 JM109, 在含 25 mg/L Zeocin 的低盐 LB 平板上筛选克隆, 并通过酶切鉴定阳性克隆 (图 1B)。提取质粒后, 经过 *Bgl* II 线性化质粒后, 电转化酵母 GS115。

2.2 酵母染色体的重组和 PCR 鉴定

平板培养 36 h 左右, 观察到菌落直径约为 0.5~0.7 mm 的转化子。挑出这些单克隆接于含 1000 μ g/mL 的高浓度 Zeocin 的 YPDS 培养基中, 明显可见生长状况的不一致。挑出生长良好的克隆, 用酶解法提取染色体 DNA, 分别用 2 组引物来验证目的基因是否整合。一对是 α -factor 中部序列和 3'AOX1 primer 组成一对引物, 如果目的基因整合, PCR 扩增出的产物大小应该是 1000 bp 左右; 另一对是 calobin 两端上下游引物 Y-F、Y-R, PCR 扩增产物的大小应为 720 bp 左右。经 PCR 鉴定 (图 2), lane3 和 lane4 中都出现了与目的带大小相同的特异性条带, lane3 的特异性条带经切胶回收, 用 3'AOX1 primer 作为测序引物测序 (测序图略), 从测序结果看出, PCR 产物的是目的基因 calobin 的特异性扩增序列, 说明目的基因已整合到酵母染色体上。

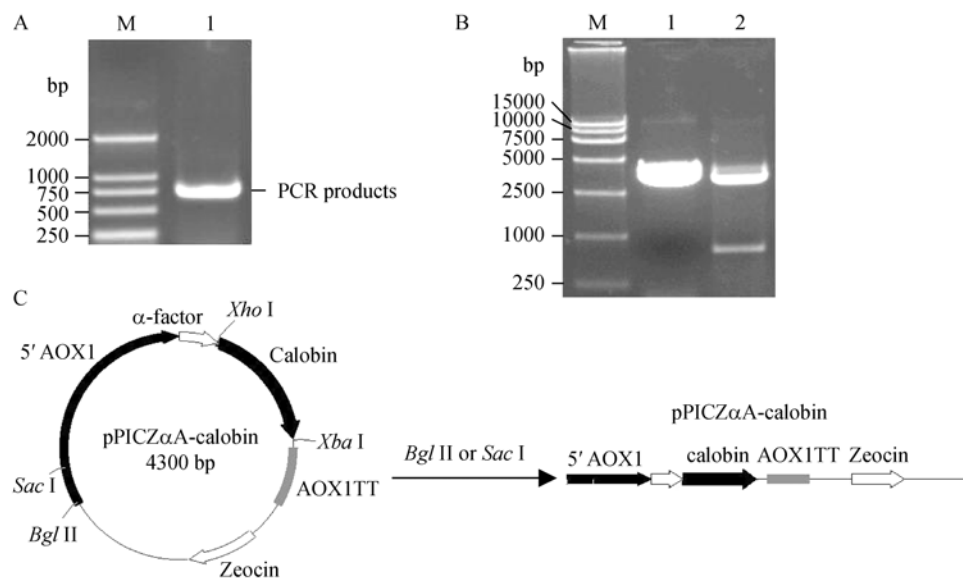


图 1 质粒 pPICZ α A-calobin 的构建和鉴定

Fig. 1 Construction and identification of plasmid pPICZ α A-calobin. (A) PCR products representing calobin gene was amplified from plasmid pET22b(+)-calobin^[10]. (B) New plasmid pPICZ α A-calobin was identified with restriction enzymes. 1: plasmid pPICZ α A digested with *Xho* I; 2: plasmid pPICZ α A-calobin digested with *Xho* I and *Xba* I. (C) the plasmid pPICZ α A-calobin was linearized with restriction enzyme *Bgl* II or *Sac* I.

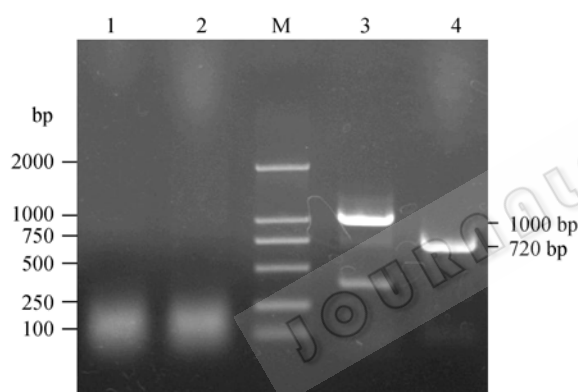


图 2 采用 PCR 方法对 GS115 阳性整合子进行鉴定

Fig. 2 Confirmation of pPICZ α A-calobin recombination into chromosome DNA of GS115 by PCR. 1: PCR products from chromosome DNA of GS115 by a pair of primers α -factor and 3'AOX1 primer; 2: PCR products from chromosome DNA of GS115 by a pair of primers Y-F and Y-R; 3: PCR products from chromosome DNA of positive colony by α -factor and 3'AOX1 primer; 4: PCR products from chromosome DNA of positive colony by primers Y-F and Y-R; M: DNA marker.

