

核酸酶 P1 的原核表达、纯化及酶学特性分析

王亚楠¹, 魏爱云¹, 王美艳¹, 卫晓彬¹, 张超¹, 单丽伟², 范三红¹

1 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100

王亚楠, 魏爱云, 王美艳, 等. 核酸酶 P1 的原核表达、纯化及酶学特性分析. 生物工程学报, 2012, 28(11): 1388-1397.

Wang YN, Wei AY, Wang MY, et al. Prokaryotic expression, purification and enzymatic properties of nuclease P1. Chin J Biotech, 2012, 28(11): 1388-1397.

摘要: 为了建立一种核酸酶 P1 (Nuclease P1, NP1) 的原核表达纯化系统, 首先采用重叠延伸 PCR 将 22 段寡核苷酸拼接, 获得人工合成的 *NP1* 基因。将其克隆至分泌型表达载体 pMAL-p4X 获得重组质粒 pMAL-p4X-NP1, 然后将重组载体转化 T7 Express 和 Origami B(DE3) 菌株诱导表达, 利用 Amylose 亲和层析柱纯化获得重组蛋白, 并对其活性、热稳定性和金属离子依赖性进行系统分析。SDS-PAGE 结果显示, 重组蛋白 MBP-NP1 (Maltose binding protein-NP1) 在 T7 Express 和 Origami B(DE3) 菌株中均可表达, 且以可溶性形式存在。活性检测表明 Origami B(DE3) 菌株中获得的重组蛋白活性高于 T7 Express 菌株 (75.48 U/mg : 51.50 U/mg); 利用蛋白酶 Factor Xa 切除 MBP 标签后, 两种重组蛋白的比活力均有提高, 分别为 258.13 U/mg 和 139.20 U/mg。重组 NP1 表现出良好的热稳定性, 80 °C 温浴 30 min 后重组酶仍具有 90% 以上的活力。2.0 mmol/L Zn²⁺对 NP1 有比较明显的激活作用, 相同浓度的 Cu²⁺则对该酶有强烈的抑制作用。该研究实现了 NP1 在大肠杆菌系统中的功能性表达, 为 NP1 纯酶的制备提供一个替代途径。

关键词: 核酸酶 P1, 原核表达, 亲和纯化, 热稳定性

Received: April 18, 2012; **Accepted:** May 17, 2012

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. QN2009070).

Corresponding author: Sanhong Fan. Tel/Fax: +86-29-87092262; E-mail: shfan@nwsuaf.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项 (No. QN2009070) 资助。

Prokaryotic expression, purification and enzymatic properties of nuclease P1

Yanan Wang¹, Aiyun Wei¹, Meiyang Wang¹, Xiaobin Wei¹, Chao Zhang¹, Liwei Shan², and Sanhong Fan¹

¹ College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: To establish a prokaryotic expression and purification protocol for nuclease P1 (NP1), we first obtained a synthetic NP1 by splicing 22 oligonucleotides with overlapping PCR. We constructed and transformed a secretory expression vector pMAL-p4X-NP1 into *Escherichia coli* host strains T7 Express and Origami B (DE3) separately. Then, the recombinant NP1 was purified by amylose affinity chromatography, and its activity, thermo-stability and metal-ion dependence were investigated systematically. The results indicated that the expressed fusion proteins MBP-NP1 (Maltose binding protein-NP1) existed mainly in soluble form both in host strains T7 Express and Origami B (DE3), but the specific activity of recombinant protein from Origami B(DE3) strain was higher than T7 Express strain (75.48 U/mg : 51.50 U/mg). When the MBP-tag was cleaved by protease Factor Xa, the specific activity both increased up to 258.1 U/mg and 139.2 U/mg. The thermal inactivation experiments demonstrated that the recombinant NP1 was quite stable, and it retained more than 90% of original activity after incubated for 30 min at 80 °C. Zn²⁺ (2.0 mmol/L) could increase enzyme activity (to 119.1%), on the contrary, the enzyme activity was reduced by 2.0 mmol/L Cu²⁺ (to 63.12%). This research realized the functional expression of NP1 in the prokaryotic system for the first time, and provided an alternative pathway for NP1 preparation.

