

断裂内含肽介导的蛋白纯化系统的构建

王玉君¹, 王姝婧¹, 杜夜星¹, 冯利利¹, 夏海锋^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以 *Npu DnaE* (*Nostoc punctiforme*) 内含肽为研究对象, 使用分子生物学方法对内含肽的 N 端结构 (I_N) 和 C 端结构 (I_C) 进行改造, 构建了以 I_N 为亲和配基的亲和层析介质和以 I_C 为自断裂亲和标签的融合蛋白表达体系, 形成了由断裂内含肽介导的新型蛋白纯化系统。通过构建 3 种 I_N 亲和配基片段以及 2 种 I_C -GFP 融合蛋白片段, 研究了空间位阻对融合蛋白断裂速率的影响; 通过 6 种组合的体外断裂及 Zn^{2+} 抑制试验, 找到了最佳的断裂组合以及新的 Zn^{2+} 结合位点。利用 N3 亲和配基片段 C 末端的 Cys, 制备了 I_N 亲和层析介质并对其纯化效果进行了研究, 成功获得高纯度 GFP 蛋白。

关键词: 断裂内含肽; 自我断裂; 亲和层析介质; 空间位阻; 克隆表达; 蛋白纯化

中图分类号: TQ 028.8 文章编号: 1673-1689(2019)10-0135-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.019

Construction of A Protein Purification System Mediated by Split Intein

WANG Yujun¹, WANG Shujing¹, DU Yexing¹, FENG Lili¹, XIA Haifeng^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Molecular biology techniques are used to modify the N (I_N) and C (I_C) fragment of *Npu DnaE* (*Nostoc punctiforme*) intein. An affinity chromatography medium with I_N as the affinity ligand and a fusion protein expression system with I_C as self-cleavage affinity tag were constructed. Finally, a protein purification system mediated by split intein was developed. The effect of steric hindrance on the C-terminal cleavage rate of fusion protein was studied by constructing 3 kinds of I_N affinity ligands and 2 kinds of I_C -GFP fusion proteins. Through the combination of in vitro cleavage and Zn^{2+} inhibition experiment, we found the best combination of F and the new Zn^{2+} binding site. The I_N affinity chromatography media were successfully prepared by using cysteine at the C-terminal of N3 affinity ligands. The purification effect of it was studied, and the high purity GFP protein was obtained successfully.

Keywords: split intein, self-cleavage, affinity chromatography medium, steric hindrance, cloning and expression, protein purification

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20151123)。

* 通信作者: 夏海锋(1979—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事发酵工程、生化工程、生物分离工程的研究。

E-mail: hf Xia@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王玉君, 王姝婧, 杜夜星, 等. 断裂内含肽介导的蛋白纯化系统的构建[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 135-143.

内含肽是存在于未成熟前体蛋白中的一段多肽链,在前体蛋白转化为成熟蛋白质的过程中,依靠自我催化从前体蛋白中释放出来,同时将两端的蛋白质外显肽通过肽键连接,该过程称为蛋白质剪接^[1-3]。内含肽利用自身高效的蛋白反式剪接作用,能够在目标蛋白有效纯化的同时去除纯化标签,在蛋白质纯化领域得到了广泛的研究和关注。

来源于 *Nostoc punctiforme* PCC73102 菌株的 *Npu* DnaE 天然断裂内含肽具有很高的剪接活性和断裂活性,其剪接活性可以达到 98 %以上^[4]。它的 N 端和 C 端剪接区域分别含有 102 个和 36 个氨基酸且中间无归巢核酸内切酶结构域。此外,与高度同源的 *Ssp* DnaE 天然断裂内含肽相比,*Npu* DnaE 断裂内含肽更加能够容忍 C 末端外显肽替换并且拥有更加快速的剪接速率^[5]。与其它类型的内含肽相比,*Npu* DnaE 断裂内含肽更加的适合生物技术领域的应用。改造过的 *Npu* DnaE-C 端剪接型蛋白纯化系统在还原剂 DTT 的诱导下能够实现快速剪切,室温下 30 s 内的剪切效率达到 50%,半小时内可以完成 90%以上外源蛋白的释放^[6-7]。Ramirez^[6]等利用 *Npu* DnaE 断裂内含肽成功的纯化到磷酸脱氢酶(PTDH)、 β -半乳糖苷酶(β -Gal)、麦芽糖结合蛋白(MBP)等不同结构的蛋白,充分的说明了内含肽介导的蛋白纯化系统可以广泛的应用到不同目标蛋白的分离纯化过程中去。但由于层析标签(比如麦芽糖结合蛋白(MBP)、甲壳素结合蛋白(CBD))和层析介质之间相对较弱的结合力,许多亲和配基片段易从层析介质上脱落,造成了目的蛋白的污染^[7]。

