

• 生物技术与方法 •

# 铁蛋白介导的地衣多糖酶胞内自发聚集及其高效制备

葛慧华, 葛钟琪, 毛磊, 张光亚

华侨大学 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

葛慧华, 葛钟琪, 毛磊, 张光亚. 铁蛋白介导的地衣多糖酶胞内自发聚集及其高效制备. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1602-1611.

GE HH, GE ZQ, MAO L, ZHANG GY. *In vivo* self-aggregation and efficient preparation of recombinant lichenase based on ferritin. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1602-1611.

**摘 要:** 酶分离纯化、固定化及催化性能提升一直是生物催化领域的研究热点和前沿,也是众多研究者致力解决的难点。研究和开发新型的纯化、固定化及提升催化性能的方法,降低纯化及储存等设备的要求及生产成本,对酶大规模应用具有重要意义。文中将铁蛋白 (ferritin) 与目标酶 (地衣多糖酶) 基因融合,经高效表达后,在细胞内自发形成无载体固定化酶,且可经低速离心分离纯化,纯度可达 90% 以上,酶活回收率为 61.1%,在 30 °C 储存 608 h 后,依然能够保持活力,且比初始时活力略有增加。在重复使用 10 次以后,仍保持初始酶活力的 50.0%。该微米级固定化酶可自发复溶,形成直径约为 12 nm 的可溶寡聚地衣多糖酶,其比活力是游离地衣多糖酶的 12.48 倍,催化效率则是后者的 7.11 倍,在 50 °C 时,酶活性降低为初始值一半所需时间也延长了 11.09 倍。这表明铁蛋白有望成为一种全新的分离纯化目标酶并大幅提升其催化性能的标签。

**关键词:** 铁蛋白; 无载体自固定化; 酶寡聚化; 生物分离; 酶活性聚集体; 生物催化

## *In vivo* self-aggregation and efficient preparation of recombinant lichenase based on ferritin

GE Huihua, GE Zhongqi, MAO Lei, ZHANG Guangya

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China

**Abstract:** Enzyme separation, purification, immobilization, and catalytic performance improvement have been the research hotspots and frontiers as well as the challenges in the field of biocatalysis. Thus, the development of novel methods for enzyme purification, immobilization, and improvement of their

**Received:** December 9, 2021; **Accepted:** February 11, 2022

**Supported by:** Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2020J01079)

**Corresponding author:** ZHANG Guangya. Tel: +86-592-6162302; E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

**基金项目:** 福建省自然科学基金 (2020J01079)

catalytic performance and storage are of great significance. Herein, ferritin was fused with the lichenase gene to achieve the purpose. The results showed that the fused gene was highly expressed in the cells of host strains, and that the resulted fusion proteins could self-aggregate into carrier-free active immobilized enzymes *in vivo*. Through low-speed centrifugation, the purity of the enzymes was up to >90%, and the activity recovery was 61.1%. The activity of the enzymes after storage for 608 h was higher than the initial activity. After being used for 10 cycles, it still maintained 50.0% of the original activity. The insoluble active lichenase aggregates could spontaneously dissolve back into the buffer and formed the soluble polymeric lichenases with the diameter of about 12 nm. The specific activity of them was 12.09 times that of the free lichenase, while the catalytic efficiency was 7.11 times and the half-life at 50 °C was improved 11.09 folds. The results prove that the ferritin can be a versatile tag to trigger target enzyme self-aggregation and oligomerization *in vivo*, which can simplify the preparation of the target enzymes, improve their catalysis performance, and facilitate their storage.

**Keywords:** ferritin; carrier-free self-immobilization; enzyme polymerization; bioseparation; active aggregates of enzymes; biocatalysis

酶作为生物催化剂在工业催化及医药等领域应用广泛。但却存在诸多问题：基于色谱的酶纯化方法一般较烦琐、且色谱填料昂贵；同时，酶储存较困难，一般需要低温保存，增加了生产成本；酶固定化虽可实现其重复利用，增强其稳定性，延长酶作用时间，降低成本，但目前酶固定化方法过程较复杂，固定化载体较昂贵<sup>[1]</sup>。因此，迫切需要研究和开发新型的纯化、固定化及提升催化性能的方法。近年来出现的胞内固定化方法引起了研究者的关注，它通过酶工程手段引入特殊的模块 (module)，诱发目标酶在胞内自组装成纳米级或微米级超分子结构，从而实现一步法在胞内形成固定化酶，同时也极大方便了下游的分离和制备<sup>[2]</sup>。其中，最具代表性的就是活性包涵体 (catalytically active inclusion bodies)，这也是一种新颖的无载体固定化酶，它主要依赖于有聚集倾向或者能诱发聚集的标签触发形成活性包涵体，其中酶分子能正确折叠，故而能正常发挥功能<sup>[3]</sup>。一般情况下，所得活性包涵体的稳定性和重复使

用有明显提升，但催化效率和大多数固定化酶一样，均低于游离酶<sup>[4]</sup>。

为了提高酶的催化效率，对酶分子进行改造是目前常用的方法，其中最具代表性的就是定点突变和定向进化<sup>[5]</sup>。此外，通过引入寡聚化多肽使目标酶形成寡聚体，从而在稳定性及催化性能上获得提升，也被证明是一种有效提高酶催化性能的方法<sup>[6]</sup>。因此，若能将酶分子在胞内诱发形成无载体固定化酶，又能在获得固定化酶之后将其部分或全部转化为寡聚态酶分子，这样就能同时实现酶的分离纯化、固定化及催化性能提升，从而降低对纯化设备的要求，提高储存性能及降低生产成本，对酶实际应用具有重要意义。

