

# 灵杆菌非特异性核酸酶的原核表达、纯化及活性分析

陈鹏, 杨海艳, 李慧婧, 杨龙雨, 李学俊

西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100

**摘要:** 以灵杆菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增非特异性核酸酶 (Non-specific nuclease, NU) 基因, 并克隆到 pMAL-c4X 载体上构建重组表达载体 pMAL-c4X-NU。经测序及 BLASTN 发现其与灵杆菌 *Serratia marcescens* 核酸酶基因的同源性为 97%。将构建的表达载体 pMAL-c4X-NU 转入大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导实现了胞内表达 78 kDa 的麦芽糖结合蛋白-NU 融合蛋白 (Maltose-binding protein-NU, MBP-NU), 其最佳诱导表达条件为 37 °C, 0.75 mmol/L IPTG 诱导 1.5 h。用 Amylose resin 纯化得到了目的蛋白。活性检测表明 MBP-NU 具有同时降解 DNA 和 RNA 的活性, 在 37 °C、pH 8.0 时活性最高, 比活力为  $1.11 \times 10^6$  U/mg, 目标蛋白的纯化效率可达 10.875 mg/L。纯化的目标蛋白中无蛋白酶活性存在。0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 以及 150 mmol/L KCl 对 MBP-NU 的活性几乎无影响, 因此 MBP-NU 可作为蛋白质纯化过程中核酸的高效降解酶。

**关键词:** 灵杆菌核酸酶, 载体构建, 融合蛋白, 亲和纯化

## Expression, purification and characterization of non-specific *Serratia* nuclease in *Escherichia coli*

Peng Chen, Haiyan Yang, Huijing Li, Longyu Yang, and Xuejun Li

College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** To efficiently produce non-specific nuclease (NU) of *Serratia marcescens* through recombinant overexpression approach and to characterize the purified NU. The nuclease gene was amplified from the genomic DNA of *Serratia marcescens* by PCR and fused into vector pMAL-c4X with maltose binding protein (MBP) tag. The recombinant vector verified by DNA sequencing was transformed into *Escherichia coli* BL21. The expressed MBP-NU was purified through the amylose resin and its catalytic characters were analyzed. The results showed the NU gene had 97% identities with the reported *S. marcescens* nuclease gene and intracellularly expressed in *E. coli* BL21. The optimal expression conditions were 37 °C, 0.75 mmol/L IPTG with 1.5 h induction. The purified MBP-NU exhibited non-specific nuclease activity, able to degrade various nucleic acids, including RNA, single-stranded DNA and double-stranded DNA that was circular or linear. Its optimal temperature was 37 °C

**Received:** January 4, 2011; **Accepted:** May 30, 2011

**Supported by:** Basic Science Research Fund in Northwest A&F University (No. QN2009064), National Natural Science Foundation of China (No. 30400282).

**Corresponding author:** Peng Chen. Tel/Fax: +86-29-87092262; E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

Xuejun Li. Tel/Fax: +86-29-87091460; E-mail: sg801@163.com

西北农林科技大学基本科研业务费专项 (No. QN2009064), 国家自然科学基金 (No. 30400282) 资助。

and optimal pH 8.0. From 1 L culture broth 10.8 mg NU could be purified with a specific activity of  $1.11 \times 10^6$  U/mg. The catalytic activity of NU was not inhibited by reagents such as EDTA (0.5 mmol/L), PMSF (1 mmol/L) and KCl (150 mmol/L) commonly used in protein purification.

**Keywords:** *Serratia* nuclease, vector construction, fusion protein, affinity purification

重组蛋白质表达技术的成熟与发展为研究蛋白质的结构与功能提供了高效的研究手段,同时重组表达技术为众多蛋白质与酶的大规模制备和应用奠定了基础。但目前在重组蛋白特别是医用重组蛋白纯化过程中还面临诸多问题,如菌体释放的核酸会产生高粘度的裂解液进而影响下游的操作和层析纯化,同时过量的核酸将导致纯化产品的核酸污染等。核酸的污染也会影响到纯化过程蛋白的定量以及活性分析甚至影响蛋白的结晶。现今最常用的核酸去除方法利用了核酸带负电荷的特征,在初步纯化时利用如 STREAMLINE SP、SP Sepharose Big Beads、SP 或 CM Sepharose FF、SP Sepharose XL 等离子交换介质除去大量核酸,也有研究利用疏水层析介质去除核酸。但以上方法成本较高,需要昂贵的仪器设备,不适合纯化前期大规模的核酸去除。酶催化的高效性使酶法去除核酸成为理想的途径,已有通过加入核酸酶去除蛋白样品中核酸的研究实例。如商业化产品 Benzonase endonuclease、DNase 和 RNase A 等,其中 Benzonase endonuclease 来源于灵杆菌。灵杆菌核酸酶 (*Serratia marcescens* nuclease, smNU) 是一种分泌至胞外的非特异性磷酸二酯酶,其在金属阳离子存在下可以高效切割任意形式的核酸 (DNA 和 RNA, 双链和单链)<sup>[1-5]</sup>,其催化效率是葡萄球菌核酸酶的 4 倍,牛胰 DNase I 的 34 倍。灵杆菌是一种条件致病菌,致使大规模培养菌液用于核酸酶的分离纯化存在潜在的危险,因此有必要探索该酶安全高效的重组表达体系。由于核酸酶的胞内表达可能造成重组表达宿主细胞自身核酸的降解而产生宿主细胞的强毒性,因此已报道的 smNU 重组表达均采用胞外分泌的方式,但表达效率较低,每升仅可生产  $1.23 \times 10^4$  U 的酶<sup>[6]</sup>。本研究在成功克隆了 smNU 基因的基础上,构建了 smNU 的胞内原核表达载体,实现了该酶的胞内高

效表达,并用 Amylose resin 纯化该酶得到了理想的纯化效果,为今后 smNU 的分子改造以及应用奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