基于 *Npu* DnaE 断裂内含肽的优良剪接性能以及在蛋白质表达和纯化中的应用潜力和技术需求,本文设计了一种 *Npu* DnaE 断裂内含肽介导的蛋白质表达与亲和纯化系统,主要包括 I_N 亲和配基片段及 I_C 融合蛋白片段。通过改变 I_N 和 I_C 片段的结构以及利用 Zn^{2+} 对断裂速率的抑制,从中选择出与层析过程契合度最好的组合及断裂条件。利用 Cys 代替传统的亲和标签和层析介质进行偶联,成功的制备了 I_N 亲和层析介质,并将其应用到绿色荧光蛋白(GFP)的纯化。对于调整内含肽的剪切活性,控制剪切速率,有着重要的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自生工生物(上海)工程技术有限公司;引物由生工生物(上海)工程技术有限公司合成;Ni-NTA 亲和层析介质和 Purose 6 Fast Flow 空白层析介质,江苏千纯生物科技有限公司;含有内含肽 *Npu* DnaE 基因序列的质粒 pRSFDuet-*Npu*DnaE,由美国俄亥俄州立大学化工系 David W. Wood 教授课题组提供;表达质粒 pET-28a、pET-21b 和 pET24b 由本实验室保存;质粒构建和蛋白表达用菌株 *E.coli* JM109 和 *E.coli* BL21(DE3)由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 I_N 亲和配基片段重组菌株构建 设计 I_N 以组氨酸标签为纯化标签,并利用此标签不同位置所形成的空间位阻,考察 I_N 和 I_C 片段断裂性质的影响。利用 pET-28a 和 pET-21b 表达载体在多克隆位点结构上的差异以及组氨酸标签位置的不同,以 Nde I 和 Hind III 两个酶切位点进行 3 种亲和配基片段构建。其结构示意图如图 1 所示。主要包括以下几个方面的改造:1) 采用基因定点突变的方法将 I_N 首位的氨基酸 Cys 突变为 Ala,阻断 N 端断裂反应的进行^[8-9];2) 在 I_N 的 C 末端添加 Cys,利用其上面的巯基和活化的琼脂糖凝胶介质上的环氧乙烷基团反应进行共价偶联^[10];3) 通过组氨酸标签在 I_N 片段中的位置不同(在 I_N 的 N 端或者 C 端)以及组氨酸标签和 I_N 片段之间多余氨基酸片段的添加构建了 3 种不同结构的 I_N 亲和配基片段。

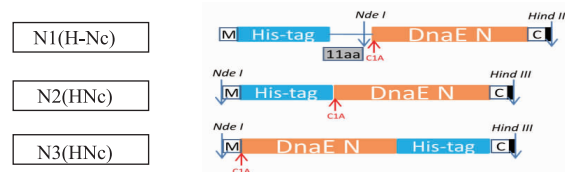


图 1 亲和配基片段的结构

Fig. 1 Structure of affinity ligand

以 pRSFDuet-*Npu*DnaE 质粒为模板,分别加入引物 S'I_N-1/A'I_N-1、S'I_N-2/A'I_N-2 和 S'I_N-3/A'I_N-3 进行 PCR 扩增,构建 3 种不同的 I_N 片段(N1,N2,N3)。本文中所使用的引物如表 1 所示。将 PCR 扩增

得到的序列分别于 pMD19 (Simple)-T 载体进行连接,涂布相应抗性的平板,筛选阳性克隆子,酶切和测序验证。利用 *Nde* I 和 *Hind* III 限制性核酸内切酶将 N1 与 pET-28a 载体进行连接,N2、N3 片段分别与 pET-21b 载体进行连接。将构建好的重组质粒 pET-28a-N1 及 pET-21b-(N2,N3) 转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中,得到重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a-N1 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET-21b-(N2,N3),-80 °C超低温下甘油管保藏。

表 1 本文中所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
S'I _N -1	GGAATTCATATGCATCATCATCATCACGCT TTAAGCTATGAAACGGAA
A'I _N -1	CCCAAGCTTTTAACAATTTCGGCAAATTATCAACC
S'I _N -2	GGAATTCATATGGCATTAAAGCTATGAAACGGAA
A'I _N -2	CCCAAGCTTTTAACAATTTCGGCAAATTATCAAC
S'I _N -3	GGAATTCATATGGCTTTAAGCTATGAAACG
A'I _N -3	CCCAAGCTTTTAACAGTGATGATGATGATGATGA TTTCGGCAAATTATCAACCC
S'D118G	GCAAAACAAAATGTCTATGGCATTGGAGTTGAGC GCCA
A'D118G	TCGCGCTCAACTCCAATGCCATAGACATTTTGT TGC
F ₁	GGAATTCATATGATCAAAATAGCCACACGTAA AT
R ₁	TGCTCACATTGAAACAATTAGAAGCTATGAAGC CATTT
F ₂	AGCTTCTAATTGTTTCAATGTGAGCAAGGCGGAG GAG
R ₂	CCCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG

1.2.2 I_c 融合蛋白片段重组菌株构建 同理利用 pET-28a 和 pET-24b 表达载体的不同,以 *Nde* I 和 *Hind* III 两个酶切位点进行 2 种 I_c 融合蛋白片段构建。以 *Npu* DnaE 断裂内含肽的 C 片段为基础进行 I_c 融合蛋白片段的改造,主要包括以下几个方面:1)采用基因定点突变的方法引入 D118G 突变。该突变可以解除 C 端断裂对 N 端断裂的依赖,提高 C 端断裂速率^[6];2)通过融合 PCR 的方式将 I_c 片段和 GFP 连接,并在 I_c 片段末端连接了 3 个氨基酸 Cys-Phe-Asn(CFN)来提供 C 端断裂过程中的关键氨基酸+1Cys^[11-12];3)将 IC-GFP 片段分别与表达载体 pET-28a 与 pET-24b 连接,构建两种不同结构的融合蛋白片段。其结构示意图如图 2 所示,分别命名为

CG1(H-C-GFP)和 CG2(C-GFP-H)。

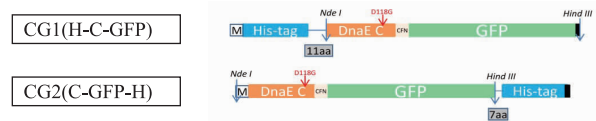


图 2 融合蛋白片段的结构

Fig. 2 Structure of IC-GFP fusion protein fragment

以 pRSFDuet-*Npu*DnaE 质粒为模板,加入引物 S'D118G /A'D118G 对 I_c 片段进行基因定点突变。将质粒转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中,测序验证后,-80 °C低温保存。

