

# 人源血管紧张素转化酶-N 结构域基因片段在毕赤酵母中的表达

徐 辉, 徐 珏, 陈成集, 丁 明, 许传莲

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 利用 RT-PCR 方法从食管癌细胞 TE-1 中反转出 cDNA, PCR 扩增得到血管紧张素转化酶 N 结构域 (ACE-N) 基因片段, 构建 pPIC9K-ACE-N 表达载体, 转化毕赤酵母 GS115, 阳性克隆再次电转, 并从转化菌株中筛选出多拷贝转化子进行表达。经  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱对表达的蛋白进行纯化, 获得的目的蛋白表达量为 0.11 g/L, 其纯度大于 99%。为今后选择性抑制血管紧张素转化酶两个同源结构域的体外研究奠定基础。

**关键词:** 血管紧张素转化酶-N 结构域; RT-PCR; 毕赤酵母

**中图分类号:** Q78      **文献标识码:** A

## 0 引 言

血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE), 按系统命名法命名为肽酰二肽水解酶, 是一种哺乳动物组织中普遍存在的含锌离子的膜结合外肽酶<sup>[1-3]</sup>, 能够通过肾素-血管紧张素系统和激肽释放酶-激肽系统, 催化血管紧张素 I 水解生成具有收缩血管的血管紧张素 II (Ang II) 或水解具有血管扩张功能的缓激肽生成苯丙-精二肽<sup>[4]</sup>。

研究发现, ACE 的 N 结构域和 C 结构域都有一个锌依赖性的活性中心, 两个结构域之间有 357 个氨基酸残基相同, 占氨基酸残基总数的 60%。尽管如此, 两个同源结构域蛋白却有各自独特的化学性质和生物学功能。首先, N 端结构域比 C 端结构域更加稳定<sup>[5]</sup>, 在蛋白变性后, 更不易被蛋白水解酶水解<sup>[6]</sup>。其次, 由于 N 端结构域只含有一个氯离子结合位点, 而 C 端结构域有两个氯离子结合位点, 所以 ACE-N 结构域的催化活性与 ACE-C 结构域相比, 达到最大活性所需的氯离子浓度更低, 但催化活性相对较低<sup>[7]</sup>, 并且 N 结构域主要参与缓激肽的水解。

目前, ACEI(angiotensin-converting enzyme inhibitors) 药物如卡托普利、依那普利、赖诺普利已经成为临床治疗急性心肌梗死和心力衰竭的标准药物<sup>[8]</sup>。然而长期使用 ACEI 药物会出现咳嗽、肾功能减退、蛋白尿、高血钾症、低血压、肝功能异常、味觉和肠胃功能紊乱、皮疹、血管神经性水肿等不良反应<sup>[9]</sup>。这极可能与当前的 ACEI 的设计均以全长序列 ACE 为靶蛋白有关, 这种相对非选择性的 ACEI 在抑制 Ang II 生成的同时也抑制了缓激肽的降解, 从而产生了咳嗽、肾功能不全等副作用。Sebastien Fuchs 等<sup>[10]</sup>利用定点突变技术, 获得 3 种 ACE 功能团缺失型老鼠, 他们发现, 仅保留 ACE-C 或 ACE-N 的活性的老鼠与正常老鼠一样, 血压等生理功能正常, 而 ACE 完全失活的老鼠出现了血管壁变厚, 肾功能衰退等病变。

本研究通过 NCBI 搜索到人源 ACE 基因, 选择 N 端长为 1 071 bp 的保守序列作为目的片段, 首创将 ACE-N 基因片段整合到毕赤酵母 GS115 表达菌株中, 利用毕赤酵母 GS115 真核表达系统, 获得高表达、高纯度的人源 ACE-N 目的蛋白。为今后 ACE-N 蛋白的功能及生物活性研究和选择性抑制两个同源结构域的体外实验奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 基因、菌株与试剂

*Pichia pastoris* 菌株 GS115、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、pPIC9K 质粒为本实验室保存,食管癌细胞 TE-1 由本实验室培养。Trizol 试剂、RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司,*EcoR* I、*Not* I 和 *Sac* I 限制性内切酶,T4 DNA 连接酶,primer star DNA 聚合酶,蛋白分子量标准为 TaKaRa 公司产品。普通质粒小提试剂盒、DNA 分子量标准 (Marker III, D15000) 为上海天根生物工程有限公司产品。胶回收试剂盒购自博大泰克。酵母提取物 (yeast extract), 蛋白胨 (bacteriological) 购自 Oxoid 公司。YNB 购自 Amresco 公司。生物素 Biotin 为 BBI 公司产品。层析介质 Ni<sup>2+</sup> Sepharose High Performance 购自 Amersham 公司。DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

