

重组融合蛋白 MBP-PAI 的表达、纯化及酶活测定

黄昕烟, 张白曦, 陈海琴, 张 灏, 陈 卫*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了解决亚油酸异构酶(Linoleic Acid Isomerase, PAI)在大肠杆菌中形成包涵体的问题, 选择麦芽糖结合蛋白(Maltose-Binding Protein, MBP)标签和低温诱导表达系统 pColdV, 构建了大肠杆菌重组表达菌株 *E.coli* BL21(pCold-Mpai), 并对其诱导表达条件进行了优化。SDS-PAGE 电泳结果显示, 融合蛋白 MBP-PAI 成功表达, 重组菌的最佳诱导表达条件为: 诱导温度 15 ℃、IPTG 添加量 0.1 mmol/L、诱导时间 12 h, 在该诱导条件下, 与未融合 MBP 的 PAI 相比, MBP-PAI 的可溶性表达量为后者的 18 倍、酶活为后者的 1.5 倍。经过 MBPTrap HP 亲和层析柱纯化后, MBP-PAI 纯蛋白质的比酶活为 1.58 U/mg, 能够转化亚油酸形成反 10, 顺 12-共轭亚油酸。

关键词: 亚油酸异构酶; 大肠杆菌; 包涵体; 麦芽糖结合蛋白; 蛋白质纯化

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2020)02-0010-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.02.002

Expression, Purification and Enzyme Activity Determination of Recombination Fusion Protein MBP-PAI

HUANG Xintian, ZHANG Baixi, CHEN Haiqin, ZHANG Hao, CHEN Wei*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to reduce the inclusion bodies of the linoleic acid isomerase (PAI) in *Escherichia coli*, a recombinant expression strain *E.coli* BL21 (pCold-Mpai) was constructed by using maltose-binding protein (MBP) and low temperature induced expression system pColdV, and its induction conditions were optimized. SDS-PAGE showed that the fusion protein MBP-PAI was successfully expressed, and the best induction conditions were: induction temperature 15 ℃, IPTG 0.1 mmol/L and induction time 12 h. Under the best induction conditions, the soluble expression and enzyme activity of MBP-PAI was 18 times and 1.5 times that of PAI, respectively. After purification by MBPTrap HP affinity chromatography column, the enzyme activity of MBP-PAI was 1.58 U/mg, which could convert linoleic acid to *trans* 10, *cis* 12-conjugated linoleic acid.

Keywords: linoleic acid isomerase, *Escherichia coli*, inclusion body, maltose binding protein, protein purification

收稿日期: 2017-12-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31501457)。

* 通信作者: 陈 卫(1966—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

反 10, 顺 12-共轭亚油酸(*t*10, *c*12-CLA)是一种具有两个共轭双键的十八碳二烯酸,是共轭亚油酸最重要的活性单体之一^[1]。*t*10, *c*12-CLA 具有多种生理功能,如减少机体脂肪积累、预防动脉粥样硬化、调节免疫、抗肿瘤等^[2]。该脂肪酸也因此成为目前研究的热点,在食品工业和药品、保健品行业拥有巨大的发展前景。

来源于痤疮丙酸杆菌的亚油酸异构酶(PAI)是惟一一种晶体结构已知的亚油酸异构酶^[3]。由于痤疮丙酸杆菌是一种致病菌,因此将 PAI 在其他宿主微生物中表达迫在眉睫,在这之中研究最多的就是 PAI 在大肠杆菌的表达。研究表明,在大肠杆菌中 PAI 多以不可溶的包涵体形式存在^[4-5];将 PAI 与组氨酸标签 (His-tag)、谷胱甘肽巯基转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 和小分子泛素样修饰蛋白 (Small ubiquitin-like modifier, SUMO) 融合表达也不能有效减少其包涵体的形成, PAI 活性蛋白的表达量依然很低^[6-8],这给 PAI 未来的应用造成了困难。因此,作者通过基因工程手段,将能够提高蛋白质可溶性的标签——麦芽糖结合蛋白 (Maltose-binding protein, MBP) 与 PAI 在低温诱导表达载体 pColdV 中融合表达,通过优化诱导培养条件,提高了 PAI 在大肠杆菌中的可溶性表达水平,并将重组融合蛋白纯化得到了具有活性的可溶性蛋白质。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