Keywords: nuclease P1, prokaryotic expression, affinity purification, thermo-stability

核酸酶 P1 (Nuclease P1, NP1, EC 3.1.30.1) 是一种非特异性的分解单链 RNA 和 DNA 的核酸酶。1961 年日本科学家 Kuninaka 等首次从桔青霉 *Penicillium citrinum* T. 中分离获得^[1]。NP1 是由 270 个氨基酸残基组成的糖蛋白, 分子内包含两个二硫键 (Cys72-Cys217 和 Cys80-Cys85), 分子表面有 4 个 N-糖基化位点 (Asn92, Asn138, Asn184 和 Asn197)^[2-3]。1991 年 Volbeda 等用 X 射线衍射法获得了分辨率为 2.8 Å 的 NP1 晶体结构^[4]; 1998 年 Romier 等获得了分辨率为 1.8 Å 的 NP1 与底物类似物复合体的晶体结构^[5]。分析表明, NP1 的催化中心处于一个裂隙中, 包含 3 个参与催化的锌离子。催化中心两侧存在两个疏水性口袋样结构, 直接参与单链核酸中核苷酸的识

别和结合。其金属离子结合区域的三维结构同蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* F. 的磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 非常相似^[4]。NP1 与米曲霉 *Aspergillus oryzae* C. 的 Nuclease S1 同源, 序列一致性为 49.3%, 它们同属 S1-P1 Nuclease 蛋白家族^[3-4,6]; pfam 数据库中 S1-P1 Nuclease 家族目前有 482 个成员, 它们来自 240 种不同的真菌、植物、原生生物、细菌和病毒等。

NP1 具有磷酸二酯酶和磷酸单酯酶活性^[7-9], 能将单链的 RNA 分解为 5'-单核苷酸^[9], 而 5'-单核苷酸及其衍生物在医药和食品领域应用广泛。在生物医药方面, 5'-AMP 类似物 2'-C-methyl-adenosine 和 7-Deaza-2'-C-methyl-adenosine、5'-GMP 类似物 2'-C-methyl-guanosine 在体外能

强烈抑制丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus) RNA 的复制^[10]; 5'-CMP 可用于制造胞二磷胆碱、CTP、阿糖胞苷、聚肌胞等生化药物。5'-单核苷酸衍生的抗病毒和抗癌药物已成功用于疾病的治疗^[11-12]。在食品工业方面, 5'-IMP 和 5'-GMP 是典型的鲜味成分^[13]。添加 5'-IMP 可使食品具有肉类的鲜味, 添加 5'-GMP 可使食品产生蔬菜、香菇的鲜味。5'-核苷酸的生产目前主要依赖于酶解法, 因而 NP1 的需求量日益增加。

NP1 在核酸研究中的应用也日益广泛, 主要应用于: 1) 核酸结构研究和碱基组成分析, 包括 RNA 序列分析和 tRNA 结构分析^[14-16]; 2) 蛋白纯化过程中核酸的去除^[17]; 3) DNA 损伤分析^[18-19]。近年来 NP1 在 tRNA 依赖的氨基酸生物合成和转酰胺作用^[20]、芳香/杂环致癌物性 DNA 加合物的分离^[21]、UVA 照射和补骨脂素引起的 DNA 链间交联的定量测定^[22]、DNA 脱氨基作用研究中 2'-XMP 的测定等方面的研究中也发挥了关键性作用^[23]。

目前工业和研究领域所使用的 NP1 均通过桔青霉 *P. citrinum* 发酵制备, 工业用酶对纯度要求较低, 而研究用酶需要高纯度, 需经热变性、超滤、离子交换层析等多步骤纯化获得。本研究采用基因工程手段将人工合成的 NP1 基因导入大肠杆菌, 并利用亲和纯化获得具有稳定酶活性的重组 NP1, 为研究用高纯度 NP1 的获得提供了一个新的来源。

1 材料与方 法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 Turbo、T7 Express、Origami B(DE3) 为本实验室保存; 分泌表达载体

pMAL-p4X、快速连接酶 Quick Ligase、聚合酶 Deep Vent DNA Polymerase、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I、蛋白酶 Factor Xa、Amylose Resin 购自 NEB 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; *Taq* DNA Polymerase 购自北京康为世纪公司; 酵母 tRNA 购自 Invitrogen 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 NP1 基因的合成

依据 GenBank 中 NP1 氨基酸序列 (GenBank Accession No. AAB19975), 设计 p1~p22 共 22 段寡核苷酸 (表 1), 片段 p1 包含 *EcoR* I 酶切位点, 相邻片段之间两两部分互补。

采用重叠延伸 PCR, 通过两轮扩增获得 NP1 基因 (图 1)。第一轮 PCR 过程为: 以 p2~p7 为模板, 以 p1 和 p8 为引物扩增获得 P1 片段; 以 p8~p21 为模板, 以 p7 和 p22 为引物扩增获得 P2 片段。第二轮 PCR 过程为: 以 P1 和 P2 片段为模板, 以 p1 和 p22 为引物扩增获得 NP1 基因。PCR 反应程序均为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

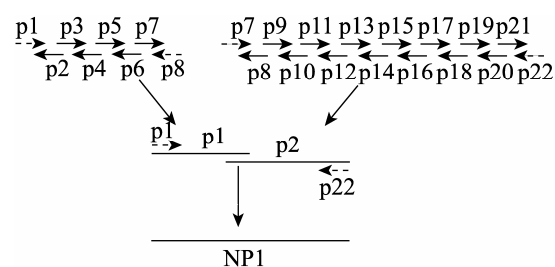


图 1 NP1 基因拼接示意图

Fig. 1 Schematic diagram of splicing process of NP1. Dashed arrows represented primers for fragment P1, P2 and NP1.