#### 1.1.2 PCR 引物

根据 NCBI 发表的序列,以及本实验需要设计合成所需引物,所有引物均由上海英骏生物技术有限公司完成。

5'端引物 Primer1:

5'-GGGGAATTCCATCATCATCATCATTGGCGCTCCTGGTACAAC-3' (下划线为保护碱基;波浪线为 *EcoR* I 酶切位点;加粗部分为 6 个 His 标签);

3'端引物 Primer2:

5'-GGGCGGCCGCTTACTCCTGC CAGGGCCTG-3' (下划线为保护碱基;波浪线为 *Not* I 酶切位点;加粗部分为终止密码子)。

#### 1.1.3 培养基

活化培养基: YPD (1% 酵母抽提物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖); 生长培养基: BMGY (1% 酵母抽提物, 2% 甘油, 2% 蛋白胨, 1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 13.4% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % 生物素); 表达培养基: BMMY (1% 酵母抽提物, 1.5% 甲醇, 2% 蛋白胨, 1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 13.4% YNB, 4 $\times 10^{-5}$ % 生物素)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RT-PCR 获得 TE-1 细胞的 cDNA

将培养的食管癌细胞 TE-1 按照 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA 作为逆转录模板。用 Invitrogen 公司的逆转录试剂盒将提取出的总 RNA 逆转录成 cDNA。

#### 1.2.2 pPIC9K-ACE-N 载体的构建

以 TE-1 细胞的 cDNA 为模板, Primer1 和 Primer 2 为上下游引物扩增 ACE 的 N 结构域基因, 扩增条件为: 98 $^{\circ}$ C 热变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物鉴定后回收纯化; 用 *EcoR* I、*Not* I 双酶切 pPIC9K 质粒和 ACE-N DNA 片段, 对双酶切产物进行产物回收和纯化。利用 T4 DNA 连接酶, 将 ACE-N 目的片段与 pPIC9K 载体进行连接, 并将连接产物转化 DH5 $\alpha$ 。提取阳性转化子的重组质粒 pPIC9K-ACE-N, 作酶切鉴定。

#### 1.2.3 重组质粒电击转化毕赤酵母菌株 GS115

限制性内切酶 *Sac* I 将测序鉴定正确的高浓度重组质粒线性化, 与电转化感受态细胞 GS115 混合转入 0.2 cm 电转杯, 电击 4 s 左右, 参数为: 电压 1 500 V; 电容 25  $\mu$ F; 电阻 200  $\Omega$ 。电击后, 经孵育, 涂覆于 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d, 至单克隆转化子出现, 挑取菌落进行 PCR 鉴定。

#### 1.2.4 高抗性转化子的筛选

PCR 鉴定后, 将转化成功的单克隆接种扩大培养, 并将这些阳性菌落制备成电转感受态细胞, 进行 2 次电转, 刮下 MD 板上生长的菌落分别涂覆于含抗生素 G418 3 mg/mL 的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d, 筛选抗性强的转化子。

#### 1.2.5 重组质粒在毕赤酵母 GS115 中的表达及目的蛋白分离

含 3 mg/mL G418 的 YPD 平板上挑取单克隆接种于 25 mL BMGY 培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 1 d 至 OD<sub>600</sub> = 2~6。4 $^{\circ}$ C, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 重新悬浮于 200 mL BMMY 培养基, 26 $^{\circ}$ C 培养 36 h。甲醇诱导表达的 ACE-N 结构域蛋白分泌到毕赤酵母胞外, 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清。0 $^{\circ}$ C 条件下, 向

上清液缓慢加入硫酸铵,至溶液饱和度为80%。4℃,8 000 r/min离心15 min,收集沉淀。

### 1.2.6 表达蛋白的纯化及浓度测定

将硫酸铵沉淀获得的样品用pH8.0的磷酸缓冲液溶解,4℃,12 000 r/min,离心10 min,收集上清,去除不溶性杂质。处理后的上清以3 cm/min的线速度加入Ni<sup>2+</sup>-NTA层析柱。首先用上样缓冲液洗涤,去除色素和杂蛋白;然后用含20 mmol/L、40 mmol/L咪唑的洗涤缓冲液(pH7.0磷酸缓冲液)分步洗涤,收集蛋白。最后用含200 mmol/L咪唑的洗脱缓冲液洗脱。12% SDS-PAGE、Western blotting鉴定蛋白质,Bradford法测定蛋白浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 TE-1 细胞总 RNA 琼脂糖电泳检测

