

N-糖酰胺酶 F 在大肠杆菌中的高效表达及其脱糖基化作用研究 High Level Expression of PNGase F in *Escherichia coli* and its Bioactivities

苏移山,王圣钧,王 鹏,祁庆生*

SU Yi-Shan, WANG Sheng-Jun, WANG Peng and QI Qing-Sheng*

山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

Life Science School, Shandong University, Jinan 250100, China

摘 要 从脑膜炎脓杆菌(*Flavobacterium meningosepticum*)基因组中通过 PCR 扩增了 N-糖酰胺酶 F(PNGase F)基因,经酶切后与表达载体 pET28a 连接,获得的重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)。重组大肠杆菌经诱导表达和纯化提取后,获取大量高纯度 N-糖酰胺酶 F,其纯度达 90% 以上。试验证明,经纯化的重组 N-糖酰胺酶 F 可以切除核糖核酸酶 B、转铁蛋白和人 IgG 等糖蛋白上的 N-糖链,具有脱糖基化作用。

关键词 N-糖酰胺酶 F, pET28a, RNase B, 脱糖基化

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0911-05

Abstract In order to obtain active recombinant PNGase F in *Escherichia coli*, a prokaryotic expression vector pET28a/PNGase F was constructed. Amplification of PNGase F was obtained using PCR technique employing suitable primers designed according to the PNGase F gene sequence from *Flavobacterium meningosepticum*. The expression of PNGase F gene in LB medium or M9 medium led to the formation of inclusion body and soluble protein, respectively. The refolding of the denatured inclusion body was successful by gradual dilution. Further purification of the refolded protein and soluble crude extract from M9 medium with Ni²⁺-NTA argarose resulted a 90% purified PNGase F. The purified protein catalyzed the complete and intact cleavage of N-linked oligosaccharides from various glycoproteins. The efficiency of this cleavage was affected by the substrate status in the reaction system. In summary, we have developed an enzyme production system where PNGase F was over-expressed in recombinant *E. coli*. This system can provide more than 15mg/L purified active PNGase F. This purified active PNGase F can be used as tools in analyzing the oligosaccharide structure.

Key words PNGase F, pET28a, RNase B, deglycosylation

N-糖酰胺酶 F(系统命名:Peptide-N-(N-acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase F, EC 3.5.1.52;通常称 PNGase F or glycoamidase)主要存在于革兰氏阴性菌及一些真核生物的细胞内^[1],能够专一性的断

裂糖链和蛋白之间的酰胺键,生成一个完整的糖链和蛋白质,并将蛋白质上的天冬酰胺转化为天冬氨酸^[2](图 1)。来自于脑膜炎脓杆菌的(*F. meningosepticum*)N-糖酰胺酶 F 基因的阅读框中含有

Received: June 16, 2005; Accepted: August 31, 2005.

This work was supported by a grant from The National Science Foundation of China(No. 30470399).

* Corresponding author: Tel: 86-531-8365628; Fax: 86-531-8565610; E-mail: ziqingsheng@sdu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30470399)

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

1062 个碱基。编码一个 354 个氨基酸的蛋白质。前面的 40 个氨基酸推测为信号肽, 剩余的 314 个氨基酸为一分子量为 34.779kD 的蛋白^[3]。由于 N-糖酰胺酶 F 能够从糖肽和糖蛋白上面完整切下 N-连接的寡糖链(N-糖苷), 将蛋白和糖链完全分开, 这对于进行细胞表面糖结构-功能的分析、糖链对糖蛋白功能的影响和糖链结构的分析和研究具有重要意义。N-糖酰胺酶 F 对所有类型的 N-连接的糖蛋白都有作用^[4], 这些特性使它成为糖生物学研究中广泛应用的工具酶。

从脑膜炎脓杆菌中提取 N-糖酰胺酶 F 是一个十分耗资和耗时的的工作, 步骤繁琐, 产率低, 每升发酵液只能获得 0.1 到 0.5mg N-糖酰胺酶 F^[5], 而且脑膜炎脓杆菌为病原菌不适合大规模发酵。这些因素极大的限制了 N-糖酰胺酶 F 的广泛应用。为了获得一个高效异源蛋白的表达体系, 在本研究中将 N-糖酰胺酶 F 基因从脑膜炎脓杆菌中克隆到 pET28a 载体上, 并诱导大肠杆菌表达获得大量重组 N-糖酰胺酶 F。