分别以 D118G 突变后的质粒以及含有 GFP 片段的质粒 pEGFP-N1 为模板,利用引物 F₁/R₁ 和 F₁/R₁ 进行 I_c 和 GFP 片段的扩增。将两片段按照等摩尔浓度进行混合,用 PrimeSTAR DNA 聚合酶进行扩增。最后以 F₁/R₂ 为引物,使用 Ex Taq DNA 聚合酶对融合后的片段进行 PCR 扩增。凝胶回收融合后的 I_c-GFP 片段,与 pMD19(Simple)-T 载体进行连接,得到 pMD-19T-I_c-GFP 重组质粒。

将酶切后的 I_c-GFP 片段分别与酶切后的 pET-28a 和 pET-24b 载体进行连接,得到重组质粒 pET-28a-CG1 及 pET-24b-CG2。最后转入 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,得到重组表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a-CG1 及 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-24b- CG2,-80 °C超低温下甘油管保藏。

1.2.3 蛋白表达与纯化 取已构建的甘油管保藏的菌株于 LB 培养基中过夜培养活化。按照 1%的接种量接种到新鲜的 TB 培养基(含有相应的抗生素)中至菌体浓度(OD₆₀₀)达到 0.8 时,加入 50 mmol/L 的 IPTG 储存液至终浓度为 1 mmol/L^[13]。在 16 °C, 180 r/min 的条件下诱导蛋白表达 20 h,离心收集表达后的菌体细胞,于-80 °C冰箱中待用。

将收集到的菌体按照细胞湿重 10%(w/v) 的量加入结合缓冲液 Buffer A (50 mmol/L 磷酸钠;0.5 mol/L 氯化钠;100 mmol/L 咪唑;pH 8.0)重悬,冰浴条件下超声裂解细胞。将破碎的细胞裂解液离心(12 000 g×30 min) 收集上清并用 0.22 μm 的滤膜过滤。使用 ÄKTA 蛋白纯化仪将细胞上清液上样到 Ni-NTA 亲和层析柱中,用 20 mmol/L 咪唑浓度的结合缓冲液清洗未结合的杂蛋白;用洗脱缓冲液 Buffer B (50 mmol/L 磷酸钠;0.5 mol/L 氯化钠;500 mmol/L 咪唑;pH 8.0)洗脱目的蛋白。纯化后的目的蛋白通过 3 000 kDa(N1、N2、N3)和 10 kDa(CG1、

CG2)的超滤膜进行超滤浓缩和缓冲液的更换。

1.2.4 柱外断裂实验 通过超滤管将纯化后的目的蛋白中的缓冲液更换成 Buffer C(50 mmol/L 磷酸钠;0.5 mol/L 氯化钠;pH 8.0)。采用考马斯亮蓝法^[14]测定各片段的浓度,按照摩尔比为 3:1(IN:IC)的比例取相应体积的 IN 片段(N1、N2、N3)于 1.5 mL 的 EP 管中,加入终浓度为 50 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT)。取相应体积的 CG(CG1、CG2)片段加入反应体系中混匀,开始断裂反应。该反应在室温下进行,在不同时间点取样进行 SDS-PAGE 电泳检测。利用 ImageJ 软件扫描 SDS-PAGE 图片上的相应目标条带的浓度,根据相对分子质量计算相应条带的摩尔浓度,按照文献[8]的方法计算断裂效率。

1.2.5 Zn^{2+} 的抑制作用 本文研究了不同浓度的 Zn^{2+} 对断裂反应的抑制效果。由于 Zn^{2+} 在碱性环境中容易发生沉淀,在研究 Zn^{2+} 对断裂反应的抑制作用的过程中将目标蛋白的环境条件更换为 Buffer C(x mmol/L Zn^{2+} ;0.5 mol/L NaCl;50 mmol/L Na_2HPO_4 ;pH 6.0)。在 Buffer C 中将 Zn^{2+} 的浓度分别设定为 $x=0, 0.5, 1, 1.5, 2, 5$ 。

按照 N 片段与 CG 片段摩尔比为 3:1 的比例称取适量的蛋白冻干粉,用不同 Zn^{2+} 浓度的 Buffer C 缓冲液溶解。在室温下进行断裂反应,并在反应的不同时间分别取样,进行 SDS-PAGE 检测和分析。

1.2.6 I_N 层析介质的偶联 采用 Buffer D(0.1mol/L $Na_2CO_3/NaHCO_3$,pH 10.0)溶解亲和配基片段 N3,配置成浓度为 7 mg/mL 的蛋白溶液。称取 5 g 环氧活化的琼脂糖凝胶介质于带塞的 25 mL 三角瓶中,加入 15 mL 的 N3 蛋白溶液进行偶联反应。偶联条件为:40 $^{\circ}C$,150 r/min,16 h。偶联后的介质用大量的去离子水清洗并抽干,20 %乙醇溶液中,4 $^{\circ}C$ 保存。

1.2.7 I_N 亲和层析介质对融合蛋白表达片段 CG2 的纯化 将制备好的亲和层析介质装于 1 mL 的预装柱中,采用 ÄKTA purifier 层析系统进行整个蛋白纯化过程,流速控制在 1 mL/min。其亲和纯化过程如图 3 所示,具体操作如下所示:

1) 介质平衡与上样。用 10 倍柱体积的平衡缓冲液 Buffer E (1 mmol/L Zn^{2+} ;0.5 mol/L NaCl;50 mmol/L 磷酸钠;pH 6.0)对介质进行充分平衡,以 1 mL/min 的流速将 CG 粗蛋白液上样 1 mL。

