

# 重组人糜蛋白酶表达、纯化和性质研究

刘晓, 李素霞<sup>△</sup>

(生物反应器工程国家重点实验室, 华东理工大学, 上海 200237)

**[摘要]** 目的 研究重组人糜蛋白酶(human Chymotrypsin)在大肠杆菌中的表达、纯化和部分性质。方法 大肠杆菌 BL 21(DE 3)高效表达目的蛋白, 表达形式为包涵体, 复性后的重组蛋白, 通过阳离子交换层析纯化, 对纯化蛋白进行性质研究。结果 SDS-PAGE 分析重组蛋白酶原大小约为 30 KD, CM-FF 阳离子交换层析纯化后最终活性回收率为 93.7%。重组酶在 pH 3~pH5 范围内稳定, 温度稳定性好, 以 N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(n-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, BTEE)作为底物时的 Km 值为 0.067 mmol/L, 紫外最大吸收波长为 281 nm。结论 重组人糜蛋白酶工程菌成功表达目的蛋白, 并通过复性、激活后获得了活性蛋白, 建立了生产该酶的方法。

**[关键词]** 重组人糜蛋白酶; 表达; 性质

**[中图分类号]** Q 556+.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-1678(2014)02-0144-04

## Study on expression, purification and properties of recombinant human Chymotrypsin

LIU Xiao, LI Su-xia<sup>△</sup>

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**[Abstract]** Objective To study the prokaryotic expression, purification and properties of recombinant human Chymotrypsin. Methods The protein was highly expressed in E.coli BL 21 (DE 3) as inclusion body. After refolding and activated with trypsin, the activated protein was obtained and purified with ion-exchange chromatography(CM-FF), some properties of the recombinant human chymotrypsin was investigated. Results The molecular weight of chymotrypsinogen was about 30 KD in SDS-PAGE, total activity recovery rate of CM-FF purification was 93.7%. The recombinant chymotrypsin kept stable from pH 3 to pH 5, and owned good temperature stability. Km was 0.067 mmol/L with BTEE as a substrate. The UV maximum absorption wavelength was 281 nm. Conclusion The recombinant human enzyme was expressed successfully, and a feasible production method to get a high activity of the recombinant human chymotrypsin was established.

**[Keywords]** recombinant human chymotrypsin; expression; purification; properties

糜蛋白酶(chymotrypsin)也叫胰凝乳蛋白酶,属于丝氨酸蛋白酶家族,能专一性水解芳香族氨基酸羧基形成的肽键<sup>[1]</sup>。糜蛋白酶原由胰腺分泌,随胰液进入小肠后,在 Arg 15 和 Ile 16 之间(按 Bovine chymotrypsin A 序列编号)被胰蛋白酶切为通过二硫键连接的两部分,随后糜蛋白酶在 Leu 13 酶切去短肽 Ser 14-Arg 15,在 Tyr 146 和 Asn 148 酶切去短肽 Tyr 147-Asn 148,形成由二硫键相连的三条多肽链并具有生物活性<sup>[2-3]</sup>。本文主要研究重组人糜蛋白酶(human Chymotrypsin)的表达、纯化和部分性质。

糜蛋白酶与胰蛋白酶相似,能迅速分解变性蛋白质,因此在临床上可用于皮肤伤口或局部炎症<sup>[4]</sup>。目前,糜蛋白酶在临床上的应用主要为治疗腱鞘囊肿、皮肤慢性溃疡、慢性咽炎、疱疹性口炎等,由此可知该酶的主要功能是提高组织通透性、抑制炎症反应、溶解坏死组织等<sup>[5]</sup>作用。其临床给药方式主要有肌肉注射、灌注、喷雾和局部外敷,而目前临床应用糜蛋白酶系自牛或猪胰中提

取,异源蛋白进入人体后可能会引起免疫反应<sup>[6]</sup>,大大增加了用药风险。

采用基因工程方法表达重组糜蛋白酶不仅能从根源上解决这一问题,而且生产过程简洁有效,生产工艺稳定易控制,通过大肠杆菌高密度发酵和包涵体复性大大提高了重组酶的产率,改善了纯化工艺,因此利用基因工程技术和生产重组糜蛋白酶具有非常重要的意义。

