

大肠杆菌来源的喹啉酸磷酸核糖转移酶和烟酸磷酸核糖转移酶的表达纯化及酶活性的初步检测

陈永升¹ 周强² 赵圣印^{1*}

(1. 东华大学 化学化工与生物工程学院 上海 201620)

(2. 中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点研究室 上海 200032)

摘要: 【目的】在原核表达体系中实现大肠杆菌来源的喹啉酸磷酸核糖转移酶(Quinolinic acid phosphoribosyl transferase, QPRT)和烟酸磷酸核糖转移酶(Nicotinic acid phosphoribosyl transferase, NaPPT)的表达与纯化, 并利用酶的生物催化作用实现 2,3-二羧酸喹啉的 2 位选择性脱羧得到烟酸。【方法】通过 PCR 扩增分别得到编码 QPRT 和 NaPPT 的基因片段, 构建成原核表达质粒 pET28a-NadC 和 pRSETB-PncB, 在 *Escherichia coli* (*E. coli*) 中对其进行表达, 在体外对目标蛋白进行纯化并利用高效液相色谱法(HPLC)检测酶催化反应的发生。【结果】成功表达纯化得到 QPRT 和 NaPPT, 检测结果表明在这两个酶的生物催化作用下可实现喹啉酸的 2 位选择性脱羧。

关键词: 生物催化, 喹啉酸磷酸核糖转移酶, 烟酸磷酸核糖转移酶, 蛋白纯化, 选择性脱羧, 烟酸

The expression, purification and activity detect of quinolinic acid phosphoribosyl transferase and nicotinic acid phosphoribosyl transferase from *Escherichia coli*

CHEN Yong-Sheng¹ ZHOU Qiang² ZHAO Sheng-Yin^{1*}

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

(2. State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

*通讯作者: Tel: 86-21-67792776; ✉: syzhao8@dhu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-21; 接受日期: 2011-10-11

Abstract: [Objective] The expression, purification of quinolinic acid phosphoribosyl transferase (QPRT) and nicotinic acid phosphoribosyl transferase (NaPPT) from *Escherichia coli* (*E. coli*) were undertaken in prokaryotic expression system and activity detection of QPRT and NaPPT *in vitro*. **[Methods]** The *NadC* encoding QPRT and *PncB* encoding NaPPT were cloned and then ligated into pET28a and pRSETB to generate the expression plasmid pET28a-*NadC* and pRSETB-*PncB*, respectively. The plasmids were expressed in *E. coli* BL21(DE3) and enzymes were purified *in vitro*. Enzymes activity were detected by analyzing the reaction mixture on a high performance liquid chromatography (HPLC) system. **[Results]** QPRT and NaPPT were expressed and purified, the results indicate that quinolinic acid can be transformed into nicotinic acid through regioselective decarboxylation catalyzed by recombinant QPRT and NaPPT sequentially.

Keywords: Biocatalysis, Quinolinic acid phosphoribosyl transferase, Nicotinic acid phosphoribosyl transferase, Protein purification, Protodecarboxylation, Nicotinic acid

生物催化 (Biocatalysis) 也称生物转化 (Biotransformation), 指以外源性的天然或合成的有机化合物为底物, 添加至处于活性状态的生物体系或酶体系中, 在适宜的条件下进行培养, 使得底物与体系中的酶发生相互作用, 从而产生结构改变, 其实质是酶催化^[1-2]。生物催化中常用的有机体主要是微生物, 其本质是利用微生物细胞内的酶进行催化, 促进生物转化的进程。在大肠杆菌中, NAD 和 NADH 的代谢已被广泛研究^[3-4], 一系列参与代谢的酶的基因已经为人们所知^[5-6]。其中 *NadC* 基因编码的喹啉酸磷酸核糖转移酶 (Quinolinic acid phosphoribosyl transferase, QPRT) 可催化喹啉酸(QA)和 5-磷酸核糖-1-焦磷酸(PRPP)的反应得到烟酸单核苷酸(NaMN), 其脱酸反应机理十分独特^[7]; *PncB* 基因编码的烟酸磷酸核糖转移酶 (Nicotinic acid phosphoribosyl transferase, NaPPT)可催化烟酸单核苷酸(NaMN)和烟酸(NA)的相互转换, 效率较高且是 NAD 合成反应的限速步^[8]。在这两个酶的催化作用下, 可实现喹啉酸(QA)向烟酸(NA)的转化。有关喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPRT)和烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)在国内尚未见报道。因此, 我们克隆了大肠杆菌中的 *NadC* 和 *PncB* 基因, 构建原核表达体系, 并在大肠杆菌中进行表达, 进而对目标蛋

