

一种 SUMO-Heparinase I 融合酶的可溶性表达与纯化

赵善成¹, 王 振¹, 程咏梅¹, 陈敬华^{*1,2}

(1. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 克隆自肝素黄杆菌(*Flavobacterium heparinum*)的肝素酶 I(Heparinase I, EC4.2.2.7) 广泛应用于低相对分子质量肝素(LMWH, low molecular weight heparin)制备研究。然而, 该酶在大肠杆菌表达体系中易形成包涵体, 限制了其大量应用。将可溶性配体 SUMO (small ubiquitin-like modifier, 小泛素类似修饰蛋白质) 与 C 端带有 6×His 标签的肝素酶基因片段 N-端融合表达, 菌体总蛋白质和可溶性蛋白质 SDS-PAGE 电泳表明, N 端融合 SUMO 的肝素酶 I 可溶性表达比率显著提高; 通过镍-亲和柱层析得到均一纯化的融合肝素酶 I, 融合酶酶学性质表明该融合酶可直接应用于肝素降解而无需切除 SUMO 标签, 为肝素酶 I 的广泛应用提供了良好的技术基础。

关键词: 肝素酶 I; 小泛素类似修饰蛋白质; 融合表达; 可溶性表达

中图分类号: O 629.12 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)03—0318—06

Soluble Expression and Purification of the SUMO-Heparanase I Fusion Enzyme

ZHAO Shancheng¹, WANG Zhen¹, CHENG Yongmei¹, CHEN Jinghua^{*1,2}

(1. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Heparinase I cloned from *Flavobacterium heparinum* was widely used in the preparation of LMWH (low molecular weight heparin). However, the formation of inclusion bodies when expressed in *Escherichia coli* limits its application in a large scale. In this study, the soluble partner, small ubiquitin-like modifier (SUMO), was fused to the N-terminus of Hep I gene with a C-terminal 6× histidine tag. SDS-PAGE analysis of total protein in bacteria and soluble fractions indicated that the portion of the soluble Heparinase I fused with SUMO to the N-terminus was significantly enhanced. After purified by the nickel-chelate chromatography, the resulting fusion enzyme could be used directly without removing the fusion SUMO tag, which made the wide application of Heparinase I feasible.

Keywords: Heparinase I, small ubiquitin-like modifier, fusion expression, soluble expression

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 教育部博士点基金项目(20110093110008)。

作者简介: 赵善成(1986—), 男, 安徽六安人, 工学博士, 主要从事肝素类多糖和相关酶的研究。E-mail: zhaoshancheng2008@163.com

* 通信作者: 陈敬华(1971—), 男, 湖北黄石人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物大分子和生物功能材料的研究。

E-mail: jhchenwhut@126.com

肝素酶是一类特异性降解肝素和类肝素多糖的裂解酶,可用于病人体外治疗血液中残存肝素的有效去除、血液肝素浓度水平的测定、肝素类多糖的序列分析,以及真核细胞表面肝素类多糖的结构-功能研究^[1-3]。其中,肝素酶 I 降解肝素制备低相对分子质量肝素以质量高、条件温和、易控制和环境友好等优点^[4],受到了研究人员越来越多的关注。

