

皱纹盘鲍 *Hdh-MMP-1* 基因 cDNA 的克隆及原核表达

段雪昆¹, 杜翠红^{1,2}, 胡健健¹, 蔡秋凤^{1,2}, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 水产品深加工技术国家地方聚合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 利用同源克隆方法和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术, 从皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 肌肉组织中克隆得到基质金属蛋白酶-1 基因 (*Hdh-MMP-1*) cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: KR537291)。结果表明, *Hdh-MMP-1* cDNA 全长 2136 bp, 其中 ORF 长度为 1551 bp, 编码区含有 516 个氨基酸残基, 预测其分子质量为 58.94 ku, 理论等电点为 5.99。 *Hdh-MMP-1* 具有 MMPs 家族典型的 N-端前肽区、催化区、铰链区和 C-端类血色素结合区。利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 软件对该基因编码蛋白质高级结构进行了预测分析。氨基酸序列相似性结果显示, *Hdh-MMP-1* 不仅与多种生物 *MMP-1* 基因具有序列相似性, 且与某些软体动物和虫类的 *MMP-14* 及 *MMP-19* 也具有序列相似性。多序列比对结果显示, *Hdh-MMP-1* 与红螺鲍、杂色鲍、美洲牡蛎的 *MMP-1* 相似性分别为 95.29%、82.35%、38.85%。随后, 构建了表达载体 pET28a-catMMP-1, 利用大肠杆菌原核表达系统, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功对该蛋白质催化区进行异源表达。

[关键词] 皱纹盘鲍; 基质金属蛋白酶; cDNA 克隆; 生物信息学; 原核表达

[中图分类号] Q 785; S 917.4

cDNA Cloning and Prokaryotic Expression of Matrix Metalloproteinase-1 from *Haliotis discus hannai*

DUAN Xue-kun¹, DU Cui-hong^{1,2}, HU Jian-jian¹, CAI Qiu-feng^{1,2}, LIU Guang-ming^{1,2}, CAO Min-jie^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. National and Local Joint Engineering Research Center of Deep Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: Matrix metalloproteinase-1 gene (*Hdh-MMP-1*) from the muscle of abalone (*Haliotis discus hannai*) was cloned by RT-PCR and RACE technology (GenBank accession number KR537291). The full-length of cDNA *Hdh-MMP-1* was 2136 bp, including an open reading frame (ORF) of 1551 bp coding 516 amino acid residues with an estimated molecular weight of 58.94 ku and a theoretical pI of 5.99. The *Hdh-MMP-1* contains N-terminal prodomain, catalytic domain, hinge region and C-terminal hemopexin domain, which was typical in matrix metalloproteinases. Higher-order structure of *Hdh-MMP-1* was predicted using SOPMA and SWISS-MODEL. The results of multiple sequence alignment analysis showed that there was about 38.9% ~ 95.3% identities in amino acid sequence with some other organisms. Prokaryotic expression plasmid pET28a-catMMP-1 containing the catalytic domain of *MMP-1* was constructed. The recombinant *MMP-1* was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 cells.

Keywords: *Haliotis discus hannai*; matrix metalloproteinases; cDNA cloning; bioinformatics; prokaryotic expression

[收稿日期] 2016-01-03

[修回日期] 2016-03-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31471640); 国家海洋局海洋公益性行业科研专项 (201305015)

[作者简介] 段雪昆 (1990—), 女, 硕士生, 主要从事水产品生物化学与分子生物学研究。通信作者: 曹敏杰 (1964—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质化学及水产品深加工研究, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

0 引言

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类金属离子依赖型内肽酶, 其作为降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要酶类, 能够参与生物体多种生理和病理过程。大多数 MMPs 在机体组织中活性不高, 但受炎症反应、生长因子、激素等因素调控, 其活性可被激发。此外, MMPs 的活性也受其内源性抑制剂 TIMP 调控^[1]。MMPs 是一个蛋白酶家族, 根据其成员的底物专一性、序列相似性、结构域组成及分布位置, 可分为明胶酶 (gelatinase)、胶原酶 (collagenase)、基质溶解素 (stromelysins)、膜型基质金属蛋白酶 (membrane-type MMPs, MT-MMPs) 以及其他类型 MMPs^[2]。基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 属于金属蛋白酶家族中的胶原酶, 几乎能降解 ECM 的所有成分, 广泛参与机体的多种生理过程。