### 1 材料和方法

1.1 质粒,菌株和试剂 含有重组人糜蛋白酶基因的质粒 pET-hCT 和菌株 BL 21(DE 3)由本实验室保存;重组胰蛋白酶购自上海雅心生物技术有限公司;蛋白低分子量标准(Takara);BTEE,IPTG(Sigma);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组人糜蛋白酶原表达与鉴定 含有重组质粒 pET-hCT 的 BL 21(DE 3)菌株,涂布于含有 50 μg/mL 卡那霉素抗性的 LB(0.1%蛋白胨,0.1%NaCl,0.05%酵母粉)平板,倒置培养 14~16 h。挑取菌落于相同浓度抗性的 30 mL LB 液体培养基,37℃,200 r/min 培养 12 h 后,以 2%接种量转接二级瓶,当菌密度 OD 600 达 0.6~0.8 时,IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖

**作者简介:** 刘晓,女,硕士,研究方向:生物化学与分子生物学研究, E-mail: liuxiao4209@gmail.com; 李素霞,通信作者,女,副教授,研究方向:生物化学与分子生物学,酶与酶工程,重组蛋白的变性与复性机理研究, E-mail: lisuxia@ecust.edu.cn.

昔)诱导4h,离心收集菌体,超声破碎后 SDS-PAGE[7]分析表达情况。

**1.3 重组人糜蛋白酶制备** 按菌体:缓冲液约为 1g:15 mL 的比例悬浮菌体于 50 mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液中,超声破碎得上清和包涵体。将包涵体重悬于洗涤液(0.1% Triton, 2 M 尿素),洗涤后的包涵体溶解于 8M 尿素中,稀释复性<sup>[8]</sup>,用重组胰蛋白酶激活<sup>[9]</sup>。

使用 3 cm × 30 cm 层析柱,按总蛋白量确定适合的 CM-FF 阳离子交换树脂装柱量。配制 20 mM NaAc-HAC pH 4.2 缓冲液进行平衡,上柱。上样后用上述平衡液洗涤至基线,然后用不同浓度 NaCl 进行梯度洗脱。洗脱后,测定活性,绘制洗脱曲线,并用 SDS-PAGE 鉴定纯度。合并洗脱液,透析后,冻干,冻干粉于 -20℃ 保存。

**1.4 活性测定** 测活底物为 BTEE,酶活力单位定义<sup>[10-11]</sup>为:在 25℃,pH 7.8 的条件下,1 个活力单位糜蛋白酶每分钟能水解 1 μmol BTEE。测活方法为:3.0 mL 25℃ 底物溶液中加入 10 μL 酶液,在 256 nm 下每 30 s 记录 1 个吸光值 A<sub>256</sub>,使每分钟的变化值 ΔA 在 0.015~0.020 之间为宜,空白对照为 1 mM HCl。

**1.5 重组人糜蛋白酶性质研究**

**1.5.1 pH 稳定性** 取纯酶液,分别在 pH 3~pH 11 缓冲液中稀释 10 倍,于 25℃ 下温育 2 h 和 46 h,取样测定酶活,以水浴前酶液的初始活性作为 100%,计算活性残余率。缓冲液依次为 NaAc-HAc(pH 3~pH 6),Tris-HCl (pH 7~pH 8),Gly-NaOH (pH 9~pH 11),所有缓冲液均 25℃ 配制。

**1.5.2 温度稳定性** 取 1 mg/mL 溶解于 1mM HCl 中的纯酶液,分别置于 25℃、37℃ 水浴中温育,每隔一定时间测定酶活,以水浴前酶液的初始活性作为 100% 计算活性残余率。

**1.5.3 反复冻融稳定性** 取 1 mg/mL 纯酶液,置于 -20℃ 下反复冻融。测定每次冻融后的酶活,以未冻融酶液的活力为 100%,计算活性残余率。

**1.5.4 Km 和 Vmax 测定** 以测活缓冲液(80 mM Tris HCl pH 7.8 含 0.05 mol/L Ca<sup>2+</sup>)溶解不同浓度 BTEE 底物, [S]/mol/L: 1 × 10<sup>-5</sup>, 2 × 10<sup>-5</sup>, 5 × 10<sup>-5</sup>, 1 × 10<sup>-4</sup>, 1.5 × 10<sup>-4</sup>, 2 × 10<sup>-4</sup>。在 256 nm 波长处分别测定每个底物浓度下反应 2min 时的 A<sub>256</sub> 并按下列公式计算酶促反应速度 v (μ mol/min):

$$\text{unit/mL} = \frac{A/\text{min} \times 3 \times \text{df}}{0.964 \times v}$$

