

土曲霉洛伐他汀合成调控基因 *lovE* 的克隆与表达

朱碧云, 黄欣, 刘宝意, 李浩明

(广东药学院 生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 克隆表达土曲霉洛伐他汀合成调控基因 *lovE*, 为研究 *lovE* 蛋白的生物学功能奠定基础。方法 利用原核表达载体 pET21b(+) 构建 *lovE* 原核表达质粒, 并在大肠杆菌中通过 IPTG 诱导表达; 亲和层析法纯化重组蛋白。结果 构建了 pET-*lovE* 原核表达质粒, 经原核表达和亲和层析获得 6 × His-*lovE* 融合蛋白, 蛋白纯度在 90% 以上。结论 原核表达可获得 *lovE* 蛋白, 为 *lovE* 蛋白的生物学功能研究奠定了基础。

关键词: 土曲霉; 洛伐他汀; 调控基因; 亲和层析

中图分类号: Q 786 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.020

文章编号: 1006-8783(2011)01-0077-04

Cloning and expression of lovastatin synthesis regulatory genes *lovE* from *Aspergillus terreus*

ZHU Bi-yun, HUANG Xin, LIU Bao-yi, LI Hao-ming

(School of Life Sciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To acquire lovastatin synthesis regulatory genes *lovE*, recombinant *lovE* protein, and to study its biological functions. **Methods** The recombinant expression plasmid was constructed by using prokaryotic pET21b(+) vector, which was inducible expression by IPTG in *E. Coli*. Recombinant protein was purified by chromatography under denatured conditions. **Results** Recombinant plasmid pET-*lovE* was constructed. 6 × His-*lovE* fusion protein was obtained through prokaryotic expression and affinity chromatography, its purity was more than 90%. **Conclusions** *lovE* protein was expressed and purified, and this work provides a basis for further study.

Key words: *Aspergillus terreus*; lovastatin; regulatory gene; affinity chromatography

洛伐他汀(lovastatin, 也称 mevinolin、monacolin K) 是羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 是治疗高胆固醇血症的首选药物, 它能阻止动脉硬化发展, 减少心肌梗死等危险^[1-3]。洛伐他汀的主要产生菌为丝状真菌土曲霉(*Aspergillus terreus*) 和红曲霉(*Monascus*)。

土曲霉洛伐他汀合成酶基因簇包括 *lovA-lovG*、*lovI* 和 *lovA* 等基因^[4-6]。*lovE* 是土曲霉洛伐他汀生物合成的调控基因, 编码 GAL4 类转录因子, 其氨基

酸序列中半胱氨酸富集的 DNA 结合区域表明含有 Zn₂Cys₆ 型锌指结构域^[7-8]。为深入研究洛伐他汀生物合成调控基因的生物学功能并利用转录因子来调控洛伐他汀合成代谢, 本研究首次从土曲霉 CCTCC AF93208 基因组中克隆洛伐他汀合成酶调控基因 *lovE*, 构建了 pET-*lovE* 原核表达质粒, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中大量表达, 利用亲和层析法在变性条件下分离纯化 *lovE* 蛋白, 为 *lovE* 功能研究奠定了基础。

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 广州市科技计划项目(2010Y1-C811)

作者简介: 朱碧云(1983-), 女, 硕士研究生, Email: my8171678@163.com; 通讯作者: 李浩明, 男, 教授, 主要从事微生物次生代谢研究, Email: lihaoming@gdpu.edu.cn。

网络出版时间: 2011-01-21 16:24 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1624.018.html>

1 材料与方法

1.1 材料

土曲霉 CCTCC AF93208 (中国典型培养物保藏中心);大肠杆菌 *DH5 α* 与 *BL21 (DE3)* 为本实验室保藏;蛋白质分子量标准、DNA marker、T4 DNA ligase、限制性内切酶 *Xho* I、*Nhe* I 和 *Nde* I (TakaRa 公司);Taq 酶采用 Fermentas 公司的 Taq recombinant;质粒 pET-21b(+) (Novagen 公司);Ni-NTA His 标签蛋白纯化树脂 (Qiagen 公司);PCR 产物纯化试剂盒 D6494-01、质粒小提试剂盒 D6943-01 (OMEGA 公司);其他常规化学试剂均为国产分析纯。

重组蛋白抽提纯化缓冲液:裂解缓冲液 (Na_2HPO_4 50 mmol \cdot L⁻¹、NaCl 300 mmol \cdot L⁻¹、咪唑 10 mmol \cdot L⁻¹, pH 8.0)、Buffer B (Na_2HPO_4 100 mmol \cdot L⁻¹、Tris 10 mmol \cdot L⁻¹、尿素 8 mol \cdot L⁻¹, 调至相应 pH 值 Buffer B (pH 8.0)、Buffer C (pH 6.3)、Buffer D (pH 5.9)、Buffer E (pH 4.5)