相较于肝素黄杆菌发酵法制备肝素酶 I,采用 pET 表达系统在大肠杆菌中重组表达肝素酶 I,可显著提高肝素酶 I 的产量和产品纯度^[5]。然而,大肠杆菌表达体系中肝素酶 I 的非可溶性表达和易失活极大地限制了其大规模应用。近年来发展起来的融合表达策略采用基因工程手段将编码靶蛋白质的基因片段与编码可溶性配体的基因片段融合共表达,可以降低重组蛋白质的降解,改善蛋白质折叠,是一种有效提高蛋白质可溶性从而促进其蛋白质表达水平的方法^[6]。之前的研究发现,选用 MBP (maltose-binding protein)、GST (glutathione S-transferase) 这类相对分子质量较大的标签融合表达肝素酶 I 可显著改善其可溶性^[7-8],但是需要在较低的诱导温度如 15℃ 以下表达靶蛋白质,不利于大规模工业化生产,而 CBD (cellulose-binding domain) 融合的肝素酶 I 表达后依然主要以包涵体形式存在^[9]。除了这些较大的标签蛋白质之外,组氨酸等较小相对分子质量标签的融合酶易于纯化却无助于改善可溶性。SUMO (small ubiquitin-like modifier) 是一种相对分子质量只有 11.5 kDa 的较小的标签蛋白质^[10],已成功应用于严重急性呼吸综合征冠状病毒 3CL 蛋白酶、核衣壳蛋白质、膜蛋白质以及基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase-13, MMP13)、生长分化因子 8 (growth differentiating factor-8, GDF8) 的可溶性表达^[11-12]。除此之外,去除 SUMO 标签所用的 SUMO 蛋白酶具有高保真性,可精确识别 SUMO 标签的三级结构,因此剪切时会保留靶蛋白质的末端序列尤其是 N-端与生物活性密切相关的序列^[13]。

基于上述考虑,拟选用 SUMO 这一相对分子质量更小的助溶性配体标签,将 SUMO 标签蛋白基因片段与肝素酶 I 基因片段通过重叠 PCR 方法构建重组 pET-30a-SUMO-Hep I 表达载体,将 SUMO 蛋白质与肝素酶 I N-端融合表达,探索其对于肝素酶 I 可溶性表达的促进作用。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 菌种、质粒和引物 *E.coli* DH5 α , *E.coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta (DE3), pMD-19T-SUMO, pMD-19T-Hep I 和 pET-30a(+), pET-30a(+)-Hep I 质粒,作者所在实验室保存;Ulp1 蛋白酶,作者所在实验室制备并保存;pMD-19T(simple),购自大连宝生物工程有限公司;PCR 引物 F1: 5'-CATATGTCGGACTCAGAAGTCAATCAA-3' (*Nde* I), R1: 5'-CCGGATTTTTTTTCTGACCTCCAATCTGTTCG-3', F2: 5'-GATTGGAGGTCAGCAAAAAAATCCG-3', R2: 5'-GGATCCGATCTGGCAGTTTCGCTG-3' (*Bam* H I),均由上海生物工程有限公司合成。

1.1.2 工具酶、试剂盒和仪器 Ex Taq 酶, T4 DNA 连接酶,限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam* H I, 购自大连宝生物工程有限公司;PCR 产物回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒, 购自上海生物工程有限公司;蛋白质纯化系统 (GE AKTA prime plus), HisTrap HP, 购自美国 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 SUMO-Hep I 基因扩增和重组表达质粒 pET-30a(+)-SUMO-Hep I 的构建 采用重叠 PCR 方法扩增 SUMO-Hep I, 扩增过程见图 1。PCR 反应条件为: 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 充分延伸 10 min。PCR 产物经质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, PCR 产物回收试剂盒回收后与 pMD-19T (simple) 克隆载体 16℃ 连接过夜。连接产物 pMD-SUMO-Hep I 转化 *E. coli* DH5 α , 通过 Amp 抗性和蓝白斑筛选出阳性转化子。对经测序验证的重组克隆载体 pMD-SUMO-Hep I 和表达载体 pET-30a(+) 进行双酶切并回收目的片段, 并在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃ 连接过夜, 连接产物命名为 pET-30a(+)-SUMO-Hep I。pET-30a(+)-SUMO-Hep I 转化大肠杆菌 *E. coli* Rosetta (DE3), 从 LB 平板挑选单克隆, 接种于 10 mL LB 培养基 (含卡那霉素 50 μ g/mL) 中, 37℃ 220 r/min 过夜培养, 甘油终质量分数 15% 保种并送上海生工测序验证。重组表达质粒 pET-30a(+)-SUMO-Hep I 构建流程见图 2。