铁蛋白 (ferritin) 是生物体内主要铁储存分子，它将铁储存在蛋白笼内，并保护细胞免受芬顿反应引起的氧化损伤，在真核生物和一些细菌中发现的铁蛋白约由 200 个氨基酸组成，形成 24 个亚单位的八面体 432 对称的笼子<sup>[7]</sup>。而源于嗜热古菌的铁蛋白可在高离子强度

(800 mmol/L NaCl) 下组装成 24 聚体形态,但在较低的离子强度 (<200 mmol/L NaCl) 下,则形成稳定的二聚体<sup>[8]</sup>,因此,铁蛋白在仿生纳米材料制备、药物运输及纳米反应器等方面有不少成功的应用<sup>[9]</sup>。

鉴于此,本文以能高效水解地衣多糖(又称  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖)的 1,3-1,4- $\beta$ -D-4 葡聚糖水解酶(EC 3.2.1.73, 又称地衣多糖酶)为对象,通过在其 C 端引入能自发组装的全新标签——铁蛋白<sup>[10]</sup>,结果发现所得融合蛋白在细胞内自发组装成微米级无载体固定化酶,经低速离心即可获得纯度较高的目标酶,它不仅能多次重复使用,而且在室温下长时间储存活力无损失,更有趣的是该固定化酶可缓慢自发复溶,形成纳米级酶寡聚体,其催化效率及稳定性等较游离酶有大幅提升。

## 1 材料与方法

### 1.1 目的基因构建

地衣多糖酶(BglS, Gene ID: 937470)来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。由苏州金唯智生物科技有限公司合成编码地衣多糖酶+linker+Ferritin 的基因,经测序验证无误后由 Nde I 和 Hind III 限制性酶切位点克隆至 pET-22b(+),将成功构建的表达载体导入表达宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)。其中,linker 序列为 (EAAAK)<sub>2</sub>,铁蛋白序列在 PDB 数据库的 ID 号为 2FHA。

### 1.2 重组地衣多糖酶低速离心纯化及电泳分析

重组菌在含 1‰ (V/V) 氨苄青霉素的 LB 培养基中活化 12 h 后,按照接种量 1% (V/V) 的比例转入 TB 培养基中(含氨苄青霉素),在 37 °C、200 r/min 下恒温培养 24 h。

将表达后的菌体收集分装,在室温 6 000 r/min

的条件下离心 20 min。弃上清,将缓冲液与菌液按照 1:20 (V/V) 的比例混合均匀后,于冰水中进行超声破碎。超声条件:功率 300 W,工作 2 s,停顿 4 s,总超声时间 15 min。

将破碎后的溶液分别在 1 000×g、1 500×g、2 000×g、2 500×g、3 000×g,4 °C 下离心 10 min。根据公式 1 计算酶活性回收率,选择具有最高酶活回收率的转速(2 500×g)进行纯化。

$$\text{酶活回收率(\%)} = \frac{IU_1}{IU} \times 100 \quad (1)$$

式中, IU<sub>1</sub> 是纯化后酶活力, IU 是粗酶活力。

重组地衣多糖酶纯度通过 SDS-PAGE 鉴定,分离胶浓度为 12%,在 80 V 的电压下电泳适当时间后,进行染色和脱色,采用 GIS-2008 凝胶成像系统进行拍照。

### 1.3 地衣多糖酶活力测定

采用 3,5-二硝基水杨酸显色法测定酶活力<sup>[11]</sup>,向具塞试管中加入 50  $\mu$ L 稀释一定倍数的酶液和 350  $\mu$ L 地衣多糖溶液,在最适反应条件下恒温水浴 10 min,反应结束后迅速加入 400  $\mu$ L DNS 终止反应。沸水浴 5 min,冷却后加入 1.6 mL 蒸馏水,于 540 nm 波长下测定光吸收值。空白对照用 50  $\mu$ L 缓冲液替换酶液。

1 个酶活力单位 (IU) 为每分钟生成 1.0  $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量,比活力定义为每毫克酶蛋白所含的酶活力单位 (IU/mg)。

### 1.4 地衣多糖酶酶学性质测定

可溶多聚地衣多糖酶获取:为了获得可溶多聚地衣多糖酶(soluble polymeric lichenase, SPL),将不溶性活性地衣多糖酶(insoluble active lichenase aggregates, IALA)聚集体悬浮在 Tris-HCl (0.05 mol/L, pH 7.0) 中,并置于 30 °C 水浴中。8 h 后,可以获得一定浓度的 SPL 进行性质测定。此外,将 IALA 重悬并均匀分配到多个 2 mL 离心管中,并在 30 °C 的水浴中孵育。在不同的时间间隔(8、20、32、56、

104、176、296、608 h), 通过低速离心分离沉淀和上清, 分别测定 SPL 和 IALA 的酶活力。通过 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 以计算地衣多糖酶比活性。

地衣多糖酶最适温度和 pH 测定: 将稀释一定倍数的地衣多糖酶液与底物混合后在不同温度 (30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C) 和不同 pH (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) 条件下水浴 10 min, 测定酶活力, 以最高酶活力为 100%。

