

## 脑型一氧化氮合成酶的钙调蛋白结合区的表达及活性鉴定

朱敏生 沈月 许祥裕

(南京军区军事医学研究所 南京 210002)

朱东亚

(中国药科大学新药研究中心 南京 210005)

智刚

(Southwestern Medical Center at Dallas, UT, USA)

**摘要** 用 PCR 法克隆出 nNOS 的 CaM 结合区基因 (nNOS 2455~2988bp), 并在大肠杆菌中进行了高效表达。经金属离子螯合亲和层析得到纯度为 90% 以上的重组蛋白, 分子量为 22kDa, CaM Overlay assay 证实该蛋白具有 CaM 的结合活性。由于所表达的重组蛋白既具有序列特异性又具有 CaM 的结合活性, 因此, 可将它作为筛选 nNOS 特异性抑制肽的靶蛋白, 亦可用于特异性抗体的制备。

**关键词** nNOS, 钙调蛋白结合区, 重组表达, 大肠杆菌  
学科分类号 Q559

目前已纯化并发现多种一氧化氮合成酶 (NOS) 的同功酶, 其中许多同功酶的基因也相继克隆成功。一般认为, NOS 可分为 3 种类型, 即: 诱导型 (iNOS)、内皮细胞型 (eNOS) 和脑型 (nNOS)<sup>[1]</sup>。3 种同功酶均以 L-精氨酸 (L-Arg) 为底物, 在 FAD、FMN、NADPH 和 BH4 等辅助因子的作用下生成 L-肌氨酸和一氧化氮 (NO)<sup>[2]</sup>。NO 是 1 种自由基形式的信使分子。大量证据表明 NO 产生过量与多种疾病密切相关<sup>[3]</sup>。如何控制 NO 水平是新药设计研究的一个重要研究领域。目前 NOS 的抑制剂主要为精氨酸的衍生物, 缺乏特异性。制备各型 NOS 的特异性抑制剂是 NOS 研究和相关药物开发的一个兴奋点。通过对 3 种 NOS 的同源性比较, 可以发现 nNOS 的钙调蛋白 (CaM) 结合位点及其靠 C 端的邻近序列与 iNOS 和 eNOS 的同源性很低, 而 CaM 可与该区结合并激活其附近与催化合成 NO 相关的特异性位点, 启动 NO 合成过程中的电子传递<sup>[4]</sup>。我们设想, 通过 phage display 的方法筛选 CaM 结合区的特异性结合肽, 阻断电子传递, 即可获得 nNOS 的特异性抑制肽。因此, 如何获得足够量具有生物活性的 CaM 结合区蛋白是一重要环节。本文通过 PCR 方法克隆出 nNOS 结合区的编码基因, 并在大肠杆菌中得到高效表达, 同时还证实重组蛋白具有与 CaM 结合的能力, 为 nNOS 特异性抑制肽的筛选提供了理想的靶蛋白。

本课题得到国家自然科学基金 (No. 39670856) 和全军医药科研基金的资助。

收稿日期: 1997-07-17, 修回日期: 1997-12-26。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒和菌种

pCMV/nNOS 质粒, 内含 nNOS 全长 cDNA, pET/28a(+) 表达载体质粒均由美国德克萨斯西南医学中心提供。BL21 菌株由本实验室保存。

### 1.2 酶和蛋白质及常用试剂

各种限制酶, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶等分别购自 Boehringer 公司、Promega 公司、华美生物工程公司。Lambda/Hind III DNA 分子量标准购自 Pharmacia 公司, CaM 购自 Sigma 公司。His. Tag-Sepharose 购自 Novegen 公司, 常用化学试剂主要为国产分析纯试剂。

### 1.3 方 法

**1.3.1 PCR 扩增及基因操作**按文献[5]进行。重组蛋白的纯化, 按 Novegen 公司的产品说明书进行。

**1.3.2 CaM 结合实验:** 将重组蛋白样品作常规 SDS-PAGE 电泳, 电转移至硝酸纤维素膜上, 用 TBST(0.14mol/L NaCl, 0.01mol/L Tris. Cl pH7.5, 0.05% Tween-20)洗膜 3 次, 每次 10min, 加入含 1% 明胶的 TBST 溶液中室温封闭 1h 后, 加入生物素标记的 CaM(终浓度为 0.625nmol/L)和 20nmol/L CaCl<sub>2</sub>, 室温振荡 1~2h, TBST 清洗 3 次, 加入 1:10000 的 Stretavidin HRP(1% 明胶/TBST 溶液)反应 1h, 用 TBST 洗膜 3 次, 以 ECL 发光法显影。

## 2 结 果

### 2.1 nNOS CaM 结合区编码基因的扩增

用 primer1: 5'-GGGATCCATATGTCCTTTGAGTACCAT-3'和 primer2:

5'-CGGAATTCTATCAGAACCCTCAAGG-3' 为引物, 以 pCMV/nNOS 质粒为模板, 扩增 nNOS 703-881AA 区的编码基因。PCR 扩增条件为: 先 94℃ 预变性 3min, 然后 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7min, 经扩增后得到一条大约 0.55kb 的特异性扩增片段, 几乎无杂带, 如图 1。