2.3 pPICZ α A-calobin 的诱导培养

候选株在菌种活化后, 转接到 BMGY 培养基中, 培养至 $OD_{600}=2$ 以上。收获细胞, 参照 Invitrogen EasySelect™ Pichia Expression Kit 的使用说明进行通气诱导。培养 48 h 后取样, 离心取上清, 制成 SDS 上样样品, 进行 SDS-PAGE。在 6 个候选克隆中, 有

2 个克隆的表达水平较高, 其发酵液不经过浓缩, 直接电泳就可以观察到明显的重组表达带。任意挑选其中一个高表达克隆, 其发酵液电泳结果如图 3, 可见在 32 kD 处有明显的表达带。经扫描, 目的带在培养基上清中的含量为 43%。用 Folin 酚法测得培养基上清的蛋白含量约为 8.1 g/L(用牛血清白蛋白做标准曲线), 则诱导蛋白的表达量约为 3.5 g/L。

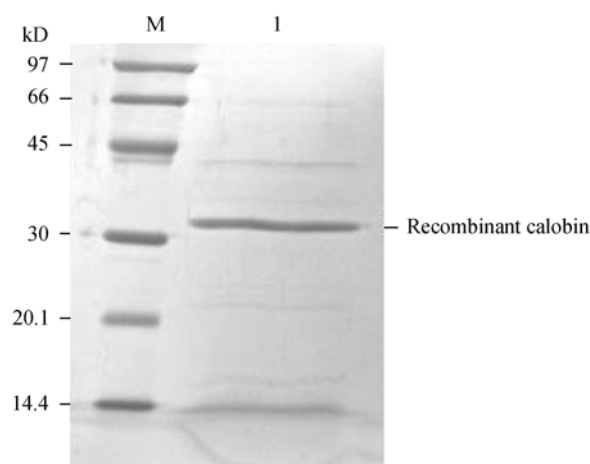


图 3 pPICZ α A-calobin 的诱导表达产物(48 h)

Fig. 3 Expression products of pPICZ α A-calobin induced for 48 h.

随即检测了最佳取样时间, 如图 4 所示。实验发现, 在诱导培养 24 h 后, 目的条带就很明显, 增

加培养时间, 产物的积累效果不是很显著。而且, 当诱导培养到 7 d 时(168 h), 培养基上清中杂蛋白条带增多。因此, 选择 36~48 h 收获样品。

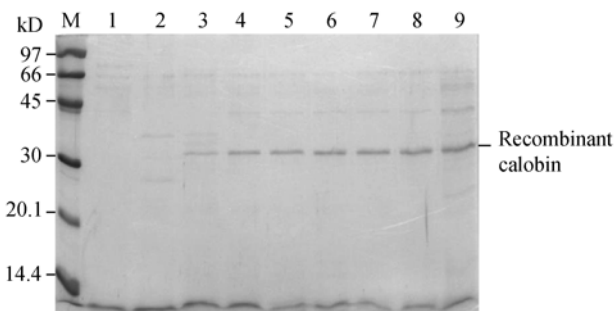


图 4 pPICZ α A-calobin 诱导不同时间后表达产物的积累
Fig. 4 Effects of harvest time on the accumulation of recombinant calobin. M: protein marker; 1: GS115 induced for 96 h; 2~9: GS115/pPICZ α A-calobin induced for 3, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 h, respectively.