白进行了分离纯化。体外活性检测表明, 获得的重组蛋白具有良好的活性, 能够顺利实现 QA 到 NA 的转化, 为进一步深入研究该催化反应的机制和应用于体外生物转化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种及培养基: 质粒 pET28a, 质粒 pRSETB, 大肠杆菌 DH5 α , 大肠杆菌 BL21(DE3)均来自本实验室。LB 培养基: 胰化蛋白胨 1.0%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1.0%, pH 7.0, 固体培养基加 2.0%琼脂。

1.1.2 主要试剂及仪器: 限制性内切核酸酶购自 TaKaRa 公司, DNA marker、*Taq* DNA 聚合酶购自北京鼎国生物技术公司, 溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)购自 Aldrich 公司。其它常用生化试剂购自生工生物工程公司; 化学试剂均为国产分析纯试剂; 蛋白纯化及生测中用到的有机缓冲盐来自 Aldrich 公司。HPLC 流动相来自 Merck 公司。PCR 实验所需核苷酸引物的合成由上海英俊生物技术有限公司完成。克隆测序由上海美季生物技术有限公司完成。主要仪器: SCR20BA 高速冷冻离心机, HiTACH 公司; Genernap 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; LC-20AT 高效液相系统,

Shimadzu; Platisil (铂金) ODS 色谱柱, Dikma Technologies。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 DH5 α 总 DNA 的提取: 见链霉菌总 DNA 的少量快速分离^[9]。

1.2.2 喹啉酸磷酸核糖转移酶基因(*NadC*)和烟酸磷酸核糖转移酶基因(*PncB*)的克隆: 在 GenBank 中查找来自大肠杆菌的 *NadC* (Gene ID: 948869)和 *PncB* (Gene ID: 946648)基因序列, 然后根据其基因序列设计合成上下游引物(F, R)。在 *NadC* 基因序列的 5'端添加 *EcoR* I 位点, 3'端添加 *Hind* III 位点。在 *PncB* 基因序列的 5'端添加 *Bam*H I 位点, 3'端添加 *Hind* III 位点。

基因 *NadC* 的引物设计如下:

NadC-F: 5'-TAAGAATTCCATATGCCGCCTCGCCGCTATAACCC-3';

NadC-R: 5'-TTAAAGCTTTTACTCGAGGCGAAAACGCATTGAAAGGT-3'。

基因 *PncB* 的引物设计如下:

PncB-F: 5'-GAAGGATCCGATGACACAATTGCTTCTCC-3';

PncB-R: 5'-GCGAAGCTTTTAACTGGCTTTTAAATATGCG-3'。

采用分子克隆技术, 以大肠杆菌 DH5 α 总 DNA 为模板, PCR 反应条件为: 98 °C 15 s, 64 °C 15 s, 72 °C 95 s, 循环 35 次; 72 °C 10 min。经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶, 回收 PCR 产物。

1.2.3 重组表达质粒 pET28a-*NadC* 的构建: 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切载体 pET28a 及基因 *NadC* 的 PCR 产物, 酶切片段经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 以 GenClean DNA 胶回收试剂盒纯化回收。回收片段用 T4 DNA 连接酶连接构建重组表达载体 pET28a-*NadC*, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 转化后的菌液涂于 LB 固体培养基(抗生素为卡那霉素 50 mg/L)上培养 20 h,

挑单菌扩大培养, 取 2 mL 扩大培养的菌液提取质粒, 具体操作按照上海捷瑞生物工程有限公司提供的质粒 DNA 小量制备试剂盒说明书进行。取部分质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 然后进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析初步验证构建的质粒是否正确, 酶切验证正确的质粒再次进行测序鉴定。测序验证正确后, 将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中用于蛋白的表达与纯化。

1.2.4 重组表达质粒 pRSETB-*PncB* 的构建: 具体操作与重组表达载体 pET28a-*NadC* 的构建相同, 只是所用的载体为 pRSETB, 双酶切所用的酶是 *Bam*H I 和 *Hind* III。

