

研究报告

人激肽释放酶-1 在甲醇酵母中高水平表达、纯化与鉴定

黄秀东, 王书生, 陈佩新, 王俊, 陈耀国, 潘学工, 曹之舫

上海万兴生物制药有限公司新药开发部, 上海 201026

摘要: 将自肾脏cDNA中获得的人激肽释放酶-1(Human kallikrein 1, hK1)基因插入到pPICZαA载体中, 构建甲醇酵母分泌型表达载体pPICZα-hK1, 该载体转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*)宿主菌X33, 通过提高YPD平板和培养液中抗生素Zeocin的浓度(500~700 μg/mL), 筛选能高水平表达重组人激肽释放酶-1(Recombinant human kallikrein 1, rhK1)的*P. pastoris*工程菌株。在30 L发酵罐中发酵的表达条件为30°C、pH 6.0, 诱导64 h时, 发酵上清中rhK1产量达到6500 u/L(约1.25 g/L)。表达的rhK1有N-型糖基化程度不同的两种类型, 分别是分子量偏大的rhK1-H和分子量略小的rhK1-L。通过苯基疏水作用、Cu²⁺螯合以及阴离子交换层析纯化, 从每升发酵上清中可获得0.28 g的rhK1-H和0.62 g的rhK1-L, 纯化的总得率约为72%, 纯度不低于96%。到目前为止, 该研究获得的rhK1产量高于其他研究者的结果。

关键词: 激肽释放酶, 毕赤酵母, 重组蛋白, S-2266 生色底物

High Level Expression, Purification and Characterization of Human Kallikrein-1 in *Pichia pastoris*

Xiudong Huang, Shusheng Wang, Peixin Chen, Jun Wang, Yaoguo Chen, Xuegong Pan, and Zhifang Cao

Department of Research & Development, Wangxing Biopharmaceuticals Co., Ltd, Shanghai 201026, China

Abstract: Human kallikrein-1 (hK1) gene was cloned from kidney tissues cDNA, it was inserted into the plasmid pPICZαA, then the yeast expression vector pPICZα-hK1 was constructed. After transformed into *Pichia pastoris* host X33, high-level expression transformants were screened by escalating the concentration of Zeocin (from 500 to 700 μg/mL) of YPD plate and medium. When temperature was 30°C, pH 6.0 with induction duration of 64 hours in the 30 L fermenter, the highest yield can reach about 6500 u/L (1.25 g/L). The variation of glycosylation resulted in two kinds of molecules, i.e. rhK1-H with a heavy molecular weight and rhK1-L with a light one. rhK1 was purified from the supernatant through Phenyl hydrophobic interaction, Cu²⁺-charged Chelating and Anion-exchange chromatography. 0.28 g rhK1-H and 0.62 g rhK1-L can be purified from one liter supernatant. The yield recovery was 72% with a purity of >96%. So far our yield of rhK1 is superior than known recombinant expression method reported by other researchers.

Keywords: kallikrein, *Pichia pastoris*, recombinant protein, S-2266 substrate

早在1909年, Abelous等就发现将人尿中的一种醇不溶性组分注射到狗体内时, 狗的血压会下降。1926年, Frey EK等称该成分为血管舒缓素, 之

后的研究发现, 它是广泛存在于人和动物血浆、胰腺、肾脏、唾液腺等处的一类蛋白酶, 胰腺中含量最高, 尿中的该成分是其不完全代谢的产物。1930

Received: September 12, 2007; Accepted: December 29, 2007

Corresponding author: Xiudong Huang. Tel: +86-21-58990164; Fax: +86-21-58990234; E-mail: hxd2002@hotmail.com

年,希腊的 Kraut H 等依据希腊语‘Kallikreas’(胰腺)一词,称之为 Kallikrein。在对其功能、分布和作用机理研究中,不同的研究者还使用了诸如 Kininogenase、Kallidinogenase 和 Kininogenin 等名称,中文译名也有血管舒缓素、激肽原酶、激肽酶以及激肽释放酶等。目前,国际上建议只使用 Kallikrein(激肽释放酶)一词,并把除了血浆中的人激肽释放酶(Human kallikrein, hK)之外的其他组织中产生的 hK 重新命名,依次为 hK1、hK2、hK3……hK15 等,已经确定的有 15 种之多^[1,2]。

早期研究者描述的来自人体的诸如组织型激肽释放酶、胰激肽释放酶、唾液腺激肽释放酶、尿激肽原酶以及胰激肽原酶等,实际就是人激肽释放酶-1(Human kallikrein 1, hK1)。hK1 在人尿中含量高,国内外都已将其分离纯化作为药物,用于临床实践并取得了理想的效果。例如,德国拜尔公司(Bayer AG)1930 年就将从尿提取的 hK1 粗品(Padutin®)作为降压药物,并曾出口日本^[3]。广州天普生物医药公司已将从人尿中精纯化的 hK1 用于临床(商品名:凯力康®)。

随着基因工程技术的广泛应用,许多研究者都尝试采用重组技术生产 hK1 的工作。Angermann A 等^[4]在 *E. coli* 中表达人唾液腺 hK1 基因, Wang J 等^[5]用 *E. coli* 和啤酒酵母(*S. cerevisiae*)表达大鼠组织型激肽释放酶基因(类 hK1), Georg Fertig 等^[6]在昆虫细胞中表达人激肽释放酶原(Human pro-kallikrein, Pro-hK1),以及 Lu SH 等^[7,8]在 *E. coli* 表达 Pro-hK1 和 Met-hK1,同时也在 CHO 细胞中表达人前激肽释放酶原基因(Preprokallikrein, prepro-hK1)等。

