

马文君,滕琳,王培培,等. 基因共表达对人源 LysoPLD 异源可溶性表达、纯化及酶学性质的影响 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 102-109. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060091

MA Wenjun, TENG Lin, WANG Peipei, et al. Effect of Gene Co-expression on Heterologous Soluble Expression, Purification and Enzymatic Properties of Human LysoPLD[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 102-109. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060091

· 生物工程 ·

基因共表达对人源 LysoPLD 异源可溶性表达、纯化及酶学性质的影响

马文君^{1,2},滕琳³,王培培²,卫宏远¹,郑春阳²

(1.天津大学,天津 300350;

2.天津强微特生物科技有限公司,天津 300384;

3.守正创新生物科技(天津)有限公司,天津 300384)

摘要:目的:为实现人源溶血磷脂酶 D (LysoPLD) 的原核异源可溶性表达。方法:通过 NCBI 检索,确定人源 LysoPLD 基因序列 (GenBank: L46720.1)。采用密码子优化后的序列,克隆至 pET-28a 表达载体中,采用共表达麦芽糖结合蛋白融合标签 (MBP) 和共表达促蛋白正确折叠分子伴侣触发因子 Trigger factor (tig) 两种方式提高 LysoPLD 蛋白在大肠杆菌中的异源可溶性表达,建立对应蛋白的纯化工艺包括离子柱纯化,硫酸铵盐析,疏水柱纯化,淀粉树脂柱 (Amylose Resin) 纯化,分离纯化获得的重组酶,经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定蛋白纯度,以对羟基棕榈酸酯为底物对比两种蛋白的酶学性质。结果:成功构建载体 pET28a-MBP-LysoPLD 和 pET28a-pTF16-LysoPLD,并获得工程菌 BL21 (DE3) -pET28a-MBP-LysoPLD 和 BL21 (DE3) -pET28a-pTf16-LysoPLD。BL21 (DE3) -pET28a-MBP-LysoPLD 经 0.6 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 低温诱导过夜可获得上清表达的 MBP-LysoPLD 蛋白;BL21 (DE3) -pET28a-pTf16-LysoPLD 在含有 0.5 μg/mL L-Arabinose 的 LB 培养基中培养,经 0.1 mmol/L IPTG 低温诱导表达,可获得可溶性表达的 LysoPLD 蛋白,经纯化,酶纯度可大于 80%。以对羟基棕榈酸酯为底物,对比两种方法得到的蛋白的酶学性质,发现二者催化反应的最适温度、最适 pH、最适 Ca²⁺浓度、比酶活基本一致。结论:两种基因共表达方式都可实现人源 LysoPLD 的在大肠杆菌中的可溶性表达,且酶学性质基本相同。

关键词:人源溶血磷脂酶 D,异源可溶性表达,麦芽糖结合蛋白融合标签,触发因子,酶学性质

中图分类号:Q 789

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)07-0102-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060091

Effect of Gene Co-expression on Heterologous Soluble Expression, Purification and Enzymatic Properties of Human LysoPLD

MA Wenjun^{1,2}, TENG Lin³, WANG Peipei², WEI Hongyuan¹, ZHENG Chunyang²

(1.Tianjin University, Tianjin 300350 China;

2.Robustnique Corporation Ltd., Tianjin 300384, China;

3.Integribiotech Corporation Ltd., Tianjin 300384, China)

Abstract: Objective: This study aimed to express soluble human LysoPLD in *Escherichia coli*. Methods: Human LysoPLD gene sequence (GenBank: L46720.1) was retrieved from NCBI and synthesized chemically. The codon optimized sequence was cloned into pET-28a vector and transformed to the *E. coli* BL21(DE3) strain which was co-expressed with maltose binding protein fusion tag (MBP) or co-expressed with a pTF16 chaperone plasmid, then induced by isopropyl thiogalactoside (IPTG). The downstream purification process was established, including ion column elution, ammonium sulfate salting out, hydrophobic column purification, and amylose resin purification. The LysoPLD purity was determined

收稿日期: 2020-06-09

作者简介: 马文君 (1990-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: mwj9061@163.com。

by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the enzymatic properties were determined by catalytic reaction of p-hydroxypalmitate. Results: The plasmids pET28a-MBP-LysoPLD and pET28a-pTf16-LysoPLD were constructed, then transformed into the *E. coli* BL21(DE3) strain respectively. BL21(DE3)-pET28a-MBP-LysoPLD was induced by 0.6 mmol/L IPTG, and incubated overnight to obtain MBP-LysoPLD protein; BL21(DE3)-pET28a-pTf16-LysoPLD was cultured in LB medium containing 0.5 $\mu\text{g/mL}$ L-arabinose then induced by 0.1 mmol/L IPTG, the soluble LysoPLD was obtained. After downstream purification, the purity of the human LysoPLDs expressed through both methods were more than 80%. It was found that using p-hydroxypalmitate as substrate, the optimum reaction conditions including optimal temperature, pH and Ca^{2+} concentration for both LysoPLDs were basically the same. Conclusion: In this study, two different methods for improving soluble expression of human LysoPLD in *E. coli* were established and proved to be successful. The purified human LysoPLDs were enzymatically active, and the enzymatic activity were basically the same.

