

K5 裂解酶在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析

高金卉¹, 窦文芳¹, 李会¹, 张晓梅¹, 许泓瑜¹, 许正宏^{1,2}

1 江南大学医药学院制药工程研究室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

高金卉, 窦文芳, 李会, 等. K5 裂解酶在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析. 生物工程学报, 2012, 28(6): 696-704.

Gao JH, Dou WF, Li H, et al. Expression, purification and characterization of K5-lyase in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 696-704.

摘要: K5 多糖裂解酶 (Elma) 能够裂解半合成肝素的底物-K5 多糖, 裂解产物是半合成法生产低分子量肝素的底物。利用 PCR 方法扩增 *elma*, 构建表达载体 pET-28a-Elma, 将构建好的质粒转化至大肠杆菌 BL21 中, 以 0.2 mmol/L 的 IPTG 在 16 °C 诱导 5 h 实现了高效表达, SDS-PAGE 分析表明 Elma 表达量可达菌体总蛋白的 30% 以上。采用 Ni²⁺-NTA 亲和层析法和 G-75 分子筛层析纯化目的蛋白, 其纯度大于 95%。通过 PAGE 多糖电泳发现裂解前后的 K5 多糖分子量有明显的减小。根据 Elma 裂解产物产生双键从而在 232 nm 处有吸光度的变化来测 Elma 的酶活。其最适反应温度为 37 °C, 反应的最适 pH 值为 7.0。底物特异性分析发现 Elma 除 K5 多糖外对肝素和透明质酸也有降解作用。

关键词: 大肠杆菌, K5 多糖, K5 裂解酶, 表达, 纯化

Expression, purification and characterization of K5 lyase in *Escherichia coli*

Jinhui Gao¹, Wenfang Dou¹, Hui Li¹, Xiaomei Zhang¹, Hongyu Xu¹, and Zhenghong Xu^{1,2}

1 Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: K5 polysaccharide of high molecular weight (HLW) can be splitted into low molecular weight (LMW) K5 polysaccharide by K5 lyase which can be used as the substrate of partial synthesis low molecular heparin sulfate (HS). To prepare recombinant K5 lyase (Elma) and analyze its biological activity, The gene of Elma was cloned by PCR amplification and was ligated with pET-28a. Then the recombinant expression vector pET-28a-Elma was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). After induction with 0.2 mmol/L IPTG at 16 °C for 5 h, Elma was successfully expressed,

Received: November 9, 2011; **Accepted:** December 30, 2011

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP111A50).

Corresponding author: Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP111A50) 资助。

SDS-PAGE analysis demonstrated that the enzyme constituted more than 30% of the total cell proteins. After Ni^{2+} -NTA affinity and G-75 chromatography, the purity of enzyme was more than 95%. Enzymatic activity was determined according to the change of absorbance at 232 nm per ml of the sample. The reduction of the polysaccharide molecular weight could be detected by PAGE electrophoresis. Elma can partially split HA and HS. Its optimal reaction temperature is 37 °C and the optimal reaction pH is 7.0.

Keywords: *Escherichia coli*, K5 polysaccharide, K5 lyase, expression, purification

硫酸乙酰肝素 (HS) 是一种带电荷的多糖分子, HS 常被用作抗凝血药。肝素类化合物, 除了有明确的抗凝血和抗血栓活性外, 有研究发现它们也有防止艾滋病毒感染和减缓细胞体外凋亡的作用^[1-2]。当前肝素类生物活性分子一般从哺乳动物器官中提取, 用该方法提取的肝素易受非常规病毒的二次污染^[3], 而以半合成方法合成 HS 可避免此类污染。

