

研究报告

粟酒裂殖酵母 N-糖酰胺酶在大肠杆菌中的表达、纯化及活性分析

信丰学^{1,2}, 王鹏¹, 钟盛华², 祁庆生¹

1 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 江西农业大学理学院, 南昌 330045

摘要: 根据 GenBank 中公布的粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)N-糖酰胺酶(Png1p)cDNA 序列, 设计并合成一对特异性引物, 利用 RT-PCR 技术从粟酒裂殖酵母中克隆出糖酰胺酶 cDNA。将得到的基因克隆到表达载体 pET-15b 中。重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经诱导表达和纯化提取后, 进行酶活测定。实验结果表明, 该酶的分子量约为 39 kD, 纯化后的重组 N-糖酰胺酶可以对变性处理的糖蛋白进行糖链的切除, 且这种作用需要还原剂 DTT 的辅助作用; N-糖酰胺酶只对错误折叠的糖蛋白有作用, 对天然的糖蛋白没有作用。等量粟酒裂殖酵母 Png1p 在不同温度、pH、DTT 浓度和底物变性温度下对等量核糖核酸酶 B(RNase B)的脱糖基化检测发现, 重组酶的最适反应温度 30°C, 最适反应 pH 为 7.0, 需要的最适 DTT 浓度为 10 mmol/L, 底物在 100°C 处理 10 min 时酶的脱糖基化率最高。

关键词: N-糖酰胺酶, RT-PCR, Ribonuclease B, 酶活测定

Expression, Purification and Characterization of N-glycanase from *Schizosaccharomyces pombe* in *Escherichia coli*

Fengxue Xin^{1,2}, Peng Wang¹, Shenghua Zhong², and Qingsheng Qi¹

1 Science Department, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China

2 Life Science School, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: One pair of primers were designed and synthesized on the base of the cDNA sequence encoding *Schizosaccharomyces pombe* N-glycanase reported on the GenBank. The cDNA sequence encoding Peptide N-glycanase was cloned from the *Schizosaccharomyces pombe* by RT-PCR. And then the RT-PCR product was cloned into the expression vector pET-15b. The expression vector pET-15b(+)/Png1p was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The results showed that the relative molecular weight of the enzyme was determined to be approximately 39 kD using SDS-PAGE. The expression products after induction and purification can catalyze the cleavage of N-linked oligosaccharides from glycoprotein coped with heat, but have no action on the native glycoprotein with the help of DTT. The percentage of deglycosylated RNase B treated with equate Png1p in different reaction temperature, pH, concentration of DTT and denatured temperature showed that the optimum temperature, the optimum pH is 30°C; the optimum concentration of DTT is 10 mmol/L and the optimum denatured temperature is 100°C.

Keywords: Png1p, RT-PCR, Ribonuclease B, enzyme activity

Received: July 27, 2007; **Accepted:** September 29, 2007

Supported by: the National Science Foundation of China (No. 30470049).

Corresponding author: Qingsheng Qi. Tel: +86-531-8365628; Fax: +86-531-8565610; E-mail: qiqingsheng@sdu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30470049)资助。

真核细胞内存在一个质量控制系统, 它保证只有正确折叠的糖蛋白质才能进入分泌途径。错误折叠的糖蛋白主要是通过胞质内的泛素-26S 蛋白酶体被降解掉^[1]。从内质网运出的畸变的糖蛋白在降解的过程中要切掉糖链, 我们把可水解 N-连接的糖肽或糖蛋白的 β -天冬胺酰葡萄糖胺键, 释放出完整寡糖链, 并生成天冬胺酸残基的酶统称为糖酰胺酶(peptide- N^4 -(N-acetyl- β -glucosaminy)-asparagine, 有时写作 Peptide N-glycanase)(图 1)^[2]。糖蛋白在胞内主要是作为生物信息的携带者和传递者, 对细胞生长发育、分化、代谢、识别反应和免疫反应起调节作用。错误折叠的糖蛋白在体内的积聚可以引起很多病理性疾病, 比如: 阿尔茨海默氏病, 疯牛病等^[3]。目前对错误折叠糖蛋白的降解过程的研究是国际上的热点之一, 研究的内容主要包括两部分: 一是对该酶的性质做进一步的研究, 尤其是来源于高等生物中的糖酰胺酶; 二是确定在体内与糖酰胺酶相互作用降解错误折叠糖蛋白的其它的蛋白因