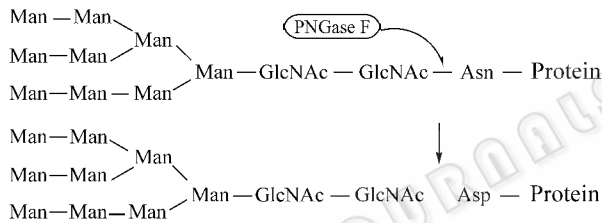


图 1 N-糖酰胺酶 F 的酶切位点

Fig. 1 Cleavage site of PNGase F on glycoprotein

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

脑膜炎脓杆菌 ATCC 33958(购自 ATCC), 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3), 载体 pET28a 由本实验室保藏。

1.2 培养基

LB 培养基(1% 蛋白胨、0.5% 酵母膏、1% NaCl) 用于细菌培养, 卡那霉素终浓度为 20 μ g/mL。

1.3 酶和化学试剂

限制酶、T4DNA 连接酶、DNA 分子量 Marker、IPTG、基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒均为 TaKaRa 公司产品, dNTP、TaqDNA 聚合酶购自上海博亚生物技术有限公司, 小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, 核糖核酸酶 B、人 IgG、转铁蛋白购自 Sigma 生物公司, 其他常规试剂均为国产或进口分装, 序列测定由上海博亚生

物技术有限公司完成。

1.4 N-糖酰胺酶 F 基因的克隆

接新鲜脑膜炎脓杆菌单菌落于 3mL LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C, 250r/min 振荡培养 12h, 用基因组提取试剂盒(购自上海生工公司) 抽提得脑膜炎脓杆菌 DNA。

根据文献提供的脑膜炎脓杆菌 N-糖酰胺酶 F 基因^[6]的 DNA 序列设计并合成引物, 为方便后续的克隆, 分别在 3'端和 5'端引入了 *Nco* I、*Xho* I 酶切位点。

5'端引物 PNGase1 :

5'ATCCATGGATGGCTCCGGCAGATAATACGG 3' ,

3'端引物 PNGase2 :

5'AACTCTCGAGGTTTGTAATACTACCGGAGCAC 3'。

以基因组 DNA 为模板, PNGase1, PNGase2 为引物 PCR 扩增, 获得 942bp DNA 片段。PCR 扩增条件: 50 μ L 反应体系中, 10 \times PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 3 μ L, dNTP (25mmol/L) 1 μ L, 引物 1、2 (20pmol/L) 各 1 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 在 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后按如下参数循环 28 次: 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 扩增产物经 *Nco* I、*Xho* I 酶切回收后与同样双酶切处理的表达载体 pET28a 连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性转化子, 经酶切和测序验证。

1.5 N-糖酰胺酶 F 的表达

将 pET28a/PNGase F 表达质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌, 挑取单菌落接种于 3mL LB 或 M9 培养基(含卡那霉素 20 μ g/mL) 中, 200r/min 在 37 $^{\circ}$ C 中振荡培养过夜, 以 1:100 转接到 50mL LB 培养基和 M9 培养基中培养到 OD = 0.7, 加入 IPTG (终浓度为 1.0 mmol/L) 200r/min 在 37 $^{\circ}$ C 中振荡培养诱导表达。

1.6 N-糖酰胺酶 F 包涵体的分离和纯化

2.0g 诱导表达后的菌体沉淀重悬于 15mL 裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 ; 0.05mol NaCl, 0.5mmol EDTA) 中, 加入 50mmol/L PMSF 10 μ L, 加溶菌酶至终浓度 0.1mg/mL, 室温放置 30min。冰浴间歇超声波破菌后 13000g、4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 收集包涵体沉淀, 分别用缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100 (V/V), 4mol/L 尿素) B (50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 3% Triton X-100) C (50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, 2mol/L 盐酸胍) 洗涤包涵体。

1.7 包涵体的变性及复性

用 5mL 含 6 mol/L 盐酸胍, 10mmol/L β -巯基乙醇, 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 2mmol/L EDTA 及脱氧胆酸钠缓冲液充分溶解包涵体沉淀, 13000g, 4℃ 离心 30min, 收集包涵体溶解上清液。快速加入稀释复性液中(50mmol/L HEPES pH7.5, 0.2mol/L NaCl, 1mmol/L DTT), 10℃ 搅拌 2h, 透析后 Ni 柱纯化。