Key words: human LysoPLD; prokaryotic soluble expression; maltose binding protein; trigger factor; enzymatic properties

磷脂酶是催化磷脂水解的第一步关键酶, 根据水解磷脂的部位不同可以把磷脂酶分为磷脂酶 A1、磷脂酶 A2、磷脂酶 B、磷脂酶 C 和磷脂酶 D^[1]。磷脂酶 D(PLD) 是一个复杂的蛋白家族, 普遍存在于哺乳动物、植物和细菌中^[2-3]。磷脂酶 D 能够水解细胞膜中的磷脂, 其水解产物参与细胞的多种生理过程如抗凋亡、伤口愈合、促进血管生成、神经系统发育、肿瘤进展等^[4-5]。人溶血磷脂酶 D(LysoPLD) 因其与 PLD 的氨基酸序列具有相似性, 也具有磷脂酶活性。作为 PLD 家族一员, 它不仅可以在水解溶血磷脂分子中磷酸二酯键生成溶血磷脂酸(LPA) 和一个自由的头部基团, 还能够催化磷脂和某些醇类发生碱基交换反应生成另一种磷脂^[6-8]。

在食品工业中, PLD 广泛作用于多种磷脂, 以卵磷脂为底物, 富集自然界稀少、难以分离提纯的单体磷脂, 如磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI) 和磷脂酰甘油(PG) 等, 这些磷脂都具有非常高的经济价值^[9-11]。如磷脂酰丝氨酸, 是一种新资源食品, 具有改善阿尔兹海默症、治疗抑郁症和缓解精神压力等作用, 市场前景十分广阔^[12-13]。酶法合成磷脂酰丝氨酸主要取决于 PLD 催化作用, 但市售的 PLD 主要是从植物中提取, 存在的问题主要是种类少、活力低、价格高。鉴于 LysoPLD 的 PLD 活性及其人源的低免疫原性, 采用微生物异源表达 LysoPLD 具有解决市售 PLD 存在问题的潜力。

如何提升外源蛋白高效、可溶表达一直是工业酶生产与应用的瓶颈。目前, 多个课题组尝试了磷脂酶 D 的异源表达, 大多呈包涵体表达^[14-15]。由于蛋白表达速度过快、活性二硫键来不及正确配对等原因, 外源蛋白在大肠杆菌胞内往往会以无活性的包涵体形式表达。由于包涵体复性折叠机制不明确, 把无活性的包涵体复性为完全的天然活性状态不仅操作繁琐而且复性效率较低。较低的复性效率依然是大肠杆菌体系表达的许多外源蛋白造成损失或者难以有效制备的主要原因^[16]。原核表达系统及可溶性表达优化确实均属于非常成熟的技术, 但在重组蛋白的表达过程中, 合适的载体和分子伴侣对重组蛋白的正

确折叠, 防止包涵体的形成具有积极作用^[17]。因此在实践过程中需要对不同标签蛋白和分子伴侣进行大量的筛选研究, 确定合适的促溶表达条件。本研究首次尝试用触发因子(Triggering factor, Tig), 作为第一个与新生多肽链相互作用的伴侣分子, 以期协助 LysoPLD 蛋白共翻译折叠, 有效促进其可溶表达。

前人通过定点突变研究发现, LysoPLD 的活性中心(LysoPLD 催化结构域) 位于胞外结构域的 Thr-210 到 His-475 序列附近^[18], 确定含有 Ser 48 的 C 末端的胞外结构域是 LysoPLD 的主体, 可以获得可溶、具有活性的重组分子^[19]。在此基础上, 本研究在大肠杆菌中分别构建含促溶标签 MBP 和分子伴侣 tig 共表达两种促 LysoPLD 可溶表达体系, 并研究了两种促溶体系对重组蛋白的可溶表达、纯化方法、酶活性等方面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株和质粒大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、*Escherichia coli* BL21(DE3) 均由本实验室保存; pET28a-MBP 质粒 由本实验室保存; Chaperone Competent Cells pTf16/BL21 Takara 公司; pET28a-MBP-PLD 本实验构建; 限制性内切酶 美国 NEB 公司; 胶回收试剂盒 美国 Promega 公司; 质粒小提试剂盒 中国天根生物公司; SDS-PAGE 电泳凝胶试剂盒、高保真 PCR 聚合酶 天津强微特生物科技有限公司; 实验所用纯化填料 美国 GE 公司; 麦芽糖等其他试剂 为国产分析纯。

AKTApurifier TM100 纯化系统 美国 GE 公司; SCIE10TI-IID 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; Bio-rad PowerPac HV 垂直电泳仪 美国 Bio-Rad 公司; BioDoc-It2 315 Imaging System 凝胶成像系统 美国 UVP 公司; GL-21M 高速冷冻离心机 中国湘仪公司; UV3100 紫外可见光分光光度计 日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人源 LysoPLD 基因的克隆及载体构建 根据

NCBI 上人 LysoPLD(ENPP2)基因编码的氨基酸序列信息及催化反应的信息,确定本实验的目的克隆序列。通过信号肽分析程序(<http://www.detaibio.com/tools/index.php?r=signal-peptide/index>)对此序列进行信号肽分析,确定 Ser-48 至 C 末端全序列为本研究的目的基因序列。经密码子优化后,由通用生物合成目的基因序列,获得质粒 pET28a-LysoPLD 质粒。通过 Snapgene 设计麦芽糖结合蛋白(MBP)上下游引物,将 MBP 作为促溶标签与人 LysoPLD 基因融合表达,上游引物 P1: 5'-GTTTAACTTTAAG AAGGAGATATACC atgaaatcgaagaaggtaaactg; 下游引物 P2: 5'-AATATTGGTCCACGGACTCATATT GGATTGGAAGTACAGGTTTTCTCGATCCCagt ctgctgctcttcagggc; 设计用于扩增 pET28a-LysoPLD 骨架的引物,上游引物 P3: 5'-ATGAGTCCGTGGA CCAATATTAG; 下游引物 P4: 5'-GGTATATCTCC TTCTTAAAGTTAAAC。