经鉴定的灵杆菌为本实验室保存,大肠杆菌 BL21 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。pMAL-c4X 载体为 New England Biolabs 公司产品,其分子大小为 6 645 bp,编码麦芽糖结合蛋白的片段大小为 1 388 bp。

#### 1.1.2 工具酶和主要试剂

实验用到的限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白分子质量 Marker 均购自 Fermentas 公司。Pfu Turbo DNA 聚合酶为 Stratagene 公司产品。DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司。其他常用生化及分子生物学试剂均为国产或进口分析纯。Amylose resin 为 NEB 公司产品。引物合成及测序由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 灵杆菌核酸酶原核表达载体的构建

根据 smNU 的基因序列设计并合成引物。上游引物 NU12-1: 5'-GCCGACACGCTCGAATCCATC-3', 下游引物 NU12-2: 5'-AGTCGGATCCTCAGTTTTGCAGCCCATCAACTCC-3', 下游引物引入 BamH I 的酶切位点 (下划线所示)。以灵杆菌的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 (25  $\mu$ L): 1 $\times$ PCR 缓冲液, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTPs, 75 ng 灵杆菌基因组 DNA, 200 nmol/L 上下游引物, 1 U Pfu Turbo DNA 聚合酶。PCR 反应参数为: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 61  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

PCR 产物采用 PCR 产物回收试剂盒纯化后进行 *Bam*H I 酶切, 质粒 pMAL-c4X 采用 *Xmn* I 和 *Bam*H I 双酶切, 胶回收大片段后进行连接, 连接产物转入 *E. coli* BL21。经菌落 PCR 验证为阳性的克隆, 提取质粒送北京奥科生物技术有限责任公司进行测序鉴定。

### 1.2.2 序列分析

将测序所得的序列在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 采用 BLASTN 软件进行相似性搜索, 核酸序列同源性比较用 ClustalX2 程序进行分析。

### 1.2.3 MBP-NU 融合蛋白的诱导表达

将构建正确的重组质粒 pMAL-c4X-NU 转入 *E. coli* BL21, 37 °C 培养 7 h 后, 用于扩大培养。

1) 诱导温度和 IPTG 浓度对 MBP-NU 融合蛋白表达量的影响: 将扩大培养的菌液按 1:100 接种于 LB 液体培养基中, 分别置于 24 °C、28 °C、37 °C 培养至菌浓度  $OD_{600}$  值为 1.0 时, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.5、0.75、1.0 mmol/L, 诱导培养 3 h, 收获细菌培养物, SDS-PAGE 分析表达情况, 分离胶浓度为 12.5%。

2) 诱导时间对 MBP-NU 融合蛋白表达量的影响: 将扩大培养的菌液按 1:100 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 培养至菌浓度  $OD_{600}$  值为 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.75 mmol/L, 诱导时间分别为 0.5、1.5、2.5 和 3.5 h, 收获细菌培养物, SDS-PAGE 分析表达结果。

### 1.2.4 融合蛋白的纯化

融合蛋白的纯化参考 NEB 公司 pMAL 试剂盒说明进行<sup>[7]</sup>。将扩大培养的菌液按 1:100 接种于 250 mL LB 培养基中, 37 °C 培养至菌浓度  $OD_{600}$  值为 1.0 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.75 mmol/L, 诱导培养 2 h 后, 8 000 r/min 离心 10 min 并将收获的菌体重悬于 40 mL 的裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) 中, -20 °C 放置过夜后, 冰浴条件下超声破碎 20 min, 超声功率为 30 W, 超声间隔时间为 10 s, 裂解的菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清备用。

用 8 倍柱体积的平衡缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) 平衡 Amylose resin 亲和层析柱, 然后加入样品并使其缓慢的流过层析柱以便样品充分的结合, 用 10 倍柱体积的洗涤缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, pH 7.2) 洗去未结合的蛋白, 最后用洗脱缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 麦芽糖, pH 7.2) 洗脱, 洗脱蛋白用 SDS-PAGE 进行分析, 蛋白的纯度采用 BandsScan 软件进行分析。

### 1.2.5 MBP-NU 融合蛋白的活性检测

以 10 kb 的标准质粒为底物, 不同单位的 MBP-NU 对其进行水解反应。酶活单位的定义: 在 37 °C 条件下 30 min 完全降解 5 μg DNA 的酶量为一个酶活单位。在冰浴上每支 PCR 管中加入 3 μL 缓冲液 N (250 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl, 0.5 g/L BSA, 5 mmol/L  $MgSO_4$ ), 过量的标准质粒, 一定量的 MBP-NU, 用 ddH<sub>2</sub>O 补充至终体积为 15 μL, 混匀, 37 °C 保温 30 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测反应结果。MBP-NU 的量分别为: 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0 U。

以含 RNA 的 10 kb 标准质粒为底物, 进行 MBP-NU 降解 RNA 的定性实验。反应体系: 3 μL 缓冲液 N, 过量的标准质粒, 适量的 MBP-NU, 再加入 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 15 μL, 混匀, 37 °C 保温 30 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测反应结果。MBP-NU 的量分别为: 0、8、16、24、32、40、48、56 U。

### 1.2.6 EDTA 和 PMSF 对 MBP-NU 活性的影响

在下述反应体系中分别加入不同浓度的抑制剂 EDTA 或 PMSF, 混匀, 37 °C 保温 30 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测反应结果。EDTA 的浓度分别为: 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L。PMSF 的浓度分别为: 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L。反应体系为: 3 μL 缓冲液 N, 过量的标准质粒, 7.5 U 的 MBP-NU, 适量的抑制剂, 再加入 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 15 μL。

### 1.2.7 温度、pH 和盐浓度对 MBP-NU 活性的影响

参考 1.2.5 的方法, 分别在 0 °C、4 °C、16 °C、

24 °C、37 °C、52 °C、67 °C、82 °C条件下检测 MBP-NU 的水解活性,分析温度对 MBP-NU 水解活性的影响。用 pH 分别为 3.7、4.5、5.6、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液替代缓冲液 N,在 37 °C 条件下检测 MBP-NU 的水解活性,分析 pH 对 MBP-NU 水解活性的影响。