1.8 可溶性表达产物的提取

将经 IPTG 诱导表达 10h 后的 50mL M9 培养物 4000r/min \times 10min 离心收集菌体, 用 PBS 重悬洗涤, 再用 5mL 溶菌酶液(含 1mg/mL 溶菌酶、20% W/V 蔗糖、30mmol/L Tris-HCl, pH8.0 和 1mmol/L EDTA), 冰浴 10min, 在 4℃ 条件下 12000g \times 30min 离心, 上清液即为分泌至细胞周质空间中的表达产物粗提物。

1.9 亲和层析纯化 N-糖酰胺酶 F

将 M9 表达产物粗提物或复性蛋白分别上样, 用 6 个柱床体积的缓冲液(50mmol/L 磷酸钠, 20mmol/L 咪唑, 0.5mol/L 氯化钠, pH 8.0)清洗; 用 6 个柱床体积的缓冲液(50mmol/L 磷酸钠, 250mmol/L 咪唑, 0.3mol/L 氯化钠, pH 8.0)洗脱目的蛋白; 收集液进行 SDS-PAGE 分析。

1.10 N-糖酰胺酶 F 的脱糖基化作用

称取核糖核酸酶 B、转铁蛋白和人 IgG 各 10mg 溶于 1mL 乙酸盐缓冲液中(0.1mmol/L 乙酸钠, 0.1% SDS pH8.5), 100℃ 水浴 10min, 取 100 μ L 加入 10 μ L 经 Ni 柱纯化的酶液, 37℃ 水浴 12h。SDS-PAGE 分析酶活。以将 10 μ g RNaseB 在 10 μ L 体系中 37℃ 反应 1h 95% 以上脱糖基化所需要的酶量定义为一个单位。

2 结果

2.1 pET28a/PNGase F 质粒的构建及鉴定

从脑膜炎杆菌中提取基因组, 以基因组为模板利用 PCR 获得 N-糖酰胺酶 F 基因, 双酶切处理后与 pET28a 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。DNA 测序结果表明, PCR 扩增与预期结果一致, 得到一段不含信号肽序列的 945bp 基因片段(图 2)。

2.2 N-糖酰胺酶 F 的表达

测序鉴定正确的 pET28a/PNGase F 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 LB 培养基中经 IPTG 诱导表达, 产物经 SDS-PAGE 分析得到大小为 34kD 的蛋白质(图 3a)。菌体经超声波破碎离心后, 发现目的蛋白为包涵体, 蛋白质含量达 30%。破菌离心后收集包涵体沉淀, 经缓冲液 A、B、C 洗涤后, 用 6mol/L 盐

酸胍溶解包涵体沉淀, 离心收集上清, 即可获得包涵体溶解液, 经一步稀释法获得复性后的 N-糖酰胺酶 F。其蛋白纯度达 80% 以上。

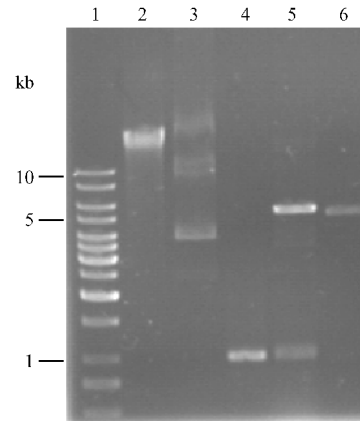


图 2 琼脂糖电泳显示质粒构建过程

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of the products obtained during the construction of the expression plasmid pET28a/PNGase F

1 :DNA Marker ; 2 :genomic DNA from *F. meningosepticum* ; 3 :pET28a vector ; 4 :PCR product of PNGase F gene ; 5 :digestion of pET28a/PNGase F by restriction enzyme ; 6 :pET28a vector restricted with *Xho* I .

