

信号肽去除的耐热碱性磷酸酯酶 FD-TAP 在大肠杆菌中的亚克隆和高表达

季朝能 白晓阳 盛小禹 张 冰 毛裕民

(复旦大学生命科学院 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 通过计算机辅助分析,发现在耐热碱性磷酸酯酶(简称 FD-TAP)的 N 端存在 26 个氨基酸的信号肽序列。但一般信号肽切点并非是完全专一的,所以利用基因工程手段将 FD-TAP 的 N 端分别缺失 24、25、26 和 27 个氨基酸,得到了 N 端分别缺失 24、25、26 和 27 个氨基酸的克隆子 pTAPND24、pTAPND25、pTAPND26 和 pTAPND27。考虑到这样的克隆子其翻译起始区所形成的能量较低结构稳定的二级结构可能阻碍基因的表达,所以在保证氨基酸序列不变的前提下另外设计了 4 个引物,得到了二级结构能量大大提高的 4 个克隆子 pTAPND24C、pTAPND25C、pTAPND26C 和 pTAPND27C。结果表明 pTAPND24、pTAPND25 和 pTAPND27 没有表达,pTAPND26 和 pTAPND24C 的表达量较低,pTAPND25C、pTAPND26C 和 pTAPND27C 的表达量较高。通过测定 pTAPND25C、pTAPND26C 和 pTAPND27C 的表达蛋白 TAPND25、TAPND26 和 TAPND27 的比活和热稳定性,发现无论比活和热稳定性 TAPND27 明显比 TAPND25 和 TAPND26 高且比野生型 FD-TAP 略高。

关键词 耐热碱性磷酸酯酶,信号肽,mRNA 二级结构

中图分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)06-0690-05

碱性磷酸酯酶(Alkaline phosphatase 简称 AP)是一种广泛存在于各种生物体内,参与细胞磷代谢和信号传导的重要酶类^[1,2]。AP 也是研究蛋白质结构和功能关系的一个很好的材料,近年来以 AP 特别是大肠杆菌 AP 为对象,通过晶体 X 衍射和核磁共振等结构测定手段并结合突变研究,已经在蛋白质结构和功能之间关系的研究上取得了很大的进展^[3-9]。AP 也是一种有用的工具酶,作为非同位素标记被广泛应用于 Southern 和 Northern 印迹分析、酶联试剂和 DNA 序列分析等各个方面^[10]。由于非同位素标记可以避免实验工作人员接触同位素、避免环境污染和可长期保存等优点,有着很大的开发和利用的价值,有着广阔的市场前景。过去所报道的 AP 都来自常温菌,酶的热稳定性相对较差,不利于在高温下的操作,这限制了酶的应用范围特别是在目前常用的 PCR 技术中的应用。本实验室从栖热细菌中筛选到了一株耐热碱性磷酸酯酶(简称 FD-TAP)产生菌株 *Thermus sp.* 3041^[11],并在大肠杆菌中进行了 FD-TAP 的克隆、测序和表达^[11,12],这很好地解决了常温酶的缺点。目前对耐热蛋白的结构和功能之间关系缺乏一个好的材料,

FD-TAP 由于其方便的活性测定可以弥补这方面的缺陷。

但在大肠杆菌中克隆表达的 FD-TAP 的热稳定性(95℃ 30 min 保留 50% 活性)比野生型 FD-TAP(95℃ 60 min 保留 75% 活性)低^[11]。通过对 FD-TAP 的氨基酸序列的计算机分析,发现在 FD-TAP 的 26 位和 27 位氨基酸之间存在一个信号肽酶切位点,推测可能是外加的信号肽在大肠杆菌中不能或不能正确地切除造成了热稳定性的下降。通过基因工程手段,将其信号肽序列去除,可以为 FD-TAP 的进一步的改造、FD-TAP 的应用以及 FD-TAP 结构和功能之间的关系研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 *E. coli* TG1(*super E hsd* Δ 5 *thi* Δ (*lac-proAB*)F [*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15]), *mph44* (*f'* *araD139D* (*ara-leu*) 7697*Dlac-74galUgal Krps/D* (*phoA-phoC*) *phoR tsx::Tn5*),高表达载体 pJLA503 和高表达质粒 pTAP503(pJLA503 上克隆有 FD-TAP 基因全序列

