

Aeropyrum pernix K₁ 磷脂酶 A₂ 的克隆、表达及其性质

卢冬梅¹ 吴英松¹ 解桂秋² 高仁钧² 王智²

(广州市达瑞抗体工程技术有限公司 广州 510665)¹

(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室 长春 130023)²

摘要: 从超嗜热需氧古细菌 *Aeropyrum pernix* K₁ 中抽提出染色体基因组, 经 PCR 扩增得到磷脂酶 A₂ 基因, 用带有 His-tag 标记的 pET15b 作为表达载体, 在大肠杆菌 BLP 中成功地诱导表达。表达产物经过 Ni-螯合柱一步得到纯化。SDS-PAGE 检测只有一条带, 其准确分子量为 17, 871 kD。对纯化后的磷脂酶 A₂ 测定其酶活性和生物活性, 得出其最适反应温度为 90℃, 最适 pH 范围为 7.8~8.2。至此首次成功地在大肠杆菌中表达了古细菌嗜热磷脂酶 A₂, 这将为以后对该酶的结构和功能以及耐热机制研究打下很好的基础, 同时有利于古细菌研究领域的扩展。

关键词: *Aeropyrum pernix* K₁, 磷脂酶 A₂, 古细菌, 热稳定性

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0035-04

Cloning, Expression and Characterization of *Aeropyrum pernix* K₁ phospholipase A₂

LU Dong-Mei¹ WU Ying-Song¹ XIE Gui-Qiu² GAO Ren-Jun² WANG Zhi²

(Guangzhou Darui Antibody Engineering and Technology Co. Ltd., Guangzhou, 510665)¹

(Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education,
Jilin University, Changchun 13002)²

Abstract: The sequence of the genome of *Aeropyrum pernix* K₁ was completed and the open reading frame was found. The PCR amplified gene was inserted in pET15b with His-tag mark and expressed in the host *E. coli* BLP. The recombinant phospholipase A₂ was purified by Ni-chelation chromatography with only a one-step procedure. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of this enzyme was 17.871 kD. It showed an optimal activity at 90°C and a pH of 7.8-8.2. This is the first successful expression of recombinant PLA₂ from archaeon. This study will facilitate the further study of structure-function relationship of PLA₂.

Key words: *Aeropyrum pernix* K₁, Phospholipase A₂, Archeon, Thermostability

磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, EC3.1.1.4, 简称 PLA₂) 能酶促水解甘油磷脂的第二位酯酰键, 生成溶血磷脂和脂肪酸^[1]。PLA₂ 按照来源可以分为胞外分泌 PLA₂ (sPLA₂) 和胞内 PLA₂ (cPLA₂)^[2,3]。cPLA₂ 分子量在 85 kD 左右, 主要在信号转导过程中发挥作用^[4,5]。sPLA₂ 是一种小分子量的水溶性蛋白质, 主要存在于动物的胰脏、蛇的毒液中^[6,7]。PLA₂ 除了具有酶活性之外, 还有很多的生物学功能并参与许多生理活动。近年来发现它具有广泛的心血管药理效应, PLA₂ 水解卵磷脂的产物不饱和脂肪酸是合成前列腺素的前体, 与血栓的形成等生理效应有着密切的关系, 从而引起人们新的研究兴趣^[8-10]。正是 PLA₂ 这种相对简单的化学结构和复杂的药理生理功能之间的反差, 使之成为研究脂质代谢、脂蛋白代谢、生物膜磷脂结构以及脂-蛋白相互作用的结构和功能的重要工具酶。本文对 *Aeropyrum pernix* K₁ PLA₂ (Ape 2325) 基因^[11] 进行了

其他作者: 曹淑桂² 冯雁²

收稿日期: 2005-12-12, 修回日期: 2006-03-16

表达, 并对其酶活性和理化性质作了初步研究, 目前其结构与功能的研究正在进行中。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

