

α -天冬氨酰二肽酶基因的高表达和产物回收

张红缨 杨 巍 王晓萍 张 今

(吉林大学酶工程国家重点实验室 长春 130023)

摘 要 构建了 α -天冬氨酰二肽酶基因 (pepE) 与载体 pBV220 连接的高表达重组质粒 (pBVPEP, 4337bp)。转化大肠杆菌后, 目的基因表达为两种形式的产物, 即细胞质中可溶性蛋白 (~75%) 和包含体蛋白, 共占细菌总蛋白的 30% 左右。SDS-PAGE 分析温敏诱导的表达蛋白, 可以观察到约 27kDa 的高表达蛋白条带, 与提纯的酶带一致。用不同于以往的萃取包含体蛋白的方法, 回收了包含体中 95% 以上的表达蛋白。

关键词 α -天冬氨酰二肽酶, 工程菌, 包含体

学科分类号 Q789

α -天冬氨酰二肽酶 (α -aspartyl dipeptidase) 高度专一地水解由 L-天冬氨酸 (L-Asp) 的 α -羧基所形成的肽键^[1], 对 N 端或 C 端带保护基的二肽和不带保护基的三肽及寡肽 (大于三肽) 均没有水解活性, 对 N 端由 L-Asp 的 β -羧基和其它氨基酸的氨基形成的二肽也无水解活性^[2]。

该酶的基因已被克隆和测序^[3], 其开放阅读框架为 687bp, 受 CRP (Cyclic AMP receptor protein)-cAMP 调控。酶蛋白是由 229 个氨基酸残基组成的单亚基, 理论分子量为 24.8kDa, 分子内只有一个半胱氨酸。该酶不被丝氨酸蛋白酶的专一性修饰剂失活, 不被金属络合物钝化, 其中半胱氨酸被氯化汞修饰而酶不失活等实验结果证明, 它似乎不属于任何一种现已划分的四类蛋白酶。

当今世界主要的二肽甜味剂 Aspartame 和 Alitame 都是 N 端为 L-Asp 的二肽脂化物和酰氨化物。目前, 利用 α -天冬氨酰二肽酶等酶的专一性水解反应的逆反应, 合成这两种甜味剂是国际上主攻焦点之一。国内该领域仍是空白。为填补这一空白, 我们将 α -天冬氨酰二肽酶基因重组在高表达质粒 pBV220 中, 探索了从包含体中回收目的蛋白的最适条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *S. typhimurium* TN2401 [LeuCD485 pepN90 pepA16 pepB11 supQ302 (Δ proB pepD) pepP pepQ1 pepT1 pepE1] 美国 Illinois 大学 Miller 教授赠送, 其中 pJG29 质粒载有 pepE 基因。质粒 pBV220 由中国人民解放军军事医学科学院放射医学

国家科委科技专项项目资金资助。

收稿日期: 1997-04-03, 修回日期: 1997-09-02。

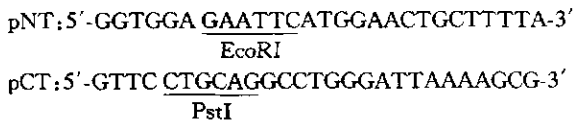
研究所惠赠。受体菌大肠杆菌 DH5 α 为本室保存。

1.1.2 酶和化学试剂: 限制酶 BamHI、PstI、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶、 λ DNA/Hind III、氨苄青霉素购自华美生物工程公司。Taq DNA 聚合酶购自英国 Amersham 公司。蛋白质分子量标准购自美国 Sigma 公司, L-天冬氨酰对硝基苯胺购自 Bachem Feinchemikalien 公司, 丙烯酰胺及亚甲基双丙烯酰胺购自西德 Merck 公司, 十二烷基磺酸钠 (SDS) 购自美国 Bio-Rad 公司, 低熔点琼脂糖购自美国 BRL 公司, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自美国 Serva 公司, Sephacryl S-200HR 购自 Pharmacia 公司。