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 别名鲍、石决明、盘大鲍等, 是原始腹足目鲍螺科鲍螺属的一种, 肉质肥美, 营养价值高, 为海产品中的珍品, 也是我国重要的海水养殖经济物种。但近年来, 由于养殖水体水质下降, 养殖品种的退化, 导致人工养殖鲍抗病力低, 从而造成了巨大的经济损失。因此, 对病原体的免疫防治是鲍鱼养殖业中的关键环节之一^[3]。鲍鱼主要依靠先天性免疫抵御病害, 即依靠血细胞的吞噬作用和血淋巴中各种非特异性免疫活性因子的复杂作用来实现机体对外来物的防御^[4]。Wang 等的研究^[5]指出, 杂色鲍在外源细菌刺激后, 血细胞中 3 种 MMPs 的相对表达量显著上升。可见 MMPs 在鲍鱼的免疫应答过程中发挥一定作用。Ornella 等^[6]从转录水平分析细菌感染红螺鲍前后血细胞中相关蛋白质的变化情况, 发现 MMP-1 参与了红螺鲍早期免疫应答, 很有可能是通过对 IV 型胶原蛋白的分解作用发挥其生物学功能。关于水产动物 MMPs 的研究, 在鱼类方面已有较多报道^[7], 但在贝类方面则鲜有报道, 其在免疫应答过程中的作用机理的研究也不够深入。本研究通过同源克隆方法和 RACE 技术, 得到了皱纹盘鲍基质金属蛋白酶-1 基因 (*Hdh-MMP-1*) 的全长 cDNA 序列, 并对其进行了序列分析、序列相似性比对、理化参数及高级结构预测, 进一步构建了大肠杆菌表达载体, 成功对该重组蛋白进行异源表达。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

鲜活皱纹盘鲍, 购于福建省厦门市集美菜市场, 即杀后迅速取其肌肉组织进行总 RNA 提取。

1.1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂购自 Roche; PrimeScript™ II 1st Strand cDNA 合成试剂盒、RACE 试剂盒 (5' - Full RACE Kit with TAP、3' - Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase)、rTaq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶、DL2000 DNA marker、限制性内切酶 *Nde* I、*Eco*R I 等均购自宝生物 (大连) 有限公司; 质粒小提试剂盒和 Universal DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 大肠杆菌 Top10/BL21、原核表达载体 pET-28a 为本实验室保存; 镍离子 (Ni^{2+}) 亲和层析离心柱采用赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific) 产品。

1.2 引物设计及合成

根据 GenBank 中报道的相关物种 MMP-1 的基因序列, 即: 红螺鲍 *Haliotis rufescens*, AIZ03375.1; 杂色鲍 *Haliotis diversicolor*, ABY87417.1; 美洲牡蛎 *Crassostrea virginica*, AJZ73171.1, 利用 Primer 5.0 软件设计兼并引物并对其进行评价, 最终确定正向引物 MMP-F 和反向引物 MMP-R 进行皱纹盘鲍 MMP-1 ORF 部分基因片段扩增及测序, 并以该基因片段为基础设计用于 3' RACE 的特异性正向引物 MMP-3F1、MMP-3F2 及用于 5' RACE 的特异性反向引物 MMP-5R1、MMP-5R2。根据 *Hdh-MMP-1* cDNA 全序列设计催化区表达引物, 并在正反向引物 5' 端加入 *Nde* I、*Eco*R I 酶切位点。引物序列如

表 1 所示。所有引物均由铂尚生物技术（上海）有限公司合成。

表 1 本研究所用引物
Tab.1 PCR primers used in this research

引物名称 Names of primers	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	用途 Use
MMP-F	AAGTGGCCAAATAATGAAGTA	ORF 部分基因片段扩增 Partial gene fragment amplification of ORF
MMP-R	TTACTGGAGGAAGCTAGGAA	ORF 部分基因片段扩增 Partial gene fragment amplification of ORF
MMP-3F1	CGCCATTGTCACAGCTTC	3′RACE outer
MMP-3F2	GGATGTCGAATGTGTGTGC	3′RACE inner
MMP-5R1	GTACCGGAAGGCGTATGTG	5′RACE outer
MMP-5R2	CGTCATCATCAAAGTGGGTG	5′RACE inner
MMP-eF	<u>CATATG</u> * AAGTGGCCAAATAATGAAGTA	催化区原核表达 Prokaryotic expression of catalytic area
MMP-eR	GAATTC* <u>TTATGGGCGGTGAGGATTA</u>	催化区原核表达 Prokaryotic expression of catalytic area

说明：下划线为限制性内切酶识别位点。
Notes: the recognition sites of restriction enzyme are underlined.