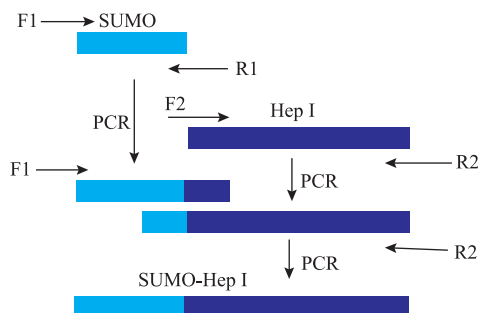


图1 SUMO-HepI 融合基因片段扩增示意

Fig. 1 Diagram of amplification of SUMO-Hep I fusion gene

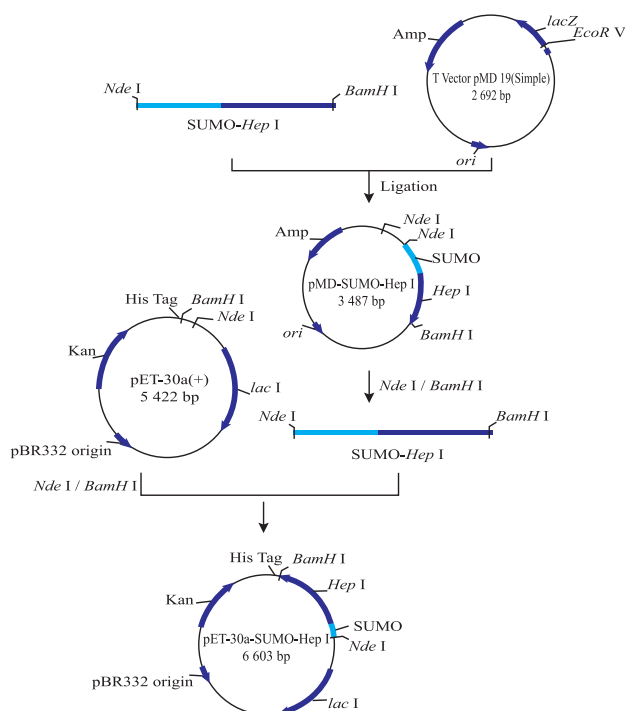


图2 重组表达质粒 pET-30a(+)-SUMO-Hep I 的构建示意

Fig. 2 Diagram of construction of recombinant expression plasmid pET-30a(+)-SUMO-Hep I

1.2.2 Hep I-6×His 和 SUMO-HepI-6×His 重组蛋白质的表达 将经测序验证的保种 pET-30a (+)-SUMO-HepI 大肠杆菌 *E.coli* Rosseta (DE3), 以体积分数 1% 接种于两瓶 10 mL 的 LB 培养基 (含卡那霉素 50 μg/mL), 37 °C 220 r/min 过夜培养, 作为种子液。再以体积分数 1% 的接种量接种到 50 mL LB 培养基 (含卡那霉素 50 μg/mL), 37 °C 220 r/min 培养, 当 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时, 加终浓度为 0.2 mmol/L

的 IPTG, 25 °C 220 r/min 诱导表达 10 h。pET-30a (+)-Hep I 表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 在活化后亦按照上述条件诱导表达。

1.2.3 Hep I-6×His 和 SUMO-Hep I-6×His 重组蛋白质的纯化 4 °C、9 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, Binding Buffer (20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 重悬, 超声破碎 (200 W, 超声 5 s, 间歇 8 s, 工作 99 个循环, 共 3 次) 后 12 000 r/min 离心 30 min, 上清液用 0.45 μm 水系膜过滤, 过滤液用蛋白质纯化系统 GE AKTA prime plus 进行纯化。HisTrap HP (5 mL) 亲和层析纯化条件: 采用阶段梯度洗脱模式, 先用 5 个柱体积质量分数 4% 的 Elution Buffer (20 mmol/L Tris, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 冲洗结合力的杂蛋白质, 再采用体积分数 50% 的 Elution Buffer 洗脱目的蛋白质, 体积流量 5 mL/min 收集洗脱液。纯化完毕, BCA 法分别测定 Hep I-6×His、SUMO-Hep I-6×His 的产量。将纯化的 SUMO-Hep I-6×His 与 Ulp 1 蛋白酶按照质量比 1 000:1 混合均匀后置于 4 °C 酶切 1 h, 并按照上述条件进行镍柱亲和纯化。