1.2.5 蛋白的小量表达: 分别将含重组表达质粒 pET28a-*NadC* 和 pRSETB-*PncB* 的大肠杆菌 BL21 菌种接种至两瓶 50 mL LB (抗生素分别为卡那霉素 50 mg/L 和氨苄青霉素 50 mg/L)中, 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.4, 转移至 16 °C 继续培养, 至 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG 进行诱导(终浓度为 0.1 mmol/L)。16 °C 诱导表达 20 h, 离心收菌, 用破菌缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗涤一次, 然后用 10 mL 破菌缓冲液重悬菌体, 加入溶菌酶(终浓度 1 mg/L), 冰水浴中处理 30 min。然后在冰浴下超声破菌 10 min (超声 10 s, 间歇 50 s, 功率 200–300 W)。取 40 μ L 用于制备 SDS-PAGE 全菌样品, 另外再取 40 μ L, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min。上清用于制备 SDS-PAGE 可溶性蛋白样品, 沉淀用 40 μ L 破菌缓冲液重悬, 用于制备 SDS-PAGE 包涵体蛋白样品。通过 SDS 凝胶电泳检测蛋白是否可溶。

1.2.6 蛋白大量表达与亲和层析纯化: 蛋白的大量表达和后处理过程与蛋白的小量表达相同, 只是所用的 LB 培养基的体积由 50 mL 扩大至 500 mL。菌体经超声破菌后, 4 °C、12 000 r/min 离心 60 min, 转移上清至另一 50 mL EP 管中, 加

入 Ni^{2+} -IDA 亲和层析柱填料, 冰水浴下振荡 2 h。4 °C、3 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 用 15 mL 淋洗缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, 25 mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬柱填料, 装柱, 并用 20 mL 淋洗缓冲液进行淋洗。然后用含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液 20 mL (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 500 mmol/L NaCl, pH 8.0, 50 mmol/L 咪唑)进行洗脱以除去杂蛋白, 然后用含 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液 6 mL 将目标蛋白洗脱下来。然后通过 SDS-PAGE 检测纯化后蛋白的纯度。

1.2.7 蛋白的脱盐: 将收集的目标蛋白溶液超滤浓缩(4 °C、5 000 r/min 离心)至体积为 2.5 mL, 上样于 PD-10 凝胶柱, 丢弃流出液, 然后用缓冲液(10%甘油, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)洗脱目标蛋白。将洗脱液合并, 超滤浓缩至合适的浓度, 分装, 液氮速冻, -80 °C 保存。

1.2.8 蛋白的活性鉴定: 以喹啉酸(QA)与 5-磷酸核糖-1-焦磷酸盐(PRPP)为底物, 在喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPRT)的催化作用下得到中间产物烟

酸单核苷酸(NaMN), 25 °C 反应 1 h 后将反应体系放于沸水中煮 10 min 以终止反应, 再将其放于冰水浴中冷却 5 min^[10], 然后加入已纯化的烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)和 5-磷酸核糖-1-焦磷酸盐(PRPP)继续第二步反应, 25 °C 反应 1 h 后再次于沸水中煮沸 10 min, 冰水浴中冷却 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min 后, 取少量上清上样, 通过 HPLC 分析检测底物 2,3-吡啶二羧酸(QA)与最终产物烟酸(NA)的变化来确定两步反应是否能发生, 以此确定纯化得到的酶是否有活性, 反应方程式见图 1^[4,11]。HPLC 流动相为水(含 1%甲酰胺)/乙腈(98:2, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长 265 nm, 每次检测时间 12.5 min。酶 QPRT 的缓冲体系^[7]中含: 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.8, 4 mmol/L 氯化镁, 1 mmol/L 5-磷酸核糖-1-焦磷酸盐(PRPP), 1 mmol/L 喹啉酸(QA), 纯化得到的待测 QPRT 蛋白, 反应总体积 100 μL 。酶 NaPPT 的缓冲体系^[3]含: 50 mmol/L 磷酸盐, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 15 mmol/L 氯化镁, 4.5 mmol/L ATP, 1.5 mmol/L PRPP, 待测 NaPPT 蛋白, 反应总体积 120 μL 。

