

水稻巯基蛋白酶抑制剂 cDNA 在大肠杆菌中的表达

周兆澜 朱 祯* 陈 荣 刘春明 李向辉

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要 根据从水稻未成熟种子 cDNA 文库中筛选出的水稻巯基蛋白酶抑制剂 (Oryzacystatin) cDNA 序列, 利用聚合酶链反应 (PCR) 技术扩增出 Oryzacystatin 编码区, 插入到温度敏感型大肠杆菌表达载体的 P_ρP_L 启动子下游, 该质粒带有温度敏感型阻遏子的编码基因 cIts857. 转化大肠杆菌 DH5α 后, 通过升温诱导, Oryzacystatin 在大肠杆菌中获得高效表达, SDS-PAGE 表明分子量约为 12kDa, 与预期结果一致, 表达量占细菌可溶性蛋白总量的 10% 以上, 对巯基蛋白酶的抑制活性检测表明, 可溶性蛋白组分对木瓜蛋白酶有明显的抑制活力。

关键词 水稻巯基蛋白酶抑制剂, 高效表达, 活力测定

植物蛋白酶抑制剂作为一种天然的抗虫物质在抗虫植物基因工程中愈来愈受到重视^[1]。我们已经成功地克隆了豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTI) 基因并获得了有抗虫能力的转基因烟草^[2,3]。CpTI 是一类丝氨酸蛋白酶抑制剂, 由于大多数昆虫 (例如鳞翅目、直翅目、双翅目、部分鞘翅目等) 的主要蛋白消化酶为丝氨酸类蛋白酶, 决定了 CpTI 的抗虫广谱性。对植食性昆虫蛋白消化机制的进一步了解, 引起了对另一类蛋白酶抑制剂——巯基蛋白酶抑制剂的普遍关注^[4,5]。体外实验证明, 水稻巯基蛋白酶抑制剂 (Oryzacystatin) 对鞘翅目害虫的蛋白消化酶有显著的抑制活性, 同时还证明上述两类蛋白酶抑制剂在抗虫谱上有较强的互补性^[6], 显然 Oryzacystatin 基因在抗虫植物基因工程中具有十分重要的潜在应用价值。另一方面, 巯基蛋白酶抑制剂在医药研究中的应用日益受到重视, 其可能具一定的抗癌作用^[7]。Oryzacystatin 是水稻种子中的蛋白成分之一, 但含量甚少^[8], 从水稻未成熟种子的 cDNA 文库中, 我们已经分离到了 Oryzacystatin cDNA, 本文对其编码区进行了扩增, 并在 λ 噬菌体 P_ρP_L 启动子的调控下获得了大肠杆菌细胞内的高效表达。

1 材料

1.1 菌株与质粒

E. coli DH5α [Sup E44, ΔLacU169 (Φ80 LacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1] 为受体菌; 克隆载体 pBluescript KS (+) 由本实验室保存; *E. coli* 表达载体 pBV220 由中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德教授惠赠; pBZλ1 由本实验室构建, 其含有 Oryzacystatin cDNA, 该 cDNA 克隆来自梗稻 R570 未成熟种子的 cD-

本研究得到“863”计划基金、总理基金及美国洛氏基金的资助。

* 通讯联系人。

本文于 1994 年 7 月 27 日收到。

NA 文库, 作为 PCR 扩增的模板。

1.2 重要生化试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶和低熔点 Agarose 购自 Gibco/BRL 公司; Vent DNA 聚合酶购自 Boehringer 公司; Klenow 酶购自 Promega 公司; 木瓜蛋白酶 (Papain) 购自 Sigma 公司; Na-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯胺盐酸盐 (α -N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide, BAPA) 购自百泰生化技术公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、细胞色素 C 购自华美公司。

2 方法

2.1 聚合酶链反应 (PCR)

参照 Oryzacystatin cDNA 序列, 设计编码区引物:

pZ1: 5' AGAAGATGTCGAGCGACGGAG 3'

pZ2: 5' CTTAGGCATTTGCACTGGCATC 3'

由微生物所 ABI 公司 DNA 合成仪合成。用时稀释到 50 pmol/ μ l。取 0.1 μ g 的 pBZA1DNA 为模板, 于 100 μ l PCR 反应体系, 加入两种引物各 50 pmol, 98 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后加入 2u 的 Vent DNA 聚合酶, dNTP 各 200 μ mol, 并覆盖一层液体石蜡。93 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min, 70 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 30 个循环后在 70 $^{\circ}$ C 保温延伸 10 min, 然后加入 2u 的 Klenow 酶, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 以保证扩增产物为平端。取 10 μ l 样品电泳检测。