1.2.2 pMAL-p4X-NP1 载体的构建

以重叠延伸 PCR 获得的 NP1 基因片段为模板, 以 p1、NP1-*Pst* I-R 为引物 (表 1) 扩增获得两侧分别包含 *Eco*R I 和 *Pst* I 切点的 NP1 片段。PCR 产物胶回收后采用 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切, 目的片段与同样双酶切的 pMAL-p4X 载体连接,

连接产物转化 *E. coli* Turbo 菌株, 挑取单克隆进行 PCR 和质粒酶切鉴定, 鉴定正确的质粒送生工生物工程 (上海) 有限公司测序确证。

1.2.3 重组 NP1 酶活力的检测

将 100 μ L 底物溶液 (50 μ L 5 g/L RNA 溶液、50 μ L 0.03 mol/L pH 5.3 醋酸钠缓冲液 (含

表 1 用于 NP1 基因合成的寡核苷酸序列

Table 1 Sequence of oligonucleotides for NP1 gene synthesis

Oligonucleotide name	Oligonucleotide sequence (5'-3')
p1	TTCAGAATTCGCTGGTGGGGTGCTTTGGGTCATGCTACTGTTGCTTACGTTGCTCAAC
p2	TACCTTGAGCCCAAGAAGCAGCTTCTGGAGAAACGTAATGTTGAGCAACGTAAGCAACA
p3	CTGCTTCTTGGGCTCAAGGATTTTGGGTTCTTCTTCTTCTTCTTACTTGGCTTCTATTG
p4	ACCAGCAGAAGTCAATCTGTATTCATCAGCCCAAGAAGCAATAGAAGCCAAGTAAGAAGA
p5	ACAGATTGACTTCTGCTGGTAAGTGGTCTGCTTCTTGCATTTTATTGATGCTGAAGATA
p6	ATCTCTTTCGTAATCAACGTTACAGTTAGTTGGTGGGTTATCTTCAGCATCAATAAAATG
p7	ACGTTGATTACGAAAGAGATTGTGGTCTTCTGTTGTTCTATTTCTGCTATTGCTAACT
p8	TCAGAAGACAAAGAAGAATCAGAAACTCTTTGAGTGTAGTTAGCAATAGCAGAAATAG
p9	GATTCTTCTTTGTCTTCTGAAAACCATGCTGAGGCTTTGAGATTTTGGTTCATTTTAT
p10	GCGTAAGCCTCATCATGCAATGGTTGAGTCATATCACCAATAAAATGAACCAAAAATCTC
p11	GCATGATGAGGCTTACGCTGTTGGTGGTAACAAGATTAACGTTACTTTTGATGGTTACCA
p12	TTGTGGCATGTAAGTATCCCAATCAGAATGCAAGTTATCATGGTAACCATCAAAAAGTAAC
p13	GGGATACTTACATGCCACAAAAGTTGATTGGTGGTCATGCTTTGTCTGATGCTGAATCTT
p14	AGTTACCAGATTCAATGTTTTGAACCAAGTCTTAGCCCAAGATTCAGCATCAGACAAAG
p15	CAAAACATTGAATCTGGTAACACTGCTCAAGCTATTGGTTGGATTAAGGGTGATAAC
p16	CAGAAGCCCATCTAGTAGCAGTAGTAATTGGTTCAGAAATGTTATCACCCCTTAATCCAAC
p17	GCTACTAGATGGGCTTCTGATGCTAACGCTTTGGTTTGTACTGTTGTTATGCCACATGGT
p18	AGTAAGTTGGGTACAAATCACCAGTTTGC AAAGCAGCAGCACCATGTGGCATAACAACAG
p19	GATTTGTACCCAACCTACTACGATTCTGTTATTGATACTATTGAATTGCAAATTGCTAAG
p20	GAATTCGTTAATCCAGTTAGCCAATCTGTAACCACCCTTAGCAATTTGCAATTC AATAG
p21	GGCTAACTGGATTAACGAAATTCATGGTCTGAAATTGCTAAGGCTGGTCATCATCATC
p22	GAGTGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGATGACCAGCCTTAGC
NP1- <i>Pst</i> I-R	AAAAC <u>CTGCAGT</u> TAAACCAGCCTTAGCAA

Note: the underlined bases in p1, NP1-*Pst* I-R represent *Eco*R I and *Pst* I cutting site respectively.