1.2.4 SUMO-Hep I-6×His 酶活表征 参照文献[14] 方法对 SUMO-Hep I-6×His 的相对酶活进行测定: 在 200 μL pH 7.0 的缓冲液 (0.05 mol/L 醋酸钠、5 mmol/L 醋酸钙) 中加入 1 mg 肝素, 再加入 20 μL 保存于质量分数 0.1% BSA 中的 Hep I。30 °C 水浴反应 10 min, 立即加入 0.06 mol/L 盐酸 2 mL 终止反应。3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测定 232 nm 处吸光值。一个酶活力单位是指 30 °C pH 7.0 的条件下, 在 1 min 内产生 1 μmol 具有 Δ_{4,5} 不饱和糖醛所需要的酶量, 酶活 (IU/mL) 计算

$$E = \frac{A_{232} \times V_1}{5.5} \times \frac{1}{T} \times \frac{1}{V_2}$$

上式中, A_{232} 为在波长 232 nm 下测定的紫外吸收值; V_1 为反应液总体积 (mL); V_2 为加入酶的体积 (mL); T 为反应时间 (min); 反应系数为 5.5 (μmol/mL)。

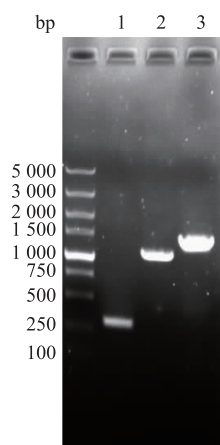
测定重组融合蛋白质 Hep I-6×His 和 SUMO-Hep I-6×His 的各纯化步骤中蛋白质含量和酶活性。

2 结果与讨论

2.1 SUMO-Hep I 编码序列的扩增

见图 3, PCR 扩增产物经 2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后, 在约 300、1 100、1 400 bp 处可清楚地观察到

DNA 条带,大小和 SUMO 编码片段、Hep I 编码片段,以及 SUMO-Hep I 编码片段理论值 291、1 155、1 446 bp 一致。



1:SUMO;2:Hep I;3:SUMO-Hep I

图 3 基因电泳图

Fig. 3 Gene electrophoresis

2.2 pET-30a(+)-SUMO-Hep I 重组质粒测序鉴定结果

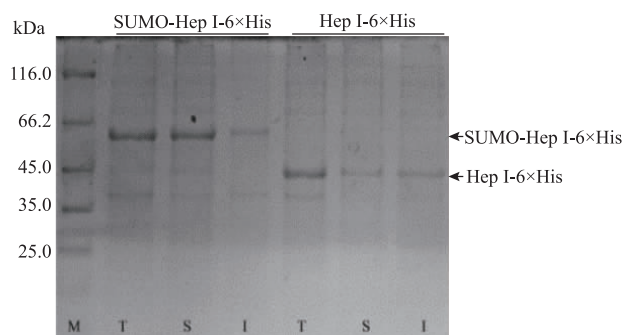
表达质粒 pET-30a (+)-SUMO-Hep I 送至上海华大基因公司测序,测序结果显示重组表达质粒与设计基因序列一致,表明重组表达质粒构建成功。

2.3 Hep I-6×His 和 SUMO-Hep I-6×His 重组蛋白质的表达

如图 4 所示,在诱导温度 25℃条件下,融合 SUMO 标签的肝素酶 I 呈高水平表达,且融合后可溶性组分占总蛋白质组分由融合 SUMO 标签前的质量分数(24.28±1.63)%显著提高至(94.52±3.99)% (图 5),证明采用 SUMO 融合表达肝素酶 I 是一种可提高靶蛋白质可溶性表达的有效策略。

