

重组 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的表达、纯化和复性研究 Studies on the Expression , Purification and Renaturation of Recombinant N-acety-L-ornithine Deacetylase

李 环* , 陈 悦 , 翁秋萍 , 吴明刚 , 韦 萍 , 欧阳平凯

LI Huan* , CHEN Yue , WENG Qiu-Ping , WU Ming-Gang , WEI Ping and OUYANG Ping-Kai

南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009

College of Life Science and Pharmacy , Nanjing University of Technology , Nanjing 210009 , China

摘 要 报道重组 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶(NAOase)的研究进展。重组 NAOase 由大肠杆菌 *argE* 基因编码,在重组菌 BL21(DE3)-pET22b-*argE* 中的表达量为 32.5% 大多以无活性的包涵体存在。低温诱导可增大有活性的可溶表达部分的比例。可溶性 NAOase 经 Ni-NTA 凝胶亲和纯化后得到 SDS-PAGE 电泳纯的酶,比酶活为 1193.2u/mg 蛋白。诱导条件影响整菌蛋白的成分及比例。37℃ 诱导生成的包涵体经尿素梯度洗涤后纯度较 22℃ 高。低的蛋白浓度和合适的氧化还原体系是影响复性的关键因素。稀释法和透析法皆可使包涵体部分复性。在合适的条件下以稀释法复性时,约有 17.78% 包涵体可顺利复活。包涵体经尿素洗涤、溶解、Ni-NTA 凝胶柱亲和纯化后,获得了高纯度的 NAOase。

关键词 重组 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶,表达定位,亲和纯化,包涵体,复性

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0487-06

Abstract The *argE* gene from *Escherichia coli* coding for N-acety-L-ornithine deacetylase(NAOase), the key enzyme involved in the L-arginine biosynthesis, had been cloned in pET22b and transformed into BL21(DE3). With 32.5% expression level in the optimal fermentation medium at 37℃, most NAOase was expressed as inclusion bodies. The soluble and active proportion could be slightly increased when expressed at low temperature. The specific activity of soluble NAOase purified by Ni-NTA resin chromatography was 1193.2u/mg. The species and proportions of whole cell proteins varied with induction conditions. The inclusion bodies expressed at 37℃ was more pure than 22℃ after gradient wash with urea. Inclusion bodies could be partly refolding and reactivated by dilution and dialysis. Low protein concentration and suitable rate of oxidant/reducing agents were important to renaturation. In the optimal conditions 17.78% of Urea-denatured NAOase could be refolding and reactivated by dilution. The purified fusion protein was obtained after wash, solubilization and Ni-NTA resin affinity chromatography purification of inclusion bodies.

Key words recombinant N-acetylornithine deacetylase, cellular location, affinity purification, inclusion bodies, renaturation

大肠杆菌 *argE* 基因编码的 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶(N-acetylornithine deacetylase, 简称 NAOase; EC3.5.1.16)可催化 N-乙酰鸟氨酸脱去乙酰基生

成 L-鸟氨酸^[1]。鸟氨酸是精氨酸和多胺类物质合成的共同前体。多胺和 DNA 复制及细胞分裂有关。故 NAOase 的活性对细菌的繁殖必不可少^[2]。由于

Received : November 13 2006 ; Accepted : December 18 2006.

This work was supported by a grant from ' 973 ' of China (No. 2003CB7160004).

* Corresponding author. Tel : + 86-25-83587341 ; Fax : + 86-25-83587330 ; E-mail : lihuan45678@163.com

国家 973 课题资助项目(No. 2003CB7160004).

