

人芳香基硫酸酯酶(HSulf-1)基因的原核表达及酶活初步研究

马会彦^{1a}, 陈 钊², 李 杰², 莫敏俐², 谢国良^{1b}, 盛 清^{1a}

(1. 浙江理工大学生命科学学院, a. 生物化学研究所, b. 新元医学与生物技术研究, 杭州 310018; 2. 清华大学生命科学学院分子酶学实验室, 北京 100084)

摘 要: 人芳香基硫酸酯酶(HSulf-1)是一类分泌型蛋白,能在中性条件下改变硫酸肝素蛋白聚糖(HSPGs)的硫酸化状态,从而影响多种信号分子与其相应受体的结合,进而影响细胞信号通路。鉴于 HSulf-1 具有重要的潜在应用价值,为获得大量纯化蛋白以探索其功能与应用,文章将 HSulf-1 功能域基因片段与 pGEX-6p-1 表达载体连接构建成重组质粒,在原核表达系统 BL21 中表达、分离纯化了 HSulf-1 的功能域片段,并以 4-Mus 为底物用荧光光度法进行了酶活性的测定。结果表明,原核表达能得到电泳纯度的 HSulf-1 纯化蛋白,但其具有酶活性的条件需要进一步探索。

关键词: 芳香基硫酸酯酶; HSulf-1; 原核表达; 酶活性

中图分类号: Q789

文献标识码: A

0 引 言

细胞外间质(Extracellular Matrix, ECM)是由细胞分泌的多种蛋白和多糖等所构成的复杂网络结构,它们不仅支持组织细胞的框架,其结构和成分的变化往往通过改变细胞的微环境、影响多种信号通路,从而对细胞的形态、生长、分裂、分化和凋亡起重要的调控作用^[1-2]。细胞外间质中存在一种重要成分——糖胺聚糖(Glycoaminoglycans, GAGs),它通过与特殊的核心蛋白(core protein)连接形成蛋白聚糖(proteoglycans, PG)被铆定在细胞膜上。糖胺聚糖是调节信号转导通路中信号分子配体与其相应受体结合过程的重要成分,在哺乳动物全身组织中广泛存在,对于细胞外微环境的水分、阳离子分布以及多种细胞外信号分子具有重要的调节作用^[3]。

硫酸肝素蛋白聚糖(Heparan Sulfate Proteoglycans, HSPGs)是细胞外间质中的一种重要的蛋白聚糖,它与成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor, FGF)和 Wnt(Wingless and int)等信号通路有关,可能通过在胞外隔离或聚集配体来调节信号通路活性^[4]。HSPGs 从高尔基体分泌出来以后,就会被分泌到细胞表面和细胞外基质中。在胞外, HSPGs 上硫酸肝素(HS)链的高硫酸化位点区(S-domains)的密度和分布影响 HSPGs 与各种配体的亲和力,然而一旦分泌到细胞表面或细胞基质中, HSPGs 结合配体亲和力的主要调节者就是胞外硫酸酯酶(Sulfatase, Sulf),它通过对 HS 链上高度硫酸化区域内的 6-O-氨基葡萄糖硫酸酯键的水解来完成这种调节作用^[5]。

在体内目前已经发现 17 种硫酸酯酶,其中大部分存在于溶酶体,一部分存在于细胞膜或细胞器膜上。

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770475); 国家 863 重点项目(2007AA021703); 浙江省自然科学基金面上项目(Y3090228)