最具突破性的研究是 Chan H 等^[9]将人的三种 Pro-hK1 基因在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中分泌表达,获得了 Pro-hK1 蛋白,再经胰蛋白酶切割,获得重组人激肽释放酶-1(Recombinant human kallikrein 1, rhK1),其表达产量比以前的研究报道都高,达到约 30 mg/L,但表达产物 SDS-PAGE 电泳呈现两条带。国内开展 rhK1 研究起步晚,也进行了 *E. coli*, *P. pastoris* 和昆虫细胞中表达 hK1 的研究,但多数是对国外研究的验证性工作,没有实质性突破^[10-14]。

根据 GenBank 中公开的 hK1 基因序列资料,设计并合成其上下游引物,从商品化的人肾 cDNA 中直接 PCR 出成熟 hK1 蛋白对应的 DNA 序列,将其

插入到 pPICZαA 中构建表达载体 pPICZα-hK1。通过基因测序后发现,我们从肾脏 cDNA 中获得的 hK1 基因同 GenBank(NCBI)已经公开的序列都略有不同。将 pPICZα-hK1 电转化 *P. pastoris* 宿主菌 X33,筛选获得了高表达工程菌 rhK1/X33,发酵表达的活性产量不低于 6500 u/L(约 1.25 g/L),通过层析纯化可以得到纯度不低于 96%的 rhK1,并对 rhK1 的性质进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

S-2266 底物购自 Chromogenix 公司, pPICZαA 载体、*P. pastoris* 宿主菌 X33 以及抗生素 Zeocin 购自 Invitrogen 公司, *E. coli* 宿主菌 NoveBlue 购自 Novagen 公司,人肾脏 cDNA(Human Kidney cDNA, P/N: 7202, L/N: P02060602)购自 Panomics 公司。各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为上海生工生物工程公司(Sangon)产品, Pyrobest DNA 聚合酶为大连宝生物(TaKaRa)产品。酵母基因组抽提试剂盒、质粒小提试剂盒、PCR 产物柱回收试剂盒以及胶回收试剂盒分别购自 Sangon 和华舜生物工程公司(Watson)。层析介质 Phenyl Sepharose 6FF(High Sub)、Chelating Sepharose FF 和 Q Sepharose FF 均为 Amersham Pharmacia Biotech (GE)公司产品。

1.2 方法

上游构建的分子生物学操作,参见《分子克隆实验指南》以及 Invitrogen 表达载体使用手册,发酵的操作参见 Invitrogen 公司网站上公开的 *Pichia* Fermentation Process Guidelines、纯化介质的使用参见 Amersham Pharmacia Biotech(GE)公司的手册。

1.2.1 活性测定方法

参考汪炬等^[15]的方法,使用生色底物 S-2266 测定,最佳线性范围是 0.017~0.034 u/mL。具体活性单位(u)值可按下面公式计算:

$$\text{u/mL} = 0.1736 \times A_{405} \times \text{待测样品的稀释倍数}$$

本方法可以快速、准确地对样品(如,发酵液、纯化中间样品、原液以及成品等)中的 rhK1 活性进行定量。

1.2.2 目的基因的获得与表达载体的构建

选用人肾 cDNA 为模板,上游引物 hK-P5: 5'-cat ctc gag aaa aga att gtg gga ggc tgg gag tgt gag-3' (Sangon

No: AA07624)和下游引物 hK-P3: 5'-cat gcg gcc gct tag gag ttc tcc gct atg gtg tcc tc-3' (Sangon No: AA07625), 用 Pyrobest DNA 聚合酶, 经 PCR 得到无自身信号肽的 hK1 成熟蛋白对应的 DNA(基因)序列(图 1)。

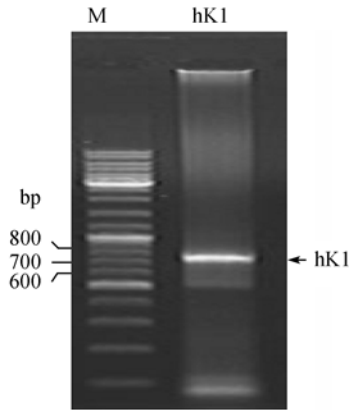


图 1 PCR 肾组织 cDNA 中的 hK1 基因

Fig. 1 hK1 gene obtained from human kidney tissue cDNA by PCR

M: 1 kb mix DNA ladder marker, molecular weight from light to heavy; 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp (brighter), 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp(brighter), 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp (brighter), 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp and 10 000 bp. hK1: hK1 gene obtained by PCR

1.2.3 表达载体的构建与工程菌株的筛选

按常规分子生物学方法操作, 将 PCR 获得的 hK1 基因插入到 pPICZαA 载体的 *Xho* I-*Not* I 位点之间, 转化并酶切筛选符合要求的 NovaBlue 阳性克隆, 委托上海英骏(Invitrogen)公司, 测定载体中 hK1 基因序列。将正确的 pPICZα-hK1 表达载体经 *Sac* I 线性化, 电转化并筛选能高表达 rhK1 的工程菌。

1.2.4 高拷贝菌株的筛选

用接种针穿刺平板上的酵母单菌落, 分别接种于 24 孔板中(每孔 0.5 mL YPD+Zeocin 700 μg/mL 培养液), 30°C 培养约 15 h, 酶标仪测定 A_{600} 值最高的孔为高抗 Zeocin 的克隆, 将菌液再转接到试管中, 按常规表达筛选步骤, SDS-PAGE 电泳分析、测定活性并结合菌液 A_{600} 值, 筛选更高表达的菌株。

1.2.5 工程菌中 hK1 基因和甲醇利用类型鉴别

用 Watson 的酵母基因组抽提试剂盒, 分别抽提 *P. pastoris* X33 和工程菌 rhK1/X33 基因组 DNA, 分别以基因组 DNA 为模板, 使用通用引物 5'AOX₁+3'AOX₁ 进行 PCR。每组 PCR 产物分两份,