2.2 DNA 重组操作

质粒 DNA 提取、重组、*E. coli* 转化及重组子的筛选鉴定均参照 Sambrook 等人的方法^[9]进行。

2.3 表达产物的制备

Oyzacystatin 表达菌株 *E. coli* DH5 α (pBVC9) 和对照菌株 *E. coli* DH5 α (pBV220) 在含氨基青霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 培养基中 30 $^{\circ}$ C 生长过夜, 按 1:40 转入新鲜的 LB 培养液, 继续在 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀=0.4~0.6, 迅速转至 42 $^{\circ}$ C 诱导培养 6h, 离心收集菌体, 用 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0, 2 mmol/L EDTA) 洗涤一次, 重新悬浮于 1/10 体积的上述缓冲液, 超声波裂解, 离心去除沉淀, 即得到可溶性总蛋白。非诱导对照实验菌株于 30 $^{\circ}$ C 培养。

2.4 总蛋白含量的测定

参照文献 [10] 的方法, 按 Bradford 法, 样品中加入考马斯亮蓝 G-250 结合 2 min 后, 测定 595 nm 光吸收值, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准绘制标准曲线, 测算样品蛋白含量。

2.5 SDS-PAGE 分析

参照文献 [9] 的方法, 分离胶浓度 15%, 浓缩胶浓度 5%, 以细胞色素 C (12.5 kDa) 为标准分子量蛋白, 样品中加入等体积的 2 \times SDS 载样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 处理 10 min 后, 取样 15 μ l 电泳。蛋白质经考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色后用激光光密度计扫描定量。确定表达产物是否形成包含体时, 分三部分制备样品, 一部分为收集后的全菌体, 一部分为超声破碎离心后的上清, 第三部分是离心后的沉淀部分, 分别加入等体积的 2 \times SDS 载样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 处理 10 min 后上样电泳。

2.6 抑制活力测定

参照文献 [11] 的方法, 将不同量的表达菌可溶性总蛋白及对照菌可溶性总蛋白和 $10\mu\text{g}$ 的木瓜蛋白酶在 100mmol/L 的磷酸钠缓冲液 ($\text{pH}6.5$, 2mmol/L DTT, 2mmol/L EDTA) 中 37°C 保温 30min , 然后加入 $\text{BAPA}30\mu\text{l}$ (40mg/ml DMSO), 继续在 37°C 反应, 60min 后加入 5% 的冰乙酸终止反应, 测定 410nm 光吸收值 (以未加木瓜蛋白酶的相应样品反应管为空白对照, 以未加菌株总蛋白的反应管为标准), 木瓜蛋白酶的剩余酶活力 (%) = 样品 410nm 光吸收值 / 标准品 410nm 光吸收值 $\times 100\%$ 。

3 结果与讨论

3.1 Oryzacystatin 编码区的克隆

我们从水稻未成熟种子 cDNA 文库中筛选得到的 Oryzacystatin cDNA, $5'$ 及 $3'$ 端均带有很长的非编码区, 因此无法在大肠杆菌中直接表达, 对此我们首先设计一对引物, 扩增出 Oryzacystatin 的编码区, 实验中使用 Boehringer 公司的 Vent DNA 聚合酶, 这是一种具有 $3'$ 到 $5'$ 校正活性的耐热 DNA 聚合酶, 其扩增的正确率远高于 Taq DNA 聚合酶, 对仅有 315bp 的扩增产物, 基本可以排除扩增过程中碱基错误掺入的可能。扩增 30 循环后, 进一步经 Klenow 酶补平处理, 利用 1.4% 低熔点琼脂糖回收 PCR 产物, 如图 1 所示, 以 $\Phi\text{x}174/\text{Hae III}$ 为分子量标准, 在 310bp 处有一清晰的单一扩增条带。扩增产物平端插入 pBluescript SK (+) 的 EcoRV 位点, 得到反向插入的重组质粒 pBC5。