K5 多糖具有以下结构: ...→4) β-D-葡萄糖醛酸 (1→4) α-D-N-乙酰氨基葡萄糖 (1→4) ...。它是肝素的非硫酸前体, 用于生产半合成肝素^[4]。K5 多糖来源于大肠杆菌, 是一种荚膜多糖^[5-6], 该多糖存在于发酵液中。在一定的培养条件下 K5 多糖的分子量为 100~200 kDa, 但是受自身所产生 K5 裂解酶的影响, 发酵生产的 K5 多糖存在低分子量和高分子量组分^[5], 多糖分子量分布不均。合成低分子量肝素所需 K5 多糖的分子量为 5 kDa 左右^[7-10], K5 裂解酶可以将发酵生产的 K5 多糖裂解为分子量为 5 kDa 左右的多糖, 因此 Elma 可以用于低分子量 K5 多糖的制备。然而该酶在大肠杆菌 K5 中只有少量表达, 且难以分离纯化。因此我们构建了能够大量高效表达该酶的基因工程菌。

本研究在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中高效表达了大肠杆菌 K5 裂解酶, 表达产物经 Ni^{2+} -NTA 亲

和层析纯化、G75 分子筛凝胶纯化后得到能裂解 K5 多糖的裂解酶 Elma^[8], 并对其酶学性质进行了初步研究, 本研究为 K5 裂解酶作为一种新型的工具酶的生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3) (*Escherichia coli* BL21 (DE3)), 大肠杆菌 JM109 (*Escherichia coli* JM109α)、大肠杆菌 K5 (*Escherichia coli* Bi 8337/41 (O10 : K5 : H4)), 质粒 pET-28a 为本实验室保存。质粒 pMD18-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 酶、载体、引物和主要试剂

扩增大肠杆菌 K5 裂解酶 *elma* 基因的引物 (表 1) 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其上下游引物分别加入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点 (下划线标示)。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*exTaq* 酶等分子生物学工具酶购自大连宝生物公司。PCR 产物纯化试剂盒、IPTG、低分子量标准蛋白等购自上海生工生物技术有限公司。 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱和 G-75 凝胶柱层析购自 GenScript 公司。其他化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。K5 多糖为本实验室制备^[11-12]。

表 1 克隆目的基因 *elma* 的引物

Table 1 Primers for cloning of target genes

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	GG <u>ATCCAT</u> GACGGTCTCAACCGAAGTT
Reverse	GCCG <u>TTCGAG</u> TCAATTCCTGTTAATTG CAAA

The underlined part is the restriction sites

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 K5 裂解酶基因的克隆及表达载体的构建

提取大肠杆菌 K5 基因组,以基因组为模板扩增大肠杆菌裂解酶基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后连接 pMD18-T Simple Vector 并用 CaCl_2 法转入大肠杆菌 JM109 中,提取连接好的 T 载体用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后,用 T4 DNA 连接酶连接到同样经过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-28a(+) 质粒上,构建重组表达载体 pET-28a-Elma。转化后经提取质粒、PCR 和双酶切鉴定,筛选阳性克隆进行测序分析。

1.2.2 重组蛋白 Elma 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达及条件优化

将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细菌中。转化的 BL21 (DE3) 在 LB 培养基中活化过夜后,接种至含有 100 mg/L 卡那霉素的培养基中,对诱导条件进行优化,考察不同诱导剂量、诱导时间对目的蛋白表达量的影响及蛋白溶解性变化。经 12% SDS-PAGE 和光密度扫描检测,确定最适诱导条件。

1.2.3 重组蛋白的纯化

取 IPTG 诱导产物 500 mL, 4 °C 离心收集并

洗涤菌体,在冰浴中超声破碎菌体,离心取上清,将上清用 0.45 μm 的膜过滤后,采用 GenScript 公司的 Ni^{2+} -NTA 蛋白质纯化柱纯化目的蛋白,选择不同浓度的咪唑 (50~250 mmol/L) 梯度洗脱,具体操作参照其说明书并参考文献^[13,17],纯化后的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析,确定洗脱液的最佳咪唑浓度。然后用凝胶过滤色谱 SepHadex G-75 分离,收集不同时间洗脱下来的色谱峰,测定纯化效率^[14]。

1.2.4 Elma 的活性检测

定性测定: 1 μg 的 Elma 加入到 100 μL 的 1 g/L 的 K5 多糖反应液中,反应液含有 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 醋酸钙, pH 7.0, 37 °C 反应 10、20、30、40、50、60、70 min, 取各个反应时间的样品 10 μL 沸水浴 5 min。用 10% 聚丙烯酰胺电泳 125 V (20 min) ~250 V (40 min) 检测不同反应时间 K5 多糖分子量变化。用阿利辛蓝和银染的方法显色^[15]。