5AOX ₁						<i>Xho</i> I				Kex 2		hK1-N-Terminal									
-----AAA						GAA	GAA	GGG	GTA	TCT	CTC	GAG	AAA	AGA	ATT	GTG	GGA	GGC	TGG	GAG	
TGT	GAG	CAG	CAT	TCC	CAG	CCC	TGG	CAG	GCG	GCT	CTG	TAC	CAT	TTC	AGC	ACT	TTC			6	
C	E	Q	H	S	Q	P	W	Q	A	A	L	Y	H	F	S	T	F			24	
CAG	TGT	GGG	GGC	ATC	CTG	GTG	CAC	CGC	CAG	TGG	GTG	CTC	ACA	GCT	GCT	CAT	TGC			42	
Q	C	G	G	I	L	V	H	R	Q	W	V	L	T	A	A	H	C			60	
ATC	AGC	GAC	AAT	TAC	CAG	CTC	TGG	CTG	GGT	CGC	CAC	AAC	TTG	TTT	GAC	GAC	GAA			78	
I	S	D	N	Y	Q	L	W	L	G	R	H	N	L	F	D	D	E			96	
AAC	ACA	GCC	CAG	TTT	GTT	CAT	GTC	AGT	GAG	AGC	TTC	CCA	CAC	CCT	GGC	TTC	AAC			114	
N	T	A	Q	F	V	H	V	S	E	S	F	P	H	P	G	F	N			132	
ATG	AGC	CTC	CTG	GAG	AAC	CAC	ACC	CGC	CAA	GCA	GAC	GAG	GAC	TAC	AGC	CAC	GAC			150	
M	S	L	L	E	N	H	T	R	Q	A	D	E	D	Y	S	H	D			168	
CTC	ATG	CTG	CTC	CGC	CTG	ACA	GAG	CCT	GCT	GAT	ACC	ATC	ACA	GAC	GCT	GTG	AAG			186	
L	M	L	L	R	L	T	E	P	A	D	T	I	T	D	A	V	K			204	
GTC	GTG	GAG	TTG	CCC	ACC	CAG	GAA	CCC	GAA	GTG	GGG	AGC	ACC	TGT	TTG	GCT	TCC			222	
V	V	E	L	P	T	Q	E	P	E	V	G	S	T	C	L	A	S			238	
GGC	TGG	GGC	AGC	ATC	GAA	CCA	GAG	AAT	TTC	TCA	TTT	CCA	GAT	GAT	CTC	CAG	TGT				
G	W	G	S	I	E	P	E	N	F	S	F	P	D	D	L	Q	C				
GTG	GAC	CTC	AAA	ATC	CTG	CCT	AAT	GAT	GAG	TGC	AAA	AAA	GCC	CAC	GTC	CAG	AAG				
V	D	L	K	I	L	P	N	D	E	C	K	K	A	H	V	Q	K				
GTG	ACA	GAC	TTC	ATG	CTG	TGT	GTC	GGA	CAC	CTG	GAA	GGT	GGC	AAA	GAC	ACC	TGT				
V	T	D	F	M	L	C	V	G	H	L	E	G	G	K	D	T	C				
GTG	GGT	GAT	TCA	GGG	GGC	CCG	CTG	ATG	TGT	GAT	GGT	GTG	CTC	CAA	GGT	GTC	ACA				
V	G	D	S	G	G	P	L	M	C	D	G	V	L	Q	G	V	T				
TCA	TGG	GGC	TAC	GTC	CCT	TGT	GGC	ACC	CCC	AAT	AAG	CCT	TCT	GTC	GCC	GTC	AGA				
S	W	G	Y	V	P	C	G	T	P	N	K	P	S	V	A	V	R				
GTG	CTG	TCT	TAT	GTG	AAG	TGG	ATC	GAG	GAC	ACC	ATA	GCG	GAG	AAC	TCC	TAA	<u>GCG</u>				
V	L	S	Y	V	K	W	I	E	D	T	I	A	E	N	S	Ter					
<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	AGC	TTT	CTA	GAA	CAA	-----														
<i>Not</i> I						3AOX ₁ ----															

图 2 表达载体 pPICZα-hK1 中 hK1 的基因序列以及推导氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of hK1 in expression vector pPICZα-hK1

一份为对照, 另一份加入 *Xho* I/*Not* I 进行酶切处理, 1.5%琼脂糖电泳分析(图 3)。

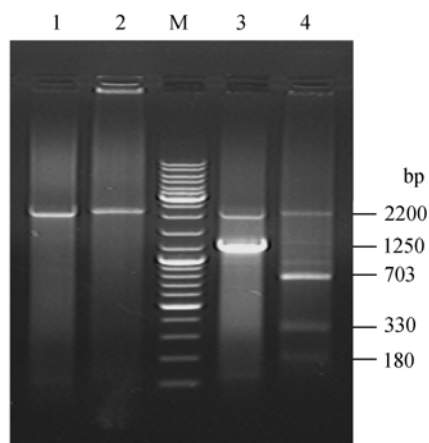


图 3 PCR 分析宿主菌 X33 和工程菌 rhK1/X33 的基因组 DNA

Fig. 3 Analysis of genomic DNA of host X33 and rhK1/X33 by PCR

1: host yeast X33 genomic DNA by priming with the 5' and 3' AOX₁ primers, shows 2.2 kb product of the wild-type AOX₁ (alcohol oxidase) gene; 2: use *Xho* I and *Not* I to cut Lane 1 PCR product, 2.2 kb AOX₁ band can not be cut; 3: rhK1/X33 strain genomic DNA by priming with the 5' and 3' AOX₁ primers, shows 1.25 kb product of hK1 expression unit(330 bp-5AOX₁+730 bp hK1+188 bp-3AOX₁) and the wild-type AOX₁ gene; 4: after using *Xho* I and *Not* I to cut rhK1/X33 PRC product(Lane 3), shows 1.25 bp band is cut into 730 bp, 180 bp and 330 bp three bands. Compare Lane 3 and Lane 4, it indicates that hK1 expression unit of pPICZα-hK1 has inserted into X33 genomic DNA, and AOX₁ gene of the X33 has not disrupted, rhK1/X33 is still Mut⁺ gene type. M: 1 kb mix DNA ladder marker, similar to Fig. 1

