

重组海蚯蚓纤溶酶的克隆、表达及活性鉴定

鞠吉雨¹, 于文静², 初金鑫², 张金宝¹, 连波², 赵春玲^{2*}

¹潍坊医学院基础医学院; ²潍坊医学院药学与生物科学学院, 潍坊 261053

摘要: 纤溶酶在溶栓治疗中起重要作用, 能够溶解血凝块的主要成分纤维蛋白。采用 RACE 方法从海蚯蚓消化道组织中扩增出海蚯蚓纤溶酶编码序列, 构建该基因原核表达载体, 并进一步构建工程菌表达融合蛋白, 经 Ni²⁺ 树脂柱纯化后通过平板法检测该融合蛋白纤维蛋白酶原激活活性。结果获得海蚯蚓纤溶酶的 cDNA 序列和氨基酸序列, 并成功构建重组表达载体 pET-21a-AFE, 表达纯化出融合蛋白, 该融合蛋白能够激活纤维蛋白酶原而溶解纤维蛋白。总之, 本研究获得了海蚯蚓纤溶酶的 cDNA 序列和氨基酸序列, 并初步证明其具有纤维蛋白酶原激活活性, 为临床新型溶栓药物的开发提供实验基础。

关键词: 海蚯蚓; 纤溶酶; RACE; 基因序列

中图分类号: Q503

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.003

Gene Cloning, Expression and Activity Identification of the Recombinant Fibrinolytic Enzyme from *Arenicola cristata*

JU Ji-Yu¹, YU Wen-Jing², CHU Jin-Xin², ZHANG Jin-Bao¹, LIAN Bo², ZHAO Chun-Ling^{2*}

¹College of Basic Medicine; ²College of Pharmacy and Biological Science, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

Abstract: Fibrinolytic enzyme plays an important role in thrombolytic therapy, and they can dissolve fibrin which is the main components of blood clots. The encoding sequence of fibrinolytic enzyme from *Arenicola cristata* were amplified by RACE from digestive tract tissues of *A. cristata*. The prokaryotic expression vector of the gene was constructed and fusion protein was then induced to express in *E. coli*. Plasminogen activator activity of the fusion protein purified by the Ni²⁺ resin column was detected by fibrin plate method. Thus, the cDNA sequence and amino acid sequence of fibrinolytic enzyme from *A. cristata* were obtained. The recombinant expression vector pET-21a-AFE was successfully constructed. The purified fusion protein can dissolve fibrin by activating plasminogen. In short, the cDNA sequence and amino acid sequence of fibrinolytic enzyme from *A. cristata* were obtained. This enzyme was preliminarily proved to have plasminogen activation activity, and might act as a thrombolytic agent for use in thrombosis.

Key words: *Arenicola cristata*; fibrinolytic enzyme; RACE; gene sequence

血栓性疾病严重威胁着人类健康, 其主要治疗手段之一是溶栓。溶栓剂迄今已发展了三代, 但出血、发热、过敏反应、低血压等副作用的出现使现有药物并不理想。临床上迫切需要寻找和开发安全高效的新型溶栓剂。研究发现, 纤溶酶(fibrinolytic enzyme)在溶栓治疗中起重要作用, 能够溶解血凝块的主要成分纤维蛋白^[1,2]。

海蚯蚓(*Arenicola cristata*), 属于环节动物门海洋生物, 始载于《中国药用动物志》, 用于痈疮肿毒, 有清热解毒之功效。但有关海蚯蚓的研究只有少量

报道^[3-5]。1975年血红蛋白从海蚯蚓中被分离且结构被特征化; Parker等从海蚯蚓中分离到4种能够激活环AMP磷酸二酯酶; Wang等从海蚯蚓中分离到一种具有抗肿瘤活性的新的烯醇式磺化甾醇—Arenicolsterol A。本研究利用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)法, 从海蚯蚓消化道组织中获得海蚯蚓纤溶酶的cDNA序列、氨基酸序列, 构建原核表达载体并表达纯化融合蛋白, 并进一步对其功能进行初步研究。本研究为探讨海蚯蚓纤溶酶的生物学活性和可能的开发应用提供实验基础。