1.2 方法

1.2.1 *lovE* 基因的扩增 根据 GenBank 上公布的洛伐他汀生物合成基因簇(登录号为 AF141925.1)中 *lovE* 基因序列设计引物^[9] 在上游引物序列引入 *Nhe*I 酶切位点,下游引物序列引入 *Xho*I 酶切位点:lovE-F: CTAGCTAGCATGGCTGCAGATCAAGGTATAT; lovE-R: CCGCTCGAGTGGAGGAATATTGTTGAGGTCT 交由英俊生物技术有限公司合成。

以土曲霉总 DNA^[9] 为模板,lovE-F、lovE-R 为引物,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 40 s,30 个循环,最后以 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 做 PCR 反应扩增 *lovE* 基因。用 1% (ρ) 的琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物,再用胶回收试剂盒纯化目的 DNA 片段。

1.2.2 原核表达载体 pET-*lovE* 的构建 将纯化回收的 *lovE* 基因片段和质粒 pET-21b(+) 用 *Xho* I 和 *Nhe* I 双酶切。将酶切获得的 *lovE* 基因片段克隆到原核表达载体 pET-21b(+) 中,并依次转入大肠杆菌 *DH5 α* 与 *BL21 (DE3)* 受体菌中,挑取单菌落接种于 3 mL LB 培养基(含 Amp 100 μ g/mL)中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,用质粒小量提取试剂盒提取重组质粒 DNA,用限制性内切酶 *Nde* I 酶切验证。重组质粒交由英俊生物技术有限公司测序验证。

1.2.3 融合蛋白诱导表达 从含有表达载体 BL21

(DE3) $\text{-pET-}lovE$ 的 LB 平板上挑取单菌落,接种于 2 mL 含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。按 1% 接种于 50 mL LB 培养基(含 Amp 100 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 180 r/min 摇床培养至 A_{600} 为 0.6~0.8,留样 100 μ L 4 $^{\circ}$ C 保存。在菌液中加入异丙基 β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol \cdot L⁻¹ 诱导表达,37 $^{\circ}$ C,180 r/min 摇床培养,每隔 1 h 留样 100 μ L。SDS-PAGE 分析表达进程。

1.2.4 蛋白抽提 将经 IPTG 诱导的菌液 4 000 \times g 离心 20 min 收集菌体(-20 $^{\circ}$ C 保存),去菌体培养液(C)留样。菌体悬浮于 1/10 菌液体积的裂解缓冲液,置于冰上用超声波破碎细胞(超声参数设置为 20 \times 30 s,每个间隔为 10 s)。裂解液 4 $^{\circ}$ C、10 000 \times g 离心 20 min,得上清(胞内可溶蛋白,A),沉淀(包涵体,B)悬浮于 5 mL 裂解缓冲液;包涵体用 Buffer B + β -巯基乙醇(β -ME)抽提(每克湿重沉淀悬浮于 5 mL 的 Buffer B β -ME 按体积分数 1% 加入 30~60 min,室温 10 000 \times g 离心 20 min 得上清(D)。

1.2.5 在变性条件下纯化含有 6 \times his 标签的融合蛋白 包涵体蛋白溶解后加入 Ni-NTA His 标签蛋白纯化树脂,摇匀装柱。分别用 2 倍柱体积的裂解缓冲液、Buffer C (pH 6.3)、Buffer D (pH 5.9) 和 Buffer E (pH 4.5) 洗脱,收集洗脱液。

2 结果

2.1 *lovE* 基因 PCR 扩增

利用引物 lovE-F 和 lovE-R,以土曲霉总 DNA 为模板扩增得到约 1.5 kb 的片段,其大小与预期 *lovE* 大小 1 512 bp 相符合,初步判断获得了目的片段。将重组菌种交英俊生物技术有限公司测序,*lovE* 基因长 1 512 bp,编码 503 个氨基酸,不含内含子结构。将 *lovE* 的 3 次测序结果提交到 GenBank 中进行 blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 比对 *lovE* 与 Genbank 中登录号为 AF141925.1(编码 *Aspergillus terreus* 调控蛋白)的相似性达到 99.9%,仅在第 614 位碱基处由 C 置换了 T,编码的氨基酸也仅在第 205 位氨基酸处由 Ala 置换了 Val,表明克隆片段应为洛伐他汀合成酶调控基因片段,由此证明洛伐他汀合成酶调控基因 *lovE* 种间保守程度极高。