式中 v 为加入糜蛋白酶的体积(mL),df 为稀释因子,0.964 为 BTEE 在 256 nm 下摩尔吸光系数。

**1.5.5 紫外吸收光谱** 将 0.5 mg/mL 重组糜蛋白酶冻干粉溶解于超纯水中,在光路 1 cm,波长 190~300 nm 范围内进行紫外光谱扫描,确定其特征吸收波长。

**2 实验结果**

**2.1 重组人糜蛋白酶的制备** 含重组质粒 pET-28 a-hCTRB1 的 E.coli BL 21(DE 3) 重组菌的表达结果见 SDS-PAGE 电泳分析(图 1A)。诱导后,在 30 KD 附近有表达条带,与预期结果一致,超声破碎,离心后结果显示上清中基本没有目的条带,因此重组蛋白主要以包涵体形式表达。经重组胰蛋白酶和糜蛋白酶自身的切割,酶原被激活并释放了活性酶,活性酶的大小明显小于酶原形式(图 1B)。

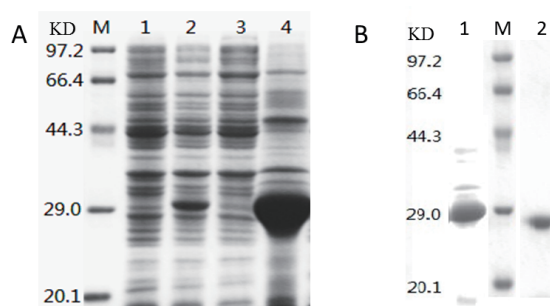


图 1 重组人糜蛋白酶原表达和激活 (A)酶原表达鉴定:M.低分子量蛋白 marker,1.诱导前;2.IPTG 诱导后 3.诱导后上清;4.诱导后包涵体;(B)重组人糜蛋白酶原激活:M.低分子量蛋白 marker, 1.激活前;2.胰蛋白酶激活后

Fig.1 Expression and activation of human chymotrypsinogen (A)Expression of chymotrypsinogen: M.Low molecular weight protein maker; 1, Before induction; 2.After induction with IPTG; 3.Supernatant after induction; 4.Inclusion body after induction;(B)Activation of chymotrypsinogen: M.Low molecular weight protein maker; 1.Before activation; 2.After activation with trypsin

重组人糜蛋白酶包涵体经复性和酶原激活后的活性酶,用 20 mmol/L NaAc-HAC pH 4.2 和 5mmol/L CaCl<sub>2</sub> 透析缓冲液,在酸性条件下透析,随后进行 CM-FF 阳离子交换层析,重组蛋白主要在 200 mmol/L NaCl 浓度下被洗脱,电泳结果如图 2 所示。主条带在 29 KD 附近,但在 14.3~20.1 KD 之间也有明显条带,分析该条带为在还原电泳过程中,由于二硫键被还原而形成的糜蛋白酶第二条肽链(14.4 KD)。洗脱曲线见图 2 和表 1。

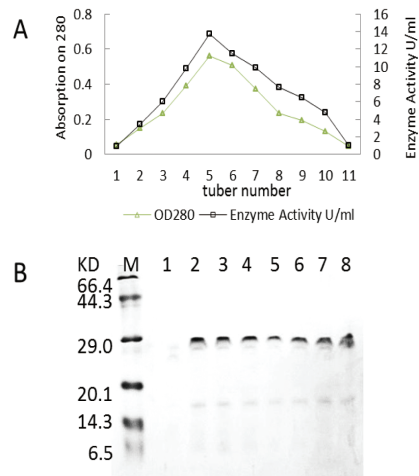


图 2 重组人糜蛋白酶纯化 (A)洗脱曲线;(B)纯化结果 SDS-PAGE 鉴定:M.低分子量蛋白 marker;1.流穿液;2~8 试管. 200 mM NaCl 洗脱液

Fig.2 CM purification of recombinant human chymotrypsin (A)Elution curve of CM-FF; (B) SDS-PAGE detection of purification:M. Low molecular weight protein maker; 1. Flow solution; 2~8 tuber. 3 to 9 of 200 mM NaCl elution

表 1 重组人糜蛋白酶 CM-FF 纯化表 Tab.1 The CM purification table of recombinant human chymotrypsin