作者简介: 马会彦(1982—),男,山东济宁人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。

通讯作者: 盛 清,电子邮箱: csheng@zstu.edu.cn

目前研究发现只有 2 种硫酸酯酶存在于细胞外,这两种酶分别称为硫酸酯酶 1 型(Sulf-1)和硫酸酯酶 2 型(Sulf-2)^[6]。各种硫酸酯酶之间的区别在于水解的硫酸酯键在所作用的大分子中的位置不同,Sulf-1 和 Sulf-2 都是特异性的水解 HS 链上的 6-O-氨基葡萄糖硫酸酯键。研究表明,HS 链中 6-O-氨基葡萄糖的硫酸化对其与多种生长因子的结合,或作为某些信号分子的共受体是必需的,而 Sulf-1 和 Sulf-2 正是细胞外仅有的能够水解 HS 链上 6-O-氨基葡萄糖硫酸酯键的酶^[7]。2001 年,Dhoot 等^[5]和 Ai X 等^[8]在研究鹌鹑胚胎发育时发现了一种细胞外的芳香基硫酸酯酶并命名为 QSulf-1,它能够在中性条件下水解 HSPGs 中的 6-O-氨基葡萄糖硫酸酯键,降低 HSPGs 的硫酸化,从而降低 Wnt 与 HSPGs 的亲合力,使得 Wnt 分子与其受体结合从而激活其信号通路、调节胚胎生成。2002 年,人的 Sulf-1 cDNA 被克隆并表达,该基因被命名为 HSulf-1^[9]。在体外实验中,HSulf-1 能够促进药物诱导的癌细胞凋亡,越来越多体内实验也表明 HSulf-1 能够抑制肿瘤发生和血管生成,稳定表达 HSulf-1 的癌细胞植入小鼠体内形成肿瘤的大小要远小于对照组^[10]。HSulf-1 可以显著地促进肿瘤细胞外基质的沉积,从而减弱生长因子的信号通路,抑制肿瘤的生长^[11]。HSulf-1 还可以促进组蛋白 H4 的乙酰化,增强组蛋白去乙酰化酶抑制剂的作用,抑制肝癌发生、发展^[12]。

HSulf-1 开放阅读框(ORF 框)长 2 616 bp,编码 871 个氨基酸残基。HSulf-1 氨基酸序列大体上可分为四段:信号肽(23 AA),硫酸酯酶结构域(373 AA)、亲水结构域(346 AA)和 C 端结构域(109 AA)^[13]。也有其他文献^[9]报道 HSulf-1 的结构域大概可分为三部分,硫酸酯酶结构域 SD(42-414 AA),亲水结构域 HD(415-725AA)和 C 端结构域(737-871AA)。

鉴于 HSulf-1 的诸多功能和潜在的应用价值,近些年 HSulf-1 得到了深入研究,但这些研究集中在 HSulf-1 的功能方面的探索和癌细胞中表达情况的检测方面,很少有研究对 HSulf-1 在癌细胞中的活性做过测定,至今还没有 HSulf-1 的原核表达和表达产物酶活性测定等方面的报道。鉴于此,笔者根据相关文献报道的功能域构建了 HSulf-1 的功能域片段 H20-478(HSulf-1 一级结构中第 20-478 个氨基酸残基对应序列)和 H28-478(HSulf-1 一级结构中第 28-478 个氨基酸残基对应序列),进行了原核表达并使用 4-Mus 为底物测定了 HSulf-1 功能域片段的酶活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

稳定表达 HSulf-1 的胃癌 MNK28 细胞系,表达载体 pGEX-6p-1,大肠杆菌 DH5 α ,表达宿主大肠杆菌 BL21 均由清华大学分子酶学实验室提供;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho*I,逆转录酶 M-MLV(目录号:D2639A)购自 TaKaRa 公司;Ligation High 连接酶购自 TOYOBO 公司;引物合成由生工生物工程(上海)有限公司完成;测序由 Invitrogen 公司完成;4-Mus 购自 Sigma 公司;Pfu DNA 聚合酶(目录号:EP101)购自北京天根生化科技(北京)有限公司;其他化学试剂为化学纯,购自北京现代化工有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 扩增目的基因片段

使用天根生化科技(北京)有限公司的总 RNA 提取试剂盒(目录号:DP405)提取稳定表达 HSulf-1 的 MNK28 细胞的总 RNA,使用 TaKaRa 公司的 M-MLV 逆转录第一链 cDNA,然后使用 Pfu 聚合酶扩增目的基因片段。所有操作均按相应的使用说明书完成。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 30 s;58℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 160 s;反应进行 30 个循环,72℃ 继续延伸 10 min。