子。但是目前整个详细的机理过程还没有完全弄清楚^[4]。糖酰胺酶作为这个质量控制系统中的一个关键酶, 对其性质的研究有助于帮助我们弄清楚糖蛋白降解的机理。

粟酒裂殖酵母 N-糖酰胺酶(Png1p)的基因位于粟酒裂殖酵母的第二条染色体上, 基因全长为 1213 bp, 由五个外显子和四个内含子组成^[5]。该基因开放阅读框由 1002 bp 组成, 编码一个 333 aa 的可溶性蛋白, 其分子量为 39.241 kD, 无信号肽。本研究首次以粟酒裂殖酵母为材料, 采用 RT-PCR 技术克隆出 N-糖酰胺酶基因, 克隆至表达载体 pET-15b 中, 并在 *E. coli* BL21(DE3) 中获得了高表达。通过尝试不同的诱导条件发现, 蛋白主要是以包涵体的形式存在, 对包涵体变性复性处理, 得到纯度高达 95% 以上的蛋白。酶活测定显示, 纯化后粟酒裂殖酵母 N-糖酰胺酶(Png1p)能切处错误折叠糖蛋白上的糖链, 并研究了其反应的最佳条件。

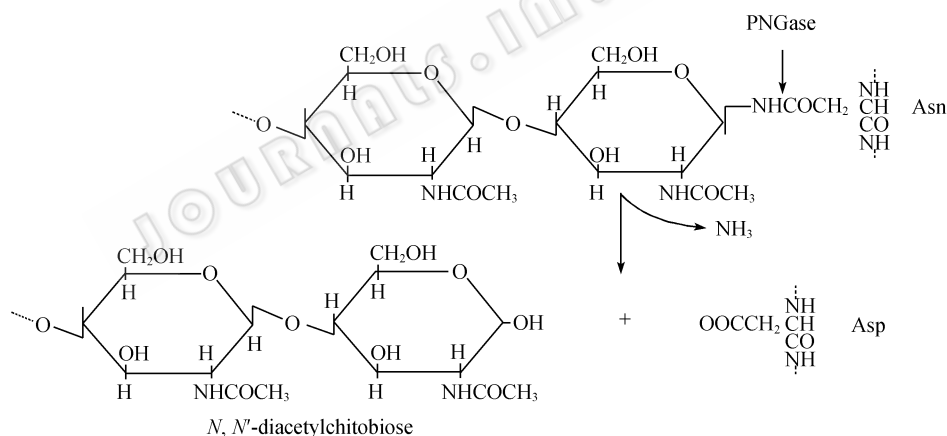


图 1 糖酰胺酶的作用机制^[6]

Fig. 1 Effects of Png1p on glycoprotein^[6]

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*. AKU4220)、大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)、载体 pET-15b 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, 氨苄青霉素 (Ampicillin) (100 μ g/mL); YPD 培养基(2%蛋白胨, 1%酵母膏, 2%葡萄糖)用于

粟酒裂殖酵母培养。

1.3 工具酶与试剂

限制性内切酶 *Xho* I, *Bam*H I 和 T4 DNA 连接酶均购自北京博大泰克公司; Agarose Gel DNA Purification Kit, RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0, 质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 核糖核酸酶 B(RNase B)购自 Sigma 公司; TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.4 引物的设计

根据 GenBank 中粟酒裂殖酵母 N-糖酰胺酶

cDNA的序列(No. AL031852), 设计2条特异性引物, 在正向引物的5'端加入 *Xho* I 酶切位点, 在互补链引物的5'端引物加入 *Bam*HI 酶切位点(下划线):

正向引物: 5'-TTA CTC GAG ATG GAT TTT CAT GCG ATT TC-3'

反向引物: 5'-TTT GGA TCC TCT CAT TTT CCT GCT TCC CCT CT-3'

