

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(1):67–72; 4 January 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140188

来源于铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 所产蛋白酶 PT121 克隆表达及其在小肽合成上的应用

朱富成¹, 庄宇¹, 何冰芳^{1,2*}

南京工业大学,¹ 生物与制药工程学院,² 药学院, 江苏 南京 211816

摘要: 【目的】基于前期筛选到的 *P. aeruginosa* PT121 所产有机溶剂耐受性蛋白酶, 本研究对该蛋白酶进行克隆表达, 研究了重组蛋白的酶学性质及小肽合成上的应用。【方法】参考文献中报道的相似蛋白酶 pseudolysin 设计引物从菌株 PT121 基因组中克隆到耐有机溶剂蛋白酶 PT121 基因 *lasB*。构建诱导表达重组质粒 pET22b-*lasB*, 于大肠杆菌中进行表达。考察蛋白酶 PT121 酶学性质及小肽合成上的应用。【结果】序列分析表明 *lasB* 基因编码信号肽、前肽及成熟肽 3 个部分, 成熟肽部分含有 301 个氨基酸, 分子量约 33 kDa, 属于金属蛋白酶 M4 家族。通过破碎条件优化, 一步法制备得到较为纯净的重组蛋白酶 PT121, 其比活力达 7700 U/mg, 该酶呈现了较高的热稳定性, pH 稳定性及溶剂耐受性, 与野生菌 *P. aeruginosa* PT121 所产蛋白酶性质一致。在 50% DMSO 体系中高效催化合成了多种小肽, 其中阿斯巴甜前体 (Cbz-Asp-Phe-NH₂) 产率高达 91%。【结论】蛋白酶 PT121 基因在大肠杆菌中克隆表达为进一步研究相关催化机理及分子改造奠定了基础。

关键词: 蛋白酶 PT121, 基因 *lasB*, 异源表达, 有机溶剂耐受性

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209(2015)01-0067-06

微生物能够产生多种肽类天然产物, 其中有些肽类可以具有非常好的抗菌活性, 可作为潜在药物进行研发^[1]。肽类是介于氨基酸和蛋白质之间的物质, 可分为寡肽 (2–20 肽) 和多肽 (20–50 肽)。其中寡肽具有重要的生物活性广泛应用于食品、医药领域, 如阿斯巴甜、胸腺五肽, 六胜肽^[2–4]等, 随着非水酶学的兴起, 目前, 蛋白酶在有机相中催化小肽合成已成为催化领域的研究热点, 因此挖掘与开发在有机溶剂中高效催化小肽合成的蛋白酶成为关键。

弹性蛋白酶 (Pseudolysin, EC3.4.24.26) 是一类来源于金属蛋白酶 M4 家族的水解酶^[5]。由于宽泛的溶剂耐受性及高效催化合成小肽特性, 弹性蛋白酶被认为具有较大的潜在应用价值^[6–9]。天然耐有机溶剂蛋白酶 PT121 是由本实验室筛选到的一株铜绿假单胞杆菌 (*P. aeruginosa*) 所分泌的弹性蛋白酶^[10]。该酶对多种有机溶剂显示了超强的耐受性, 在非水相体系合成了内吗啡肽-1, -2 及苦味肽前体, 并通过小肽合成与自组装合成了水凝胶, 在双相体系中催化内吗啡肽转化效率为 93.7%^[11–12]。蛋

基金项目: 国家“863 计划”(2012AA022205); 国家“973 项目”(2011CB710800)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-58139902; E-mail: bingfanghe@njtech.edu.cn

作者简介: 朱富成 (1988–), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 主要从事极端微生物研究。E-mail: fucheng323@163.com

收稿日期: 2014-04-13; 修回日期: 2014-09-19

白酶 PT121 是一个典型的耐有机溶剂模型蛋白,尽管目前已有报道该酶基因 *lasB* 在毕赤酵母及大肠杆菌中异源表达但酶活仍然较低^[12-13]。为进一步探讨其有机溶剂耐性以及高效合成活力的分子机理,分子克隆表达至关重要。该蛋白酶的克隆表达可为相关研究奠定基础。

