

重组人丝氨酸蛋白酶抑制因子 Hespintor Kazal 结构域的原核表达、纯化及活性鉴定

冯洁^{1,2}, 伦永志¹, 李越³, 武会娟³, 李宝明³, 魏玲³, 张小莉³, 王雪蕾¹, 迟庆¹

1 大连大学医学院 辽宁省高校生物物理学重点实验室, 辽宁 大连 116622

2 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622

3 北京市理化分析测试中心, 北京 100094

冯洁, 伦永志, 李越, 等. 重组人丝氨酸蛋白酶抑制因子 Hespintor Kazal 结构域的原核表达、纯化及活性鉴定. 生物工程学报, 2013, 29(11): 1607-1616.

Feng J, Lun YZ, Li Y, et al. Prokaryotic expression, purification and activity analysis of recombinant human serine protease inhibitor Hespintor Kazal Domain. Chin J Biotech, 2013, 29(11): 1607-1616.

摘要: Hespintor 是应用抑制消减杂交技术 (SSH) 从肝母细胞瘤细胞系 HepG2 中筛选得到的一未知功能蛋白, 序列分析表明该蛋白属于 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制因子 (Serine proteinase inhibitor, Serpin) 家族中的一个分泌型新成员, 具有与食管癌相关基因 2 (Esophageal cancer related gene 2, ECRG2) 高度同源的 Serpin 基本结构。为了进一步阐明 Hespintor 的生物学功能, 必须得到纯化的 Hespintor 蛋白。先将 Hespintor Kazal 结构域编码序列亚克隆至原核表达载体 pET-40b(+), 转化至 Rosetta (DE3) 表达宿主菌中。经 0.25 mmol/L IPTG, 30 °C 诱导 5 h 获得了分子量约为 42 kDa 的 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的优化表达, Western blotting 证实了重组蛋白的特异性。Hespintor-Kazal 重组融合蛋白以包涵体形式在宿主菌中表达, 利用金属螯合亲和层析和阴离子交换层析柱对重组蛋白进行两步纯化。初步的活性鉴定表明, 纯化的 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白能特异性抑制胰蛋白酶的水解活性, 提示 Hespintor 具有作为一种新型抗肿瘤药物的潜在开发价值。

关键词: 丝氨酸蛋白酶抑制因子, Hespintor, Kazal 结构域, 原核表达

Received: January 8, 2013; **Accepted:** June 17, 2013

Supported by: Dalian Science and Technology Planning Project (No. 2010E13SF138).

Corresponding author: Yongzhi Lun. Tel: +86-411-87402740; E-mail: lunyz@163.com

大连市科技计划项目 (No. 2010E13SF138) 资助。

Prokaryotic expression, purification and activity analysis of recombinant human serine protease inhibitor Hespintor Kazal Domain

Jie Feng^{1,2}, Yongzhi Lun¹, Yue Li³, Huijuan Wu³, Baoming Li³, Ling Wei³, Xiaoli Zhang³, Xuelei Wang¹, and Qing Chi¹

¹ Liaoning Provincial University Key Laboratory of Biophysics, College of Medicine, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

² College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

³ Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China

Abstract: Hespintor is an unknown function protein that was got from hepatoblastoma cell lines HepG2 by suppression subtractive hybridization technique (SSH), sequence analysis showed that the protein is a new member of secretory type of Kazal type serine protease inhibitor (Serpine) family, and has high homology with esophageal cancer related gene 2 (*ECRG2*). The coding sequence of Hespintor's Kazal domain was subcloned into prokaryotic expression vector pET-40b(+), then transformed into Rosetta (DE3). A recombinant protein about 42 kDa in the form of inclusion body was optimization expressed by inducing with 0.25 mmol/L IPTG, 30 °C for 5 h. and its specificity was confirmed via Western blotting. The recombinant protein was purified by metal chelate affinity chromatography (MCAC) and anion-exchange chromatography. The preliminary experimental result showed that the recombinant protein can inhibit trypsin hydrolysis activity specifically. The result clearly demonstrated that Hespintor, as a novel member of Serpin, would be valuable in developing anti-tumor agents.