地衣多糖酶热稳定性测定: 将稀释一定倍数的游离地衣多糖酶 (B-E) 及不溶活性地衣多糖酶 (IALA) 及可溶多聚地衣多糖酶 (SPL) 在 45 °C 和 50 °C 条件下分别保温, 间隔一定时间将其与底物混合并测定其在最适反应条件下的残留酶活力。以最高酶活力为 100%, 并根据文献计算酶活力下降一半所需的时间<sup>[12-13]</sup>。

地衣多糖酶动力学常数测定: 配制浓度 1.00、1.25、1.67、2.00、2.50、4.00、5.00、7.00、9.00、10.00 g/L 的地衣多糖溶液, 与稀释一定倍数的 B-E、IALA 和 SPL 在最适条件下反应 10 min 后, 测定其酶活力, 利用米氏方程计算  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

IALA 重复使用性的测定: 由于 IALA 是微米级的颗粒, 且其自发回溶形成纳米级 SPL 所需时间较长, 因此 IALA 可重复使用。IALA 与地衣多糖在最适条件下反应一定时间后, 在 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min, 取上清液测定酶活力, 回收沉淀, 用缓冲溶液洗去残留的还原糖溶液。加入一定量的缓冲溶液重新悬浮沉淀颗粒, 加入底物进行下一轮实验, 首轮反应酶活力定义为 100%。

### 1.5 细胞切片及电子显微镜观察

将宿主菌细胞固定并脱水后, 将样品插入 37 °C 烘箱中的包埋板中过夜, 然后在 60 °C 烘

箱中聚合 48 h, 用 LeicaUC7 (Leica Germany) 切片机将样品切成 60–80 nm 超薄切片, 并进行铀铅双染色, 室温下干燥过夜后, 透射电子显微镜 (HT7700, 日立, 日本) 观察切片细胞并拍照。将分散的 IALA 和 SPL 溶液滴到涂有碳的铜网上, 风干过夜, 用透射电子显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 IALA 的表达和纯化效果分析

将含有表达载体的重组菌 *E. coli* BL21(DE3) 摇瓶培养, IPTG 诱导表达后收集菌体, 超声破碎后静置在室温一段时间后, 发现细胞破碎液可以在试管底部形成沉淀, 且沉淀依然显示出较高的地衣多糖酶活性, 占总酶活力比例接近 100% (上清中几乎没有检测到酶活力), 这表明重组地衣多糖酶形成 IALA。因此, 为了加速分离, 采用低速离心的方式纯化重组地衣多糖酶, 结果发现, 2 500×g 离心 10 min 时即可达到最高酶活回收率 (61.1%)。

纯化后的重组地衣多糖酶通过 SDS-PAGE 验证 (图 1), 其在 37–50 kDa 处有一明显条带, 与理论分子量 46 kDa 接近, 其纯度大于 90%, 表明铁蛋白可诱发地衣多糖酶自组装成

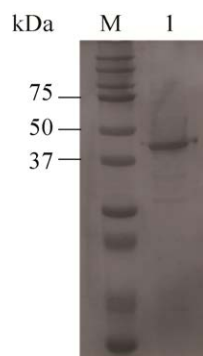


图 1 Lichenase-Ferritin 的 SDS-PAGE 分析  
Figure 1 SDS-PAGE analysis of lichenase-ferritin.  
M: marker; lane 1: the target protein.

不溶性酶聚集体, 且通过低速离心纯化可得纯度较高的目标重组酶。众所周知, 低速离心纯化对设备要求较低, 操作简单, 仪器设备前期投入较少, 且分离制备过程容易放大, 在实际应用过程中极具优势。

## 2.2 IALA 自发复溶特性

为了观察 IALA 是否能够重新溶解到溶液中, 将纯化后的 IALA 静置在 30 °C 的缓冲液中, 同时检测上清液和沉淀酶活力。结果如图 2A 所示, 在所检测时间内, 上清酶活力占比逐渐升高, 而沉淀中酶活性的占比越来越低, 在 608 h 时, 上清酶活力已占据 90% 以上的总酶活力 (图 2A)。这主要是由于上清中酶活力不断升高, 在 608 h 时, 其最高酶活力最高, 可达  $(2\,670.92 \pm 156.03)$  IU/mL (图 2B), 较游离地衣多糖酶  $(105.12 \pm 1.30)$  IU/mL 有极显著提高 ( $P < 0.001$ )。此外, IALA 在孵育 608 h 后, 依然能够保持活力, 且比初始时活力略有增加, 与孵育 100 h 时活力相当, 表明 IALA 在 30 °C 时储存的稳定性较好, 这也极大方便了该酶实际应用过程中的运输和储存, 降低了成本。而比活力的结果 (图 2C) 表明, 上清液中地衣多糖酶比活力显著上升, 这表明有较多的 IALA 复溶到溶液中, 形成 SPL。而 IALA 的比活力略有升高, 其中上清中可溶多聚地衣多糖酶 (soluble polymeric lichenase, SPL) 最高比活力可达  $(410.12 \pm 9.09)$  U/mg, 较游离地衣多糖酶的比活力高 12.48 倍, 其  $t$  检验的  $P$  值小于 0.001 ( $P < 0.001$ ), 表明二者之间差异极显著。此外, 上清中 SPL 的比活力也比文献报道的野生型地衣多糖酶 (该酶序列与本研究完全一样)<sup>[14]</sup> 比活力高 112.36 倍。

