

重组点状产气单胞菌脯氨酰内肽酶的纯化和鉴定

李 民¹ 陈常庆^{1*} 王德宝²

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 报道重组点状产气单胞菌脯氨酰内肽酶(简称 apPEP)的基因工程下游工艺研究。工程菌株 *E. coli* BL21/pKKH-PEP 表达产物 apPEP 为可溶性蛋白,在 NBS BioFlo 3000 型 5L 自控发酵罐中经 14h 培养每升发酵液可达到 22.5g 干重菌体,含 apPEP 3.0g 左右。发酵菌体经超声破碎、硫酸铵沉淀后,依次经 Sephadex G-25、High performance Q sepharose FR(HP-Q)、Phenyl sepharose 6 FF 柱层析分离纯化,每升发酵产物最终可得 0.86g 纯度达 96% 的重组 apPEP,比活力达到 65.5u/mg,整个纯化工艺的蛋白回收率为 8.2%,活力回收率为 24.4%。纯化的 apPEP 经电喷雾质谱测定分子量为 $76464 \pm 30D$,N 端氨基酸序列与基因序列推导的一致。等电点为 pI6.0 左右。与 *Aeromonas hydrophila* 来源的 PEP(pI=5.5)相近。

关键词 脯氨酰内肽酶 高密度发酵 纯化 比活力 鉴定

中图分类号 Q493.3 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0345-04

脯氨酰内肽酶(Prolyl Endopeptidase, PEP) EC 3.4.21.26 是一种广泛分布在各种生物体内能特异性水解小分子量多肽中脯氨酸羧基端肽键的蛋白酶^[1]。PEP 的催化性质及其在生物体不同组织的特异性分布(哺乳动物脑中含量较高)表明,它对特定组织的功能发挥可能起着重要的调节作用^[2]。临床上发现精神分裂症患者血浆、吗啡戒断症状患者下丘脑和 Alzheimer's 病患者脑中的 PEP 活性均发生了显著变化,这表明 PEP 与神经和记忆等相关疾病的发生具有密切的联系^[3]。PEP 在人体内参与许多多肽激素和神经递质的成熟和降解,其专一性抑制剂在改善莨菪胺引起的小鼠记忆障碍中具有好的药理作用^[4]。

由于 PEP 在生物体内含量甚微,直接从组织中分离提取繁琐且低效^[5-8]。因此利用基因工程技术大量生产该酶具有重要的研究价值和潜在的医用价值。本实验室从国内一株点状产气单胞菌(*Aeromonas punctata*)中克隆了脯氨酰内肽酶基因,它编码 690 个氨基酸,分子量为 76.467kD,由该基因构建的工程菌 *E. coli* BL21/pKKH-PEP 表达产生的重组脯氨酰内肽酶占菌体总蛋白的 30% 左右,为可溶性蛋白,并能进行高密度发酵(结果另文发表)。本文将报道发酵产物 apPEP 的分离与纯化结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和材料: PEP 酶的特异性底物 Benzoyloxycarbonyl-Gly-Pro- β -NA(Z-G-P- β NA)为本实验室合成;显色剂 Fast Garnet GBC Salt 购自 Sigma 公司;丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺为 USB 公司产品;乙腈为 Merck 产品;其它为国产分析纯试剂;分离纯化介质和蛋白层析系统为 Pharmacia 公司产品;Protein-Pak DEAE 15HR AP-1(10 × 100mm)以及 HPLC 系统为 Waters 公司产品; C_8 反相柱(Shim-pack CLC-C8 6.0 × 150mm)为岛津公司产品;等电点标准蛋白和两性电解质购自 Bio-Rad 公司。

1.1.2 培养基和工程菌: 2-YT 培养基^[9]作为试管种子和二级种子培养,半合成培养基^[10]用于发酵罐中补料分批培养。IPTG 诱导表达型基因工程菌株 BL21/pKKH-PEP 在试管培养中 apPEP 的表达量为菌体总蛋白的 30% 左右。