本研究克隆了 *P. aeruginosa* PT121 蛋白酶 PT121 编码基因 *lasB*,并在大肠杆菌 (*Escherichia coli* BL21 (DE3)) 中成功实现了异源表达,通过菌体细胞破碎条件的调节实现了同步纯化并获得了电泳纯的酶,研究了酶学性质,同时将其应用于多种小肽的合成,为后期蛋白改造及相关机理研究奠定了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及试剂

克隆载体 pMD18-T 和表达载体 pET-22b (+), *E. coil* JM109 和 *E. coil* BL21 (DE3) 分别为克隆宿主和表达宿主,用于 PCR 的试剂 (Taq DNA 聚合酶, Pfu DNA 聚合酶),限制性内切酶 *Nco*I 以及 *Bam*H I 均购自宝生物 (大连) 生物工程有限公司,福林-酚试剂购自生工生物 (上海) 有限公司,所有试剂均为分析纯

的市售产品。

1.2 P. aeruginosa 来源蛋白酶基因克隆

前期研究表明了 *P. aeruginosa* PT121 来源的蛋白酶分子量及性质与 GenBank 数据库中已公布的 Pseudolysin (Accession number: EU0212222) 相近。设计引物并以 *P. aeruginosa* PT121 基因组为模板进行 PCR 扩增,将扩增所得片段经纯化后连接至 pMD18-T 载体,构建好重组质粒转化至大肠杆菌 *E. coli* JM109 中送至金斯瑞 (南京) 公司测序。以重组质粒 pMD18-T-*lasB* 为模板用表 1 中带有酶切位点 (以下划线表示) 的引物 Primer 1F, Primer 1R 及 Primer 2F, Primer 2R 分别进行 PCR 扩增,纯化后用 *Nde* I 和 *Bam*H I 以及 *Nco* I 和 *Bam*H I 分别进行双酶切反应 7 h,进行胶回收纯化并连接至 pET-22b (+),随后转化至 *E. coli* BL21 (DE3),将在转化平板 (LB 平板含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 1% (W/V) 葡萄糖) 上长出的菌落挑到鉴定平板 (含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 1% (W/V) 脱脂奶粉) 培养,同时将对应的菌落挑入另一块转化平板上培养保存。在蛋白酶鉴定平板上 37℃ 培养 24-48 h 能产生显著透明圈的菌落即为阳性重组子,以直接导入 pET-22b (+) 质粒的菌株为对照。

表 1. 本研究所用引物
Table 1. primers used in this study

Name*	Sequences of Primer (5'→3')	Restriction sites
<i>lasB-F</i>	AAGCGTCGGCCGAGTACTTGG	—
<i>lasB-R</i>	GACCGGCATTCCTTCCTGGAG	—
Primer 1F	GCGG <u>ACTATG</u> AAGAAGGTTTCTACGCTTGACCT	<i>Nde</i> I
Primer 1R	AATG <u>GATCCTT</u> ACAACGCGCTCGGGCAGGTC	<i>Bam</i> H I
Primer 2F	GCGG <u>CCATGCT</u> AGACCTGATCGACGTGCCAAACT	<i>Nco</i> I
Primer 2R	AATG <u>GATCCTT</u> ACAACGCGCTCGGGCAGGTC	<i>Bam</i> H I

* Primer 1F and Primer 1R were used to cloning sequence including signal peptide, propeptide and mature peptide; Primer 2F and Primer 2R were used to clone sequence including propeptide and mature peptide.