其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增、基因重组操作: 用于 PCR 反应的两个引物是 pNT(上游引物)和 pCT(下游引物):



引物由中国科学院上海细胞研究所合成。上游引物保证目的基因的起始密码与载体的 SD 序列之间保持 5 个核苷酸距离。

PCR 和基因重组操作参照“分子克隆手册”^[4]进行。

1.2.2 菌体培养与破碎: 将所获阳性克隆菌于 30 $^{\circ}$ C 生长过夜, 按 1% 接种量接在含氨苄青霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6, 迅速转至 42 $^{\circ}$ C 升温诱导培养 5h, 然后于 4 $^{\circ}$ C、4000r/min 离心 20min 收集菌体。用缓冲液 A [30mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5mmol/L EDTA, 30mmol/L NaCl, 10mmol/L DTT] 洗菌体一次, 重新悬浮于 4 倍体积的缓冲液 A 中, 高压匀浆 4 次, 取破碎液进行以下实验。

1.2.3 包含体中目的蛋白的萃取: 将破碎液于 4 $^{\circ}$ C、6 000r/min 离心 20min, 保留上清, 沉淀溶于缓冲液 B [30mmol/L Gly-NaOH (pH 10), 5 mmol/L EDTA, 30 mmol/L NaCl, 10mmol/L DTT, 0.6% Triton X-100]。在 40 $^{\circ}$ C 保温 20min, 于 4 $^{\circ}$ C、10 000r/min 离心 20min, 保留上清, 用缓冲液 B 重复处理沉淀一次, 分别取二次获得的上清与最后获得的沉淀走 SDS-PAGE 电泳, 同时以细胞总蛋白为对照。

1.2.4 酶的提纯和 SDS-PAGE 电泳: 酶的提纯按文献 [1] 进行。SDS-PAGE 参照文献 [5] 的方法。分离胶浓度 13.5%, 浓缩胶浓度 5%。电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后用薄层扫描定量。

1.2.5 酶活性分析^[6]: L-天冬氨酰对硝基苯胺溶于 50mmol/L 咪唑 (pH 7.2) 中, 配成 0.77mmol/L 的标准反应液, 温育至 25 $^{\circ}$ C, 加 10 μ l 酶液于 0.8ml 上述底物溶液中, 混匀并以岛津 UV-250 连续检测 A₄₀₅, 所得曲线的斜率代表了水解反应的相对速率。酶活力定义: 25 $^{\circ}$ C 每分钟催化形成 1 μ mol 对硝基苯胺所需要的酶量为一个酶活力单位。

1.2.6 酶的圆二色谱: 圆二色谱测定在日本 J500C 圆二色谱仪上进行。仪器灵敏度为 5 $^{\circ}$ /cm, 扫描范围在 200~300nm, 样品池光径为 1cm。样品浓度为 0.20mg/ml。

2 结果

2.1 高表达重组质粒的构建与产物表达

为实现酶法合成强力二肽甜味剂 Alitame, 首先应具有好的工程菌。由于 *S. typhimurium* TN2401(含 pJG29)中, α -天冬氨酰二肽酶的表达量不高(约占细胞可溶性蛋白 1.5%, 细胞不存在包含体), 故设法提高其表达量势在必行。我们利用 PCR 反应, 将 α -天冬氨酰二肽酶基因从 pJG29 扩增出来, 重组在 pBV220 的 EcoRI 和 PstI 位点, 获得了数十个阳性转化菌落, 随机选取 10 个提取重组质粒, 进行酶切图谱鉴定和 SDS-PAGE 分析。阳性克隆之一的鉴定结果(图 1、2)显示目的蛋白的表达量明显高于原有菌株, 约是其 20 倍(表 1), 表达蛋白占细胞总蛋白的 30%(图 2)。其中约有 75% 是可溶性的, 25% 为不溶的包含体形式(图 3), 这是较为罕见的现象。通常重组蛋白的表达或全部为可溶的, 或是绝大部分(90% 左右)参与构成包含体。