Keywords: serine protease inhibitor, hespintor, kazal domain, prokaryotic expression

癌症病变过程中最重要的步骤是肿瘤细胞的浸润和转移, 其关键取决于肿瘤细胞的某种分泌物能够水解细胞外基质 (Extra cellular matrix, ECM) 和基底膜 (Basement membranem, BM)。肿瘤细胞先分泌尿激酶型纤溶酶原激活物 (Urokinase-type plasminogen activator, uPA), 此激活物为一种丝氨酸蛋白酶, 可激活纤溶酶原产生纤溶酶 (Plasmin, PLM); PLM 继而降解 ECM, 同时还能激活前基质金属蛋白酶成为基质金属蛋白酶, 后者参与细胞外基质蛋白的水解作用; 最终 ECM 与 BM 被水解, 肿瘤细胞得以扩散^[1]。因此, 干预 uPA 水平或功能可以达到治疗肿瘤的目的, 其中尤以 Kazal 型丝氨酸蛋

白酶抑制因子抑制 uPA 活性最为直接也最具有临床应用前景^[2-4]。

本实验室利用 SSH 技术研究 HBV RT/DNA 聚合酶反式调节靶基因, 从肝母细胞瘤细胞系 HepG2 中筛选得到一未知功能新基因, 经 RT-PCR 验证及生物信息学方法确定该基因属于一种新的 Kazal 型 Serpin, 命名为 *Hespintor* (GenBank Accession No. DQ438947)。*Hespintor* cDNA 全长为 285 个核苷酸, 编码 94 个氨基酸。蛋白质序列分析表明, *Hespintor* 编码的 94 个氨基酸可分为 3 部分: N 端 1~23 个氨基酸残基为信号肽; 第 35~94 个氨基酸含一个典型的 Kazal 结构域; N 端信号肽与 Kazal 结构域间的 24~34

位氨基酸残基构成了连接区^[5]。

pET-40b(+)原核表达载体具有 2 个显著特点:一是含有 T7 启动子,可被宿主细胞提供 T7 RNA 聚合酶识别, T7 RNA 聚合酶的转录效率比大肠杆菌 RNA 聚合酶高 5 倍,能够高效转录 mRNA,并大量表达融合蛋白;二是载体上携带 DsbC-Tag、His-Tag 和 S-Tag,诱导表达的 35 kDa 标签蛋白对目的蛋白的结构及生物学活性影响很小,特别是分别位于目的蛋白前后的 His-Tag 为进一步纯化重组融合蛋白提供了最佳亲和位点,而且两者之间有凝血酶 (Thrombin) 及肠激酶 (Enterokinase) 酶切位点,便于纯化后将标签蛋白切除。

本研究将从 HepG2 细胞中克隆得到的 Hespintor Kazal 型结构域编码区亚克隆至原核表达载体 pET-40b(+)中,采用 IPTG 诱导带有融合标签蛋白的 Hespintor-Kazal 重组蛋白的大量表达。经诱导条件的优化筛选,获得 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的高效表达,再经 Ni²⁺柱及 Q 柱两步纯化及柱上复性,最终得到具有特异性抑制胰蛋白酶水解活性的纯化重组蛋白,为下一步的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

pMD 20-T/Hespintor cDNA 克隆载体、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存;大肠杆菌 Rosetta(DE3)、原核表达载体 pET-40b(+)引自北京市理化分析测试中心;pMD 19-T Simple Vector 购自宝生物工程(大连)公司。

1.1.2 引物

根据 Hespintor 基因序列 (GenBank

Accession No. DQ438947),设计序列特异性的含有限制性核酸内切酶 (*Bam*H I /*Hind* III) 酶切位点的引物 F (5'-GGATCCGCCTAAGCCCCG-3')、R (5'-GCGCAAGCTTATCACATTTTCCATATTTTC-3'),由宝生物工程(大连)公司合成。

1.1.3 主要试剂

Restriction Enzyme Starter BOX、Permixon Ex Taq Version 2.0、 λ -*Hind* III digest、DL2 000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)公司;PageRuler Prestained Protein Ladder 购自美国 Fermentas 公司;鼠抗人 His-Tag 单克隆抗体(一抗)购自科百奥公司;羊抗鼠 HRP-IgG(二抗)购自中杉金桥公司;牛血清白蛋白(BSA)、胰蛋白酶(活性 \geq 250 NF U/mg)购自美国 Amresco 公司;Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基酰胺盐酸盐(BAPNA)购自美国 Sigma 公司;Ni²⁺柱(Ni²⁺-HisTrap FF crude 5 mL)、Q 柱(HisTrap Q FF column 1 mL)购自美国 GE Healthcare 公司;考马斯亮蓝 G250 购自索莱宝公司。