2.4 Hep I-6×His 和 SUMO-Hep I-6×His 重组蛋白质的纯化

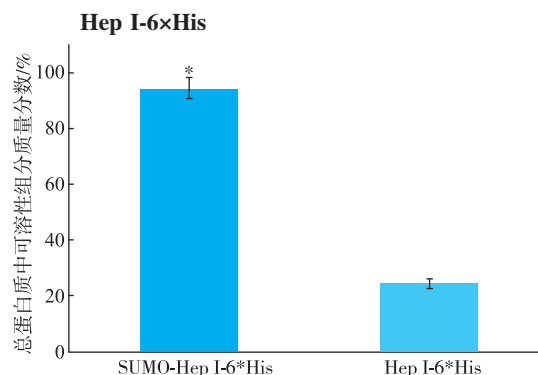
如图 6 所示,SDS-PAGE 电泳结果表明,在 43.8 kDa、63.8 kDa 分别出现 Hep I-6×His、SUMO-Hep I-6×His 预期的单一蛋白质条带。BCA 法测定纯化酶的产量为 Hep I-6×His 和 SUMO-Hep I-6×His 分别为 2.2 mg/(0.3 g 干质量菌体)和 3.4 mg/(0.3 g 干质量菌体),进一步表明 SUMO 标签的融合确有助于提高融合酶的可溶性从而提高其表达水平。



M:Marker;T:菌体总蛋白质;S:可溶性蛋白表达组分;I:非可溶性表达组分

图 4 SUMO-Hep I-6×His 融合表达的 SDS-PAGE 分析

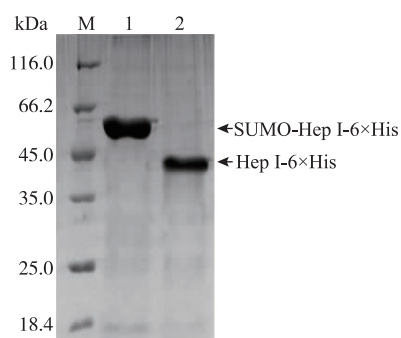
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of fusion expression of SUMO-Hep I-6×His



表示组间具有统计学差异($p < 0.05$)

图 5 SUMO-Hep I-6×His 表达的可溶性组分与 Hep I-6×His 表达的可溶性组分的比较

Fig. 5 Comparison of the portion of soluble expression of SUMO-Hep I-6×His with Hep I-6×His



M:Marker;1:SUMO-Hep I-6×His;2:Hep I-6×His

图 6 重组 SUMO-Hep I-6×His 融合蛋白质纯化效果的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 6 SDS-PAGE identification of purification efficiency of recombinant SUMO-Hep I-6×His

2.5 SUMO-Hep I-6×His 酶活表征

重组融合蛋白质 SUMO-Hep I-6×His 的各纯化步骤中蛋白质含量和酶活测定结果如表 1 所示。

表 1 0.3 g 干质量菌体内蛋白质纯化和酶活测定结果

Table 1 Protein purification and enzymatic activity in 0.3 g dry cell mass

类型	总酶活/IU	蛋白质总量/mg	比酶活/(IU/mg)	回收率/%	纯化倍数
Crude enzyme of Hep I-6×His	178.7	27.7	6.5	100	1
Purified Hep I-6×His	114.8	2.2	52.2	64.2	8.0
Crude enzyme of SUMO-Hep I-6×His	227.1	26.1	8.7	100	1
Purified SUMO-Hep I-6×His	179.9	3.4	52.9	79.2	6.1
Purified SUMO removed Hep I-6×His	132.7	2.6	51.0	52.6	5.9