真核生物合成精氨酸的途径和原核生物不同,不含 NAOase。故有可能据此研制出作用于 *argE* 基因及其编码的 NAOase 的全新型的抗生素^[2-4]。这在致病菌耐药性逐步提高的今天,这种广谱性抗生素的寻找和发现具有非常重要的医药应用价值。

N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶只选择性的作用于 L-型的酰基化产物,且具有广泛的底物特异性,可立体拆分生产 L-型的氨基酸^[1,5,6]。相比于同族另一种可立体拆分氨基酸的氨基酰化酶(Aminoacylase; EC3.5.1.14),目前国内外对该酶的研究甚少,国内报道更是空白。已有的报道主要研究了 NAOase 的纯化、酶学性质及底物特异性^[1,5]、基因序列及相应氨基酸组成^[6,7]、对金属离子的依赖性、酶的亚基数目^[2,5]等方面内容。

argE 基因工程菌的构建有见报道^[5,6],分别用于测序和酶学性质研究,没有发酵液酶活力和表达量的具体数据,更没有包涵体纯化及复性的报道。基于此研究背景,本实验室以 pET22b 为表达载体,构建了可表达 NAOase 的基因工程菌 BL21(DE3)-pET22b-*argE*。对重组 NAOase 的系列研究正在进行中。本文首次报道了重组 NAOase 包涵体的洗涤及复性研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

基因工程菌 BL21(DE3)-pET22b-*argE*,目的基因 *argE* 表达产物为重组 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶,氨苄抗性。表达载体 pET22b-*argE* 构建时在 C 端引入了 6×his 标签。南京工业大学制药与生命科学学院菌种室构建。

1.2 培养基

保藏培养基:LB 培养基,含 50mg/L 羧苄青霉素。

发酵培养基(g/L):蛋白胨 16.0,甘油 10.0,乳糖 5.0,(NH₄)₂SO₄ 8.0,NaCl 5.0,羧苄青霉素 50mg,Na₂HPO₄·2H₂O 3.2,KH₂PO₄ 1.6。微量元素适量。调 pH 7.0。

1.3 重组 NAOase 的表达

将含有正确表达载体 pET22b-*argE* 的基因工程菌接入发酵培养基,37℃培养 2.5h。此时 OD₆₀₀ 约为 0.5。加入 0.5%乳糖诱导过夜。离心收集菌泥,以细胞裂解液适当重悬后,加入 1.0mg/mL 溶菌酶,200W 超声破壁,超声 5s,间歇 5s,全程 20min。离心后的超声上清即为重组 NAOase 的可溶性表达部分,

沉淀为不可溶的包涵体。

1.4 可溶性 NAOase 的纯化

22℃诱导的超声上清经(NH₄)₂SO₄ 分级沉淀后和 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF(北京卓冠公司产品)静态结合 3h 后装柱纯化。A 相缓冲液:0.05mol/L 磷酸缓冲液,pH7.4,含 0.5mol/L NaCl,20mmol/L 咪唑;B 相缓冲液:咪唑浓度为 250mmol/L,其余成分同 A 相。以 A 相平衡亲和柱,以不同比例混合的 A 相缓冲液和 B 相缓冲液洗脱样品。流速 1.0mL/min。AKTA 纯化系统 FPLC 上进行,紫外监测器检测。

1.5 不可溶包涵体的洗涤、溶解与纯化

37℃诱导的超声沉淀(包涵体)用不同洗涤液洗涤,分别收集上清和沉淀,10.0% SDS-PAGE 电泳分析洗涤效果,确定洗涤条件。洗涤后的包涵体溶于 8.0mol/L 尿素(含 1.0mmol/L DTT)中,离心后的上清即为包涵体溶解液。纯化方法同上,只是 A 相和 B 相缓冲液中含有 8.0mol/L 尿素。

1.6 包涵体的复性

1.6.1 稀释法复性:在不同复性液中,逐滴加入包涵体溶解液,边加边缓慢搅拌,放置 10min 后再加第二滴。滴加完毕后继续放置 4h 以充分复性。整个操作 4℃进行。

1.6.2 透析法复性:将 0.5mg/mL 的包涵体溶解液装入透析袋中,在 4℃对不同的复性液(各含 6.0mol/L 尿素)透析。每 12h 更换一次复性液,复性液中尿素浓度依次降为 4mol/L、2mol/L、1.0mol/L 和 0mol/L。离心后取上清测各条件下的蛋白含量及酶活。

1.7 分析方法

1.7.1 菌体的生物量:用 DU-650 分光光度计测定 OD₆₀₀。以灭菌后的培养基作为空白。

1.7.2 酶的表达量及细胞表达定位:分别对菌体,菌体的培养外液、细胞周质、细胞质可溶部分及不溶组分适当处理后进行 10.0% SDS-PAGE 分析^[8]。采用 Bio-Rad 凝胶成像系统及 BandsScan 软件分析测定重组 NAOase 的表达量(目的蛋白占整菌可溶性蛋白的百分比)。