2) 清洗杂蛋白。用 5 倍柱体积的平衡缓冲液充分冲洗,除去未结合的蛋白。最后用 2 倍体积不含

Zn^{2+} 的平衡缓冲液冲洗,除去介质内的 Zn^{2+} 。

3) 诱导断裂。3 倍体积断裂缓冲液 Buffer F (50 mmol/L DTT,20 mmol/L EDTA,0.5 mol/L NaCl,50 mmol/L 磷酸钠,pH 8.0)冲洗层析介质。室温下静置 10 min。

5) 洗脱。用洗脱缓冲液 Buffer C(50 mmol/L 磷酸钠;0.5 mol/L 氯化钠;pH 8.0)洗下断裂后的 GFP 并进行收集。

6) 亲和层析介质的再生。用再生缓冲液 Buffer G (10 mmol/L Tris-HCl;0.5 mol/L NaCl;6 mol/L 盐酸胍,pH 8.0)将与亲和介质结合的 IC 以及未完全断裂的 CG2 片段洗脱下来。

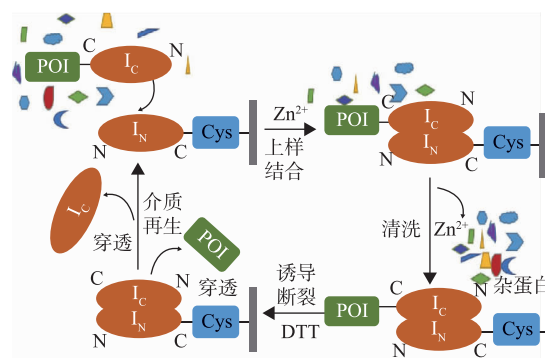


图 3 I_N 亲和层析介质的亲和纯化过程

Fig. 3 Purification process of I_N affinity chromatography

2 结果与讨论

2.1 重组菌株的构建

以 pRSFDuet-*Npu*DnaE 和 pEGFP-N1 质粒为模板,利用分子生物学手段成功的构建了重组质粒 pET-28a-N1、pET-21b-(N2,N3)、pET-28a-CG1 和 pET-24b-CG2。重组质粒的双酶切结果表明(图 4):在 300 bp 与 400 bp 相对应的位置出现目的基因条带,证明 N1、N2、N3 片段与表达载体正确连接;在 800 bp 与 1 000 bp 之间也有相应的 CG 基因片段的目标条带出现。所有的质粒都经过基因测序进一步证明序列的正确性。

2.2 蛋白表达和纯化

接种构建好的重组表达菌株于新鲜的 TB 培养基中进行亲和配基片段和融合蛋白片段的表达。在 IPTG 的诱导下,3 种 N 片段和两种 CG 片段都成功的进行了表达,表达比较高。(图 5)

为了研究 N 与 CG 片段在柱外断裂情况,需要对这五种蛋白片段进行分离纯化。本实验中利用 N

与 CG 片段中带有 His 标签对其进行 Ni 亲和纯化。结果表明,3 种 N 片段及 CG1 与 CG2 片段都得到了较好的纯化效果。穿透液中有少量的目标蛋白存在,

这可能是目标蛋白在表达过程中组氨酸标签没有暴露导致无法与 Ni-NTA 层析介质结合^[9]。通过后续进一步优化蛋白表达条件可以避免这种现象的产生。

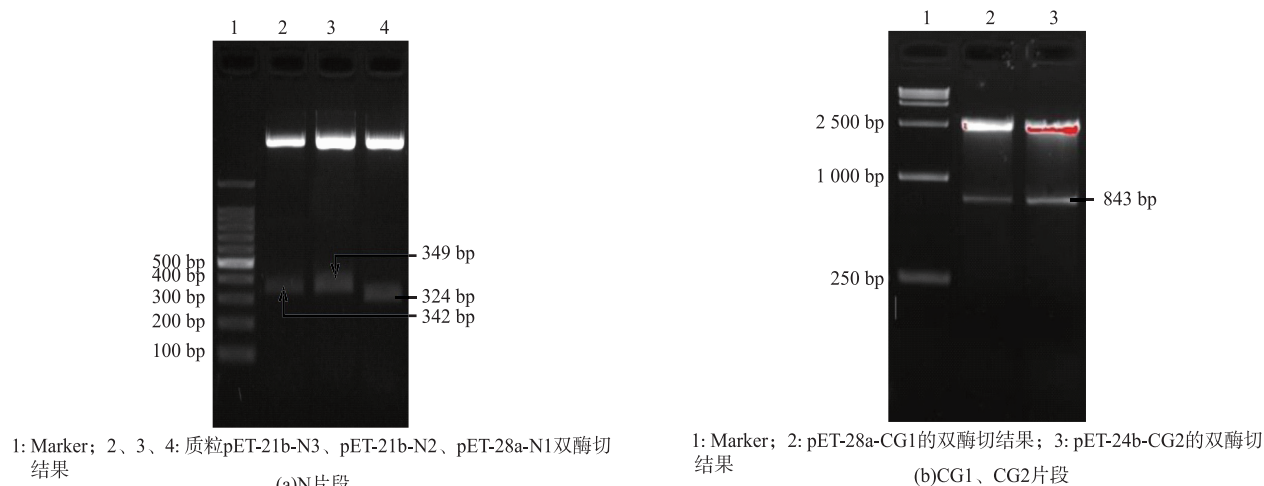
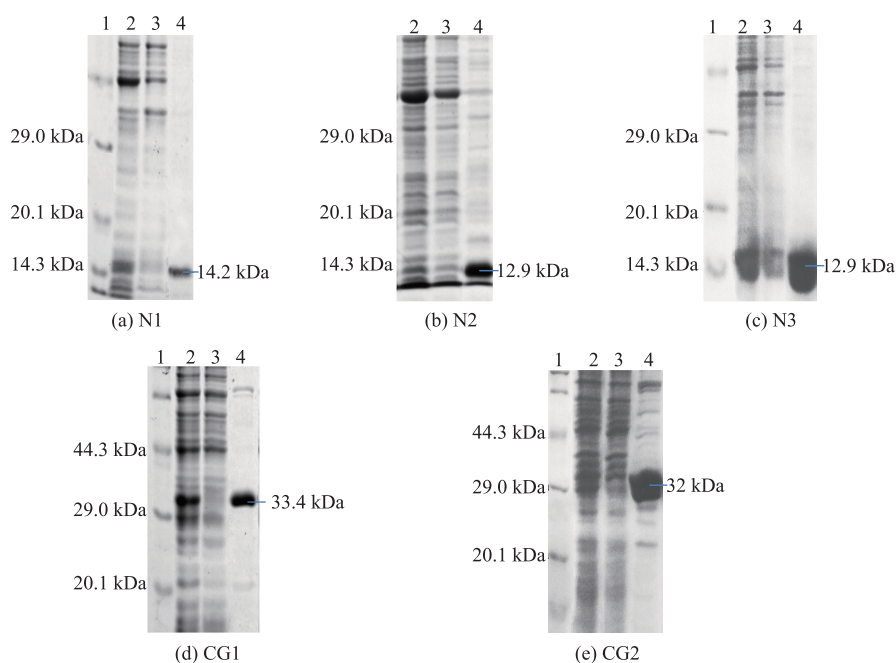