首先以 P1、P2 为引物对,PCR 扩增 MBP 基因片段,再以 P3、P4 为引物对,PCR 扩增 pET28a-LysoPLD 骨架,PCR 的扩增条件为: 98 °C, 3 min; (98 °C, 10 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 3.5 min) × 30 循环; 72 °C, 7 min; 4 °C, ∞。将得到片段采用胶回收试剂盒进行片段回收,回收的片段以摩尔比 1:3(MBP 片段的摩尔数>pET28a-LysoPLD 骨架的摩尔数)于室温采用同源重组的方法连接 1 h,连接产物转化 *E.coli* DH5 α 感受态,筛选阳性克隆,并进行测序鉴定。经鉴定的重组表达载体为 pET28a-MBP-LysoPLD,转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞后于 -80 °C 进行保存^[20]。

1.2.2 MBP-LysoPLD 的诱导表达及条件优化 将 -80 °C 保藏的重组表达菌株 pET28a-MBP-PLD-BL21(DE3)复苏后,接种于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C,100 r/min 振荡过夜活化。将活化的 pET28a-MBP-PLD-BL21(DE3)继续扩大培养,接种于 100 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,当菌液 A₆₀₀ 达 0.5~0.7 时,加入 IPTG 诱导表达。6000 × g 离心 10 min 收集菌体,超声破菌后,离心得到菌液上清和沉淀,再用 0.5 mmol/L Tris-HCl 将沉淀复溶,进行 SDS-PAGE 分析,配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,恒定功率 10 W 跑 45 min^[21]。

1.2.3 Tig 分子伴侣与 PLD 共表达实验 Takara 公司的 pTf16 质粒中存在 tig 表达基因,受 araB 启动子调控,pET28a-LysoPLD 质粒中目的基因 LysoPLD 受 Lac 调控系统控制,两个质粒具有不同的抗生素标记可进行共表达,且 tig 和 LysoPLD 可独立诱导表达^[22]。将 pET28a-LysoPLD 和 pTf16 两个质粒同时转化 BL21(DE3),采用双抗 LB 培养基(25 μ g/mL 卡那霉素和 17 μ g/mL 氯霉素)筛选同时具有两种质

粒的转化子,-80 °C 冻存。取出转化子,接种到双抗培养基中,37 °C 振荡培养活化;活化后,接种于 100 mL 含双抗和 0.5 mg/mL L-Arabinose 的 LB 培养基中进行扩大培养(此时已开始表达 Tig),当 A₆₀₀ 达 0.4~0.6 时,于 15 °C 放置 30 min,加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 于 15 °C 振荡培养 12~24 h。培养结束后,6000×g 离心 10 min 收集菌体,超声破菌,根据 SDS-PAGE 电泳(具体方法同 1.2.2)、活性测定结果确认目的产物的表达量及溶解性。

1.2.4 重组 LysoPLD 的纯化 MBP-LysoPLD 的纯化:将诱导后收集的 pET28a-MBP-LysoPLD 的 BL21(DE3)菌体均匀悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)溶液中,经超声破菌后,20000×g 离心 20 min,收集上清,经 0.45 μ m 滤膜过滤后,采用 Amylose 亲和柱进行纯化。采用 Amylose-A(20 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 0.2 mol/L NaCl)进行洗涤、平衡,得到流穿蛋白,采用 Amylose-B(20mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 0.2 mol/L NaCl, 10 mmol/L 麦芽糖)进行洗脱,收集洗脱组分,得到洗脱收集蛋白,进行 10%SDS-PAGE 分析,具体方法同 1.2.2。

LysoPLD(tig)的纯化:将诱导后收集的同时含有 pTf16(tig)和 pET28a-LysoPLD 的 BL21(DE3)菌体,均匀悬浮于 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)溶液中,经超声破碎后,20000×g 离心 20 min,收集上清,过 0.45 μ m 滤膜。首先采用 SP 柱,经 SP-A(20 mmol/L Tris-HCl(pH6.0))洗涤后,得到流穿蛋白。采用 SP-B(20 mmol/L Tris-HCl(pH6.0), 1 mol/L NaCl)进行洗脱,洗脱流速为 1 mL/min,洗脱梯度为 0~100% B,10 min 收集洗脱组分,得到洗脱收集蛋白。再过 Q 柱纯化,经 Q-A Buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 5%Glycerol)洗涤后,得到流穿蛋白,采用 Q-B Buffer(20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA, 5%Glycerol, 1 mmol/L NaCl)进行洗脱,收集洗脱组分,得到洗脱收集蛋白,将上述得到的蛋白进行 10%SDS-PAGE 分析,具体方法同 1.2.2。

1.2.5 LysoPLD 的酶活测定 LysoPLD 的酶活测定方法参考对硝基苯酚方法^[23],对硝基苯酚粉末用 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)进行溶解并稀释,溶液浓度梯度为 0、0.005、0.01、0.02 和 0.04 μ mol/L,并测定其在波长为 405 nm 的分光光度值拟合得到对应标准曲线为 $y=28.36x, R^2=0.9991$ 。