提取的TE-1食管癌细胞总RNA通过1%琼脂糖凝胶电泳,检测提取效果,鉴定结果见图1。电泳结果可见3条清晰的亮带,分别为28S和18S rRNA两条主带,还有一条5S条带,说明提取的mRNA纯度较高,无明显降解。

### 2.2 ACE-N 目的基因琼脂糖电泳检测

以PCR的方法,利用Primer1和Primer2为上下游引物,TE-1的cDNA为模板扩增ACE-N结构域基因。目的基因的PCR产物在经过1%的琼脂糖凝胶电泳分离,鉴定结果见图2。电泳结果显示,PCR产物只有一条特异性条带,条带在1 100 bp左右,且NCBI上发表的人源ACE-N基因大小为1 071 bp,PCR产物大小与理论值相符合。

### 2.3 pPIC9K-ACE-NA 载体的构建与鉴定

重组质粒抽提,用Primer1/Primer2引物进行PCR扩增,得到约1.1 kb的片段(见图3),与目的基因大小(1 071 bp)相符,重组质粒用限制性内切酶EcoR I和Not I进行双酶切,出现约10 kb和1.1 kb片段,与载体(9.3 kb)和目的基因(1 071 bp)条带大小相符,说明表达载体构建成功。重组质粒的测序结果(测序图略)也与NCBI的DNA库中查得的序列一致。

### 2.4 毕赤酵母重组子的鉴定和筛选

毕赤酵母GS115为His<sup>-</sup>菌株,不能合成组氨酸,因此只有含HIS4基因的重组质粒整合进入GS115后,与宿主进行互补,才能在不含组氨酸的培养基MD板上生长。Sac I线性化后的重组质粒转化GS115后,产生His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>重组子,挑取单克隆用Primer1和Primer2引物进行PCR(图4)可见一条目的基因片段约1.1 kb。为了增加目的基因在酵母基因组中的拷贝数,提高表达量,对阳性重组子进行了2次电转,并用高浓度G418筛选高拷贝数转化子,最终获得能抗G418 3 mg/mL的酵母转化子。

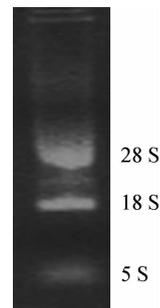
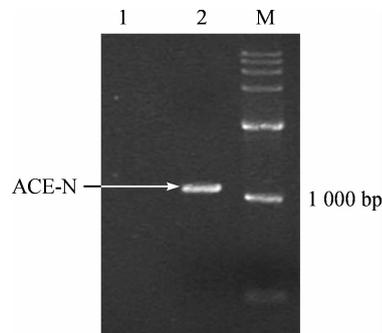
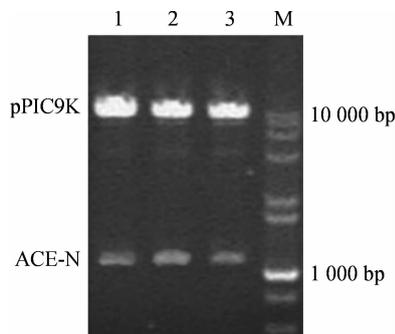