3.2 大肠杆菌表达质粒的构建

pBC5 经 EcoR I / Xho I 双酶切回收 315bp 的 Oryzacystatin 编码区片段, 插入到表达载体 pBV220 的 EcoR I / Sal I 位点, 转化 *E. coli* DH5 α , 经质粒 DNA 的快速提取鉴定、限制酶分析, 得到 Oryzacystatin 的大肠杆菌表达质粒 pBVC9 (图 2、图 3)。Oryzacystatin 处于温控串连启动子 P_{rPt} 的调控之下, 而强转录终止子 $\text{rrnBT}1\text{T}2$ 位于 Oryzacystatin 基因的下流, 起始密码子 ATG 与核糖体结合位点 (S. D) 之间的距离为 13 个碱基。图 3 给出了 pBVC9 的限制酶消化后的琼脂糖电泳图谱。由于表达质粒上带有编码温度敏感阻遏蛋白的突变基因 $\text{cIts}857$, 因此在 pBVC9 被转入大肠杆菌受体细胞 DH5 α 后, 可进行 Oryzacystatin 的温控表达。

3.3 Oryzacystatin 在大肠杆菌中的高效表达

将 Oryzacystatin 的表达菌株 *E. coli* DH5 α (pBVC9) 和载体对照菌株 *E. coli* DH5 α (pBV220) 在 30°C 培养至 $\text{OD}_{600} = 0.4 \sim 0.6$, 迅速转到 42°C 诱导 6h 。作为非诱导对照的

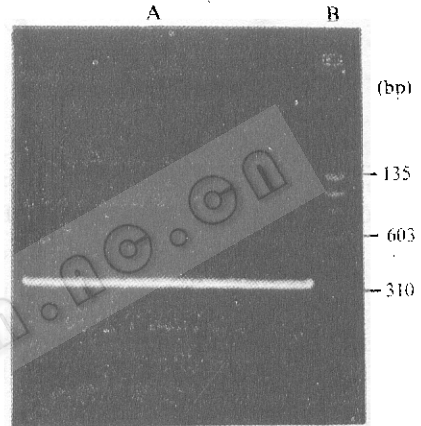
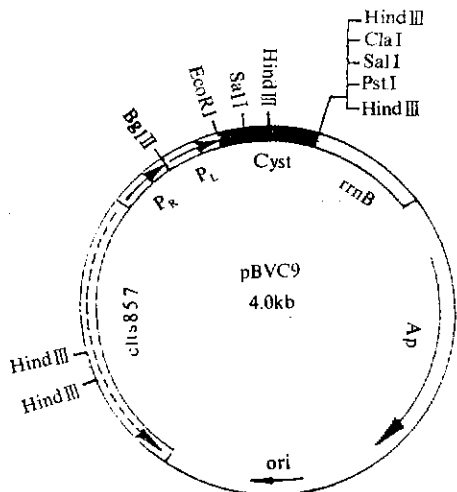


图 1 Oryzacystatin 编码区扩增产物电泳回收图

Fig. 1 The electrophoresis pattern of the PCR products for oryzacystatin coding-region

A. PCR products, B. $\Phi\text{x}174/\text{Hae III}$ marker



5'... P_RP_L...AATTA [AGGAGG] AATTCGATAGAAG ATG TCG AGC...3'
 Promoter S.D. (rrnB) Translating site

图2 Oryzacystatin 大肠杆菌表达质粒 pBVC9 的结构图

Fig. 2 The Structure of the *E. coli* expression plasmid pBVC9 for expressing oryzacystatin.

上述相应菌株一直在 30℃ 培养。所制备的可溶性蛋白于 15% 的 SDS-PAGE 分离, 经染色、脱色后, 在低于细胞色素 C 标准分子量 12.5kDa 处, 诱导表达菌株 *E. coli* DH5α (pBVC9) 样品有明显条带 (图 4A), 与推论的 Oryzacystatin 蛋白分子量 12.0kDa 相一致, 而在对照菌株 *E. coli* DH5α (pBV220) (图 4B) 以及非诱导菌株样品上未见有明显条带 (图 4C, D)。经光密度扫描测定, 表达出的 Oryzacystatin 蛋白占细菌可溶性总蛋白的 10% 以上。初步计算, 从 1 L 的细菌培养物中大约可得到 50mg 的 Oryzacystatin 蛋白。

另外, 通过对表达菌株裂解物不同组分蛋白的 SDS-PAGE 分析表明, Oryzacystatin 表达产物主要存在于上清液部分, 因此可以认为其是以可溶性蛋白形式存在的, 而不是形成包含体, 这样将便于 Oryzacystatin 的进一步分离纯化以及避免提取过程中 Oryzacystatin 的失活。