1.7.3 蛋白的含量测定:Bradford 法。牛血清蛋白作为标准分子量蛋白。

1.7.4 酶的活力测定:茚三酮比色法^[9]。由于酶分子、菌本身中所含氮及试剂中微量氮皆会干扰茚三酮显色,样品不同干扰也不尽相同,故每个样品皆需做空白实验。以零转化时间的样品同样操作作为空白。

酶活单位定义为在 37℃和 pH6.98 条件下,每

小时催化生成 $1\mu\text{mol}$ 的 L-Met 所需要的酶量。发酵液中可溶表达部分的比酶活定义为每 mL 发酵液每小时催化生成 L-Met 的 μmol 数。复性后包涵体的比酶活定义为每 mg 酶蛋白每小时催化生成 L-Met 的 μmol 数。

2 结果与分析

2.1 重组 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶的表达

重组 NAOase 在发酵培养基及工程菌通用的 LB 培养基的表达见图 1。在 LB 培养基中,以 1.0mmol/L IPTG 为诱导剂,发酵培养基以 0.5% 乳糖为诱导剂。皆在 $OD_{600} 0.4 \sim 0.6$ 时加入 37°C , 180r/min 诱导过夜。

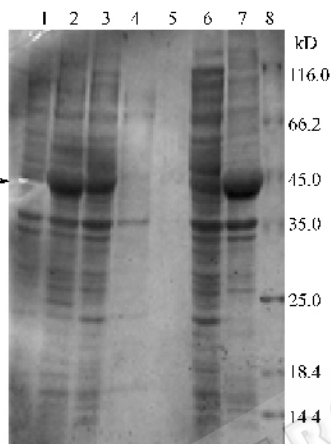


图 1 重组 NAOase 的表达及细胞定位

Fig.1 Expression and cellular location of recombinant NAOase 1: without induction; 2, 3: total cell protein of fermentation and LB medium; 4: medium, periplasmic, soluble and insoluble cytoplasmic fractions of fermentation medium; 5: protein marker.

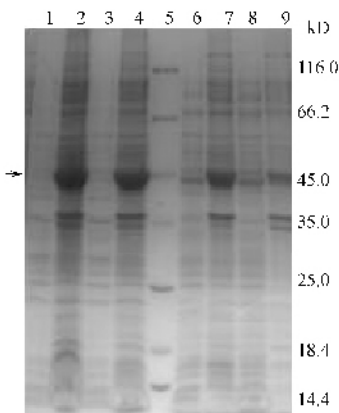


图 2 不同诱导温度下的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant NAOase inducing at different temperatures

Supernatant and pellet of L21(DE3)pET22b-argE induced at (1) 37°C (lanes 1, 2); (2) 30°C (lanes 3, 4); (3) 22°C (lanes 6, 7); (4) 4°C (inducing for 44h, Lane 8, 9); lane 5: protein marker.

从图 1 可知,与不添加诱导剂的带 1 相比,带 2

和带 3 在 43kD 附近有明显的表达条带,和理论值 (NAOase 单亚基分子量为 42350D) 相吻合,证实了表达质粒构建的正确性,也表明重组 NAOase 为诱导酶。细胞定位实验表明,在 37°C 诱导时,重组 NAOase 绝大多数以不可溶的包涵体形式存在。

表 1 重组 NAOase 在两种培养基中的参数比较

Table 1 Parameters of recombinant NAOase expressing in different mediums			
Culture type	OD_{600}	NAOase activity(u/mL)	Expression level/ %
LB culture	3.59	3.49	21.0
Fermentation culture	5.91	4.52	32.5

从表 1 可以看出,营养丰富的发酵培养基各种数据明显优于通用培养基 LB。在发酵培养基中,目的蛋白的表达水平达到 30% 以上,而酶活只有 4.52u/mL ,证实了绝大多数重组 NAOase 的表达形成了包涵体。