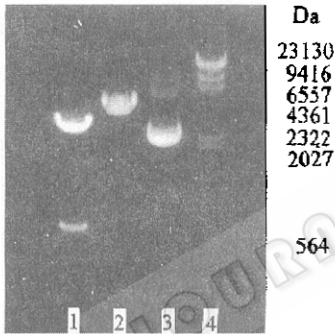


图 1 重组质粒 pBVPEP 的限制酶谱

Fig. 1 Restriction endonuclease map analysis of the recombinant plasmid pBVPEP

1. Digested by EcoRI/PstI; 2. Digested by EcoRI; 3. The plasmid pBVPEP; 4. Marker(λ DNA/HindIII)

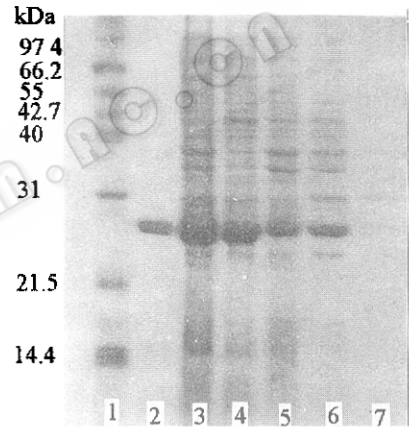


图 2 含 pBVPEP 的工程菌中表达产物的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed products in *E. coli* DH5 α harboring plasmid pBVPEP.

1. Marker; 2. The purified enzyme; 3. The cell extract; 4. Supernatant; 5. Pellet; 6. First treatment of inclusion bodies; 7. Second treatment of inclusion bodies;

表 1 工程菌和鼠伤寒沙门氏菌 TN2401 的 α -天冬氨酰二肽酶活力

Table 1 The activities of α -aspartyl dipeptidase from the engineered *E. coli* strain and *S. typhimurium* TN2401

	Supernatant of cell extract	First treatment	Second treatment	Total α -aspartyl dipeptidase	<i>S. typhi- murium</i>
Activity(u) *	1825.3	529.1	67.9	2422.3	104.7

* ; The data in this table were from 1 ml culture.

2.2 Triton X-100 浓度对萃取的影响

基因工程的最终目的是获得高表达有活性蛋白,故萃取包含体中目的蛋白极为重要。用 0~1% 不同浓度的 Triton X-100 缓冲液 (pH 10.0), 40℃ 处理细胞破碎后的离心沉淀物 20min, 取第一次处理液上清测酶活性。由 Triton X-100 浓度-酶活曲线 (图 4A) 可见, 0.6% 的 Triton X-100 浓度最佳。

此包含体经 Triton X-100 处理一次, 即可萃取包含体中 90% 的目的蛋白, 处理两次, 则几乎获得全部的目的蛋白 (图 2)。

2.3 离子强度对萃取的影响

图 4B 给出离子强度对萃取包含体中 α -天冬氨酰二肽酶的影响。可见, 离子强度低于 30mmol/L 时, 获得的活性目的蛋白含量随离子强度的升高而升高, 在 30mmol/L 时, 呈现了最佳的萃取和复性效果, 随后下降。

2.4 pH 对萃取的影响

配制 pH 从 7.0~10.5 的缓冲液 B, 其中 pH7.0~8.5 以 30mmol/L Tris-HCl 为缓冲系统; pH9.0~10.5 以 30 mmol/L Gly-NaOH 为缓冲系统。从 pH-酶活曲线 (图 4C) 清晰可见, 随着缓冲体系的 pH 值升高, 从包含体得到的有活性的目的蛋白越多, 在 pH10~10.5 最佳, 达 90% 左右。

2.5 温度对萃取的影响

萃取温度-酶活曲线 (图 4D) 表明, 在 0~40℃, 酶活力随温度的升高而升高, 40℃ 时达到最高值, 随后酶活性下降。这说明在 40℃, 获得了最佳萃取效果。超过 40℃, 由于体系热运动加强, 分子中疏水基团暴露于溶剂, 体系熵增加, 又导致蛋白分子的变性。