菌株 *E. coli* BL21, *E. coli* BL21 (DE3) (pET24a-pai): 均保藏于江南大学生物技术中心;质粒 pColdV: 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 主要试剂

限制性内切酶: 购自 New England Biolabs (北京)有限公司;氨苄青霉素(Amp)、溶菌酶(lysozyme)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG): 购自上海生工生物工程技术有限公司;MBP 亲和层析柱 MBPTrap HP: 由 GE Healthcare 提供;质粒小提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒: 均购自天根生化科技(北京)有限公司;其余试剂: 为国产分析纯产品。全基因合成由金斯瑞生物科技有限公司(南京)提供,本实验所需的引物合成及测序工作均由华大基因完成。

蛋白质纯化所需缓冲液配方如下: 结合缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L

EDTA, pH 7.4), 洗脱缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 麦芽糖, pH 7.4)。

1.3 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胍体积分数 1%, 酵母浸出粉体积分数 0.5%, 氯化钠体积分数 1%, pH 7.0, 高压灭菌 20 min。所需抗生素为 100 μ g/mL 氨苄青霉素。固体培养基是在上述培养基中加入 2 g/L 的琼脂。

1.4 重组融合蛋白质表达载体的构建

以来源于 *E. coli* 编码 MBP 的基因 *malE* (Genbank: AHM36606.1) 为模板, 将 *malE* 基因合成并连接至质粒 pUC57 上, 全基因合成由南京金斯瑞公司完成。分别用 *KpnI*/*HindIII* 限制性内切酶双酶切 pUC57-MBP, 切下 *malE* 基因并切胶回收, 与同样酶切的载体 pColdV 在 16 $^{\circ}$ C 连接反应过夜, 构建 pCold-MBP 重组质粒。

以 PAI 的基因 *pai* (Genbank: AX062088) 为模板, 设计 PCR 扩增引物。上游引物 P1: 5'-CCCAAGCTT ATGTCCATCTCGAAGGATTACACG-3', 下游引物 P2: 5'-GCTCTAGATTACACGAAG AACCGCGTCAC-3', 其中划线部分分别为限制性酶切酶识别位点 *HindIII*/*XbaI*。引物均由华大基因合成。以作者所在实验室前期构建的含有 *pai* 基因的质粒 pET24a-pai 为模板, PCR 扩增基因 *pai*, PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 24 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环。*HindIII*/*XbaI* 双酶切纯化回收后的 PCR 产物, 用并与同样酶切的 pColdV-MBP 载体在 16 $^{\circ}$ C 连接反应过夜, 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 挑选菌落, 质粒抽提并经酶切鉴定筛选阳性单克隆并送至华大基因测序, 构建融合蛋白质表达质粒 pCold-Mpai。

1.5 重组融合蛋白质诱导表达条件的优化

挑取重组菌株单个菌落, 接种于 5 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 再以 2% 的比例转接于 50 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中。

1.5.1 诱导温度对 MBP-PAI 蛋白表达的影响 将重组菌株培养 3~4 h 至 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.5 时, 取 5 支试管, 每管分装扩大培养液 10 mL, 分别将试管放在冰水中冷却培养液到 10、15、20、28、37 $^{\circ}$ C 并放置 30 min, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 分别于 10、15、20、28、37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。以 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min

离心收集菌体,并将其重悬于结合缓冲液中,超声破碎细菌并于 4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为全细胞蛋白质,加入适量 1×蛋白质上样缓冲液,吹打混匀后沸水浴 10 min,利用 SDS-PAGE 电泳分析蛋白质表达情况并确定最佳诱导温度。

1.5.2 诱导剂 IPTG 浓度对 MBP-PAI 蛋白表达的影响 将重组菌株在摇瓶中培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.5 时,取 5 支试管,每管分装扩大培养液 10 mL,分别按 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mmol/L 的终浓度加入诱导剂 IPTG,15 ℃下培养 24 h,离心、破碎菌体后收集上清液作为全细胞蛋白质,利用 SDS-PAGE 分析、比较蛋白质表达量的多少以确定最佳诱导浓度。