1.2 方法

1.2.1 高密度发酵: 工程菌的发酵在 NBS BioFlo 3000 型 5L 自控罐中进行。将新鲜的试管种子以 2% 接种量接入到含 100mL 2-YT 培养基的 500mL 摇瓶中,37℃,260r/min 培养 6h,作为二级种子,按

发酵罐工作体积的 5% 接入二级种子,补料分批培养 10h 后加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,诱导表达 4h。培养过程中通过补加 25% 的氨水控制 pH 在 7.0 左右,通过编制的计算机控制程序自动调节转速和通入纯氧使溶解氧维持在 40% 左右,按设定的补料方程式补加甘油和氮源。

1.2.2 apPEP 的纯化: 发酵结束后 5000r/min 离心 25min 收集菌体,按 1:10 用 PBS 悬浮,冰浴中间断超声 20 次,每次 60s,破碎菌体,15 000r/min 离心 15min,上清用硫酸铵分级沉淀,收取 20%~65% 饱和度的蛋白沉淀,20mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液溶解后用 Sephadex G-25 脱盐,上 HP-Q sepharose FF 层析柱分离,0~0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱,收集 apPEP 活性峰,样品经 1.5mol/L 硫酸铵平衡后,上 Phenyl sepharose 6FF 柱,1.5~0mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 线性梯度洗脱,整个操作在 4℃ 下进行。

1.2.3 apPEP 活力测定: 将酶溶液稀释至约 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,取 10 μL 酶液,加入到 34℃ 预热的 0.5mL 20mmol/L Tris-HCl (pH8.4) 缓冲液中,1min 后立刻加入 10 μL 5mmol/L 的 Z-Gly-Pro- β NA 溶液,混匀反应 5min,加入 250 μL 1mg/mL 的 Fast Garnet GBC Salt 溶液显色 20min,于 550nm 处测定光吸收值,相对活力以 A_{550} 表示。

1.3 鉴定方法

1.3.1 菌体浓度用分光光度计在 600 nm 波长处测光密度值(OD_{600})^[10];12.5% 的 SDS-PAGE 采用 Laemmli 法^[9];蛋白质定量采用 Bradford 法^[11]。表达量采用激光灰度扫描法^[10]。

1.3.2 apPEP 纯度采用离子型 HPLC(0~300mmol/L NaCl 线性梯度)和 HPLC-C₈ 反相柱(0~100% 含 0.1% TFA 乙腈梯度)鉴定,流速 1mL/min,波长 280nm。

1.3.3 等电点测定: 采用 Bio-Rad 公司的微型聚丙烯酰胺等电聚焦仪(Mini IEF Cell 111)测定,电泳方法按说明书。两性电解质的 pH 范围为 3~10。上样 2 μL ,对应标准蛋白分析 apPEP 的等电点。质谱分析委托中国科学院上海有机化学研究所生命有机实验室测定,N 端测序委托中国科学院上海生物化学研究所测定。

2 结果与讨论

2.1 重组工程菌 BL21/pKKH-PEP 的高密度高表达发酵

高密度发酵过程中采用分批和补料分批发酵相

结合的工艺。分批培养 4h 后菌体密度达到 OD_{600} 5,随后进入补料培养阶段。转速在 7h 达到 800r/min 后,开始供应纯氧。培养至 10h,加入 IPTG 至 1mmol/L 诱导培养 4h,之后细菌生长趋势开始减缓故终止发酵,最终菌体密度为 OD_{600} 56.4,相当于 22.5g(DCW)/L,获得干菌体 90.2g,apPEP 的表达量占菌体总蛋白的 30%,apPEP 产量达到 3.0g/L。图 1 为 *E. coli* BL21/pKKH-PEP 发酵图。