10 mmol/L ZnSO₄) 与 25 μL 酶液混匀, 70 °C 温浴 15 min, 加入 250 μL 核酸沉淀剂, 冰浴 20 min 后 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 用双蒸水将上清液稀释合适倍数测定 OD₂₆₀ 值。以不加酶液的反应液作为对照。在上述条件下每分钟生成的核苷酸量在 260 nm 处的吸光值差值为 1.0 时定义为一个酶活力单位^[24]。

1.2.4 重组蛋白表达与纯化

将重组载体 pMAL-p4X-NP1 转化 TSS-法制备的 T7 Express 和 Origami B(DE3) 感受态细胞^[25]。挑选单克隆, 分别接种于 LB 和胰蛋白胍-磷酸盐培养基中^[26], 28 °C 和 20 °C 诱导表达 8 h 后离心收集菌体, 超声波破碎后离心收集上清, 定量测定上清的比活力。将诱导温度设定为 20 °C, IPTG 终浓度设定为 0.5 mmol/L, 分析不同诱导时间点 (2 h、4 h、6 h、8 h、10 h) 酶活性的变化, 从而确定最佳诱导时间。设定诱导温度为 20 °C, 诱导时间为 8 h, 分析不同浓度 IPTG (0.25、0.5、0.75、1 mmol/L) 对酶活性的影响, 从而确定最佳 IPTG 诱导浓度。

在确定的最佳条件下进行诱导表达, 收集菌体后超声裂解, 上清载入 Amylose 柱进行亲和层析分离, 具体步骤参照唐如春等的方法^[27]。使用考马斯亮蓝 G250 法对纯化获得的融合蛋白进行定量, 按照 50:1 的比例将融合蛋白和蛋白酶 Factor Xa 混合, 4 °C 过夜酶切去除 MBP 标签。采用 15% SDS-PAGE 对总蛋白、可溶性蛋白、纯化后的融合蛋白及酶切去除 MBP 标签的目标蛋白进行电泳检测。

1.2.5 重组 NP1 的热稳定性和离子依赖性检测

测定重组 NP1 的热稳定性时, 将重组蛋白分

别于 55 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C、90 °C 和 100 °C 中保温 30 min, 残余酶活力测定参考 1.2.3, 将最高酶活力设为 100%。

将终浓度为 2.0 mmol/L 不同金属离子 (Zn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ 和 Ca²⁺) 与重组蛋白混合, 25 °C 保温 30 min 后, 残余酶活力测定参考 1.2.3, 将不外加金属离子时的酶活力设置为 100%。

2 结果

2.1 NP1 的人工合成

采用两轮重叠延伸 PCR 拼接获得 NP1 基因。第一轮中, 重叠延伸扩增 p1~p8 获得大小约 320 bp 的目标片段 P1 (图 2 中第 1 泳道), 扩增 p7~p22 获得大小约 620 bp 的目标片段 P2 (图 2 中第 2 泳道)。以片段 P1 和 P2 为模板进行第二轮扩增获得 850 bp NP1 基因片段 (图 2 中第 3 泳道), 与预期结果一致。

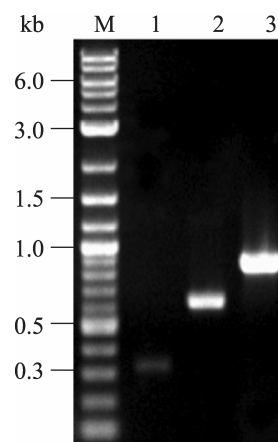


图 2 重叠延伸 PCR 产物的电泳检测

Fig. 2 Products of overlapping PCR by agarose gel electrophoresis. M: 2-log DNA ladder; 1: amplified fragment P1; 2: amplified fragment P2; 3: amplified fragment NP1.

