

重组 N-乙酰鸟氨酸脱酰基酶的表达条件优化

李 环, 朱大伟, 陈 悦, 任 真, 韦 萍
(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: N-乙酰鸟氨酸脱酰基酶(N-acetylornithine deacetylase, NAOase)为新型氨基酸拆分酶,可在重组菌BL21(DE3)-pET22b-argE 中胞内诱导表达。为降低生产成本并提高酶活,优化了培养基成分及诱导条件。结果表明,进口的蛋白胨和酵母膏明显优于国产原料。5.0g/L 的乳糖可以代替昂贵的 IPTG(isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, 异丙基 β -D 硫代半乳糖苷)起到有效的诱导效果。最佳碳源为 1.0g/L 甘油,氮源为 15.0ml/L 玉米浆和 5.0g/L 蛋白胨。NAOase 大多以不可溶的包涵体形式表达,少量为可溶的活性表达。降低诱导温度可增大活性表达的比例,而整菌表达量也随之降低。22℃诱导 10h 为活性表达的最适条件,生物量为 6.91,酶活为 392.65U/ml,分别为优化前的 1.65 倍和 5.72 倍。

关键词: N-乙酰鸟氨酸脱酰基酶; 表达优化; 包涵体; 可溶性部分酶活

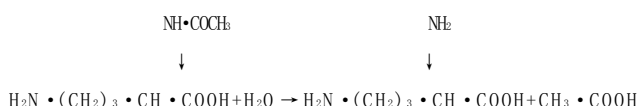
Expression Conditions Optimization of Recombinant N-acetylornithine Decatylase

LI Huan, ZHU Da-wei, CHEN Yue, REN Zhen, WEI Ping
(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: N-acetylornithine decatylase (NAOase), a new kind of amino acids resolving enzyme, could be cellular expressed by the recombinant strain BL21 (DE3)-pET22b-argE. In order to reduce producing cost and increase soluble NAOase activity, the culture medium and inducing conditions were optimized. The results showed that the imported peptone and yeast extracts were more suitable than the native materials. Lactose of 5.0g/L could act as inducer in place of expensive IPTG. The optimized carbon and nitrogen sources are: 1.0 g/L glycerol, 15.0 ml/L corn steep liquor and 5.0 g/L peptone. Most of NAOase were expressed as inclusion bodies, little as active enzymes. The proportion of the soluble expression could be increased by lowering the inducing temperature, but the yield of target protein followed was decreased. With the optimized active inducing condition of 22 °C for 10 h, the biomass is enhanced by 1.65-fold to 6.91 and the enzyme activity is increased by 5.72-fold to 392.65 U/ml in comparison with initial medium.

Key words N-acetylornithine decatylase (NAOase); expression optimization; inclusion bodies; soluble NAOase activity
中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2008)04-0239-05

大肠杆菌 *argE* 基因编码的 N-乙酰鸟氨酸脱酰基酶(N-acetylornithine deacetylase, NAOase, EC3.5.1.16), 可催化 N-乙酰鸟氨酸脱去乙酰基生成 L-鸟氨酸^[1-2]。该酶催化的化学反应式为:



NAOase 只选择性的作用于 L-型的酰基化产物,且具有广泛的底物特异性^[2],可立体拆分生产 L-型的氨基酸,反应机理和氨基酰化酶(aminoacylase, EC3.5.1.14)类似,只是两者的结构、底物专一性、最适作用条件、

热稳定性等酶学性质不同。氨基酰化酶为十大常用酶系之一,对其的研究是一个热点,各种来源的氨基酰化酶及其拆分研究常见报道,其中最常见的来源为米曲霉,胞外分泌,酶活数量级在 10^4 U/g 干菌丝体,发酵周期约 60h。相应重组菌的构建也有报道。而对同样具有拆分作用的 NAOase,国外仅有几篇文献主要报道了 NAOase 的酶学性质^[1,3]、基因序列及氨基酸组成^[2,4]、对金属离子的依赖性、酶的亚基数目^[4-5]等理论方面内容。未见到以应用为目的的表达优化方面的研究。

基于此研究背景,本实验室从大肠杆菌中克隆到 *argE* 基因,并以 pET22b 为表达载体,构建了可表达

收稿日期: 2007-04-06

基金项目: “973”计划项目(2003CB7160004)