结果表明,使用 SUMO 标签融合不仅可提高肝素酶 I 可溶性表达水平、总酶活和比酶活,每 0.3 g 干质量菌体总的可溶性含粗酶的蛋白质由 178.7 mg 提高到 227.1 mg,而且可提高其镍柱亲和纯化的回收率和纯化倍数,回收率由 64.2% 提高到 79.2%,证明 SUMO 标签在改善肝素酶 I 镍柱亲和纯化效果方面具有一定促进作用。

此外,SUMO-Hep I-6×His 的最适 pH 和最适温度表征结果(图 7)表明,SUMO 标签在提高肝素酶 I 表达的可溶性的同时,融合肝素酶 I 的最适 pH 和最适温度未发生改变,与天然肝素酶 I 基本一致,仍为 pH 7.0 和 30 ℃^[15]。因此 SUMO-Hep I-6×His 可无需切除 SUMO 标签直接使用,方便快捷。切除 SUMO 标签后,单位物质的量比酶活恢复到融合之前,表明 SUMO 标签有利于肝素酶 I 酶活的提升,其机制或影响到肝素酶 I 三级结构而改变其底物亲和力或与其催化效率有关,这有待进一步深入研究。

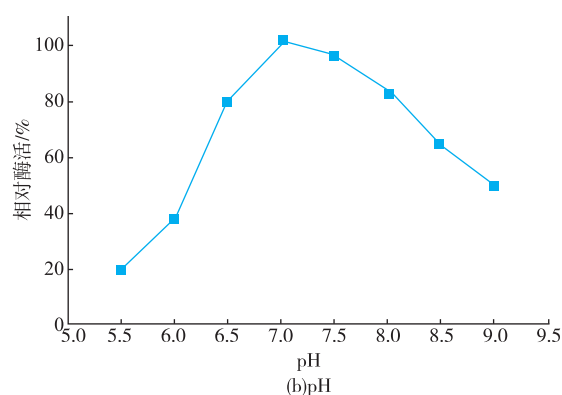
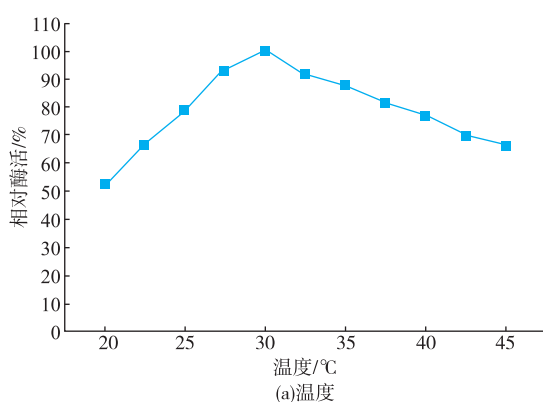


图 7 SUMO-Hep I-6×His 的最适温度和最适 pH

Fig. 7 Optimum temperature and pH of SUMO-Hep I-6×His

3 结 语

难以经济高效地表达肝素酶 I,一直是限制其大规模工业应用尤其是在酶法制备低相对分子质量肝素领域应用的瓶颈之一。使用 SUMO 这种较小相对分子质量的标签配体蛋白质,融合表达蛋白质,可在有效提高靶蛋白质可溶性的同时,避免空间位阻效应对靶蛋白质活性的影响。本研究利用该性质成功构建了一种 SUMO-Hep I-6×His 融合酶,提高了肝素酶 I 的可溶性表达,肝素酶 I 的产量由 2.2 mg/(0.3 g 干质量菌体) 提高到 3.4 mg/(0.3 g 干质量菌体),可溶性表达比率由 $(24.28 \pm 1.63)\%$ 显著提高至 $(94.52 \pm 3.99)\%$,且无需切除标签可直接应用于肝素降解,为肝素酶 I 的广泛应用提供了一条成功的工艺路线。

参考文献:

- [1] Ernst S, Venkataraman G, Winkler S, et al. Expression in Escherichia coli, purification and characterization of heparinase I from *Flavobacterium heparinum*[J]. **Biochem J**, 1996, 15(315):589-597.
 - [2] 刘卫超,程咏梅,邓超,等. GST-His-Heparinase I 双标签融合蛋白的原核表达与纯化[J]. 工业微生物, 2014, 44(5):51-56.
- LIU Weichao, CHENG Yongmei, DENG Chao, et al. Prokaryotic expression and purification of GST-His-Heparinase I double