1 材料与方法

收稿日期: 2014-10-08

接受日期: 2014-12-05

基金项目: 国家自然科学基金(30901779); 山东省高等学校科技计划(J11LC52)

* 通讯作者 Tel: 86-536-8462053; E-mail: zhaochunlingbj@163.com

1.1 材料

海蚯蚓采自烟台市近海。Trizol 试剂、3'RACE 试剂盒、5'RACE 试剂盒购自北京吉百特公司;反转录试剂盒购自 fermentas 公司;T-A Easy 试剂盒、高保真 Taq 酶、内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 购自大连宝生物公司;IPTG、镍柱填料和超滤管购自北京东胜泰博公司;牛血纤维蛋白溶酶原和尿激酶购自中国食品药品检定研究院。表达载体 pET-21a、*E. coli* BL21 为本室保存。

1.2 海蚯蚓纤溶酶基因 cDNA 3'及 5' 端序列扩增及测序

设计引物序列:3R 为含接头引物序列的反转录引物;3R1 为 3'端接头引物;3F1 是根据丝氨酸蛋白酶家族催化活性中心 Ser 附近所含的高度保守序列 GDSGGP 设计的引物。5R 为 oligodT 反转录引物;5R1、5R2 是根据 3'RACE 获得的 3'端序列设计的特异性引物;5F1 为含 5'端接头引物序列的引物;5F2 为 5'端接头引物。引物具体序列见 Table 1。

表 1 本研究中 RACE 所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study for RACE

Primer 引物	Sequence 序列
3R	5'-GGCCACGCGTCTGACTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
3F1	5'-GCAATGCTGACAGTGGTGGTCC-3'
3R1	5'-GGCCACGCGTCTGACTACTAG-3'
5R	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
5F1	5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGGGGGGGGGG-3'
5R1	5'- CCTGAACACTGAGAGTTGGAC-3'
5F2	5'-CCACGGCTCGACTACTAG-3'
5R2	5'-GGACCACCACGTCACCATTGC-3'

利用 Trizol 试剂从鲜活海蚯蚓肠道组织中提取总 RNA,以 3R 作为反转录引物使用 fermentas 公司反转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,3F1 和 3R1 为上下游引物,利用 3'RACE 试剂盒扩增 3'末端序列。以 5R-oligodT 作为反转录引物合成 cDNA,使用 dCTP 和 TdT 对纯化的 cDNA 加尾,以过柱纯化后的加尾产物为模板,5F1、5R1 和 5F2、5R2 分别为引物,利用 5'RACE 试剂盒扩增 5'末端序列。将扩增出来 3'和 5'末端序列电泳回收纯化后,分别连接 TA 克隆载体,转化细菌 *E. coli* DH5 α ,测序。应用 Contigexpress 软件对海蚯蚓纤溶酶基因 cDNA 5'端和 3'端序列进行拼接。

1.3 生物信息学分析

将得到的海蚯蚓纤溶酶基因 DNA (mRNA) 序列,使用 DNAMAN 软件,获得该海蚯蚓纤溶酶 cDNA 编码的氨基酸序列。登陆 NCBI 利用 Blast 在 GenBank 数据库和蛋白质数据库进行同源性比较分析。Signal P 3.0 软件分析海蚯蚓纤溶酶的信号肽序列。

1.4 海蚯蚓纤溶酶基因重组表达载体的构建

根据发现的海蚯蚓纤溶酶基因 cDNA 序列,设计一对引物, F: 5'-TTCGAGCTCATTATTGCTGCTTCTGATGCA-3', R: 5'-GTGCTCGAGGACTCCAGTACACTCTGGAT-3',上下游引物中分别引入 *Sac*I 和 *Xho*I 酶切位点(下划线部分);以海蚯蚓纤溶酶 cDNA 为模板,利用 pfu DNA 聚合酶扩增活性肽的 cDNA 片段,PCR 产物利用酶切、连接的方法构建至原核表达载体 pET-21a 中,并转化至 *E. coli* DH5 α 中,以双酶切和测序进行阳性克隆的筛选与鉴定。