1.3 皱纹盘鲍肌肉组织总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

利用 Trizol 法提取皱纹盘鲍肌肉总 RNA，并测定 RNA 浓度及纯度。按 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA 合成试剂盒说明书操作合成第一链 cDNA，按 RACE 试剂盒说明书操作合成 3′/5′RACE-ready cDNA，置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.4 PCR 扩增及 RACE 扩增

采用上述 cDNA 为模板，MMP-F、MMP-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应采用 25.0 μL 体系：ddH₂O 17.2 μL，10 × PCR Buffer 2.5 μL，dNTPs 2.0 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1.0 μL，模板 cDNA 1.0 μL，rTaq DNA 聚合酶 0.3 μL。反应条件：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 30 s；59 ℃ 退火 30 s；72 ℃ 延伸 60 s；30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min，4 ℃ 保存。

RACE 扩增采用巢式-末端快速扩增（nested-RACE）方法。以 3′/5′ RACE-ready cDNA 作为第一轮 PCR 模板，使用特异性外部引物（MMP-3F1 /MMP-5R1）和接头引物进行 PCR 扩增；再以第一次扩增产物作为模板，使用特异性内部引物（MMP-3F2 /MMP-5R2）与接头引物进行第二轮 PCR 扩增。两轮 PCR 均采用上述相同反应体系和条件。

将以上 PCR 扩增产物用质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后纯化回收，将回收产物与 pMD18-T 载体连接，转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞中，挑取阳性克隆送往上海立菲生物技术有限公司进行测序。

1.5 生物信息学分析

应用 DNASar 软件进行开放阅读框（ORF）分析并将其翻译为相应的氨基酸序列；利用 NCBI（美国国家生物技术信息中心数据库）在线 CDD 分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对 *Hdh-MMP-1* 蛋白质保守结构域进行预测。用 NCBI 中 BLAST 工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对和相似性分析；用 Motif Scan(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)分析蛋白质关键氨基酸位点；用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)工具对该蛋白质的理化性质进行预测和分析；采用 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽预测；通过 SOPMA(http://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)在线预测 *Hdh-MMP-1* 蛋白质二级和三级结构；利用 PyMOL 软件对模型进行相关分析及显示；利用 DNAMAN 软件进行多序列比对。

1.6 *Hdh-MMP-1* 表达载体的构建

构建 *Hdh-MMP-1* 催化区克隆载体 pMD18T-catMMP-1，将测序正确的质粒及 pET-28a 质粒分别

用 *Nde* I、*Eco*R I 双酶切处理，用 T4 DNA 连接酶将目的基因片段与载体酶切产物于 16 ℃ 连接 18 h，转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞中，构建重组质粒 pET28a-catMMP-1。

1.7 重组 *Hdh-MMP-1* 的诱导表达及纯化

将测序验证正确的重组质粒 pET28a-catMMP-1 转化到大肠杆 BL21（DE3）中，挑取阳性重组子接种至 5 mL LB 液体培养基（含卡那霉素终质量浓度为 25 mg/L）中，37 ℃ 摇床振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右，加入终浓度 0.8 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）诱导表达 3.5 h，SDS-PAGE 鉴定诱导表达结果。将上述鉴定的阳性菌接种于 100 mL LB 液体培养基（含卡那霉素终质量浓度为 25 mg/L）中，大量诱导表达。收集菌体重悬于 20 mmol/L Tris-HCl（pH = 8.0，含 150 mmol/L NaCl），超声波破菌，8000 r/min 离心 5 min，收集沉淀。将沉淀用含 8 mol/L 尿素的 20 mmol/L Tris-HCl（pH = 8.0，含 150 mmol/L NaCl）的缓冲液重悬，静置过夜，12000 r/min 离心 15 min，收集上清液。参照说明书，用 HisPur™ Ni-NTA Spin Columns 纯化重组蛋白。

1.8 重组蛋白的复性及活性检测

重组蛋白的复性采用透析复性的方法：将 1.7 中制备的洗脱样品装入截留分子质量为 3 ku 的透析袋中，将透析袋置于 100 倍体积分含 6 mol/L 尿素的 20 mmol/L Tris-HCl（pH = 8.0，含 150 mmol/L NaCl）缓冲液中透析，每 5 h 更换透析液，同时缓慢降低透析液中尿素浓度（6→4→2→1→0 mol/L 尿素）。取出透析袋中的样品，在 4 ℃、12000 r/min 条件下离心 20 min，上清液部分即为复性后的重组蛋白。