为探讨盐浓度对 MBP-NU 水解活性的影响,参考 1.2.5 的方法,在反应体系中加入终浓度分别为 0、50、100、150、200、250、300 mmol/L KCl 或 NaCl,37 °C 条件下检测酶的水解效率。

### 1.2.8 纯化 MBP-NU 中蛋白酶活性的检测

纯化蛋白中蛋白酶活性的测定参考 Cupp-Enyard<sup>[8]</sup>的方法。灭菌试管加入 5 mL 0.65% (W/V) 酪蛋白溶液,37 °C 水浴中保温 10 min,加入 2 000 U 的纯化酶液,摇匀后,37 °C 精确反应 1 h,然后立即向管内加入 5 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液以终止反应。37 °C 水浴中继续保温 30 min,12 000 r/min 离心 20 min,取上清在 275 nm 波长处测定光吸收。以含有高温灭活酶液的测定管作为对照,每次测定重复 3 次。

另外分别以商品化的牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 和本实验室纯化的无机焦磷酸酶 (pyrophosphatase, PPA) 作为反应底物,与 10 000 U 高剂量的 MBP-NU 在 37 °C 条件下反应

24 h 后,SDS-PAGE 分析 BSA 和 PPA 电泳带型的变化。

### 1.2.9 纯化 MBP-NU 与商品化 Benzonase 的活性比较

为了比较 MBP-NU 与商品化的 Benzonase 的水解效率,参考 1.2.5 的方法,在反应体系中分别加入终浓度为 1.0、10 U 的酶,37 °C 条件下检测酶的水解效率。

### 1.2.10 纯化 MBP-NU 的去核酸效果检测

采用内标法检测 MBP-NU 对核酸的水解效果。本实验室在无机焦磷酸酶的重组表达与纯化实验中,6 g 诱导表达的菌体用 15 mL 裂解液 (25 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.5% Tween20, pH 8.0) 进行裂解,取裂解液加入 1.2.1 中的 PCR 产物至终浓度为 100 ng/μL,再分别添加终浓度为 0、1、5、10、15、20 U/mL 的 MBP-NU,37 °C 条件下反应 5 min,置于冰上。取 2 μL 做模板参考 1.2.1 扩增参数及体系检测内标水解程度。

## 2 结果

### 2.1 灵杆菌核酸酶原核表达载体的构建

以灵杆菌的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增编码灵杆菌核酸酶的 DNA 片段,电泳分析显示在 750 bp 左右有一特异 DNA 带 (图 1A),大小与预期

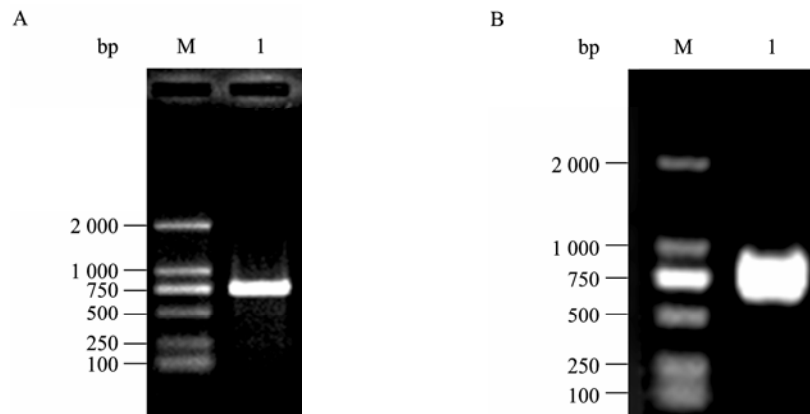


图 1 NU 基因的 PCR 扩增 (A) 和重组质粒的 PCR 鉴定 (B)

Fig. 1 PCR amplification of NU gene (A) and identification of recombinant vector pMAL-c4X-NU (B). M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of NU gene.

结果一致。将扩增产物酶切纯化后连接到 pMAL-c4X 载体上, 得到重组表达载体 pMAL-c4X-NU。提取重组表达载体, 质粒 PCR 扩增得到约 750 bp 的基因片段 (图 1B), 与目的序列大小一致, 并经测序证实载体构建完全正确。

### 2.2 灵杆菌核酸酶的序列分析

用 BLASTN 在线软件对所测 NU 序列进行同源

基因检索显示其与 *S. marcescens* 核酸酶基因的同源性为 97%, 与 *Serratia proteamaculans* 568 的核酸酶基因的同源性为 85%。应用 ClustalX2 软件对其核酸序列进行比对发现其与 *S. marcescens* 核酸酶基因 (GenBank Accession No. M19495.1) 有 22 个碱基不同, 编码的氨基酸仅在第 12 位不同, 其他均为同义密码子的变化 (图 2)。