取 30 mg 对硝基酚棕榈酸酯溶于 10 mL 异丙醇后,用含 10% Triton-100 的 Tris-HCl(pH8.0)的溶液混合溶解,放入 37 °C 恒温水浴 5 min,加入适量酶液,测定 405 nm 处紫外分光光度值随时间变化的曲线,算出每分钟吸光值的值,酶水解活力计算公式为:

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{\Delta A \times V}{K \times V_s \times T} \times 277$$

式中, ΔA 为酶促反应的吸光变化值; V 为测量试样总体积; V_s 为所加酶液体积; K 为对硝基酚标准曲线斜率; T 为反应时间; 277 为转化系数。

1.2.6 最适温度、最适离子浓度和最适 pH 将重组酶置于含有 50 mmol/L CaCl_2 的 40 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中, 在 20~80 °C 温度范围内, 每间隔 10 °C 进行酶反应, 研究温度对重组酶活性的影响。

将 50 μL 20 mmol/L 的重组酶添加到含有底物和 100 μL 10、50 和 100 mmol/L 不同金属离子 (Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 的溶液中后测量活性。另外, 以 40 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 溶液为缓冲液进行对照。通过将不同因素的酶活性除以对照组的 100%, 计算出重组酶的相对活性(%)。

参照侯海娟等的方法, 将纯化得到的两种磷脂酶 D (10 μL) 在 50 °C 下预孵育 30 min, 以含有对硝基酚棕榈酸酯的反应混合物为底物, 以 40 μL 不同 pH (5.0~8.5) 缓冲液 100 mmol/L 乙酸盐、50 mmol/L 三氯化甘油和 8 mmol/L CaCl_2 作为缓冲液进行反应。

将 20 mmol/L 50 μL 的重组酶添加到含有底物对硝基酚棕榈酸酯和不同浓度 (0、10、25、45 和 100 mmol/L) Ca^{2+} 离子 (100 μL) 的溶液中后测量活性。另外, 以 Triton X-100 溶液为缓冲液进行对照。通过将不同因素的酶活性除以对照组的 100%, 计算出重组酶的相对活性(%)。

1.3 数据处理

实验中每个处理重复 3 次, 采用 SPSS 22.0 软件进行数据显著性分析, 应用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 pET28a-LysoPLD 和 pET28a-MBP-LysoPLD 质粒的构建与鉴定

根据前述方法, 通过 PCR 分别扩增 MBP 片段 (~1100 bp, 图 1A) 和 pET28a-LysoPLD 骨架 (~7700 bp, 图 1B), 同源重组后, 获得的质粒采用 T7/T7t 引物对, 对转化子进行 PCR 扩增鉴定, 并采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 出现 ~3500 bp 的扩增产物, 其大小恰好与 MBP (~1100 bp) + LysoPLD (~2400 bp) 大小相吻合 (图 1C)。重组质粒经抽提测序, BLAST 比对, 与目的基因序列相符, 未发生突变, 表明 pET28a-MBP-LysoPLD 载体构建成功。

2.2 pET28a-MBP-LysoPLD-BL21 (DE3) 的诱导表达分析

分别培养 pET28a-LysoPLD-BL21 (DE3) 和 pET28a-MBP-LysoPLD-BL21 (DE3), 并经 IPTG 诱导, 收集菌体, 超声破菌, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。如图 2A 可以看出, 诱导后的全菌在 110 kDa 处有一明显蛋白质条带, 但上清中却并未发现此蛋白的表达 (图 2A, 泳道 3), 都在沉淀中 (图 2A, 泳道 4), 证明没有 MBP 标签的 LysoPLD 蛋白几乎全部呈包涵体表达。MBP 是一种大肠杆菌的内源性的蛋白质, 由大肠杆菌 K12 的 *malE* 基因编码, 分子量为 40 kDa^[24], 在大肠杆菌中具有极高的表达量。在目的蛋白的氨基端添加 MBP 标签蛋白时, 可大幅度地提高目的蛋白的可溶性表达量, 并且可帮助目的蛋白在大肠杆菌中正确折叠并保持原有的活性^[25]。因此。本实验构建了 pET28a-MBP-LysoPLD, 将 LysoPLD 蛋白与 MBP 进行融合表达, 融合蛋白 MBP-LysoPLD 分子量大于 116 kDa 红色箭头标示

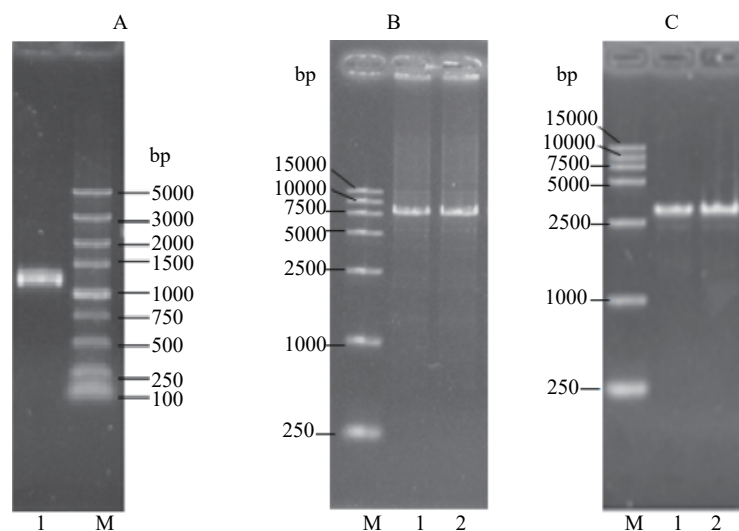


图 1 MBP 基因、pET28a-LysoPLD 载体骨架和 pET28a-MBP-LysoPLD 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig.1 PCR amplification and identification of MBP gene, pET28a-LysoPLD and pET28a-MBP-LysoPLD