重组蛋白的活性检测采用明胶酶谱法：制备 SDS-PAGE 凝胶时，将 0.5 mL 去离子水替换成等体积 8 g/L 明胶溶液；电泳结束后用质量分数 2.5% Triton X-100 充分洗涤凝胶，除去 SDS 使蛋白酶复性；将凝胶置于孵育液（20 mmol/L Tris-HCl，pH = 8.0，含 5 mmol/L CaCl₂）中 37 ℃ 孵育 16 h 后用考马斯亮蓝染色，脱色完成后，能够降解明胶的蛋白酶呈现透明亮带。

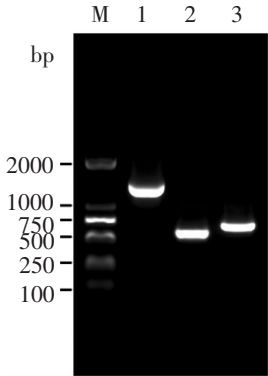
2 结果

2.1 *Hdh-MMP-1* cDNA 的克隆

提取皱纹盘鲍肌肉组织总 RNA，测其质量浓度为 879.2 g/L，A₂₆₀/A₂₈₀ = 2.07，A₂₆₀/A₂₃₀ = 2.12，表明该 RNA 符合要求，可用于后续实验。通过相应 PCR 扩增，获得皱纹盘鲍 MMP-1 编码区部分基因片段、3'-RACE 扩增基因片段和 5'-RACE 扩增基因片段（见图 1）。将克隆得到的编码区基因片段和非编码区基因片段进行拼接，最终获得 *Hdh-MMP-1* 基因 cDNA 全序列。该 cDNA 全长 2136 bp，包括 5'非编码区（5'UTR）67 bp，3'非编码区 UTR（3'UTR）519 bp，开放阅读框（ORF）1551 bp，编码 516 个氨基酸残基（见图 2）。该基因序列已登录 GenBank，登录号为 KR537291。

2.2 *Hdh-MMP-1* 序列分析

利用 NCBI 在线 CDD 分析软件对 *Hdh-MMP-1* 蛋白质的结构域进行预测（见图 2）。结果显示，该蛋白质包含 N-端前肽区（prodomain）、催化区（catalytic domain）和 C-端类血红素结合区（hemopexin domain）3 个结构域，为典型的 MMP 蛋白质结构。氨基酸序列分析结果表明，*Hdh-MMP-1* 含有 MMPs 两个保守结构片段，即位于前肽区的半胱氨酸开关和位于催化区的催化活性中心 HEXGHXXGXXH 序列（见图 3）。此外，铰链区（hinge region）是催化区与类血红素结合区之间的连接肽段；类血红素结合区包含 4 个类似的 β 折叠，形成一种四叶片螺旋桨式



说明：M-DNA marker DL2000；泳道 1-中间基因片段；泳道 2-5'-RACE 扩增基因片段；泳道 3-3'-RACE 扩增基因片段。

Notes: lane M-DL2000 marker; lane 1-PCR product of partial ORF; lane 2-PCR product of 5'-RACE; lane 3-PCR product of 3'-RACE.

图 1 *Hdh-MMP-1* 基因 PCR 扩增产物

Fig.1 The PCR products of *Hdh-MMP-1*

结构 (four-bladed β -propeller structure)^[8]。经 SignalP 4.1 Server 软件分析, 该氨基酸序列无信号肽。

