

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140153

假坚强芽孢杆菌丙氨酸脱氢酶的原核表达纯化与结晶

唐昭娜^{1,2}, 张翠英¹, 胡平雄^{1,2}, 易秋分^{1,2}, 杨江丽^{1,2}, 董辉²

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

摘要: 丙氨酸脱氢酶(alanine dehydrogenase, Ald)是一种 NAD⁺依赖性的氨基酸脱氢酶,能可逆地催化丙氨酸氧化脱氨生成丙酮酸和氨. 实验以假坚强芽孢杆菌的丙氨酸脱氢酶为研究对象,将目的基因克隆到 pET-22 b(+)原核表达载体上,并在大肠杆菌中完成蛋白的高效表达. 通过镍离子亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析等纯化方法,得到了高纯度的目的蛋白. 利用气相扩散法对目的蛋白进行结晶,最终得到分辨率为 0.31 nm 的蛋白晶体.

关键词: 丙氨酸脱氢酶; 表达; 纯化; 结晶

中图分类号: Q518.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2015)04-0021-04

Prokaryotic Expression, Purification and Crystallization of Alanine Dehydrogenase in *Bacillus pseudofirmus*

TANG Zhaona^{1,2}, ZHANG Cuiying¹, HU Pingxiong^{1,2}, YI Qiufen^{1,2},
YANG Jiangli^{1,2}, DONG Hui²

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China)

Abstract: Alanine dehydrogenase (Ald) is a NAD⁺-dependent amino acid dehydrogenase. It catalyzes the reversible oxidative deamination of L-alanine to pyruvate and ammonia. An Ald gene from *Bacillus pseudofirmus* was cloned into the prokaryotic expression vector pET-22 b (+) and the Ald protein was overexpressed in *Escherichia coli*. The Ald protein was purified by Ni²⁺-chelating affinity chromatography, anion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. Crystals were grown with the vapour-diffusion method and diffracted to 0.31 nm resolution.

Key words: alanine dehydrogenase; expression; purification; crystallization

丙氨酸脱氢酶(alanine dehydrogenase, Ald)是一种 NAD⁺依赖性的氨基酸脱氢酶^[1],琥珀酸、苹果酸和丙酮酸等均可诱导其产生^[2-3]. 丙氨酸脱氢酶可以调节酮酸和氨基酸的稳态平衡,它可逆地催化丙氨酸生成丙酮酸和氨,同时 NAD⁺被还原成为 NADH. 反应产物丙酮酸在食品工业、制药工业、农用化学品、生化研究和减肥保健品等多个方面被广泛的应用^[4].

丙氨酸脱氢酶在细菌、藻类和植物中分布较为广泛,影响着微生物的碳氮代谢^[5-9]. 动物体内的丙氨酸脱氢酶影响着机体的氨基酸代谢和糖代谢,能为机体提供能量^[10]. 1990年,丙氨酸脱氢酶的编码基因

被克隆成功^[11],来源于席藻(*Phormidium lapideum*)中丙氨酸脱氢酶的三维空间结构在1998年首次被解析出来^[9],其后多种不同来源的丙氨酸脱氢酶三维空间结构也相继被解析.

目前,尚无关于假坚强芽孢杆菌(*Bacillus pseudofirmus*)丙氨酸脱氢酶(NCBI参考序列号: WP_012 959 278.1)表达纯化及结晶的研究报道. 本实验对来源于假坚强芽孢杆菌的丙氨酸脱氢酶进行原核表达纯化及结晶,并通过X射线衍射对其晶体数据进行收集和处理,为蛋白空间结构的解析提供有力的理论依据,可为其催化机制的研究和相关药物的

收稿日期: 2014-11-25; 修回日期: 2014-12-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31300601)

作者简介: 唐昭娜(1989—),女,河北石家庄人,硕士研究生; 通信作者: 董辉,副研究员, donghui@irm-cams.ac.cn.

数字出版日期: 2015-05-08; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20150508.1507.005.html>.