的质粒)由本实验室保存。

1.1.2 酶和化学试剂 :各种限制酶和 T4 DNA 连接酶均购自美国 New England Biolabs 或 Promega 公司。测序试剂盒购自 GENE 公司 ;SDS ,bisacrylamide 和 acrylamide 购自 Sigma 公司 ;其它化学试剂均为国产分析纯产品。PCR 扩增引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 重组操作 :细菌培养、质粒提取、内切酶水解、DNA 限制性酶切片段回收、DNA 连接和转化参考文献 [13]。

1.2.2 DNA 序列测定 :DNA 序列测定用双脱氧末端终止法 ,采用 PE Applied Biosystems 公司的 ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 进行双链 DNA 测序。

1.2.3 信号肽位置的计算机分析 :分析采用 PC/GENE 软件包 (A. bairoch/University Geneva/Switzerland 1993)。

1.2.4 FD-TAP 的诱导表达 :将待表达菌株接种于 10 mL 的 2YT 培养基中 ,30℃ 培养过夜 ,以 2% 的接种量接种于 100 mL 的 2YT 培养基中 ,30℃ 培养 2 h ,加入等体积的 55℃ 预热的 2YT 培养基 ,42℃ 培养 10 h ,5 r/min 离心 5 min 收集菌体。

1.2.5 FD-TAP 的分离纯化 :将收集的菌体以 10 mL/g 湿菌体的比例用 50 mmol/L Tris-HCl (pH7.0)悬浮 ,超声破菌后 ,12 000 r/min 离心 10 min 取上清边搅拌边加入聚乙烯亚胺至终浓度 0.03% ,静置 10 min 后 ,12 000 r/min 离心 10 min。取上清于 0℃ 边搅拌边加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 50% 的饱和度 ,静置 10 min 后 ,12 000 r/min 离心 10 min ,去上清 ,沉淀用破菌液 1/10 体积的 BufferA (10 mmol/L PBS (pH6.5) ,1 mmol/L MgCl_2)溶解后对 BufferA 的缓冲液透析直至透析袋内外平衡 ,透析的样品放置待用。

透析好的样品进行 CM-sepharose Fast Flow 柱层析 ,CM-sepharose Fast Flow 柱预先用 BufferA 平衡。样品上柱后 ,先用 BufferA 将没有被吸附住的蛋白淋洗干净 ,洗脱采用 BufferA ~ BufferA + 400 mmol/L NaCl 的梯度进行连续线形梯度洗脱 ,收集 200 mmol/L NaCl 附近的洗脱峰 ,于 0℃ 边搅拌边加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 80% 的饱和度 ,静置 10 min 后 ,12 000 r/min 离心 10 min ,去上清 ,沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.0)溶解后对 100 mmol/L Tris-HCl (pH7.0)的缓冲液透析直至透析袋内外平

衡 ,透析的样品放置待用。

1.2.6 FD-TAP 的酶活测定 :FD-TAP 酶活的定义 :在 1 mol/L 的二乙醇胺 ,1 mmol/L MgCl_2 (pH12.4)的反应体系中 65℃ 反应 10 min 生成 1 μmol 的产物的酶定义为 1 单位。

FD-TAP 酶活的测定 :取 10 μL 的酶于 1 mL 的 1 mol/L 的二乙醇胺 ,1 mmol/L MgCl_2 (pH12.4) 65℃ 反应 10 min ,用 1 mL 的 0.2 mol/L NaOH 终止反应 ,然后在 405 nm 处测定其 OD 值。

酶活 ($\text{u}/\mu\text{L}$) = $(\text{OD}_{405} \times 2.01) / (18.8 \times 10 \times 10)$

1.2.7 SDS-PAGE 电泳 :SDS PAGE 电泳选用 Laemmli 的高 pH 不连续缓冲体系^[14] ,分离胶浓度采用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶。

2 结果

2.1 信号肽位置的确定

利用 PCGENE 软件包 ,通过计算机分析发现在 FD-TAP 的 N 端存在 26 个氨基酸的信号肽 ,但一般信号肽的切点并非是完全专一的 ,所以利用基因工程手段将 FD-TAP 的 N 端分别缺失 24、25、26 和 27 个氨基酸以选取一个酶性质较好的克隆。