可见, IALA 在缓冲液中可以自发复溶, 所得可溶多聚地衣多糖酶 (SPL) 催化活性显著高于游离酶。这区别于之前文献报道的活性包涵体, 因为一般活性包涵体的催化性能略低

于游离酶<sup>[15]</sup>, 且尚未见活性包涵体复溶后活力较游离酶更高的报道, 这可能是由于目前诱发

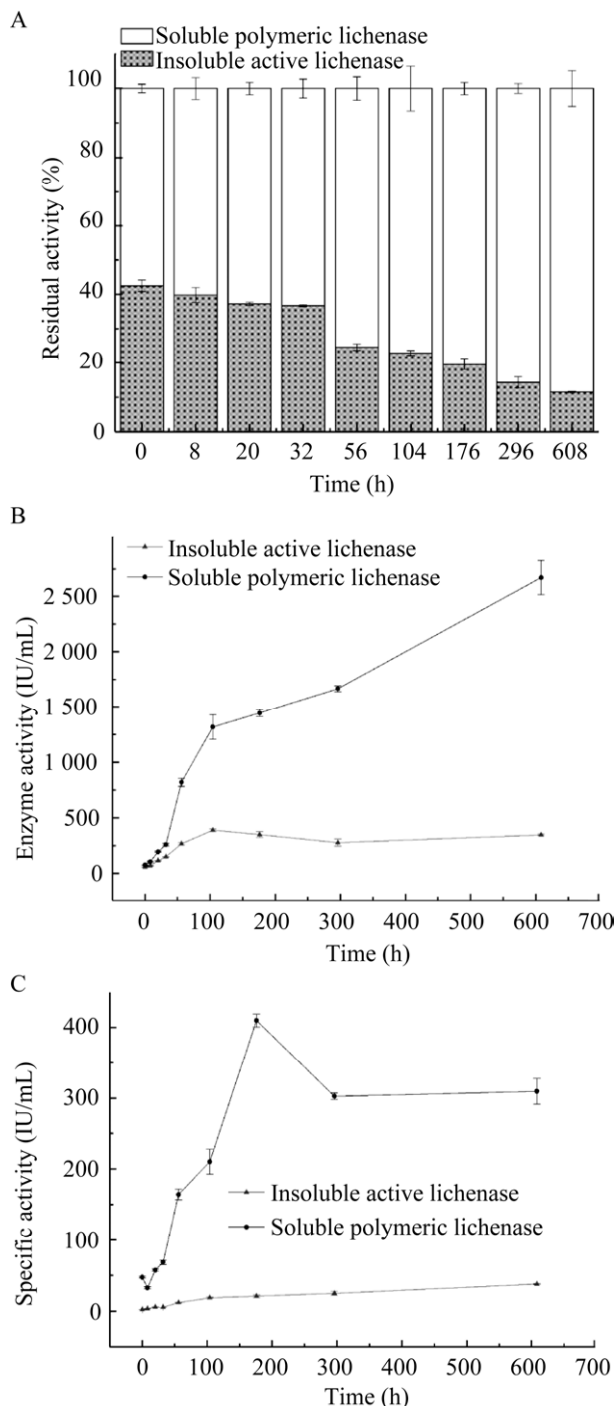


图 2 IALA 孵育过程中酶活力 (A、B) 及比活力 (C)

Figure 2 Activity (A, B) and specific activity (C) of IALA during incubation.

目标酶形成活性包涵体的标签并不能在活性包涵体复溶后重新引起目标酶寡聚, 由于铁蛋白可自发形成 24 聚体<sup>[10]</sup>, 而其作为标签时也可能让目标酶形成寡聚体, 从而提高可溶多聚地衣多糖酶的催化活力。其可能的原因是寡聚提高了目标酶的局部有效浓度, 也可能是由于铁蛋白引起地衣多糖酶微结构的变化, 从而增加了活性位点和底物的接触<sup>[16]</sup>。

### 2.3 不同状态地衣多糖酶最适温度与 pH

30–60 °C 温度下反应 10 min 后, 测定游离地衣多糖酶、不溶活性地衣多糖酶 (IALA) 以及可溶多聚地衣多糖酶 (SPL) 的酶活力, 结果如图 3A 所示, IALA 及游离酶的最适反应温

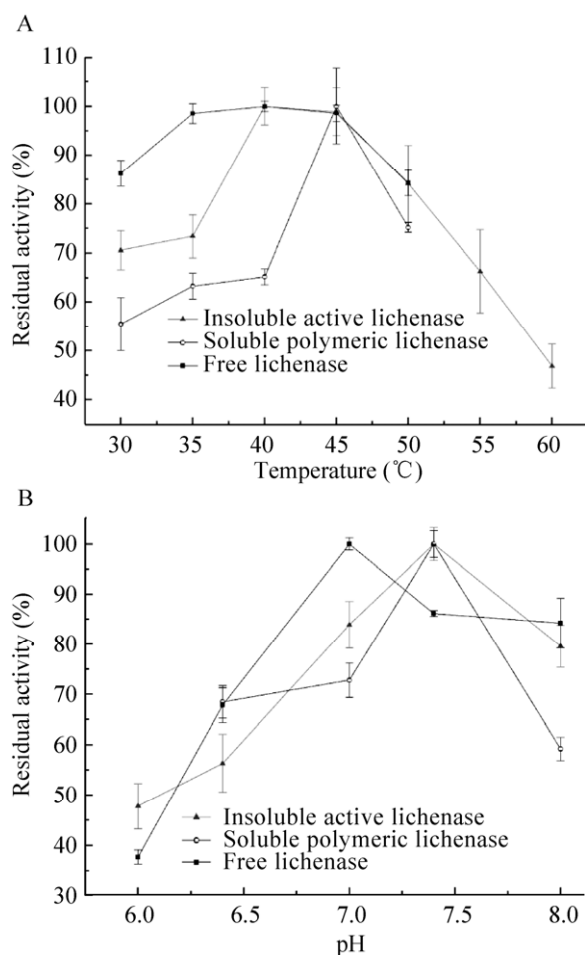


图 3 地衣多糖酶的最适温度 (A) 和 pH (B)  
Figure 3 Optimal temperature (A) and pH (B) of lichenases.