注: M: DNA Marker; 泳道 1 (或 2): PCR 扩增的电泳条带; A: MBP 基因的 PCR 扩增片段; B: pET28a-LysoPLD 载体骨架的 PCR 扩增片段; C: pET28a-MBP-LysoPLD 中 PCR 扩增片段鉴定电泳图。

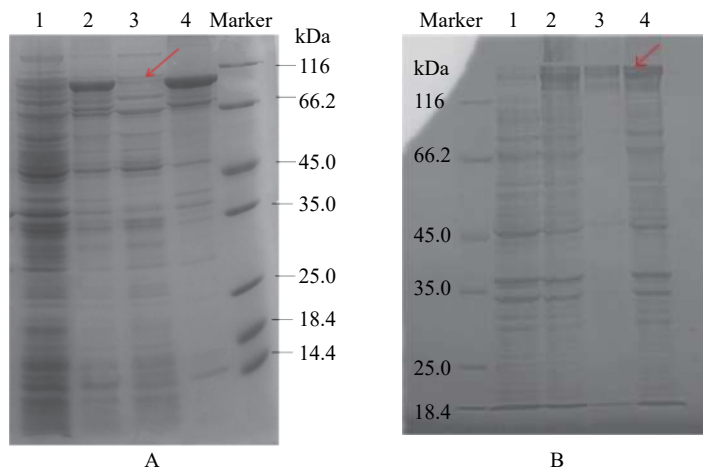


图 2 大肠杆菌表达的重组 PLD 和 MBP-LysoPLD 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Analysis of the recombinant of LysoPLD and MBP-LysoPLD expressed in *E. coli* by SDS-PAGE

注: A 中泳道 1~4 分别代表大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达前全菌, 诱导表达后全菌, 诱导表达后超声破碎离心得到的上清, 诱导表达后超声破碎离心得到的沉淀; B 中泳道 1~4 分别代表分别代表大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达前全菌, 诱导表达后全菌, 诱导表达后超声破碎离心得到的沉淀, 诱导表达后超声破碎离心得到的上清。

的条带,由图 2B 显示,大约 1/3 的 MBP-LysoPLD 可在诱导表达后超声破碎离心得到的上清中表达(图 2B,泳道 4)。后续通过发酵工艺的优化,目的蛋白质的可溶表达量可能会有进一步的提高。

2.3 Tig 与 LysoPLD 的共诱导表达分析

鉴于 LysoPLD 的原核表达主要以包涵体形式存在,除了用促溶标签的方法,本实验还尝试了共表达分子伴侣 Tig 的方法。如图 3 所示,在加入 IPTG 诱导前(图 3,条带 1)就已经在 50 kDa 左右出现了 tig 的诱导表达条带,在加入 IPTG 后,在 66.2~116 kDa 区间出现 LysoPLD 目的蛋白(图 3,条带 2),部分呈上清表达(图 3,条带 3),部分在破菌后离心沉淀中,即呈包涵体表达(图 3,条带 4),包涵体蛋白没有经过正确折叠的聚集体,不具备其应有的生物活性。对比 SDS-PAGE 图 2B 第 4 条泳道和图 3 中第 3 条泳道破菌离心的上清结果得到的可溶蛋白

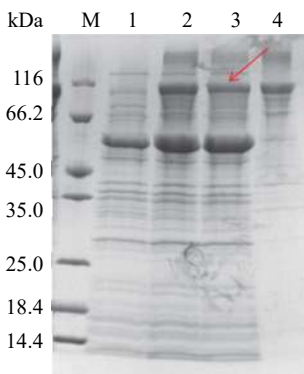


图 3 大肠杆菌表达的重组 LysoPLD(tig)的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 Analysis of the recombinant of pTf16-LysoPLD(tig) expressed in *E. coli* by SDS-PAGE

注: M: Marker; 1: 诱导表达前全菌; 2: 诱导表达后全菌; 3: 诱导表达后超声破碎离心后得到的上清; 4: 诱导表达后超声破碎离心后得到的沉淀。

量大于促溶标签法。tig 分子伴侣促溶法在诱导表达操作上较复杂,但经诱导表达后可直接获得 LysoPLD 蛋白本身。而促溶标签法诱导表达的是融合蛋白,后续需要把促溶标签通过蛋白酶进行切除后再纯化。

2.4 LysoPLD (tig) 和 MBP-LysoPLD 的分离纯化比较分析

根据 MBP 标签特性,本实验采用了 Amylose 亲和柱层析对 MBP-LysoPLD 融合蛋白的纯化,目标蛋白条带大于 116 kDa,对 Amylose 亲和柱吸附特异性强,可以被洗脱,结果如图 4 箭头所示,最终条带 3 为目标蛋白 MBP-LysoPLD,所得最终样品约 4 mL,浓度 0.46 mg/mL,根据凝胶成像分析系统分析其纯度达到 90% 以上。