3.4 Oryzacystatin 对木瓜蛋白酶抑制活性的测定

在磷酸盐缓冲体系中, 加入 DTT、EDTA 等木瓜蛋白酶的保护剂, 将不同量的表达菌可溶性总蛋白及对照菌可溶性总蛋白和 10μg 的木瓜蛋白酶混匀, 于 37℃ 保温 30min, 此时表达菌株所表达出的巯基蛋白酶抑制剂——Oryzacystatin 即会和巯基蛋白酶—木瓜蛋白酶结合, 非竞争性抑制木瓜蛋白酶的酶活性, 在加入底物 BAPA 以后, 未被抑制的木瓜蛋白酶可水解 BAPA 并产生对硝基苯胺, 从而导致 410nm 处光吸收值的增加。因此不同样品组 410nm 光吸收值的高低即代表了该组中木瓜蛋白酶剩余酶活力的大小。由图 5 可以看出, 随着表达菌株 *E. coli* DH5α (pBVC9) 可溶性总蛋白量的增加, 木瓜蛋白酶的剩余酶活力显著降低, 而对照却没有变化。

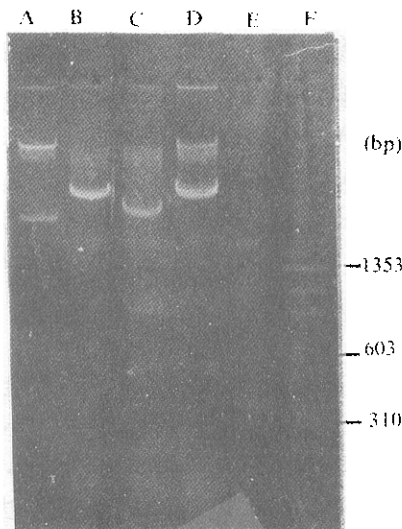


图3 pBVC9 的限制酶分析

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of the oryzacystatin *E. coli* expression plasmid pBVC9

- A. Plasmid pBVC9
- B. pBVC9/EcoRI + Pst I
- C. pBVC9/Hind III, D. pBVC9/Sal I
- E. PCR products
- F. Φx174/Hae III marker

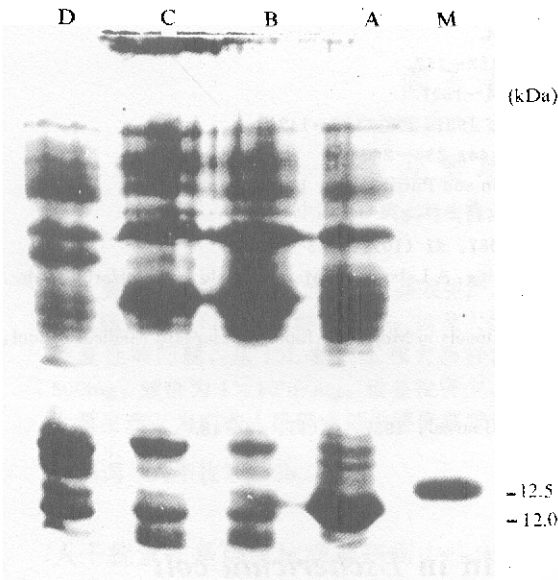


图 4 Oryzacystatin 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis for the expression of oryzacystatin.

- M. Molecular weight marker protein (Cyt. C)
A. *E. coli* DH5 α (pBVC9) incubated at 30°C then induced at 42°C,
B. *E. coli* DH5 α (pBV220) incubated at 30°C then induced at 42°C,
C. *E. coli* DH5 α (pBVC9) incubated at 30°C without inducement,
D. *E. coli* DH5 α (pBV220) incubated at 30°C without inducement

和-3位的嘌呤与高效翻译起始密切相关。

Chen 等^[9]曾对 Oryzacystatin 进行过 *E. coli* 的表达研究,但他们所获得的是融和蛋白,其 N-端的 23 个氨基酸被异源的 11 个氨基酸所取代。本文首次完整地表达了具有生物活性的 Oryzacystatin 蛋白,表达量占细菌可溶性总蛋白的 10% 以上。水稻种子中的 Oryzacystatin 含量甚微,难以大量分离纯化。通过大肠杆菌发酵生产 Oryzacystatin,为大量制备该蛋白提供了方便,这不仅有助于对 Oryzacystatin 抗虫特性的深入研究以及在医药治疗中的应用,也为抗体的制备以及随后的转 Oryzacystatin 基因植株的分析鉴定奠定了基础。