1.2.6 高表达菌株的上罐发酵

将经 24 孔板和试管筛选出来的高表达工程菌株 rhK1/X33 按标准方法准备工作种子, 在 30 L 发酵罐中对发酵的 pH、温度、溶氧、补料等条件进行优化。研究从试管、摇瓶到发酵罐中的表达产量以及发酵工艺。

1.2.7 表达产物的纯化

酵母分泌到发酵上清中的 rhK1 有三种形式: 少量 rhK1 多聚体、分子量偏大的 rhK1(rhK1-H)和分子量略小的 rhK1(rhK1-L)。通过对多种层析介质和层析条件的优化组合, 确定了通过苯基疏水作用(Phenyl Sepharose 6FF(High Sub))、Cu²⁺ 螯合(Chelating Sepharose FF)以及阴离子交换(Q Sepharose FF)三步层析, 最终将发酵上清中的 rhK1-H 和 rhK1-L 分别纯化, SDS-PAGE 电泳和 HPLC 检测纯度。

1.2.8 rhK1 的鉴别试验

参照苯酚-硫酸法^[16], 以甘露糖为标准, 分别测定纯化获得的 rhK1-H 和 rhK1-L 中糖百分含量。用 S-2266 底物, 按 2.2.1 中的方法测定活性并计算比活性。委托中科院上海生化所蛋白质组学研究分析中心(SIBS)测定 rhK1-H 和 rhK1-L 的 N-端序列。另用等电聚焦法测定等电点。

2 结果与讨论

3.1 hK1 基因序列

虽然是依据 GenBank 中公开的 hK1 基因序列设计 PCR 两端引物的, 但实际得到的 hK1 基因所对应的氨基酸序列与 GenBank AY094609(人肾/胰腺/唾液腺 hK1 全基因组 DNA 及推测的氨基酸序列)、AAM11874(人肾/胰腺/唾液腺的 hK1 氨基酸序列)和 2009261A(人尿 kallidinogenase 的氨基酸序列)中公开的氨基酸序列一致, 而与 BT007253(人肾/胰腺/唾液腺 mRNA)、X13561(人唾液腺)、AY703451(一个中国病人的胰腺)、BC005313(人胰腺)和 NM_002257(人肾/胰腺/唾液腺 mRNA)这五个 hK1 基因在第 90 或 115 或 121 或 162 或 164 位密码子(氨基酸)有所不同。上游引物 hK-P5 中设计有插入用的内切酶 *Xho* I 位点(CTCGAG), 且在 *Xho* I 和 hK1 基因第一个氨基酸(I)的密码子(ATT)之间添加了酵母 Kex2 蛋白酶识别序列 K-R 二肽所对应的密码子 AAA AGA, 而下游引物 hK-P3 在 hK1 基因最后一个密码子(TCC)后紧随着终止密码子 TAA 和插入用内切酶 *Not* I 位点(GCGGCCGC)。这就保证自 *Xho* I/*Not* I 位点插入的 hK1 基因与载体 pPICZαA 的读码框匹配, 可利用载体α-信号肽分泌表达 hK1(图 2)。

2.2 高表达菌株筛选及基因拷贝数

从 24 孔板中初筛 100 个单克隆中获得 6 个抗高浓度 Zeocin 的克隆(8、12、14、45、62、88), 诱导 48 h 后, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳、测定活性(u), 并计算活性(u)/菌液 A₆₀₀ 比值。从比值可见 14 号表达量最高(表 1)。

为排除平板上 Zeocin 不均匀以及菌落密集处 Zeocin 不足, 将平板上的单克隆再转接到 24 孔板高浓度的 Zeocin 培养液(700 μg/mL)中, 这就保证筛选工程菌株 hK1 高拷贝数。我们发现, 在相同的培养诱导条件下, 生长缓慢(hK1 拷贝数低)的克隆, 诱导

48 h 的活性一般为 0.01~0.12 u/mL, 而生长快速的克隆都大于 0.19 u/mL。14 号菌在发酵罐中诱导 64 h 时, 上清中 rhK1 活性产量可达到 6.5 u/mL, 相当 rhK1 蛋白浓度 1.25 mg/mL。委托上海基康(Genecore)生物工程公司, 采用荧光定量 PCR 法测定出 14 号菌中 hK1 基因拷贝数约为 10 个。

表 1 抗高浓度 Zeocin 的 6 个克隆表达 rhK1 水平
Table 1 rhK1 Expression Level of 6 high resistant Zeocin clone

Clone No.	Activity of rhK1 supernatant(u/mL)	Culture A_{600}	Activity/Culture A_{600}
8	0.243	11.78	0.0206
12	0.194	11.12	0.0174
14	0.276	10.40	0.0265
45	0.269	10.60	0.0253
62	0.226	9.36	0.0241
88	0.220	10.82	0.0203

国内外已报道的 hK1 表达产量最高的是 30 mg/L, 而我们获得的工程菌发酵表达量可达 1.25 g/L。这种差别是否与以前研究者表达的是 Pro-hK1, Prepro-hK1 或 Met-hK1, 而没有使用 α -信号肽的有关呢? 还是 hK1 基因序列赋予了其高表达能力呢? 还有待进一步研究。