2.2 信号肽序列的去除

根据 FD-TAP 的核苷酸和蛋白质序列 ,我们在 N 端设计了 4 个引物 :Pr24、Pr25、Pr26 和 Pr27。考虑到在这些位置缺失后基因上 5' 端的核苷酸序列与表达载体上的 SD 序列形成很强的二级结构 ,这种 ATG 密码子附近低能量的 mRNA 的二级结构很有可能对表达不利 ,我们通过在保证氨基酸序列不变的前提下改变基因上 5' 端的核苷酸序列使得 mRNA 的二级结构的能量大大升高 ,另外设计了 4 个引物 :Pr24C、Pr25C、Pr26C 和 Pr27C。另外我们在 FD-TAP 基因的 3' 端设计了一个引物 Pr1 (引物序列如下所示 ,TAP 为基因上相对应的序列) ,在设计以上引物时 ,5' 端引物都在 ATG 位置引入一个 NdeI 酶切位点 (斜体表示) ,3' 端引物都在终止密码子后引入一个 BamHI 酶切位点 (黑体表示) ,以便于 PCR 产物的克隆。将 5' 端的突变引物和 3' 端引物 Pr1 配对 ,质粒 pTAP503 为模板 ,进行 PCR 扩增 ,将 PCR 产物进行 NdeI 和 BamHI 双酶切 ,酶切后回收的 DNA 片段与 pJLA503 (NdeI 和 BamHI 双酶切)载体连接 ,然后转化 TG1 ,抽提质粒 ,进行 NdeI 和 BamHI 双酶切鉴定 ,挑取能切出 1.4 kb DNA 片段的克隆再进行 DNA 序列分析 ,测序结果表明发生所需的突变 ,这样得到了 N 端缺失 24、25、

26 和 27 个氨基酸的两套缺失体 ,命名为 pTAP-ND24、pTAPND24C、 pTAPND25、 pTAPND25C、 pTAPND26、pTAPND26C、 pTAPND27 和 pTAP-ND27C。由于大肠杆菌 TG1 自身含有碱性磷酸酯

酶 ,可能对以后的分离纯化和性质测定产生干扰 ,所以将这些克隆子转化碱性磷酸酯酶缺失的大肠杆菌 mph44 准备进行蛋白的表达和分离纯化。

TAP	5'-CAGGGGGCTCTGCAGAACCCAGCCTTCCTTGGAAGGCGGTACCGCAACCTC-3'
Pr24	5'-CTCATATGCAGGGGGCTCTGCAGAAC-3'
Pr24C	5'-CTCATATGCAAGGTGCTTTACAAAATCAACCTTCCTTGGAAGGCGGTAC-3'
Pr25	5'-CTCATATGGGGGGCTCTGCAGAACAG-3'
Pr25C	5'-CTCATATGGGAGCTTTACAAAATCAACCATCCTTGGAAGGCGGTACCGC-3'
Pr26	5'-CTCATATGGCTCTGCAGAACCCAGCCTTC-3'
Pr26C	5'-CTCATATGGCACTTCAAAAATCAACCTTCCTTGGAAGGCGGTACC-3'
Pr27	5'-TGCATATGCTGCAGAACCCAGCCTTCCT-3'
Pr27C	5'-CTCATATGTTACAAAATCAACCTTCCTTGGAAGGCGGTAC-3'
Pr1	5'-GACGGATCCTTAGGCCCAGACGTCCTCGG-3'

2.3 蛋白的表达和分离纯化

将 8 个克隆子和 mph44(TAP503)按方法 4 进行诱导表达 ,以 8 mL/g 湿菌体的比例用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.0)悬浮 ,超声破菌 ,取破菌液上清进行酶活测定(表 1)。测定结果表明 ,mph44(pTAP-

表 1 mph44(pTAPND24) mph44(pTAPND24) mph44(pTAPND25) mph44(pTAPND25) mph44(pTAPND26) mph44(pTAPND26C) mph44(pTAPND27)和 mph44(pTAP-ND27C)的破菌液酶活性的测定

Table 1 Determination of the enzyme activity of the cell extract of mph44 (pTAPND24) mph44 (pTAPND24) mph44 (pTAPND25) mph44(pTAPND25) mph44(pTAPND26) mph44 (pTAPND26C) mph44(pTAPND27) and mph44(pTAPND27C)