作者简介: 李环(1972-),女,博士研究生,研究方向为酶工程。E-mail: lihuan45678@163.com

NAOase 的重组菌 BL21 (DE3)-pET22b-argE。下一步拟就 NAOase 的实际应用及结构与作用机制等方面展开系列研究。本实验将着重研究重组 NAOase 的表达。

1 材料与方法

1.1 试剂与原料处理

进口蛋白胨、酵母膏 Oxoid 公司；蛋白胨、酵母膏 中国医药(集团)上海化学试剂公司；标准分子量蛋白 上海生工生物工程技术有限公司；其余试剂均为分析纯。

拆分底物 N-乙酰 D, L-蛋氨酸为四川同晟氨基酸有限公司产品，纯度 > 98%。以重结晶法精制后，以 1.0% 的茚三酮乙醇溶液做显色检验，证实无残余蛋氨酸后作为拆分底物。使用时以 0.05mol/L 的磷酸缓冲液配成 0.06mol/L 的底物 (pH6.98, 含 1mmol/L CoCl₂)。

1.2 菌种

重组菌 BL21 (DE3)-pET22b-argE (目的基因 *argE*、表达载体 pET22b、T7 启动子、氨苄青霉素抗性、C 端带 6 × His 标签) 南京工业大学制药与生命科学学院菌种室自己构建。

1.3 培养基

保藏与发酵基础培养基皆为含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB (Luria-Bertani) 培养基，优化后的发酵培养基视实验需要而变化。

1.4 诱导条件

将含有正确表达载体 pET22b-argE 的重组菌接入发酵培养基，装液量为 50ml/500ml。37℃，150r/min 振荡培养 2.5h 后，加入诱导剂在 30℃ 诱导 16h 后测生物量及酶活。每个样做二个平行，同样发酵条件重复三次，数值稳定无异常后取平均值作为实验数据。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量

稀释 10 倍后采用比色法用 DU-650 分光光度计测定 OD₆₀₀。以灭菌后的培养基作为空白。

1.5.2 目的蛋白表达量

发酵液经离心后，菌体进行 10% SDS-PAGE 分析^[6]，采用 Bio-Rad 凝胶成像系统及 BandsScan 软件分析表达量 (目的蛋白占全菌总蛋白的百分比)。

1.5.3 目的蛋白的可溶性

重组 NAOase 如为可溶性表达，应在超声上清液中，反之则在沉淀中。取菌泥 1.0g，加入 12.0ml 细胞裂解液，加入 1.0mg/ml 的溶菌酶，超声波破碎。破碎条件：超声 5s，间歇 5s，全程 20min，功率 200W。离心后的上清液与沉淀进行 10% SDS-PAGE 电泳，分析目的蛋白所在部位^[6-8]。

1.5.4 目的蛋白的酶活力测定

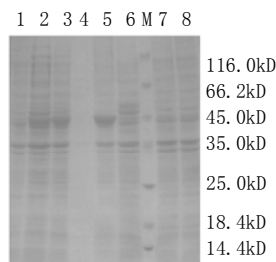
茚三酮比色法。发酵液离心尽量去除上清液，菌泥以 0.05mol/L 磷酸缓冲液重悬，适当稀释后制成菌悬液。取菌悬液 0.1ml 和 0.06mol/L 的拆分底物 0.9ml 于 37℃ 水浴反应 30min。由蛋氨酸的标准曲线计算酶转化所生成的蛋氨酸的量^[9]。由于酶分子、菌本身中所含氮及试剂中微量氮皆会干扰茚三酮显色，样品不同干扰也不尽相同，故每个样品皆需做空白实验。以零转化时间的样品同样操作作为空白。

酶活单位定义为在 37℃ 和 pH6.98 条件下，每小时催化生成 1 μmol 的 L-Met 所需要的酶量。重组菌的酶活定义力为每毫升发酵液每小时催化生成 L-Met 的微摩尔数。

2 结果与分析

2.1 重组 NAOase 在进口 LB 培养基中的表达

以 1.0mmol/L 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 为诱导剂，重组 NAOase 在重组菌通用培养基 LB (进口原料) 的表达结果如图 1 所示。