1.2 方法

1.2.1 pET-40b(+)/Hespintor-Kazal 原核表达载体的构建和鉴定

以 pMD 20-T/Hespintor cDNA 克隆质粒为模板,PCR 扩增 Hespintor Kazal 型结构域编码序列,3%琼脂糖凝胶电泳后,切胶纯化回收。将纯化的目的基因片段与 pMD 19-T Simple Vector 室温连接过夜,转化 DH5 α 感受态细胞,碱裂解法提取质粒后测序鉴定,证明目的基因片段已正确插入 T 载体中;再用 *Bam*H I /*Hind* III 从 T 载体上酶切目的基因片段,3%琼脂糖凝胶电泳纯化回收,与经过同样酶切的 pET-40b(+)原核表达载体连接,转化大肠杆菌 Rosetta

(DE3), 碱裂解法提取质粒后酶切鉴定。

1.2.2 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的诱导表达及条件优化

转化有 pET-40b(+)/*Hespintor* 的 Rosetta (DE3) 菌株接种至 LB 液体培养基 (氯霉素 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、卡那霉素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 按比例扩大培养, 选择不同诱导条件进行优化, 分别观察诱导时间、IPTG 终浓度、诱导温度对目的蛋白表达量的影响, 每个条件做 3 组平行。离心收集菌体, 15% SDS-PAGE 进行分析, 确定最适诱导条件。

1.2.3 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的纯化复性与鉴定

利用 Western blotting 确定重组蛋白的表达。将最适条件诱导获得的菌体 (上清保留备用) 超声破碎, 用 8 mol/L 尿素溶液溶解沉淀 (即包涵体), 离心后收集上清。用 A 液 (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑; pH 8.0) 平衡 Ni^{2+} 柱, 上清抽滤脱气后上柱, A 液继续冲洗, 用 B 液 (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑; pH 8.0) 进行蛋白复性, 梯度洗脱程序由 0% B 至 100% B, 复性时间为 150 min。该过程中将融合蛋白液从 8 mol/L 尿素缓慢降至 0 mol/L 尿素, 变性的融合蛋白重新折叠形成具有生物活性的空间结构, 即柱上复性, 整个过程在低温环境下进行。尿素去除完全后用 C 液 (0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑; pH 8.0) 进行洗脱, 收集洗脱峰, 15% SDS-PAGE 分析。用 D 液 (20 mmol/L Tris-HCl; pH 8.0) 平衡 Q 柱, 将 Ni^{2+} 柱纯化后的样品用 D 液稀释后上样, 用 E 液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl; pH 8.0) 进行梯度洗脱, 收集洗脱峰, 15% SDS-PAGE 分析。Bradford

法测定重组蛋白浓度。

1.2.4 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的活性鉴定

参照文献[6-7]和 Sigma 公司活性测定方法, 进行部分改进: 取 8 只 5 mL 离心管分别编号, 其中 7 只各加入 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶 200 μL , 依次加入 0、20、40、80、120、160、200 μL 重组蛋白纯化液; 余下的 1 只离心管中加入 20 μL 1 mmol/L HCl 作为空白对照, 用 Tris-HCl 均补至 2 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 8 只管各加入 1 mL 1 mmol/L BAPNA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 加入 1 mL 60% 醋酸终止反应。595 nm 处检测 OD 值。根据下列公式计算 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的抑制率, 绘制抑制曲线。

Inhibition (%) =

$$\frac{(\Delta A_{405 \text{ nm/min}}^{\text{Unhibited}} - \Delta A_{405 \text{ nm/min}}^{\text{Inhibition}})}{(\Delta A_{405 \text{ nm/min}}^{\text{Unhibited}} - \Delta A_{405 \text{ nm/min}}^{\text{Blank}})} \times 100\%$$

2 结果

2.1 Hespintor-Kazal 原核表达载体的构建

以 pMD 20-T/*Hespintor* cDNA 克隆质粒为模板, 利用 PCR 方法扩增 *Hespintor* Kazal 型结构域编码序列, 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 197 bp 处附近可见扩增产物 (图 1), 大

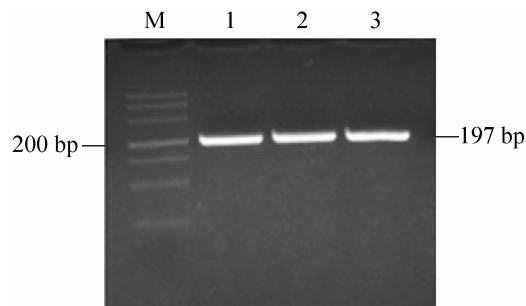


图 1 *Hespintor* Kazal 结构域编码序列的 PCR 产物
Fig. 1 PCR products of CDS of *Hespintor* Kazal domain. M: DL500 DNA marker; 1-3: PCR products of *Hespintor*.