2.3 分析工程菌 rhK1/X33 表达单元和甲醇利用类型

以 *P. pastoris* 宿主菌 X33 基因组总 DNA 为对照, 用 PCR 法检测整合到基因组中的 hK1 基因以及工程菌的甲醇利用类型。从图 3 可见, *P. pastoris* X33 基因组 DNA 经 5AOX₁+3AOX₁ 引物可以 PCR 出 2.2kb 的 AOX1(醇氧化酶)基因, 表明 X33 是甲醇利用野生型。因为 AOX1 基因中没有 *Xho* I 或 *Not* I 的切点, 所以用 *Xho* I/*Not* I 双切后 AOX1 片段不变。而对于 rhK1/X33 工程菌, 由于表达载体 pPICZ α A 中 hK1 表达单元(5' AOX₁-hK1-3' AOX₁)已成功地插入 X33 基因组 DNA 之中, 且基因插入未破坏 X33 的 AOX1 基因, 所以 5AOX₁+3AOX₁ 引物 PCR 出两条带: 约 1.25 kb hK1 表达单元(330 bp-5AOX₁ + 730 bp hK1 + 188 bp-3AOX₁)和 2.2 kb 的野生型 AOX1 基因, 由此可见, rhK1/X33 工程菌为甲醇利用快型(Mut⁺)^[17]。

2.4 rhK1/X33 工程菌株发酵条件确定

将种子液按 1:15 接入发酵罐内的 15L BSM 培养

基(pH 2.0)中, 参考 Invitrogen 公司操作手册, 进行发酵。诱导阶段的 pH 6.0, 30°C, 维持甲醇诱导约 64 h, 结束后离心收获上清。整个发酵过程 SDS-PAGE 电泳如图 4。发酵上清中 rhK1 的活性达 6.5 u/mL, 同试管中比, 表达量提高了 20 倍以上。

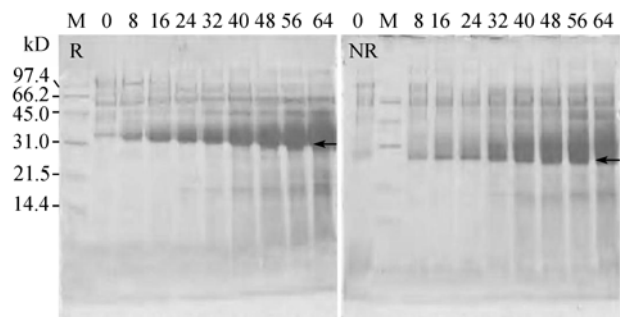


图 4 发酵表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 Analysis of the fermentation expression products by SDS-PAGE

M: molecular weight marker (kD). Arrows indicate the rhK1 bands; 0: the supernatant before methanol induction; 8,16~64: stand for the different time induced by methanol, respectively; R: reducing SDS-PAGE; NR: non-reducing SDS-PAGE

2.5 rhK1 蛋白的纯化条件确定

纯化过程包括发酵上清的预处理和连续的三步层析: 预处理后的上清先经过 Phenyl Sepharose 6FF(High Sub)介质疏水层析, 平衡缓冲液为 20 mmol/L PB, 1.0 mol/L Na₂SO₄, pH 7.0, 分别用 20 mmol/L PB, 0.58 mol/L Na₂SO₄, pH 7.0 和 20 mmol/L PB, 0.23 mol/L Na₂SO₄, pH 7.0 缓冲液洗脱, 分别收集到两个洗脱峰, 第一个洗脱峰中主要是高分子量的 rhK1-H, 第二个是分子量略低的 rhK1-L。电泳扫描分析可见, rhK1-L 的产量高于 rhK1-H(rhK1-L/rhK1-H \approx 7/3)。两个 hK1 洗脱峰可分别进行后续层析, 只是洗脱条件略有差异。以纯化 rhK1-L 为例, 第一步收集的洗脱液经过 Cu²⁺螯合层析(Cu²⁺ charged Chelating Sepharose FF), 用 20 mmol/L PB, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.0 缓冲溶液, 可以洗脱下纯度更高的 rhK1-L, 再将该步骤的洗脱液直接上 Q Sepharose FF 阴离子交换介质, 平衡后, 收集 20 mmol/L PB, 0.25 mol/L NaCl, pH 7.0 洗脱液, 过滤除菌就得到了 rhK1-L 原液。通过该纯化工艺, 可以从每升发酵上清中获得 0.28 g 的 rhK1-H 和 0.62 g 的 rhK1-L, rhK1 的总得率不低于 70%。表 2 是 30 L 罐发酵获得一批上清的纯化过程与结果。图 5 是 rhK1-L 纯化过程 SDS-PAGE 电泳。

表 2 30 L 发酵罐表达 rhK1 的纯化结果
Table 2 Results of purification of rhK1 expressed in 30 L fermenter

Step	Total volume (mL)		Protein concentration (mg/mL)		Purity (%)		Protein recovery (%)		Activity concentration (u/mL)		Specific activity (u/mg)		Activity recovery (%)	
	rhK1-H	rhK1-L	rhK1-H	rhK1-L	rhK1-H	rhK1-L	rhK1-H	rhK1-L	rhK1-H	rhK1-L	rhK1-H	rhK1-L	rhK1-H	rhK1-L
Supernatant	12000		3.04		39.9		/		6.5		2.1		/	
Phenyl Sepharose 6 FF(HS)	4100	7500	1.12	1.45	80.1	74.5	25.3	55.7	4.9	5.7	4.4	3.9	25.8	54.8
Cu ²⁺ Chelating Sepharose FF	2100	2900	1.81	2.88	95.2	95.3	98.4	98.2	8.5	14.5	4.7	5.0	88.9	98.4
Q Sepharose FF	950	1200	3.54	6.20	98.3	96.5	91.4	90.2	17.3	32.9	4.9	5.3	92.1	93.9
Total recovery							72.1						71.8	