反应最适温度和 pH 确定: 1 μg 的 Elma 加入到 1 g/L 的 K5 多糖 3 mL 中,反应液含有 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 醋酸钙, 分别在 37 °C 不同的 pH, pH 7.0 不同温度下反应 5 min, 测其 OD_{232} 变化值^[14]。每个样品设 3 个平行组,重复试验 2 次,结果取平均。

底物特异性检测: 2 μg 的 K5 裂解酶分别加入到 0.5 g/L 的 K5 多糖, HS 和 HA 的反应液中。反应液含有 100 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 醋酸钙 (pH 7.0), 37 °C 反应一定时间,测不同时间 OD_{232} 变化值。每个样品设 3 个平行组,重复试验 2 次,结果取平均。

2 结果

2.1 大肠杆菌 K5 裂解酶基因的克隆及表达载体的构建

用 PCR 方法以大肠杆菌 K5 基因组为模板扩增 *elma* 基因。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见在 2 460 bp 附近的扩增产物 (图 1), 大小与预期相符; 纯化后的 PCR 产物和 pMD18-T Simple Vector 连接后, 与 pET-28a (+) 同时用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切纯化并连接, 得到重组质粒 pET-28a (+)-*Elma*, 酶切鉴定表明重组载体构建成功。测序结果表明与 GenBank 登记序列相一致。

2.2 重组蛋白 *Elma* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达及条件优化

将重组质粒 pET-28a (+)-*Elma* 转化至 BL21 (DE3) 后, 经 IPTG 诱导表达, 用 SDS-PAGE 电泳分析显示 80 kDa 处有明显的蛋白条带, 与预期相符。表明重组菌 BL21 (DE3)/

pET-28a (+)-*Elma* 构建成功。我们对诱导表达条件下的诱导剂浓度、诱导时间进行优化, 结果显示: 重组菌 BL21/pET-28a (+)-*Elma* 在 LB 培养基中培养至对数生长前期, 加入 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 最佳 (图 2), 诱导时间 5 h 最佳 (图 3)。重组蛋白 *Elma* 在优化后表达量均可达到菌体总蛋白的 30% 以上。

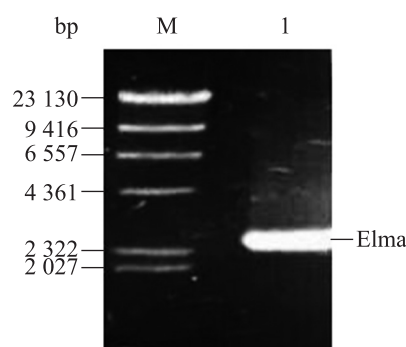


图 1 *elma* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *elma*. M: DNA marker; 1: PCR product of *elma*.