泳道 1：未诱导；泳道 2、3、5：37℃ 诱导 12、14、19h；泳道 4：泳道 3 的发酵液上清液；泳道 6~8：30℃ 诱导 12、14、19h；泳道 M：标准分子量蛋白。

图 1 不同诱导条件下全细胞蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of whole cellular proteins induced on different conditions

与不添加诱导剂的泳道 1 相比，泳道 2、3 和 5 在 43kD 附近有明显的表达条带，和预期结果 (理论计算重组 NAOase 单亚基分子量为 42350D) 相吻合，表明构建的重组质粒可诱导表达目的蛋白。37℃ 诱导 14h 的发酵液离心后取上清液浓缩，泳道 4 显示无目的蛋白条带，也没检测到酶活，说明重组 NAOase 为胞内表达。30℃ 诱导 12h 的表达量为 7.4%，延长至 24h 时，表达量仅为 8.9%，明显低于 37℃ 的表达量 (泳道 2、3、5 所示的表达量分别为 11.3%、29.6% 和 39.6%)。

37℃ 诱导酶的表达量较高，但酶活测定仅为 1.48U/ml，明显低于 30℃ 诱导时的 68.08U/ml。pET 系统的高水平表达常形成包涵体，37℃ 诱导常常使一些蛋白累积形成不可溶的无活性的包涵体，30℃ 生长则可产生有活性的可溶的蛋白^[6]。虽然再降低诱导温度有可能增大活性表达

的比例, 但在此培养条件下, 30℃的表达水平已经很低, 再者重组NAOase的具体表达量及相应活性与具体的培养基成分及诱导条件有关, 故先考虑培养基优化, 再针对该培养基进行表达优化, 诱导温度暂定为30℃。

2.2 培养基及诱导剂的优化

2.2.1 LB培养基主要成分产地的影响

在重组菌表达蛋白的相关研究中, 无论是基于应用还是理论研究的目的, 重组菌通常在进口LB培养基中培养; 如为诱导表达, 诱导剂为IPTG, 实验室小摇瓶阶段生物量一般在3~4之间, 表达成本较高。以价格较低的国产蛋白胨和酵母膏代替进口原料, 并以廉价的乳糖代替昂贵的IPTG, 来生产降低成本。比较结果见表1。

表1 国产、进口原料及不同诱导剂的综合影响

Table 1 Comprehensive effects of induced LB culture materials from Chinese and overseas companies

诱导剂	蛋白胨和酵母膏			
	国产		进口	
	1.0mmol/L IPTG	10.0g/L 乳糖	1.0mmol/L IPTG	10.0g/L 乳糖
OD ₆₀₀	1.51	2.49	3.70	3.94
酶活(U/ml)	39.35	112.99	68.09	192.43

结果表明, 进口原料无论生物量和酶活都明显优于国产原料。和进口培养基相比, 国产原料可能缺少某些微量成分。由此推测, 在国产培养基的基础上, 添加某些成分, 能在节约成本的情况下, 弥补这种差别, 从而提高酶活。同样的培养基成分, 乳糖的诱导效果明显优于IPTG。

2.2.2 乳糖用量的影响

以国产的LB培养基为发酵培养基, 改变诱导剂乳糖的加入量, 实验结果如图2和图3所示。

结果表明, 乳糖对菌的生长基本没有影响, 对重组NAOase的表达量及活性影响显著。以Bandscan软件分析, 乳糖浓度达到1.0g/L时, 表达量已达39.8%,

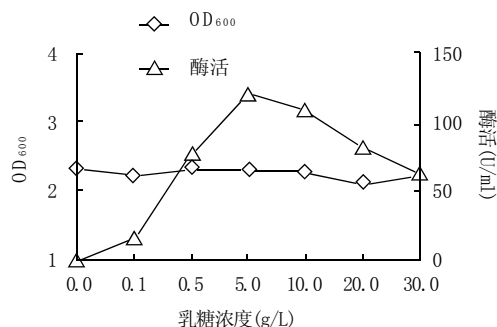
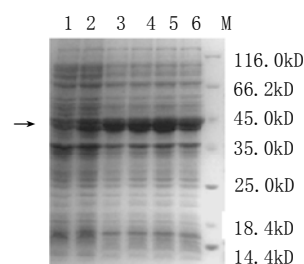