2.2 pMAL-p4X-NP1 载体的构建

获得的 NP1 片段经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切, 然后与同样双酶切处理的 pMAL-p4X 载体连接, 获得重组载体 pMAL-p4X-NP1 (图 3A)。重组载体经 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切出现了预期目的片段 (图 3B)。在该载体中, NP1 上游融合有分泌型麦芽糖结合蛋白 (MBP) 编码区, 两者之间为蛋白酶 Factor Xa 识别位点编码序列。

2.3 NP1 融合蛋白表达条件的优化

重组载体转化 T7 Express 和 Origami B(DE3)

菌株诱导表达 (28 °C 和 20 °C, IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L)。28 °C 诱导获得的融合蛋白 MBP-NP1 未检测到酶活性; 而 20 °C 获得的重组蛋白有活性。温度为 20 °C、IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时, T7 Express 菌株的最佳诱导时间为 8 h, Origami B(DE3) 菌株的最佳诱导时间为 4 h (图 4A)。温度为 20 °C, 诱导时间分别为 8 h 和 4 h, T7 Express 菌株和 Origami B(DE3) 菌株最佳 IPTG 诱导浓度均为 0.75 mmol/L (图 4B)。

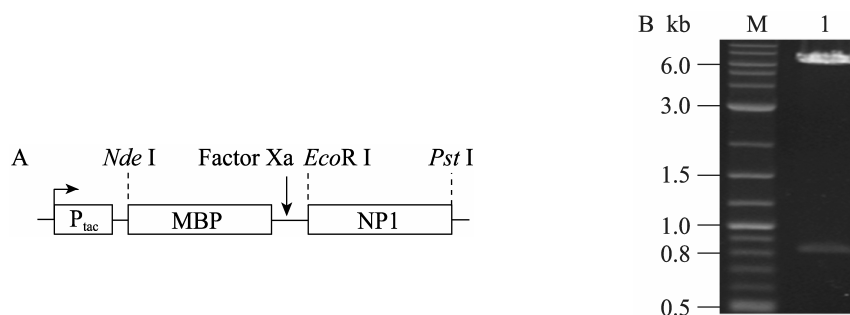


图 3 pMAL-p4X-NP1 重组载体示意图及双酶切鉴定

Fig. 3 Schematic diagram and double digestion of recombinant plasmid pMAL-p4X-NP1. (A) Schematic diagram of pMAL-p4X-NP1. (B) Identification of recombinant plasmid pMAL-p4X-NP1 by double digestion. M: 2-log DNA ladder; 1: pMAL-p4X-NP1 digested with *EcoR* I and *Pst* I.

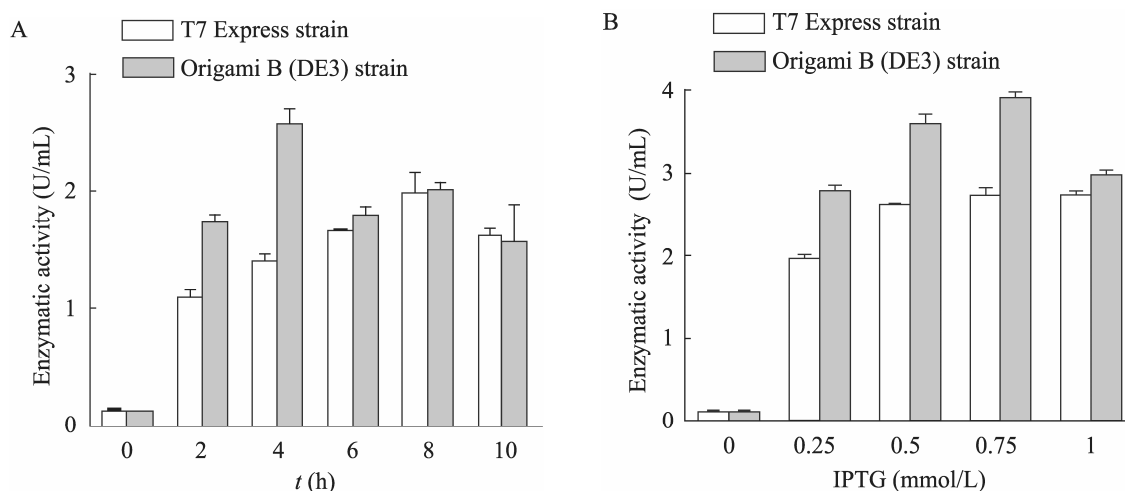


图 4 不同诱导时间和 IPTG 浓度对酶活性的影响

Fig. 4 Effect of time and IPTG concentration on the enzymatic activity. (A) Time. (B) IPTG.