	Enzyme activity (u/g)
mph44(TAP503)	90.2
mph44(pTAPND24)	<0.01
mph44(pTAPND24C)	5.1
mph44(pTAPND25)	<0.01
mph44(pTAPND25C)	150.2
mph44(pTAPND26)	0.344
mph44(pTAPND26C)	300
mph44(pTAPND27)	<0.01
mph44(pTAPND27C)	202.4

ND24) mph44(pTAPND25)和 mph44(pTAPND27)基本上没有表达 ,mph44(pTAPND24C)和 mph44(pTAP-ND26)的表达量很低 ,mph44(pTAPND25C) mph44(pTAPND26C)和 mph44(pTAPND27C)的表达量较高 ,这表明 ATG 附近的 mRNA 的二级结构对酶的表达有很大的影响。pTAPND25C、pTAPND26C 和 pTAPND27C 的表达量都高于 pTAP503 ,这对于

FD-TAP 的应用和研究 FD-TAP 结构和功能之间的关系都是有利的。由于 pTAPND24C 的表达量很低 ,在分离纯化上存在一定的难度并且对以后酶的应用不利 ,所以没有进行分离纯化。这个结果表明了翻译起始区 mRNA 稳定的二级结构对蛋白的表达不利 ,这提示为了提高蛋白的表达量 ,提高翻译起始区 mRNA 二级结构的能量降低其稳定性是可供选择的好方法。

pTAPND25C、pTAPND26C 和 pTAPND27C 所表达的蛋白质命名为 TAPND25、TAPND26 和 TAPND27。将 TAPND26 和 TAPND27 按方法所述进行了蛋白质的分离纯化 ,分离纯化的酶蛋白 SDS-PAGE 电泳一条带(图 1)。

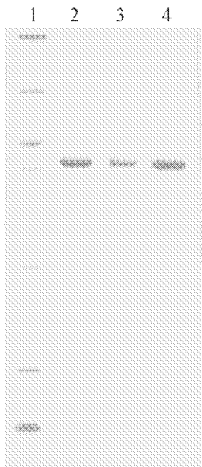


图 1 纯化的 TAPND25 ,TAPND26 和 TAPND27 的 SDS-PAGE 电泳

Fig.1 SDS-PAGE of purified TAPND25 , TAPND26 and TAPND27

Lane 1 is Protein marker ;Lane2 ~ 4 are purified TAPND25 ,TAP-ND26 and TAPND27

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.4 酶的比活测定

通过测定 TAPND25、TAPND26 和 TAPND27 的酶活和酶蛋白的浓度 ,确定它们的比活分别为 70.3 u/mg、73.9 u/mg 和 91.4 u/mg ,和 FD-TAP (TAP503 的表达产物)的 81.3 u/mg 相比 ,TAPND27 略有升高 而 TAPND25 和 TAPND26 则有下降(FD-TAP 的表达和纯化另文发表)。

TAPND27 用 10 mmol/L PBS (pH7.0) 2 mmol/L MgCl₂ 分别稀释至 0.04 mg/mL ,然后在 95℃ 放置不同时间后 ,0℃ 冰浴 30 min ,取 10 μL 测定酶活力 (图 2)。从图上可以发现 TAPND27 的耐热性比 TAPND25 和 TAPND26 高。从比活和热稳定性来看 ,TAPND27 的比活和热稳定性都比 TAPND25 和 TAPND26 高。

3 讨 论

从酶学性质来看 ,TAPND27 相对于 TAPND26 和 TAPND25 而言 ,酶的比活和热稳定性都有一定程度的上升。这个结果表明了 N 端 1 到 2 个氨基酸的差异也会造成热稳定性大的改变 ,说明了 N 端氨基酸对 FD-TAP 的热稳定性有很大的影响。同时 TAPND27 作为一个信号肽缺失的 TAP ,比没有去除信号肽的 FD-TAP 的热稳定性和比活高 ,对于其在高温条件下的应用有着较大的价值。

在亚克隆中通过二级结构的分析发现 ,翻译起始点 mRNA 的二级结构对蛋白的表达有很大的影响 ,稳定的二级结构会阻碍蛋白的表达。有关 mRNA 二级结构和蛋白表达量之间关系的研究正在整理之中。