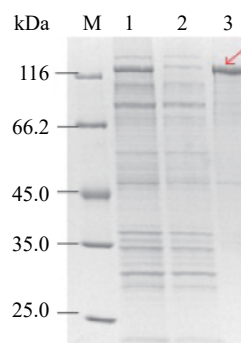


图 4 Amylose Resin 纯化洗脱 MBP-LysoPLD
Fig.4 Purification and elution of MBP-LysoPLD by Amylose Resin

注: M:Marker;1: 上 Amylose 亲和柱前总蛋白; 2: 经 Amylose 亲和柱流穿的蛋白; 3: 经 Amylose-B 洗脱收集的蛋白。

tig 协助下的 LysoPLD 蛋白表达菌株经超声破碎,细胞上清液依次经过 SP 琼脂糖凝胶柱(图 5A)和阴离子 Q 柱(图 5B),进行目的蛋白洗脱,最终获

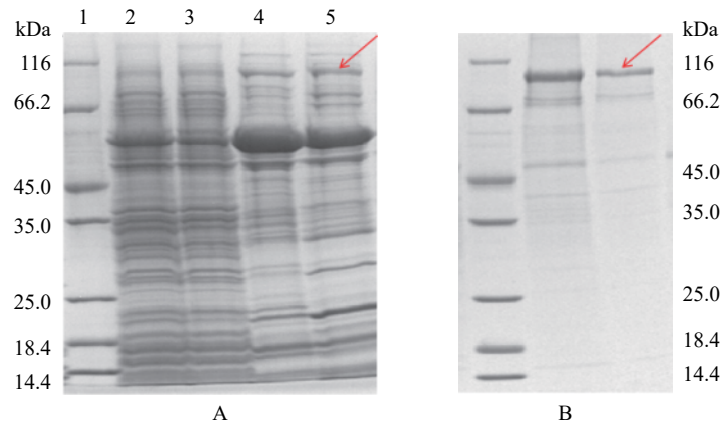


图 5 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified PLD protein

注: A: SP 琼脂糖凝胶柱 LysoPLD 蛋白洗脱 SDS-PAGE 电泳图; 泳道 1~5 分别为 1: Marker; 2: 上 SP 琼脂糖凝胶柱前总蛋白; 3: 经 SP 琼脂糖凝胶柱流穿的蛋白; 4: 经 SP-B 洗脱后收集的蛋白; 5: 经 SP-B 洗脱后收集的蛋白; (B): 阴离子柱(Q 柱) LysoPLD 蛋白洗脱 SDS-PAGE 图; 1, Marker; 2, 经 Q-B 洗脱后收集的蛋白; 3, Q-B 洗脱后收集的蛋白。

得分子量为 110 kDa 的目标蛋白(图 5B)。在设计 LysoPLD 的表达时, PLD 序列设计了 His 标签, 但无论 His 标签在 C 端或在 N 端, PLD 蛋白都无法挂 Ni 柱(结果未示出), 因此采用离子交换柱 Q 柱进行 PLD 蛋白的纯化, 根据凝胶成像分析系统分析其纯度达到 80% 以上。

比较 tig 协助下的 LysoPLD 蛋白和融合蛋白 MBP-LysoPLD 的分离纯化步骤发现, MBP-LysoPLD 由于存在 MBP 标签, 只采用 Amylose 亲和层析就可以得到纯度在 90% 的融合蛋白, 但后续也会涉及采用 TEV 进行 MBP 标签切割步骤; 而 tig 协助下的 LysoPLD 蛋白由于不能挂 Ni 柱纯化, 需要进行两步离子柱洗脱, 在操作方法上来讲较为复杂, 但不需要再进一步切除多余的标签。因此, 从纯化步骤的角度两种方法复杂度类似。

2.5 LysoPLD (tig) 与 MBP-LysoPLD 的酶活比较分析

采用同样 100 mL 发酵液体积, MBP-LysoPLD 融合蛋白得到 4.91 mg, tig 协助折叠的 LysoPLD 蛋白得到 5.79 mg, tig 协助的 PLD 蛋白比融合蛋白 MBP-PLD 得率约高 17.9%。根据 1.2.5 中的酶活测定方法, 分别测定融合蛋白 MBP-LysoPLD 和 tig 协助折叠的 PLD 的酶活力, MBP-LysoPLD 的总活力为 20.98 U, 比活力为 4.27 U/mg, LysoPLD(tig)总活力为 42.61 U, 比活力为 7.32 U/mg (表 1)。

表 1 两种 LysoPLD 酶活性质比较

Table 1 Comparison of two LysoPLD enzyme activity

指标	MBP-PLD	LysoPLD(tig)
总蛋白量(mg)	4.91±0.03	5.79±0.11
总活力(U)	20.98±2.34	42.61±3.05
比酶活(U/mg)	4.27±0.02	7.32±1.24

目前报道的 LysoPLD 蛋白的表达系统有 Sf9 昆虫细胞和 COS-7 细胞表达^[19], 现有结果表明这两类表达系统表达的蛋白缺乏修饰, 蛋白表达量低, 无法满足 LysoPLD 蛋白结构及功能研究, 也有研究者对 LysoPLD 蛋白进行 HEK293 细胞的规模化表达, 但其表达的 LysoPLD 蛋白含有 FC 标签, 标签较大, 后续需要切去标签, 获得蛋白纯度低^[26]。本试验构建的 LysoPLD(tig)可以有效避免切标签带来的操作, 与其他来源的标签相比, 表达效率高, 可溶性效果好, 具有重要的应用价值。