步骤	活性 U/ml	总活性 U	总蛋白 mg	比活	回收率%	纯化倍数
上样前	0.8	140.8	35.2	4.0		
纯化后	13.2	132.0	6.0	22.0	93.7	5.5

2.2 重组人糜蛋白酶性质研究 pH 稳定研究(见图 3)发现,重组人糜蛋白酶在酸性 pH 条件下(pH 3~pH 5)活性相对较稳定,酶液在该条件下温育 46 h 任保持约 90%的活性,因此在选择纯化,透析,保持的方法时应选择酸性条件,例如阳离子交换层析 CM 柱选择 pH 4~pH 5,透析时采用 20 mmol/LNaAC-HAC pH 4.2。而相对于 pH 8~pH9 的条件,重组糜蛋白酶在强碱性条件(pH 10~pH 11)下的残余活性较高,说明该酶具有一定的碱耐受性。

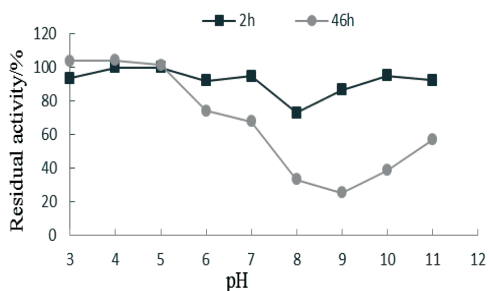


图 3 重组人糜蛋白酶 pH 稳定性

Fig.3 The pH stability of recombinant human chymotrypsin

温度稳定性研究(见图 4)发现重组糜蛋白酶的热稳定性好,25℃下温育 7 h 能保留 80%酶活性,因此该酶的纯化不需要在 4℃下进行,37℃稳定性实验模拟人体内温度,此时糜蛋白酶的半衰期为 7h 左右。长期放置后,酶活力还是会有很大损失,必须注意酶的保存方法。

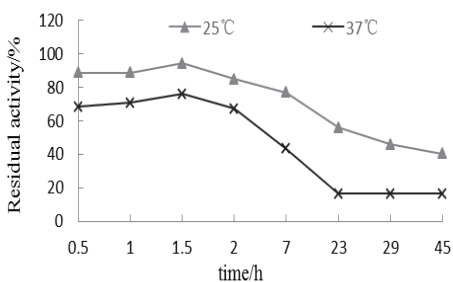


图 4 重组人糜蛋白酶温度稳定性

Fig.4 The temperature stability of recombinant human chymotrypsin

反复冻融稳定性研究(见图 5)发现重组糜蛋白酶冻融一次后酶活力能保持 100%,但从第二次冻融开始活力有明显下降,根据本实验结果能有效提高酶使用次数和应用范围。

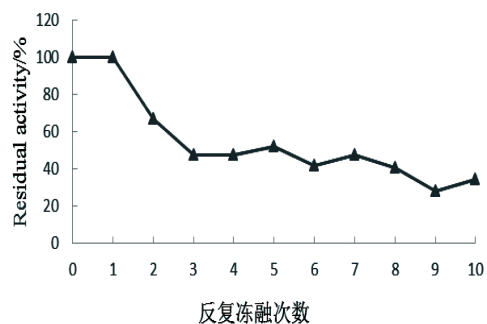


图 5 重组人糜蛋白酶反复冻融稳定性

Fig.5 The Freezing stability of recombinant human chymotrypsin

重组糜蛋白酶 Km 和 Vmax 值测定结果(见图 5),按双倒数作图法,以 1/[S]为横坐标,1/v 为纵坐标作图,经线性拟合,其曲线方程为  $y=0.0071x+0.1041$  ( $R^2=0.9942$ )。得到直线的斜率在纵轴上的截距为 1/V,横轴上的截距为  $-1/Km$ ,可求得 Km 值为 0.067 mmol/L, Vmax 值为 9.6  $\mu$ mol/min。Km 值受 pH 和温度的影响,一般只与酶的性质有关,与酶的浓度无关。不同酶有不同的 Km 值,Km 值可以反映酶与底物的结合效率,Km 值越大说明底物与酶结合率越低,Km 值越小说明酶与底物的结合率越强。