为进一步简化步骤, 重组大肠杆菌 BL21(DE3) 在 M9 培养基中经 10h 诱导表达后, 经检测得到可溶性目的蛋白。总目的蛋白含量少于在 LB 培养基中的表达量(图 3b)。

2.3 N-糖酰胺酶 F 的纯化

大肠杆菌 BL21(DE3) 高效表达的 pET28a/PNGase F 目的蛋白含有 His₆-tag, 能够专一性的与 Ni 离子结合。将复性的包涵体蛋白或可溶性目的蛋白粗提取物经亲和层析纯化得到纯度达 90% 以上的 N-糖酰胺酶 F 蛋白(图 3a、b)。

2.4 N-糖酰胺酶 F 的脱糖基化作用

为验证重组糖酰胺酶的活性和底物范围, 以含有一个高甘露糖型的寡糖链糖蛋白核糖核酸酶 B; 含有一个杂合型的寡糖链糖蛋白人 IgG 重链和含有三个复杂性的糖链糖蛋白转铁蛋白分别作为底物, 对重组 N-糖酰胺酶 F 底物专一性进行测定。SDS-PAGE 电泳分析发现与对照相比, 经 N-糖酰胺酶 F 作用的核糖核酸酶 B、转铁蛋白和人 IgG 重链分子量减小, 说明已经被 N-糖酰胺酶 F 切除糖链(图 4)。试验证明 N-糖酰胺酶 F 对三种类型糖蛋白都有活性, 这个结果与报道的 N-糖酰胺酶 F 对高甘露糖型、杂合型、复杂性糖蛋白上的糖链都有活性相一致。

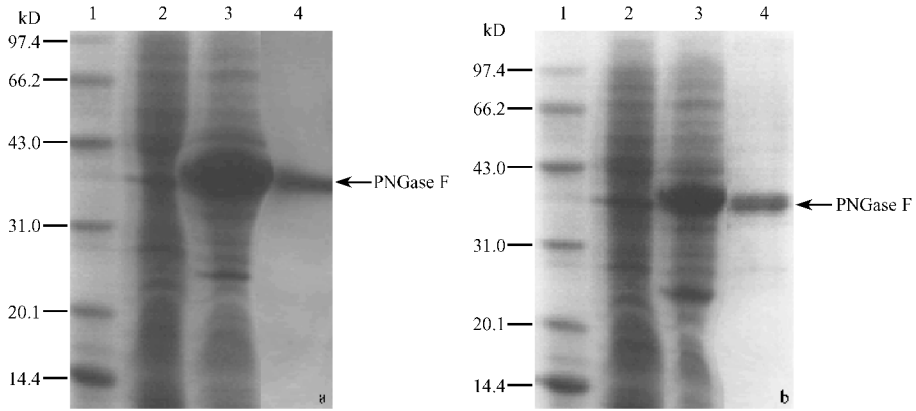


图3 N-糖酰胺酶 F 的表达及纯化

Fig. 3 Expression and purification of PNGase F

a. expression of PNGase F in LB medium. 1: protein molecular marker; 2: cell lysate of *E. coli* BL21(DE3); 3: cell lysate of *E. coli* BL21(DE3, pET28a/PNGase F); 4: refolded and purified PNGase F from inclusion bodies; b: expression of PNGase F in M9 medium. 1: protein molecular marker; 2: cell lysate of *E. coli* BL21(DE3); 3: cell lysate of *E. coli* BL21(DE3, pET28a/PNGase F); 4: purified PNGase F from cell lysate of *E. coli* BL21(DE3, pET28a/PNGase F).

以核糖核酸酶 B 为底物研究 N-糖酰胺酶 F 在不同条件下的脱糖基化作用发现:底物的折叠对 N-糖酰胺酶 F 的活性有一定的影响,在相同酶切条件下酶切 12h,热变性的核糖核酸酶 B 几乎全部发生脱糖基化,而未热变性的核糖核酸酶 B 只有一半发生了脱糖基化。而 SDS 对 N-糖酰胺酶 F 的酶活并没有太大影响,SDS 作用是加速目的蛋白的变性。

力为 200 000 单位/mg。

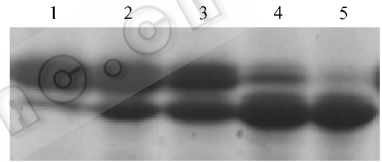


图5 N-糖酰胺酶 F 的脱糖基化作用酶活测定

Fig. 5 The activity assay of Deglycosylation by PNGase F. 1:RNase B; 2:RNase B treated with 1 μ L PNGase F; 3:RNase B treated with 2 μ L PNGase F; 4:RNase B treated with 5 μ L PNGase F; 5:RNase B treated with 10 μ L PNGase F.