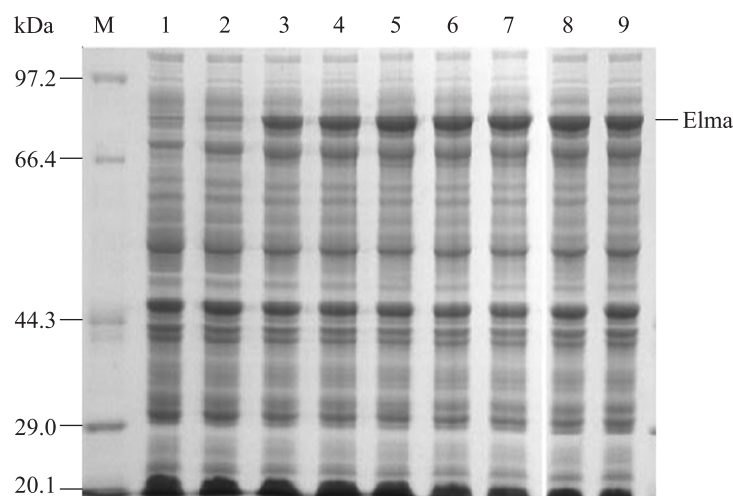


图 2 IPTG 浓度对 *Elma* 蛋白表达量的影响

Fig. 2 Effects of IPTG concentration on the expression of *Elma*. M: protein marker; 1: uninduced sample; 2: 0.1 mmol/L; 3: 0.2 mmol/L; 4: 0.3 mmol/L; 5: 0.4 mmol/L; 6: 0.5 mmol/L; 7: 0.6 mmol/L; 8: 0.7 mmol/L; 9: 0.8 mmol/L.

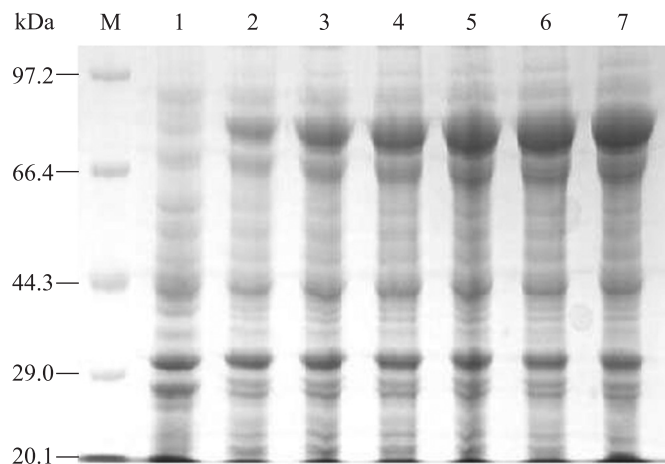


图3 诱导时间对 Elma 蛋白表达量的影响

Fig. 3 Effects of induction time on the expression of Elma. M: protein marker; 1: uninduced sample; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 3 h; 5: 4 h; 6: 5 h; 7: 6 h.

2.3 Ni²⁺-NTA 亲和层析及 G-75 凝胶层析纯化

对菌体超声破碎后,用相差显微镜镜检,发现细胞破碎完全。分别对破碎上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳,结果表明重组蛋白主要存在于上清中。将破碎后的菌体上清用亲和层析柱和凝胶柱层析纯化,收集各个色谱峰并用 12% SDS-PAGE 电泳观察纯化结果,从图 4 可以看出:在约 80 kDa 处可见特异条带。目的蛋白主要集中在咪唑浓度为 200 mmol/L 时的洗脱峰中,收集的样品经 G-75 分离得到较纯的酶,经 SDS-PAGE 薄层扫描分析,其纯度大于 95%。

2.4 Elma 的活性定性检测

1 μg 的 Elma 加入到 100 μL 的 1 g/L 的 K5 多糖反应液中反应不同时间后取样并将酶及时灭活,样品用 10% 聚丙烯酰胺电泳 125 V (20 min) ~250 V (40 min) 检测其分子量变化。用阿利辛蓝和银染的方法显色。电泳原理同蛋白电

泳类似,图 5 所示随着反应时间的延长,K5 多糖电泳条带随着反应时间的延长逐渐向下延伸,说明 K5 多糖的分子量随着反应时间的延长而降低,该实验定性地说明了重组表达的 Elma 对 K5 多糖有明显的裂解作用。

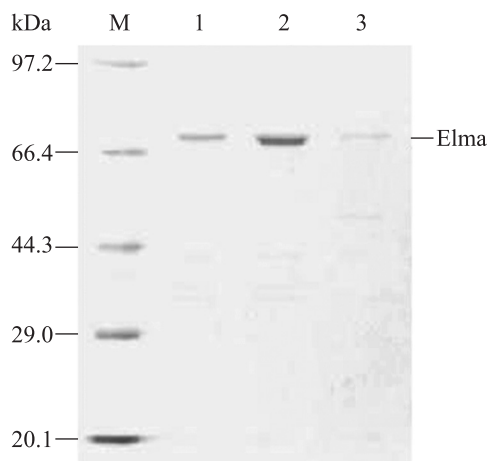


图4 纯化后 Elma 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified Elma. M: protein marker; 1-3: purified Elma.