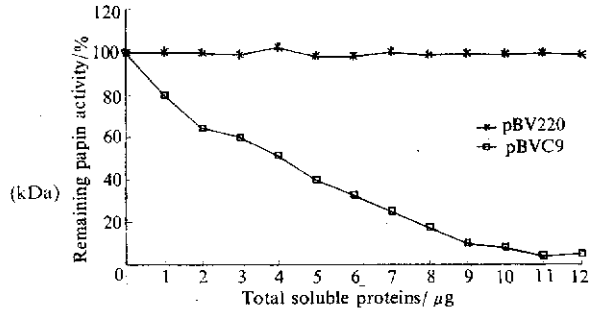


图 5 Oryzacystatin 表达菌株可溶性总蛋白对木瓜蛋白酶的抑制曲线

Fig. 5 Papain inhibitory curve by total soluble proteins from oryzacystatin expression strain *E. coli* DH5 α (pBVC9) and *E. coli* DH5 α (pBV220) as control.

外源基因在大肠杆菌中表达水平的高低,取决于许多因素,包括宿主菌的性质、启动子的强弱、S. D 序列与起始密码子之间的距离和核苷酸种类、表达基因本身的结构以及表达产物的理化性质等等。我们在设计引物扩增 Oryzacystatin 编码区时,起始密码 ATG 前边保留了 AGAAG5 个碱基,一方面是为了在插入到载体 pBV220 后使 S. D 序列和 ATG 之间保持合适的距离,另一方面保留 ATG 前边第一位和第三位的嘌呤碱基,也是为以后构建 Oryzacystatin 的植物表达载体做准备。据文献 [12] 报道,植物翻译起始密码子 ATG 前边 -1 位

致谢 本实验室肖桂芳老师为本研究提供了大量帮助, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] 周兆焯, 朱 楨. 生物工程进展, 1994, 14 (4): 18~24.
- [2] 刘春明, 朱 楨, 周兆焯等. 生物工程学报, 1993, 9: 152~157.
- [3] 刘春明, 朱 楨, 周兆焯等. 科学通报, 1992, 37: 1694~1697.
- [4] Liang C, Brookhart G, Feng G H *et al.*, FEBS Letters, 1991, 278: 139~142.
- [5] Wolfson J L, Murdock L L. Entomol Exp Appl, 1987, 44: 235~240.
- [6] Chen M S, Johnson B, Wen L, *et al.* Protein Expression and Purification, 1992, 3: 41~49.
- [7] 孙 詮, 董坦君, 国外医学分子生物学分册, 1991, 13 (1): 1~3.
- [8] Abe K, Emori Y, Kondo H *et al.* Agric Biol Chem., 1987, 51 (10): 2763~2768.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., 1989.
- [10] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Harvard Medical School, 1987.
- [11] Barrett A J. Analytical Biochem. 1972, 47: 280~293.
- [12] Lutcke H A, Chow K C, Mickel F S *et al.* The EMBO Journal, 1987, 6 (1): 43~48.

Expression of Oryzacystatin in *Escherichia coli*

Zhou Zhaolan Zhu Zhen Chen Rong Liu Chunming Li Xianghui

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract A rice cDNA library of immature seeds had already been constructed, from which colonies carrying oryzacystatin cDNA were isolated. Coding region of the oryzacystatin was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted downstream of $\lambda P_R P_L$ promoter of *E. coli* thermal-inducible expression vector pBV220. An oryzacystatin expression plasmid pBVC9 was thus obtained. Shifting the culture temperature of *E. coli* DH5 α (pBVC9) from 30°C to 42°C led to a high level expression of oryzacystatin. The result of SDS-PAGE showed a distinct band of 12.0kDa which accounts for at least 10% of the total soluble proteins. The inhibitory activity of the total soluble proteins of *E. coli* DH5 α (pBVC9) toward papain was evaluated by using that of *E. coli* DH5 α (pBV220) as a control. Results evidently indicated that soluble proteins of *E. coli* DH5 α (pBVC9) exhibited inhibitory activity toward papain.

Key words Oryzacystatin, high level expression, inhibitory activity