1.5 重组海蚯蚓纤溶酶的诱导表达与纯化鉴定

提取经鉴定确认的阳性重组质粒,转化至 *E. coli* BL21 (DE3),构建工程菌。工程菌单菌落在 1.0 mM IPTG 中 30 °C 诱导培养 4 h (对照组未加入 IPTG);收集菌体后超声破碎,4 °C 12000 \times g 离心 30 min,上清和沉淀各取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 分析。将收集的菌体超声破碎后,取上清液过 Ni²⁺ 树脂柱,50 mL 洗涤液洗涤 (20mM Tris-CL, pH7.4, 10 mM 咪唑,0.5 M NaCl);用洗脱液 (20 mM Tris-CL, pH7.4, 500 mM 咪唑,0.5 M NaCl) 洗脱结合蛋白,每次加入 1 mL,共洗 5 次。

1.6 重组海蚯蚓纤溶酶的纤维蛋白酶原激活活性测定

在 50 mL TBS-HCL (50 mmol/L Tris-CL, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl) 缓冲液中加入 0.5 g 琼脂糖,微波炉煮沸;加入 0.5 g 脱脂奶粉,混匀。冷却至 40 °C 后加入 10 U 牛血纤维蛋白溶酶原,混匀。铺 2 个平皿,待凝固后打孔,加入 0.5、1 μ g/ μ L 重组蛋白,以尿激酶 (1 μ g/ μ L) 为阳性对照,以 PBS 为阴性对照,37 °C 孵育 16 h 后,观察小孔周围有无透明圈的形成。

2 实验结果

2.1 海蚯蚓纤溶酶基因 cDNA 3' 端及 5' 端序列扩增

以海蚯蚓消化组织 RNA 为模板,利用 3'RACE

和 5'RACE 技术分别扩增出 3'端及 5'端序列,琼脂糖凝胶电泳结果显示,3'端和 5'端扩增产物长度分别约为 250bp 及 740bp(图 1,图 2)。测序后,应用 Contigexpress 软件对海蚯蚓纤溶酶基因 cDNA 5'端和 3'端序列进行拼接,获得海蚯蚓纤溶酶编码基因的 DNA(mRNA)序列。使用 DNAMAN 软件,获得该海蚯蚓纤溶酶 cDNA 编码的氨基酸序列。该蛋白酶由信号肽、前肽及成熟肽组成,成熟肽以 IIGG 起始;含丝氨酸蛋白酶家族高度保守序列 GDSGGP 及保守的催化三联体(H79, D126, S213)(图 3)。