小与预期相符。纯化后的 PCR 产物与 T 载体连接后经蓝白斑筛选和双酶切鉴定得到阳性重组子 pMD 19-T Simple/Hespintor-Kazal, 测序结果表明目的基因片段已正确插入至 T 载体中。用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切 T 载体得到的目的基因片段连接至经过同样酶切的 pET-40b(+), 酶切鉴定结果表明重组原核表达载体 pET-40b(+)/Hespintor-Kazal 构建成功 (图 2)。

2.2 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白表达条件的筛选

pET-40b(+)/Hespintor-Kazal 重组载体转化大肠杆菌 Rosetta (DE3), 经诱导表达后进行 15% SDS-PAGE 分析, 在相对分子量约 42 kDa 处出现明显的蛋白条带, 与预期相符。表达条件的筛选结果表明, 诱导时间对 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白表达量无明显影响, 但诱导 5 h 的表达量相对较多; IPTG 浓度对重组蛋白表达量亦无明显影响, 由于高浓度 IPTG 对细菌有毒副作用, 因此选择 0.25 mmol/L 作为 IPTG 诱导浓度; 诱导温度只有在 33 °C 时重组蛋白表达量较少, 考虑到温度对菌体生长的影响, 故选择 30 °C 作为诱导温度 (图 3)。诱导产物离心后获得的上清和沉淀经 15% SDS-PAGE 分析, 结果证实 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白以包涵体形式存在于沉淀中 (图 4), 约占菌体总蛋白量 25.83%。进一步的 Western blotting 检测表明, 重组蛋白可与 His 单克隆抗体发生特异性结合 (图 5)。

2.3 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的纯化复性与鉴定

将包涵体溶液进行组氨酸亲和层析, Hespintor-Kazal 重组融合蛋白经柱上复性后被洗脱, 通过监控蛋白洗脱曲线, 洗脱下来的目

的蛋白出现明显的单一紫外吸收峰 (图 6A)。SDS-PAGE 结果显示经 Ni²⁺柱纯化后的蛋白主要以两条条带迁移, 尚有少量杂蛋白, 故将亲和层析纯化产物再进行阴离子交换层析 (图 6B), 经 SDS-PAGE 检测, 最终得到目的蛋白的单一特异性条带 (图 7)。经 Bradford 法测定,

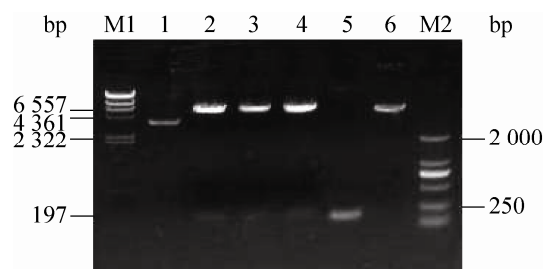


图 2 重组原核表达载体 pET-40b(+)/Hespintor-Kazal 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pET-40b(+)/Hespintor-Kazal by enzyme digestion. M1: λ -*Hind* III digest; 1: pET-40b(+)/Hespintor-Kazal; 2-4: pET-40b(+)/Hespintor-Kazal digested with *Bam*H I and *Hind* III; 5: PCR products of Hespintor-Kazal; 6: pET-40b(+) digested with *Bam*H I and *Hind* III; M2: DL2 000 DNA marker.

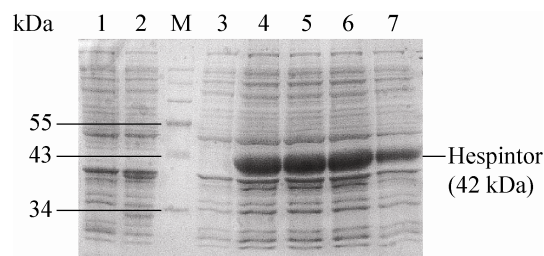


图 3 诱导温度对 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白表达量的影响

Fig. 3 Effect of induced temperature on the expression of Hespintor recombinant protein. 1: Rosetta (DE3) induced; 2: Rosetta(DE3)/pET-40b(+) induced; M: PageRular prestained protein ladder; 3: Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/Hespintor-Kazal non-induced; 4-7: Rosetta (DE3)/pET-40b(+)/Hespintor-Kazal induced with different temperature (24 °C, 27 °C, 30 °C, 33 °C).