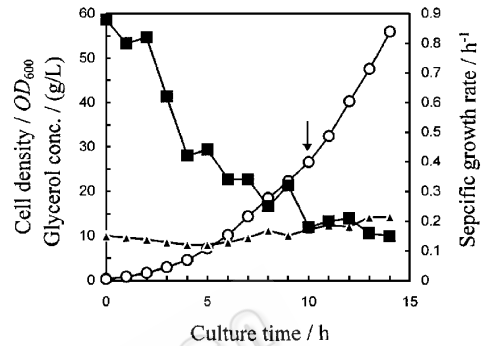


图 1 高密度发酵过程中 *E. coli* BL21/pKKH-PEP 生长曲线和比生长速度

Fig. 1 *E. coli* BL21/pKKH-PEP growth curve and specific growth rate during high cell density fermentation
(\blacktriangle) Glycerol concentration/ $g \cdot L^{-1}$ (\circ) Cell density/ OD_{600}
(\blacksquare) Specific growth rate/ h^{-1} Arrow indicates the induction time

2.2 apPEP 的分离与纯化

apPEP 表达的产物为可溶性蛋白,第一步用硫酸铵分级沉淀可去除部分杂蛋白以及大量的核酸类杂质。根据不同饱和度硫酸铵沉淀产物的凝胶电泳结果得出 apPEP 主要存在于 20%~65% 的饱和度中。

第二步采用 Sephadex G-25 脱盐,最大上样体积可达树脂体积的 1/10,它比透析脱盐快速、彻底,并避免了因时间长而造成的失活现象。

样品脱盐后用 High performance Qsepharose FF (HP-Q)可以快速捕捉目标蛋白,一步纯化使 apPEP 的纯度达到 85% 以上,而用 Q-Sepharose FF(Q) 的分离效率稍低,纯化后的纯度仅为 80% 左右,从分离图谱也可以看到 HP-Q 将 apPEP 主峰两侧 Q 不能分开的杂蛋白又各分离出一个小峰,见图 2。

最后一步用 Phenyl Sepharose 6 FF 柱层析纯化,它不仅省去了 NaCl 洗脱后脱盐的步骤,节约了时间,同时得到了进一步的精细纯化,apPEP 的纯度为 96% 左右,达到了作为分子生物学工具酶的要求。若要得到更高纯度的酶制剂,可以用半制备的 Protein-Pak DEAE HPLC 进一步纯化,一次纯化只需 30min,可得到近 1mg 的纯品。

表 1 *E. coli* BL21/pKKH-PEP 表达的 apPEP 的纯化

Table 1 Purification of prolyl endopeptidase from *E. coli* BL21/pKKH-PEP

Procedure	Protein/ mg	Total activity / $\times 10^3$ u	Specific activity ($u \cdot mg^{-1}$)	PEP purity /%	Protein recovery	Activity recovery /%	Procedure efficiency /%	Purification fold
Cell-free extract	10 428	230.4	22.1	30	100	100	/	1.0
Ammonium sulfate precipitation	3 151	91.0	28.9	36	30.2	39.5	30.2	1.2
HP-Q sepharose FF	1 482	90.1	60.8	85	14.2	39.1	47.0	2.8
Phenyl sepharose 6FF	860	56.3	65.5	96	8.2	24.4	60.2	3.2

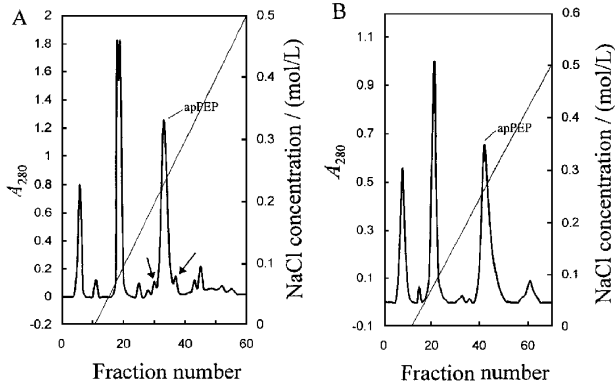


图 2 HP-Q sepharose FF (A) 和 Q sepharose FF (B) 分离纯化 apPEP 的层析图

Fig.2 Chromatograph of apPEP on HP-Q sepharose FF (A) and Q-sepharose FF (B) arrows indicate the impurity