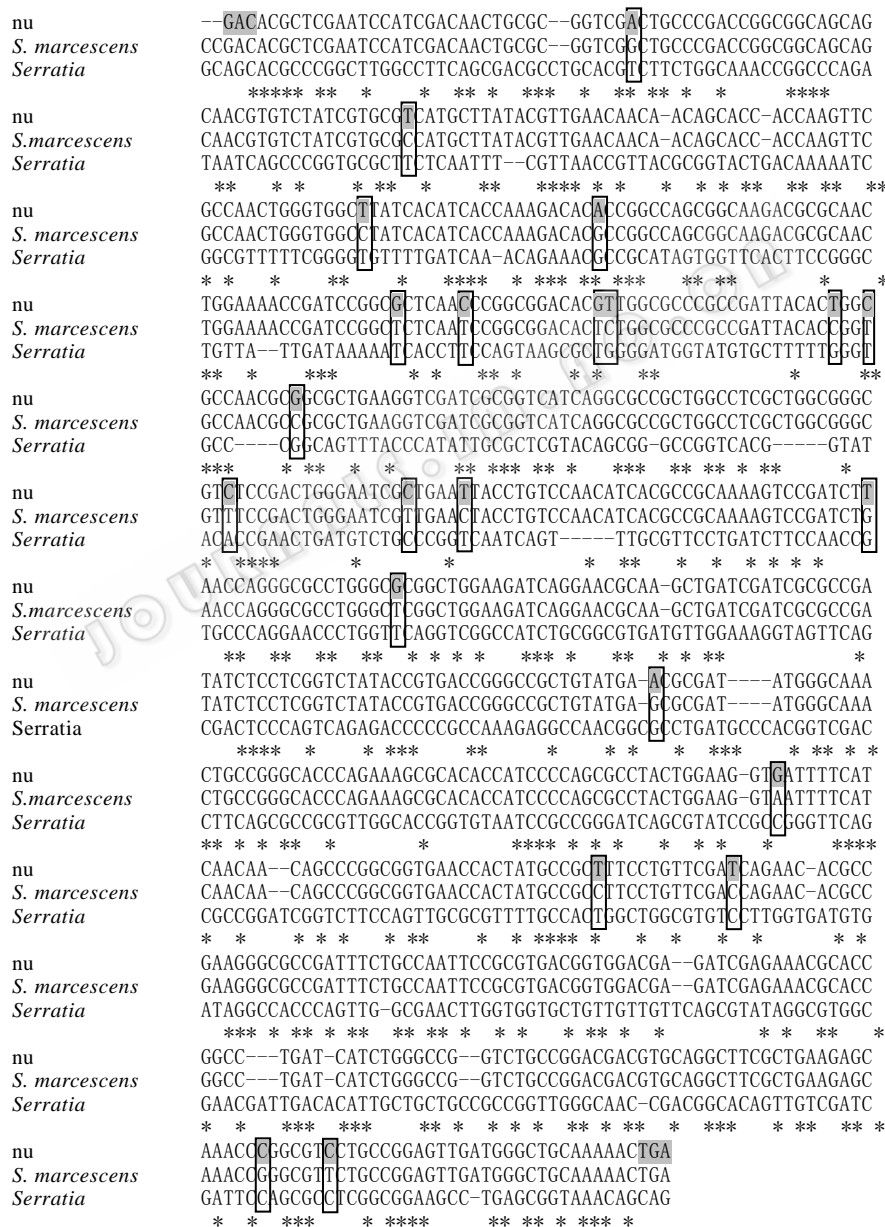


图 2 灵杆菌核酸酶 NU 和与其同源的核酸序列比对

Fig. 2 Alignment of nucleic acids between NU and its homologous sequences. The reading frame of the maturation protein was highlighted by gray coating.

### 2.3 MBP-NU 融合蛋白的诱导表达

SDS-PAGE 结果显示,经 IPTG 诱导的含重组表达载体的细菌可大量表达大小约为 78 kDa 的新蛋白,而分别含有 pMAL-c4X、pMAL-c4X-NU (未经 IPTG 诱导) 载体的宿主菌及不含表达载体的宿主菌均不表达该蛋白(图 3)。新蛋白的分子量约为 78 kDa,与预期值大小一致,说明 MBP-NU 融合蛋白诱导表达成功。

#### 2.3.1 诱导温度和 IPTG 浓度对 MBP-NU 融合蛋白表达量的影响

SDS-PAGE 结果显示(图 4),在 IPTG 浓度相同的条件下,融合蛋白的相对表达量随温度的升高而增加;在温度相同的条件下,融合蛋白的相对表达量随 IPTG 浓度的不同出现了不同的变化,24 °C 时表达量基本相同,28 °C 时浓度为 1.0 mmol/L 时的表达量最大,37 °C 时浓度为 0.75 mmol/L 时的表达量最大。其中在 37 °C 时 IPTG 浓度为 0.75 mmol/L 的条件下,融合蛋白的相对表达量最高。

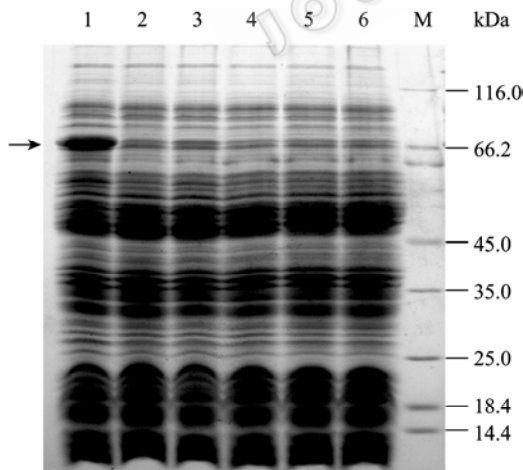


图 3 MBP-NU 诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the induced expression of recombinant MBP-NU. M: protein marker; 1,3,5: induced BL21/pMAL-c4X-NU, BL21/pMAL-c4X and BL21, respectively; 2,4,6: uninduced BL21/pMAL-c4X-NU, BL21/pMAL-c4X and BL21, respectively.

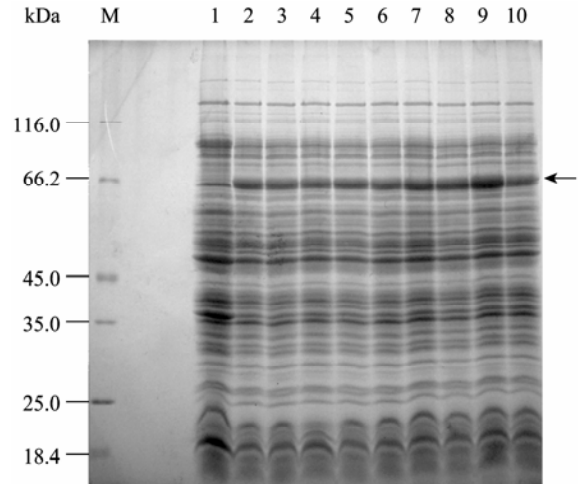


图 4 不同诱导温度和 IPTG 浓度对 MBP-NU 表达量的影响

Fig. 4 Effects of temperature and IPTG concentration on the expression of MBP-NU. M: protein marker; 1: uninduced; 2,3,4: induced at 24 °C; 5,6,7: induced at 28 °C; 8,9,10: induced at 37 °C; 2,5,8: induced with 0.5 mmol/L IPTG; 3,6,9: induced with 0.75 mmol/L IPTG; 4,7,10: induced with 1.0 mmol/L IPTG.