图 3 工程菌的电镜照片 ($\times 30\ 000$), 其菌体中黑团为含 pepE 蛋白的包含体

Fig.3 Electron microscopic appearance of the inclusion bodies containing pepE proteins expressed in engineered *E. coli* strain ($\times 30\ 000$)

3 讨 论

工程菌中目的蛋白的表达量受控于转录和翻译两个环节。采用 pBV220 载体 (具有强的温控型串连启动子 $P_{R}P_{L}$)^[7], 同时保持 SD 序列与目的蛋白起始密码 ATG 的距离为 5 个核苷酸, 获得了满意的工程菌, 只是一部分表达产物形成了包含体。

本实验中十分有趣的是, 利用温和的处理条件 (低浓度温和表面活性剂、碱性条件、低离子强度、40℃ 和短的处理时间), 便能从包含体中萃取出绝大部分有活性的目的蛋白, 这有别于已报道的其它包含体的处理 (利用盐酸胍或尿素等变性后再复性)。

从酶的 CD 谱 (图 5) 得知, 该酶分子具有较多的 β 折叠结构, α -螺旋仅占 10% 左右, 这意味它的空间结构较松散, 加之该酶是小分子量单体蛋白, 其折叠途径较为简单, 这些

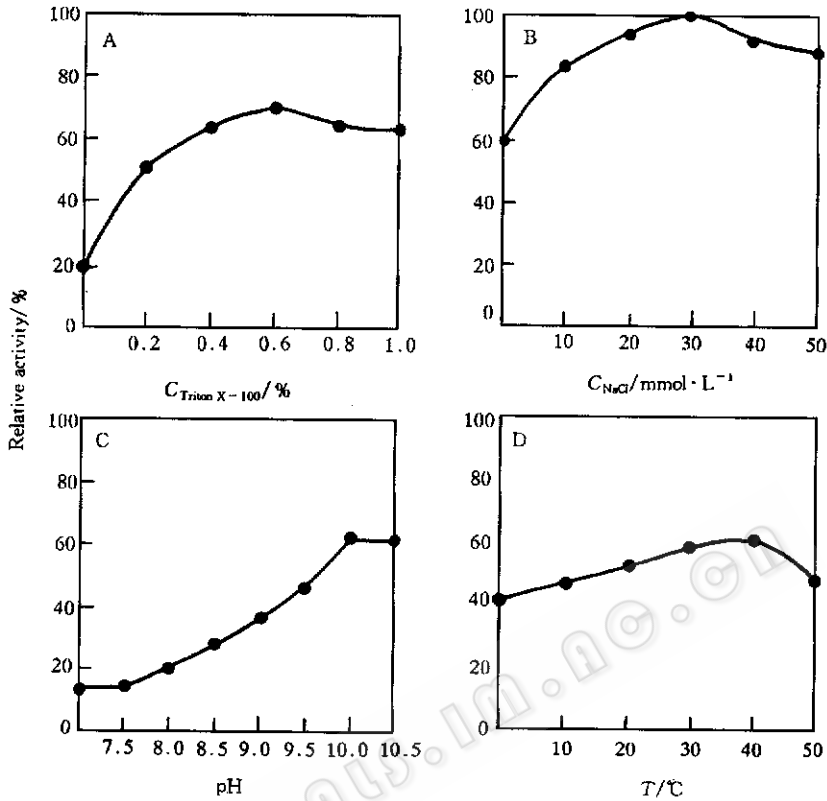


图4 不同因素对处理工程菌中包含体的影响

Fig. 4 Effects of the different factors on the treatment of inclusion bodies from the engineered strain