引物由北京赛百胜基因技术有限公司合成。

1.5 RNA 的提取及 RT-PCR

取 YPD 培养基过夜培养的粟酒裂殖酵母 1.5 mL, 离心菌体。按照 TRIZOL 说明书提取总 RNA, 以随机六聚体为引物合成 cDNA, 然后以此 cDNA 为模板, 以特异性引物扩增 N-糖酰胺酶, 具体方法参照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 说明书。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 产物, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 回收扩增的目的基因。

1.6 原核表达载体 pET15b/*Png1p* 的构建

将纯化回收的 PCR 片段与载体片段经 *Xho* I, *Bam*HI 双酶切回收后, 按摩尔数 5:1 加入连接反应体系内, 16°C 连接过夜; 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 37°C 培养过夜, 挑取菌落 PCR 阳性的单个菌落于 LB+Amp 的培养液 37°C 振荡培养过夜, 少量提取质粒 DNA, 经 *Xho* I, *Bam*HI 双酶切初步鉴定后, 由北京博尚生物技术有限公司完成测序。

1.7 N-糖酰胺酶的诱导表达

将 pET-15b/*Png1p* 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌; 挑取单菌落接种于 3 mL LB 培养基(含氨苄青霉素 100 μ g/mL)中, 200 r/min 在 37°C 中振荡培养过夜; 以 1:100 转接到 50 mL LB 培养基中培养到 OD_{600} =0.6 左右, 加入 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L), 200 r/min 在 37°C 中振荡培养诱导表达, 分别在 1、2、3、4、5 h 取样, 15%SDS-PAGE 分析蛋白表达结果。

1.8 N-糖酰胺酶的纯化

1 L 诱导表达后的菌体沉淀重悬于 30 mL PBS 缓冲液(NaCl 137 mmol/L; KCl 2.7 mmol/L; Na₂HPO₄ 4.3 mmol/L; KH₂PO₄ 1.4 mmol/L)中。冰浴间歇超声波破菌后 12 000 g, 4°C 离心 30 min, 收集包涵体沉淀, 分别用缓冲液 A(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100(V/V), 4 mol/L 尿素)、B(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 3%

Triton X-100(V/V))、C(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100(V/V), 2mol/L 盐酸胍)洗涤包涵体。用 2 mL 变性缓冲液(50 mmol/L HEPES-NaOH, 6 mol/L 盐酸胍, 25 mmol/L DTT, pH 7.5)充分溶解包涵体沉淀, 12 000 g, 4°C 离心 30 min, 收集包涵体上清液。快速加入稀释复性液中, 4°C 磁力搅拌 2 h, 透析后 Ni 柱纯化。

1.9 N-糖酰胺酶酶活的测定

取 10 mg RNase B 溶于 1 mL Hepes 缓冲液(pH 7.0)中, 100°C 水浴 10 min, 取 50 μ L 加入 DTT(终浓度为 10 mmol/L)和 5 μ L 纯化过的酶液, 30°C, 12 h。SDS-PAGE 检测酶活。以将 10 μ g RNase B 在 10 μ L 体系中 30°C 反应 1 h 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 RT-PCR 扩增的结果

逆转录产物经过 PCR 扩增, 0.8%的琼脂糖凝胶电泳可见一条 1000 bp 左右的条带, 阳性对照为 1200 bp, 符合预期值(图 2)。

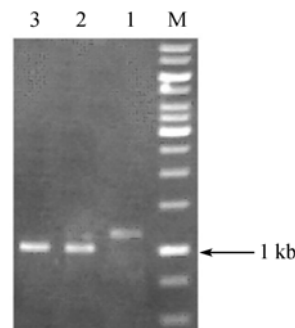


图 2 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 2 Analysis of RT-PCR products

M: DNA marker; 1: positive control; 2, 3: RT-PCR product

2.2 重组表达载体的鉴定

挑取 PCR 鉴定为阳性菌落的重组质粒经 *Xho* I, *Bam*HI 双酶切鉴定, 电泳分析可见约 5700 bp 和 1000 bp 大小两条带(图 3)。测序结果与 NCBI 上报道的序列完全一致(测序结果略), 说明基因的内含子被完全去除。