1.5.3 诱导时间对 MBP-PAI 蛋白表达的影响 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,在 15 ℃下诱导表达,在培养 3、6、12、18、24 h 时分别取 10 mL 菌液,离心收集菌体并超声破碎,再次离心收集上清液并利用 SDS-PAGE 研究培养时间对重组蛋白质表达的影响。

1.6 最佳诱导条件下 MBP-PAI 蛋白的可溶性表达量比较

将本研究构建的重组菌株在上述最佳诱导条件下诱导表达,取全细胞蛋白质于 4 ℃、12 000 r/min 再次离心 20 min,取上清液即为可溶性蛋白质。将全细胞蛋白质与可溶性蛋白质进行 SDS-PAGE 分析,并与本实验室构建的含有 *pai* 基因的 *E.coli* BL21(DE3) (pET24a-*pai*) 进行可溶性表达比较,以研究融合标签 MBP 对 PAI 可溶性表达的影响。

1.7 MBP-PAI 重组蛋白的纯化

将 MBP 亲和层析柱用结合缓冲液预先平衡,待层析柱完全平衡后,将 MBP-PAI 可溶性蛋白以 0.5 mL/min 的速度缓慢上样至层析柱,静置 0.5 h 使蛋白质与柱填料充分结合;再用结合缓冲液以 1 mL/min 的速度进行洗脱,并同时用紫外检测器(280 nm)和记录仪观察洗脱情况,待洗脱液中无蛋白质后,换含有 10 mmol/L 麦芽糖的洗脱缓冲液洗脱 MBP-PAI 融合蛋白,洗脱速度为 1 mL/min。收集各阶段样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.8 酶活测定

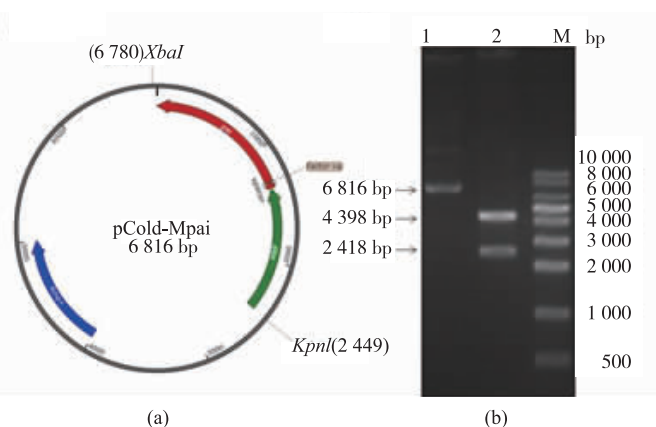
酶活测定方法参考宋宇航酶活测定方法^[9]。将底物 LA 与适量粗酶液或纯化后的蛋白质反应 1 h,经氯仿-甲醇提脂,并用重氮甲烷甲酯化,进行气相色谱测定。

以 LA 转化生成 *t*10,*c*12 -CLA 的转化率代表 PAI 粗酶液的酶活,转化率%=[CLA]/([LA]+[CLA])×100%。以气相色谱结果计算纯蛋白质的比酶活。

2 结果与分析

2.1 融合表达载体 pCold-MPAI 的构建及鉴定

对转化后的阳性克隆子进行鉴定,用 *KpnI*/*XbaI* 双酶切的结果见图 1。双酶切后分别产生大小约为 4 398 bp 和 2 418 bp 的产物,与预期相符。将重组质粒送至测序,序列与 Genbank 比对一致,无移位与突变。



1: 未酶切的 pCold-Mpai; 2: 经 *KpnI*/*XbaI* 双酶切后的片段; M: DNA ladder marker.

