

黑曲霉内切葡聚糖酶 AnCel5A 的表达纯化与晶体优化

颜俊杰¹, 李玉洁², 郑迎迎², 陈纯琪², 郭瑞庭², 李华钟^{*1}, 刘卫东²

(1. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘要: 来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的 β -1,4-内切葡聚糖酶(AnCel5A)是糖苷水解酶第 5 家族成员,水解纤维素分子无定形区的 β -1,4-糖苷键,在纤维素的降解过程中发挥关键作用。本研究通过对 AnCel5A 的结晶条件初筛,获得并优化 AnCel5A 晶体以期解析其蛋白质晶体结构。将截去 N 端信号肽的 AnCel5A 蛋白在 *Pichia pastoris* X33/pPICZ α A 中进行表达,发酵液上清透析除盐并进行 Endo H 去糖基化酶切,后续依次通过离子交换层析、疏水层析,获得高纯度蛋白。通过坐滴气相扩散法对 AnCel5A 的结晶条件进行初筛,在 CryoI screen kit (A6)孔中长出了初始晶体,经优化获得了更好的晶体。蛋白晶体于台湾新竹同步辐射中心(NSRRC)BL15A1 线站进行了 X 射线衍射数据收集,结果显示其分辨率达到 1.8 Å。

关键字: 内切葡聚糖酶;纯化;结晶;结构

中图分类号:Q 71 文章编号:1673-1689(2019)02-0081-06 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.012

Expression, Purification and Crystallization of a Glycoside Hydrolase Family 5 Endoglucanase(AnCel5A) from *Aspergillus niger*

YAN Junjie¹, LI Yujie², ZHENG Yingying², CHEN Chunchi²,
GUO Reying², LI Huazhong^{*1}, LIU Weidong²

(1. Key Lab. of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: The β -1,4-endoglucanase from *Aspergillus niger* (AnCel5A) is a cellulase which is classified to glycoside hydrolases subfamily (GH) 5. It can hydrolyze the amorphous region of cellulose long chains by endo-action, which makes it one of the key enzymes in cellulose hydrolysis. This research aims at determination the crystal structure of AnCel5A by screening and optimization its protein crystals. The signal peptide truncated AnCel5A is successfully expressed in *P. pastoris* X33. Purified proteins are obtained by using ion-exchange and hydrophobic chromatography. The crystal screen of AnCel5A is completed by using sitting-drop vapor diffusion method and screen kits bought from the Hampton Research company. Initial crystals are found in the reservoir solution of cryoI kit (A6). After further optimization, better crystals are obtained. The crystals diffracted to 1.8

收稿日期: 2016-03-29

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA022209)。

* 通信作者: 李华钟(1958—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业微生物育种和微生物制药研究。E-mail:hzhli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 颜俊杰,李玉洁,郑迎迎,等. 黑曲霉内切葡聚糖酶 AnCel5A 的表达纯化与晶体优化[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(02): 81-86.

Å and dataset is collected at beam line BL15A1 of the National Synchrotron Radiation Research Center (NSRRC, Hsinchu, Taiwan).

Keywords: endoglucanase, purification, crystallization, structure

近年来,随着化石燃料的消耗以及因此导致的环境污染问题不断加重,可再生能源的研究逐渐成为热点。纤维素是公认的新能源及化工领域的重要原材料,将其分解成可利用的单糖或多糖则是对其大规模利用的前提条件。与目前常用的物理化学降解方法相比,纤维素酶降解法具有高效、有条件温和、设备要求低、污染小等优点;纤维素酶^[1]是一类起协同作用的多种水解酶组成的复合酶系^[2]。从自然界微生物中分离得到的大多数纤维素酶常常有耐热性差、活性低、不耐酸碱等缺陷,要将这些酶进行工业生产应用,就需要对它们的这些劣势进行改造^[3]。基于蛋白结构信息的理性、半理性改造已被成功用于提高纤维素酶的活性、pH 稳定性及热稳定性等属性^[4-6]。通过研究了解纤维素酶的精细晶体结构,可以有效指导实际改造工作。