为减少包涵体所占比例,增加可溶性表达成分,分别从减少诱导剂的用量、降低诱导温度、缩短诱导时间等方面综合考虑实验。结果为,这些措施能少量增大酶的可溶性表达,表现在酶活增高,但包涵体部分仍占多数(图 2),且重组 NAOase 的表达量大幅下降。如当乳糖浓度降至 0.005% 时,表达量仅为 7.8% 。当诱导温度降至 4°C 时,培养 44h 时,表达量仅为 10.8% ,酶活增为 89.48u/mL 。 22°C 诱导时酶活最高,为 282.91u/mL ,表达量比 37°C 低了约 4 个百分点。可溶性表达部分的少量增加是以降低菌的生长速度及表达水平为代价的,会造成单位培养基所收获的重组 NAOase 总量的降低。故考虑包涵体复性。

2.2 重组 NAOase 可溶表达部分的纯化

包涵体的复性需要有活性的纯酶为复性基准。以 0.5% 乳糖为诱导剂,酶活测定最高的 22°C 为诱导温度,培养收集菌体。低温超声取上清,硫酸铵分级沉淀结果表明重组蛋白大多集中在 $50\% \sim 60\%$ 的沉淀级份中。用 50mmol/L , $\text{pH}7.4$ 磷酸缓冲液重悬, $0.22\mu\text{m}$ 膜过滤后和填料 4°C 结合 3h , 间或摇晃。装柱,线性洗脱(60min 内 B 相的比例从 0% 升至 100%)初步确定重组 NAOase 的 B 相洗脱浓度为 $25 \sim 50\%$ (图 3A)。再采用阶段洗脱,优化洗脱条件,确定了 12% (峰 1) $\sim 25\%$ (峰 2) $\sim 40\%$ (峰 3) $\sim 50\%$ (峰 4) $\sim 70\%$ (无峰) 的 B 相阶段洗脱梯度,结果见图 3B。 50% B 相浓度可得到 SDS-PAGE 电泳纯的重组 NAOase (图 3C)。测定蛋白浓度和酶活后,得到可溶表达部分的比酶活为 1193.2u/mg 蛋白。

氧化型试剂能够促进二硫键的形成,而还原型试剂能够催化错误配对的二硫键进行重排,其浓度比例应有合适的范围。适当降低复性液中蛋白的浓度为 0.008mg/mL,氧化型谷胱甘肽的浓度固定为

0.2mmol/L。在基础复性液的基础上,变化 GSH/GSSG 的摩尔比分别为 1:1,2:1,5:1 和 10:1。结果 5:1 的比例最好,复性后的比酶活为 211.90u/mg 酶蛋白,复性率达到 17.78%。

表 2 复性液成分及蛋白浓度对稀释复性的影响

Table 2 Effect of refolding buffer and protein concentration on dilution refolding

Refolding buffer	Protein concentration (mg/mL)	Total activity/u	Refolding NAO activity(u/mL)	Specific activity(u/mg)	Recovery activity/%
0.05mol/L NaCl, 5.0% glycoceol	0.014	213.06	2.12	153.83	12.89
	0.028	247.45	2.45	89.33	7.49
	0.056	318.24	3.12	56.82	4.76
0.04mmol/L CoCl ₂ + 0.031mmol/L ZnSO ₄	0.014	137.69	1.37	98.35	8.24
	0.028	289.87	2.87	103.53	8.67
	0.056	349.86	3.43	62.48	5.23
2.0mmol/L DTT	0.014	219.09	2.18	156.49	13.12
	0.028	258.56	2.56	92.34	7.74
	0.056	420.24	4.12	75.04	6.29
0.12mmol/L N-acetylmethionine + 0.04mmol/L CoCl ₂ + 0.031mmol/L ZnSO ₄ + 2.0mmol/L DTT	0.014	201.0	2.0	143.58	12.04
	0.028	234.32	2.32	83.69	7.02
	0.056	259.08	2.54	46.26	3.88

2.6 包涵体的透析法复性

分别取 5.0mL 浓度为 0.5mg/mL 的包涵体溶解液装入透析袋中,对 100mL 不同的复性液 4℃ 透析,每 12h 更换 1 次。透析液中尿素浓度由 6mol/L 逐次降为 4mol/L、2mol/L、1mol/L 和 0mol/L,并添加不同成