限制性内切酶、T4DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶、DNA分子质量标准 and 蛋白质分子质量标准等购自宝泰克生物科技公司; PCR引物合成和DNA测序由北京鼎国生物技术发展中心完成; 异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)和氨苄青霉素购自北京鼎国生物技术发展中心; 凝胶回收试剂盒购自QIAGEN公司; 表达载体pET15b、菌株和Ni-螯合柱由本室保存; 其他药品和试剂均为分析纯。

1.2 Ape 2325 基因的克隆与酶解分析

以 *Aeropyrum pernix* K₁ 染色体基因组为模板, 用含有 *Nde* I 位点的 N 端引物 P₁ 和含 *Bam*H I 位点的 C 端引物 P₂ 扩增 Ape 2325 片段, 引物序列为:

P₁, 5' -TTTAGAATTTCGCGCATATGGGTGTTAACGAGG-3' (N 端, 32bp, 画线部分为 *Nde* I 识别位点);

P₂, 5' - TTTTGGTACCTTAGGATCCAATTAGTGTTAGCCTCCG-3' (C 端, 38bp, 画线部分为 *Bam*H I 识别位点)。

PCR 反应条件: 94℃ 2 min 对模板进行变性, 在 94℃ 1 min, 55℃ 1.5 min, 72℃ 2 min 35 个循环后, 将预期大小 474bp 的产物经凝胶回收试剂盒回收后, 与 pET15b 载体连接, 转化感受态大肠杆菌 BLP, 涂布于氨苄 2YT 平板上, 挑取单克隆提取质粒, 用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定。选取酶切鉴定正确的克隆质粒送交北京鼎国生物技术发展中心进行序列测定。

1.3 Ape 2325 的诱导表达

挑取经酶切鉴定的转化菌, 分别置 5 mL 含氨苄培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日稀释 10 倍, 继续培养 2 h ($A_{600} = 0.6 \sim 1.0$) 时, 将菌液分装入两个试管中, 其中一管作为诱导的阴性对照, 而另一管加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG), 终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 3 h, 离心 (6,000 g, 4℃, 15 min), 所得菌体经冻融法处理后, 进行 12% SDS-PAGE, 鉴定表达的阳性克隆。

将经小样鉴定的阳性克隆菌落接种于 100 mL 的含氨苄 2YT 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜。取过夜培养物按 2% 比例接种于 2 L 培养液中, 37℃ 放大培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 1.0$, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 于 25℃ 诱导表达 10 h。离心沉淀菌体, 悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 冻融并超声破碎后再离心, 留取上清液, 纯化 Ape 2325 蛋白。

1.4 Ape 2325 的纯化

以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 为缓冲液, 将上清液上 Ni-螯合柱 (Ni-chelating column), 用 1 mol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) 进行洗脱, 用 5 mol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) 进行结合, 用 100 mmol/L EDTA、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) 进行洗柱。

1.5 SDS-PAGE

用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.6 酶活测定

以 10 mmol/L 对硝基苯丙酸酯作为底物, 取 940 μ L 经 90℃ 保温的 pH 值为 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液, 加入 40 μ L 纯化的 Ape 2325, 再加入 20 μ L 底物测对硝

基苯酚在 OD_{420} 值随时间的变化曲线。

1.7 蛋白质浓度的测定

按 Bradford 方法测定蛋白含量, 用牛血清白蛋白 (BSA) 做标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 Ape 2325 克隆和序列鉴定

用具有高保真的 PCR 扩增用的 DNA 聚合酶, 以古细菌 *Aeropyrum pernix* K₁ 染色体基因组为模板进行 Ape 2325 的扩增, 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳分析, 于 474bp 处出现一条特异带, 大小与预期相符 (图 1)。

将重组子 Ape 2325-pET15b 转入感受态大肠杆菌 BLP 后, 挑取克隆, 提取质粒, 用 *Nde* I 和 *Bam*HI 双酶切鉴定, 皆为阳性克隆。