2.3 N-糖酰胺酶诱导表达及纯化后的 SDS-PAGE 检测

将重组菌株接种于含氨苄的 LB 培养基, IPTG 诱导后, 重组菌经超声破碎, 进行 15%SDS-PAGE 电泳。

电泳检测结果显示, 在 39 kD 处有一明显的蛋白表达带(图 4)。目的蛋白的表达主要是以包涵体的形式存在, 菌体破碎后离心, 将复性的包涵体亲和层析纯化后 SDS-PAGE 分析, 纯化产物可达 95%以上(图 5)。

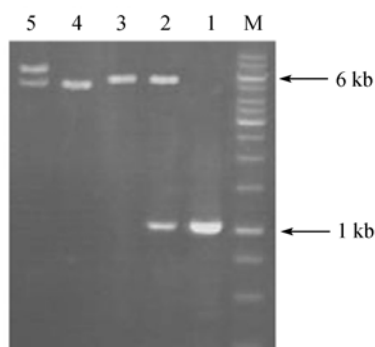


图 3 琼脂糖电泳对质粒构建的鉴定

Fig. 3 Identification of pET-15b/Pnglp

M: DNA marker; 1: PCR products; 2: digestion of pET-15b/Pnglp by *Xho* I and *Bam* H I; 3: digestion of pET-15b by *Xho* I and *Bam* H I; 4: plasmid of pET-15b; 5: plasmid of pET-15b/Pnglp

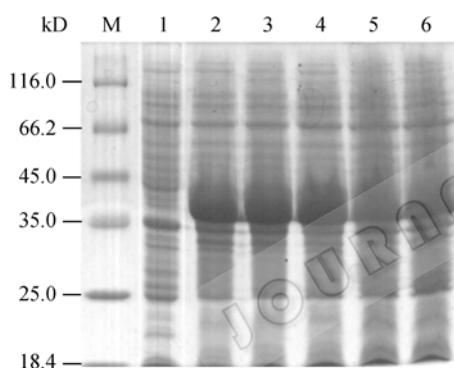


图 4 N-糖酰胺酶的表达

Fig. 4 Expression of Pnglp in *E. coli*

M: protein marker; 1: *E. coli* BL21(pET-15b/Pnglp) without IPTG; 2~6: *E. coli* BL21(pET-15b/Pnglp) after IPTG induction for 1~5 h

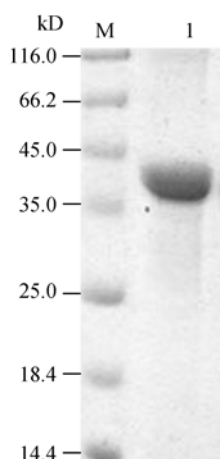


图 5 N-糖酰胺酶的纯化

Fig. 5 Purification of Pnglp

M: protein marker; 1: purified Pnglp

2.4 N-糖酰胺酶的脱糖基化作用及酶活测定

RNaseB 是一个含高甘露糖型寡糖链的糖蛋白, 在第 34 位的 Asn 上有相连的单链高甘露糖。SDS-PAGE 分析发现, 与对照相比, 经 N-糖酰胺酶作用的 RNaseB 的分子量变小, 说明核 RNaseB 上的糖链被成功的切除。在真核生物中, N-糖酰胺酶的核心区由 Cys、His、Asp 三个氨基酸组成的催化三联体组成, 酶在发挥活性的时候需要一个还原的环境, 这需要还原剂(如: DTT)的辅助^[5], 下图的实验结果也证实了这一点。在相同条件下, 粟酒裂殖酵母的 N-糖酰胺酶对天然的 RNaseB 则没有作用(图 6), 这与文献中报道的其它来自真核生物的 N-糖酰胺酶的活性一致^[7]。

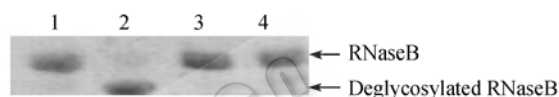


图 6 N-糖酰胺酶的脱糖基化作用

Fig. 6 Deglycosylation of glycoprotein by Pnglp

1: denatured RNase B; 2: denatured RNase B treated with DTT and Pnglp; 3: native RNase B treated with DTT and Pnglp; 4: denatured RNase B treated with Pnglp