2.6 pH、温度及金属离子对 LysoPLD 酶活的影响比较

图 6(A)表明 LysoPLD 在 pH 为 5.5, 钙离子浓度为 50 mmol/L 时, 其相对酶活的最适温度为 40 °C。温度达到 60 °C 仍保留 50% 的酶活力, 高于 60 °C 时活性降低并逐渐消失。故 LysoPLD 的温度耐受范围在 20~60 °C。不同浓度的金属离子处理 LysoPLD 蛋白, 检测其对 LysoPLD 活性影响(图 6B)可知, 不同金属离子明显影响重组酶的活性, 且呈现浓度依赖性, 尤其是 50 mmol/L 钙离子时, 重组酶活性最高, 与重组酶有 Ca²⁺的结合位点有关, 与相关文献的研究结果一致^[27]。

LysoPLD 的酶催化功能依赖于 Ca²⁺离子, 同时 pH 对其酶活的影响也很大, 因此, 本研究对比了 LysoPLD(tig)和 MBP-LysoPLD 在 Ca²⁺离子依赖性 & 最佳 pH 方面的特性^[28](图 7)。结果发现, 两种 LysoPLD 均呈现显著 Ca²⁺的依赖性。随着 pH 的提高, 在不同钙离子浓度作用下, 两种 PLD 的相对酶活均呈现先增高后降低, 且 LysoPLD(tig)和 MBP-LysoPLD 二者的最佳 pH 都在 5.5~5.6 之间, 最佳酶活时需要的钙离子浓度是 45 mmol/L。因此, 通过 PLD(tig)及 MBP-LysoPLD 蛋白的酶活特性比较分析可以发现, 在最适 pH 和最适钙离子浓度条件下, 两种酶的相对酶活均达到 90% 以上, 因此, 促溶标签

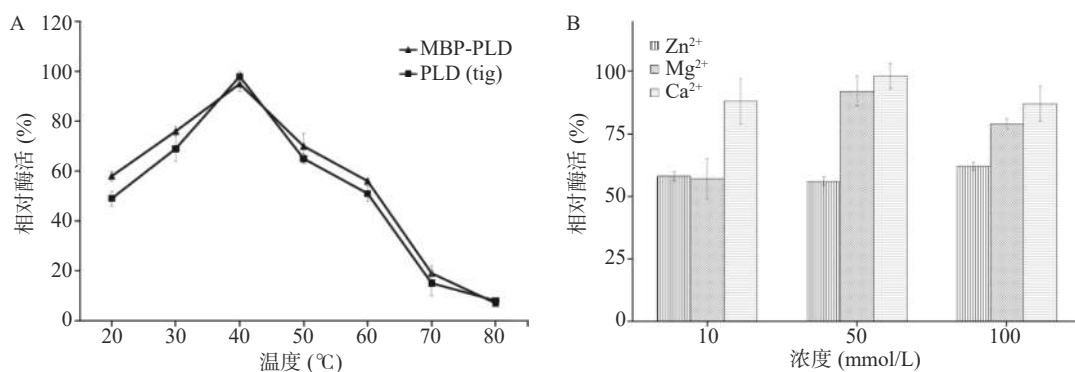


图6 LysoPLD(tig)与MBP-LysoPLD在不同温度相对酶活(A)和LysoPLD(tig)在不同金属离子下相对酶活(B)
Fig.6 Relative enzyme activities of LysoPLD (tig) and MBP-LysoPLD at different temperature (A) and LysoPLD (tig) at different metal ions (B)

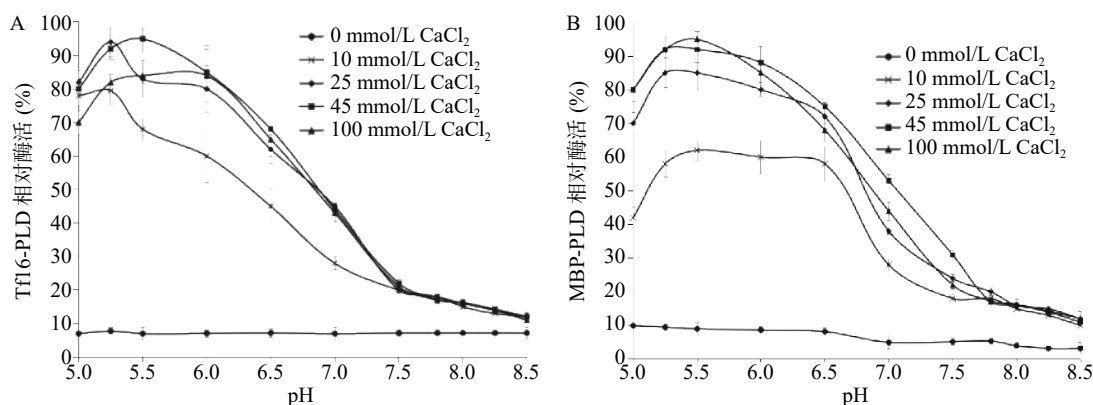


图7 PLD(tig)与MBP-LysoPLD在不同pH和浓度Ca²⁺下相对酶活
Fig.7 Relative enzyme activities of LysoPLD (tig) and MBP-LysoPLD at different pH and Ca²⁺ concentration