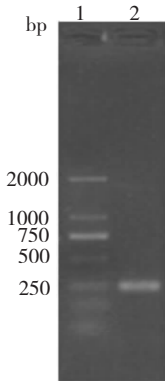


图 1 3' RACE 扩增产物

Fig. 1 Amplification product of 3' RACE

注:1:DNA 分子量标准 DL2000;2:3' RACE 产物

Note:1:DNA marker DL2000;2:product of 3' RACE

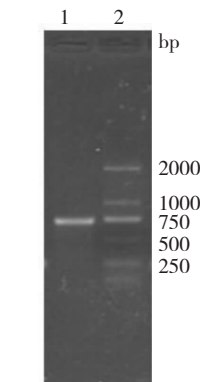


图 2 5' RACE 扩增产物

Fig. 2 Amplification product of 5' RACE

注:1:5' RACE 产物;2:DNA 分子量标准 DL2000

Note:1:product of 5' RACE;2:DNA marker DL2000

2.2 海蚯蚓纤溶酶 cDNA 编码的氨基酸序列的同源性分析

登陆 NCBI,利用 Blast 在 GenBank 数据库和蛋白质数据库进行同源性比较分析。结果显示尚无与该基因具有明显相似性的序列,提示其可能为一新

```

1 atgatgtttctgggtgggtgctgccttgggtggcaactgctgtgcagccccaagatcgct
  M M F L V V V A A L V A T A V A A P R D R
61 ctgacaccactgttccaacttggactactgagaaggattctacattattggtggttct
  L T P P V P T L I T E K D S Y I I G G S
121 gatgcatacctggccagttccctcaattggctccctgctgttccactagctcgtga
  D A S A G Q F P F I G S L L S S T S S G
181 ggagccacacttgtggtgctgtgaggatcagttctacctgggttctctgtgctgctcac
  G S H T C G A V R I S S T W V L C A A H
241 tgcacacagtcagctcccgagtcagtgatggttggaaatccgtgcttccactagctcgtga
  C T Q S S S R S V W F G I R C R S S T S
301 ggaggacagcacagctcctttagccgattgtgaatcctcctaactatggatctggtgct
  G G Q H R S F S R I V N H P N Y G S G A
361 ggatcattcccgaatgacatcagtgctgctgcaaatgagcagtggtgtgactgtaggaggt
  G S F P N D I S V L Q M S S G V T V I G
421 gttgctaattgccagcagtgagacttggctggccagactgcaaccatttctggatgg
  V A N L P S S G D F A G Q T A T I S G W
481 ggaagactgtggtatctgcagcctgccagactgctcctcaagtatgtaacatccctgtt
  R T C G S C S L P D C L K Y V N I P V
541 ctgtccaactctcagtgctcaggtactgggatccagatcaacagtgacacatctgt
  L S N S Q C S G Y W G S S I N S G H I C
601 gtctacagtgagcagctggtgcttgcattggtgacagtggtggtccaatgctcattgga
  V Y S G S T G A C N G D S G G P M S I G
661 aacactgtgattggaattacctctggggtgcagtgatggtggaacctccactccatct
  N T V I G I T S W G A S G C G T S T P S
721 gtctacagcagggttaccacctccagctcctggatccagagtggttactggagtctaa
  V Y S R V T T F R S W I Q S V T G V *
    
```

图 3 海蚯蚓纤溶酶基因序列和氨基酸序列

Fig. 3 Gene sequence encoding fibrinolytic enzyme of *A. cristata* and deduced amino acid sequence

注:信号肽以下划线表示;保守结构域以粗体表示;保守的催化三联体(组氨酸、精氨酸、丝氨酸)以粗体和下划线表示;终止密码以星号表示

Note:The putative signal peptide was underlined;the conservative domain was indicated by boldface;the conservative catalytic triad (histidine, aspartic acid and serine) were indicated by boldface and underlined;a termination codon was indicated with asterisk.

基因。该海蚯蚓纤溶酶与蚯蚓蛋白酶比较,氨基酸序列同源性为 <40%;海蚯蚓蛋白酶除与其他环节动物的蛋白酶都具有 GDSGGP 高度保守序列外,在一级结构上没有同源性。

2.3 重组表达克隆的鉴定

筛选的阳性克隆经 *SacI* 和 *XhoI* 双酶切,出现 705bp 目的基因片断(图 4),经测序,序列与 RACE 克隆结果一致。

2.4 重组蛋白的表达纯化

将重组表达载体转化至 *E. coli* BL21(DE3),诱导表达后,结果如图 5 所示,在 27kDa 处可见有重组海蚯蚓纤溶酶融合蛋白,主要以包涵体形式存在,上清中含量较少。上清液经 Ni²⁺ 树脂柱纯化后获得均质的融合蛋白(图 6)。

2.5 重组海蚯蚓纤溶酶的纤维蛋白酶原激活活性

经平板法检测纯化的重组海蚯蚓纤溶酶的活性。在加入纤维蛋白酶原的平板上,加重组蛋白和尿激酶的小孔周围形成明显的透明圈(图 7);而不

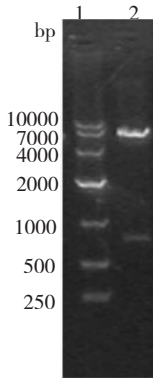


图4 重组表达克隆的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant clone by restriction enzymes

注:1:DNA 分子量标准 DL10000;2:*SacI*-*XhoI* 双酶切消化产物

Note:1:DNA marker DL10000;2:*SacI*-*XhoI* double digestion of recombinant plasmid