图 4 重组质粒双酶切验证图

Fig. 4 Digestion of recombinant plasmids with *Nde* I and *Hind* III



1: Marker; 2: 粗样品; 3: 穿透样品; 4: 洗脱样品

图 5 纯化电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE results of the purification

2.3 体外断裂实验

将 3 种 N 片段和两种 CG 片段两两组合,共形成 6 种不同的断裂反应组合,分别命名为 A、B、C、D、E、F。各个组合断裂结果如图 6 所示。通过分析发现,结构不同的 N 和 CG 片段相互作用时,其断裂

速率各不相同,呈现一定的规律性。其中,组合 F 的断裂速率最快,小于 1 min 的时间内就可以达到 90%以上的断裂速率。而文献[7]构建的纯化体系为了达到相同的断裂速率需要花费 30 min 以上的时间。可能是因为 Cys 替代 CBD 标签在三维空间结构

上减少了两片段之间结合阻力,加速断裂反应的进行。为了更直观的比较不同组合断裂时所需要的时

间,本文将 6 中不同组合的断裂速率总结成表 2。

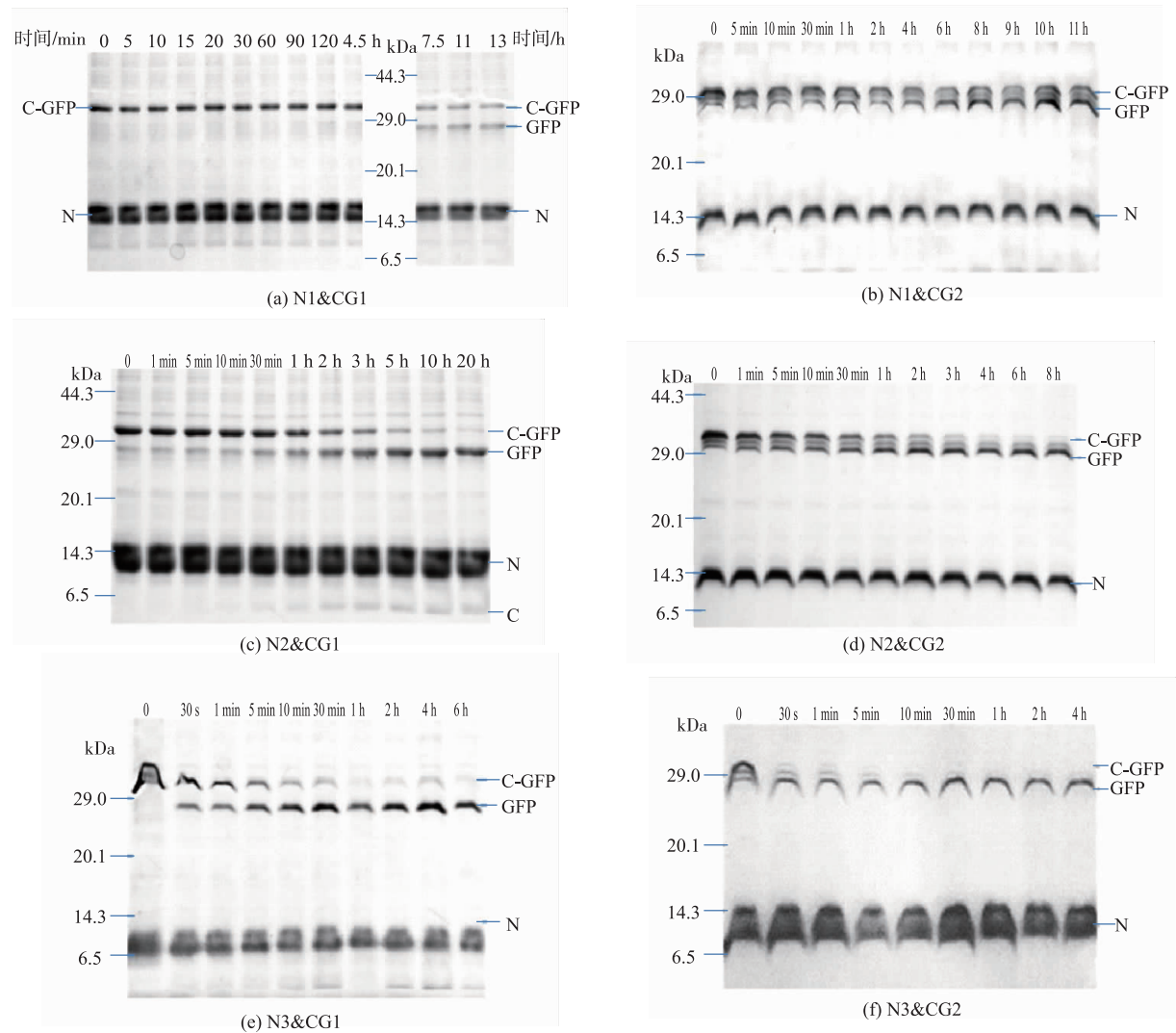


图 6 6 种组合断裂过程不同时间点取样 SDS-PAGE 结果图
Fig. 6 SDS-PAGE of the C-cleavage reaction between six different groups of N and CG

表 2 六种组合断裂反应活性比较
Table 2 Comparison of C-cleavage of six different groups

组合	组合中的片段构成	断裂率达 50% 所用时间	断裂完成 所用时间
A	N1 (HNc) & CG1 (H-C-GFP)	11 h	—
B	N1 (HNc) & CG2 (C-GFP-H)	4 h	—
C	N2 (HNc) & CG1 (H-C-GFP)	2 h	10 h
D	N2 (HNc) & CG2 (C-GFP-H)	10 min	4 h
E	N3 (NHc) & CG1 (H-C-GFP)	5 min	1 h
F	N3 (NHc) & CG2 (C-GFP-H)	—	1 min

注：“—”在 A、B 组中表示反应未完成；在 F 组中表示反应时间太短无法精确测量