度均为 40 °C, 而 SPL 最适反应温度则为 45 °C, 三者最适温度接近, 与文献报道的野生型地衣多糖酶的最适温度 50 °C 相差不大<sup>[14]</sup>。

在不同 pH 条件反应 10 min 后, 测定游离地衣多糖酶、IALA 及 SPL 酶活力, 以最高酶活为 100%, 计算其他条件的相对酶活。结果如图 3B 所示, 由图可知, 游离地衣多糖酶最适反应 pH 为 7.0, 与文献报道野生型酶一致<sup>[14]</sup>, IALA 以及 SPL 的最适 pH 均为 7.5, 与游离地衣多糖酶最适 pH 相差较小, 这表明铁蛋白标签对酶最适 pH 无明显影响。

### 2.4 不同状态地衣多糖酶热稳定性

测定并计算了游离地衣多糖酶、IALA 及 SPL 的酶活力下降一半所需时间, 结果如表 1 所示。在 45 °C 下, 三者的所需时间分别为 10.93 min、9.24 min 以及 29 382.01 min, 其中, SPL 较游离地衣多糖酶显著增强 ( $P < 0.001$ )。同时, 在 50 °C 下, SPL 酶活力下降一半所需时间是游离衣多糖酶的 12.09 倍,  $t$  检验结果也表明其与游离地衣多糖酶在该温度下酶活力下降一半所需时间的差异也极显著 ( $P < 0.001$ )。

该结果说明铁蛋白与地衣多糖酶融合并复溶至上清后, 依然能够形成寡聚体。且由于铁蛋白所形成的 24 个亚单位的八面体 432 对称的笼子, 其外径约为 12 nm, 内径约为 8 nm<sup>[17]</sup>, 因此, 可能有部分地衣多糖酶被包封到其空腔中。由于铁蛋白自组装形成的纳米结构本身对

表 1 不同状态地衣多糖酶的活力减少一半所需时间

Temperature (°C)	Half-lives of different lichenases		
	Half-lives (min)		
	Free lichenase	IALA	SPL
50	1.60±0.06	1.99±0.23	19.35±0.24***
45	10.93±1.64	9.24±0.57	29 382.01±2 650.78***

\*\*\*:  $P < 0.001$ .

热稳定, 且对包封于其内部的酶分子具有一定的保护作用。因此, 包裹于其纳米空腔内的地衣多糖酶稳定性也增加了, 故而其酶活力下降一半所需时间显著提高。这表明铁蛋白可以作为一种新型标签寡聚并包封 (或部分包封) 目标酶并提高其热稳定性。类似的现象也有报道, 如利用病毒外壳蛋白 (viral nucleocapsid protein, VNP) 包裹的肽酶 E 在 50 °C 处理 30 min, 酶活力没有损失, 而游离酶仅剩 20% 的活力, 这主要是由于加热并没有破坏 VNP 结构, 使得被包封在其内部的目标酶仅有极少部分发生了变性<sup>[18]</sup>。

## 2.5 不同状态地衣多糖酶的动力学常数

测定并计算了游离地衣多糖酶、IALA 及 SPL 的动力学参数, 结果如表 2 所示。可以看出, SPL 的米氏常数 ( $K_m$ ) 值显著升高, 表明其与底物的亲和力下降明显, 这可能是由于寡聚使得酶分子比较拥挤, 以至于与底物接触不太容易。然而, SPL 的转化数 ( $K_{cat}$ ) 相比游离酶也显著提升, 为前者的 21.96 倍, 有研究者认为, 寡聚也会使酶活性中心及附近空间更为柔性 (flexible)<sup>[19]</sup>, 也可能稳定了酶分子不利的空间构象<sup>[20]</sup>, 从而引起转化数的大幅提升, 进而引起其催化效率 ( $K_{cat}/K_m$ ) 的提高。本文铁蛋白引入使得 SPL 为游离酶的 7.11 倍, 二者差异达极显著水平 ( $P < 0.001$ )。这表明处于寡聚状态的 SPL 催化效率明显提升, 而将目标酶寡聚化也是一种简单且有效的提升酶催化效率的手段。例如, Wang 等利用 foldon 将目标酶进行寡聚化, 结果发现 2 个目标酶的催化效率分别提高了 4.2 倍和 3.9 倍<sup>[21]</sup>。Yang 等通过在胰水解酶 C-端融合了寡聚化短肽 18A, 所得寡聚化酶比活力显著提升, 且热稳定性也提高了 6.7 倍<sup>[20]</sup>。结合 SPL 的热稳定性和催化效率可以看出, 铁蛋白也可以作为一种全新的触发目标酶寡聚化并提升其催化效率及稳定性的标签。

表 2 不同状态地衣多糖酶动力学常数

Table 2 Kinetic parameters of different lichenases

Kinetic parameters	Free lichenase	IALA	SPL
$K_m$ (mg/mL)	9.73±0.84	9.49±1.15	30.14±5.56
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	44.03±2.73	4.84±0.46	966.69±147.22***
$k_{cat}/K_m$ (mL/(mg·s))	4.53±0.11	0.51±0.01	32.21±1.08***

\*\*\*:  $P < 0.001$ .