#### 2.3.2 诱导时间对 MBP-NU 融合蛋白表达量的影响

SDS-PAGE 结果显示(图 5),诱导时间在 1.5 h 时融合蛋白的相对表达量较高。诱导时间超过 2.5 h,表达量有所下降。

### 2.4 融合蛋白的纯化

将诱导表达的菌体进行超声破碎后离心,上清液用 Amylose resin 进行纯化。纯化蛋白经 SDS-PAGE 和 BandsScan 软件分析其纯度为 93.8% (图 6),表明与 MBP 融合的灵杆菌核酸酶可通过 Amylose resin 进行高效的纯化,从而避免了多次纯化对核酸酶稳定性及回收率的影响。

### 2.5 MBP-NU 融合蛋白的活性检测

研究考察了不同活性浓度的 MBP-NU 对 DNA、RNA 的水解能力,如图 7 所示。随着 MBP-NU 的浓度增加,DNA 的浓度由于酶解而减少。当 MBP-NU 浓度达到 10.0 U 时,DNA 已完全被降解。由图 7B 可知,MBP-NU 可以完全降解 RNA。纯化的 MBP-NU 的比活力为  $1.11 \times 10^6$  U/mg。

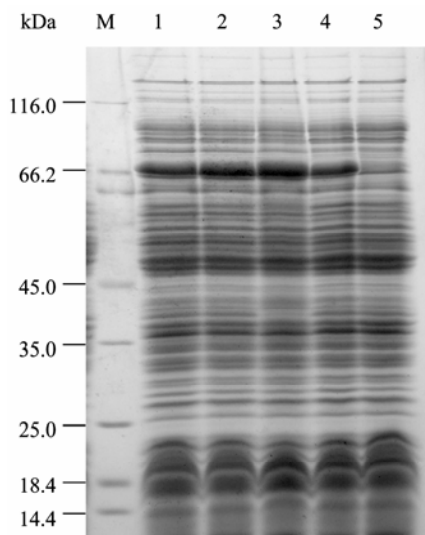


图5 不同诱导时间对 MBP-NU 表达量的影响

Fig. 5 Effect of induction duration on the expression of MBP-NU. M: protein marker; 1-4: induced for 3.5, 2.5, 1.5, 0.5 h, respectively; 5: uninduced.

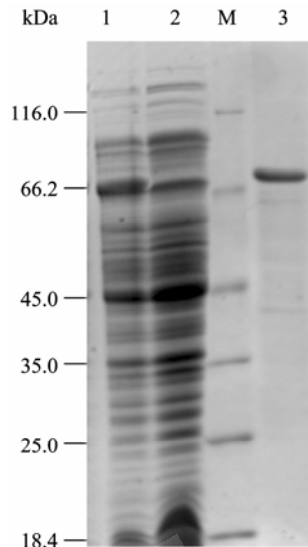


图6 纯化 MBP-NU 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified MBP-NU. M: protein marker; 1: induced; 2: uninduced; 3: purified MBP-NU.

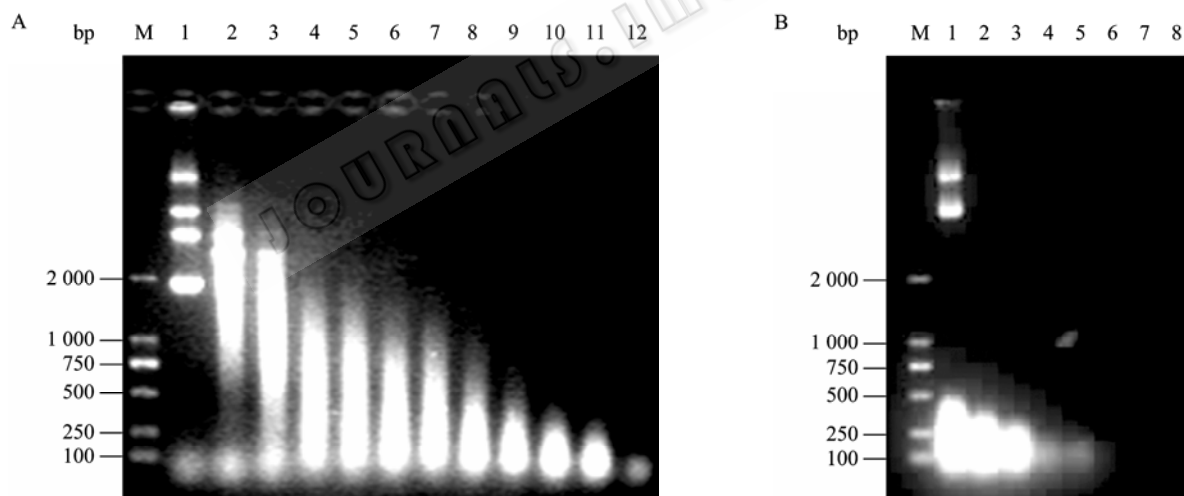


图7 MBP-NU 的 DNase 活性 (A) 和 RNase 活性 (B) 检测

Fig. 7 Assay of the DNase (A) and RNase (B) activity of MBP-NU. (A) 1-12: different concentration of MBP-NU(U): 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0. (B) 1-9: different concentration of MBP-NU (U): 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56; M: DNA marker DL2000.