分以助复性。结果在透析过程中,尿素浓度降为 4mol/L 时,蛋白溶液变混浊。尿素浓度降至 1mol/L 时,均出现明显的白色沉淀。从 4mol/L 尿素梯度起分别离心取上清测酶活及蛋白浓度,结果为透析外液中尿素浓度为 2mol/L 时,测出的酶活最高。

表 3 复性液成分对透析复性的影响(尿素浓度 2mol/L)

Table 3 Effects of refolding buffers on dialysis refolding with 2.0mol/L urea

Refolding buffer	Protein Concentration(mg/mL)		NAO activity (u/mL)	Specific activity (u/mg)	Recovery activity/%
	Before dialysis	After dialysis			
0.12mmol/L N-acetylornithine	0.5	0.36	5.2	14.53	1.21
0.03mmol/L ZnSO ₄	0.5	0.42	7.1	17.36	1.46
0.06mmol/L ZnSO ₄	0.5	0.39	1.9	4.84	0.41
2mmol/L DTT	0.5	0.49	11.3	22.7	1.90
2mmol/L DTT + 0.03mmol/L ZnSO ₄	0.5	0.49	7.4	14.86	1.25

从表 3 可以看出,和稀释法相比,透析复性的整体效果较差。复性率最高仅为 1.9%。复性液成分的影响规律和稀释法类似。改变 DTT 的添加量分别为(单位:mmol/L) 0.5,1.0,2.0 和 3.0,结果 DTT 的添加对酶的再折叠复性基本无影响。固定 GSSG 的浓度为 0.2mmol/L,改变 GSH/GSSG 比例分别为 0,1:1,5:1,5:1,10:1,结果该氧化还原体系的改变对复性率稍有促进,最适用量为 5:1,此时复性率为 3.27%。

2.7 重组 NAOase 包涵体的亲和纯化

将 37℃ 诱导生成的包涵体经尿素梯度浓度洗涤后,沉淀以 8.0mol/L 尿素(含 1.0mmol/L DTT)溶解。离心取沉淀和 Ni-NTA 琼脂糖凝胶 FF 结合 3h 后,以阶段洗脱法纯化。洗脱条件为 B 相洗脱液在基线走平后依次增加为 ①12.5%(峰 1),②25.0%

(峰 2),③50.0%(峰 3)及④100%(无峰)。

由图 6 可知,以 Ni-NTA 亲和柱层析纯化可以得到 SDS-PAGE 电泳纯的蛋白,洗脱峰 2 和 3 皆为

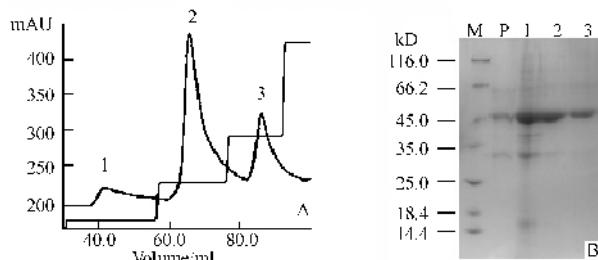


图 6 包涵体的 Ni-NTA 柱层析纯化(A)及 SDS-PAGE 分析(B)

Fig.6 Purification of inclusion bodies by Ni-NTA resin chromatography and SDS-PAGE analysis

M: protein marker; P: pass-through; 1, 2, 3: column 1, 2, 3 of Fig. 6 (A).