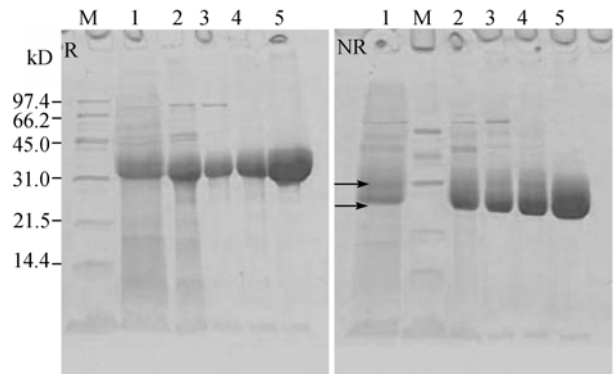


图 5 rhK1-L 纯化过程的 SDS-PAGE 电泳
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purification process of rhK1-L

1: pretreated supernatant (arrows indicate rhK1-H and rhK1-L on NR Lane 1); 2: after Phenyl Sepharose 6 FF; 3,4: samples after Cu²⁺-charged chelating Sepharose FF; 5: purified rhK1-L by Q Sepharose FF

2.6 rhK1 活性测定

hK1 属丝氨酸蛋白酶类, 能够特异性水解其天然底物激肽原 (Kininogen) 分子内的 Met-Lys 或 Arg-Ser 间的肽键, 释放出激肽 (Lys-bradykinin 或 Kallidin), 激肽可调节人的血压、电解质平衡、炎症反应和细胞增殖。hK1 或 rhK1 均能特异性水解人工合成的底物 S-2266 (Val-Leu-Arg-pNA, Chromogenix), 释放出在 405 nm 处有最大吸收值的-pNA。因此, 用 S-2266 可以测定天然的 hK1 或 rhK1 的活性^[18]。诱导前的上清几乎没有活性, 而诱导 24 h 的发酵上清中不仅有 rhK1 的蛋白条带, 也检测 hK1 活性。实际测算出 rhK1-L 的比活性不低于 5.2 u/mg, 而 rhK1-H 比活性略低, 约为 4.8~5.0 u/mg。若按比活性为 5.2 u/mg 推算, 工程菌在试管中诱导 48 h 的表达量约 53 mg/L (276 u/L), 而在发酵罐中诱导 64 h 时, rhK1 的活性表达量为 6500 u/L (约 1.25 g/L)。

2.7 rhK1 的等电点

用电泳聚焦法 (Isoelectric focusing, IEF) 测定 rhK1 的等电点, 可见, rhK1 的等电点 pI 为 4.0~5.2 之间 (图 6)。rhK1-H 和 rhK1-L 均有多条带, 推测这可能是糖基化程度的微小差别影响了分子表面电荷的结果。

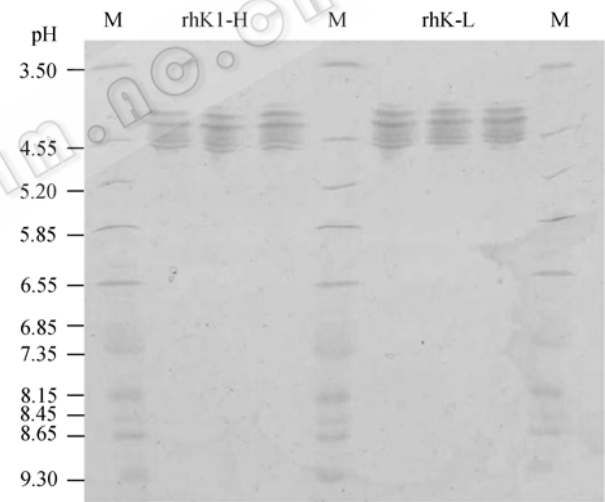


图 6 等电聚焦法 rhK1 的等电点 pI
Fig. 6 Determination of pI of rhK1 by IEF

M: pI standard protein broad pI kit pH 3~10 (GE Healthcare Life Science), from acid to base: amyloglucosidase (3.50); trypsin inhibitor (4.55); β -lactoglobulin a (5.20); bovine carbonic anhydrase b (5.85); human carbonic anhydrase b (6.55); myoglobin, acidic band (6.85); myoglobin, basic band (7.35); lentil lectin, acidic (8.15); lentil lectin, middle (8.45); lentil lectin, basic (8.65); trypsinogen (9.30). rhk1-l: low glycosylation rhk1; rhk1-h: high glycosylation rhk1

2.8 rhK1 蛋白修饰类型鉴别

发酵上清的 SDS-PAGE 电泳, 特别是非还原电泳 (NR) 时呈现为比较模糊而宽的约 30 kD 的蛋白条带, 减少上样量后, 可见有两条靠的很近的条带 (图 4、5)。转 PVDF 膜, 分别测定两条带中蛋白的 N-端序列, 结果 rhK1-H 和 rhK1-L 的 N-端前 15 个氨基

酸序列均为: I-V-G-G-W- E-X-E-Q-H-S-Q-P- W-Q(X 为 C)。这表明, 两个条带是糖基化程度不同的 rhK1。用 N-型去糖化酶 PNGaseF(Sigma-Aldrich, P7367)分别处理 rhK1-H 和 rhK1-L, 其分子量均明显变低, 切去糖链后的 rhK1-H 和 rhK1-L 条带相对位置一致。质谱测定证实, rhK1-H 分子量为 31 871.163, rhK1-L 的是 28 975.790。脱糖后的 hK1(De-rhK1)分子量为 26 404.353, 这与 rhK1 理论分子量 26 405.74 非常接近(图 7)。这表明: rhK1-H 和 rhK1-L 只是糖基化修饰程度不同, 氨基酸序列没有差别, 也暗示 rhK1 中可能只有 N-糖基化修饰, 并无其他蛋白修饰方式。