图 1 重组质粒 pCold-Mpai 的图谱(a)及双酶切鉴定电泳图谱(b)

Fig. 1 Map of pCold-Mpai (a) and restriction map of pCold-Mpai(b)

2.2 诱导温度对重组蛋白质表达的影响

诱导温度是重组菌体的生长和蛋白质表达的一种重要影响因素。为了探究最佳的诱导温度,将重组蛋白 MBP-PAI(90 000)分别在 10、15、20、28、37 ℃下进行表达,SDS-PAGE 电泳结果见图 2。在诱导温度为 10、15、20 ℃时,灰度扫描分析重组蛋白 MBP-PAI 表达量基本相同,15 ℃表达量略高于其他两组;随着诱导温度继续升高至 28 ℃时,表达量明显降低;诱导温度继续升高为 37 ℃时,MBP-PAI 表达情况与空载体对照相比无差异,灰度扫描分析也证明了 MBP-PAI 无表达。因此,重组菌株的最佳诱导温度为 15 ℃。pColdV 是一个冷休克表达载体,它利用了大肠杆菌的低温表达基因 *cspA* 作为启动子调控蛋白质的表达,因此,较高的温度不利于该启动子发挥其作用,这一结果也与 Qing 的研究一致^[10]。

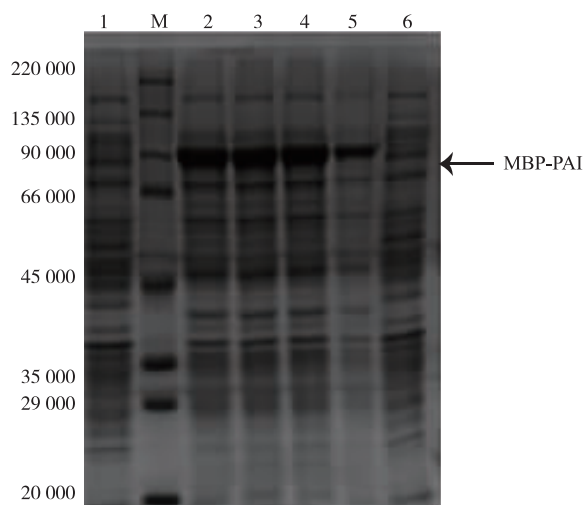


图 2 不同诱导温度对重组蛋白 MBP-PAI 表达的影响

Fig. 2 Effect of different induction temperature on the expression of MBP-PAI

2.3 诱导剂 IPTG 浓度对 MBP-PAI 蛋白表达的影响

为了探究诱导剂对于重组蛋白质表达的影响,设置了 5 个不同的 IPTG 浓度梯度,分别为 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mmol/L。将重组菌株在 15 °C 下诱导 24 h 后,取胞内蛋白质进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 3。与空白对照相比,在这 5 个不同的 IPTG 浓度下重组蛋白质均有表达。当 IPTG 浓度由 0.01 mmol/L 上升至 0.1 mmol/L 时,重组蛋白质的表达量明显增大,在浓度为 0.1 mmol/L 时,蛋白质表达量达到最高;但随着 IPTG 浓度继续增大,表达量明显降低。这证明较高的 IPTG 浓度会影响菌株正常生长,从而影响蛋白质的表达量。为了减少 IPTG 对细菌毒性作用,确定 IPTG 最佳浓度为 0.1 mmol/L。

2.4 诱导时间对 MBP-PAI 蛋白表达的影响

为了使重组蛋白质最大量表达,我们在上述试验的基础上,进一步对诱导表达时间进行了优化,见图 4。在 3~12 h 范围内,随着诱导时间的延长,MBP-PAI 重组蛋白质的表达量逐渐增大;在 12 h 之后,目的蛋白质表达量趋于稳定。为了提高效率,确定诱导表达的最佳诱导时间为 12 h。

2.5 最佳诱导条件下重组蛋白质的可溶性表达情况

在上述确定的最佳诱导条件(诱导温度 15 °C、IPTG 添加量 0.1 mmol/L、诱导时间 12 h)下,比较融合蛋白 MBP-PAI 与非融合蛋白 PAI 的可溶性表达情况,以确定融合标签 MBP 对 PAI 可溶性表达