法和tig共表达方法都可获得发挥正常功能,具有一致特性的LysoPLD。

3 结论

成功构建了人PLD的原核表达质粒pET28a-pTf16-LysoPLD(tig)和pET28a-MBP-LysoPLD,建立了LysoPLD(tig)和MBP-LysoPLD蛋白大肠杆菌促进可溶性表达系统,获得了纯度80%以上的LysoPLD蛋白。两种LysoPLD酶反应最适pH在5.5~5.6之间,最佳酶活时需要的钙离子浓度是45 mmol/L,两种促进可溶性表达方式都可以获得具有一致特性的LysoPLD。

参考文献

[1] 叶展,罗质,何东平,等.酶法脱胶及其在大豆油适度精炼中的应用[J].食品工业,2015,36(1):258-261.
[2] 刘茂希.缺氧微环境中HIF1- α 上调PLD2表达进而抑制结肠癌细胞凋亡的机制研究[D].重庆:重庆医科大学,2016.
[3] 陈雷.玉米磷脂酶D基因家族的克隆及功能分析[D].雅安:四川农业大学,2017.
[4] Hong Y Y, Zhao J, Guo L, et al. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses[J]. *Progress in Lipid Research*, 2016, 62: 55-74.
[5] Cholia R P, Nayyar H, Kumar R, et al. Understanding the

multifaceted role of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (ENPP₂) and its altered behaviour in human diseases[J]. *Current Molecular Medicine*, 2015, 15(10): 932-943.
[6] Koike S, Keino-Masu K, Ohto T, et al. The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin(ENPP₂) functions as a signal peptide[J]. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2006, 11(2): 133-142.
[7] Magotti P, Bauer I, Igarashi M, et al. Structure of human N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: Regulation of fatty acid ethanolamide biosynthesis by bile acids[J]. *Structure (London, England: 1993)*, 2015, 23(3): 598-604.
[8] Ueda N, Minami K, Ishimoto K, et al. Effects of lysophosphatidic acid (LPA) receptor-2 (LPA₂) and LPA₃ on the regulation of chemoresistance to anticancer drug in lung cancer cells[J]. *Cellular Signalling*, 2020, 69: 109551.
[9] 陈晓玲.黑曲霉磷脂酶D基因的克隆表达与生化特征解析[D].天津:天津科技大学,2018.
[10] Hou H J, Gong J S, Dong Y X, et al. Phospholipase D engineering for improving the biocatalytic synthesis of phosphatidylserine[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(7): 1185-1194.
[11] Zhou W B, Gong J S, Hou H J, et al. Mining of a phospholipase D and its application in enzymatic preparation of phosphatidylserine[J]. *Bioengineered*, 2018, 9(1): 80-89.

- [12] 李冰麟. 磷脂酶 D 催化磷脂酰基转移反应生产稀有及非天然磷脂的研究 [D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [13] 侯海娟, 龚劲松, 翟坤, 等. 磷脂酶 D 的重组表达及其在磷脂酰丝氨酸合成中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 9-14.
- [14] Yang L Y, Xu Y, Chen Y, et al. Efficient extracellular expression of phospholipase D in *Escherichia coli* with an optimized signal peptide [J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2018, 301: 012105.
- [15] Ciervo A, Mancini F, Cassone A. Transcription, expression, localization and immunoreactivity of *Chlamydomonas reinhardtii* phospholipase D protein [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2007, 43(2/3): 96-105.
- [16] 何伟. 重组大肠杆菌表达包涵体药物蛋白的复性与纯化研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2017.
- [17] 李祥魁, 范翠英, 崔亚君, 等. 重组蛋白可溶性表达促进标签的研究进展 [J]. *生物技术*, 2013, 23(2): 93-97.
- [18] Gijsbers R, Aoki J, Arai H, et al. The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP₂) involves a single catalytic site [J]. *FEBS Letters*, 2003, 538(1/2/3): 60-64.
- [19] Haga A, Hashimoto K, Tanaka N, et al. Scalable purification and characterization of the extracellular domain of human autotaxin from prokaryotic cells [J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 59(1): 9-17.
- [20] Hannes M B, Patrick G, Sophia L. et al. AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach [J]. *Plos One*, 2015, 10(9): e0137652.
- [21] Piao D C, Shin D W, Kim I S, et al. Trigger factor assisted soluble expression of recombinant spike protein of porcine epidemic diarrhea virus in *Escherichia coli* [J]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16(1): 39.
- [22] Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, et al. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 884-889.
- [23] 张莹. 在不同宿主中表达链霉菌磷脂酶 D 的研究 [D]. 广州: 华东理工大学, 2013.
- [24] Lebediker M, Danieli T. Purification of proteins fused to maltose-binding protein [M] // *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016: 257-273.
- [25] 张亚萌. 重组融合蛋白 rMBP-NAP 的毒理学研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [26] Song Y D, Dilger E, Bell J, et al. Large scale purification and characterization of recombinant human autotaxin/ lysophospholipase D from mammalian cells [J]. *BMB Reports*, 2010, 43(8): 541-546.
- [27] 赵亚蕊, 曹鹏程, 郑耀武, 等. 人自分泌运动因子哺乳细胞表达纯化及酶学特性 [J]. *生物技术*, 2017, 27(5): 484-490.
- [28] Yang H Y, Roberts M F. Cloning, overexpression, and characterization of a bacterial Ca²⁺-dependent phospholipase D [J]. *Protein Science*, 2009, 11(12): 2958-2968.