将 Pnglp 配成 0.05 mg/mL 的酶溶液, 在 50 μ L 含有 50 μ g 的 RNase B 的溶液中分别加入不同量的酶液, 30 $^{\circ}$ C 反应 1 h。酶的脱糖基率通过图像处理软件 Image J 获得。由图 7 可见, 加入 5 μ L 以上的酶液后, 90%以上的底物被脱糖基化, 由此的出所得到的 Pnglp 的比活为 200 000 单位/mg。

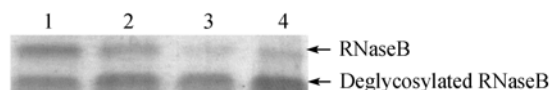


图 7 N-糖酰胺酶脱糖基化的酶活测定

Fig. 7 Activity assay of deglycosylation by Pnglp

1: denatured RNase B treated with DTT and 2 μ L Pnglp; 2: denatured RNase B treated with DTT and 4 μ L Pnglp; 3: denatured RNase B treated with DTT and 5 μ L Pnglp; 4: denatured RNase B treated with DTT and 10 μ L Pnglp

2.5 N-糖酰胺酶反应的最佳条件

2.5.1 N-糖酰胺酶的最适反应温度

在不同反应温度条件下分析重组表达 N-糖酰胺酶活力变化, 发现在 30 $^{\circ}$ C 的时候 RNase B 的脱糖基率最高, 可达 48%, 随着反应温度的升高, 底物的脱糖基率明显下降, 这可能是因为温度的升高导致酶的部分失活。

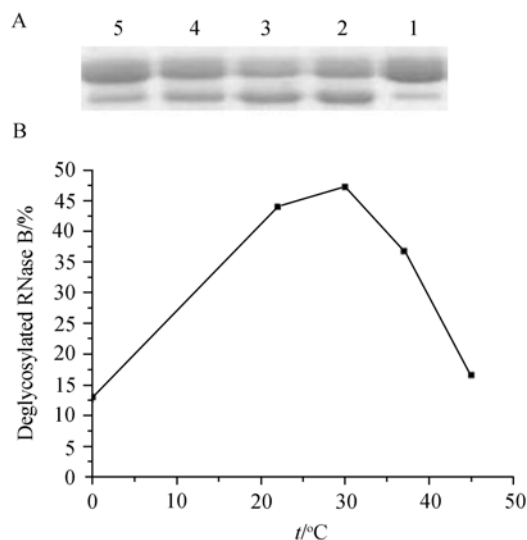


图 8 反应温度对 N-糖酰胺酶活力的影响

Fig. 8 Effect of reaction temperature on activity of *N*-glycanase

(A) 1: control; 2: 22°C; 3: 30°C; 37°C; 45°C

2.5.2 *N*-糖酰胺酶反应的最适 DTT 浓度

真核生物中 *N*-糖酰胺酶催化三联体的存在要求在发挥活性时需要一个还原的环境^[5], 从下图的结果显示, DTT 的浓度在 5~100 mmol/L 之间变化时, RNase B 的脱糖率变化不是很明显, 且在 20 mmol/L 的时候就达到了最大。

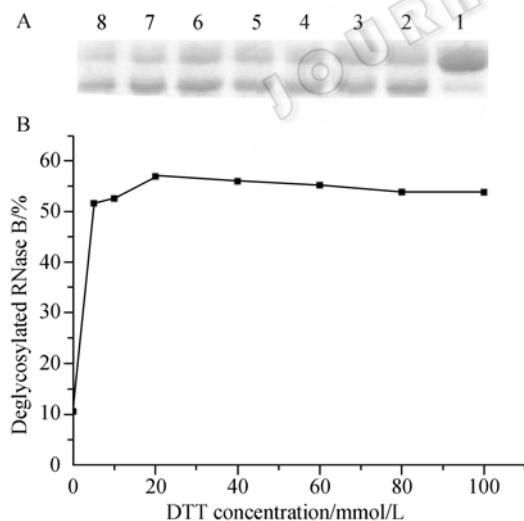


图 9 DTT 浓度对 N-糖酰胺酶活力的影响

Fig. 9 Effect of DTT concentration on activity of *N*-glycanase

(A) 1: control; 2: 5 mmol/L; 3: 10 mmol/L; 4: 20 mmol/L; 5: 40 mmol/L; 6: 60 mmol/L; 7: 80 mmol/L; 8: 100 mmol/L