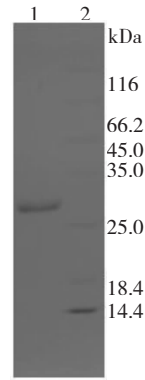


图6 重组表达蛋白的纯化

Fig. 6 Purification of the recombinant protein

注:1:纯化的重组蛋白;2:蛋白分子量标准

Note:1:purified recombinant protein;2:protein marker

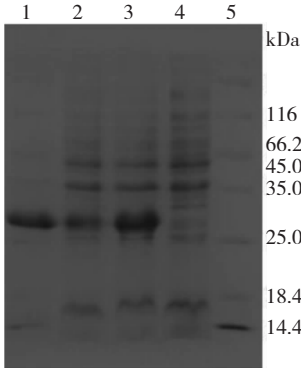


图5 重组原核表达载体的诱导表达

Fig. 5 Induced expression of the recombinant plasmid from *A. cristata* protease

注:1,2:IPTG 诱导后的菌体沉淀和上清;3:诱导的菌体蛋白;4:未诱导的菌体蛋白;5:蛋白分子量标准

Note:1,2:supernatant and precipitate from induced *E. coli* by IPTG; 3:protein from induced *E. coli*;4:protein from uninduced *E. coli*;5:protein marker

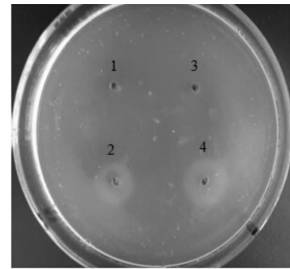


图7 重组表达蛋白的体外活性测定

Fig. 7 *In vitro* fibrinolytic activity of the purified recombinant protein

注:1:PBS;2:尿激酶(1 μg/μL);3,4:纯化的重组蛋白(0.5 μg/μL、1 μg/μL)

Note:1:PBS as a negative control;2:Urokinase (1 μg/μL) as a positive control;3,4:the purified recombinant protein (0.5 μg/μL、1 μg/μL)

加纤维蛋白酶原的平板上,加重组蛋白和尿激酶的小孔周围都没有透明圈形成。这说明该重组海蚯蚓纤溶酶具有纤维蛋白酶原激活活性。

3 讨论

纤溶酶作为新型溶栓剂,主要来源于天然动植物、微生物^[6-9]。但由于分离提取存在操作繁琐、提取纯度低、所需原材料多等缺点,因此,应用基因工程技术获得有功能性的蛋白药物已成为该领域的研究热点。纤溶酶大多属于丝氨酸蛋白酶家族,该家

族的蛋白酶催化活性中心 Ser 附近含高度保守序列 GDSGGP^[10],此为寻找已知功能蛋白的编码基因提供了入手点。

本研究根据丝氨酸蛋白酶家族高度保守序列 GDSGGP 设计引物,采用 3'RACE 和 5'RACE 技术从海蚯蚓消化道上皮细胞中扩增出长度为 777bp 的蛋白质编码序列。该基因序列与 GenBank 数据库中的其他基因序列没有明显的相似性;其氨基酸序列在蛋白质数据库进行同源性搜索分析证明该基因为一新发现的基因,且其蛋白序列中含有与其他丝氨酸蛋白酶家族高度保守序列 GDSGGP,这提示我们克隆到的海蚯蚓纤溶酶为丝氨酸蛋白酶家族的一个新成员。海蚯蚓纤溶酶中还含有保守的催化三联体 (H83、D129、S225),由信号肽、前肽及成熟肽组成,且其成熟肽即蛋白质的活性形式中含有保守的

IVGG(第36~39位)序列^[11]。进一步将海蚯蚓成熟肽成功构建至原核表达载体 pET-21a 中,转化工程菌,融合蛋白主要为包涵体,其上清经 Ni²⁺ 树脂柱纯化后,通过平板法证明该融合蛋白具有纤维蛋白酶原激活活性,显示了间接的纤溶活性。丝氨酸蛋白酶家族主要裂解纤维蛋白和纤维蛋白原中 Lys 或 Arg 羧基端的肽键使其被降解成许多具有抗凝作用的可溶性小肽^[12];有的纤溶酶还作为纤溶酶原激活剂,间接发挥溶栓作用,如葡激酶^[13]、普佑克(注射用重组人尿激酶原,即 Pro-UK)^[14]。