1.3 蛋白酶 PT121 的异源表达

将重组菌接种于含卡那青霉素的 LB 培养基中,在 37℃ 培养过夜,次日转接于新鲜培养基中,培养至 *OD*₆₀₀ 约为 0.6-0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,30℃ 诱导 3 h 后,离心后收集菌体,用 Tris/HCl (0.1 mol/L, pH8.0) 洗 2-3 次,随后用含 0.25 mg/mL 溶菌酶 Tris/HCl 缓冲液 (0.1 mol/L, pH8.0) 混悬菌体,37℃ 静置水浴 2 h,再于低温 4℃,15000 ×g 离心 10 min,获得上清酶液,用于 SDS-PAGE 分析及

蛋白含量测定^[15-16]。

1.4 热稳定性及 pH 稳定性

纯化蛋白酶液分别放入 30、40、50、60、70℃ 温浴 1 h,迅速放入冰浴中冷却 10 min,稀释一定倍数后在标准条件下检测蛋白酶剩余活力。

纯化蛋白酶液分别与不同 pH 的缓冲液混合 (1/20 = V/V, pH4-12),于 30℃ 保温 1 h。在标准条件下测定蛋白酶活力。蛋白酶 PT121 水解酶活测定参照文献 [10]。所有样品均进行 3 次平行实验。

1.5 蛋白酶 PT121 溶剂耐受性

纯化的蛋白酶液 1 mL(约含蛋白量 0.5 mg), 分别加入各种等体积有机溶剂, 置于密封试管中, 在 30℃, 140 × g 水浴摇床中振荡, 分别于 0、1、3、5、7、10 和 15 d 取样检测蛋白酶剩余活力, 通过指数回归曲线求蛋白酶的半衰期。

1.6 有机相中催化小肽合成

将 Z-Asp、Z-Asn、Z-Ala、Z-Phe、Z-Trp、Z-Tyr、Z-Pro 和 Phe-NH₂ 溶解于 DMSO 中使其反应终浓度为 0.1 mol/L 和 0.2 mol/L, 将酶活为 2500 U/mL 的蛋白酶 PT121 与反应底物等体积混合置于 30℃ 水浴锅中反应 12 h, 取样利用 HPLC 法测定, 测定方法参照文献 [17]。催化合成产物产率以 Z-Asp、Z-Asn、Z-Ala、Z-Phe、Z-Trp、Z-Tyr、Z-Pro 摩尔减少率计算。

2 结果

2.1 基因 *lasB* 的克隆表达

按照方法 1.2 扩增获得蛋白酶 PT121 编码基因, 经过测序后在 GenBank 中比对, 与已报道的 *lasB* 基因具有 99% 的相似度。序列分析显示, 该序列 CDS 全长为 1497 bp 含有信号肽(26 aa)、前肽(173 aa)和成熟肽(301 aa), 分子量为 33 kDa, 与本实验室前期研究报道的来源于蛋白酶 PT121 一致^[10]。

表达载体构建采用了两种策略, 将蛋白酶 PT121 基因 *lasB* 的 ORF(信号肽 + 前肽 + 成熟肽) 插入 pET-22b(+) 的多克隆位点获得 pET22b-*lasB* 插入, 另一种策略利用 pET-22b(+) 本身所带有的信号肽 PelB 整合 *lasB* 中的前肽及成熟肽构建重组质粒 pET-*lasB'*(即去除 *lasB* 携带的信号肽)。导入宿主后分别获得重组菌 *E. coli* BL21/pET-*lasB* 和 *E. coli* BL21/pET-*lasB'*, 以导入 pET-22b(+) 的作为对照组即 *E. coli* BL21/pET。牛奶筛选平板可以发现对照组 BL21/pET 的菌株未产生透明圈, 而 *E. coli* BL21/pET-*lasB'* 和 *E. coli* BL21/pET-*lasB* 在牛奶平板上能产生明显透明圈。重组菌 *E. coli* BL21/pET-*lasB* 发酵液破碎上清液酶活为 661 U/mg, *E. coli* BL21/pET-*lasB'* 的破碎上清液酶活高达 7700 U/mg, 而在对照菌株 *E. coli* BL21/pET 的破碎上清中检测不到酶活。表达酶活力显著高于 Ogino 等的报道^[13]。这一现象表明, pET-22b(+) 本身所携带的信号肽 PelB 更有利于蛋白酶 PT121 在大肠杆菌中