2.5.3 *N*-糖酰胺酶反应的最适底物变性程度

由下图显示, 随着底物处理温度的上升, RNase B 的脱糖基率也随之升高, 在 100°C 热变性处理后, 酶的活力最大, 表明底物变性程度越大, 酶的活力

就越强。这也文献中报告的 *N*-糖酰胺酶只对错误折叠的糖蛋白有作用相一致^[7]。

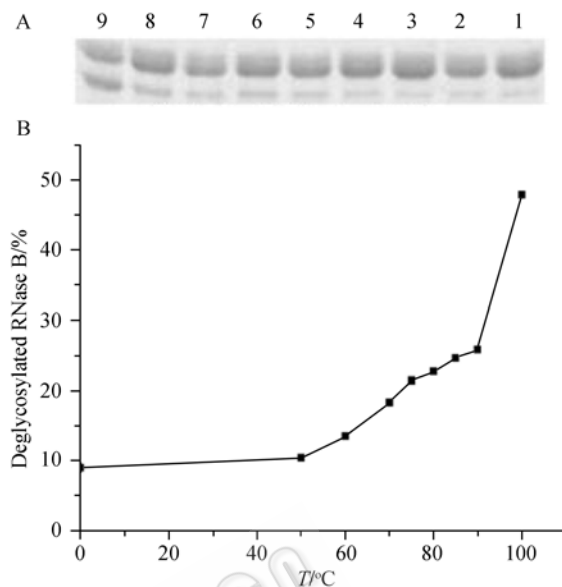


图 10 底物变性温度对 N-糖酰胺酶活力的影响

Fig. 10 Effect of substrate denature temperature on activity of *N*-glycanase

(A) 1: control; 2: 50°C; 3: 60°C; 4: 70°C; 5: 75°C; 6: 80°C; 7: 85°C; 8: 90°C; 9: 100°C

2.5.4 *N*-糖酰胺酶最适 pH

在不同 pH 反应条件下分析重组表达 *N*-糖酰胺酶的酶活力, 发现该酶在 pH 7.0 时表现出最大酶活力, RNase B 的脱糖基率可达 38%, 在偏酸或者偏碱的情况下, 酶的活力都下降, 表明该酶最适 pH 为 7.0。

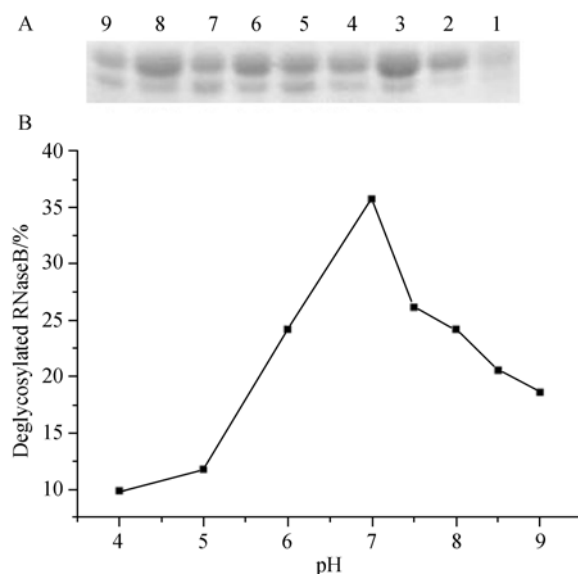


图 11 pH 对 N-糖酰胺酶活力的影响

Fig. 11 Effect of pH on activity of *N*-glycanase

(A) 1: control; 2: pH4.0; 3: pH5.0; 4: pH6.0; 5: pH7.0; 6: pH7.5; 7: pH8.0; 8: pH8.5; 9: pH9.0