1.2.2 重组质粒的构建

将上述 PCR 产物与 pGEX-6p-1 载体分别用 TaKaRa 公司的 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切,反应条件 37℃,2 h。然后使用天根生化的普通琼脂糖凝胶回收试剂盒(目录号:DP209)回收酶切产物,使用 TOYOBO 的连接酶连接 PCR 酶切产物片段与载体,42℃ 热激,转化大肠杆菌 DH5 α 。37℃ 倒置培养后挑取单克隆,液体培养基中培养后提取质粒进行双酶切鉴定并进行测序鉴定。测序由 Invitrogen 测序公司完成。鉴定正确的质粒转化表达宿主大肠杆菌 BL21,进行诱导表达。

1. 2. 3 目的基因的诱导表达与表达产物的分离纯化

从平板上挑取单克隆接入含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$,220 r/min 振荡培养过夜。然后按 1 : 100 的比例稀释至 500 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.6 左右,随后降低温度至 16 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 1 h,然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mM,振荡培养 24 h 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h。按 1 L 培养基加入 20 mL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的裂解液,将菌体悬起,倒入置于冰浴中的烧杯中,并加磁搅拌子搅拌。加入溶菌酶,使其终浓度达到 0.5 mg/mL,再加入终浓度为 1 mM 的 PMSF 蛋白酶抑制剂。超声波破碎仪破碎菌体 30 min,每次超声时间为 5 min,间隔 5 min。超声功率为 80 W,周期为 0.5 s。11 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,离心后取上清,并用 0.22 μm 滤膜过滤上清,将滤液同 GE 公司的 GST 柱材(Glutathione-Sepharose beads)混合,冰浴下摇晃混合至少 3 h。将上述含柱材的混和液分批加入层析柱内,待柱内液体全部流出后,进行清洗,使用 PPase(PreScission protease,清华大学分子酶学实验室制备保存)酶切融合标签得到目的蛋白。

1. 2. 4 HSulf-1 功能域片段酶活性测定

首先使用 TransGen 公司蛋白定量试剂盒(目录号:DQ101-01)测定蛋白质浓度;取出适量体积(含 100 μg 目的蛋白的体积)蛋白到 1.5 mL EP 管中;添加 4-Mus(pH5.4)与 0.1 M 醋酸铅至终浓度为 10 mM,补加 ddH₂O 至总体积为 200 μL ;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后添加 1 mL 0.5 M Na₂CO₃/NaHCO₃(pH 10.7)终止反应;采用荧光分光光度计 Hitachi 2500 λ 以 360 nm 作为激发光,监测波长采用 350~600 nm,激发光狭缝 5 nm,发射光狭缝 10 nm,光电倍增管电压 400 V,扫描速度为 300 nm/min 扫描发射荧光。以发射波波长为横坐标,荧光强度为纵坐标作图。

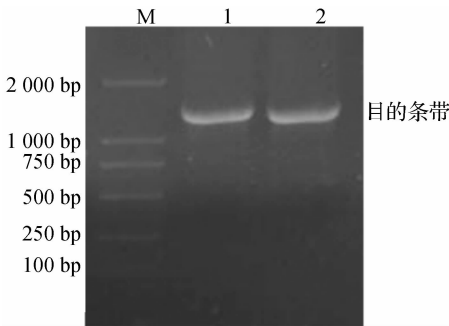
2 结 果

2.1 PCR 扩增出目的基因片段

在提取培养细胞总 RNA 后,进行逆转录得到第一链 cDNA,然后分别使用设计好的引物进行 PCR 扩增目的片段,H20-478(引物序列为:5-GTAC[GGATCC]AGCCTCTGTTTCGACTGTCAG-3';5'-GTCG[CTCGAG]TCCTTTACACTTGTGAATTCAAG-3'。方框中分别为 *Bam*H I 和 *Xho*I 识别序列)和 H28-478(引物序列为:5'-GTAC[GGATCC]AGCCTCTGTTTCGACTGTCAG-3';5'-GTCG[CTCGAG]TCCTTTACACTTGTGAATTCAAG-3'。方框中分别为 *Bam*H I 和 *Xho*I 识别序列)。如图 1 所示,使用材料与方法中所述的条件,有效获得了目的基因扩增产物。