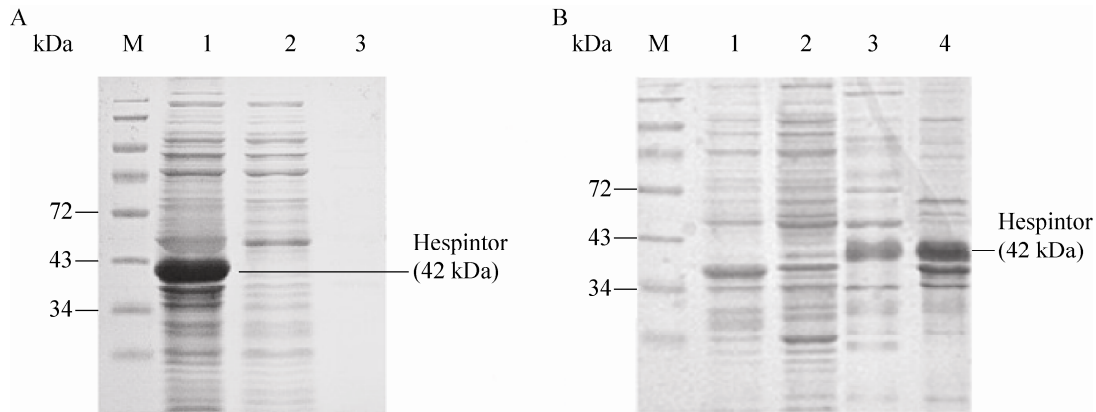


图 4 诱导产物粗提取物的溶解性分析

Fig. 4 Solubility analysis of crude extracts from induced Rosetta(DE3). (A) M: PageRular prestained protein ladder; 1: inclusion body of Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal; 2: periplasm parts of Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal; 3: supernatant of Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal. (B) 1: Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal induced; 2: Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal non-induced; 3: inclusion body of Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal sloved in 8 mol/L urea; 4: inclusion body of Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal.

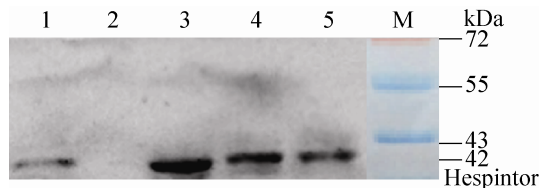


图 5 *Hespintor*-Kazal 重组融合蛋白的 Western blotting 鉴定

Fig. 5 Identification of purified *Hespintor* recombinant protein by Western blotting. M: PageRular prestained protein ladder; 1: Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal non-induced; 2: Rosetta(DE3)/pET-40b(+) induced; 3-5: Rosetta(DE3)/pET-40b(+)/*Hespintor*-Kazal induced with different IPTG concentration (0.25, 0.50, 0.75 mmol/L).

纯化蛋白浓度为 193.678 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即每升诱导表达菌液经超声破碎与 Ni^{2+} 柱及 Q 柱两步纯化后可获得 0.77 mg *Hespintor*-Kazal 重组融合

蛋白。

2.4 *Hespintor*-Kazal 重组融合蛋白的活性鉴定

胰蛋白酶 (Trypsin) 可水解 BAPNA 生成无色的苯甲酰-L-精氨酸和淡茶色的对硝基苯胺，使溶液变成淡茶色。若在此系统中加入过量的胰蛋白酶抑制剂，抑制胰蛋白酶的水解活性，底物不能水解生成对硝基苯胺，溶液仍呈现无色。结果表明，随着蛋白浓度的上升，*Hespintor*-Kazal 重组融合蛋白对胰蛋白酶的抑制率也随之上升，当蛋白含量为 38.74 mg/mL 时，胰蛋白酶的抑制率达到 91.57%。由此可见，*Hespintor*-Kazal 重组融合蛋白对胰蛋白酶具有较高的抑制作用，并且抑制曲线呈剂量依赖关系 (图 8)。