研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 目的基因、表达载体及菌株

含有丙氨酸脱氢酶(Ald)基因的质粒和实验用到的表达载体 pET-22b(+)由本实验室保存。感受态细胞 *E. coli* DH5 α 和 BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 实验试剂

本实验用到的引物由上海生工生物工程有限公司合成; *Pfu* DNA 聚合酶、dNTP(10 mmol/L)、限制性核酸内切酶(*Nde* I 和 *Xho* I)、T4 DNA 连接酶, Fermentas 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒, Bioflux 公司; 氨苄青霉素(Amp⁺)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、咪唑、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氯化钠(NaCl)等, 上海生工生物工程有限公司; Ni-NTA sephrose、Resource Q 离子交换柱、Superdex 75 凝胶过滤层析柱, GE Healthcare 公司; 结晶试剂盒 Index、PEG/Ion screen、PEG/Ion 2 screen、Crystal Screen 和 Crystal Screen 2, Hampton Research 公司; 乙二醇、聚乙二醇(PEG 3350)、甲酸钠等, Sigma 公司; 甘油等其他常用试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建

利用引物设计软件 Primer Premier 5.0, 按照引物设计原则设计引物。本实验选定的酶切位点分别为 *Nde* I 与 *Xho* I, 设计出的引物如下: 上游: 5'-CCCATATGATGTTAATTGGTGTACC-3', 其中划线部分为 *Nde* I 酶切位点; 下游: 5'-CCTCGAGTCATGACTGAAGTGTTT-3', 其中划线部分为 *Xho* I 酶切位点。

以含有目的基因(1 125 bp)的质粒为模板经 PCR 后, 用限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对目的基因和 pET-22b(+) 进行双酶切, 产生相同的黏性末端, 构建重组质粒。利用限制性内切酶酶切法和 DNA 测序法对重组质粒进行鉴定。

1.2.2 丙氨酸脱氢酶(Ald)的表达

将重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞内。挑取长出的单克隆菌落接种于 5 mL 含

100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基内, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养过夜。次日, 将上述培养液接种于 800 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基内, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养至 600 nm 处吸光度在 0.6 左右。将摇床温度降至 16 $^{\circ}$ C, 向菌液内加入 0.25 mmol/L IPTG, 诱导培养 16 ~ 20 h。将菌液以 5 500 r/min 离心 20 min, 弃上清液。用缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.2), 200 mmol/L NaCl 溶液, 5% 甘油)对菌体进行重悬并收集。

1.2.3 丙氨酸脱氢酶(Ald)的纯化

收集的菌体利用低温高压破碎, 12 000 r/min 离心 40 min, 收集上清液。将上清液加到已用悬菌缓冲液平衡过的镍离子亲和层析柱(NI-NTA sephrose)上。悬菌缓冲液和洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.2), 200 mmol/L NaCl 溶液, 5% 甘油, 1 mol/L 咪唑)按比例混合, 使缓冲液中咪唑浓度分别为 20、50、100、200 mmol/L, 利用梯度洗脱对蛋白进行初步纯化。洗脱的目的蛋白利用 Resource Q 离子交换柱和 Superdex 75 凝胶过滤层析柱进行进一步的纯化。

1.2.4 Ald 蛋白结晶条件的初筛及结晶条件的优化

对获得的 Ald 蛋白进行结晶条件的筛选。将蛋白稀释成 5 mg/mL 和 10 mg/mL 两种质量浓度溶液, 用 Index、PEG/Ion screen、PEG/Ion 2 screen、Crystal Screen 和 Crystal Screen 2 等试剂盒以坐滴气相扩散法在 16 $^{\circ}$ C 条件下初步筛选蛋白的结晶条件。通过改变结晶初筛条件中温度、缓冲液 pH、盐的浓度、沉淀剂的种类和浓度以及蛋白浓度来确定蛋白结晶的最优条件^[12]。

2 结果与分析

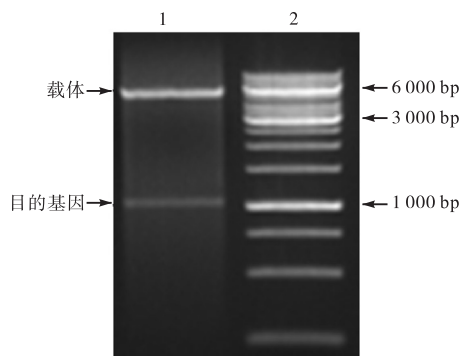
2.1 重组质粒的构建和鉴定

利用质粒提取试剂盒提取重组质粒, 使用限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对其进行双酶切鉴定, 鉴定结果如图 1 所示。图中出现的两片段大小约为 1 100 bp 和 5 500 bp, 初步证实该质粒为重组质粒。测序的结果也表明重组质粒构建成功。