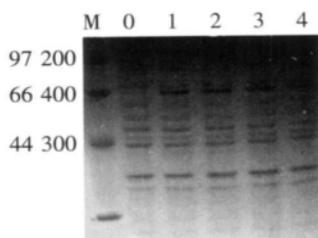
2.2 重组质粒 pET-*lovE* 的构建

用胶回收试剂盒回收 PCR 扩增片段,克隆到

pET 表达载体 转化大肠杆菌 *DH5 α* 与 *BL21 (DE3)* 受体菌, 挑取重组质粒单克隆, 做菌落 PCR 获得目的片段 *lovE* 基因。对目的片段做单酶切验证, 电泳分析。经 *Nde* I 酶切消化后在琼脂糖电泳上分离的结果, 其片段大小约为 770 bp、520 bp 和 230 bp, 与用 DNAMAN 软件酶切分析预测的 771 bp、516 bp 和 225 bp 结果一致。表明成功克隆到 *lovE* 基因。进一步对重组质粒进行 DNA 测序, 与 GenBank 中登录号为 AF141925.1 的 *lovE* 通过 DNAMAN 比对仅在末尾多了 6 个组氨酸的核苷酸序列, 与实验设计完全一致^[9]。这也确定连接到表达载体 pET-21b 上的基因片断为除去终止密码子加入 His 标签的 *lovE* 基因的完整编码框序列, 符合原核表达外源融合蛋白的要求。

2.3 *lovE*-His 融合蛋白表达

从图 1 中可以看出在约 5 800 处有新蛋白表达, 其蛋白分子量与实验设计表达的 *lovE*-His 融合蛋白分子量相符, 凝胶成像系统灰度扫描分析诱导表达 1 h、2 h、3 h 和 4 h 的融合蛋白占菌体总蛋白的百分比, 分别为 16%、19%、20% 和 22%, 表明重组 *lovE* 在大肠杆菌 *BL21 (DE3)* 中获得大量表达。密码子使用的兼容模式对异源系统的功能表达是特别重要的, G + C 含量可以作为一个初步的简单的指导, 土曲霉 *lovE* 基因 *ORFs* 的 G + C 含量为 55.3%, 大肠杆菌 *ORFs* G + C 含量平均为 52%, 这两种生物的大多数氨基酸的密码子使用模式相似。分析大肠杆菌和 *lovE* 稀有密码子的使用频率, 大肠杆菌中的稀有密码子的使用频率(单位为每千对碱基出现的次数)为: AGA(Arg) 2.1、CTA(Leu) 3.9、ATA(Ile) 4.4、CCC(Pro) 5.5, *lovE* 中对应的稀有密码子的使用频率为 6.0、10.0、11.9、17.9。*lovE* 的稀有密码子利用率比大肠杆菌稍高一点, 但不存在显著性差异, 故可以大量表达, 而非超量表达。



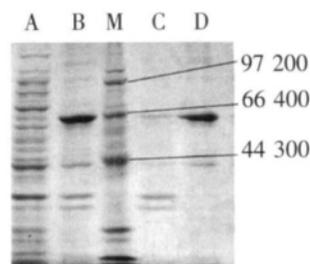
M. 蛋白质分子量标准; 0. 诱导前样品; 1-4. 分别为诱导 1~4 h 的样品

图 1 *lovE*-His 融合蛋白 SDS-PAGE

Figure 1 SDS-PAGE for *lovE*-His fusion protein

2.4 蛋白抽提及纯化

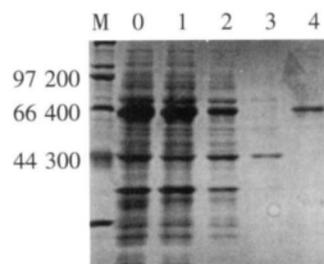
将抽提过程中所得的样品做 SDS-PAGE, 如图 2 所示, C 泳道为大肠杆菌表达分泌到细胞外的可溶性蛋白, 在与目的蛋白分子量大小相符的地方没有明显的条带, 表明 *lovE* 的表达形式为胞内非分泌型蛋白; A 泳道为超声破碎细胞后的离心所得的上清液, 即胞内可溶性蛋白, 从图看出目的蛋白并不在本部分; B 泳道为超声裂解缓冲液悬浮的包涵体沉淀, 在与目的蛋白分子量大小相符的地方存在明显的条带, 表明目的蛋白在大肠杆菌中的表达形式为不可溶的包涵体蛋白; D 泳道为用加入 β -ME 的 Buffer B 溶解包涵体蛋白的可溶部分, 该缓冲液中含有强变性剂高浓度的尿素, 并加入了还原剂 β -ME 可以将包涵体中目的蛋白很好地溶解出来, 而且得到了初步的纯化, 可以进行下一步的亲亲和层析纯化。