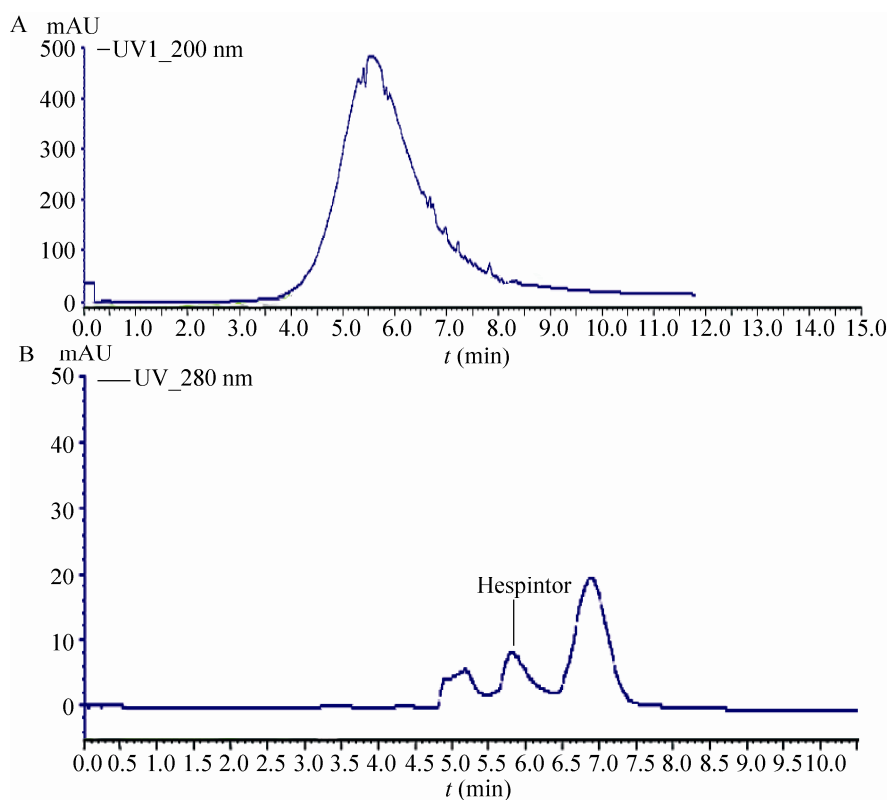


图 6 Ni^{2+} 柱(A)和 Q 柱(B)纯化 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of Hespintor recombinant protein from Ni^{2+} column(A) and Q column(B).

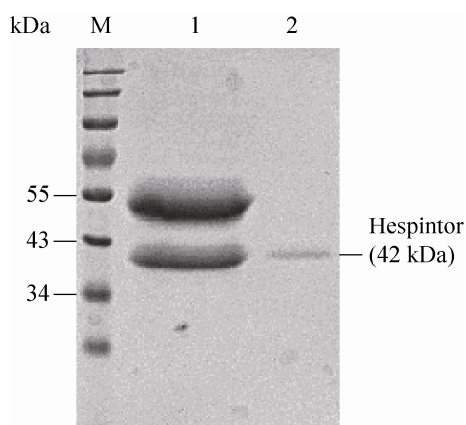


图 7 Ni^{2+} 柱及 Q 柱纯化 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of purified Hespintor recombinant protein from Ni^{2+} column and Q column. M: PageRuler prestained protein ladder; 1: purified Hespintor recombinant protein from Ni^{2+} column; 2: purified Hespintor recombinant protein from Q column.

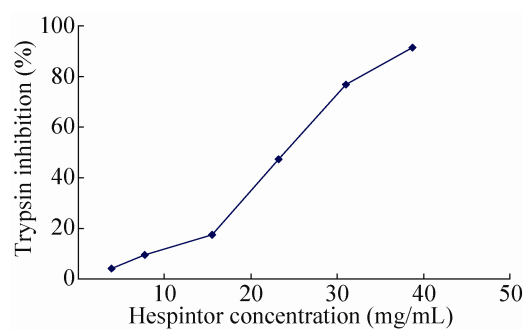


图 8 纯化的 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白对胰蛋白酶活性的抑制作用

Fig. 8 Inhibitory activity of purified Hespintor recombinant protein on trypsin.

3 讨论

已有研究表明, 肿瘤细胞产生的蛋白酶降

解 ECM 及基膜的能力与其侵袭、转移能力密切相关。蛋白酶的活性可由多个层次进行调控^[8-10]，但最直接的方法还是阻断蛋白酶活性。在此级联式反应中，uPA 发挥着关键性作用，被认为是肿瘤局部浸润和/或形成远处转移的限速步骤。尽管可在多个层次上调控蛋白酶活性，但最直接的方法还是阻断蛋白酶活性^[9,11]。因此，干预 uPA 水平或功能可成为治疗肿瘤的一种有效方法。