选取酶切鉴定正确的质粒进行序列测定, 结果表明: 克隆的 Ape 2325 基因序列与 GenBank 中已公布的序列完全一致 (测序资料略)。

2.2 Ape 2325 的表达与纯化

酶切鉴定的工程菌经 IPTG 诱导后, 在 SDS-PAGE 中出现一条明显的蛋白表达带, 其分子量约为 17.9 kD (图 2), 与预期值 17, 871 D 基本相符。由于表达产物带有 His-tag 标记, 易于通过 Ni-螯合柱获得纯化的 Ape 2325 蛋白 (表 1)。

表 1 Ape 2325 的纯化

| 提纯步骤 | 总活力 (U) | 蛋白总量 (mg) | 比活力 (U/mg) | 回收率 (%) | 纯化倍数 |
|--------|---------|-----------|------------|---------|-------|
| 发酵上清液 | 2103.12 | 1087.2 | 1.9 | 100 | 1 |
| Ni-螯合柱 | 1632.81 | 13.6 | 119.7 | 83.6 | 62.16 |

2.3 Ape 2325 的酯酶活性

2.3.1 Ape 2325 的最适底物:

Ape 2325 在对硝基苯酚软酸酯、对硝基苯酚月桂酸酯作为底物时几乎无活力, 在对硝基苯酚辛酸酯、对硝基苯酚硬酸酯作为底物时有部分活力, 在对硝基苯酚丙酸酯作为底物时有最高活力。

2.3.2 Ape 2325 最适反应温度的测定:

以对硝基苯酚丙酸酯作为反应底物, pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液作为溶剂, 然后在 40℃ ~ 100℃ 的温度范围内测定该酶的比活 (图 3)。从图 3 可以看出, 该酶对温度的变化很敏感, 当温度达到 90℃ 时, 该酶表现出较高的反应活性, 所以 Ape 2325 的最适温度为 90℃。

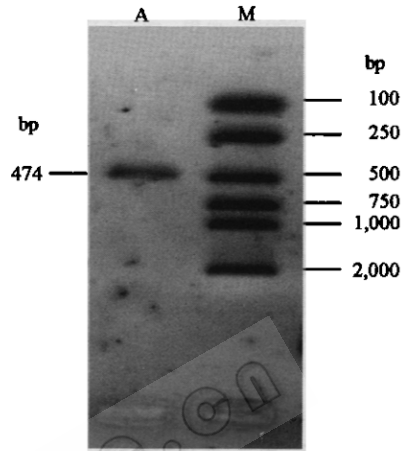


图 1 Ape 2325 基因的 PCR 克隆

A Ape 2325 基因片断 (预期值为 474bp),
M DL2000 分子量 marker

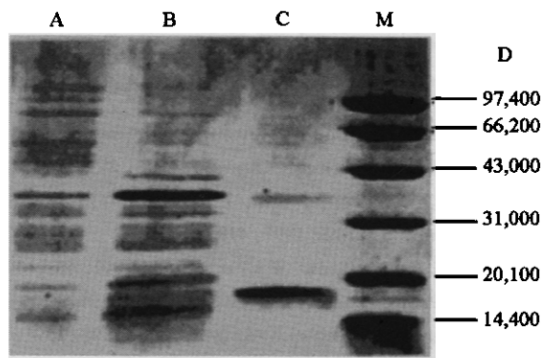


图 2 Ape 2325 的 SDS-PAGE

M 蛋白分子量 marker, A Ape 2325 重组蛋白的未诱导表达产物,

B Ape 2325 重组蛋白的诱导表达产物, C Ape 2325 重组蛋白的纯化

2.3.3 Ape 2325 的最适 pH: 以对硝基苯酚丙酸酯为底物, 测定 Ape 2325 在 pH4.0 ~ 8.8 范围内的比活, 以 pH 为横坐标, 比活为纵坐标作图, 结果如图 4 所示。结果表明, 该酶的最适 pH 为 8.0 左右。