2.2 重组质粒的验证

由于在引物中加入了载体 pGEX-6p-1 多克隆位点所具有的 *Bam*H I 和 *Xho*I 酶切位点,分别对 PCR 扩增产物和载体进行 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切,回收后使用 Ligation High 连接酶连接目的片段与载体得到重组质粒,模式图如图 2。



M: DNA Marker, 1: H20-478PCR 产物, 1 395 bp; 2: H28-478PCR 产物, 1 371 bp

图 1 PCR 扩增目的基因片段的电泳鉴定

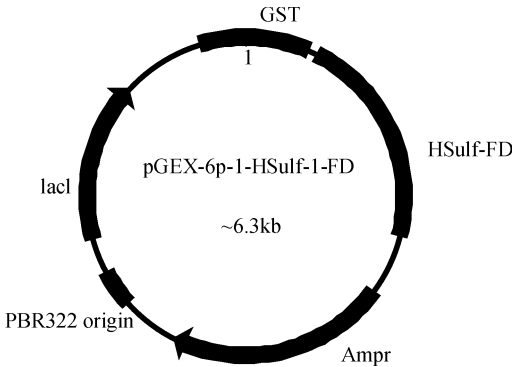


图 2 重组质粒模式图

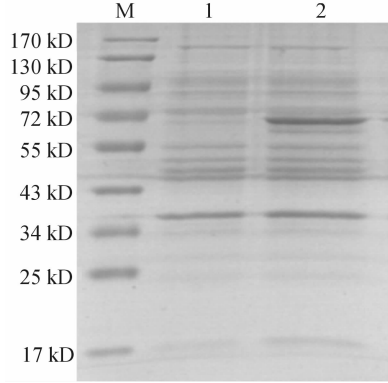
为了验证重组质粒的正确性,提取质粒后进行双酶切,电泳鉴定(图 3),将鉴定正确的质粒所对应的菌液送 Invitrogen 公司,采用 pGEX-6p-1 通用引物测序。经验证获得构建正确的重组质粒:pGEX-6p-1-H20-478;pGEX-6p-1-H28-478。

2.3 目的基因的诱导表达与分离纯化

在验证重组质粒的正确性后,转化大肠杆菌 BL21,工程菌中培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.6 左右时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mM,为了减少包涵体的形成,采用 16℃ 摇床培养 24 h。

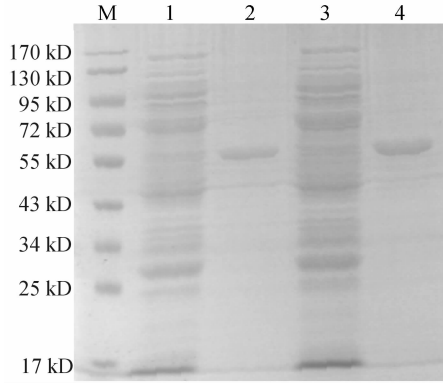
在蛋白纯化过程中,为了维持蛋白可能具有的活性,所有操作均在 4℃ 环境下完成。如图 4 所示,对照诱导前后的 SDS-PAGE 图谱,可以清晰地发现诱导剂起到了很好的诱导效果,转化后的菌株得到了有效诱导,表达了外源目的蛋白。

图 5 所示为收集菌体破碎后取上清,进行融合蛋白的纯化,泳道 1、3 分别为 H20-478 和 H28-478 菌液破碎上清液,泳道 2、4 分别为纯化后蛋白。融合蛋白经 GST 柱纯化,得到了电泳纯的目的蛋白,为后续酶活测定提供了物质基础。