3 讨论

糖酰胺酶首先是在植物的杏仁中发现^[8], 随后在脑膜炎脓杆菌等细菌中也发现^[9], 并且发现这个酶广泛分布于真核生物中^[2]。在胞内, 糖酰胺酶在 26S 蛋白酶体降解过程中起重要作用; 在胞外这个酶已经作为一个强有力的工具广泛用来分析糖蛋白上 N-连接寡糖链的结构和功能^[4]。

目前, 在几种模式生物中, 比如: 酿酒酵母、线虫、果蝇、拟南芥、小鼠等^[2], 对该酶的性质研究已经做了很多工作, 其中研究 N-糖酰胺酶的性质, 在蛋白水解中的作用及与其它蛋白的相互作用多是用模式生物——酿酒酵母中的 N-糖酰胺酶为研究对象^[10], 但是对粟酒裂殖酵母中的 N-糖酰胺酶研究目前的文献中还没有报道。粟酒裂殖酵母的 N-糖酰胺酶的氨基酸数是目前已经知道的模式生物中数目最少的, 比酿酒酵母的也少 30 个^[2], 但是它的基因却包有 4 个内含子, 这在酿酒酵母中是没有的。以糖酰胺酶的氨基酸序列为基础做进化树, 结果分析表明, 来源于粟酒裂殖酵母的 N-糖酰胺酶不同于其它几种模式生物, 在进化上与多细胞真菌更接近, 表明来源于粟酒裂殖酵母的 N-糖酰胺酶在进化上有重要的作用。了解粟酒裂殖酵母 N-糖酰胺酶的性质对于我们研究胞内糖蛋白降解的机理有极大的帮助作用。

本研究首次利用粟酒裂殖酵母的 N-糖酰胺酶为研究对象, 研究 N-糖酰胺酶的性质。利用 RT-PCR 技术从粟酒裂殖酵母中克隆出 N-糖酰胺酶基因, 并在大肠杆菌中高效表达, 通过尝试不同的诱导条件发现, N-糖酰胺酶主要是以包涵体的形式存在。包涵体经变性复性纯化后其纯度可达 95% 以上, 测其酶活发现, 粟酒裂殖酵母的 N-糖酰胺酶能对热变性的糖蛋白有去糖基化作用, 而对天然的糖蛋白没有任何作用, 且这种作用需要还原剂 DTT 的辅助作用, 这与文献中报道的来自其它的真核生物的糖酰胺酶

的性质是一致的^[4]。对该酶进一步的分析发现, 底物的变性程度越大酶的活性越强; 酶的最适反映温度在 30°C 左右; 在 pH 5.0~8.0 之间, 酶的活性较高; DTT 的浓度在 5~100 mmol/L 之间变化时, 酶的活性变化不是很大。以上结果为我们以后进一步研究该酶的性质和对该酶进行改造提供了有用的参考价值。

REFERENCES

- [1] Helenius A. Quality control in the secretory assembly line, *philos. Trans R Soc Lond B*, 2001, **356**: 147–150.
- [2] Suzuki T, Park H, Hollingsworth NM, Sternglanz R, Lennarz WJ. PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide: N-glycanase. *J Cell Biol*, 2000, **149**: 1039–1052.
- [3] Hiderou Y. ER stress and diseases. *The FEBS Journal*, 2007, **274**(3): 630–658.
- [4] Tadashi S, William J. Lennarz. Hypothesis: a glycoprotein-degradation complex formed by protein-protein interaction involves cytoplasmic peptide: N-glycanase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **302**: 1–5.
- [5] Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, *et al*. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 2002, **415**: 871–876.
- [6] Suzuki T, Park H, Lennarz WJ. Cytoplasmic peptide: N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *FASEB J*, 2002, **16**: 635–641.
- [7] Shibanjali J, Samiksha K, William JL. Misfolding of glycoprotein is a prerequisite for peptide: N-glycanase mediated deglycosylation. *FEBS Letters*, 2005, **579**: 823–826.
- [8] Takahashi N. Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, **76**: 1194–1201.
- [9] Plummer TH, Elder J, Alexander JH, Phelan S, Tarentino AW. Demonstration of peptide: N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 10700–10704.
- [10] Lee JH, Choi JM, Lee C, Yi KJ, Cho Y. Structure of a peptide: N-glycanase-Rad23 complex: insight into the deglycosylation for denatured glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 9144–9149.