的表达。

2.2 蛋白酶 PT121 表达及酶学性质

由于蛋白酶 PT121 在大肠杆菌中不能实现胞外分泌表达, 本研究通过调整溶菌酶用量与优化保温培养时间, 控制细胞部分破壁。此方法仅使存在于周质空间的蛋白酶溶出, 而细胞内绝大多数杂蛋白不溶出, 同时在蛋白酶 PT121 溶出过程中实现对杂蛋白的降解以及对自身前肽的切除增加蛋白酶表达量, 从而获得电泳纯蛋白酶, 重组菌破壁上清液的 SDS-PAGE 见图 1。

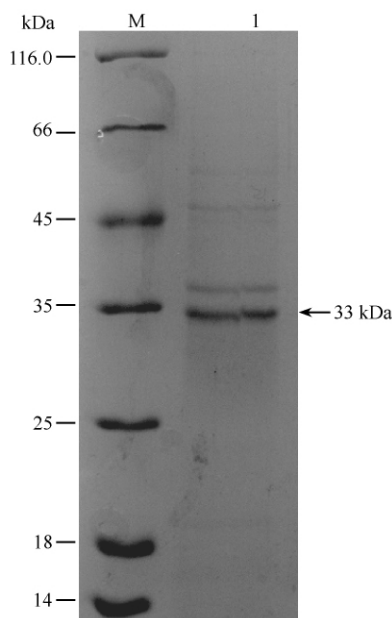


图 1. 重组菌破壁上清 SDS-PAGE 图

Figure 1. SDS-PAGE of supernatant of broken recombinant strain. M, molecular weight marker; lane 1, the prepared protease.

蛋白酶 PT121 的热稳定性如图 2-A 所示, 该酶在 50℃ 或其以下保温 1 h 后, 酶活保持在 90% 以上; 于 60℃ 保温 1 h 后, 酶活残留大于 75%, 而 70℃ 保温 1 h 后几乎失去酶活。

蛋白酶 PT121 的 pH 稳定性如图 2-B, 结果显示蛋白酶 PT121 在 pH6.0–11.0 范围保温 1 h 酶活无明显损失, 在 pH5.0 时蛋白酶活力仍能维持原始活力的 70% 以上, 表明该蛋白具有宽泛的 pH 稳定性。

蛋白酶 PT121 在多种有机溶剂中显示了较好的稳定性(见表 2), 尤其在 50% DMSO 和 50% 异戊醇体系中的稳定性超过 100 d, 在 25% 乙腈及 50% 丙酮体系中的稳定性最低。以上性质与前期本实验室报道的野生型蛋白酶 PT121 性质基本一致。

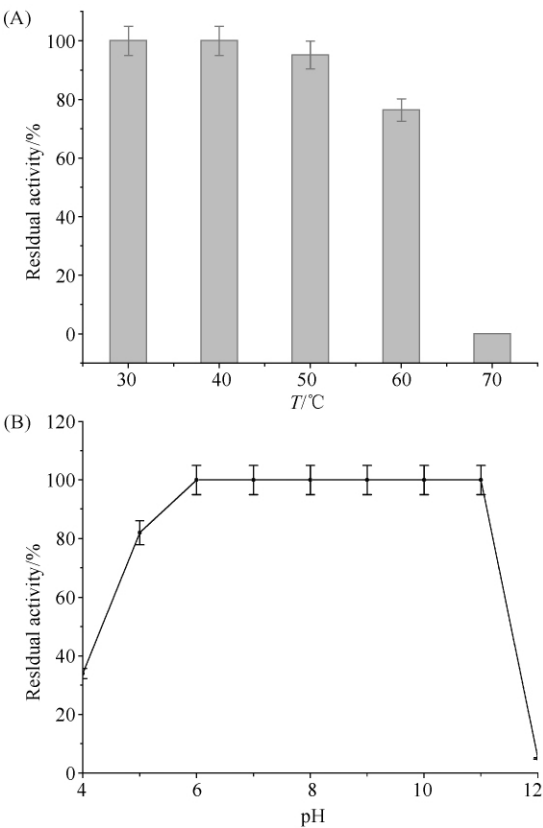


图 2. 蛋白酶 PT121 热稳定性 (A) 及 pH 稳定性 (B)
Figure 2. Thermostability (A) and pH tolerance (B) of protease PT121.