本文研究的黑曲霉内切葡聚糖酶(AnCel5A),属于糖苷水解酶第5家族(GH5)下的A6亚家族^[7],作用于纤维素分子无定形区的内部 β -1,4-糖苷键^[8],其比活力高达204 U/mg^[9],而且能水解多种不同底物,这一特性使AnCel5A在工业、能源等领域拥有广阔的前景。本文作者截去N端构成信号肽的30个氨基酸,在毕赤酵母表达系统^[10-11]中对其进行了表达,表达出来的截短的AnCel5A由302个氨基酸残基构成,含3个N-糖基化位点,相对分子量33.7 kDa、等电点pH 4.11,粗酶液切去糖基化后经离子柱、疏水柱纯化获得纯度95%以上的蛋白^[12]。以气相扩散法^[13-14]初步筛选出AnCel5A的初步结晶条件,对结晶条件优化获得了较好的晶体。通过对晶体衍射测试得知晶体衍射数据的分辨率,为后续确定相位信息^[15]、结构调整优化获得其晶体结构做准备。后续获得的晶体结构信息将能确定该酶的催化以及潜在热稳定性相关位点信息,为提高酶活及耐热性等的改造提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 层析填料:购自美国GE公司;二喹啉

甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测试试剂盒:购自美国Thermo Fisher公司;酵母膏、蛋白胨、无氨基酸酵母氮源(YNB):购自上海生工生物工程有限公司;蛋白质结晶条件筛选试剂盒:购自美国Hampton Research和Emerald Biosystems公司;晶体优化试剂:购自美国Sigma公司。

1.1.2 仪器 恒温培养箱:美国精骐公司;高速冷冻离心机:美国Thermo Fisher公司;台式冷冻离心机:美国Thermo Fisher公司;AKTA蛋白纯化系统:美国GE公司;蛋白质电泳仪:美国Invitrogen公司;Nano-drop超微量分光光度计:美国Thermo Fisher公司;光学显微镜:美国徕卡公司。

1.1.3 菌种 毕赤酵母工程菌*Pichia pastoris* X33/pPICZ α A-AnCel5A(由本实验室保存)。

1.2 方法

1.2.1 重组菌株的表达 将-80℃保存的甘油菌1 mL接种到100 mL YPD培养基(Zeocin⁺,100 μ g/mL)中,30℃,250 r/min振荡培养至OD₆₀₀=0.6~0.8。将YPD培养液平均接种到10瓶含500 mL BMGY培养基中(Amp⁺,Kan⁺,100 μ g/mL),30℃,250 r/min振荡培养16~18 h,至OD₆₀₀=2~6。4℃沉降6 h,倾去上清,沉淀细胞用等体积BMMY培养基重悬,继续于30℃,250 r/min振荡培养。每隔24 h,加入终浓度1%的甲醇,总共诱导96 h。

1.2.2 发酵液收集与纯化预处理 发酵液经5 500 r/min,4℃离心25 min后收集上清液。经糖基化预测得知AnCel5A存在N-糖基化位点,因此需要用Endo H酶切去糖基化,按体积比1:10⁴向上清液中加入20 mg/mL的Endo H酶。将蛋白粗酶液透装入透析袋放入5 L(25 mmol/L Tris-Cl,pH 7.5)透析液中4℃透析除盐,每隔6 h更换透析液,每隔12 h取样SDS-PAGE电泳(设置未加酶空白对照),检查酶切效果。

1.2.3 DEAE Sepharose 6 Fast Flow 平衡液A:25 mmol/L Tris-Cl,pH 7.5;洗脱液B:25 mmol/L Tris-Cl,1 mol/L NaCl,pH 7.5。层析柱用A液预平衡后上样,上样完成后A液淋洗平衡,B液设置条件0~

100%, 60 min, 梯度洗脱, 根据 SDS-PAGE 验证结果收集纯度符合要求的蛋白。

1.2.4 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 平衡液 A: 25 mmol/L Tris-Cl, 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.5, 洗脱液 B: 25 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5。调节样品的电导和 pH 值, 层析柱 A 液预平衡后上样, 上样完成后 A 液淋洗平衡后, B 液设置条件 0~100%, 1 h, 梯度洗脱, 根据 SDS-PAGE 验证结果收集纯度符合要求的蛋白。