## 2.6 EDTA 和 PMSF 对 MBP-NU 活性的影响

研究考察了不同浓度的 EDTA 和 PMSF 对 MBP-NU 活性的影响, 如图 8 所示, 0.5 mmol/L EDTA 或 1 mmol/L PMSF 对 MBP-NU 的活性几乎无影响, 但 EDTA 浓度达到 1 mmol/L 时, 约 80% 的

MBP-NU 活性受到抑制。

## 2.7 温度、pH 和盐浓度对 MBP-NU 活性的影响

考察了不同温度、pH 和盐浓度对 MBP-NU 活性的影响。如图 9A 所示, 随着处理温度的升高, 剩余 DNA 的量由于酶解而呈现先降低后增加的变

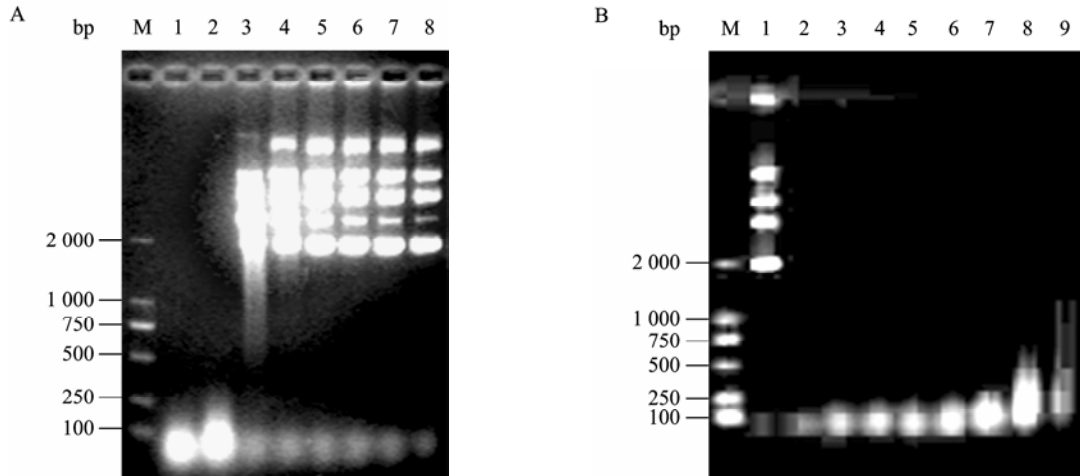


图 8 EDTA (A) 和 PMSF (B) 对 MBP-NU 活性的影响

Fig. 8 Effects of EDTA (A) and PMSF (B) on the MBP-NU activity. (A) 1–7: different concentration of EDTA (mmol/L): 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0; 8: control. (B) 1: control; 2–9: different concentration of PMSF (mmol/L): 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.5; M: DNA marker DL2000.

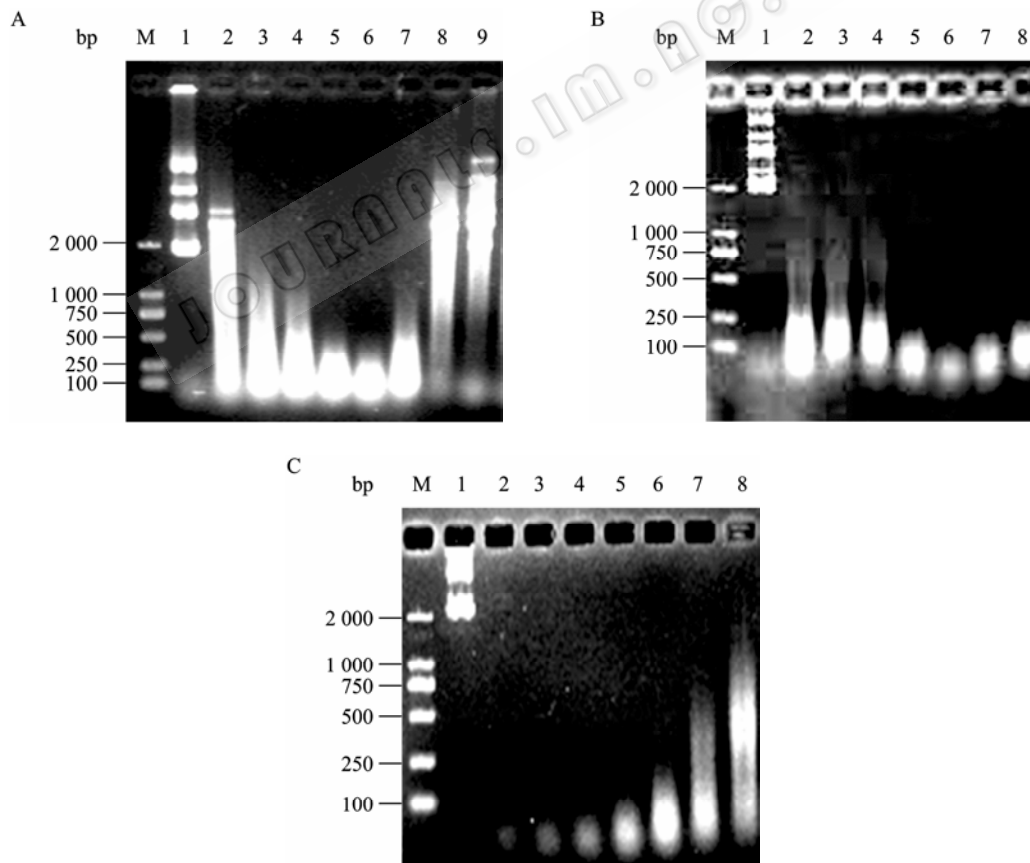


图 9 温度 (A)、pH (B) 和不同浓度 KCl (C) 对 MBP-NU 活性的影响

Fig. 9 Effect of temperature (A), pH (B) and different KCl concentration (C) on the MBP-NU activity. (A) 1: control; 2–9: different temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ): 0, 4, 16, 24, 37, 52, 67, 82. (B) 1: control; 2–8: different pH: 3.7, 4.5, 5.6, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0. (C) 1: control; 2–8: different KCl concentration (mmol/L): 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300; M: DNA marker DL2000.