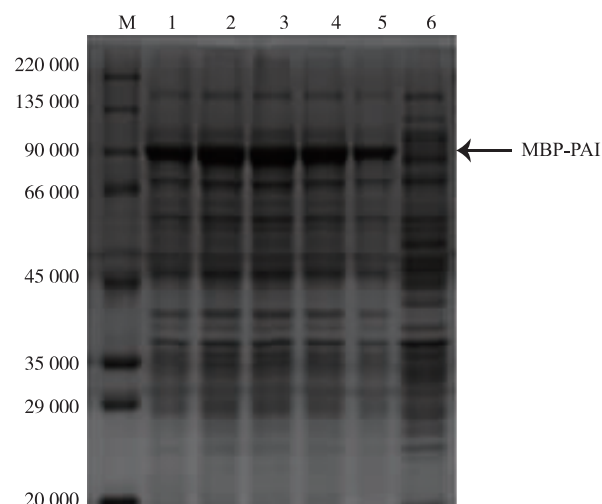


图 3 不同 IPTG 浓度对重组蛋白 MBP-PAI 表达的影响

Fig. 3 Effect of IPTG on the expression of MBP-PAI

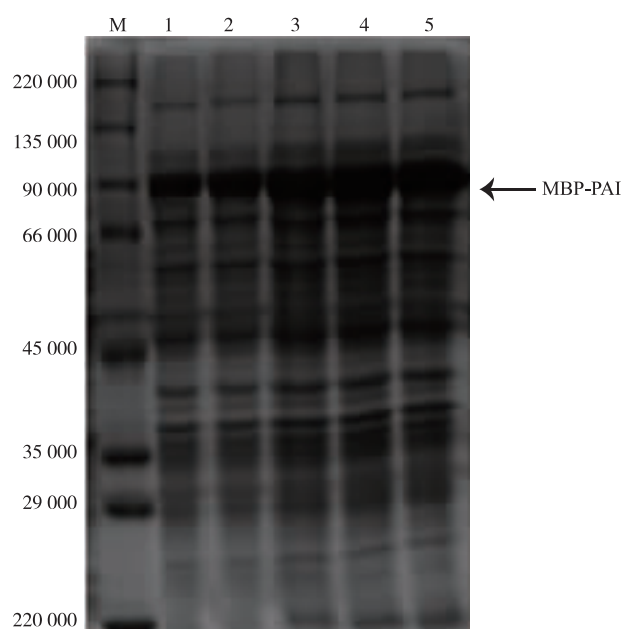


图 4 不同诱导时间对重组蛋白 MBP-PAI 表达的影响

Fig. 4 Effect of induction time on the expression of MBP-PAI

的影响。SDS-PAGE 结果见图 5,泳道 1、2 分别为本实验构建的重组菌株的可溶性蛋白质和全细胞蛋白质,箭头所示为融合蛋白 MBP-PAI 的条带;泳道 3、4 分别为将 pai 基因单独表达的重组菌株 *E.coli* BL21(DE3)(pET24a-pai)的可溶性蛋白质和全细胞蛋白质,箭头所示为 PAI 的条带(50 000)。分析结果显示,融合蛋白 MBP-PAI 在该诱导条件下大量表达,表达量约是 PAI 的 12 倍。同时,在电泳图中可以清楚的看到,重组蛋白 MBP-PAI 大部分以可溶性蛋白质的形式存在,而未与 MBP 融合的 PAI 可溶

性表达量非常低,大部分以包涵体形式存在,二者的可溶性蛋白质的比例约为 18:1 (MBP-PAI:PAI)。证明与 MBP 融合表达后,无论是 PAI 的表达量还是可溶性表达量都大幅提高。

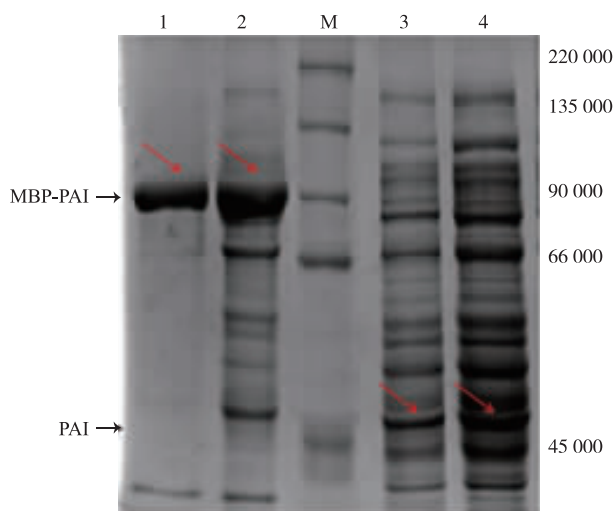


图 5 最佳诱导条件下重组蛋白质的可溶性表达情况

Fig. 5 Soluble expression of recombinant protein under optimal induction condition