1.2.5 超滤浓缩 用 Amicon Ultra 截留相对分子质量 10 kDa 超滤浓缩管, 4 °C, 3 600 r/min 条件下浓缩蛋白, 分装, 冻存于 -80 °C。

1.2.6 蛋白质浓度测定 使用 Nano-drop 微量分光光度计测定蛋白浓度。

1.2.7 纯度分析 用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白质纯度: 吸取 1 μL 浓缩蛋白于 EP 管中, 加入 10 μL 2 $\times$ 上样缓冲液, 添加缓冲液至总体积 20 μL ; 设置 DTT 有、无对照, 确定蛋白在该条件下否有聚体。若 SDS-PAGE 电泳结果显示蛋白纯度 > 95%, 则可以进行后续结晶实验。

1.2.8 AnCel5A 蛋白结晶条件初筛、优化及衍射数据收集 采用坐滴蒸汽扩散法进行晶体生长条件初筛, 初筛所用试剂盒包括 Hampton 公司和 Emerald Biosystems 公司生产的常用初筛试剂盒, 以及 Molecular Dimensions Ltd 公司生产的 JCSG-plus 1、JCSG-plus 2、ProPlex 1、ProPlex 2、PACT premier™ 1、PACT premier™ 2 试剂盒。初筛条件总数 1 320 个, 所用的 96 孔坐滴结晶板由 Hampton 公司生产, 池液 100 μL , 蛋白液与池液为 1 μL + 1 μL , 养晶环境为于 22 °C 恒温室, 观察时间间隔 72 h。以初筛长晶条件为基础, 通过组合调整结晶条件中沉淀剂和盐的种类及浓度、缓冲液的种类及 pH、蛋白液浓度进行优化。优化晶体在台湾新竹同步辐射中心进行 X 光衍射及数据的收集和处理。

2 结果与讨论

2.1 糖基化酶切效果验证

糖基化可以在某种程度上使蛋白的柔性区增加, 却会对蛋白质结晶产生不利影响, 所以在蛋白晶体学研究中通常需要去糖基化。按比例向 AnCel5A 粗酶液中加入 Endo H 酶, 透析于 25 mmol/L Tris-Cl pH 7.5 的缓冲液中酶切 24 h。取样跑 SDS-PAGE 蛋白胶验证酶切情况。AnCel5A 蛋白

在 SDS-PAGE 上的大小由酶切前的 45 kDa 左右变为 35 kDa, 接近 AnCel5A 蛋白的理论分子量 33.7 kDa, 如图 1 所示, 其中泳道 1 代表 EndoH 酶切之前, 泳道 M 代表标准蛋白带 Marker, 泳道 2 代表 EndoH 酶切之后。

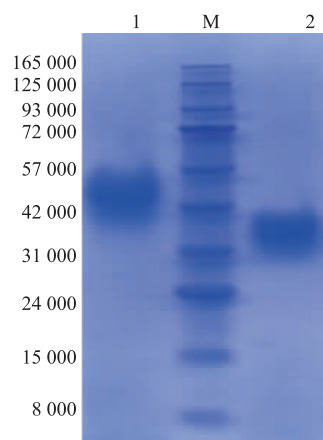


图 1 AnCel5A 经 Endo H 酶切的 SDS-PAGE

Fig. 1 Endo H enzyme digestion of AnCel5A

2.2 DEAE Sepharose 6 Fast Flow

在同一缓冲溶液中, 不同蛋白表面所带的电荷种类和数量各不相同, 导致与离子交换介质的结合能力有所区别, 从而实现目的蛋白与杂蛋白的分离。因为 AnCel5A 的等电点低于 pH 7.0, 因此它在 pH 7.5 的缓冲溶液中带负电荷, 所以选择阴离子交换柱 DEAE。A 液平衡后样品能很好地挂柱, 流穿棕黄色但电泳结果显示没有蛋白, 线性洗脱过程中目的蛋白逐渐被洗脱下来。如图 2 所示, 泳道 2 代表流穿, 泳道 3、4 代表不同浓度洗脱液洗脱的蛋白。