文献[7]研究发现,空间位阻对断裂反应速率有着很大的影响。*Npu* DnaE 断裂内含肽两片段相互结合时,*I_N* 的 N 端剪接结构域与 *I_C* 的 C 端剪接结构域相互靠近^[5,16]。为了考察空间位阻对断裂反应的影响,将 6 种组合相互作用的结构示意图绘制成图 7。通过该图我们可以发现:*I_N* 的 N 端片段越短,参与的断裂反应速率越快;*I_C* 的 N 端片段越短,断裂速率越快。通过改变 *I_N* 和 *I_C* 的 N 端插入序列的多少,可以对内含肽断裂反应的速率进行调控,有望实现

断裂内含肽的可控性断裂。

2.4 Zn^{2+} 对断裂反应的抑制

本文中选取断裂速度最快的组合 F(N3&CG2) 来研究不同浓度的 Zn^{2+} 对断裂反应的抑制作用。当 Zn^{2+} 浓度大于 1 mmol/L 时,反应体系中的目标蛋白会发生沉淀(对反应体系中的上清部分进行取样)。实验结果如图 8 所示, Zn^{2+} 对断裂反应没有显著的抑制效果。与 Guan 所述的 0.5 mmol Zn^{2+} 对断裂反应有明显的抑制效果相违背^[6]。

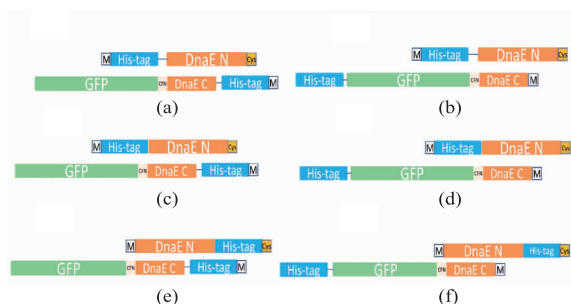


图 7 六种组合在 I_N 与 I_C 结合过程中空间位阻对断裂反应的影响

Fig. 7 Effect of steric hinderance on cleavage reaction during the process of I_N and I_C recognition

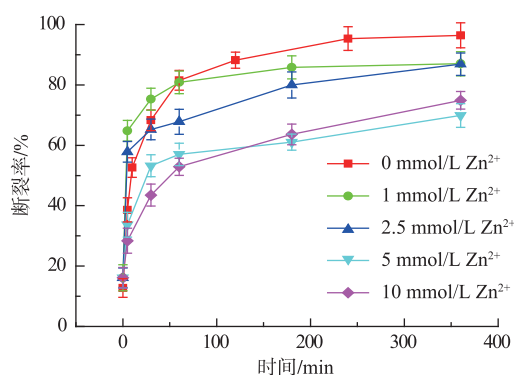


图 8 不同浓度 Zn^{2+} 对组合 F(N3&CG2) 断裂反应的抑制作用

Fig. 8 Inhibition effects of different concentration of Zn^{2+} on cleavage group F(N3&CG2)

Zn^{2+} 对断裂反应的抑制作用主要是有 Zn^{2+} 结合域的存在。*Ssp* DnaE 断裂内含肽的 Zn^{2+} 结合区域是由 His48, Asp140, His110 以及 +1Cys 组成^[17]。由于断裂内含肽 *Ssp* DnaE 和 *Npu* DnaE 高度同源性,根据氨基酸序列比对,*Npu* DnaE 对应的 Zn^{2+} 结合位点为 His48, Asp118 和 +1Cys (His110 在 *Npu* DnaE 中无对应)。本实验中引入的 D118G 突变破坏了上述结合位点,造成 Zn^{2+} 抑制效果不佳。