SERPIN (Serine proteinase inhibitor) 是一类丝氨酸蛋白酶活性调节因子，根据它们的序列特征和三维结构，目前归类为 18 个非同源蛋白质家族，其中以 Kazal 型 SERPIN 抑制 uPA 活性最为直接也最具有临床应用前景^[12-14]。Kazal 型 SERPIN 属于较为保守的家族之一，其成员多为小分子多肽，其中某些成员具有抑制肿瘤细胞增殖和侵袭的活性，从而成为肿瘤治疗的新靶点^[15-19]。蛋白质序列分析表明，Hespintor 具有与食管癌相关基因 2 (Esophageal cancer related gene 2, ECRG2) 高度同源的 serpin 基本结构。由于 ECRG2 具有抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移等作用，因此提示 Hespintor 可能具有同样的抗肿瘤能力^[11, 20-22]。

本研究将 *Hespintor* 连接至原核表达载体 pET-40b(+) 中，采用 IPTG 诱导 Hespintor-Kazal 融合标签蛋白的大量表达。pET-40b(+) 原核表达载体具有两个显著特点：一是含有 T7 启动子，可被宿主细胞提供 T7 RNA 聚合酶识别，T7 RNA 聚合酶的转录效率比大肠杆菌 RNA 聚合酶高 5 倍，能够高效转录 mRNA，并大量表达融合蛋白；二是载体上携带 DsbC-Tag、His-Tag 和 S-Tag，诱导表达的 35 kDa 标签蛋白对目的

蛋白的结构及生物学活性影响很小，特别是分别位于目的蛋白前后的 His-Tag 为进一步纯化蛋白提供了最佳亲和位点，而且两者之间有凝血酶 (Thrombin) 及肠激酶 (Enterokinase) 酶切位点，便于纯化后将标签蛋白切除^[23-24]。诱导条件是影响外源蛋白表达的重要因素，诱导温度、诱导时间和 IPTG 浓度是其中不可缺少的，由于三者之间有相互作用，应采用正交试验来进行优化。结果表明，诱导条件的变化对重组蛋白的表达量无太明显影响。本研究预实验发现，即使将 IPTG 浓度降至 0.1 mmol/L，进行 16 °C 低温诱导，仍未有效增强重组蛋白的可溶性或提高其表达量。由于单因素实验结果差异甚微，因此仅采用最佳单因素条件进行重组蛋白的诱导表达。

在蛋白纯化复性过程中，首先采用 Ni²⁺ 柱进行亲和层析，获得的洗脱曲线为单一峰；之后的 SDS-PAGE 分析出现两条蛋白条带，重组蛋白为 42 kDa 的蛋白条带，另一蛋白条带分子量约为 50 kDa，在纯化前的电泳检测时并未出现。分析认为，该杂蛋白分子量与重组蛋白分子量不成倍数关系，并非重组蛋白的二聚体或多聚体，有可能是进行重组蛋白复性时重新折叠聚集的速度有时过快，导致某些蛋白碎片通过二硫键而随机聚集形成。SDS-PAGE 分析结果表明，Ni²⁺ 柱的上样流穿液中仍含有部分重组蛋白，说明 Ni²⁺ 柱对重组蛋白 His 标签的亲和力未达到饱和，或是重组蛋白本身结构限制了 Ni²⁺ 柱对 His 标签的亲和力^[25-26]。根据上述分析，选择 500 mmol/L 咪唑直接洗脱 Ni²⁺ 柱而非梯度洗脱，以便于后继的蛋白纯化。由于预测重组蛋白的理论等电点 pI 为 7.12，所用缓冲液 pH

8.0, 故选择 Q 柱进行阴离子交换层析, 最终获得产物为单一条带的重组蛋白。

本文成功构建了 Hespintor-Kazal 原核表达体系, 并获得纯化的重组融合蛋白, 之后初步证明其具有预期的生物学活性。下一步将重点围绕 Hespintor-Kazal 重组融合蛋白的纯化复性工艺及其体内外抗肿瘤活性开展研究。