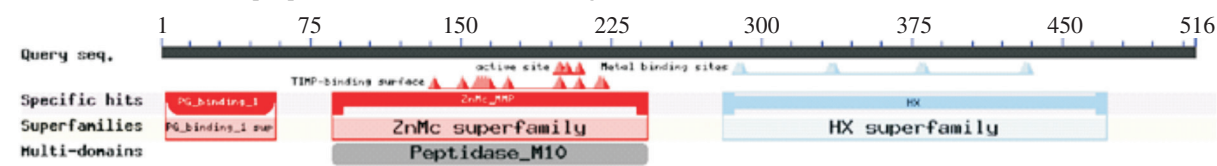


图2 *Hdh-MMP-1* 蛋白质结构域预测

Fig.2 Predicted conserved protein domains of *Hdh-MMP-1*

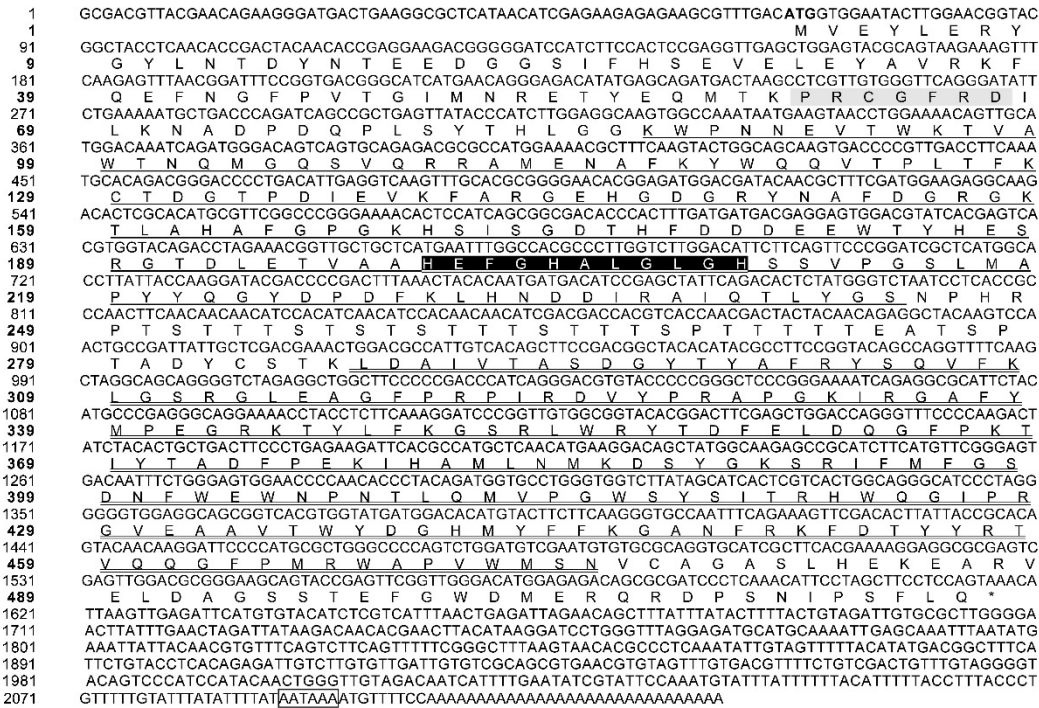


图3 *Hdh-MMP-1* 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Hdh-MMP-1*

说明:催化区用单下划线表示;类血红素结合区用双下划线表示;黑底所示序列为催化活性中心;灰底所示序列为半胱氨酸开关;方框所示为加尾信号。

Notes:the underlined sequence is catalytic domin;the double underlined sequence is hemopexin domain;the sequence in black background is catalytic site sequence; the sequence in grey background is cysteine switch; the putative polyadenylation signal is boxed.

2.3 蛋白质理化参数及高级结构预测

2.3.1 理化性质分析

根据 ProtParam 预测结果, *Hdh-MMP-1* 蛋白质的分子质量为 58.94 ku, 理论等电点为 5.99。基因编码的 516 个氨基酸中, 带有正电荷的碱性氨基酸精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 共 54 个, 带有负电荷的酸性氨基酸天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu) 共 63 个。该蛋白质的不稳定系数和疏水值分别为 26.17 和 -0.717, 是一种稳定的亲水性蛋白质。

2.3.2 高级结构预测

一般认为, 驱动蛋白质折叠的主要动力是疏水效应。蛋白质主链的折叠产生由氢键维系的蛋白质的二级结构, 并由此进一步折叠成球形。常见的二级结构元件有 α 螺旋、 β 折叠 (延伸链)、 β 转角和无规则卷曲等。用 SOPMA 对 *Hdh-MMP-1* 二级结构进行预测, 结果表明, *Hdh-MMP-1* 蛋白质主要由 4 种二级结构元件组成, 其中 α 螺旋结构占 23.84%, β 转角结构占 12.40%, 延伸链占 23.45%, 无规则卷曲占 40.31%。