2.4 GS115/pPICZ α A-calobin 诱导表达产物的纯化

诱导培养 48 h 的发酵液在 4°C 下离心收集上清, 用 70%硫酸铵沉淀蛋白, 重溶后经透析平衡, 上样于阴离子交换柱 Q-sepharose Fast Flow (2.0 cm \times 20 cm), 用 0~1.0 mol/L 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱, 收集穿过峰及洗脱各峰, SDS-PAGE 检测目的蛋白的位置, 收集后透析除盐, 上同样的离子交换柱, 样品挂柱后, 用分步 NaCl 梯度洗脱, 收集样品峰, 超滤浓缩到 0.5 mL 左右的体积, 上分子筛 Sephacryl S-100(1.6 cm \times 90 cm), 收集目的蛋白, 进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 5 所示。

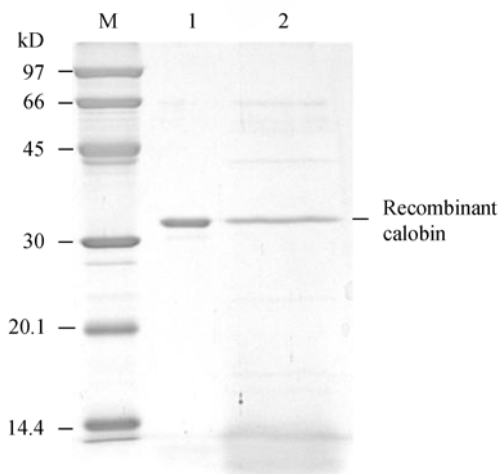


图 5 重组 calobin 的纯化

Fig. 5 Purification of recombinant calobin. M: protein marker; 1: purified calobin; 2: fermentation supernatant of GS115/pPICZ α A-calobin.

2.5 重组 calobin 的活性测定

凝血活力的测定(平板法): 取 15 μ g 纯化的 calobin, 与凝血酶 thrombin 和类凝血酶 ussurin 共同点样在纤维蛋白原平板上, 37°C 正面向上保温 10 h。观察平板可以发现, 重组 calobin 作用于纤维蛋白原, 产生了明显的水解圈(图 6), 但其作用效果与凝血酶和长白白眉蝗的类凝血酶 ussurin 对纤维蛋白原的作用效果有差别。重组 calobin 产生的水解圈颜色略淡。

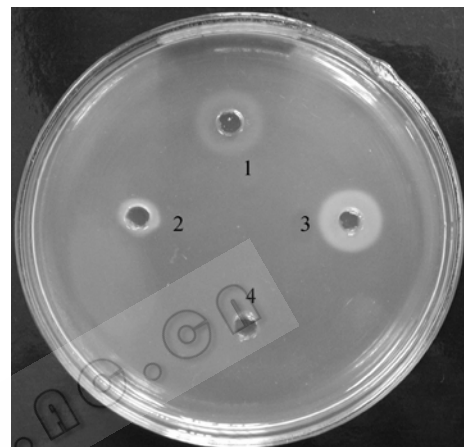


图 6 重组的类凝血酶 calobin 对纤维蛋白原的作用
Fig. 6 Incubation of recombinant thrombin-like enzyme calobin with fibrinogen. 1: recombinant calobin 15 μ g; 2: thrombin (bovine) 0.25 U; 3: ussurin 0.25 U; 4: negative control.

用试管法测定重组 calobin 的活性时发现, 纤维蛋白原溶液在被作用 1 h 后, 溶液明显变混浊, 但不产生凝固现象, 逐渐有絮状沉淀生成。而对照凝血酶和 ussurin 与纤维蛋白原溶液的作用会使溶液凝固。

重组 calobin、凝血酶和 ussurin 对纤维蛋白原的不同作用特点, 可以通过 SDS-PAGE 电泳图谱观察(图 7)。凝血酶可以同时水解纤维蛋白原的 A α 、B β 和 γ 链, 因此对应的 3 条带的量逐渐减少(图 7A)。而重组 calobin 只作用于 A α 链, 在保温 20 min 时已完全被降解, 并逐渐在 40 kD 处形成明显的降解产物带(图 7B)。类凝血酶 ussurin 也只作用于 A α 链, 从图 7C 中看出 A α 链随着酶作用时间的延长而逐渐消失, 但在略小于 A α 链而略大于 B β 链的位置出现一条新的降解带。