M:Protein Marker;1:H20-478 诱导前;
2:H20-478 诱导后

图 4 H20-478 诱导前后对照

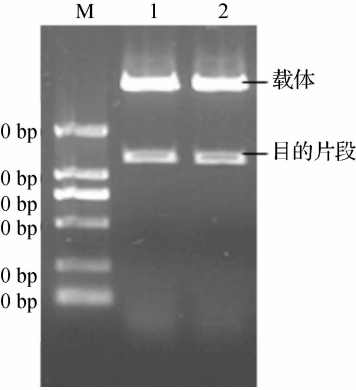


M:Protein Marker;1:H20-478 上清;2:H20-478 纯化后;
3:H28-478 上清;4:H28-478 纯化后

图 5 融合蛋白分离纯化

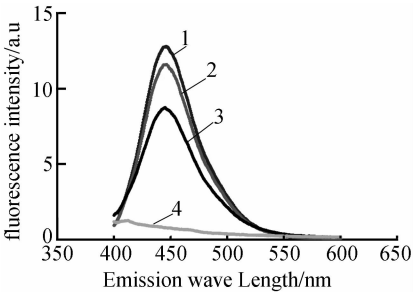
2.4 HSulf-1 功能域片段酶活性测定

由于 HSulf-1 能使 4-Mus 底物转化为 4-Mu,后者可在 360 nm 激发的激发下产生荧光,峰位在 460 nm 处,本方法灵敏、简便、可操作性强,被用作标准方法^[9,14-15]。在固定激发光为 360 nm 后,扫描 350~600 nm 处的发射光光强度,由于发射光光强度与生成物量呈正相关,所以可以间接地了解 HSulf-1 功能域片段的酶活性。使用溶解蛋白的 Tris-HCl 作为空白对照,4-Mus 作为底物本底对照,测定了 H20-478 和 H28-478 纯化蛋白的酶活性,发现相对于 4-Mus 底物本底对照,这两种蛋白的实验组均没有发射高强度的荧光,表明没有预期的活性(图 6)。这可能是由于 HSulf-1 行使功能要经过糖基化等修饰^[9],而在大肠杆菌中表达的蛋白,则没有经过糖基化修饰,故不具有酶的功能。



M:DNA Marker,1:H20-478 片段,2:H28-478 片段

图 3 重组质粒的双酶切电泳鉴定



1. 4-Mus, 2. H28-478, 3. H20-478, 4. Tris-HCl

图 6 HSulf-1 酶活性测定

3 讨论

原核表达系统是最早被采用进行研究的表达系统,也是目前掌握最为成熟的表达系统,能较为方便地通过诱导纯化获得所需的蛋白,其优点在于能够在较短时间内获得基因表达产物,而且所需的成本相对较低廉^[16]。但与此同时原核表达系统还存在许多难以克服的缺点,如无法对表达时间及表达水平进行调

控,有些基因的持续表达可能会对宿主细胞产生毒害作用,过量表达可能导致非生理反应,目的蛋白常以包涵体形式表达,导致产物纯化困难等;而且原核表达系统翻译后加工修饰体系不完善,表达产物的生物活性可能会比较低。为了减少包涵体形成的可能,本研究选用 16℃ 为培养条件;为了增加纯化的便利,我们选用 pGEX-6p-1 为表达载体,使目的蛋白在 N 端融合了 GST 表达标签,为后续蛋白的纯化提供了便利^[17];为了减少融合标签可能造成的酶活力影响,在纯化后期从纯化柱洗脱蛋白时,使用了清华大学分子酶学实验室制备的 PPase 酶切融合蛋白,选择性去除了 GST 融合标签。

原核表达产物纯化后,进行酶活性测定,发现目的蛋白没有预期的酶活性。这可能是由于原核表达的 HSulf-1 功能域片段没有经过糖基化、半胱氨酸修饰等,而这些翻译后修饰可能为 HSulf-1 行使功能所必备的。Tang 等报道,HSulf-1 合成后,经类 furin 蛋白酶水解,切成 N 端 75 kD 和 C 端约 50 kD 的两个肽段,由二硫键连接形成二聚体分泌到胞外,然而不经酶切的 Sulf-1 也具有酶活性,却不能促进 Wnt 信号通路;虽然催化结构域在 N 端,但是 C 端结构对其芳香基硫酸酯酶和内切硫酸酯酶的活性也是必需的^[18]。本研究在构建重组质粒时去除了信号肽,疏水区等功能域,仅保留了其催化功能域,这也可能是导致原核表达产物不具有酶活性的一个重要原因。