REFERENCES

- [1] Lun YZ, Feng J, Li XY, et al. Gene cloning and sequence analysis of human serine protease inhibitor Hespintor. *Biotechnology*, 2013, 23(1): 1-4 (in Chinese).
伦永志, 冯洁, 李欣悦, 等. 人丝氨酸蛋白酶抑制因子 Hespintor 的基因克隆与序列分析. *生物技术*, 2013, 23(1): 1-4.
- [2] Huang G, Hu Z, Li M, et al. ECRG2 inhibits cancer cell migration, invasion and metastasis through the down-regulation of uPA/plasmin activity. *Carcinogenesis*, 2007, 28(11): 2274-2281.
- [3] Bekes EM, Deryugina EI, Kupriyanova TA, et al. Activation of pro-uPA is critical for initial escape from the primary tumor and hematogenous dissemination of human carcinoma cells. *Neoplasia*, 2011, 13(9): 806-821.
- [4] Legrand C, Polette M, Tournier JM, et al. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res*, 2001, 264(2): 326-336.
- [5] Chi Q, Lun YZ. Kazal type human serine protease inhibitor research status. *Chin J Clin: Electr Ed*, 2010, 4(8): 1331-1333 (in Chinese).
迟庆, 伦永志. Kazal 型人类丝氨酸蛋白酶抑制抑制研究现状. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4(8): 1331-1333.
- [6] Quyang J, Wang JW, Yang XM, et al. Expression, purification and primary activity analysis of recombinant serine protease inhibitor rEa. *J Chin Biot*, 2002, 23(3): 67-71 (in Chinese).
欧阳晶, 王健伟, 杨晓梅, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Ea 的表达纯化与活性分析. *中国生物工程杂志*, 2002, 23(3): 67-71.
- [7] Zhang SG, Zhang ZW, Zhang LF, et al. Cloning and prokaryotic expression of the serine protease inhibitor RCSP12 from the skin of Chinese brown frogs, *Rana chensinensis*. *Acta Hydro Sin*, 2010, 34(3): 629-633 (in Chinese).
张曙光, 张哲文, 张丽芳, 等. 中国林蛙皮肤丝氨酸蛋白酶抑制剂 RCSP12 的基因克隆和原核表达. *水生生物学报*, 2010, 34(3): 629-633.
- [8] Aureli L, Gioia M, Cerbara I, et al. Structural bases for substrate and inhibitor recognition by matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*, 2008, 15(22): 2192-2222.
- [9] Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs. *Methods Mol Biol*, 2010, 622: 471-487.
- [10] Steverding D, Caffrey CR, Sajid M. Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(9): 1025-1032.
- [11] Cheng XL, Lu SX, Gui YP. ECRG2 regulates ECM degradation and uPAR/FPRL1 pathway contributing cell invasion/migration. *Cancer Lett*, 2010, 290(1): 87-95.
- [12] Olson ST, Gettins PG. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 99(1): 185-240.
- [13] Olson ST, Gettins PG. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 99: 185-240.
- [14] Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 1994, 269(23): 15957-15960.
- [15] Pantoja-Uceda D, Arolas JL, Aviles FX, et al. Deciphering the structural basis that guides the oxidative folding of leech-derived tryptase inhibitor. *J Biol Chem*, 2009, 284(51): 35612-35620.

- [16] Wendy WeiJia Soon, Lance David Miller, Michael A Black, et al. Combined genomic and phenotype screening reveals secretory factor SPINK1 as an invasion and survival factor associated with patient prognosis in breast cancer. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(8): 451–464.
- [17] Shigemasa K, Gu LJ, Tanimoto H, et al. Human kallikrein gene 11(klk11) mRNA overexpression is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(8): 2766–2700.
- [18] Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. C 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, fluvastatin, as a novel agent for prophylaxis of renal cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8648–8655.
- [19] Cao D, Zhang Q, Wu LS, et al. Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases. *Mod Pathol*, 2007, 20(5): 570–578.
- [20] Cui Y, Bi M, Su T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel esophageal cancer related gene. *Int J Oncol*, 2010, 37(6): 1521–1528.
- [21] Cheng X, Shen Z, Yin L, et al. ECRG2 regulates cell migration/invasion through urokinase-type plasmin activator receptor (uPAR)/beta1 integrin pathway. *J Biol Chem*, 2009, 284(45): 30897–30906.
- [22] Song H, Song C, Wang H, et al. Suppression of hepatocarcinoma model *in vitro* and *in vivo* by ECRG2 delivery using adenoviral vector. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(12): 875–879.
- [23] Liu ZQ, Yang PC. Construction of pET-32a(+) vector for protein expression and purification. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(12): 651–655.
- [24] Meng E, Cai TF, Li WY, et al. Functional expression of spider neurotoxic peptide huwentoxin-I in *E. coli*. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21608.
- [25] Jin Q, Yang LX, Jiao HM, et al. Purification, gene cloning and expression of an acidic phospholipase A2 from *Agkistrodon shedaoensis* Zhao. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36(1): 27–32.
- [26] Li J, Wu R, Chen H, et al. The Cloning and Characterization of the Enolase2 gene of *Gekko japonicus* and its polyclonal antibody preparation. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(5): 8787–8800.

(本文责编 郝丽芳)