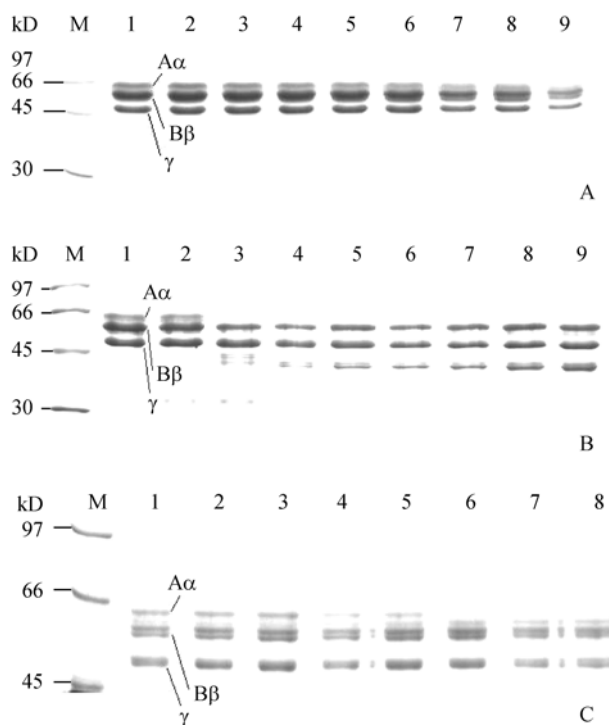


图 7 牛凝血酶、重组 calobin 和天然 ussurin 在不同时间点对纤维蛋白原的水解状况

Fig. 7 Incubation of fibrinogen with different enzymes at different time intervals. (A) Fibrinogen was incubated with bovine thrombin (sigma) and aliquots were taken for SDS-PAGE at different time intervals. M: protein marker; 2-9: 0, 1.5, 4, 10, 20, 30, 60, and 120 min. (B) Fibrinogen was incubated with recombinant calobin for 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180 and 240 min (2-9). (C) Fibrinogen in the presence of native ussurin was for, 0, 3, 7, 15, 30, 45 and 100 min (2-8). 1: Fibrinogen in the absence of enzyme was used as control.

4 讨论

长白眉蝮类凝血酶 gussurin 和大连蛇岛蝮类凝血酶 glosedobin 在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中获得表达时, 都保持了酰胺裂解活性, 但对纤维蛋白原的作用却未曾提及^[4,5]。You 等^[6]和李招发等^[7]在酵母系统中表达了巴曲酶, 得到的重组酶和其天然蛋白一样, 具有使纤维蛋白原凝固的活性, 比活单位均在 200 NIH 以上。本实验中, 重组的 calobin 在测定酰胺裂解活性时, 发现酶活性比较微弱, 而对纤维蛋白原的水解活性却十分明显。重组 calobin 在作用于纤维蛋白原时, 并不使后者聚合而产生凝固, 只水解纤维蛋白原 Aα 链。而且, 把重组 calobin 加到被凝血酶作用后完全凝固的纤维蛋白底物中时, 发现完全凝固的现象会被破坏, 紧密聚合的纤维蛋白逐渐降解, 试管中底物的流动性变大。这种作用

特点应该被归为 A-纤维蛋白原酶^[2]。重组后的 calobin 为什么没有表现凝血酶活而表现 A-纤维蛋白原酶活, 很难找到准确原因, 推测可能在酵母细胞中大量诱导表达时, 折叠状态与天然状态有差异, 或可能是由于 calobin 分子存在糖基化位点, 毕赤酵母特色的糖链存在干扰了活性中心的构象。

蛇毒中存在多种 Ser 蛋白酶, 除具有类凝血酶活性外, 还有激肽释放酶活性、毛细血管通透性增强酶活性、蛋白 C 激活剂活性、纤维蛋白原活性、纤维蛋白原激活剂活性等^[12]。这些 Ser 蛋白酶都从同一个祖先进化而来, 具有共同的保守区, 具有相似的构象, 均属于胰蛋白酶家族。因此, 在许多不同种类的酶分子中, 活性并不独立, 常常表现相互之间的交叉, 比如从东部菱斑响尾蛇 (*Crotalus adamanteus*) 中分离得到的类凝血酶 Crotalase 既具有类凝血酶活, 又具有类激肽释放酶活性^[13]。在天然类凝血酶 calobin 所来源的朝鲜蝮蛇 (*Agkistrodon caliginosus*) 的蛇毒中, 已纯化出的丝氨酸蛋白酶中, 具有水解精氨酸酯水解活性的酶就有类凝血酶 calobin 和 calobin2、毛细血管通透性增强因子 CPI enzyme-1 和 CPI enzyme-2、激肽原酶 Kininogenase-1 和 Kininogenase-2。Shimokawa 等^[14]分析了后 4 者对纤维蛋白原的作用特点, 发现这 4 种酶都具有纤维蛋白原酶活性, 其中 CPI enzyme-2 显示了较强的 A-纤维蛋白原酶活性和 B-纤维蛋白原酶活性, 而 Kininogenase-2 显示了专一的 A-纤维蛋白原酶活性, 对 Bβ 链无作用。Hahn 等^[15]测定了 CPI enzyme-2 的序列, 从公布序列与类凝血酶 calobin 的对比可以看出: 1) 2 个酶分子全长相近, 前者 258 个氨基酸残基, 后者 262 个; 2) 信号肽和酶原长度相同, 均为 18+6; 3) 酶活性中心相同, 前者为 His41、Asp86、Ser180, 后者后移了 2 个氨基酸残基, 为 His43、Asp88、Ser182; 4) DNA 序列同源性: 1~152 碱基对: 98%; 152~789 碱基对: 84%。从上述比较看出, CPI enzyme-2 和 calobin 的 DNA 序列同源性和氨基酸序列同源性都比较高, 而且在活性机理、酶分子结构上具有相似性。