2.4 MBP-NP1 融合蛋白的纯化与酶活测定

将收集的菌体超声波破碎后离心, 上清液用 Amylose 亲和层析柱纯化。融合蛋白 MBP-NP1 (分子量约为 71 kDa, 其中 NP1 为 29 kDa, MBP 为 42 kDa) 在 T7 Express (图 5A) 和 Origami B(DE3) 菌株中 (图 5B) 都得到表达, 且均以可溶性形式存在; 蛋白酶 Factor Xa 酶切融合蛋白去除 MBP 标签后获得 NP1。酶活性定量检测发现由 T7 Express 和 Origami B(DE3) 菌株获得的 MBP-NP1 融合蛋白具有一定酶活性; 酶切去除 MBP 标签后比活力均有增加, 分别为 139.20 U/mg 和 258.13 U/mg (表 2)。Ying 等通过热变性、超滤、硫酸铵沉淀、苯基琼脂糖凝胶层

析、离子交换层析和葡聚糖凝胶层析从 1 L 桔青霉 *P. citrinum* 发酵液中分离获得 1.5 mg 天然 NP1, 其比活力为 1 264 U/mg^[28]。本研究获得的重组 NP1 的比活力约为天然 NP1 的 1/5; 但由于采用了亲和层析, 大幅简化了纯化流程, 两种菌株中融合蛋白的纯化效率分别可达 9.65 mg/L 和 6.30 mg/L。

2.5 重组 NP1 的热稳定性

由图 6 可以看出, 重组酶在 55 °C~80 °C 范围内保持了较高的残余酶活力, 80 °C 温浴 30 min 后保持 90% 以上的残余酶活力。随着温度的继续升高残余酶活力明显下降。因此重组 NP1 与天然酶类似, 在 55 °C~80 °C 范围内具有较好的热稳定性。

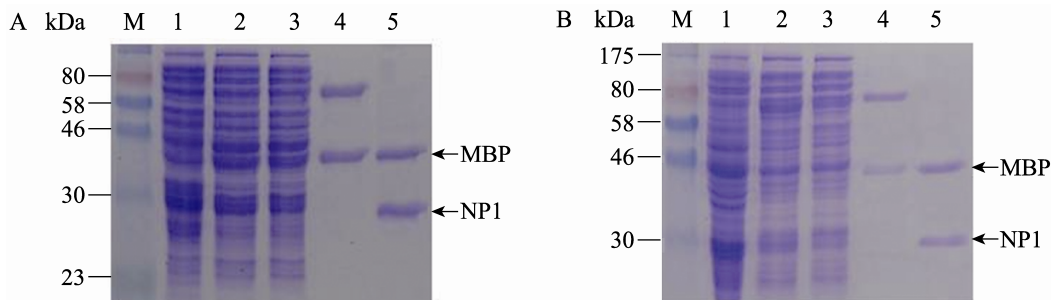


图 5 重组蛋白 NP1 表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein NP1. (A) Purification of the recombinant protein from T7 Express strain. (B) Purification of the recombinant protein from Origami B(DE3) strain. M: prestained protein marker; 1: un-induced control; 2: total protein induced with IPTG; 3: soluble protein induced with IPTG; 4: recombinant protein purified by amylose column; 5: recombinant protein cleaved by Factor Xa.

表 2 重组蛋白和天然 NP1 的酶活力比较

Table 2 Comparison of specific activity of recombinant protein and native NP1

Protein	Vectors	Strains	Activity (U/mL)	Protein (g/L)	Specific activity (U/mg)
MBP-NP1	pMAL-p4X	T7 Express	33.50±0.13	0.65	51.50±0.21
NP1 (cleaved)	pMAL-p4X	T7 Express	40.37±0.08	0.29	139.20±0.27
MBP-NP1	pMAL-p4X	Origami B(DE3)	31.70±0.02	0.42	75.48±0.06
NP1 (cleaved)	pMAL-p4X	Origami B(DE3)	49.04±1.08	0.19	258.13±3.71
NP1 (native)	/	<i>P. citrinum</i>	/	/	1 264 ^[28]

2.6 重组 NP1 的金属离子依赖性

已有研究表明不同的金属离子对天然 NP1 有激活或抑制作用。本实验结果表明 2.0 mmol/L Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Fe^{2+} 对重组 NP1 有激活作用,其中 Zn^{2+} 激活作用最为明显。2.0 mmol/L Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 对 NP1 有不同程度的抑制作用,其中 Cu^{2+} 的抑制作用最为明显(表 3)。

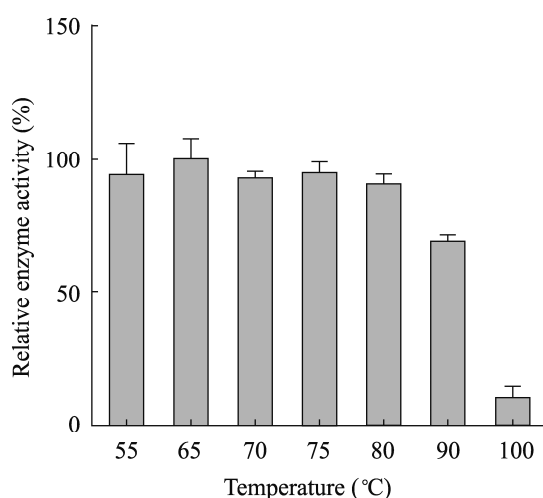


图 6 重组 NP1 的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of recombinant NP1.