2.2 Ald 蛋白的表达与纯化

菌液经高压低温破碎后离心, 上清液中的蛋白结合到镍离子亲和层析介质上, 用含不同咪唑浓度的缓冲液进行洗脱。洗脱过程取样, 进行 12% SDS-PAGE 分析, 结果如图 2 所示。最终得出杂蛋白和目的蛋白洗脱缓冲液中咪唑浓度分别为 20 mmol/L 和

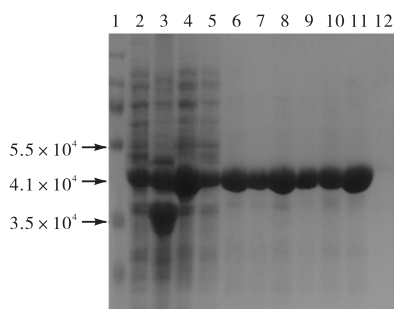
200 mmol/L.



1. 重组质粒的双酶切; 2. DNA Marker

图1 重组质粒的双酶切

Fig. 1 Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid



1. Protein Marker; 2. 细胞裂解上清液; 3. 细胞裂解沉淀; 4. 上样后介质; 5. 20 mmol/L 咪唑洗脱; 6. 20 mmol/L 咪唑洗脱介质; 7. 50 mmol/L 咪唑洗脱; 8. 50 mmol/L 咪唑洗脱介质; 9. 100 mmol/L 咪唑洗脱; 10. 100 mmol/L 咪唑洗脱介质; 11. 200 mmol/L 咪唑洗脱; 12. 200 mmol/L 咪唑洗脱介质

图2 Ald镍离子亲和层析的SDS-PAGE分析

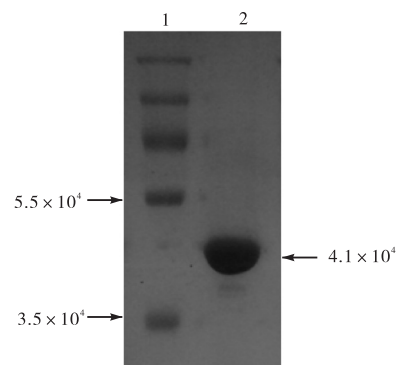
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of Ald after Ni-NTA affinity chromatography

经镍离子亲和层析洗脱下来的目的蛋白,利用 Resource Q 离子交换柱和 Superdex 75 凝胶过滤层析柱进行进一步纯化,最终得到的 Ald 蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析,如图 3 所示,结果显示得到了纯度较高的蛋白,可进行蛋白晶体筛选。

2.3 Ald 蛋白晶体的筛选与优化

经过 Hampton Research 公司的蛋白质结晶试剂盒初筛后,多个条件长出晶体,见表 1。本实验主要针对晶体生长较好的结晶条件进行温度、缓冲液 pH、盐的浓度、沉淀剂的种类和浓度以及蛋白质量浓度的优化,使最初较小的晶体经优化变为较大的块状晶体,如图 4 所示。最终得出当结晶温度为 16 °C、蛋白质量浓度为 10 mg/mL、池液条件为有机酸盐混合物 (73.2 mmol/L 丙二酸, 10 mmol/L 柠檬酸铵, 4.8 mmol/L 丁二酸, 12 mmol/L DL-苹果酸,

16 mmol/L 三水醋酸钠, 20 mmol/L 甲酸钠, 6.4 mmol/L 酒石酸氢铵) pH 5.0 和 8% PEG 3350 时,可优化出理想的晶体。



1. Protein Marker; 2. Ald 蛋白

图3 Ald凝胶过滤层析纯化后 SDS-PAGE 分析

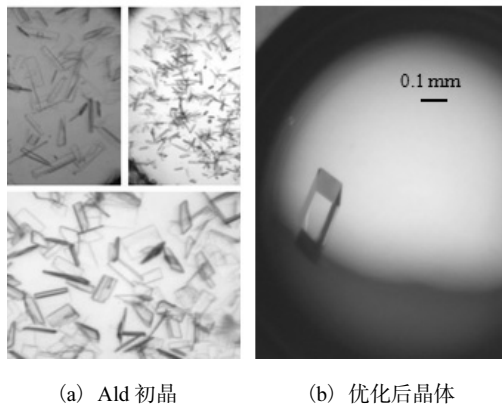
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Ald after gel filtration chromatography