蛋白质结构的复杂性和功能的多样性主要体现在球状蛋白质，每种球状蛋白质都有其独特的三级结构。本研究利用 SWISS-MODEL 对 *Hdh-MMP-1* 进行同源建模，选取 PDB 数据库中与目的蛋白序列一致性高于 30% 的人 *MMP-1*（PDB: 1SU3）（见图 4a）作为建模模板，模拟了 *Hdh-MMP-1* 的三级结构（见图 4b），并用 PyMOL 软件对模型进行相关分析。其中，催化区主要由 α 螺旋结构和无规则卷曲组成，类血红素结合区主要由 β 转角和无规则卷曲组成。图 4c 所示为 *Hdh-MMP-1* 催化结构域中催化活性中心¹⁹⁹HEFGHALGLGH²⁰⁹和半胱氨酸开关⁶¹PRCGFRD⁶⁷空间位置。其中，H199、H203 和 H209 为 3 个与 Zn^{2+} 形成配位键的组氨酸残基，C63 为半胱氨酸开关中的半胱氨酸残基，见图 4d。

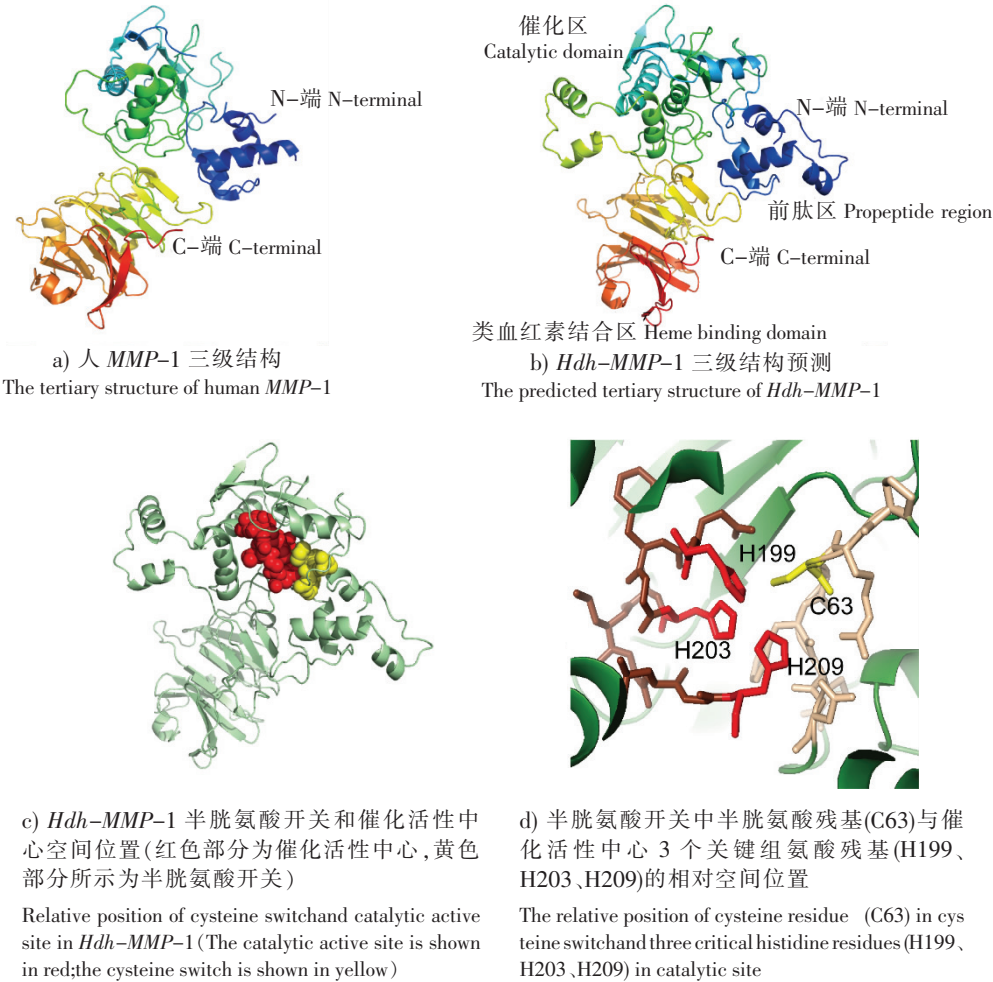


图 4 *Hdh-MMP-1* 的三级结构预测

Fig.4 The predicted tertiary structure of *Hdh-MMP-1*

2.4 序列相似性分析

通过 NCBI BLAST 工具进行 DNA 序列相似性搜索，结果表明，该序列与红螺鲍、杂色鲍等鲍类 *MMP-1* 基因有序列相似性。此外，将克隆得到的基因片段翻译成氨基酸进行 BLAST 后发现该蛋白质与某些软体动物和虫类的 *MMP-14* 及 *MMP-19* 也具有序列相似性。