另一方面, IALA 的催化效率相比游离酶则有较明显的下降, 这主要是由于其  $k_{cat}$  下降明显, 可能是由于 IALA 是微米级的酶活性聚集体 (见 2.6), 更类似无载体的固定化酶, 导致地衣多糖酶活性位点被阻挡, 难以接触到其大分子底物, 从而使其催化效率下降。但由于 IALA 制备简单, 过程易于放大, 且可重复使用 (见 2.6)。因此, 在实际应用中依然颇具潜力。

## 2.6 IALA 的重复使用性

如前所述, 铁蛋白介导的地衣多糖酶能自发形成微米级不溶活性聚集体 IALA, 其特性非常类似于固定化酶, 而酶的重复利用是降低成本的重要手段之一, 重复利用率也是评估固定化酶效果的重要指标之一。因此, 考查了 IALA 的重复使用情况, 结果如图 4 所示。由图可知, 随着 IALA 使用次数的增加, 其酶活力逐步下降, 在重复使用 5 次时, IALA 保留

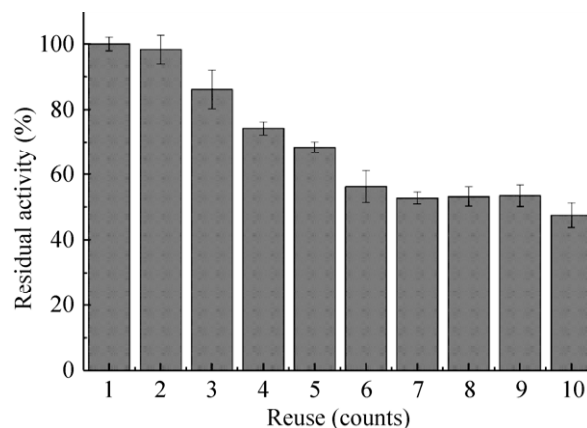


图 4 IALA 重复使用性

Figure 4 Reuse of the IALA.



了初始活力的约 70.0%，而在重复使用 10 次后，剩余约 50.0%的初始酶活力。酶在离心和转移过程中的丢失可能是导致其活性下降的原因之一，此外，频繁的离心和洗涤也会导致酶结构的破坏，这也可能是导致酶活力下降的原因<sup>[22]</sup>。

在有关地衣多糖酶固定化研究中，Chaari 等研究了通过离子相互作用将地衣多糖酶固定在 Amberlite IR120 H 上，发现其可以进行重复使用，5 次后酶活力只剩 50%，可能是由于弱的离子相互作用导致重复使用效果不佳<sup>[23]</sup>。之后，该课题组又通过将地衣多糖酶固定在戊二醛交联的壳聚糖-黏土复合珠上，其重复使用次数得到提升，重复使用 8 次后仍有 63.7%的酶活性<sup>[24]</sup>。本课题组前期通过 SpyTag/SpyCatcher 自发反应与木聚糖酶-地衣酶嵌合体结合，形成 3 臂星形多功能嵌合体，在重复使用 10 个循环后，地衣多糖酶剩余 56%的酶活力<sup>[25]</sup>，由此可见，本研究 IALA 的重复使用性接近或略高于文献报道的传统有载体固定化方法。故而，铁蛋白介导形成的不溶活性地衣多糖酶聚集体 IALA 作为一种新型无载体自固定化酶，具有较好的重复使用性，更重要的是，它解决了固定化过程中酶分离纯化困难的问题。因此，铁蛋白标签也有望与不同的目标酶融合形成多种具有良好重复使用性的自固定化酶。

## 2.7 IALA 形成机理探究

为了研究 IALA 是在细胞内还是在缓冲液中形成的，制备了宿主大肠杆菌的细胞切片，经透射电子显微镜 (TEM) 观察，结果如图 5A 所示。可见 IALA 是在宿主菌细胞中形成，甚至一个细胞里面有 2 个 IALA，还有的 IALA 充斥细胞大部分，其大小约为 500 nm (图 5A)。当细胞裂解后，IALA 释放到溶液中，呈球形或近球形，其大小约为 500–600 nm (图 5B)，与细胞内大小接近，可见 IALA 释放到缓冲液

中后并未再次聚集。有报道指出活性包涵体直径一般为 200–1 200 nm<sup>[26]</sup>，其形态一般为球形、椭圆形、圆柱形或桶形<sup>[27]</sup>，本文结果与其相符。

当 IALA 静置于缓冲液几天后，所得上清液的电镜照片如图 5C 所示，由图可以看出，上清液中存在许多圆形空心纳米颗粒，其粒径在 12 nm 左右，这与文献报道的铁蛋白笼子大小基本一致<sup>[28]</sup>。这表明 IALA 可在缓冲液中缓慢、自发地溶解，形成 SPL，这与之前有关活