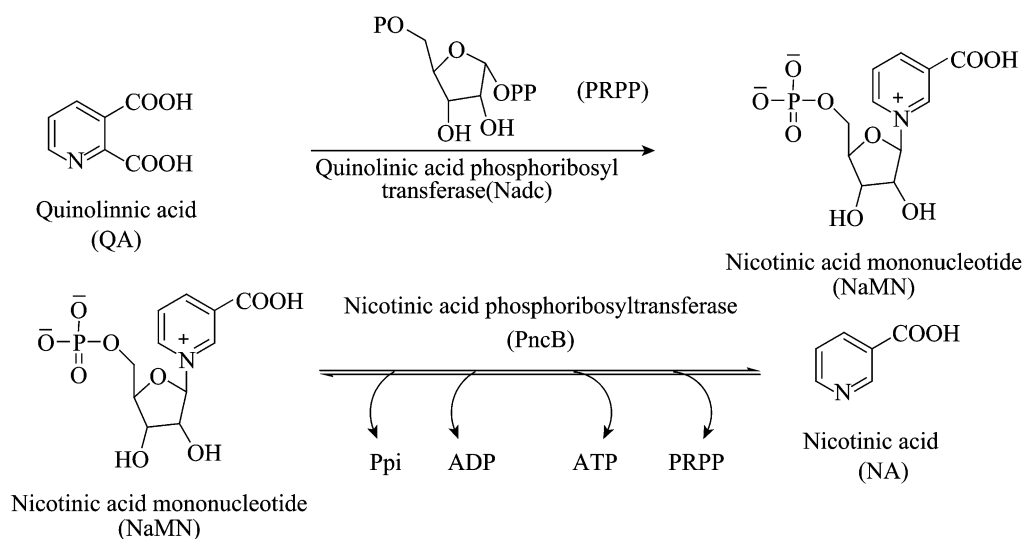


图 1 从喹啉酸生成烟酸的生物合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway from quinolinate acid to nicotinic acid

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建

以大肠杆菌 DH5 α 总 DNA 为模板, 根据目标基因 *NadC* 和 *PncB* 设计引物进行 PCR 扩增, 分别得到 890 bp 和 1 100 bp 扩增产物。重组质粒 pET28a-*NadC* 和 pRSETB-*PncB* 构建完成后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞进行扩增, 然后提取质粒, 进行双酶切验证。1% 琼脂糖凝胶电泳显示酶切片段与 PCR 产物片段大小相同(图 2), 初步证明构建的重组表达质粒 pET28a-*NadC* 和 pRSETB-*PncB* 的正确性。克隆的重组表达质粒 pET28a-*NadC* 和 pRSETB-*PncB* 的测序结果表明其基因序列与 GenBank 提供的 *NadC* (Gene ID: 948869) 和 *PncB* (Gene ID: 946648) 基因序列完全相同, 表明重组表达质粒 pET28a-*NadC* 和 pRSETB-*PncB* 的构建成功。

2.2 蛋白的表达与部分纯化

蛋白的小量表达确定蛋白可溶后, 进行蛋白的大量表达和纯化。粗酶液经过亲和柱色谱层析

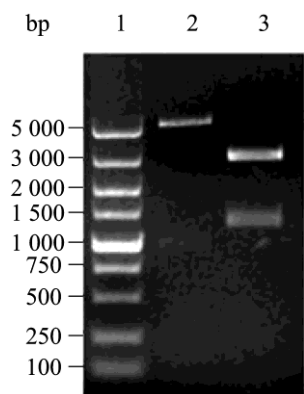


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by double digestion

注: 1: DL5000 分子标记; 2: 重组质粒 pET28a-*NadC* 双酶切产物; 3: 重组质粒 pRSETB-*PncB* 双酶切产物。

Note: 1: DNA marker DL5000; 2: pET28a-*NadC* digested by *EcoR* I and *Hind* III; 3: pRSETB-*PncB* digested by *Bam*H I and *Hind* III.

和脱盐后, 得到两个较纯的蛋白。蛋白电泳(12%), 分析表明蛋白 QPRT 的大小约为 40 kD, 蛋白 NaPPT 的分子量约为 44 kD, 纯度大于 85% (图 3)。其中蛋白 NaPPT 的大小与理论值(44 kD)