SDS-PAGE 电泳纯的重组 NAOase。只是穿透峰和洗脱峰 1 中有部分目的蛋白,可再收集上柱纯化回收。柱上复性有待于进一步研究。

3 讨论

NAOase 和氨基酰化酶都可用于氨基酸的立体拆分,催化的反应式相同,也同为依赖于锌离子的金属酶,只是氨基酸组成及其对底物的专一性不尽相同。氨基酰化酶的研究是一个热点,各种来源的氨基酰化酶及其拆分研究常见报道,相应重组菌的构建也有报道,而对 NAOase 的研究报道却屈指可数。氨基酰化酶最常见的来源为各种米曲霉,胞外分泌,酶活的数量级约在 10^5 u/g 干菌丝体。22℃ 诱导时,不包括包涵体部分复性后的酶活力,重组 NAOase 可溶性表达部分的酶活已达到 282.91u/mL,约 2×10^5 u/g 湿菌体,且发酵周期约 16h,远小于 48~64h 的霉菌发酵周期。故重组菌 BL21(DE3)-pET22b-argE 具有强大的市场应用前景。

重组菌的构建提供了一个大量生产目的蛋白的方法,但重组蛋白非正常的高速合成往往造成翻译和后修饰过程中无活性中间体的出现,并给蛋白的跨膜运送及细胞的正确定位带来错误。重组 NAOase 的表达也存在这个问题。虽然表达质粒 pET22b-argE 在构建时已保留 pET22b 的信号肽 pelB,但重组 NAOase 并没有跨过 BL21(DE3) 的内外膜屏障分泌到培养基中去,也没到达膜间隙,仍存在于细胞质中,且大多还以没有正确折叠和加工的包涵体形式存在。这也是目前实验室阶段大多重组蛋白在最常用的大肠杆菌中大量表达时常见到的一个问题。

包涵体复性时,多肽链要模拟生物体的复杂内环境来重新折叠,这是一个相当微妙精巧和复杂的过程。由于重组 NAOase 酶为含辅基的多亚基结合蛋白,且每个亚基中含 8 分子 Cys,极有可能形成二硫键,这更加大了复性的难度。本文发现氧化还原体系对重组 NAOase 复性的重要性,暗示该酶可能含有二硫键。氨基酰化酶每个亚基含 10 分子 Cys,王

洪睿等报道该酶分子中不存在二硫键^[10]。这说明 N-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶和氨基酰化酶的差异。

锌离子参与形成活性中心,而本文结果为复性液中锌离子的存在并不能促进松散肽链的重新折叠,高浓度反而有抑制作用。2004 年, Qiang Xue 最早报道同族的氨基酰化酶的全酶和脱辅酶的再折叠,发现锌离子在此过程中几乎不起作用^[11]。本文结果与其基本吻合。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Vogel HJ, Bonner DM. Acetylmithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *Biol Chem*, 1956, **218**: 97 - 106.
- [2] Wade C, Mcgregor, Sabina I. ArgE-encoded N-acetyl-L-ornithine deacetylase from *E. coli* contains a dinuclear metalloactive site. *J of Am Chem Soc*, 2005, **127**: 14100 - 14107.
- [3] Leeb M. Antibiotics: a shut in the arm. *Nature*, 2004, **431** (7011): 892 - 893.
- [4] Richard CH, Krzysztof PB, Sabina IS. Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets. *Bioinorganic Chemistry* 2003, **7**: 197 - 206
- [5] Thierry M, Emmanuelle S, Yves Mechulam, et al. Structural and biochemical characterization of the *Escherichia coli* argE gene product. *Journal of Bacteriology*, 1992, **174**(7): 2323 - 2331.
- [6] Farah JM, John SB. Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylmithinase deacetylase. *Biochemistry*, 2000, **39**: 1285 - 1293.
- [7] Boyen A, Charlier D, Charlier J, et al. Acetylmithinase succinyl-diamino-pimelate desuccinylase and carboxypeptidase G2 are evolutionarily related. *Gene*, 1992, **116**(1): 1 - 6.
- [8] pET System Manual TB055. 11th ed. <http://www.merckbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB055.pdf>.
- [9] Zhang LX (张龙翔). The Methods and Technology of Biochemistry Experiments. Beijing: Higher Education Press (高等教育出版社), 1982, pp. 161 - 165.
- [10] Wang HQ (王洪睿), Zhang Y (张彤), Wang ZF (王泽峰), et al. There was no disulfide bond in aminoacylase. *Science in China Series B* (中国科学 B 辑), 1995, **25**(1): 54 - 59.
- [11] Qiang X, Hai MZ. Refolding intermediate of guanidine hydrochloride denatured aminoacylase I. *JBJC*, 2004, **36**: 1332 - 1340.