化趋势, 其中 37 °C 时的浓度最低, 说明 MBP-NU 的最适温度为 37 °C; 图 9B 显示 MBP-NU 的最适 pH 为 8.0; 图 9C 说明, 低于 150 mmol/L 的 KCl 对 MBP-NU 的活性几乎没有影响, 当 KCl 浓度为 250 mmol/L 时开始出现抑制现象, 并随盐浓度的增加抑制程度也增加。NaCl 对 MBP-NU 的活性影响与 KCl 相同 (结果未显示)。

## 2.8 纯化 MBP-NU 中蛋白酶活性的检测

以酪蛋白为底物未检测到纯化的 MBP-NU 中存在蛋白酶活性。分别以一定纯度的 BSA 和 PPA 为底物, 与 10 000 U 大剂量纯化的 MBP-NU 长时间保温后的电泳结果显示, BSA 和 PPA 样品的电泳带型无变化 (图 10), 进一步证明本实验纯化的 MBP-NU 中没有蛋白酶活性。

## 2.9 纯化 MBP-NU 与商品化 Benzonase 的活性比较

纯化的 MBP-NU 与商品化的 Benzonase 进行核酸的水解比较显示, 在相同的酶量下, 两种酶对核酸的水解效率相同 (图 11)。

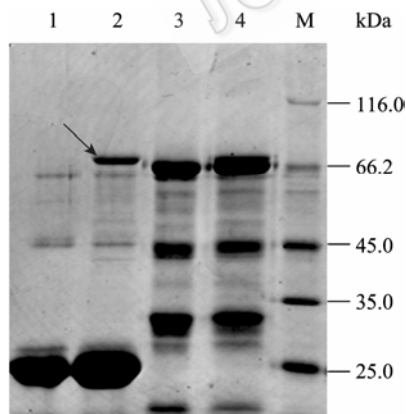


图 10 纯化 MBP-NU 与 PPA 和 BSA 保温 24 h 对电泳谱带的影响分析

Fig. 10 Effect of co-incubation of MBP-NU with PPA or BSA for 24 h on the SDS-PAGE bands patterns. M: protein marker; 1,2: PPA; 3,4: BSA; 1,3: control; 2,4: MBP-NU treatment. Arrows indicated the added MBP-NU.

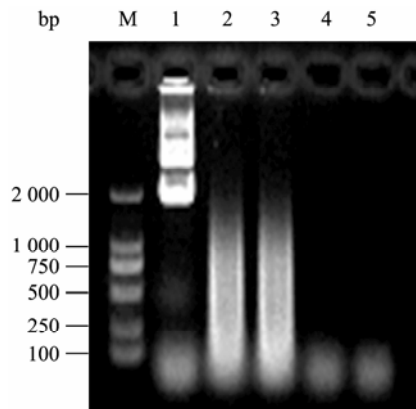


图 11 纯化 MBP-NU 与商品化 Benzonase 的活性比较

Fig. 11 Activity comparison between MBP-NU and Benzonase. M: DNA marker DL2000; 1: control; 2: Benzonase 1.0 U; 3: MBP-NU 1.0 U; 4: Benzonase 10 U; 5: MBP-NU 10 U.

## 2.10 纯化的 MBP-NU 除核酸效果检测

结合灵敏的 PCR 检测技术, 采用内标法对加入的内标片段的水解程度进行检测, 结果显示 (图 12), 伴随 MBP-NU 浓度的增加, 目标产物的扩增量逐渐降低, 当酶量超过 20 U/mL 时, 目的条带完全消失, 说明 MBP-NU 对于菌体裂解液中的模板有很高的水解效率。

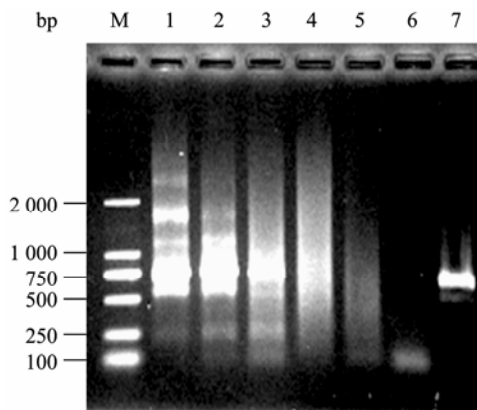


图 12 不同浓度 MBP-NU 对菌体裂解液中内标基因 NU PCR 扩增的影响

Fig. 12 Effect of MBP-NU treatment on the PCR amplification of internal reference gene NU in cell lysis. M: DNA marker DL2000; 1-6: different concentration of MBP-NU (U): 0, 1, 5, 10, 15, 20; 7: PCR product from 1.2.1.

### 3 讨论

对灵杆菌核酸酶的分泌途径、进化和作用机制已有较多的研究报道<sup>[9-12]</sup>。灵杆菌核酸酶的催化高效性使其在生物技术和实际生产中的应用价值不断凸显,特别是该酶在消除核酸污染方面的显著效果<sup>[13]</sup>。由于核酸酶本身对宿主细胞会造成强的毒害作用,从而给该酶的重组表达带来了很大困难。已有研究报道利用大肠杆菌分泌表达该酶,但由于原核分泌系统的局限性,使其表达量仅达到 $1.23 \times 10^4$  U/L<sup>[6]</sup>。本研究克隆了灵杆菌的核酸酶基因,序列分析表明,其与报道的 *S. marcescens* 核酸酶基因、*Serratia proteamaculans* 568 的核酸酶的同源性分别为 97% 和 85%。尝试利用分泌型原核表达载体 pLLP-OmpA 和 pET22b 表达该基因,但由于微量的胞内本底表达使菌体生长严重受抑或者死亡。