由于蛇毒中存在一组 Ser 蛋白酶, 它们的分子大小相近、结构类似、具有相同的催化活性中心, 酶活性既有侧重点, 又有交叉性。在折叠过程中细微的构象变化, 可能会使酶作用特异性发生改变, 从

而与另一种结构类似的 Ser 蛋白酶的作用特点相似。因此, 可能在酵母中的高表达使重组分子在折叠时与天然分子的构象略微有差异, 虽然可以专一性地作用于纤维蛋白原的 A α 链, 但失去了帮助产物首尾聚合的那一部分功能。

REFERENCES

- [1] Guan LF, Qi ZW. The research on the *Agkistrodon halys Pallas* snake venom thrombin-like enzyme. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1982, **14**(4): 303–313.
管利丰, 戚正武. 蝮蛇(*Agkistrodon halys Pallas*)蛇毒类凝血酶的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1982, **14**(4): 303–313.
- [2] Tan GP. Chinese Snake Venom. 2nd Ed. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 1998.
覃公平. 中国蛇毒学. 第二版. 南宁: 广西科技出版社, 1998.
- [3] Lathan LO, Staggers SL. Ancrod: The use of snake venom in the treatment of patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis undergoing coronary artery bypass grafting: Nursing management. *Heart Lung*, 1996, **25**(6): 451–460.
- [4] Yang Q, Hu XJ, Xu XM, *et al.* Cloning, expression and purification of Gussurobin, a thrombin-like enzyme from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2002, **34**(1): 6–10.
杨青, 胡学军, 许小明, 等. 长白山白眉蝮蛇类凝血酶 Gussurobin 基因的克隆、表达与纯化. *生物化学与生物物理学报*, 2002, **34**(1): 6–10.
- [5] Yang Q, Hu XJ, Xu XM, *et al.* Expression, purification and partial characterization of recombinant Gloshebin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(3): 390–393.
- [6] You WK, Choi WS, Koh YS, *et al.* Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett*, 2004, **571**(1-3): 67–73.
- [7] Li ZF, Yu XL, Huang JL, *et al.* Recombinant batroxobin expressed highly in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(3): 483–486.
李招发, 于学玲, 黄金路, 等. 重组巴曲酶在毕赤酵母中的高效表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(3): 483–486.
- [8] Hahn BS, Yang KY, Park EM, *et al.* Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean Viper). *J Biochem(Tokyo)*, 1996, **119**(5): 835–843.
- [9] Yuan SL, Duan HQ, Zhang ZS. The design, chemical synthesis and cloning of cDNA of *Agkistrodon caliginosus* thrombin-like enzyme Calobin. *Lett Biotechnol*, 2003, **14**(5): 357–360.
袁盛凌, 段海清, 张兆山. 蛇毒类凝血酶 Calobin cDNA 的设计合成与克隆. *生物技术通讯*, 2003, **14**(5): 357–360.
- [10] Yuan SL, Duan HQ, Liu CJ, *et al.* The role of thioredoxin and disulfide isomerase in the expression of the snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Protein Expr Purif*, 2004, **38**(1): 51–60.
- [11] Maeda M, Satoh S, Suzuki S, *et al.* Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like enzyme. *J Biochem(Tokyo)*, 1991, **109**(4): 632–637.
- [12] Deshimaru M, Ogawa T, Nakashima K, *et al.* Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett*, 1996, **397**(1): 83–88.
- [13] Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998, **36**(12): 1749–1800.
- [14] Shimokawa K, Takahashi H. Comparative study of fibrinogen degradation by four arginine ester hydrolases from the venom of *Agkistrodon caliginosus*(Kankoku-Mamushi). *Toxicon*, 1995, **33**(2): 179–182.
- [15] Hahn BS, Beak K, Kim WS, *et al.* Molecular cloning of capillary permeability-increasing enzyme 2 from *Agkistrodon caliginosus*(Korean viper). *Toxicon*, 1998, **36**(12): 1887–1893.