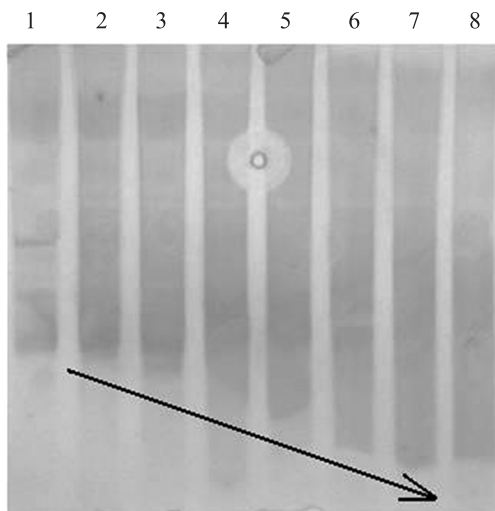
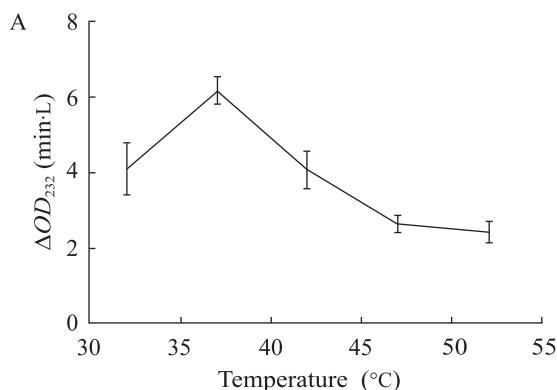


图5 K5多糖分子量随着反应时间变化

Fig. 5 The change of K5 molecular after digested by Elma for different time. 1: undigested sample; 2: 10 min; 3: 20 min; 4: 30 min; 5: 40 min; 6: 50 min; 7: 60 min; 8: 70 min.

2.5 Elma 的最适反应温度和反应 pH

K5裂解酶的最适反应温度实验结果如图6A所示, Elma 的酶活受温度影响比较大, 随着反



应温度的升高 (从 32 °C到 52 °C), Elma 的酶活呈现先上升后下降趋势, 在 37 °C条件下酶活最高。Elma 裂解 K5 多糖的活性也受 pH 的影响 (图 6B), 随着反应体系 pH 的上升 (pH 6.0 到 pH 8.0), Elma 的酶活也呈现先升后降的趋势, 当 pH 为 7.0 时 Elma 的裂解活性最高。由以上实验现象得出, 重组 Elma 反应最适温度为 37 °C, 最适反应 pH 为 7.0。

2.6 Elma 底物特异性研究

研究 Elma 对不同底物的裂解活性, 结果如图 7 所示, 说明 Elma 对 K5 多糖有着明显的裂解作用, 而对于肝素和透明质酸裂解作用不明显。分别增加透明质酸 (HA) 和肝素 (HS) 的浓度, 测不同底物浓度的 OD 值变化 (图 8), 发现随着底物浓度的增加, 反应的 OD 值变化也相应增加, 由此可确定 K5 裂解酶对 HA 和 HS 也有裂解的作用。

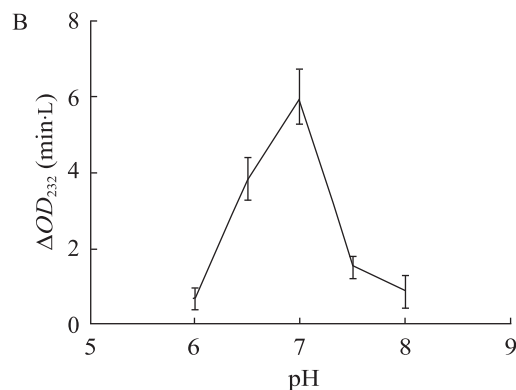


图6 Elma 反应最适温度和反应最适 pH

Fig. 6 Optimal temperature and pH of Elma.