本文构建了含人芳香基硫酸酯酶(HSulf-1)功能域基因片段的重组质粒,分离纯化了原核表达蛋白并进行了酶活性的测定,为今后开展 HSulf-1 的功能研究进行了初步探索。体外表达的 HSulf-1 具有酶活性的条件,尚需要进行进一步探索,可通过重组构建不同的突变体,选择适当的表达系统,比如酵母表达系统、昆虫细胞杆状病毒表达系统甚至哺乳动物表达系统等多种途径进行探索,以探明 HSulf-1 具有功能的决定因素和作用机制。

参考文献:

- [1] Bissell M J, Kenny P A, Radisky D C. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005, 70: 343-356.
- [2] Pupa S M, Menard S, Forti S, et al. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression [J]. J Cell Physiol, 2002, 192(3): 259-267.
- [3] Bulow H E, Hobert O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 375-407.
- [4] Lai J P, Chien J, Strome S E, et al. Hsulf-1 modulates Hgf-mediated tumor cell invasion and signaling in head and neck squamous carcinoma[J]. Oncogene, 2004, 23(7): 1439-1447.
- [5] Dhoot G K, Gustafsson M K, Ai X B, et al. Regulation of wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase[J]. Science, 2001, 293(5535): 1663-1666.
- [6] Buono M, Cosma M P. Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(5): 769-780.
- [7] Lamanna W C, Kalus I, Padva M, et al. The heparanome—the enigma of encoding and decoding Heparan sulfate sulfation [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129(2): 290-307.
- [8] Ai X, Do A T, Lozynska O, et al. Qsulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface Heparan sulfate proteoglycans to promote wnt signaling[J]. J Cell Biol, 2003, 162(2): 341-351.
- [9] Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, et al. Cloning and characterization of two extracellular Heparin-degrading endosulfatases in mice and humans[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49175-49185.
- [10] Lai J P, Chien J R, Moser D R, et al. Hsulf1 sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 231-248.
- [11] Dai Y, Yang Y, MacLeod V, et al. Hsulf-1 and Hsulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo[J]. J Biol Chem, 2005, 280(48): 40066-40073.
- [12] Lai J P, Yu C R, Moser C D, et al. Sulf1 inhibits tumor growth and potentiates the effects of histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2006, 130(7): 2130-2144.
- [13] Frese M A, Milz F, Dick M, et al. Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity Heparin/Heparan

sulfate interaction domain[J]. J Biol Chem, 2009, 284(41): 28033-28044.

- [14] Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Rosen S D. Measuring the activities of the sulfs: two novel Heparin/Heparan sulfate endosulfatases[J]. Methods Enzymol, 2006, 416: 243-253.
- [15] Lai J, Chien J, Staub J, et al. Loss of Hsulf-1 up-regulates Heparin-binding growth factor signaling in cancer[J]. J Biol Chem, 2003, 278(25): 23107-23117.
- [16] Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia Coli[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(5): 411-421.
- [17] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60: 523-533.
- [18] Tang R H, Rosen S D. Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(32): 21505-21514.

Prokaryotic Expression and Enzyme Activity Measurement of the Human Arylsulfatase(HSulf-1)

MA Hui-yan^{1a}, CHEN Zhao², LI Jie², MO Min-li², XIE Guo-liang^{1b}, SHENG Qing^{1a}

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, a. Biochemistry Institute,
b. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Hangzhou 310018, China; 2. Molecular
Enzymology Laboratory, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The Human arylsulfatase(HSulf-1), which can alter the sulfation state of Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs) in the neutral condition, is a secreted protein. The shift of sulfation state of Heparan Sulfate Proteoglycans has the affection on the combination of the signaling molecule and its receptor thereby has regulated the signaling pathway. Given the potential values of HSulf-1's application, in order to gain sufficient protein to develop its function and application research, the functional fragment of HSulf-1 is constructed into expression vector, pGEX-6p-1 to form a recombinant plasmid. Expression, isolation, and purification of the fragment of functional domain of Hsulf-1 in the prokaryotic expression system are performed. Then, the enzyme activity of prokaryotic expression product is measured by the method of fluorospectrophotometry using the 4-Mus as substrate. The data suggest that the purified protein can be obtained through the prokaryotic expression system but have no enzyme activity.

Key words: arylsulfatase; HSulf-1; prokaryotic expression; enzyme activity

(责任编辑: 许惠儿)