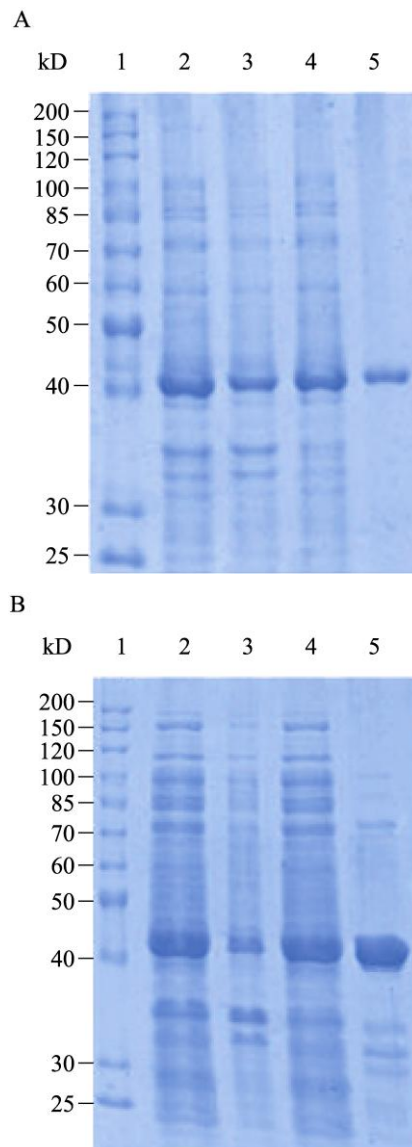


图 3 蛋白的电泳图(12% SDS-PAGE)

Fig. 3 SDS-PAGE (12%) analysis of the proteins

注: A: QPRT 蛋白的电泳图; B: NaPPT 蛋白的电泳图。1: 小分子量蛋白标记; 2: 全菌蛋白; 3: 包涵体蛋白; 4: 超声破菌的上清液; 5: 纯化得到的蛋白。

Note: A: SDS-PAGE (12%) analysis of QPRT; B: SDS-PAGE (12%) analysis of NaPPT. 1: Protein marker; 2: Total protein; 3: Inclusion body; 4: Soluble extraction; 5: Purified protein.

相同蛋白 QPRT 的分子量稍大于理论值 (35 kD)。产生差异的原因可能与该蛋白的氨基酸序列及比例有关, 该蛋白结合的 SDS 量比预期量要偏少, 其电泳速率偏低, 电泳的结果显示其分子量偏大。产生差异的原因还有待进一步深入研究。

2.3 蛋白的活性检测

由于喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPPT)催化的

第一步反应产物烟酸单核苷酸(NaMN)极性较大, 普通高效液相色谱法(HPLC)较难检测。同时, 该物质又是烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)催化的第二步反应的原料之一, 而喹啉酸(QA)和烟酸(NA)较容易用高效液相色谱(HPLC)检测的到。所以, 我们设计了两步反应(反应方程式见图 1), 通过检测底物喹啉酸(QA)的消耗和产物烟酸(NA)的生成来证明反应的发生和酶的活性。

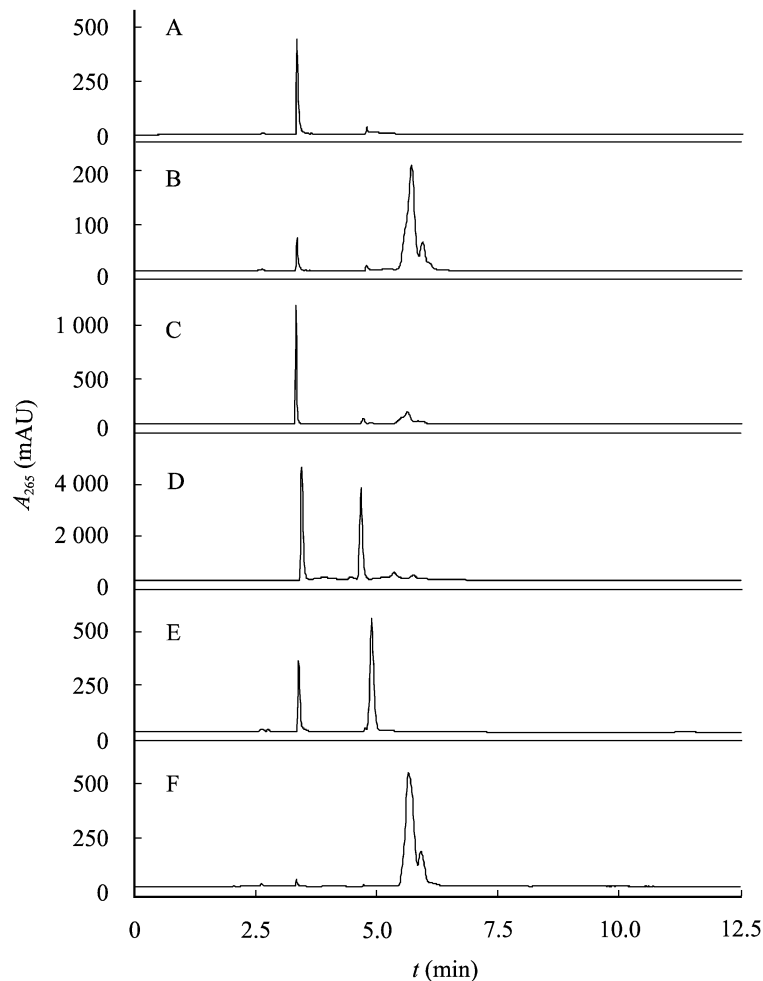


图 4 HPLC 检测结果

Fig. 4 HPLC analysis of the reaction

注: A: 第一步反应无底物; B: 第一步反应无酶; C: 第一步反应(加入 QPRT 2 μ L); D: 第二步反应(加入 NaPPT 4 μ L); E: *PncB* 缓冲液加烟酸(产物); F: *NadC* 缓冲液加喹啉酸(底物)。