2.6 MBP-PAI 重组蛋白的纯化

经 MBP 标签亲和和纯化后的结果见图 6。泳道 1 为最佳诱导表达条件下重组菌株的可溶性蛋白质;泳道 2 为上样后的流出液;泳道 3 为经结合缓冲液洗脱的杂蛋白质,可见有极少量 MBP-PAI 被洗脱下来,但对后续的洗脱影响不大;泳道 4 为洗脱缓冲液洗脱下的蛋白质,可见 MBP-PAI 融合蛋白纯度较高。

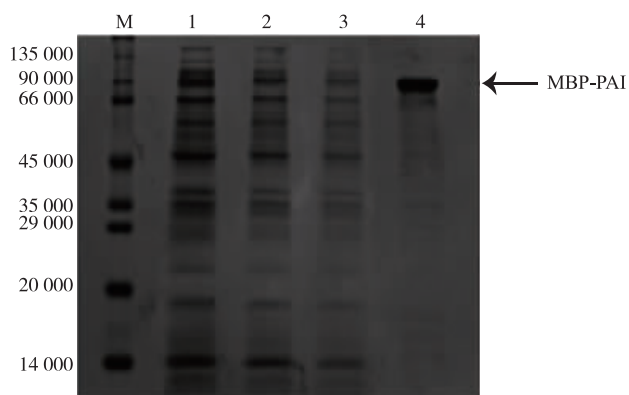


图 6 重组菌株 *E.coli* BL21(pCold-Mpai) 的表达产物纯化及 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 Purification and SDS-PAGE analysis of the expression products of recombinant strain *E.coli* BL21 (pCold-Mpai)

2.7 MBP-PAI 重组蛋白的酶活测定

分别对重组菌株 *E.coli* BL21(pCold-Mpai) 和对照菌株 *E.coli* BL21(DE3)(pET24a-pai) 的粗酶液进行酶活测定并计算其转化率,结果见图 7。重组菌株 MBP-PAI 粗酶液转化率为 66.1%,约是对照菌株的 1.5 倍。这证明融合蛋白质能够转化 LA 形成 *t*10、*c*12-CLA,MBP 能够通过提高 PAI 的可溶性而提高酶的活性。对纯化后的 MBP-PAI 蛋白进行酶活性测定,根据气相色谱测定结果计算得出比酶活为 1.58 U/mg。以上结果是 MBP 融合标签在蛋白质表达中发挥优势作用的又一例证。

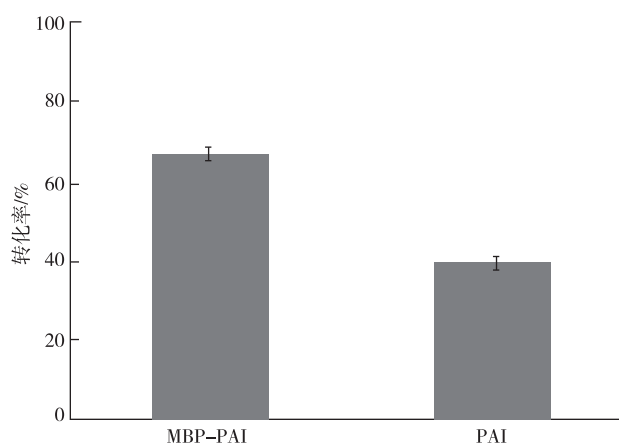


图 7 MBP-PAI 粗酶液与 PAI 粗酶液催化 LA 生成 CLA 的转化率

Fig. 7 Conversion rate of LA to CLA catalyzed by recombinant MBP-PAI and PAI

3 结 语

目前,大部分重组蛋白质使用的表达载体是大肠杆菌细胞,这是因为大肠杆菌表达的外源蛋白质质量大,通常达到细胞内蛋白质总量的 5%~20%,甚至达到 50%以上。但是,由于大肠杆菌细胞缺少折叠机制,当外源蛋白质大量表达时,这些蛋白质通常以包涵体形式存在,这些不可溶的蛋白质甚至可以占到胞内蛋白质的 50%以上,这大大影响了蛋白质在大肠杆菌中的表达和应用。PAI 酶在大肠杆菌中的表达就出现上述情况^[3-6,8]。