2.9 糖含量测定

甲醇酵母分泌型蛋白中 N-型糖链主要由甘露糖组成, 所以用甘露糖为标准来测定 rhK1 的含糖量。参照苯酚-硫酸法^[16], 测得 rhK1-H 含糖量为 17.2%(理论值 17.1%), 而 rhK1-L 含糖量为 11%(理论值 9.7%)。

3 结论

hK1 是由 238 个氨基酸残基组成的多肽, 分子内有五对二硫键(C^7-C^{150} 、 $C^{26}-C^{42}$ 、 $C^{129}-C^{196}$ 、 $C^{161}-C^{175}$ 和 $C^{186}-C^{211}$), 理论上三个 N-型糖基化位点(N^{78} 、 N^{84} 和 N^{141})。从人尿中提取的 hK1 已经用于临床实践 70 多年了, 但是尿液或动物胰脏中提取 hK1 或类 hK1 成分, 其原料和产品的质量都较难控制, 尤其病毒污染等问题。国内外采取基因工程手段表达 hK1 的研究并不顺利, 用 *E. coli* 体系表达时形成包含体, 很难大量生产; 而 CHO、昆虫细胞、酵母中进行分泌表达 hK1 时, 多数研究者都是表达 Pro-hK1 或 Prepro-hK1 或 Met-hK1, 表达产量也很低^[5,6,8], 只有 Chan H 等^[9]在甲醇酵母中获得了比较高的产量(30 mg/L)。我们构建的 rhK1/X33 工程菌可以大量产生 rhK1, 发酵时活性产量可达到 6500 u/L(约 1.25g/L)。

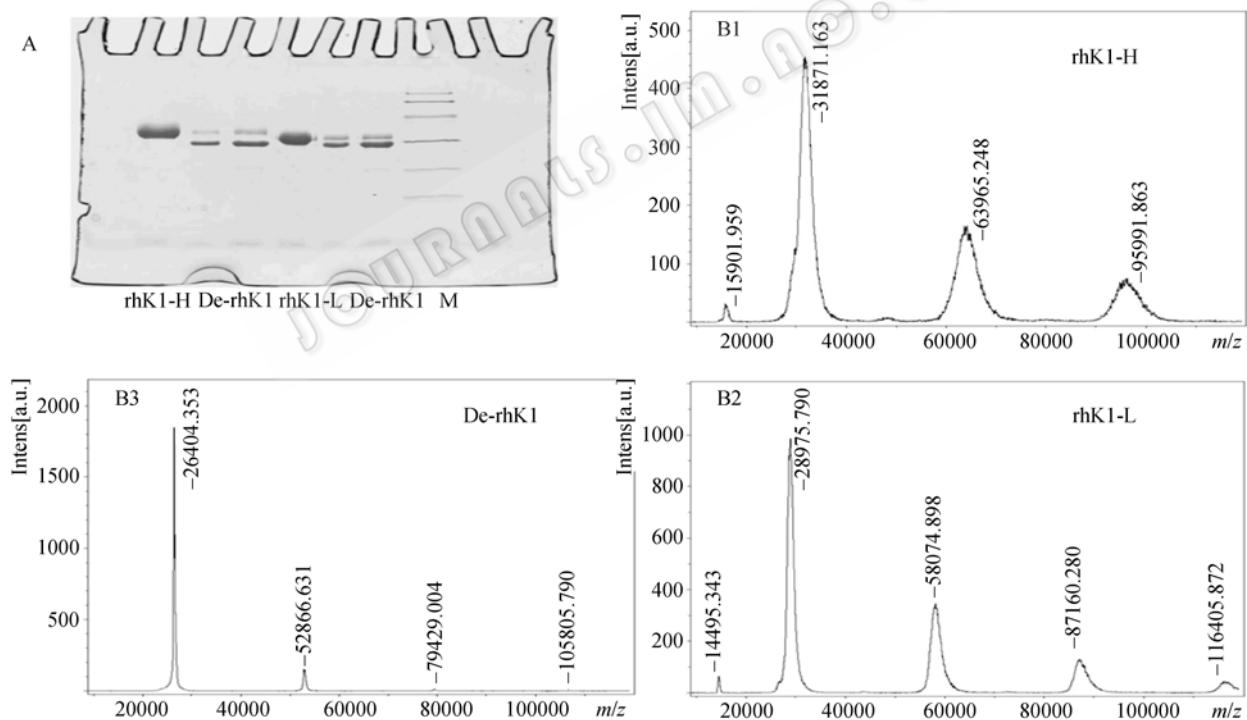


图 7 PNGaseF 切除 r-hK1 糖链前后的 SDS-PAGE 和质谱分析

Fig. 7 Analysis of SDS-PAGE and mass spectrometry before/after rhK1 deglycosylation by PNGaseF

A: rhK1-H with a slight high degree N-linked glycosylation, rhK1-L with a low one, De-rhK1 stands for deglycosated rhK1 by PNGaseF; B1~B3: mass spectrometry of rhK1-H, rhK1-L & De-rhK1 is 31 871.163 D, 28 975.790 D, 26 404.35 D, respectively