M. 蛋白质分子量标准; A. 胞内可溶蛋白; B. 包涵体; C. 培养液; D. Buffer B + β -ME 溶解的包涵体

图 2 蛋白抽提

Figure 2 Protein extraction



M. 蛋白质分子量标准; 0. 包涵体; 1. 未吸附; 2. Buffer C 洗脱; 3. Buffer D 洗脱; 4. Buffer E 洗脱

图 3 *lovE*-His 融合蛋白亲和层析纯化结果

Figure 3 Purification of *lovE*-His fusion protein by affinity chromatography

图 3 中 0 和 1 泳道为包涵体蛋白, 泳道 2 和 3 分别为洗脱掉的杂蛋白和非特异结合蛋白, 泳道 4 道条带单一, 是纯化后的目的蛋白, 本方法可获得电泳纯目的蛋白。

3 讨论

土曲霉中洛伐他汀生物合成过程中调控蛋白 lovE 通过调控洛伐他汀生物合成酶活性及其基因的转录和表达来进一步调控洛伐他汀的合成。原核表达系统遗传背景清楚、转化和表达效率高、易发酵,可以快速大量生产重组蛋白,并且 pET-21b(+) 表达载体使重组蛋白 N 末端融合了与 Ni^{2+} 具有高亲和结合特性的 6 个组氨酸标签,便于蛋白的纯化。为了在蛋白水平研究其在洛伐他汀合成中的功能和作用,本实验克隆了 *lovE* 基因,构建了 pET-lovE 原核表达载体,并在 IPTG 诱导下特异性表达和纯化了 lovE-His 融合蛋白。后续实验将用纯化的 lovE 蛋白制备抗 lovE 抗体研究 *lovE* 转录因子与 DNA 结合,深入探究转录因子生物学功能和作用机理。

参考文献:

- [1] AUER J, EBER B. A clinical focus on statins [J]. *Curr Opin Investig Drugs* 2001 2(3): 382-388.
- [2] SANDHYA V G, RAJAMOCHAN T. Comparative evaluation of the hypolipidemic effects of coconut water and lovastatin in rats fed fat-cholesterol enriched diet [J]. *Food Chem Toxicol* 2008 46(12): 3586-3592.
- [3] DICHTL W, DULAK J, FRICK M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle

cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003 23(1): 58-63.

- [4] HENDRICKSON L, DAVIS C R, ROACH C, et al. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene [J]. *Chem Biol*, 1999, 6(7): 429-439.
- [5] KENNEDY J, AUCLAIR K, KENDREW S G, et al. Modulation of polyketides synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis [J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1368-1372.
- [6] SUTHERLAND A, AUCLAIR K, VEDERAS J C. Recent advances in the biosynthetic studies of lovastatin [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001 4(2): 229-236.
- [7] TODD R B, ANDRIANOPOULOS A. Evolution of a fungal regulatory gene family: the $\text{Zn}(\text{II})_2\text{Cys}_6$ binuclear cluster DNA binding motif [J]. *Fungal Genet Biol*, 1997, 21(3): 388-405.
- [8] HUTCHINSON C R, KENNEDY J, PARK C, et al. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78(3-4): 287-295.
- [9] 黄欣, 朱碧云, 吕带弟. 洛伐他汀合成酶调控基因 *lovE* 和 *mkH* 的克隆及其序列分析比较 [J]. 广东药学院学报 2009 25(1): 83-87.

(责任编辑: 幸建华)

美国 FDA 批准 Corifact 用于治疗先天性凝血因子 VIII 缺乏症

美国 FDA 于 2011 年 2 月 17 日批准 Corifact 用于患有先天性凝血因子 VIII 缺乏症的人士预防出血。先天性凝血因子 VIII 缺乏症是一种非常罕见的遗传性疾病, Corifact 也是第一种用于治疗该疾病的产品, 由位于德国 Marburg 的 CSL Behring 公司生产。

凝血因子 VIII 是人体血液中的一种物质, 对血液凝结非常重要。患有先天性凝血因子 VIII 缺乏症的人自身无法生成足够的凝血因子 VIII, 如果不进行治疗, 这类患者可因出血而危及生命。

先天性凝血因子 VIII 缺乏症非常罕见, 在美国, 通常每 300 ~ 500 万人口中只有 1 例。凝血因子 VIII 缺乏可能会引起人体软组织挫伤、黏膜出血以及致命性的颅内出血。新生儿如果患凝血因子 VIII 缺乏症可能会出现脐带出血。

Corifact 通过 FDA 快速审批程序获批, 审批之前只对 14 名患者(其中包括小孩)进行了临床研究。研究中观察到的副作用有过敏反应(如过敏、疹子、瘙痒、红斑)、寒战、发烧、关节痛、头痛、凝血酶-抗凝血酶水平升高和肝酶水平升高等。

Corifact 是从健康捐献者的血浆中提取出来的, 患者服用 Corifact 后可能会产生抗体从而使之失效。如果服药过量也有可能发生血液异常凝结的情况。

(来源: 美国 FDA 新闻稿 2011-02-17 夏训明编译)