- labelled fusion protein[J]. **Industrial Microbiology**, 2014, 44(5): 51-56. (in Chinese)
- [3] Linhardt R J, Turnbull J E, Wang H M, et al. Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfatases[J]. **Biochemistry**, 1990, 29: 2611-2617.
- [4] Ye Fengchun, Kuang Ying, Chen Shuo, et al. Characteristics of low molecular weight heparin production by an ultrafiltration-membrane bioreactor using maltose binding protein fused heparinase I [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2009, 46: 193-198.
- [5] Weitz J I. Low-molecular-weight heparins[J]. **N Engl J Med**, 1997, 337: 688-698.
- [6] Davis G D, Elisee C, Newham D M, et al. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1999, 65: 382-388.
- [7] Chen Yin, Xing Xinhui, Lou Kai. Construction of recombinant *Escherichia coli* for over-production of soluble heparinase I by fusion to maltose-binding protein[J]. **Biochem Eng J**, 2005, 23: 155-159.
- [8] Luo Yongde, Huang Xingqiang, Mc Keehan W L. High yield, purity and activity of soluble recombinant bacteroides thetaiotaomicon GST-heparinase I from *Escherichia coli*, Arch[J]. **Biochem Biophys**, 2007, 460: 17-24.
- [9] Shpigel E, Goldlust A, Efroni G, et al. Immobilization of recombinant heparinase I fused to cellulose-binding domain [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1999, 65: 17-23.
- [10] Tatham M H, Jaffray E, Vaughan O A, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9[J]. **J Biol Chem**, 2001, 276: 35368-35374.
- [11] Zuo Xun, Mattern M R, Tan R, et al. Expression and purification of SARS Coronavirus proteins using SUMO fusions [J]. **Protein Express Purif**, 2005, 42: 100-110.
- [12] Marblestone J G, Edavettal S C, Lim Y, et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO[J]. **Protein Sci**, 2006, 15: 182-189.
- [13] Malakhov M P, Mattern M R, Malakhova O A, et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins[J]. **J Struct Funct Genomics**, 2004(5): 75-86.
- [14] Yu Ping, Wu Yan. Expression of the heparinase gene from *Flavobacterium heparinum* in *Escherichia coli* and its enzymatic properties[J]. See comment in PubMed Commons Below **Carbohydr Polym**, 2012, 90(1): 348-352.
- [15] Yang Victor C, Robert J Linhardt, Howard Bernstein, et al. Purification and characterization of heparinase from *Flavobacterium heparinum*[J]. **J B C**, 1985, 260(3): 1849-1857.

会议信息

会议名称(中文): 动物营养与饲料科学学科传承发展与技术创新学术研讨会

所属学科: 动物食品科学

开始日期: 2016-06-26

结束日期: 2016-06-28

所在城市: 四川省 成都市

主办单位: 四川农业大学动物营养研究所

联系人: 罗钧秋 15008304228

联系电话: 028-86291592

E-MAIL: cnyys2016@sina.com

会议网站: <http://www.cnyys2016.com/>

会议背景介绍:

2016年6月,四川农业大学动物营养研究所即将迎来三十周年华诞。为了更好地总结三十年来学科建设经验,展示学科建设成就,探讨学科发展前景,推动行业科技进步,我们于2016年6月26日——6月28日举办“动物营养与饲料科学学科传承发展与技术创新学术研讨会”。本次大会将以“学科、学术、技术+”为主题,邀请国内外著名专家学者深入研讨动物营养与饲料科学领域的新理论,新技术,新方法。值此佳日,我们诚邀历届校友,会集校园,抚今追昔,共叙友情和师恩情。切盼国内外同行,莅临盛会,共享成果。