图2 乳糖浓度对生物量及酶活的影响

Fig.2 Effects of lactose concentration on biomass and NAOase activity



泳道1~6: 乳糖浓度分别为0.05、0.1、1.0、5.0、10.0、30.0g/L

图3 乳糖浓度对表达量的影响

Fig.3 Effects of lactose concentration on expression level

远高于IPTG在30℃诱导16h的表达水平。再增大乳糖浓度, 表达量基本不变, 在40%左右。图2显示, 乳糖的最佳添加浓度为5.0g/L。浓度再高时, 酶活反而降低。这可能由于高浓度的乳糖除了作为T7启动子的诱导物外, 也开启了宿主菌BL21(DE3)的乳糖操纵子, 乳糖分解产生葡萄糖, 葡萄糖的阻遏效应开始表现。以后的实验选择5.0g/L的乳糖作为诱导剂。

2.2.3 碳源的影响

国产LB培养基的营养较为贫瘠, 重组菌的生物量仅为2.5左右, 故考虑外加营养源。先考察碳源的影响。目的蛋白为诱导酶, 常见碳源葡萄糖的存在会导致目的蛋白的不表达。故排除葡萄糖, 分别以不同浓度的碳酸氢钠、甘油、蔗糖、淀粉和丁二酸钠为碳源, 考察它们对重组菌生长及酶活的影响。结果显示, 只有甘油对菌的生长和酶活有一定促进作用, 其它碳源或无明显影响, 或抑制。图4为甘油浓度对重组菌生长及酶活的影响。可以看出, 低浓度的甘油对酶活有明显的促进作用, 高浓度甘油显著抑制酶活, 最适用量为1.0g/L。

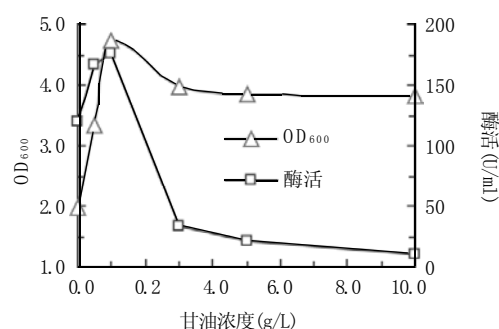


图4 甘油浓度对生物量及酶活的影响

Fig.4 Effects of glycerol concentration on biomass and NAOase activity

2.2.4 氮源及PBS缓冲液的影响

氮源不同, 所含成分也不尽相同, 有时不同氮源的组合恰好可以成分互补。分别以不同浓度的有机氮源

(蛋白胨、酵母膏、玉米浆、尿素)，无机氮源(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 NaNO_3)及其相互组合代替LB培养基中的氮源(1.0%蛋白胨和0.5%酵母膏)。结果表明，有机氮源明显优于无机氮源及有机和无机组成的氮源，但其中也只有2.0%玉米浆高于对照。由于对照中蛋白胨价格较贵，以蛋白胨为唯一氮源时酶活又高于酵母膏，故以蛋白胨为辅助氮源，并降低用量，其与玉米浆组合及玉米浆单因素浓度的影响结果如表2所示。

表 2 玉米浆及与蛋白胨组合对重组菌生物量和酶活的影响

Table 2 Effects of corn liquids and peptone on biomass and NAOase activity

氮源 (g/L)		OD ₆₀₀	酶活 (U/ml)
玉米浆 (ml/L)	蛋白胨 (g/L)		
10.0		3.19	36.78
15.0		5.58	82.60
20.0		6.25	119.92
25.0		6.78	158.12
30.0		7.49	114.49
15.0	5.0	7.54	289.44
20.0	5.0	8.53	234.31
25.0	5.0	8.77	232.14

可以看出，在玉米浆的单因素考察中，随玉米浆浓度的增加，生物量随之增加，酶活在25.0ml/L的用量时达到峰值。15.0ml/L的玉米浆和5.0g/L蛋白胨的组合达到较好的促进酶活的作用。这可能由于两者成分互补，恰好含有重组NAOase合成和表现活力的微量成分。