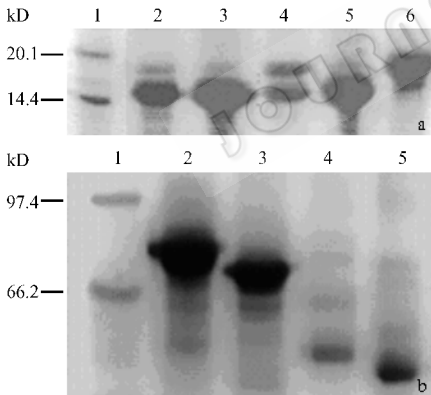


图4 N-糖酰胺酶 F 的脱糖基化作用

Fig. 4 Deglycosylation of glycoprotein by PNGase F

a. 1:protein molecular marker; 2: heat and SDS denatured RNase B treated with PNGase F; 3, 5: heat denatured RNase B treated with PNGase F; 4: native RNase B treated with PNGase F; 6: RNase B. b. 1:protein molecular marker; 2: transferrin; 3: transferrin treated with PNGase F; 4: human IgG; 5: human IgG treated with PNGase F.

2.5 N-糖酰胺酶 F 的酶活单位的测定

为了确定所得到的可溶性 N-糖酰胺酶 F 的酶活单位,将 N-糖酰胺酶 F 配成 0.05mg/mL 的酶溶液,在 50 μ L 含有 50 μ g 核糖核酸酶 B 的溶液中分别加入不同量的酶液,37 $^{\circ}$ C 反应 1h。由图 5 可见,加入 5 μ L 以上的酶液后,95% 以上的底物可以被脱糖基化,由此得出所得到的可溶性 N-糖酰胺酶 F 的比活

3 讨论

在我们的研究中,利用 PCR 技术从脑膜炎脓杆菌 ATCC 33958 中克隆出 N-糖酰胺酶 F 基因,序列比对与 Trevor Loo 等人从脑膜炎脓杆菌(另一个菌株)中克隆的 N-糖酰胺酶 F 相差一个氨基酸^[7]。在大肠杆菌高效表达后,获得 C 末端带有 His₆ 的融合蛋白,不论是包涵体复性后的蛋白还是在细胞间隙中表达的可溶性蛋白利用 Ni-NTA 亲和层析都得可纯度 90% 以上的重组 N-糖酰胺酶 F。比较以上两种表达纯化方法发现:重组 N-糖酰胺酶 F 在 LB 培养基表达量要高于在 M9 培养基,但是包涵体的处理过程中可溶性重组 N-糖酰胺酶 F 的得率不高,可达 10 mg/L。而且,包涵体的变性、复性处理过程比较麻烦,条件难于控制。在改进的 M9 培养基中表达量不高,发酵周期长,但是后提取、纯化简单,重组 N-糖酰胺酶 F 得率高,可达 15 mg/L。高于 2001 年, Trevor Loo 等人用 pBluescript SK⁺ 载体表达的来源于脑膜炎脓杆菌的 PNGase F 8mg/L 的表达量^[7]。

糖酰胺酶 F 脱糖基化的影响。热变性的蛋白容易被 N-糖酰胺酶 F 脱糖基化^[2],变性的核糖核酸酶 B 容易和 N-糖酰胺酶 F 的催化位点发生作用,而天然糖蛋白三维结构阻挡了 N-糖酰胺酶 F 与底物的作用,减缓了酶反应速度。而添加 SDS 对 N-糖酰胺酶 F 可以加快变性的速度,在一定范围内(0.1%)对糖酰胺酶 F 酶活几乎没有影响(图 4a)。

目前,糖生物学及糖工程研究已成为继基因工程、蛋白质工程之后的第三大生物工程,是当今最前沿的生物学科之一。糖链一般与其它大分子形成复合物,如糖蛋白。这对糖链的研究造成一定的困难,所以必须将糖链和蛋白分开,这样 N-糖酰胺酶 F 在糖链的研究中显得越来越重要,本研究在国内首次获得纯化重组 N-糖酰胺酶 F,与国际上报道的重组 N-糖酰胺酶 F 序列不同,脱糖基化研究证明可以对所有三种糖蛋白起作用,对国内糖生物学的研究具有重要应用和意义。