### 2.2 重组表达质粒的构建

由于 PCR 引物的两端分别设计有 Nde I 和 EcoR I 位点, 我们先用 Nde I/EcoR I 酶切扩增产物、回收片段; 同时用相同的酶酶切 pET/28a(+) 质粒, 将此酶切载体与酶切片段按适当的比例进行连接, 转化至 BL21 宿主菌, 挑选并得到重组质粒, 将之命名为 pET/nNOS CaM, 其构建过程如图 2。

### 2.3 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒导入 BL21 菌后得到工程菌, 用 IPTG 诱导后, 全菌蛋白经 SDS-PAGE 电泳可见一条明显的额

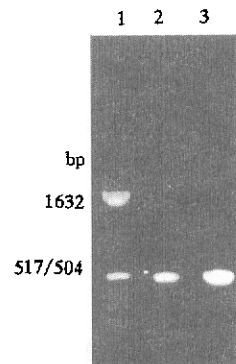


图 1 nNOS 703-881AA 编码基因的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR product for nNOS 703-881 coding gene

1. pBR322/Hinf I DNA marker;

2 and 3. PCR products

外表达带,约占菌体总蛋白的 15%~20%,分子量约为 22kDa,如图 3。为了精确测定该蛋白的分子量,我们用质量飞行质谱测得分子量为 22.364kDa(质谱图未列出),与理论值(22.117kDa)基本一致。

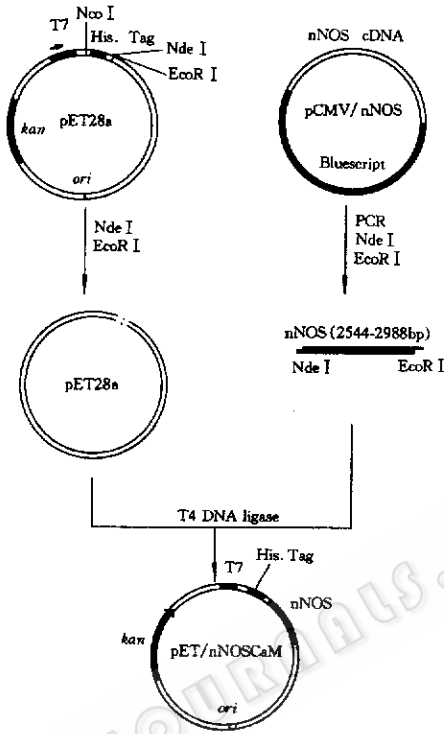


图 2 pET/nNOSCaM 重组质粒的构建图

Fig.2 Construction scheme of pET/nNOSCaM recombinant plasmid

### 3 讨 论

CaM 与 nNOS 的结合位点在 nNOS 的 715~745aa 区域, nNOS 的酶活性依赖于这种结合。Stull 等曾通过多肽合成的方法发现 nNOS 715~745aa 多肽在体外并不能与 CaM 结合(Stull 与作者的个人通讯),据此认为:nNOS 与 CaM 的结合不但需要结合位点而且其邻近序列亦是必不可少的。本文克隆并表达了 nNOS 钙调蛋白结合位点及其邻近序列的编码基因(2455~2988bp),通过金属离子螯合亲和层析的方法对表达产物进行了纯化,经 CaM overlay assay 证实该蛋白具有与 CaM 结合的能力,从而证实了 Stull 的推测。同时还进一步地明确 CaM 结合位点与 CaM 结合所必需的邻近序列位于 NADPH 结合区与 CaM 结合位点之间。

#### 2.4 重组蛋白的纯化

pET/28a(+)表达载体的启动子下游(Nco I-Nde I)紧接一段能编码 6 个连续组氨酸(His)的基因片段(His. Tag)。因此我们表达的重组蛋白实际上是含 6 个 His 的融合蛋白。利用 His 与镍离子的亲和性,我们用 His. Tag-Shephorse 进行了金属螯合亲和层析,在 6mol/L 脲的变性缓冲系统中,用 40~320mmol/L 的咪唑缓冲液洗脱目的蛋白,收集各洗脱峰。经 SDS-PAGE 电泳分析表明:当咪唑浓度为 80~320mmol/L 时可得到高纯度的目的蛋白,纯度约 90%以上。参见图 4。

#### 2.5 重组蛋白与钙调蛋白的结合

为观察重组蛋白是否具有与 CaM 结合的能力,我们用纯化蛋白进行了 CaM Overlay Assay,结果表明,重组蛋白与 CaM 具有很好的结合能力,如图 5,图中 A 和 B 道为平滑肌轻链蛋白磷酸激酶(SMLCK)与 CaM 的结合实验,是本实验的阳性对照。