文献[18]研究发现 *Mtu* RecA 内含肽中存在第

二个 Zn^{2+} 结合位点——Cys1 和 His73。由于 *Npu* DnaE 内含肽与 mini-*Mtu* RecA 内含肽在序列和结构上同源性很高,我们推测 *Npu* DnaE 中的 Cys1 位点可能是 Zn^{2+} 结合域的关键氨基酸,参与 Zn^{2+} 抑制。为了验证该推论,我们将 N3 片段中的首位氨基酸进行回复性突变即引入 A1C 突变。突变之后的 N3 片段在 1 mmol/L Zn^{2+} 浓度的条件下进行断裂实验,不同时间点进行取样,计算断裂率。结果表明,回复突变之后, Zn^{2+} 具有了明显的抑制作用(图 9)。这论证了 Cys1 参与 Zn^{2+} 对断裂反应抑制作用的推断。

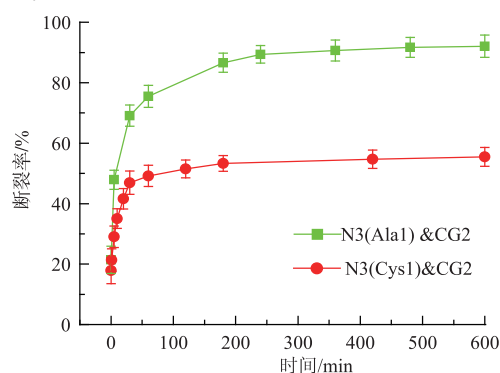
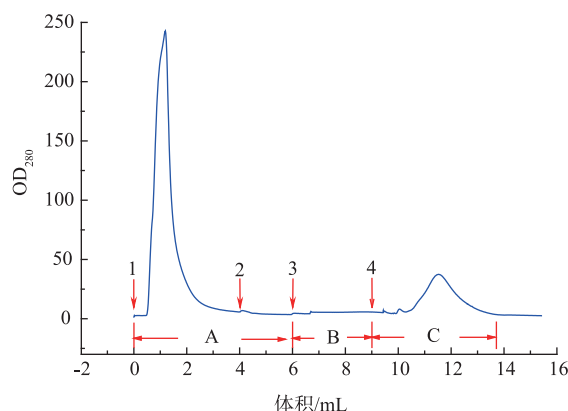


图 9 N3 回复突变前后的 Zn^{2+} 抑制效果比较

Fig. 9 Comparison of Zn^{2+} inhibition effects before and after A1C mutation

2.5 I_N 亲和层析介质对融合蛋白表达片段 CG2 的纯化

自制的 I_N 亲和层析介质对 CG2 蛋白纯化过程图如图 10 所示,粗蛋白样品的上样量为 1 mL。图中 A 阶段为杂蛋白清洗,B 阶段为 DTT 诱导断裂,C 阶段为目标蛋白洗脱。



1:进样;2:不含 Zn^{2+} 的缓冲液清洗;3:更换断裂缓冲液并静置;4:洗脱

图 10 CG2 样品的纯化过程图

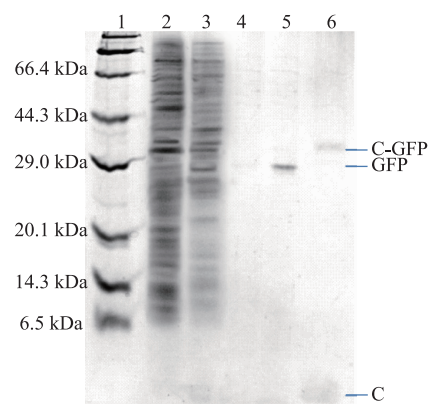
Fig. 10 Purification process of CG2 segment

对纯化过程中各个阶段取样进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 11 所示。穿透峰中含有少量未结合的 CG2 片段(图 11 第 3 泳道),这可能是由于 IN 层析介质的吸附量达到了饱和。洗脱后获得纯度较高的单一的目标条带 GFP(29 kDa)。通过 ImageJ 软件扫描 SDS-PAGE 图片上粗样品和纯化后 GFP 蛋白的纯度,得出目标蛋白的纯化倍数为 8.13 倍。利用考马斯亮蓝法测定并计算得到粗样品中 CG2 片段的含量为 0.318 mg,洗脱样品中 GFP 的含量为 0.173 mg,对 GFP 的回收率约为 54.7%。通过该方法纯化得到的目的蛋白在纯度和回收率上要优于文献[7]的方法(GFP 的纯度和回收率分别为 81%和 43%),可能因为引入的 Cys 避免了 I_N 亲和配基的脱落,间接的提高了目的蛋白的纯度,此外,A1C 回复突变之后使 Zn²⁺的抑制效果更加显著,目标蛋白断裂速率降低,增加了介质的回收率。

由于 I_N 亲和层析介质动态载量低,使得 CG2 片段未能完全与层析介质结合(图 11,泳道 3)。此外,在清洗杂蛋白的过程中,部分 CG2 片段发生了断裂,造成目的蛋白的损失。后续可通过优化 I_N 亲和层析介质的偶联条件来增加其配基密度,提高目的蛋白的回收率。用再生缓冲液 Buffer G 将结合在介质上的 I_C 片段(4 kDa)进行分离(如图 11 泳道 6)。由图可知,洗脱样品中存在少量未断裂完全的 CG2 片段。同时,由于 I_C 片段的分子量较小,洗脱后的样品在电泳图中的条带不清晰。

3 结 语

以天然断裂内含肽 *Npu* DnaE 为研究对象,利用分子生物学的方法对 I_N 和 I_C 结构进行了改造,成功的构建了 3 种亲和配基片段(N1、N2、N3)和两种