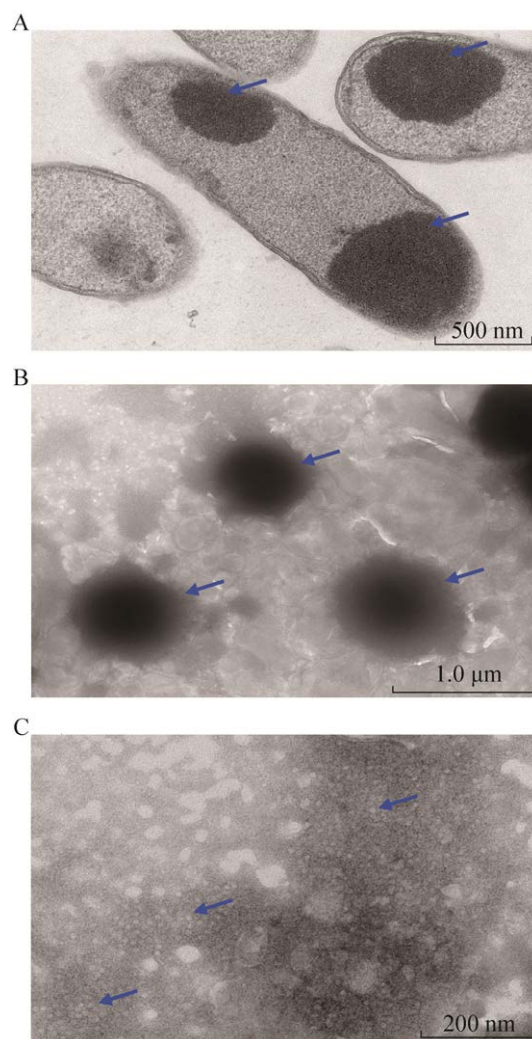


图 5 细胞切片 (A)、IALA (B) 及 SPL (C) 透射电镜图

Figure 5 Transmission electron microscopy of cell sections (A), IALA (B) and SPL (C).



性包涵体大部分使用 SDS、尿素等溶解的文献报道不同。如, Mestrom 等<sup>[29]</sup>使用 2% SDS 溶解活性包涵体, 但酶活力会受到一定影响。此外, 前文中提到的 SPL 具有良好的催化性能也再次说明微米级的 IALA 能在溶液中自发回溶, 形成催化效率更高的纳米级 SPL。

为了探究 IALA 在细胞形成的分子机制, 首先计算了地衣多糖酶与铁蛋白的等电点, 二者等电点均偏酸性, 在中性条件下 (大肠杆菌细胞液 pH 接近中性), 二者均带负电荷, 存在静电引力的可能性很低, 这说明电荷可能不是 IALA 在胞内形成的主要内部原因。由于高浓度尿素能破坏分子间的疏水相互作用, 因此, 将 IALA 溶于 8 mol/L 尿素, 结果如图 6 所示, 可以看出, 尿素可以破坏 IALA 分子间的疏水相互作用, 从而加速 IALA 的溶解。因此, 推测疏水相互作用可能是 IALA 在细胞内形成的主要原因, 而这也是多数活性包涵体形成的主要原因<sup>[30]</sup>。此外, 目标蛋白质的表达量也是影响蛋白质聚集的原因, 细胞内蛋白质大量表达导致蛋白浓度增加, 其接触机会增加或者由于溶解度限制而产生沉淀<sup>[31]</sup>。因此, IALA 的形成可能受多种因素影响, 导致其在细胞内形成活性不溶聚集体, 且在缓冲液中依然保持这种



图 6 尿素对 IALA 的溶解作用  
Figure 6 IALA dissolved by urea.

状态, 在无其他因素作用条件下, 也可以非常缓慢地自发复溶到缓冲液中。

### 3 讨论

本文将地衣多糖酶与铁蛋白标签通过 linker 融合表达后, 发现其在细胞内可自发聚集, 形成微米级无载体自固定化酶 IALA。细胞破碎后释放到缓冲液, 可通过低速离心纯化得到不溶性地衣多糖酶, 这种方法省事、省力, 极大地降低了酶分离纯化的成本, 且所需设备简单 (低速离心机), 易于放大。所得固定化地衣多糖酶具有良好的重复使用性, 循环使用 10 次后, 仍然具有 50% 的酶活性。该活性聚集体能在缓冲液中自发复溶, 形成纳米级多聚地衣多糖酶 (SPL), 所得 SPL 也具有独特的优势, 如: 具有优秀的催化性能, 其比活力、催化效率及酶活力下降一半所需时间均显著高于游离地衣多糖酶。

综上所述, 铁蛋白有望成为一种全新的标签, 在酶制备、固定化、储存及催化等各个流程起到重要作用, 后续研究需要进一步探究其普适性, 以期在生物催化等相关领域发挥更大作用。

### REFERENCES

- [1] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(6): 1451-1463.
- [2] Ölçücü G, Klaus O, Jaeger KE, et al. Emerging solutions for *in vivo* biocatalyst immobilization: tailor-made catalysts for industrial biocatalysis. *ACS Sustain Chem Eng*, 2021, 9(27): 8919-8945.
- [3] Kloss R, Karmainski T, Jäger VD, et al. Tailor-made catalytically active inclusion bodies for different applications in biocatalysis. *Catal Sci Technol*, 2018, 8(22): 5816-5826.
- [4] Roca-Pinilla R, Fortuna S, Natalello A, et al. Exploring the use of leucine zippers for the generation of a new class of inclusion bodies for pharma and biotechnological applications. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 175.
- [5] Arnold FH. Directed evolution: bringing new chemistry to life. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(16): 4143-4148.