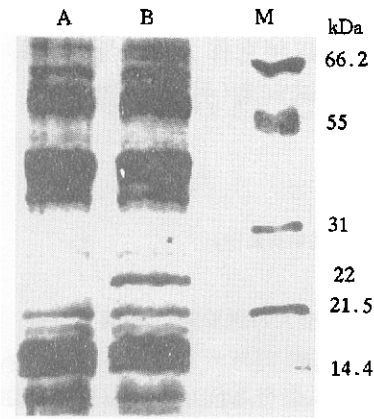


图3 重组蛋白在宿主菌中的表达

Fig.3 Expression of recombinant protein in host cells

A. Untreated with IPTG; B. Induced with 1.0 mmol/L IPTG; M. Protein marker

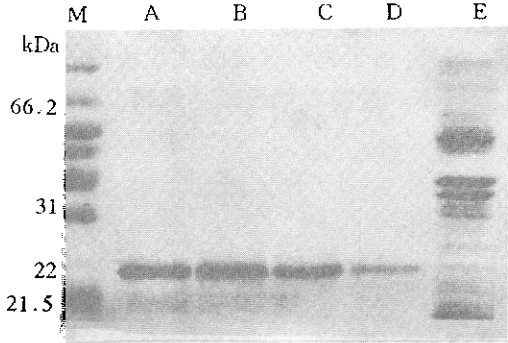


图4 His. Tag 柱纯化过程中咪唑浓度对蛋白纯化的影响

Fig.4 Effects of various concentrations of imidazole on protein purification with His. Tag-column

M. Protein molecular marker; A. 320mmol/L; B. 160mmol/L; C. 80mmol/L; D. 40mmol/L; E. Crude total protein of the *E. coli*

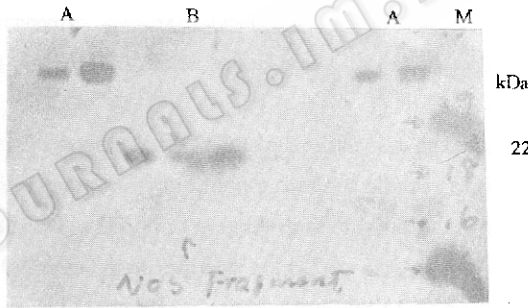


图5 重组蛋白与钙调蛋白的结合实验

Fig.5 Calmodulin overlay assay for the recombinant protein

A. Calmodulin-binding activity of SMLCK used as positive control.  
B. Calmodulin-binding activity of recombinant protein  
M. Protein molecular marker

我们表达的重组蛋白既具有与 CaM 结合的能力又具有序列特异性,这一特点对筛选 nNOS 特异性抑制肽非常有利,只要以该重组蛋白为靶蛋白,筛选得到特异性结合肽并可阻断 CaM 的结合即基本可达到目的,这就使筛选 nNOS 特异性抑制肽的成功率大大提高。根据这一策略,我们利用该靶蛋白首先筛选得到 10 个可与靶蛋白结合的噬菌体克隆,其中 8 个克隆对 nNOS 酶活性有特异性抑制作用,抑制率在 60%~85% 之间,而对其它同功酶(iNOS 和 eNOS)的抑制率为 1%~10%。其中一个克隆对 nNOS 活性的抑制率为 85%,该克隆所对应的肽序列为:Ser Ala Tyr Pro Arg Val Gly Gly Tyr His Val Phe Asp Ser Ala。尽管目前关于其它肽对 nNOS 活性的抑制效应正在研究之中,但可以看出我们

所采用的策略是行之有效的。

另外,由于我们表达的重组蛋白的序列特异性高,可以将它作为免疫原制备特异性多克隆抗体。目前我们已成功地建立了 nNOS 的免疫检测试剂盒(另文发表)。

### 参 考 文 献

- 1 Knowles R G, Moncada S. *Biochem J.* 1994, **296**:249
- 2 Marletta M A. *J Bio Chem.* 1993, **268**:12231
- 3 Bredt D S, Synder S H. *Annu Rev Biochem.* 1994, **63**:175
- 4 Abu-Sond H M, Yaho L L, Stuehr D J, *et al.* *J Biol Chem.* 1994, **269**:32049
- 5 Sambrook, Fritsch E F, Maniatis T M. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2nd Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

## Expression of Calmodulin-binding Domain of Neuronal Nitric Synthase and Its Binding Activity to Calmodulin

Zhu Minsheng<sup>1</sup> Shen Yue<sup>1</sup> Xu Xianyu<sup>1</sup> Zhu Dongya<sup>2</sup> Zhi Gang<sup>3</sup>

(*Nanjing Military Institute of Medical Science, Nanjing 210002*)<sup>1</sup>

(*Pharmaceutical University of China, Nanjing 210008*)

(*Southwestern Medical Center at Dallas, UT. USA*)<sup>3</sup>

**Abstract** To facilitate to study the associations of nNOS functions with its calmodulin(CaM) binding domain and to prepare nNOS specific inhibiting peptides from phage peptide library, we have amplified the coding gene of nNOS CaM-binding domain (nNOS2544-2988bp) and expressed it in *E. coli*. The recombinant product in size of 22kDa was purified (over 90% in pure) by His. Tag-Sepharose column and its obvious CaM-binding activity was detected with CaM overlay assay. Since the sequence specificity and effective calmodulin-binding activity, the protein was considered as an ideal target for screening nNOS specific peptides from peptide library and also an antigen for raising nNOS antibody.

**Key words** nNOS, calmodulin-binding domain, recombinant expression, *E. coli*