2.3 蛋白酶 PT121 催化合成小肽

蛋白酶 PT121 在 50% DMSO 溶剂体系催化合成多种小肽, 其中阿斯巴甜前体 (Z-Asp-Phe-NH₂) ,

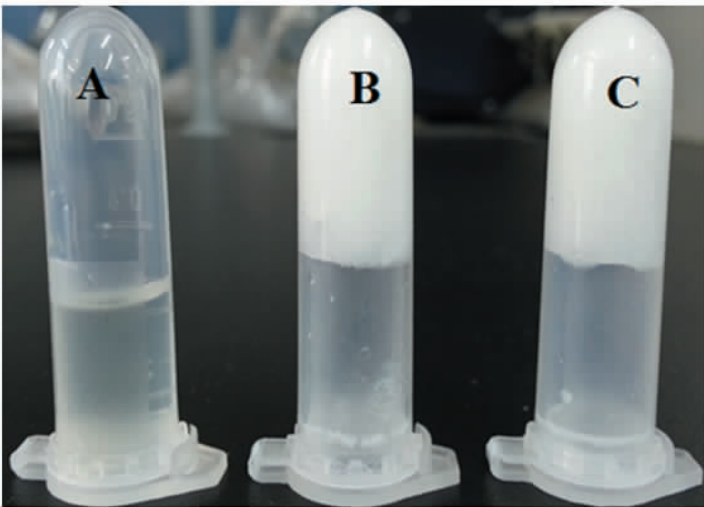


图 4. 阿斯巴甜前体催化合成

Figure 4. Biosynthesis of aspartame precursor, A, B, C present pre-(A) and post-reaction catalyzed by protease PT121 (B, C) respectively. D-1, D-2 and D-3 are the graphs of HPLC. D-1: Ingredient of reaction system at 0 h; D-2 and D-3: Ingredients of reaction system B and C at 12 h.

表 2. 蛋白酶 PT121 在有机溶剂中的半衰期

Table 2. Half-lives of protease PT121 in the presence of organic solvents

Organic solvent	Half-lives /d
Acetonitrile ^a	1.7
DMSO	> 100
DMF	5.3
Acetone	2.3
Isoamyl alcohol	> 100
Toluene	15.0
Cyclohexane	11.2
None	4.3

^a Concentration of organic solvents were 50% (V/V) except for acetonitrile (25%).

Z-Ala-Phe-NH₂, Z-Phe-Phe-NH₂ 等产率均超过 90% (图 3), 以 Z-Asp 为例, 由于产物在 50% DMSO 中溶解度较低反应 12h 左右均有阿斯巴甜前体析出, 在动力学控制下推动合成反应的进行, 显示了蛋白酶 PT121 合成小肽的高效性, 见图 4。

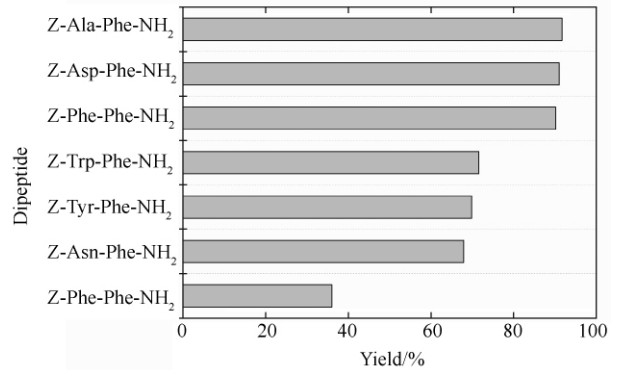
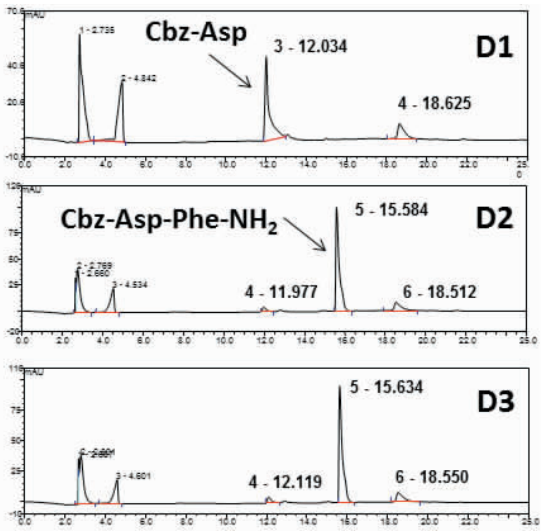