2.2.5 优化培养基的验证

综上所述，优化后的培养基成分为(g/L)：蛋白胨5.0，玉米浆15.0，甘油1.0，氯化钠10.0。诱导剂为5.0g/L乳糖。为消除不同批次菌种间的差别，再次验证优化和初始LB培养基间的差别。除明显标注外诱导温度皆为30℃。

表 3 优化前后培养基对生物量及酶活的影响

Table 3 Effects of mediums before and after optimization on biomass and NAOase activity

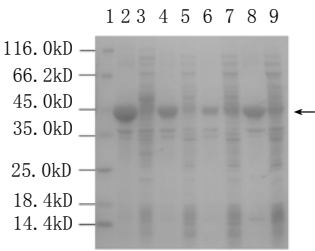
培养基成分	诱导剂	OD ₆₀₀	酶活 (U/ml)	相对酶活 (%)
国产LB	—	2.31	0	0
国产LB	10.0g/L 乳糖	3.06	116.04	169.09
进口LB	1mmol/L IPTG	4.18	68.60	100.0
优化培养基	5.0g/L 乳糖	7.52	280.03	408.28
优化培养基	5.0g/L 乳糖(37℃诱导)	8.36	10.58	15.4

从表3可以看出，在同样的诱导情况下，优化后菌的生物量和酶活都明显提高。37℃诱导时的生物量高于30℃，而酶活却明显下降。此结果和LB培养基中的培养结果相同。针对该优化培养基，具体考察诱导条件对重组NAOase表达量及表达活性的影响。

2.3 重组NAOase在优化培养基中的表达

2.3.1 诱导温度对NAOase表达的影响

将重组菌在优化培养基中以5.0 g/L乳糖为诱导剂在不同温度诱导培养。诱导结束后，从摇瓶外观可看出，随诱导温度的增加，发酵液浊度逐渐加深，其中37℃诱导时瓶壁上有大量成块菌体，出现挂壁现象。8℃诱导时菌的生物量明显偏低。为尽量消除菌生物量的差异对酶活的影响，取样后延长诱导时间到40h。



1: Marker; 2: 3.30℃诱导沉淀及上清液; 4、5: 16℃沉淀及上清液。6; 7: 12℃沉淀及上清; 8、9: 8℃沉淀及上清(诱导40h)。

图 5 超声上清液和沉淀成分分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of sonic supernatants and pellets

结果显示，其他条件相同时，诱导温度越高，目的蛋白重组NAOase酶的整菌表达量越大。37℃诱导时目的蛋白表达量约占整菌蛋白的42.2%，16~30℃皆可保持较高的表达水平(35%~40%)。8℃诱导40h的表达量明显较16h高，达到了37.5%。从图5可看出，诱导温度越高，以不可溶的包涵体形式表达的量也越大。超声上清液中看不出可溶性表达部分的明显变化，但酶活测定结果(表4)已灵敏地显示出低的诱导温度可增大有活性的可溶性部分表达的比例。

表 4 诱导温度对生物量及酶活的影响

Table 4 Effects of induction temperatures on biomass and NAOase activity

诱导温度	OD ₆₀₀	酶活 (U/ml)
8℃诱导16h	2.08	88.33
8℃诱导40h	4.57	269.84
12℃	3.11	177.47
16℃	4.16	190.82
22℃	6.78	363.96
30℃	7.46	280.56
37℃	8.14	9.95

综上所述，目的蛋白的表达形式存在可溶和不可溶两种表达形式，酶活为可溶性部分表现出来的活力。以后的发酵要根据需要来选定诱导温度。如为得到尽可能多的目的蛋白用于包涵体纯化或其它用途，可选用37℃的诱导温度。如为得到高活力的酶，可选用较低的诱导温度并适当延长诱导时间。

2.3.2 诱导时间对NAOase表达的影响

目的蛋白的表达速度过快导致绝大多数目的蛋白以无活性的包涵体形式存在,降低表达速度可减少包涵体形式表达的比例,使错误折叠的机会减少。温度越低,可溶性形式表达所占比例越高。8℃为菌生长较低限温度,22℃为酶活测定最高值,故分别考察了在这两个温度诱导时重组菌的生长及酶表达情况。

结果表明,8℃诱导时,在8~60h的考察范围内,36h为最佳诱导时间,此时OD₆₀₀为4.62,酶活275.47U/ml。虽然可溶性表达比例有提高,但由于培养温度只有8℃,限制了重组菌的生长,生物量和酶活力都没达到22℃诱导时的水平。22℃的诱导结果及成分分析分别见图6和图7。