图1 TE-1细胞总RNA凝胶电泳检测

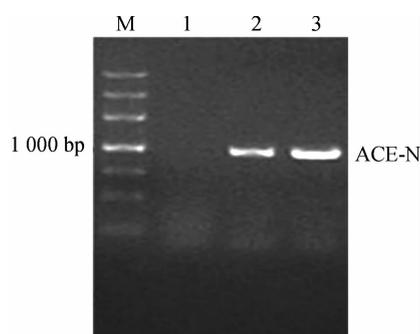


1. 阴性对照;2. ACE-N PCR产物;M. Marker III  
图2 目的基因ACE-N的PCR产物凝胶电泳检测结果



1~3. pPIC9K-ACE-N 3个重组质粒EcoR I/Not I酶切;M. 15 000 Marker

图3 pPIC9K-ACE-N重组质粒双酶切鉴定结果



1. 阴性对照;2~3. 重组GS115 PCR;M. Marker III

图4 毕赤酵母重组子的PCR鉴定结果

## 2.5 ACE-N 结构域蛋白的诱导表达纯化和鉴定

表达上清液经  $\text{Ni}^{2+}$  亲和柱一步纯化后,分别用结合缓冲液,20 mmol/L 咪唑,40 mmol/L 咪唑洗脱获得高纯度的目的蛋白,分子量约为 44.3 kD (图 5)。电泳结果同时显示,蛋白在表达菌株的表达量很高,在纯化过程中由于  $\text{Ni}^{2+}$  亲和柱饱和,使得部分目的蛋白在洗杂蛋白的过程中即被洗脱,但是主要还是在洗目的蛋白时脱落下来。纯化结束后,得到目的蛋白 20 mL,根据 Bradford 法测得蛋白浓度为 1.1 g/L。对收集到的目的蛋白进行 Western blotting 鉴定(图 6),在 44 kD 附近有明显条带,与 ACE-N 蛋白大小一致。

## 3 讨论

Crackower 等<sup>[11]</sup>指出,现在使用的 ACEI 是在没有充分了解人类 ACE 酶的结构的情况下研制的。所以传统的 ACEI 能够抑制强效的血管收缩物质血管紧张素的生成,同时也抑制了缓激肽的降解。浓度升高的缓激肽虽然起到了舒张血管的作用,但也会引起干咳等不良反应。在对 ACE 的两个结构域的研究中发现,针对 ACE-C 结构域的抑制剂可以抑制血管紧张素 II 的生成,但又不能完全抑制缓激肽的降解,有望减轻药物带来的副作用。

本研究首次利用毕赤酵母 GS115 表达系统,成功表达了 ACE-N 结构域蛋白。毕赤酵母 GS115 真核表达系统克服了富含二硫键及糖基化位点的 ACE-N 结构域蛋白,在大肠杆菌中表达不能正确折叠,形成无活性包涵体的不足<sup>[12-13]</sup>。毕赤酵母 GS115 作为低等真核生物,除了具有基本的真核生物蛋白加工修饰体系,可对表达的目标蛋白进行正确的加工和修饰,形成合理的空间折叠方式和糖基化类型之外,它在组氨酸脱氢酶位点(HIS4)有突变,因而不能合成组氨酸,而 pPIC9K 表达质粒含有 HIS4 基因可与它进行同源重组,从而能合成组氨酸。因此可以利用不含组氨酸的培养基来选择转化子,且 GS115 自发回复突变到  $\text{His}^+$  原养生物几率小于  $1/10^8$ 。

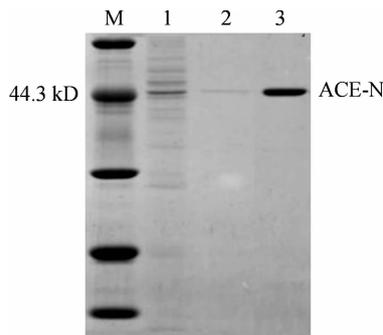
在引物设计方面,笔者在 5'端引物 Primer1 中加入 *EcoR* I 酶切位点的同时,融合了 6 个 His 标签,在 3'端引物 Primer2 中加入了 *Not* I 酶切位点。选用 *EcoR* I 和 *Not* I 作为酶切位点,是因为在 ACE-N 结构域上并不存在这两个酶切位点,而载体 pPIC9K 上含有这两个酶切位点,这为 pPIC9K-ACE-N 重组质粒的成功构建提供了理论基础和依据。引物中的 6 个 His 标签也为 ACE-N 结构域的  $\text{Ni}^{2+}$  柱纯化打下基础。另外在 ACE-N 结构域的 3'端存在一些另外的酶切位点,为了防止蛋白在药瓶表达过程中,3'端的蛋白被酶切,使 6 个 His 标签丢失,影响蛋白的纯化,所以笔者将 6 个 His 标签加在 5'端引物 Primer1。同时利用 pPIC9K 载体上的  $\alpha$  交配因子信号肽和 KEX2 酶切位点序列,它们可将外源蛋白分泌至胞外并将  $\alpha$  交配因子信号肽切除<sup>[14]</sup>。