图 3. 多种小肽在 50% DMSO 体系中催化合成产率

Figure 3. Convert ratio of various dipeptide in 50% DMSO solution.



3 讨论

本研究克隆了来源于 *Pseudomonas aeruginosa* PT121 弹性蛋白酶基因 *lasB* 基因, 并采用载体 pET-22b(+) 构建了重组质粒 pET22b-*lasB*, 重组质粒在大肠杆菌中表达结果表明 PelB 信号肽更适合蛋白酶 PT121 在大肠杆菌中(*E. coli* BL21(DE3)) 中表达。并通过破碎条件的调控实现了菌体限制性破碎并获得了较纯的蛋白酶。

蛋白酶 PT121 的热稳定性和溶剂稳定性与野生菌分泌的蛋白酶基本一致, 该酶不仅具有较高的溶剂耐受性, 而且在 60℃ 的高温下保温 1h 仍然能保持 75% 的酶活, 具有较高的温度稳定性和宽泛的 pH 耐受性。易于适应各种实际的生物转化环境。

蛋白酶 PT121 表现出很强的小肽合成能力, 特别是阿斯巴甜前体(Z-Asp-Phe-NH₂) 的合成效率高达 91%。有文献报道蛋白酶具有 S₁, S₁', S₂' 底物结合口袋, 其中 S₁' 口袋特异性识别疏水性氨基酸如亮氨酸, 缬氨酸以及苯丙氨酸, 该口袋对于底物特异性识别具有关键作用^[18-19], 蛋白酶 PT121 具有较强的小肽合成能力可能与较大的 S₁' 口袋相关, 推测该口袋对于 Phe-NH₂ 的高亲和力使得催化效率超过同一家族酶类如嗜热蛋白酶(Thermolysin)。而蛋白酶 PT121 对于阿斯巴甜直接前体(Cbz-Asp-Phe-OMe) 合成效率相对较低(数据没有提供), 可望通过上述底物结合区域的调整提高 Cbz-Asp-Phe-OMe 合成能力。蛋白酶 PT121 的克隆表达为该酶的催化机理研究及相关结构改造提供了可靠依据。

参考文献

- [1] Zhang W, Li Y, Qian G, Wang Y, Chen H, Li Y Z, Du L. Identification and characterization of the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* WAP-8294A2 biosynthetic gene cluster from *Lysobacter enzymogenes* OH11. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(12): 5581-5589.
- [2] Tordoff MG, Allewa AM. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1990, 51(6): 963-969.
- [3] Leung DY, Hirsch RL, Schneider L, Moody C, Takaoka R, Li SH, Hanifin JM. Thymopentin therapy reduces the