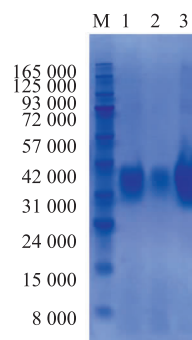


图 2 DEAE 阴离子交换层析

Fig. 2 DEAE Chromatography

2.3 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow

蛋白质等生物大分子会因不同种类、数目的疏

水性基团分布在分子表面,造成蛋白质分子间疏水性存在差异,进而导致异种蛋白质与疏水性层析介质之间的作用力强弱不同,从而实现蛋白质的分离。AnCel5A 蛋白中疏水性氨基酸如 Met、Trp、Phe 等约占总氨基酸的 40%,大量的疏水性氨基酸的存在是依靠疏水性差异实现目的蛋白与杂蛋白分离的基础。上样过程中流穿呈现浅黄色,随洗脱缓冲液浓度的提高目的蛋白被洗脱下来,电泳验证得知流穿的紫外吸收值较高是因为流穿中含有色素。如图 3 所示,泳道 1 代表样品,泳道 2 代表洗脱的蛋白。

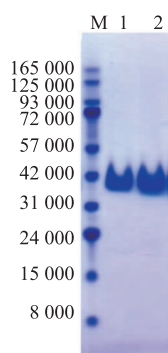


图 3 Phenyl 疏水层析

Fig. 3 Phenyl hydrophobic Chromatography

2.4 AnCel5A 蛋白浓缩及浓度测定

AnCel5A 浓缩后的蛋白浓度为 22 mg/mL,浓缩产物 SDS-PAGE 验证结果如图 4 所示。其中,泳道 1 代表浓缩后样品。

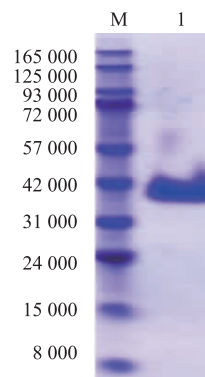


图 4 浓缩后 AnCel5A 的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of concentrated AnCel5A

2.5 AnCel5A 结晶蛋白初筛结果观察

初筛晶体放在 22 °C 恒温晶体室培养,观察后有疑似晶体生长,长晶条件如下:

1) Wizard III G5 (41[#]), 条件: 28% Polyethylene Glycol 400 (PEG-400), 0.1 mol/L HEPES pH 7.5, 0.2 M Calcium chloride, 晶体呈球形, 见图 5(a);

2) Cryo I A6 (6[#]), 条件: 40% (v/v) Polyethylene Glycol 600 (PEG-600), 0.1 mol/L cacodylate pH 6.5, 0.2 mol/L Ca(OAc)₂, 晶体形状片层状, 见图 5(b);

3) Cryo II A4 (4[#]), 条件: 40% (v/v) Polyethylene Glycol 400 (PEG-400), 0.1 mol/L HEPES pH 6.5, 0.2 mol/L Ca(OAc)₂, 晶体呈块状见图 5(c)。

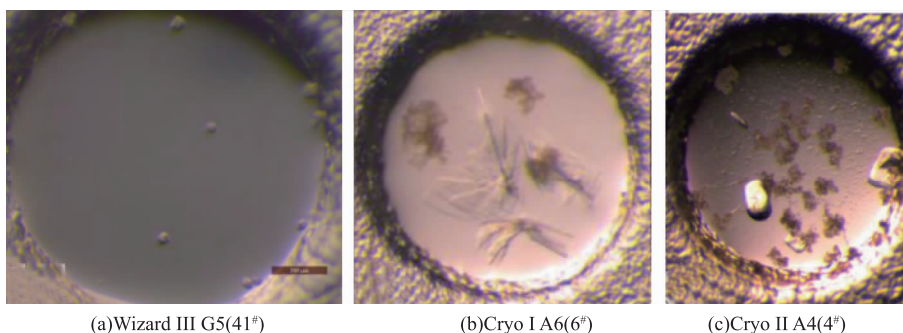


图 5 AnCel5A 初筛晶体

Fig. 5 Primary crystal of AnCel5A

2.6 结晶条件优化及衍射数据收集

2.6.1 结晶条件优化 在初筛条件的基础上,对条件中的沉淀剂和盐的浓度进行大范围调整,观察是否对晶体状况有所改善以及是否需要优化得到的长晶条件小范围调整。设置初调条件如下:

1) Wizard III G5 (41[#]): (22, 25, 28, 31, 34, 37)% PEG-400, 0.1 mol/L HEPES pH 7.5, (0.1, 0.2, 0.3, 0.4) mol/L Calcium chloride;

2) Cryo I A6 (6[#]): (25, 30, 35, 40, 45, 50)% (v/v) PEG-600, 0.1 mol/L cacodylate pH 6.5, (0.05,

0.15,0.25,0.35) mol/L $\text{Ca}(\text{OAc})_2$;

3)Cryo II A4 (4[#]), 条件:(32,34,36,38,40,42)%(v/v) PEG-400,0.1 mol/L HEPES pH 6.5,(0.1,0.2,0.3,0.4) mol/L $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ 。

观察结果显示 Wizard III G5 (41[#])条件优化出来的晶体较优化前并无改善,见图 6(a);Cryo II A4 (4[#])条件优化长晶条件只在 42% PEG-400 这一列,最优的晶体见图 6(b);Cryo I A6 (6[#])条件优化晶体状况有所改善的 PEG-600 的范围是 35%~45%,见图 6(c)尝试对 Cryo I A6 (6[#])条件进行细调如下:

Cryo I A6 (6[#]):(34,36,38,40,42,44)%(v/v)

PEG-600,0.1 mol/L cacodylate pH 6.5,(0.1,0.2,0.3,0.4) mol/L $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ 。

将初步调整与细微调整的晶体状况对比发现,Cryo I A6 (6[#])孔最优的长晶条件是 35%(v/v) PEG-600,0.15 mol/L $\text{Ca}(\text{OAc})_2$,0.1 mol/L cacodylate pH 6.5。

2.6.2 衍射数据收集 挑选优化得到的蛋白晶体送到台湾新竹同步辐射中心(NSRRC),选择 BL15A1 线站进行 X 射线晶体衍射,得到衍射图(图 7),确定晶体衍射解析度为 1.8Å。

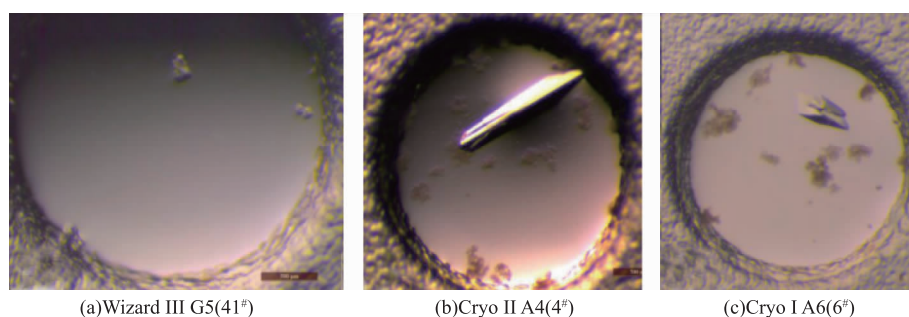


图 6 AnCel5A 优化晶体

Fig. 6 Optimized crystal of AnCel5A protein

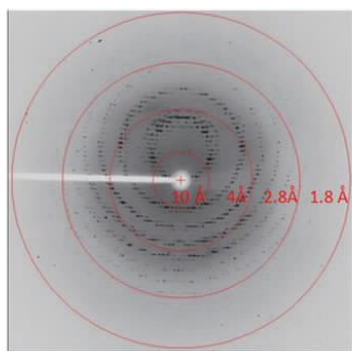


图 7 AnCel5A X-射线衍射图

Fig. 7 X-ray diffraction image of AnCel5A

3 结 语

通过毕赤酵母表达系统,获得截短的内切葡聚

糖酶 AnCel5A,发酵液依次通过 EndoH 酶切透析、DEAE 离子交换层析和 Phenyl 疏水层析获得高纯度的 AnCel5A 蛋白。通过结晶条件初筛得出 AnCel5A 蛋白形成蛋白晶的沉淀剂为高浓度聚合度较低 PEG(PEG-400 和 PEG-600),而且都含有 0.2 M Ca^{2+} ;条件为 35%(v/v) PEG-600,0.15 mol/L $\text{Ca}(\text{OAc})_2$,0.1 mol/L cacodylate pH 6.5 时,晶体衍射图的分辨率达到最高值 1.80Å。