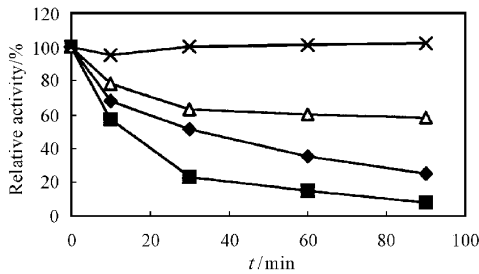


图 2 FD-TAP ,TAPND25 ,TAPND26 和 TAPND27 的热稳定性测定

Fig.2 The thermostability of FD-TAP , TAPND25 ,TAPND26 and TAPND27
× TAPND27 ;△ TAPND26 ;◆ FD-TAP ;■ TAPND25

2.5 酶的耐热性的初步测定

将分离纯化得到的 TAPND25、TAPND26 和

参 考 文 献

[1] Cohen P. *Proc Roy Soc ser B* ,1988 **234** :115~144
[2] Johnson L N ,Barfor D. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* ,1993 **22** :199~232
[3] Chen L ,Neidhart D. *Protein Eng* ,1992 **5** :605~610
[4] Dealwis C G ,Liqing C. *Protein Eng* ,1991 **4** :801~804
[5] Dealwis C G ,Liqing C. *Protein Eng* ,1995 **8** :865~871
[6] Matlin A R ,Kendall D A. *Biochemistry* ,1992 **3** :8196~8200
[7] Olafsdottir S ,Wright C ,Wright H T *et al.* *J Bio Chem* ,1988 **263** :10002~10004
[8] Sowadski J M ,Foster B A ,Wyckoff H W. *J Mol Biol* ,1981 **150** :245~272
[9] Sowadski J M ,Handschumacher M D ,Murthy H M *et al.* *J Mol Biol* ,1985 **186** :417~433
[10] Engvall E ,Perlman P. *Biochem Biophys Acta* ,1971 **251** :427~434
[11] 盛小禹 ,王 曦 ,高静波等. *生物化学杂志* ,1997 **13** (6) :672~676
[12] 袁有忠 ,季朝能 ,佟 石等. *复旦学报(自然科学版)* ,1998 **37** (4) :513~516
[13] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989
[14] Laemmli U K. *Nature* ,1970 **227** (259) :680~685

Subcloning and High Expression of Signal peptide Deleted Thermostable Alkaline Phosphatase (FD-TAP)

JI Chao-Neng BAI Xiao-Yang SHENG Xiao-Yu ZHANG Bing MAO Yu-Min

(School of Life Science ,State Key Laboratory of Genetic Engineering ,Fudan University ,Shanghai 200433)

Abstract Through computer associated analysis a signal peptide sequence of 26 amino acids was found at N-terminal of thermostable alkaline phosphatase (FD-TAP). For the cleavage site was usually not identical ,four clones named pTAPND24 ,pTAPND25 ,pTAPND26 and pTAPND27 with deletion of 24 ,25 ,26 and 27 amino acids at N-terminal of FD-TAP were obtained by genetic engineering. Considered their high stable secondary structure formed by region about translational initial codon which thought to hinder the expression of target gene ,four other clones named pTAPND24C ,pTAPND25C ,pTAPND26C and pTAPND27C were obtained. Their amino acids were identical to pTAPND24 ,pTAPND25 ,pTAPND26 and pTAPND27 and their deoxynucleosides were changed a little by which their energy of the secondary structure of the region about translational initial codon increased. These eight clones were expressed in *E. coli* mph44 which its alkaline phosphatase gene was deleted and it was found that pTAPND24 ,pTAPND25 and pTAPND27 have no expression ; pTAPND24C and pTAPND26C have little expression and pTAPND25C ,pTAPND26C and pTAPND27C have high expression. The proteins TAPND25 ,TAPND26 and TAPND27 expressed by pTAPND25C ,pTAPND26C and pTAPND27C were purified and their specific activity and thermostability were measured. It was found that the specific activity and thermostability of TAPND27 was higher than TAPND25 ,TAPND26 and native FD-TAP. The result suggests that TAPND27 was more suitable for application on the condition of high-temperature than the native FD-TAP ,TAPND25 and TAPND26.

Key words Thermostable alkaline phosphatase , signal peptide , mRNA secondary structure