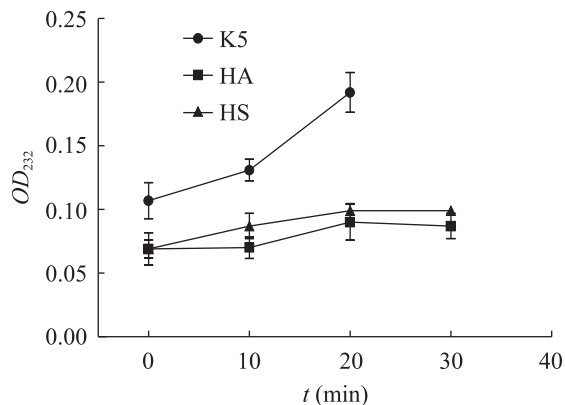


图7 Elma 底物特异性分析

Fig. 7 The substrate specificity of Elma.

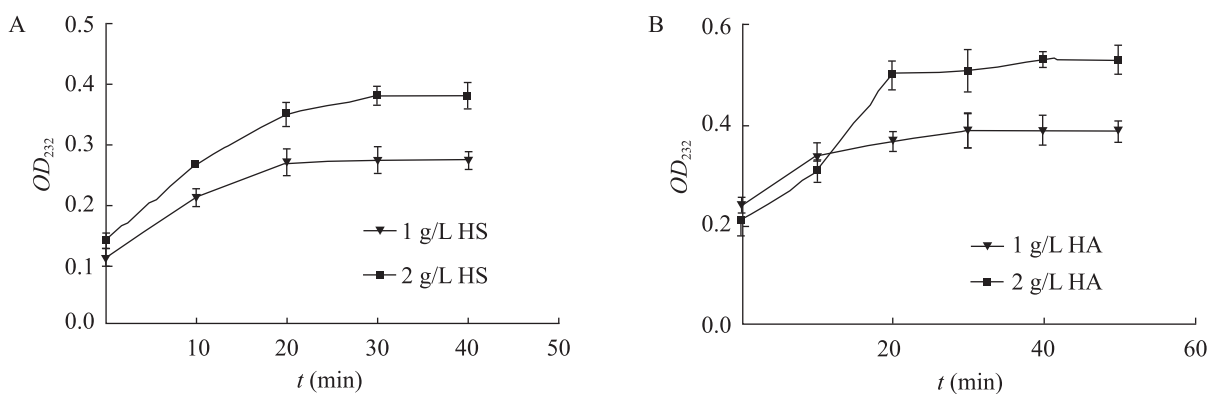


图8 Elma 对不同浓度底物 (HS 和 HA) 的裂解作用分析

Fig. 8 Analysis of Elma degrading HS and HA at different concentrations.

4 讨论

Elma 作为 K5 多糖裂解酶, 具有活性高和产物分子量均一的特性, 但该酶在产 K5 多糖菌中的表达量较少且难以分离纯化, 不适宜大规模生产。为实现高效生产 Elma, 本研究在基因工程菌中高效表达了目的蛋白, 产量高, 成本低且易操作, 适于大规模生产。本实验将 Elma 表达后得到水溶性蛋白, 并经分离纯化后得到产

物。经过优化得到的最佳的表达条件是: LB 培养基中培养重组菌, 在对数生长期前期加入 0.2 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 诱导 5 h。产物经纯化得到了较高纯度的 Elma。

肝素的分子量越低, 其抗凝活性越强。另外低分子量肝素在保持肝素的抗血栓作用的同时又降低了出血的风险。低分子量肝素比高分子量肝素具备更好的疗效, 并且具有更小的副作

用^[16-18]。半合成法生产低分子量肝素的底物-低分子量 K5 多糖需要用 K5 裂解酶生产。我们克隆并表达了编码 K5 裂解酶的基因, 该裂解酶被大量表达, 并具有较高的活性。并对 Elma 的酶学性质进行了初步研究。本研究为 K5 裂解酶应用于低分子量 K5 多糖的生产奠定了重要的基础。