表 3 不同金属离子对 NP1 活性的影响

Table 3 Effect of different metal ions on specific activity

Metal ions (2.0 mmol/L)	Relative specific activity (%)
Control	100
Zn^{2+}	119.07±1.32
Co^{2+}	112.39±0.42
Fe^{2+}	108.11±2.00
Ca^{2+}	93.03±0.77
Mn^{2+}	84.97±0.70
Ni^{2+}	76.72±0.48
Mg^{2+}	74.51±0.64
Cu^{2+}	63.12±0.50

3 讨论

本研究构建了 pMAL-p4X-NP1 分泌型表达载体,并利用 T7 Express 和 Origami B(DE3) 菌株,首次实现了 NP1 在大肠杆菌内的成功表达和活性测定。酶活性检测表明 Origami B(DE3) 菌株中获得的重组蛋白的活性高于 T7 Express 菌株 (75.48 U/mg:51.50 U/mg); 利用蛋白酶 Factor Xa 切除 MBP 标签后,两种重组蛋白的活性均有上升,分别为 258.13 U/mg 和 139.20 U/mg。融合蛋白 MBP-NP1 具有一定的酶活力,但融合在 N-端的 MBP 标签对酶活性产生了一定的影响。我们也曾将 His-tag 融合在 NP1 的 C-末端,结果获得的融合蛋白检测不到活性,说明 NP1 的 C-末端对酶的活性也非常重要。本研究采用分泌型融合表达载体 pMAL-p4X,MBP 的融合增加了目标蛋白的可溶性,分泌型表达则降低了重组蛋白对宿主细胞的伤害,提高了目标蛋白的表达量。利用大肠杆菌表达 NP1 的研究尚未见报道,与 Ying 等建立的桔青霉 *P. citrinum* 发酵和分离纯化法相比^[28],本研究获得的重组 NP1 的比活力虽然较低,但表达量高,纯化流程简单,重组蛋白可达 6.30~9.65 mg/L,且可通过高密度发酵等手段进一步提高表达效率。

天然 NP1 的表观分子量为 42~50 kDa,而根据氨基酸序列推导的理论分子量仅为 29 kDa,这是由于天然 NP1 存在糖基化现象^[2,4]。本研究采用了大肠杆菌系统,因而制备的重组 NP1 不存在糖基化现象。与天然 NP1 相比,重组 NP1 的比活力约为前者的 20%左右,缺少糖基化修饰可能是造成活力下降的原因之一。重组蛋白在 80 °C 温浴 30 min 后保持 90%的残余酶活力,90 °C 温

浴 30 min 后仍有 69% 的残余酶活力, 说明重组蛋白具有良好的耐热性, 其热稳定性与天然酶相当。重组蛋白对金属离子的依赖性实验显示, 2.0 mmol/L Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 对重组蛋白均有不同程度的激活作用, Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 则均有不同程度的抑制作用, 其中 Zn^{2+} 的激活作用最显著, 而 Cu^{2+} 的抑制作用最明显^[9], 这与 Ying 等的研究结果有所不同^[28]。

NP1 在研究中的应用日趋广泛, 而目前商品化 NP1 主要通过桔青霉 *P. citrinum* 发酵获得, 纯化过程繁琐。本研究实现了 NP1 在大肠杆菌系统中的功能性表达和纯化, 并证明重组 NP1 具有较高的比活力和良好的热稳定性, 为研究用高纯度 NP1 的获得提供了一个新的来源。