利用 DNAMAN 软件对不同物种 *MMP-1* 氨基酸序列进行比对（见图 5），结果表明 *Hdh-MMP-1* 与红螺鲍 *MMP-1*（*Haliotis rufescens*, AIZ03375.1）一致性为 95.29%，与杂色鲍 *MMP-1*（*Haliotis diversicolor*, ABY87417.1）一致性为 82.35%，与美洲牡蛎 *MMP-1*（*Crassostrea virginica*, AJZ73171.1）一致性为 38.85%。在几种无脊椎软体动物中，*MMP-1* 在催化结构域相对保守。

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

中存在糖基化位点,而大肠杆菌原核表达系统无法对外源蛋白进行翻译后修饰,导致蛋白质无法正确折叠从而没有酶活性。

3 讨论

生物体内多种生理过程如发育、内稳态的维持和组织修复等,都与 ECM 的精确重构密切相关。ECM 由蛋白聚糖和纤维蛋白如胶原蛋白等组成,其中胶原蛋白是其含量最丰富的组分。除提供机械支持外,ECM 也参与生物信号由胞外向胞内的传递,从而影响多种细胞内应答。同时,ECM 也会响应各种胞内信号而不断改变,主要包括相关组分的合成、积累和降解过程^[9]。ECM 对大多数蛋白酶稳定,但在基质金属蛋白酶(MMPs)的作用下可发生降解。

作为降解 ECM 的主要酶类,MMPs 在生物体内有着极重要的作用。有研究证实,由 MMPs 介导的胶原蛋白和弹性蛋白的降解主要发生在发育、损伤修复和多数炎症性疾病中^[10-11]。但目前对该蛋白酶的研究重点还是其参与人体某些病理过程如肿瘤细胞凋亡、转移、血管生成等方面的作用机制。在前期研究中,笔者已从鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和刺参(*Stichopus japonicus*)中克隆得到了 MMP-2 (明胶酶 A) 基因。对鲤鱼 MMP-2 的催化区进行了异源表达,并对其降解胶原蛋白的特性进行了研究^[12]。本研究结果显示,Hdh-MMP-1 包含 N-端前肽区、催化区、铰链区和 C-端类血红素结合区等典型的 MMPs 蛋白质结构。其中,半胱氨酸开关中的半胱氨酸残基(C)能与 Zn^{2+} 形成分子内复合物(图 4c,图 4d),阻碍活性位点与 Zn^{2+} 的结合从而使蛋白酶丧失生物学活性,故半胱氨酸开关与 MMPs 酶原的激活直接相关^[13]。催化中心 HEXGHXXGXXH 中的 3 个组氨酸残基(H)可与 Zn^{2+} 配体形成配位键,是其发挥生物学活性所必需的关键氨基酸^[14]。催化区与类血红素结合区之间的铰链区,其柔韧性可使两个区域分别向不同朝向运动。类血红素结合区与底物识别有关,此外,由类血红素结合区引导的蛋白质间相互作用对于 MMPs 自身的激活、定位和降解过程具有重要作用^[15]。基质金属蛋白酶家族具有相似的结构域和功能位点,同种类 MMPs 保守性较高,不同种类 MMPs 在某些区域和位点也具有很高的保守性。在本研究中,BLAST 结果表明,Hdh-MMP-1 蛋白质与某些软体动物和虫类的其他类型 MMPs 具有序列相似性,也间接证明了这一点^[16]。

将 Hdh-MMP-1 基因催化区插入原核表达载体 pET-28a,成功构建表达质粒 pET28a-catMMP-1,并转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞,经 IPTG 诱导后高效表达分子质量约为 26 ku 的重组蛋白。但该条带与预测的分子质量 18.66 ku 相差较大,扣除载体和酶切位点 4 ku 左右,仍有一定偏差。推测可能是由于 His 标签中连续 6 个碱性氨基酸组氨酸带有较强正电荷,从而影响了蛋白质在 SDS-PAGE 中的迁移率,导致蛋白质表观分子质量偏大^[17]。