甲醇酵母发酵上清中盐浓度高, 色素多, 而纯化的第一步采用疏水层析, 这能很好地捕获 rhK1 并

能将 rhK1-H 和 rhK1-L 分开, 用硫酸钠代替硫酸铵, 使第二步螯合层析能同第一步紧密衔接。我们还发

现, 虽然 rhK1 分子中并没有 His Tag, 但仍可用金属螯合介质纯化 rhK1。通过分析 rhK1 氨基酸组成可见, rhK1 的 238 个氨基酸中有 11 个 H(组氨酸)、7 个 W(色氨酸)、10 个 C(半胱氨酸), 这三种氨基酸残基都有同金属螯合介质(如 GE 公司的 Chelating Sepharose FF)结合的能力, 这很好地解释了螯合介质可结合 rhK1 的特征, 也为从尿液或其他组织中纯化 hK1 或类 hK1 蛋白提供了借鉴。rhK1 同金属螯合介质的结合力并不强, 只需略微提高咪唑浓度(10 mmol/L)就可以洗脱下 rhK1 蛋白, 此步层析不仅除去了杂蛋白和色素, 也最大限度减少了疏水层析洗脱液中的硫酸钠, 使 rhK1 洗脱液中盐浓度低, pH 较高, 可以直接进行最后一步的阴离子交换层析, 这不仅除了杂蛋白, 也可很好地浓缩了 rhK1 原液。

我们首次对甲醇酵母分泌表达的 rhK1-H 和 rhK1-L 糖蛋白进行了初步鉴定。rhK1-H 分子量为 31 871.163, 含糖量 17.2%, rhK1-L 的分子量为 28 975.790, 含糖量 11%。两者 N-端氨基酸序列完全一致, 没有发现其他研究者报道的信号肽残留现象^[5]。除糖基化修饰外, rhK1 中似乎也没有其他的修饰方式存在。通过对 rhK1 甲醇酵母工程菌株的构造、筛选、发酵、纯化工艺与性质的研究证明, 利用甲醇酵母可大量制备有活性的 rhK1, 这为进一步深入研究 rhK1 的生理功能提供了可能。

REFERENCES

- [1] Chen YC. Human tissue kallikreins. *Foreign Medical Sciences-Section of Pathophysiology and Clinical Medicine*, 2003, **23**(4): 386–388.
陈渝春. 人组织激肽释放酶. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 2003, **23**(4): 386–388.
- [2] Yousef GM, Obiezu CV, Luo LY, *et al.* Human tissue kallikreins: from gene structure to function and clinical applications. *Adv in Clin Chem*, 2005, **39**: 11–79.
- [3] Oshima K. A review on the development of Kallikrein (Kallidinogenase). *Yakushigaku Zasshi*, 1994, **29**(3): 498–507.
- [4] Angermann A, Bergmann C, Appelhasn H. Cloning and expression of human salivary-gland kallikrein in *E. coli*. *Biochem J*, 1989, **262**(3): 787–793.
- [5] Wang J, Chao JL, Chao L. Purification and characterization of recombinant tissue kallikrein from *E. coli* and yeast. *Biochem J*, 1991, **276**: 63–71.
- [6] Georg Fertig, Hans Peter Rahn, Axel Angermann, *et al.* Biotechnological aspects of the production of human pro-kallikrein using the AcNPV-baculovirus-expression system. *Cytotechnology*, 1993, **11**: 67–75.
- [7] Lu SH, Hsu YR, Lu IL, *et al.* Isolation and characterization of human tissue kallikrein produced in *E. coli*: biochemical comparison to the enzymatically inactive prokallikrein and methionyl kallikrein. *Protein Expr Purif*, 1996, **8**(2): 215–226.
- [8] Lu SH, Hsu YR, Narhi OL, *et al.* Purification and characterization of human tissue prokallikrein and kallikrein isoforms expressed in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif*, 1996, **8**(2): 227–237.
- [9] Chan H, Springman EB, Clark JM, *et al.* Expression and characterization of human tissue kallikrein variants. *Protein Expr & Purif*, 1998, **12**: 361–370.
- [10] Li TY, Du G, Zhu Y, *et al.* Preparation in small scale, purification and bioactivity analysis of mature human tissue kallikrein. *Chin J Biologicals*, 2005, **18**(1): 33–35.
李体远, 杜珙, 朱莹, 等. 人组织激肽释放酶成熟蛋白的纯化及活性分析. 中国生物制品学杂志, 2005, **18**(1): 33–35.
- [11] Li TY, Du G, Cai XY, *et al.* Overexpression of mature human tissue kallikrein fusion protein in *E. coli*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, **19**(3): 312–316.
李体远, 杜珙, 蔡筱彦, 等. 人组织激肽释放酶成熟蛋白在大肠杆菌中的高效表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, **19**(3): 312–316.
- [12] Yuan XQ, Chen JC. Secretory expression of human pancreatic kallikrein in *Pichia pastoris*. *Journal of Beijing University of Chemical Technology*, 2004, **31**(6): 33–35.
袁新清, 陈劲春. 人胰激肽原酶在毕赤酵母中的分泌表达. 北京化工大学学报, 2004, **31**(6): 33–35.
- [13] Yang Q, Liang Z, Zhang LH, *et al.* Purification of human tissue prokallikrein excreted from insect cells by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, **39**: 848–852.
- [14] Dai Y, Peng WJ, Li TY, *et al.* Cloning of human pancreatic kallikrein gene and expression of fusion protein. *China Journal of Modern Medicine*, 2005, **15**(16): 2405–2409.
戴勇, 彭武建, 李体远, 等. 人胰激肽释放酶基因的克隆及融合蛋白的表达. 中国现代医学杂志, 2005, **15**(16): 2405–2409.
- [15] Wang J, Hong A, Sun FY, *et al.* The Purification and identification of human urinary kallikrein. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(5): 772–777.
汪炬, 洪岸, 孙奋勇, 等. 人尿激肽原酶的纯化与鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2003, **3**(5): 772–777.
- [16] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, **28**: 350–356.
- [17] Protein Expression a Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Pichia Expression Kit Catalog No. K1710-01*.
- [18] Gurunathan L, Sachiko IB, Matthew JB, *et al.* 1.70 Å X-ray structure of human kallikrein 1: structural changes upon peptide inhibitor/substrate binding proteins. *Structure, Function, and Bioinformatics*, 2005, **58**: 802–814.