1:Marker;2:CG2 片段的粗样品;3:A 阶段的穿透样品;4:B 阶段样品;5:C 阶段的洗脱样品;6:介质再生样品

图 11 CG2 纯化过程 SDS-PAGE

Fig. 11 SDS-PAGE results of purification process of CG2

I_C 融合蛋白片段(CG1、CG2)。通过 6 种不同组合的柱外断裂实验,可以发现 I_N 和 I_C 的 N 端插入序列的多少对内含肽断裂活性有着重要的影响;通过不同浓度的 Zn²⁺抑制试验,发现 *Npu* DnaE 内含肽的第 2 个 Zn²⁺结合位点 Cys1。利用在 N3 片段 C 末端添加的 Cys 与环氧活化的琼脂糖凝胶介质进行偶联,成功的制备了 I_N 亲和层析介质。以 CG2 为模型蛋白,成功的对其进行了纯化,获得了高纯度的目标蛋白 GFP。为以 *Npu* DnaE 断裂内含肽所介导的亲亲和纯化体系在蛋白纯化领域的应用提供了基础。

此外,该方法还存在一定的局限性。为了加快 C 端断裂反应的速率,向反应体系中添加 50 mmol/L DTT,可能最终会影响含有二硫键的目的蛋白从而影响其功能。此外,由于 I_N 片段中含有多余的 Cys 的存在,在进行共价偶联的过程中会造成亲和配基片段非定向的结合,最终影响 C 端断裂速率。

参考文献:

- [1] LIU Xiangqin. Protein-splicing intein: genetic mobility, origin, and evolution[J]. *Annual Review of Genetics*, 2000, 34: 61-76.
- [2] PERLER F B. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution [J]. *Cell*, 1998, 92(1): 1-4.
- [3] COOPER A A, STEVENS T H. Protein splicing - self-splicing of genetically mobile elements at the protein level [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20(9): 351-356.
- [4] IWAI H, ZUGER S, JIN J, et al. Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme*[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(7): 1853-1858.
- [5] OEEMIG J S, ARANKO A S, DJUPSJOBACKA J, et al. Solution structure of DnaE intein from *Nostoc punctiforme*: structural basis for the design of a new split intein suitable for site-specific chemical modification [J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(9):

- 1451-1456.
- [6] RAMIREZ M, VALDES N, GUAN D L, et al. Engineering split intein DnaE from *Nostoc punctiforme* for rapid protein purification[J]. **Protein Engineering, Design & Selection**, 2013, 26(3): 215-223.
 - [7] GUAN D L, RAMIREZ M, CHEN Z L. Split intein mediated ultra-rapid purification of tagless protein (SIRP)[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2013, 110(9): 2471-2481.
 - [8] SHI C H, MENG Q, WOOD D W. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2013, 97(2): 829-835.
 - [9] NICHOLS N M, EVANS J T C. Mutational analysis of protein splicing, cleavage, and self-association reactions mediated by the naturally split *Ssp* DnaE intein[J]. **Biochemistry**, 2004, 43: 10265-10276.
 - [10] LIAO J L, LI Y M, HJERTEN S. Continuous beds for micro chromatography; reversed-phase chromatography [J]. **Analytical Biochemistry**, 1996, 234: 27-30.
 - [11] PERELLO M V, LIU Z H, SHAH N H, et al. Streamlined expressed protein ligation using split inteins [J]. **J Am Chem Soc**, 2013, 135(1): 286-292.
 - [12] SHAH N H, ERYILMAZ E, COWBURN D, et al. Extein residues play an intimate role in the rate-limiting step of protein trans-splicing[J]. **J Am Chem Soc**, 2013, 135(15): 5839-5847.
 - [13] LIU Peiran, DU Guocheng, ZHOU Jingwen, et al. Heterologous expression of tyrosine ammonia lyase from *rhodotorula glutinis* in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(12): 1241-1246. (in Chinese)
 - [14] 余国萍. 食品生物化学实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
 - [15] YIN Y B, WEI G M, ZOU X Y, et al. Functionalized hollow silica nanospheres for His-tagged protein purification [J]. **Sens Actuators B: Chemical**, 2015, 209: 701-705.
 - [16] ARANKO A S, OEEMIG J S, ZHOU D W, et al. Structure-based engineering and comparison of novel split inteins for protein ligation[J]. **Molecular Biosystems**, 2014, 10(5): 1023-1034.
 - [17] SUN P, YE S, FERRANDON S, et al. Crystal structures of an intein from the split dnaE gene of *Synechocystis* sp PCC6803 reveal the catalytic model without the penultimate histidine and the mechanism of zinc ion inhibition of protein splicing[J]. **J Mol Biol**, 2005, 353(5): 1093-1105.
 - [18] ZHANG L Y, ZHENG Y C, XI Z Y, et al. Metal ions binding to recA inteins from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. **Molecular Biosystems**, 2009, 5(6): 644-650.

科技信息

加拿大批准两种磷酸盐用于婴儿食品中

2019年8月7日,加拿大卫生部发布 NOM/ADM-0137 号文件,修订允许使用的螯合剂列表,批准在婴儿谷类食品中使用磷酸氢二钾(Potassium Phosphate, dibasic)以及在婴儿配方奶粉乳清产品中使用六偏磷酸钠(Sodium Potassium Hexametaphosphate)。

据了解,磷酸氢二钾已经被允许在一些肉制品中作为螯合剂使用。该规定于2019年8月7日生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 加拿大批准两种磷酸盐用于婴儿食品中 [EB/OL]. (2019-8-9). <http://news.foodmate.net/2019/08/529476.html>