为了解决这一问题,作者利用 MBP 与 PAI 融合表达,并结合低温诱导型启动子 *cspA* 的特性,将 PAI 在大肠杆菌中融合表达。MBP 是一种来自大肠杆菌周质的高可溶性蛋白质,常被当作促溶标签与目的蛋白质融合表达以提高可溶性。研究表明,当

麦芽糖结合在融合环境中使用时,MBP 通过显示分子伴侣的内在性质来促进目标蛋白质的溶解,同时,MBP 还能够促进靶蛋白的适当折叠,有利于靶蛋白的构象和活性中心的恢复^[11]。cspA 是一种低温诱导型启动子,启动强度较弱,在较低的温度下可以使目的蛋白质的表达较为缓慢,有利于蛋白质的折叠及细胞对蛋白质的加工和转运,从而形成更多具有活性的可溶性蛋白质^[12]。本研究构建的重组菌株 *E.coli* BL21 (pCold-Mpai) 结合了上述两者的优势,将 PAI 在大肠杆菌中高效可溶性表达,其最佳

诱导表达条件为诱导温度 15 ℃、IPTG 添加量 0.1 mmol/L、诱导时间 12 h。在该诱导条件下,与未融合 MBP 的 PAI 相比,MBP-PAI 的表达量是后者的 12 倍,可溶性表达量是后者的 18 倍。同时,与未融合的 PAI 相比,重组蛋白 MBP-PAI 的粗酶液酶活是前者的 1.5 倍,纯化后的融合蛋白 MBP-PAI 比酶活为 1.58 U/mg,是目前报道的较高水平。本研究结果不仅提供了减少 PAI 包涵体的解决方法,还为 PAI 在工业中生产 *t10,c12*-CLA 奠定了基础。

参考文献:

- [1] WANG W, YANG H, YANG T K. Analysis of conjugated linoleic acid isomers by gas chromatography[J]. **Journal of Food and Biotechnology**, 2012, 31 (11): 1226-1231. (in Chinese)
- [2] LI K, ZHOU N, LI H Y, et al. Studies on physiological function of conjugated linoleic acid[J]. **Food Research and Development**, 2012, 33 (7): 226-228. (in Chinese)
- [3] LIAVONCHANKA A, HORNING E, FEUSSNER I, et al. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006, 103(8): 2576-2581.
- [4] ZHANG B X, XU Z K, WANG C P, et al. His-tag effect on solubility of linoleic acid isomerase produced in *E. coli* [J]. **Food Industry Technology**, 2012, 33 (18): 217-220. (in Chinese)
- [5] DENG M D, GRUND A D, SCHNEIDER K J, et al. Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes*: purification, characterization, molecular cloning, and heterologous expression[J]. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, 2007, 143(3): 199-211.
- [6] LIAVONCHANKA A. Structure and biochemistry of polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*[D]. Göttingen: Georg August University Göttingen, 2007: 45-47.
- [7] LUO X, ZHANG L, LI H, et al. Comparison of enzymatic activity of two linoleic acid isomerases expressed in *E. coli* [J]. **Molecular Biology Reports**, 2013, 40(10): 5913-5919.
- [8] HORNING E, KRUEGER C, PERNSTICH C, et al. Production of (10E, 12Z)-conjugated linoleic acid in yeast and tobacco seeds [J]. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular & Cell Biology of Lipids**, 2005, 1738(1-3): 105-114.
- [9] 宋宇航.生物催化法合成反10,顺12-共轭亚油酸的研究[D].无锡:江南大学,2016.
- [10] Qing G, Ma L C, Khorchid A, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*[J]. **Nature Biotechnology**, 2004, 22(7): 877-882.
- [11] COSTA S, ALMEIDA A, CASTRO A, et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2014, 5(63): 22-26.
- [12] XIA B, ETCHEGARAY J P, INOUE M. Nonsense mutations in cspA cause ribosome trapping leading to complete growth inhibition and cell death at low temperature in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276(38): 81-88.