A. Effect of Triton X-100 concentration, B. Effect of ion strength, C. Effect of pH, D. Effect of temperature

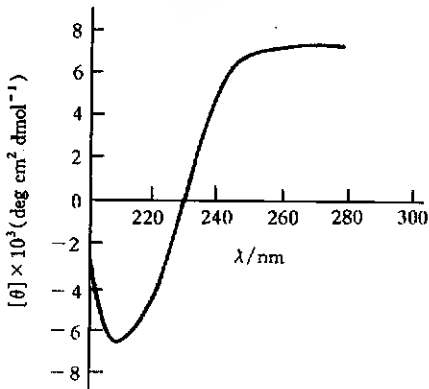


图5 鼠伤寒沙门氏菌 TN2401 α -天冬氨酰二肽酶的 CD 谱

Fig. 5 The CD spectrum of α -aspartyl dipeptidase from *S. typhimurium* TN2401

有利于该酶处于可溶状态。分析它的一级顺序,发现存在几个疏水簇,其中大部分含 Pro 残基,它的异构化和由它引起的慢折叠,利于目的蛋白结合其它大分子而形成包含体。

实验结果说明,目的蛋白的结构与包含体的形成和目的蛋白的复性密切相关。由结构松散的蛋白形成的包含体,其结构也必定松散。这种包含体易于用温和的条件处理,并易于萃取出有活性的目的蛋白,这一点很重要。一般从包含体中萃取出的目的蛋白经变性和复性处理后,仍有相当一部分呈不溶状态,结果造成已高效表达的目的蛋白丢失^[10]。

表面活性剂破坏疏水作用,使非极性基团暴

露于介质中。此目的蛋白易于从包含体中释放,并且其构象易转变成天然构象证明,包含体中的目的蛋白与其它分子的作用含有一定的疏水作用。这样获得的蛋白有活性又说明不存在分子间二硫键。

萃取液的离子强度和 pH 对萃取包含体蛋白的影响表明,包含体中大分子间存在着某些离子作用和静电作用。温度的影响在于表面活性剂的增溶作用与温度有关。在一定的温度范围内,温度升高,增溶作用增强。

本实验构建出高表达 α -天冬氨酰二肽酶的基因工程菌,为该菌在酶法合成二肽甜味剂方面的应用和有关方面的深入研究奠定了基础;并摸索出由结构松散的表达蛋白所形成的包含体的最佳处理条件。目前,尽管蛋白质的高级结构与包含体形成的关系还不清楚,至少本实验结果可为将来搞清这一问题提供素材,在处理由类似结构的重组蛋白形成的包含体方面可能具有普遍意义。

参 考 文 献

- 1 Carter T H, Miller C G. J Bacteriol, 1984, 159:453~459
- 2 Miller C G. Annu Rev Microbiol, 1975, 29:485~504
- 3 Conlin C A, Hakensson K, Liljas A *et al.* J Bacteriol, 1994, 176:166~172
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning(A Laboratory Manual Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 5 Laemmli U K. Nature(London), 1970, 227:680~685
- 6 Pfleiderer G. Methods Enzymol, 1970, 19:514~521
- 7 张智清,姚立红,侯云德. 病毒学报, 1990, 6:111~116
- 8 高基民,郑仲承,林来新妹等. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28:70~76
- 9 徐明波,姚志建. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19:89~92
- 10 Goldberg M E, Rudolph R and Jaenicke R. Biochem, 1991, 30:2790~2797

High Expression of α -aspartyl Dipeptidase Gene and Recovery of Its Products

Zhang Hongying Yang Wei Wang Xiaoping Zhang Jin

(The State Key Lab of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract A high expressed recombinant plasmid, consisted of the plasmid pBV220 and the gene of α -aspartyl dipeptidase from *S. typhimurim* TN2401, was constructed and named pBVPEP. After transformed into *E. coli* DH5 α , the expressed target protein, amounting to 30% of the total cellular proteins, occurred as soluble protein in cytoplasm (about 75%) and also as insoluble inclusion bodies (about 25%). The insoluble protein was recovered to 95% by mild treatments. The purified protein exhibited a band of 27kDa on SDS-PAGE analysis.

Key words α -aspartyl dipeptidase, engineered strain, inclusion body