总之,整个纯化过程的蛋白回收率为 8.2% 左右,活性回收率在 24.4% 左右,纯化结果见表 1,纯化过程各步骤的 SDS-PAGE 电泳图谱见图 3。

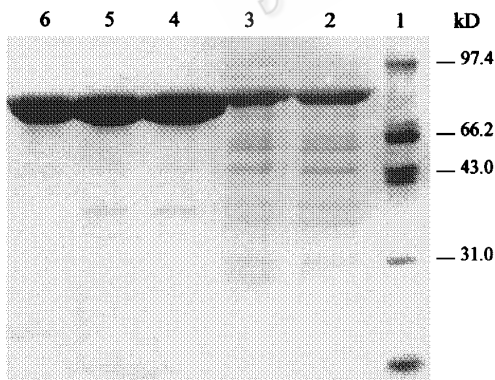


图 3 重组 apPEP 纯化过程中的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant apPEP during the purification

1.Marker;2. BL21/pKKH-PEP cell-free extrac;3~6. Purification after ammonium sulfate precipitation,HP-Q sepharose FF,Phenyl sepharose FF,Protein-Pak DEAE, respectively

2.3 重组脯氨酰内肽酶鉴定

2.3.1 apPEP 纯度和活力鉴定:经 Phenyl sepharose 6 FF 纯化后的 apPEP 分别用离子型 HPLC

和 RP-C₈ 柱进行纯度鉴定,纯度超过 96%,见图 4。Protein-Pak DEAE HPLC 中 0~300mmol/L NaCl 梯度按照曲线 III(图 4A、B 相)进行。

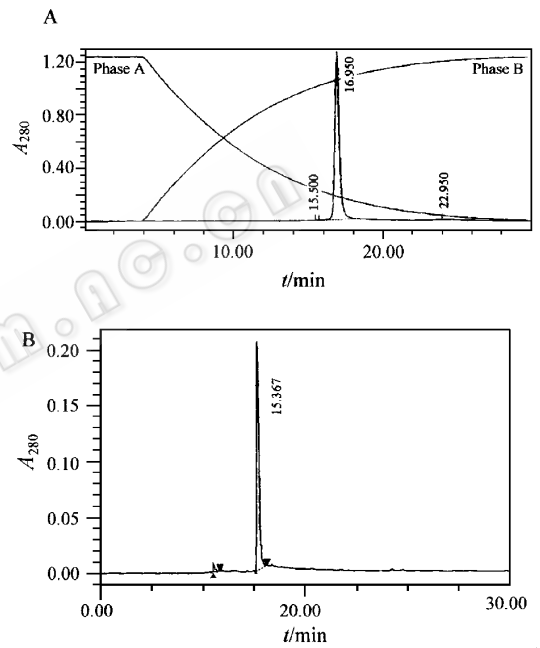


图 4 apPEP 纯度鉴定

Fig.4 Purity analysis of apPEP

A. Analysis by Protein-Pak DEAE HPLC,Phase A:20mmol/L Tris-Cl pH8.0,Phase B 300mmol/L NaCl+A;B. Analysis by HPLC RP-C₈

apPEP 的最适温度为 34℃,最适 pH 值 8.4,比活力测定在最适条件下进行。PEP 的专一性底物 Z-G-P-βNA 经 apPEP 酶解后释放的 β-NA 能与染料 Fast Garnet GBC salt 形成在 550nm 有吸收的偶氮类化合物。A₅₅₀ 代表酶的相对活力,对应标准曲线计算出 apPEP 的比活力为 65.5u/mg。

2.3.2 apPEP 质谱和 N 端序列鉴定:采用电喷雾质谱测定 apPEP 的分子量为 76464 ± 30D,根据基因序列推导的分子量为 76467D,二者非常吻合。可见不同来源 PEP 的分子量大致相同,都在 75~78kD 之间^[4]。对 apPEP 的 N 端 10 个氨基酸序列测定的结果为 S-G-K-A-R-L-H-Y-P-V,与基因序列

推测的氨基酸顺序一致,证实了纯化产物为 apPEP 基因正确表达的脯氨酰内肽酶。

2.3.3 apPEP 等电点的测定 等电点测定的结果见图 5, pI = 6.0。这比较接近 *Aeromonas hydrophila* 来源的 PEP (pI = 5.5)^[5]。