- [6] 张雷, 雷林超, 张光亚, 等. 基于 foldon 介导的寡聚化以提高阿魏酸酯酶催化效率. 生物工程学报, 2019, 35(5): 816-826.
- Zhang L, Lei LC, Zhang GY, et al. Oligomerization triggered by foldon to enhance the catalytic efficiency of feruloyl esterase. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 816-826 (in Chinese).
- [7] Zhang SL, Zang JC, Chen H, et al. Nanomaterials: the size flexibility of ferritin nanocage opens a new way to prepare nanomaterials. Small, 2017, 13(37): 1701045.
- [8] Pulsipher KW, Villegas JA, Roose BW, et al. Thermophilic ferritin 24mer assembly and nanoparticle encapsulation modulated by interdimer electrostatic repulsion. Biochemistry, 2017, 56(28): 3596-3606.
- [9] Ki MR, Nguyen TKM, Jun HS, et al. Biosilica-enveloped ferritin cage for more efficient drug deliveries. Process Biochem, 2018, 68: 182-189.
- [10] He DD, Marles-Wright J. Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology. Nat Biotechnol, 2015, 32(6): 651-657.
- [11] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 1959, 31(3): 426-428.
- [12] Pinheiro BB, Rios NS, Rodríguez Aguado E, et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. Int J Biol Macromol, 2019, 130: 798-809.
- [13] Souza PM, Aliakbarian B, Filho EXF, et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. Int J Biol Macromol, 2015, 81: 17-21.
- [14] Cota J, Oliveira LC, Damásio ARL, et al. Assembling a xylanase-lichenase chimera through all-atom molecular dynamics simulations. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(8): 1492-1500.
- [15] Kőszagová R. Inclusion bodies in biotechnology. J Microbiol Biotechnol Food Sci, 2020, 9(6): 1191-1196.
- [16] Yang HQ, Lu XY, Liu L, et al. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline  $\alpha$ -amylase from *Alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency, thermal stability, and resistance to oxidation. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(9): 3049-3058.
- [17] Pfaffen S, Abdulqadir R, le Brun NE, et al. Mechanism of ferrous iron binding and oxidation by ferritin from a pennate diatom. J Biol Chem, 2013, 288(21): 14917-14925.
- [18] Fiedler JD, Brown SD, Lau JL, et al. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. Angew Chem Int Ed Engl, 2010, 49(50): 9648-9651.
- [19] Eshaghi M, Sun GY, Grüter A, et al. Rational structure-based design of bright GFP-based complexes with tunable dimerization. Angew Chem Int Ed Engl, 2015, 54(47): 13952-13956.
- [20] Yang XF, Huang A, Peng JZ, et al. Self-assembly amphipathic peptides induce active enzyme aggregation that dramatically increases the operational stability of nitrilase. RSC Adv, 2014, 4(105): 60675-60684.
- [21] Wang XZ, Ge HH, Zhang DD, et al. Oligomerization triggered by foldon: a simple method to enhance the catalytic efficiency of lichenase and xylanase. BMC Biotechnol, 2017, 17(1): 57.
- [22] Jo BH, Seo JH, Yang YJ, et al. Bioinspired silica nanocomposite with autoencapsulated carbonic anhydrase as a robust biocatalyst for CO<sub>2</sub> sequestration. ACS Catal, 2014, 4(12): 4332-4340.
- [23] Chaari F, Blibech M, Bhiri F, et al. Production of mixed-linkage beta-oligosaccharides from lichenan using immobilized *Bacillus licheniformis* UEB CF lichenase. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 168(3): 616-628.
- [24] Chaari F, Belghith-Fendri L, Ellouz-Chaabouni S. Production and *in vitro* evaluation of oligosaccharides generated from lichenan using immobilized *Penicillium occitanis* lichenase. J Mol Catal B Enzym, 2015, 116: 153-158.
- [25] Lin YQ, Jin WH, Wang JD, et al. A novel method for simultaneous purification and immobilization of a xylanase-lichenase chimera via SpyTag/SpyCatcher spontaneous reaction. Enzyme Microb Technol, 2018, 115: 29-36.
- [26] Krauss U, Jäger VD, Diener M, et al. Catalytically-active inclusion bodies-Carrier-free protein immobilizates for application in biotechnology and biomedicine. J Biotechnol, 2017, 258: 136-147.
- [27] Margreiter G, Messner P, Caldwell KD, et al. Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. J Biotechnol, 2008, 138(3/4): 67-73.
- [28] Song N, Zhang J, Zhai J, Hong J, Yuan C, Liang M. Ferritin: a multifunctional nanoplatform for biological detection, imaging diagnosis, and drug delivery. Acc Chem Res, 2021, 54(17): 3313-3325.
- [29] Mestrom L, Marsden SR, McMillan DGG, et al. Comparison of enzymes immobilised on immbeads and inclusion bodies: a case study of a trehalose transferase. ChemCatChem, 2020, 12(12): 3249-3256.
- [30] Jäger VD, Lamm R, Küsters K, et al. Catalytically-active inclusion bodies for biotechnology-general concepts, optimization, and application. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(17): 7313-7329.
- [31] Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation—pathways and influencing factors. Int J Pharm, 2010, 390(2): 89-99.

(本文责编 陈宏宇)