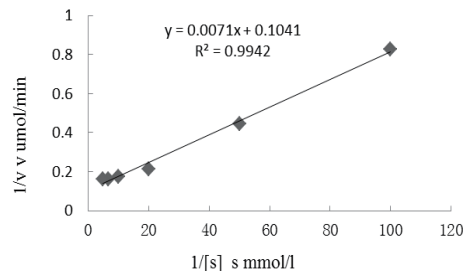


图 6 重组人糜蛋白酶 Km 和 Vmax 值测定

Fig.6 Measurement of Km and Vmax

由于 190~250 nm 是蛋白分子的肽键紫外光谱吸收,最大吸收波长为 228 nm 因此不能作为蛋白的特征吸收峰,所以实验波长范围设定为 240~300 nm,在此范围内有一个吸收峰。如图 6 和 7 所示,最大吸收波长为 281 nm,该处的紫外吸收是一些芳香族氨基酸残基的吸收,并且重组酶与天然酶的最大吸收峰基本一致。

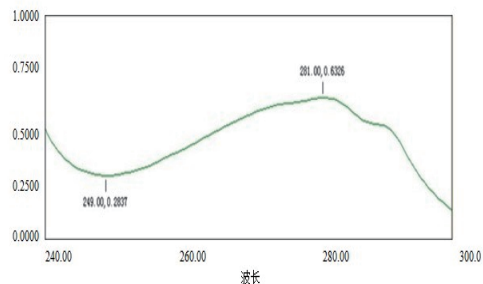


图 6 重组人糜蛋白酶紫外吸收光谱

Fig.6 Ultraviolet absorption spectrum assay of recombinant human chymotrypsin

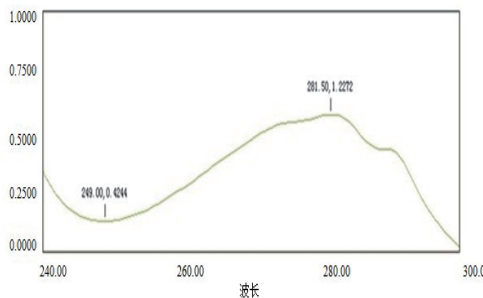


图 7 天然糜蛋白酶紫外吸收光谱

Fig.7 Ultraviolet absorption spectrum assay of native chymotrypsin



### 3 讨论

大肠杆菌表达获得的蛋白通常难以获得其天然构象,而是生成不可溶的包涵体,Haibo Wang,Duoduo Yuan等<sup>[12]</sup>在大肠杆菌中表达了猪源糜蛋白酶C,并进行了复性和纯化。本研究通过原核表达载体成功表达了人源糜蛋白酶,表达形式为包涵体,经包涵体复性和酶原激活,得到了具有较高活性的重组蛋白。理想的纯化方法是提高最终糜蛋白酶活力的主要保证,常用的糜蛋白酶纯化方法有离子交换法和亲和色谱法。Rafik Balti等<sup>[13]</sup>采用Phenyl-Sephadex G-200,DEAE阴离子交换柱层析对乌贼糜蛋白酶进行纯化,这些纯化方法主要是建立在天然糜蛋白酶含有其他杂蛋白酶的基础上,而对于通过复性方法得到的重组蛋白酶纯度已相对较高,大大降低了纯化的难度<sup>[14]</sup>。本实验采用CM阳离子交换层析纯化激活后的酶,活性回收率达到93.7%。

从pH、温度和反复冻融三方面基本讨论了重组人糜蛋白酶的性质:其pH稳定范围为3~5,这主要是因为酸性条件下酶分子的活性中心被掩盖,使酶分子维持相对稳定的状态,这一性质与同一家族的重组胰蛋白酶<sup>[15]</sup>的性质相似,而与胰蛋白酶性质不同的是重组糜蛋白酶在强碱性条件(pH 10~pH 11)下温育46 h能保持40%~60%残余活性,说明该酶具有一定的碱耐受性。25℃下重组酶比较稳定,并且反复冻融需要控制在尽量少的次数内,这些研究为该酶的纯化、使用和保存提供了参考依据。Km、Vmax值测定,和紫外吸收光谱分析主要从重组酶的动力学和紫外光谱方面分析了其性质。本实验结合不同侧面探讨了重组人糜蛋白酶的表达、纯化和基本性质,为今后的进一步研究提供了有效的参考。□

### 参考文献

[1] Walter A. Chymotrypsin: Molecular and Catalytic Properties[J]. *Clinical biochemistry*, 1986, 16: 317-322.