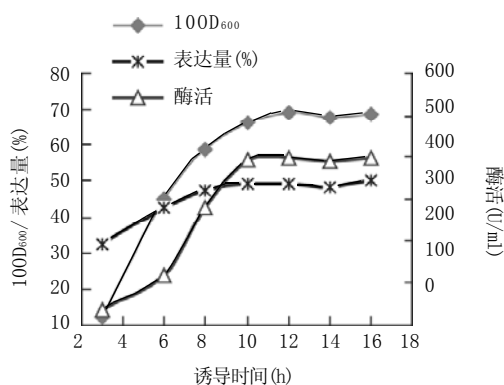
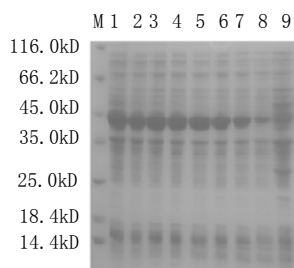


图6 诱导时间对生物量、表达量及酶活的影响(22℃)

Fig.6 Effects of inducing time on biomass, expression level and NAOase activity at 22 °C



M:uaker; 1~9: 诱导时间分别为16、14、12、10、8、6、3、1、5、0h。

图7 总细胞蛋白SDS-PAGE分析

Fig.7 SDS-PAGE analysis of whole cellular proteins

可以看出,22℃诱导的最佳时间为10h,远低于8℃诱导36h的诱导周期。10h后生物量和酶活基本不变,

OD₆₀₀为6.91,酶活为392.65U/ml,分别为优化前进口LB培养基(IPTG,30℃诱导)的1.65倍和5.72倍。整菌表达量在诱导6h时已达到42.6%,8h后基本不变,在49%左右。

3 结论

重组菌BL21(DE3)-pET22b-argE可高效表达重组NAOase,表达量及表达活性和培养基成分及诱导条件有关。优化后的培养基成分为(g/L):蛋白胨5.0,玉米浆15.0,甘油1.0,氯化钠10.0。诱导剂为5.0g/L乳糖,37℃培养2.5h后加入。应根据需求来选择诱导条件,37℃诱导可收获最大量的重组蛋白,而在22℃诱导10h得到的酶活力最大。以酶活为基准,优化后的OD₆₀₀为6.91,酶活为392.65U/ml,表达量为49%。各项指标优化效果显著。

22℃诱导时,不包括包涵体复性后的酶活力,重组NAOase可溶性表达部分的酶活已达到392.65U/ml发酵液,约 2.8×10^4 U/g湿菌体,高于氨基酰化酶104U/g干菌丝体的常见报道水平,且整个发酵周期约13h,远小于48~64h的霉菌发酵周期。故重组菌BL21(DE3)-pET22b-argE具有强大的市场应用前景。

参考文献:

- [1] BOYEN A, CHARLIER D, CHARLIER J, et al. Acetylornithine deacetylase succinyl-L-lysine desuccinylase and carboxypeptidase G2 are evolutionarily related [J]. Gene, 1992, 116(1): 1-6.
- [2] FARAH J M, JOHN S B. Mechanistic analysis of the argE-Encoded N-acetylornithine deacetylase [J]. Biochemistry, 2000, 39: 1285-1293.
- [3] VOGEL H J, BONNER D M. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties [J]. Biol Chem, 1956, 218: 97-106.
- [4] THIERRY M, EMMANUELLE S, YVES M, et al. Structural and biochemical characterization of the *Escherichia coli* argE gene product [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(7): 2323-2331.
- [5] WADE C, MCGREGOR, SABINA I. argE-Encoded N-acetyl-L-ornithine deacetylase from *Esch. coli* contains a dinuclear metalloactive site [J]. J of Am Chem Soc, 2005, 127: 14100-14107.
- [6] pET System manual TB055 [M]. 11th Edition. <http://www.merckbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB055.pdf>, 2006.
- [7] PETER E V. *E. coli* gene expression protocols [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2003.
- [8] JOHN M W. The protein protocols handbook [M]. 2nd Edition. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2002.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 2版, 北京: 高等教育出版社, 1997.