- clinical severity of atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1990, 85(5): 927-933.
- [4] Blanes-Mira C, Clemente J, Jodas G, Gil A, Fernández-Ballester G, Ponsati B, Ferrer-Montiel A. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *International Journal of Cosmetic Science*, 2002, 24(5): 303-310.
- [5] Morihara K. Elastolytic properties of various proteases from microbial origin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1967, 120: 68-78.
- [6] Doukyu, N, Ogino, H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48(3): 270-282.
- [7] Jellouli K, Bayoudh A, Manni L, Agrebi R, Nasri M. Purification, biochemical and molecular characterization of a metalloprotease from *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on shrimp wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(6): 989-999.
- [8] Ogino H., Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A, Ishikawa H. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(1): 61-68.
- [9] Ogino H, Gemba Y, Yamada M, Shizuka M, Yasuda M, Ishikawa H. The synthetic rate of dipeptide catalyzed by organic solvent-stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in the presence of water-soluble organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 5(3): 219-223.
- [10] Tang XY, Pan Y, Li S, He BF. Screening and isolation of an organic solvent-tolerant bacterium for high-yield production of organic solvent-stable protease. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 7388-7392.
- [11] Sun H, He BF, Xu J, Wu B, Ouyang P. Efficient chemo-enzymatic synthesis of endomorphin-1 using organic solvent stable proteases to green the synthesis of the peptide. *Green Chemistry*, 2011, 13(7): 1680-1685.
- [12] Xu JX, Sun HL, He X, Bai Z, He BF. (2013). Highly efficient synthesis of endomorphin-2 under thermodynamic control catalyzed by organic solvent stable proteases with in situ product removal. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 663-666.
- [13] Ogino H, Yokoo J, Watanabe F, Ishikawa H. Cloning and sequencing of a gene of organic solvent-stable protease secreted from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and its expression in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering*

- Journal, 2000, 5 (3) : 191-200.
- [14] Lin X, Xu W, Huang K, Mei X, Liang Z, Li Z, Luo Y. Cloning, expression and characterization of recombinant elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2009, 63 (2) : 69-74.
- [15] Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [16] Kruger NJ. The Protein Protocols Handbook. Totowa: Humana Press, 2002: 15.
- [17] Tang XY, Wu B, Ying HJ, He BF. Biochemical properties and potential applications of a solvent-stable protease from the high-yield protease producer *Pseudomonas aeruginosa* PT121. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160 (4) : 1017-1031.
- [18] de Kreijl A, van den Burg B, Veltman OR, Vriend G, Venema G, Eijssink VG. The effect of changing the hydrophobic S1' subsite of thermolysin-like proteases on substrate specificity. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268 (18) : 4985-4991.
- [19] Englert L, Biela A, Zayed M, Heine A, Hangauer D, Klebe G. (2010). Displacement of disordered water molecules from hydrophobic pocket creates enthalpic signature: Binding of phosphoramidate to the S1'-pocket of thermolysin. *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects*, 2010, 1800 (11) : 1192-1202.

Cloning and expression of protease PT121 from *Pseudomonas aeruginosa* and application in peptide synthesis

Fucheng Zhu¹, Yu Zhuang¹, Bingfang He^{1, 2*}

¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, ²School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the cloning and expression of *lasB* encoding solvent-resistant protease from *Pseudomonas aeruginosa* PT121. The recombinant protease was then characterized and applied in peptide synthesis. [Methods] The PCR primers were designed to acquire the open read frame (ORF) of *lasB* according to similar protease gene (pseudolysin) reported in the literature. Inducible expression plasmid pET22b-*lasB* was constructed and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protease was then characterized and applied in peptide synthesis. [Results] The protease PT121 was defined as metalloproteinase M4 family according to sequence blast. Gene sequence analysis shows that *lasB* encodes signal peptide, pro-peptide and mature peptide. Mature protein contains 301 residues with molecular weight of 33 kDa. One-step preparation of the recombinant proteases PT121 was optimized by breaking cell wall. The specific activity of protease PT121 reached up to 7700U/mg, and it was stable similar with wild type PT121 from *P. aeruginosa* PT121 in temperature, pH and organic solvent. The synthesis rate of various dipeptides in 50% DMSO was effective, especially productivity of aspartame precursor reached up to 91%. [Conclusions] Successful hetero-expression of protease PT121 lays the foundation of studying mechanism of catalysis and molecular evolution.

Keywords: protease PT121, *lasB* gene, hetero-expression, organic solvent stability

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Key Program of China (2012AA022205) and by the National Program on Key Basic Research Project (2011CBA00807)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-58139902; E-mail: bingfanghe@njtech.edu.cn

Received: 13 April 2014 /Revised: 19 September 2014