[2] Satish KS, Thomas R. Activation of Bovine Chymotrypsinogen A. Isolation and Characterization of  $\mu$ - and  $\omega$ -Chymotrypsin[J]. *Biochemistry*, 1986, 16: 1008-1013.

[3] Freer ST, Kraut J, Robertus JD. Chymotrypsinogen 2, 5-crystal structure, comparison with  $\alpha$ -chymotrypsin, and implications for zymogen activation[J]. *Biochemistry*, 1975, 9(9): 1997-2009.

[4] Kara NE, Anthony VR, Carol F. Broad specificity alkaline proteases efficiently reduce the visual scaling associated with soap-induced xerosis[J]. *Arch Dermatol Res*, 2001, 293: 500-507.

[5] 黄茂华, 赵宪平. 糜蛋白酶临床应用进展[J]. *医药综述*, 2005, 10: 462-463.

[6] 何秀莹, 何兆衡. 糜蛋白酶致过敏反应 6 例[J]. *广东药学*, 2001, 11(1): 23.

[7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 189-229.

[8] 张晓彦, 李素霞, 顾俊杰, 等. 重组羧肽酶原B的体外变复性研究[J]. *分子科学学报*, 2005, 21(4): 51-57.

[9] István V, László G, William JR. Expression of rat chymotrypsinogen in yeast: a study on the structural and functional significance of the chymotrypsinogen propeptide[J]. *FEBS Letters*, 1996, 379: 139-142.

[10] Brian CW. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin[J]. *Biochem, Physiol*, 1959, 37(12): 1393-1399.

[11] Rao KN, Lombardi Anal B. Substrate solubilization for the Hummel alpha-chymotrypsin assay[J]. *Biochem*, 1975, 65: 548-551.

[12] Wang HB, Yuan DD, Xu R. Purification, cDNA cloning, and recombinant expression of chymotrypsin C from porcine pancreas [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43: 568-575.

[13] Rafik B, Faeh B, Ali B, et al. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterisation [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130: 475-484.

[14] 张洛盛, 吴珊, 吴倩, 等. 重组羧肽酶原B突变体C383A的纯化与性质研究[J]. *食品与药品*, 2010(9): 308-312.

[15] 纪德凯, 吴倩, 李素霞. 重组人II型胰蛋白酶的性质及初步应用研究[J]. *食品与药品*, 2010(12): 384-388.

### (上接第143页)

血管[J]. *中国医学影像技术*, 2009, 25(6): 932-934.

[8] 殷香保, 黎洪浩, 陈汝福, 等. 聚乳酸阿霉素纳米微粒的制备及体内外释药的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(2): 227-229.

[9] 刘志, 严德辉, 陈辉. NS-398联合表阿霉素对肝癌HepG2细胞增殖及survivin表达的影响[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(8): 619-623.

[10] 药晋鹏, 戴立里, 李娟, 等. 载阿霉素的液-固相变型原位凝胶注射治疗兔VX2肝癌HIFU消融后残癌[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2012, 9(11): 814-818.

[11] Menon SK, Mistry BR, Joshi KV, et al. Analytical detection and method development of anticancer drug Gemcitabine HCl using gold nanoparticles[J]. *Spectrochim Acta*

*A Mol Biomol Spectrosc*, 2012, 10(94 C): 235-242.

[12] 威宁, 杜明华. 载阿霉素靶向制剂治疗肝癌研究现状[J]. *医学综述*, 2012, 18(11): 1663-1665.

[13] 李宁, 于力方, 王珊, 等. 阿霉素纳米微粒在肿瘤治疗中的应用研究[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(30): 5836-5837, 5867.

[14] 张阳德, 张峰, 潘一峰, 等. 表阿霉素脂质体纳米微粒治疗大鼠移植性肝癌的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(25): 3078-3081.

[15] 刘奕明, 林爱华, 邓时贵, 等. 甘草酸表面修饰阿霉素壳聚糖纳米微粒在小鼠体内的组织分布[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(1): 66-71.

## 重组人糜蛋白酶表达、纯化和性质研究

作者: [刘晓](#), [李素霞](#), [LIU Xiao](#), [LI Su-xia](#)  
作者单位: [生物反应器工程国家重点实验室, 华东理工大学, 上海200237](#)  
刊名: [中国生化药物杂志](#)   
英文刊名: [Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics](#)  
年, 卷(期): 2014(2)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgshyzz201402053.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgshyzz201402053.aspx)