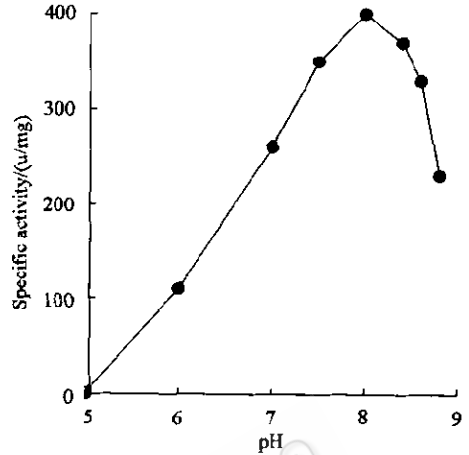
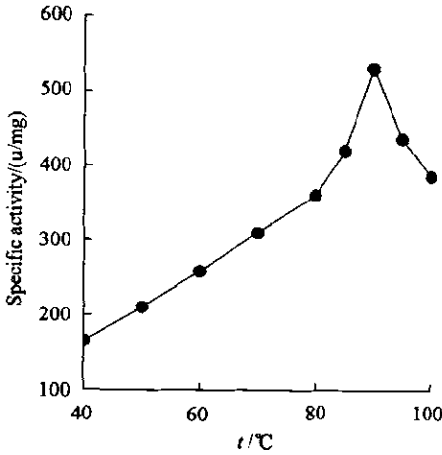


图3 Ape 2325 的最适反应温度

图4 Ape 2325 的最适 pH

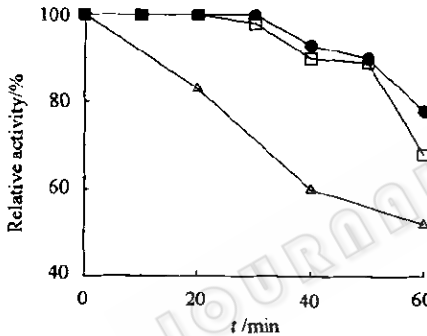


图5 Ape 2325 的热稳定性

●—●—80°C, □—□—90°C, △—△—95°C

2.3.4 Ape 2325 的热稳定性: 将纯酶置于不同温度 (50°C ~ 100°C) 下保温一定时间后迅速冷却, 然后测定其残留的酶活力, 结果如图 5 所示。结果表明, Ape 2325 在 80°C 保温 1h 后, 酶活力还剩 76.64%; 在 90°C 保温 1h 后, 酶活力还剩 68.23%; 在 100°C 保温 1h 后, 酶活力还剩 53.56%, 说明该酶的热稳定性较高。这将有利于古细菌研究领域的扩展及其耐热机制的进一步研究。

参考文献

[1] Yumee K, Lenka L, Yana S, *et al.* Analytical Biochemistry, 1997, **250**: 109 ~ 116.
 [2] Jay A T. The Journal of Biological Chemistry, 1997, **272** (28): 17247 ~ 17250.
 [3] 杨建东, 景炳文. 急诊医学, 1998, **7** (2): 132 ~ 133.
 [4] Ruth M K, John D S. FEBS, 1997, **410**: 49 ~ 53.
 [5] James D C, Lih-Ling L, Ronald W K, *et al.* Cell, 1991, **65**: 1043 ~ 1051.
 [6] Marita H, Maria J B, Javier A, *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communication, 1999, **260**: 99 ~ 104.
 [7] Yijun C, Edward A D. Biochimica Biophysica Acta, 1998, **1394**: 57 ~ 64.
 [8] Walker D H, Feng H M, Popov V L. Am J Tro Med Hyg, 2001, **65** (6): 936 ~ 942.
 [9] Burke J R. Curr Opin Investig Drugs, 2001, **11**: 1549 ~ 1552.
 [10] Macphee C H. Curr Opin Pharmacol, 2001, **1** (2): 121 ~ 125.
 [11] Yutaka K, Yumi H, Hiroshi H, *et al.* DNA Research, 1999, **6**: 83 ~ 101.