AnCel5A 属于糖苷水解酶第 5 家族的 GH-A 家族,底物特异性广泛。后续将对收集数据进行结构精确修正,确定相角信息,获得 AnCel5A 的三维结构,并根据其结构分析对活性区一些关键氨基酸进行有目的的突变改造,尝试获得高酶活、耐高温的突变蛋白。

参考文献:

- [1] MARSHALL J J. Purification of α -1,4-glucan hydrolase (cellulase) from the snail, *Helix pomatia*[J]. *Journal of the Physiology and Biochemistry*, 1973, 44(4):981-988.
- [2] WARREN R A. Microbial hydrolysis of polysaccharides[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1996, 50(23):183-212.
- [3] TANG Zizhong, LIU Shan, HAN Xueyi, et al. Improving endoglucanase activity from *Bacillus subtilis* by error-prone PCR[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(7):754-761.(in Chinese)

- [4] QIN Y, WEI X, SONG X, et al. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum[J]. **Journal of Biotechnology**, 2008, 135(2): 190-195.
- [5] ZHANG J, SHI H, XU L, et al. Site-directed mutagenesis of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritima* based on rational design[J]. **PLoS One**, 2015, 10(10): 1-2.
- [6] TISHKOV V I, GUSAKOV A V, CHERKASHINA A S, et al. Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis[J]. **Biochimie**, 2013, 95(2): 1704-1710.
- [7] TOMME P, WARREN R A J, GILKES N R. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi[M]//POOIE R K. Advances in Microbial Physiology. Academic Press. 1995: 1-81.
- [8] DAVIES G, HENRISSAT B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases[J]. **Structure**, 1995, 3(9): 853-859.
- [9] HONG J, TAMAKI H, AKIBA S, et al. Cloning of a gene encoding a highly stable endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2001, 92(5): 434-441.
- [10] ZHANG Huimin, LI Jianfang, WU Minchen, et al. Expression of a thermostable xylanase gene in *Pichia pastoris* and its enzymatic characterization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(2): 124-128. (in Chinese)
- [11] LI P, ANUMANTHAN A, GAO G X, et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007, 142(2): 105-124.
- [12] CARTER C W J, CARTER C W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1979, 254(23): 12219-12223.
- [13] CHAYEN N E, STEWART P D S, MAEDER D I. An automated system for micro-batch protein crystallization and screening[J]. **Journal of Applied Crystallography**, 1990, 23(4): 297-302.
- [14] VEDADI M, NIESEN F H, ALLALI-HASSANI A, et al. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2006, 103(43): 15835-15840.
- [15] FAN Haifu, LIANG Dongcai. The diffraction-phase problem in structural genomics [J]. **Chinese Bulletin of Life Science**, 2003, 15(2): 65-69. (in Chinese)

科 技 信 息

欧盟批准高粱糖浆作为新型食品投放市场

2018年12月19日,据欧盟官方公报消息,欧盟委员会发布(EU)2018/2017号条例,批准来自第三国的传统食品高粱(*Sorghum bicolor*(L.) Moench)糖浆作为新型食品投放市场,并修订实施细则(EU)2017/2470的附件。

据了解,高粱糖浆是以一种高粱的茎秆榨汁制成,在美国南方和中西部有少量生产。它的主要成分是蔗糖,且带有独特辛辣味,在美国有安全食用的历史。因此,欧盟委员会批准将高粱糖浆列入实施法规(EU)2017/2470中建立的授权新型食品清单中,其新型食品清单中的条目应包括本法规附件中规定的使用条件和标签要求。标签要求为在含有这种新型食品的食品标签上的名称应为“高粱糖浆”,使用条件未标明。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准高粱糖浆作为新型食品投放市场 [EB/OL]. (2018-12-21). <http://news.foodmate.net/2018/12/499369.htm>.