重组蛋白在大肠杆菌中的高水平表达常常导致包涵体的形成。虽然包涵体中富含重组蛋白,且易于分离纯化,但其复性率一般都很低。通过降低重组菌的诱导温度,在培养基中添加促溶物等方法可减少包涵体的形成;也可以用变性剂溶解包涵体蛋白质后用稀释、透析、渗滤等方法去除变性剂,使蛋白质折叠复性^[18-19]。本研究采用 8 mol/L 尿素溶解包涵体蛋白质,并采用透析法去除变性剂进行复性。但明胶酶谱结果显示重组蛋白不具有降解明胶的生物活性,推测有可能是由于本研究所用复性条件不适宜于重组蛋白的正确折叠,也可能是由于该蛋白质因含有糖基化位点而使大肠杆菌原核表达系统无法对外源蛋白进行翻译后修饰。为获得有生物活性的蛋白酶,笔者拟更换表达载体,实现重组蛋白的可溶表达或采用酵母真核表达系统对其进行表达。

尽管 MMPs 在人体内参与的大量生理及病理过程已有很多报道,但其在鲍鱼体内的生理功能尚不明确。今后可利用 qPCR 和 Western blot 技术分别从基因和蛋白质水平上研究该蛋白酶转录水平变化规律及其在生物体内的存在形式,还可研究胶原酶和明胶酶在鲍鱼胶原蛋白降解过程中的协同作用等,进一步阐明 MMPs 基因结构与功能关系、体内表达的变化规律及其参与非特异性免疫应答的机制。

[参考文献]

- [1] NAGASE H, VISSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 2006, 69(3): 562-573. DOI:10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
- [2] VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 2003, 92(8): 827-839. DOI:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
- [3] 任洪林, 柳增善, 王克坚. 鲍免疫相关基因和蛋白的研究进展. *遗传*, 2009, 31(4): 348-358. DOI:10.3724/SP.J.1005.2009.00348.
- [4] 周小龙, 郑云云, 董迎辉, 等. 海洋贝类功能基因的研究进展. *海洋科学*, 2012, 36(12): 99-107.
- [5] WANG K J, REN H L, XU D D, et al. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(11): 1326-1347. DOI:10.1016/j.dci.2008.04.007.
- [6] CHOVAR-VERA O, VALENZUELA-MUÑOZ V, GALLARDO-ESCÁRATE C. Molecular characterization of collagen IV evidences early transcription expression related to the immune response against bacterial infection in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 241-248. DOI:10.1016/j.fsi.2014.11.007.
- [7] 曹敏杰, 张玲, 王慈. 鱼类基质金属蛋白酶研究进展. *集美大学学报 (自然科学版)*, 2014, 19(5): 321-329.
- [8] LI J, BRICK P, OHARE M C, et al. Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed β -propeller. *Structure*, 1995, 3(6): 541-549. DOI:10.1016/S0969-2126(1)00188-5.
- [9] PEDERSEN M E, VUONG T T, SISSEL B, et al. Matrix metalloproteinases in fish biology and matrix turnover. *Matrix Biology Journal of the International Society for Matrix Biology*, 2015, 29: 86-93. DOI:10.1016/j.matbio.2015.01.009.
- [10] VAN DOREN S R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biology*, 2015, 44/46: 224-231. DOI:10.1016/j.matbio.2015.01.005.
- [11] FIELDS G B. Interstitial collagen catabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(13): 8785-8793. DOI:10.1074/jbc.R113.451211.
- [12] WANG C, ZHAN C L, CAI Q F, et al. Expression and characterization of common carp (*Cyprinus carpio*) matrix metalloproteinase-2 and its activity against type I collagen. *Journal of Biotechnology*, 2014, 177(7): 45-52. DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.02.019.
- [13] VAN WART H E, BIRKEDAL-HANSEN H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(14): 5578-5582. DOI:10.1073/pnas.87.14.5578.
- [14] JIANG W, BOND J S. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Letters*, 1992, 312(2): 110-114. DOI:10.1016/0014-5793(92)80916-5.
- [15] OVERALL C M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity. *Molecular Biotechnology*, 2002, 22(1): 51-86. DOI:10.1385/MB.22.1.051.
- [16] MASKOS K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*, 2005, 87(3): 249-263. DOI:10.1016/j.biochi.2004.11.019.
- [17] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因. *植物生理学报*, 2000, 26(1): 64-68.
- [18] 方敏, 黄华樑. 包涵体蛋白体外复性的研究进展. *生物工程学报*, 2001, 17(6): 608-612.
- [19] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(4): 482-485.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)