另外本研究发现除 K5 多糖外, Elma 对另外两种葡胺聚糖 (GAG) 透明质酸和肝素也有裂解作用, 低分子量的 GAG 寡糖相对于高分子量 GAG 有着更好的治疗作用^[19-20], 葡胺聚糖裂解酶近年来受到普遍重视, Elma 还可以作为工具酶来生产特殊的 GAG 寡糖。本研究将有助于 Elma 的规模化生产和相关功能研究等后续工作。

REFERENCES

- [1] Linhardt RJ, Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J Med Chem*, 2003, 46(13): 2551-2564.
- [2] Linhardt RJ, Toida T. Role of glycosaminoglycans in cellular communication. *Acc Chem Res*, 2004, 37(7): 431-438.
- [3] Liu HY, Zhang ZQ, Linhardt RJ. Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(3): 313-321.
- [4] Chen JH, Avci FY, Muñoz EM, et al. Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate. *J Biol Chem*, 2005, 280(52): 42817-42825.
- [5] Vann WF, Schmidt MA, Jann B, et al. The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* 010:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. *Eur J Biochem*, 1981, 116(2): 359-364.
- [6] Manzoni M, Bergomi S, Cavazzoni V. Extracellular K5 polysaccharide of *Escherichia coli*: production and characterization. *J Bioact Comp Polym*, 1993, 8(3): 251-257.
- [7] Manzoni M, Bergomi S, Rollini M. Influence of the culture conditions on extracellular lyase activity related to K5 polysaccharide. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(1): 81-85.
- [8] Linhardt RJ, Galliher PM, Gooney CL. Polysaccharide lyases. *Appl Biochem Biotechnol*, 1986, 12(2): 135-176.
- [9] Lindahl U, Li JP, Kusche-Gullberg M, et al. Generation of "Neoheparin" from *E. coli* K5 capsular polysaccharide. *J Med Chem*, 2005, 48(2): 349-352.
- [10] Kuberan B, Beeler DL, Lech M, et al. Chemoenzymatic synthesis of classical and non-classical anticoagulant heparan sulfate polysaccharides. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52613-52621.
- [11] Zhang ZQ, McCallum SA, Xie J, et al. Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(39): 12998-13007.
- [12] Legoux R, Lelong P, Jourde C, et al. N-Acetyl-Heparosan lyase of *Escherichia coli* K5: gene cloning and expression. *J Bacteriol*, 1996, 178(24): 7260-7264.
- [13] Lv XY. Protein Purification Protocols and Applications. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 36-43.
吕宪禹. 蛋白质纯化实验方案与应用. 北京: 化学工业出版社, 2010: 36-43.
- [14] Clarke BR, Esumeh F, Roberts IS. Cloning, expression, and purification of the K5 capsular polysaccharide lyase(KflA) from coliphage K5A: evidence for two distinct K5 lyase enzymes. *J*

- Bacteriol, 2000, 182(13): 3761–3766.
- [15] Min H, Cowman MK. Combined alcian blue and silver staining of glycosaminoglycans in polyacrylamide gels: application to electrophoretic analysis of molecular weight distribution. *Anal Biochem*, 1986, 155(2): 275–285.
- [16] Bai XD, Lv YL, Liu HJ. The application and advantage of low molecular weight HS in modern medicine. *Harbin Med J*, 2003, 23(4): 33.
白晓丹, 吕艳莉, 刘红杰. 低分子肝素在现代医学上的应用及其优越性. *哈尔滨医药*, 2003, 23(4): 33.
- [17] Rek A, Tompson J, Roberts IR, et al. Biophysical investigation of recombinant K5 lyase: structural implications of substrate binding and processing. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1774(1): 72–77.
- [18] Linhardt RJ. Chemical and enzymatic methods for the depolymerization and modification of heparin//Ogura H, ed. *Carbohydrate Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry*. Tokyo: VCH, 1992: 385–401.
- [19] Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, et al. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 66(4): 341–351.
- [20] Lidholt K, Riesenfeld J, Jacobsson KG, et al. Biosynthesis of heparin. Modulation of polysaccharide chain length in a cell-free system. *Biochem J*, 1988, 254(2): 571–578.