Note: A: The first reaction without substrate (control); B: The first reaction without enzyme (control); C: The first reaction (add QPRT 2 μ L); D: The second reaction (add NaPPT 4 μ L); E: *PncB* buffer + Nicotinic acid (product); F: *NadC* buffer + Quinolinic acid (substrate).

经过比较图4中的HPLC分析结果可以发现: 4.75 min处的峰代表烟酸(产物), 5.75 min处的峰代表喹啉酸(底物)。反应完成之后, 5.75 min处的峰降低, 表明底物的消耗, 即表示第一步反应的发生; 4.75 min处有新峰产生, 表明产物烟酸的生成。两步反应均能发生, 同时表明我们纯化得到的喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPPT)和烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)均有活性。

3 讨论

生物催化反应具有条件温和、高效及高选择性(化学、区域及立体选择性)等优点, 被认为是一种资源节约型、环境友好型技术。生物催化技术越来越受到人们的重视, 成为研究的热点。喹啉酸的化学选择性脱羧方法有很多报道, 其中大多都需要高温、高压和贵金属催化, 反应条件较苛刻。选择性脱羧反应如果能够在酶的催化作用下发生, 则变得简单、高效。大肠杆菌代谢途径中的喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPRT)和烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)在菌体内可实现2,3-二羧酸吡啶向烟酸的转化。本实验通过PCR方法克隆到大肠杆菌中编码喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPPT)和烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)的基因 *NadC* 和 *PncB*, 构建成重组表达质粒 pET28a-*NadC* 和 pRSETB-*PncB*, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达, 然后对蛋白进行纯化, 得到纯度大于85%的蛋白, 并用高效液相色谱法(HPLC)检测了喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPPT)和烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)的活性。分析结果表明, 我们纯化得到的喹啉酸磷酸核糖转移酶(QPPT)和烟酸磷酸核糖转移酶(NaPPT)均有活性, 在这两个酶的作用下, 可实现喹啉酸(2,3-二羧酸吡啶)的2位脱羧得到烟酸, 于是我们寻找到一种酶法催化的选择性脱羧方法。

致谢: 本实验是在中国科学院上海有机化学研究

所生命有机国家重点实验室唐功利老师课题组完成, 对唐老师给予的指导与支持特表感谢!

参考文献

- [1] Loughlin WA. Biotransformations in organic synthesis[J]. *Bioresource Technol*, 2000, 74(1): 49–52.
- [2] Rozzell JD. Commercial scale biocatalysis: myths and realities[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1999, 7(11): 2253–2261.
- [3] Wubbolts MG, Terpstra P, Beilen JB, et al. Variation of cofactor levels in *Escherichia coli*: sequence analysis and expression of the *pncB* gene encoding nicotinic acid phosphoribosyl transferase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(290): 17665–17672.
- [4] Begley TP, Kinsland C, Mehl RA, et al. The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria[J]. *Vitamins and Hormones*, 2001, 61:103–119.
- [5] Foster JW, Moat AG. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial[J]. *Microbiological Reviews*, 1980, 44:83–105.
- [6] Hughes KT, Ladika D, Roth JR, et al. An indispensable gene for NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 155: 213–221.
- [7] Bhatia R, Calvo KC. The sequencing, expression, purification, and steady-state kinetic analysis of quinolinate phosphoribosyl transferase from *Escherichia coli*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 325(2): 270–278.
- [8] Imsnde J, Pardee AB. Regulation of pyridine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237:1305–1308.
- [9] 霍普伍德等. 链霉菌遗传操作实验手册[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988: 57.
- [10] Shibata K, Fukuwatari T, Sugimoto E. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of nicotinic acid mononucleotide for measurement of quinolinate phosphoribosyl transferase[J]. *Journal of Chromatography B*, 2000, 749: 281–285.
- [11] Noctor G, Queval G, Gakiere B. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 1603–1620.