本研究构建了 MBP-NU 融合蛋白胞内原核表达载体,在对多个菌种进行筛选的基础上,实现了其在大肠杆菌胞内的成功表达和表达条件优化,菌体生长正常,表达量高达  $1.21 \times 10^7$  U/L。对于该酶在胞内的可溶性表达为何没有造成宿主细胞的死亡,推测原因主要有以下两个方面:一是灵杆菌核酸酶与麦芽糖结合蛋白融合表达,有助于减少其在菌体内对宿主菌的毒害;二是已有研究通过点突变的方式证明二硫键是灵杆菌核酸酶发挥催化活性所必需的<sup>[14]</sup>,由于胞内的氧化还原条件抑制了二硫键的形成,使酶在胞内无水解活性,因此不影响细胞的正常生长,当细胞破碎后,外界的氧化条件促使其向有活性的形式转化。另外本研究中曾转化构建的表达载体于有利于二硫键形成的菌株 Rosetta gami2 (DE3),未有转化菌落形成,同时发现该酶仅在个别的菌株中表达,推测可能是由于不同菌株细胞内部氧化还原状态的差异使二硫键的形成存在巨大的差异,其内在的真正原因有待进一步揭示和证实。

重组酶对核酸的水解实验证明重组核酸酶在不切除 MBP 的情况下仍具有降解 DNA 和 RNA 的

活性,最适反应条件为 37 °C、pH 8.0,蛋白纯化时缓冲液中常用的添加物 0.5 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF 对 MBP-NU 的活性几乎无影响,低于 150 mmol/L 的 KCl 或 NaCl (结果未显示) 对融合蛋白 MBP-NU 的活性亦无影响。纯化的 MBP-NU 中未检测到蛋白酶活性,且该酶具有很好的储存稳定性,4 °C 条件下储存 2 个月酶活性几乎没有变化,其水解效率与商品化 Benzonase 相同。Marcin 等报道细菌裂解液中添加 25 U/mL (约 25 ng/mL) 的 Benzonase 即可满足蛋白质纯化中核酸去除的需要,在浓度为 9 U/mL 时,4 h 可使 99% 的放射性标记的核酸完全水解,可满足 FDA 对重组蛋白药物每次使用剂量不得超过 10 pg 核酸污染的需求<sup>[15]</sup>。本研究中发现表达 MBP-NU 菌体的裂解液粘稠度明显低于对照菌。本实验室在无机焦磷酸化酶的重组表达与纯化实验中,向含有 6 g 菌体的 15 mL 裂解液中添加终浓度为 10 U/mL (约 10 ng/mL) 的 MBP-NU,裂解菌体的粘度在 5 min 内明显下降,结合 PCR 高灵敏度的检测极限,采用内标法证明,当酶浓度达到 20 U/mL 时,在 5 min 内即可使作为内标的 DNA 模板降解至 PCR 无法检测到的水平。以上结果说明该酶具有极高的核酸水解效率,在核酸去除中具有添加酶蛋白量少的显著特征。

本研究建立了灵杆菌核酸酶的高效胞内重组表达体系,其表达量远远高于已有的分泌重组表达系统,融合 MBP 的核酸酶具有很高的水解效率,这些结果为在蛋白纯化中利用酶法低成本地去除核酸奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Muro-Pastor AM, Flores E, Herrero A, et al. Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol*, 1992, 6(20): 3021-3030.
- [2] Rangarajan ES, Shankar V. Sugar non-specific endonucleases. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25(5):

- 583–613.
- [3] Li L, Lin S, Yanga F. Functional identification of the non-specific nuclease from white spot syndrome virus. *Virology*, 2005, 337(2): 399–406.
- [4] Meiss G, Gast FU, Pingoud AM. The DNA/RNA non-specific *Serratia* nuclease prefers double-stranded A-form nucleic acids as substrates. *J Mol Biol*, 1999, 288(3): 377–390.
- [5] Chen C, Krause K, Pettitt BM. Advantage of being a dimer for *Serratia marcescens* endonuclease? *J Phys Chem B*, 2009, 113(2): 511–521.
- [6] Kim WY, Lee HS, Suh SY, et al. Purification and cellular localization of extracellular nuclease of *Serratia marcescens* expressed in *Escherichia coli*. *Kor J Microbiol*, 1994, 32(2): 147–154.
- [7] Cattoli F, Boi C, Sorci M, et al. Adsorption of pure recombinant MBP-fusion proteins on amylose affinity membranes. *J Membrane Sci*, 2006, 273(1/2): 2–11.
- [8] Cupp-Enyard C. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *J Vis Exp*, 2008, 17(19): 899.
- [9] Schäfer P, Scholz SR, Gimadutdinow O, et al. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol*, 2004, 338(2): 217–228.
- [10] Miller MD, Cai JW, Krause KL. The active site of *Serratia* endonuclease contains a conserved magnesium-water cluster. *J Mol Biol*, 1999, 288(5): 975–987.
- [11] Lunin VY, Levnikov VM, Shlyapnikov SV, et al. Three-dimensional structure of *Serratia marcescens* nuclease at 1.7Å resolution and mechanism of its action. *FEBS Lett*, 1997, 412(1): 217–222.
- [12] Shlyapnikov SV, Lunin VV, Blagova EV, et al. X-ray analysis of the magnesium-containing endonuclease from *Serratia marcescens*. *Russ J Bioorg Chem*, 2001, 27(6): 370–377.
- [13] Benedik MJ, Strych U. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 165(1): 1–13.
- [14] Ball TK, Suh Y, Benedik MJ. Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. *Nucl Acids Res*, 1992, 20(19): 4971–4974.
- [15] Olszewski M, Filipkowski P. Benzoylase-possibility of practical application. *Postepy Biochem*, 2009, 55(1): 21–24.