另外,就形态而言,海蚯蚓形似蚯蚓,故名海蚯蚓;就种属而言,海蚯蚓与蚯蚓都属于环节动物门,海蚯蚓属于多毛纲,蚯蚓属于寡毛纲。从蚯蚓中提取的蚓激酶,具有良好的溶栓抗凝作用,使其在治疗多种血栓性疾病方面取得很好的应用^[15]。蚓激酶(lumbrokinase, LK)就是从蚯蚓体内分离出的一组 20~40 kDa 丝氨酸蛋白酶,也称蚯蚓纤溶酶(earthworm fibrinolytic enzyme, EFE),具有直接溶解纤维蛋白及纤溶酶原激活作用^[16-18]。

因此,我们推测:海洋生物海蚯蚓中也可能含有一组具有溶栓作用的纤溶酶。我们期望能继续进行海蚯蚓纤溶酶的克隆工作,并对克隆到的海蚯蚓纤溶酶的溶栓活性进行比较,为进一步发现高效低毒的具有溶栓作用的海洋创新药物提供科学依据。

总之,本研究从海洋环节生物海蚯蚓中克隆到海蚯蚓纤溶酶的 cDNA 序列和氨基酸序列,并初步证明其具有纤维蛋白酶原激活活性。这为海蚯蚓功能基因组学和蛋白质组学研究奠定理论基础,也为开发海洋生物新型溶栓药物提供新的思路和资源。

参考文献

- 1 Chen G, Liu Y, Xie Y, *et al.* High dose urokinase against massive pulmonary embolism in nephrotic syndrome. *Blood Coagul Fibrin*, 2013, 24:439-443.
- 2 Evim M S, Bostan Ö, Baytan B, *et al.* Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator in 7 children. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2013, 19:574-577.
- 3 Waxman L. The structure of annelid and mollusc hemoglobins. *J Biol Chem*, 1975, 250:3790-3795.
- 4 Parker GR, Lin YM. Isolation from lugworm (*Arenicola cristata*) of four proteases that activate cyclic AMP phosphodiesterase. *Comp Biochem Phys B*, 1987, 88:349-357.
- 5 Wang L, Chen B, Shen XR, *et al.* Growth inhibition and induction of early apoptosis by arenicolsterol A, a novel cyto-

toxic enolic sulphated sterol from the marine annelid, *Arenicola cristata*. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9:753-761.

- 6 Chudzinski-Tavassi AM, Kelen EM, de Paula Rosa AP, *et al.* Fibrinolytic properties of purified hementerin, a metalloproteinase from the leech *Haementeria depressa*. *Thromb Haemostasis*, 1998, 80:155-160.
- 7 Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting in a marine green alga, *Codium divaricatum*. *Comp Biochem Phys B*, 2000, 125:137-143.
- 8 Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97:6647-6665.
- 9 Huang S, Pan S, Chen G, *et al.* Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3. *Int J Biol Macromol*, 2013, 62C:124-130.
- 10 Almonte AG, Sweatt JD. Serine proteases, serine protease inhibitors, and protease-activated receptors: roles in synaptic function and behavior. *Brain Res*, 2011, 1407:107-122.
- 11 Wang K, Gan L, Lee I, *et al.* Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Biochem J*, 1995, 307:471-479.
- 12 Ratel D, Glazier G, Provencal M, *et al.* Direct-acting fibrinolytic enzymes in shark cartilage extract: potential therapeutic role in vascular disorders. *Thromb Res*, 2005, 115:143-152.
- 13 Moreadith RW, Collen D. Clinical development of PEGylated recombinant staphylokinase (PEG-Sak) for bolus thrombolytic treatment of patients with acute myocardial infarction. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55:1337-1345.
- 14 Ning RX(宁荣霞), Wang R(王瑞), Cui XY(崔晓迎). A new thrombolytic drug: recombinant human prourokinase. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2008, 17:430-432.
- 15 Jin L, Jin H, Zhang G, *et al.* Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with lumbrokinase. *Clin Hemorheol Micro*, 2000, 23:213-218.
- 16 Cho IH, Choi ES, Lim HG, *et al.* Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37:199-205.
- 17 Ge T, Sun ZJ, Fu SH, *et al.* Cloning of thrombolytic enzyme (lumbrokinase) from earthworm and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif*, 2005, 42:20-28.
- 18 Han TT, Ta TD, Nguyen DT, *et al.* Purification and characterization of novel fibrinolytic proteases as potential antithrombotic agents from earthworm *Perionyx excavatus*. *AMB Express*, 2011, 1:26-36.