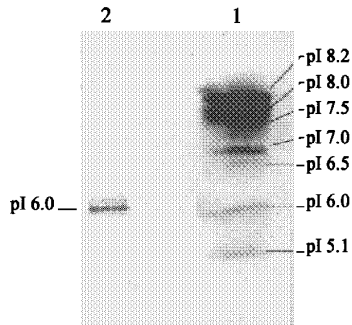


图 5 apPEP 的等电点 (IFE) 鉴定

Fig. 5 Isoelectric focusing analysis of apPEP

1. Standard protein ; 2. ap PEP

相比 *Aeromonas hydrophila* 来源 PEP 的纯化研究^[5], 本文采用的下游工艺, 发酵和纯化工艺效率高, 操作简便, 各步骤间衔接合理, 尽量采用了高流速的 FF 型和高效的 High performance 型介质, 过程中避免采用耗时步骤, 这对于易失活、易降解的蛋白酶制备极为有利, 适合该酶的大规模生产。

由于在脯氨酸位点的催化专一性, PEP 在肽类激素生产及合成工业中也显示了诱人的应用前景。其特异性的水解反应为多肽的加工修饰和基因工程生产提供了一条新途径, 利用其逆反应可以合成十几种活性多肽, 其中催产素和促黄体生成素释放激素的产率分别达到 67% 和 55%, 而且没有副反应^[12]。它的大量制备不仅有助于其特殊催化机制的深入研究, 也为其在多肽工业和医药治疗中的应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Walter R, Simmons W H, Yoshimoto T *et al.* *Mol Biochem*, 1980, **30**(2): 111~117
- [2] Yaron A, Naider F. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1993, **28**(1): 31~81
- [3] Mantle D, Falkuus C, Ishiura S *et al.* *Clin Chim Acta*, 1996, **249**(1-2): 129~139
- [4] Shinoda M, Matsuo A, Toide K. *Eur J Pharmacol*, 1996, **305**(1-3): 31~38
- [5] Kanatani A, Yoshimoto T, Kitazono A *et al.* *J Biochem*, 1993, **113**: 790~796
- [6] Chevallier S, Goeltz P, Thibault P *et al.* *J Bio Chem*, 1991, **267**(12): 8192~8199
- [7] Yoshimoto T, Sattar A, Hirose W *et al.* *J Biochem*, 1988, **104**: 622~627
- [8] Shirasawa Y, Osawa T, Hirashima. *J Biochem*, 1994, **115**: 724~729
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (2nd ed). Cold Spring Laboratory Press, New York, 1989
- [10] 李 民, 陈常庆, 朴 勤等, *生物工程学报*, 1998, **14**(3): 270~276
- [11] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1987, **72**: 248~254
- [12] Inaka T, Kokubo T, Tsuru D *et al.* European Patent, 92810537.8, 1992

Purification and Characterization of Recombinant *Aeromonas punctata* Prolyl Endopeptidase

LI Min¹ CHEN Chang-Qing¹ WANG De-Bao²

¹(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

²(Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract The study of down-stream techniques of recombinant *Aeromonas punctata* prolyl endopeptidase (apPEP) was presented here. High cell-density fermentation of *E. coli* BL21/pKKH-PEP in NBS BioFlo 3000 5L fermentor was achieved, the final cell density was 22.5g (DCW) /L after 14h cultivation, the yield of apPEP expressed in soluble protein was 3.0g per liter broth. After sonication, the supernatant of free cell extract was purified by ammonium sulfate fractionation, High performance Q sepharose FF, Phenyl sepharose 6 FF, the purity of apPEP reached 96%, enzyme specific activity was 65.5u/mg, apPEP yield reached 0.86g/L broth. Total recovery of enzyme protein was 8.2%, activity recovery was 24.4%. The molecular weight of apPEP was 76464 ± 30Da measured by MS, N terminus amino acids sequence consistent with that deduced from DNA sequence. pI 6.0, which was similar with PEP from *Aeromonas hydrophila*.

Key words Prolyl endopeptidase, high cell-density fermentation, purification, specific activity, characterization