REFERENCES (参考文献)

[1] Plummer TH Jr, Elder JH, Phelan AW *et al.* Demonstration of peptide N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase

F preparation. *J Biol Chem*, 1984, **259**:10700 - 10704

[2] Chu FK. Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F. *J Biol Chem*, 1986, **261**:172 - 177

[3] Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH Jr. Deglycosylation of asparagines-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry*, 1985, **24**:4665 - 4671

[4] Tretter V, Altmann F, Marz L. Peptide-N4(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl) asparagine amidase F can not release glycans with fucose attached $\alpha 1 \rightarrow 3$ to the asparagines-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem*, 1991, **199**:647 - 656

[5] Norris GE, Flaus AJ, Moore CH *et al.* Purification and crystallization of the endoglycosidase PNGase F, a peptide: N-glycosidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *J Mol Biol*, 1994 **241**:624 - 626

[6] Barsomaian GD, Johnson TL, Borowski M *et al.* Cloning and expression of peptide-N4(N-acetyl-beta-D- glucosaminyl) asparagine amidase F in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1990, **265**:6967 - 6972

[7] Trevor L, Mark L, Shaun IJ *et al.* Using secretion to solve a solubility problem: high-yield expression in *Escherichia coli* and purification of the bacterial glycoamidase PNGase F. *Protein Expression and Purification*, 2002, **24**:90 - 98

细菌探测技术研究进展

如何快捷地知晓某环境或某载体带有病菌呢?细菌探测器或细菌检测技术的研发有重要价值,特别是那些快速灵敏的“细菌探测器”或技术尤为重要。近几年在这方面的研究取得了一些成果。(1)自动监测装置监测芽孢。芽孢杆菌的芽孢在极其恶劣的环境里亦可生存,适应性强。这种装置盛有溶液,在微波作用下致病菌芽孢会释放独有的吡啶二羧酸化学物质,再置于溶液化学传感器中产生反应,引发强烈的绿色荧光,以此判断某环境里是否有芽孢的存在,芽孢数量越高,荧光反应将越强。当芽孢含量达到一定程度时,监测装置会自动报警。用炭疽芽孢菌(*Bacillus anthracis*)、枯草芽孢菌(*Bacillus subtilis*)做实验进行检测,15min内检测到空气中有芽孢的存在,这表明某大气环境里受到芽孢杆菌的污染,应提高警惕。在美国,航空航天局研究人员研制的细菌探测器也获得类似结果。此细菌探测器也使用一种发光物质,称为发光剂。若空气中有芽孢存在,并达到一定浓度时,探测器的发光剂会发出微光,随着芽孢数量增多、浓度增大,发出的光亮越强,这表明大气中受到细菌污染。因此,人们希望将此探测器用于太空探测任务(生存于恶劣环境中多年的芽孢)。同时,这种探测器还可用于防范生物恐怖。(2)一种检测细菌的新探测方法。这是在美国工作的我国研究者及其同事发明的。他们研制一种新合成的生物纳米材料,称之为“生物合成纳米颗粒”,利用它能迅速探测潜伏在肉类食品中的大肠杆菌,有利于用作疾病的早期诊断,只用20min即可检测出细菌。这种合成的纳米颗粒含有许多荧光染色分子、抗体,一旦遇上细菌就会产生很强的光信号,从而证实病菌的存在。这种“生物合成的纳米颗粒”很有实用价值:①能检测到致病菌如非芽孢的沙门氏菌、具有芽孢的仙人掌芽孢杆菌等;②可检测到食品中的有毒物质及污染的病菌等;③这种超灵敏“颗粒”可用于生物反恐;④用于疾病的早期诊断。应该说,这项新技术研制成功是生物学与纳米技术真正融合的产物。总之,新研制的细菌探测器有着广泛的实用价值,关键在于这项新技术在实际应用中的准确性、稳定性和特效性。这种新的细菌探测技术对探测芽孢杆菌和非芽孢杆菌等病原菌有很强的实用性,然而,针对那些非细胞形态的致病因子和那些非生长培养致病生命体的快捷检测工具仍需要从多方面努力探究和开发。对那些传布的流行病原体若能真正做到准确地、“有的放矢”地把它们检测出来,无疑将为保护人类生命安全服务做出重要的贡献,这也是新时代生命科学工作者的要务之一。

(柯 为)