为提高外源蛋白表达量,用 2 次电转来增加高拷贝菌株概率,筛选获得高拷贝菌株。由于本菌种为  $\text{Mut}^+$  型,对甲醇的消耗能力较强,所以摇瓶培养的时间不宜过长,否则目的蛋白容易降解。2%蛋白胨作为氮源,诱导温度为 26℃,甲醇含量为 1.5%是摇瓶诱导表达目的蛋白最适条件<sup>[15]</sup>。

综上所述,ACE-N 结构域在毕赤酵母中的成功表达,为今后 ACE-N 蛋白功能及生物活性的研究和两个同源结构域选择性抑制的体外实验奠定了基础。

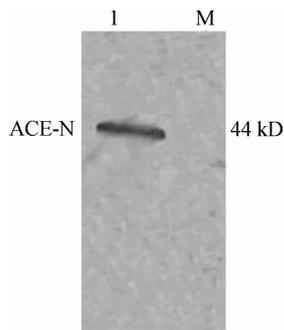
## 参考文献:

- [1] Erdős E G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years[J]. Hypertension, 1990, 16(3): 363-370.
- [2] Gavras H. Angiotensin-converting enzyme inhibition and the heart[J]. Hypertension, 1994, 23(1): 813-818.



1. 结合缓冲液洗脱; 2. 20 mM 咪唑洗脱  
3. 40 mM 咪唑洗脱; M. 蛋白 Marker

图 5 蛋白纯化结果



1. ACE-N 结构域蛋白; M. 预染蛋白 Marker

图 6 Western blotting 鉴定结果

- [3] Linz W, Wiemer G, Gohlke P, et al. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors[J]. *Pharmacol Rev*, 1995, 47(1): 25-49.
- [4] Bhoola K D, Figueroa C D, Worthy K. Bioregulation of kinins; kallikreins, kininogens, and kininases[J]. *Pharmacol Rev*, 1992, 44(1): 71-80.
- [5] Voronov S, Zueva N, Orlov V, et al. Temperature-induces selective death of the C-domain within angiotensin-converting enzyme molecule[J]. *FEBS Letters*, 2002, 52(2): 77-82.
- [6] Sturrock E D, Danilov S M, Riordan J F. Limited proteolysis of human kidney angiotensin convertinenzyme and generation of catalytically active N- and C-terminal domains[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 23(6): 16-19.
- [7] Hazel R, Corradi, Sylva, Schwager, et al. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design[J]. *Mol Biol*, 2006, 35(7): 964-974.
- [8] Vaidyanthan S, Jarugula V. Clinical pharmacokinetics and pharmaco dynamics of aliskiren[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2008, 47(8): 515-531.
- [9] Georgiadis D, Beau F, Czarny B, et al. Roles of two sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin and bradykinin: insight from selective inhibitors[J]. *Circ Res*, 2003, 9(3): 148-154.
- [10] Fuchs S, Xiao H D, Hubert C, et al. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo[J]. *Hypertension*, 2008, 5(1): 267-274.
- [11] Crackower M A, Sarao R. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. *Nature*, 2002, 41(7): 822-828.
- [12] Vassileva A, Chugh D A, Swaminathan S, et al. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Protein Express Purification*, 2001, 21(1): 71-80.
- [13] Cereghino J, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(3): 45-66.
- [14] 赵钰岚, 徐 珏, 许传莲. 人源血管紧张素转化酶-C 结构域在毕赤酵母中的表达[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(5): 664-670.
- [15] 徐 珏, 许传莲, 杜芳尧. 毕赤酵母高密度发酵表达血管紧张素转化酶 C-结构域[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(4): 33-38.

## Expression of Human Angiotensin Converting Enzyme-N Domain in *Pichia Pastoris*

XU Hui, XU Jue, CHEN Cheng-ji, DING Ming, XU Chuan-lian

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech Universtry, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The authors obtain the cDNA by RT-PCR from the TE-1 cell line, derived ACE-N gene fragment through PCR, and construct secretory expression plasmid pPIC9K-ACE-N. The recombinant plasmid is transformed into *Pichia pastoris* strain GS115, and the positive clones were selected and subjected to electroporation. Antibiotic G418 is used for screening multi-copy inserts. The expressed protein is purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. The expression quantity of target protein reached 0.11g/L and its purity reaches 99%. The results provided a basis for the in vitro study on the selective inhibition of the two homologous domains.

**Key words:** angiotensin converting enzyme-N domain; RT-PCR; *pichia pastoris*

(责任编辑: 许惠儿)