REFERENCES

- [1] Kuninaka A, Kibi M, Yoshino H, et al. Studies on 5'-phosphodiesterases in microorganisms Part II. Properties and application of *Penicillium citrinum* 5'-phosphodiesterase. *Agr Biol Chem*, 1961, 25(9): 693–701.
- [2] Fujimoto M, Kuninaka A, Yoshino H. Some physical and chemical properties of nuclease P1. *Agr Biol Chem*, 1975, 39(10): 1991–1997.
- [3] Maekawa K, Tsunasawa S, Dibo G, et al. Primary structure of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*. *Eur J Biochem*, 1991, 200(3): 651–661.
- [4] Volbeda A, Lahm A, Sakiyama F, et al. Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution. *EMBO J*, 1991, 10(7): 1607–1618.
- [5] Romier C, Dominguez R, Lahm A, et al. Recognition of single-stranded DNA by nuclease P1: high resolution crystal structures of complexes with substrate analogs. *Proteins*, 1998, 32(4): 414–424.
- [6] Iwamatsu A, Aoyama H, Dibó G, et al. Amino acid sequence of Nuclease S1 from *Aspergillus oryzae*. *J Biochem*, 1991, 110(1): 151–158.
- [7] Potter BVL, Connolly BA, Eckstein F. Synthesis and configurational analysis of a dinucleoside phosphate isotopically chiral at phosphorus. stereochemical course of *Penicillium citrinum* nuclease P1 reaction. *Biochemistry*, 1983, 22(6): 1369–1377.
- [8] Fujimoto M, Kuninaka A, Yoshino H. Substrate specificity of nuclease P1. *Agr Biol Chem*, 1974, 38(9): 1555–1561.
- [9] Fujimoto M, Kuninaka A, Yoshino H. Identity of phosphodiesterase and phosphomonoesterase activities with nuclease P1 (a nuclease from *Penicillium citrinum*). *Agr Biol Chem*, 1974, 38(4): 785–790.
- [10] Olsen DB, Eldrup AB, Bartholomew L, et al. A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(10): 3944–3953.
- [11] Nora HS. Dietary ribonucleotides and health. *Nutrition*, 2003, 19(1): 68–69.
- [12] Köhne CH, Schöffski P, Wilke H, et al. Effective biomodulation by leucovorin of high-dose infusion fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion: results of a randomized trial in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 1998, 16(2): 418–426.
- [13] Cui GY. Flavor nucleotides and their usage in food. *Chinese Condiment*, 2001(10): 25–29, 32. 崔桂友. 呈味核苷酸及其在食品调味中的应用. *中国调味品*, 2001(10): 25–29, 32.
- [14] Chango A, Nour AMA, Niquet C, et al. Simultaneous determination of genomic DNA methylation and uracil misincorporation. *Med Princ Pract*, 2009, 18(2): 81–84.
- [15] Hua NP, Naganuma T. Application of CE for determination of DNA base composition. *Electrophoresis*, 2007, 28(3): 366–372.
- [16] Shimelis O, Giese RW. Nuclease P1 digestion/high-performance liquid chromatography, a practical method for DNA quantitation. *J*

- Chromatogr A, 2006, 1117(2): 132–136.
- [17] Zabriske DW, DiPaolo M. Removal of nucleic acid contaminants using nuclease enzymes during protein isolation. *Biotechnol Bioeng*, 1988, 32(1): 100–104.
- [18] Zhou GD, Popovic N, Lupton JR, et al. Tissue-specific attenuation of endogenous DNA I-compounds in rats by carcinogen azoxymethane: possible role of dietary fish oil in colon cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(5): 1230–1235.
- [19] Godschalk R, Nairl J, Schooten FJV, et al. Comparison of multiple DNA adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis*, 2002, 23(12): 2081–2086.
- [20] Sheppard K, Akochy PM, Söll D. Assays for transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis. *Methods*, 2008, 44(2): 139–145.
- [21] Neale JR, Smith NB, Pierce WM, et al. Methods for aromatic and heterocyclic amine carcinogen-DNA adduct analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Polycycl Aromat Compd*, 2008, 28(4/5): 402–417.
- [22] Cao H, Hearst JE, Corash L, et al. LC-MS/MS for the detection of DNA interstrand cross-links formed by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in human cells. *Anal Chem*, 2008, 80(8): 2932–2938.
- [23] Lim KS, Jenner A, Halliwell B. Quantitative gas chromatography mass spectrometric analysis of 2'-deoxyinosine in tissue DNA. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1995–2002.
- [24] He QT, Li N, Chen XC, et al. Mutation breeding of nuclease p1 production in *Penicillium citrinum* by low-energy ion beam implantation. *Korean J Chem Eng*, 2011, 28(2): 544–549.
- [25] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(7): 2172–2175.
- [26] Moore JT, Uppal A, Maley F, et al. Overcoming inclusion body formation in a high level expression system. *Protein Expr Purif*, 1993, 4(2): 160–163.
- [27] Tang RC, Yang YH, Fan SH, et al. Cloning of *Triticum turgidum* L. *ramosa2* and DNA binding activity assay of the recombinant protein. *Sci Agric Sin*, 2011, 44(3): 439–446.
唐如春, 杨宇恒, 范三红, 等. 圆锥小麦 *ramosa2* 的克隆及其重组蛋白的 DNA 结合特性分析. *中国农业科学*, 2011, 44(3): 439–446.
- [28] Ying GQ, Shi LE, Yi Y, et al. Production, purification and characterization of nuclease p1 from *Penicillium citrinum*. *Process Biochem*, 2006, 41(6): 1276–1281.