表 1 Ald 蛋白的初步结晶条件

Tab. 1 Initial crystallization conditions of Ald

试剂盒编号	池液成分
Crystal Screen 2-3 [#]	25% 乙二醇
PEG/Ion 2 Screen-11 [#]	有机酸盐混合物 (73.2 mmol/L 丙二酸, 10 mmol/L 柠檬酸铵, 4.8 mmol/L 丁二酸, 12 mmol/L DL-苹果酸, 16 mmol/L 三水醋酸钠, 20 mmol/L 甲酸钠, 6.4 mmol/L 酒石酸氢铵) pH 5.0; 12% PEG 3350
Crystal Screen 2-27 [#]	0.1 mol/L 甲酸钠 pH 7.0; 12% PEG 3350
Index-55 [#]	0.05 mol/L 氯化镁; 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠 pH 7.5; 30% 聚乙二醇单甲醚 550
Index-76 [#]	0.2 mol/L 硫酸锂; 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠 pH 7.5; 25% PEG 3350
PEG/Ion 2 Screen-30 [#]	0.2 mol/L 酒石酸钠 pH 7.0; 20% PEG 3350
PEG/Ion 2 Screen-33 [#]	有机酸盐混合物 (36.6 mmol/L 丙二酸, 5 mmol/L 柠檬酸铵, 2.4 mmol/L 丁二酸, 6 mmol/L DL-苹果酸, 8 mmol/L 三水醋酸钠, 10 mmol/L 甲酸钠, 3.2 mmol/L 酒石酸氢铵) pH 6.0; 0.1 mol/L 双(2-羟乙基)氨基(三羟甲基)甲烷 pH 6.5; 20% PEG 3350
Crystal Screen-40 [#]	0.1 mol/L 柠檬酸钠 pH 5.6; 20% 异丙醇; 20% PEG 4000

优化后的晶体经 X-ray 衍射和数据收集处理,最后得到 Ald 蛋白晶体的分辨率为 0.31 nm (见图 5)。该晶体参数数据统计结果见表 2。



(a) Ald 初晶 (b) 优化后晶体

图 4 Ald 晶体图片

Fig. 4 Crystal images of Ald

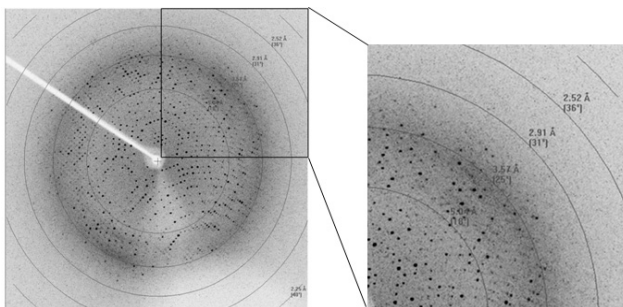


图 5 Ald 晶体衍射图

Fig. 5 X-ray diffraction pattern of Ald crystal

表 2 Ald 蛋白晶体衍射数据统计表

Tab. 2 Statistics of the diffraction data of Ald

晶体参数	晶体数据
空间群	$P2_12_12_1$
波长/nm	0.154 18
$a, b, c/\text{nm}$	$a = 9.74, b = 15.67, c = 16.91$
$\alpha, \beta, \gamma/^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
分辨率范围/nm	5.000 ~ 0.310 (0.315 ~ 0.310)
总衍射点	344 880 (15 162)
独立衍射点	47 900 (2 369)
冗余度	7.2 (6.4)
完整度/%	100 (100)
衍射强度 R 因子/%	15.2 (43.1)
信噪比 $I/\sigma(I)$	11.58 (2.65)

3 结 论

本实验将假坚强芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus* 的 Ald 目的基因克隆到原核表达载体 pET-22 b(+) 上, 成功构建了重组质粒, 并完成了其在大肠杆菌中的高效表达. 通过镍离子亲和层析、Resource Q 离子交换层析和 Superdex 75 凝胶过滤层析等方法对目的

蛋白进行纯化, 将纯化后的蛋白用于蛋白结晶. 对蛋白结晶条件进行筛选及优化, 最终在结晶温度为 16 °C、蛋白质量浓度为 10 mg/mL、池液条件为有机酸盐混合物 (73.2 mmol/L 丙二酸, 10 mmol/L 柠檬酸铵, 4.8 mmol/L 丁二酸, 12 mmol/L DL-苹果酸, 16 mmol/L 三水醋酸钠, 20 mmol/L 甲酸钠, 6.4 mmol/L 酒石酸氢铵) pH 5.0 和 8% PEG3350 时, 获得分辨率为 0.31 nm 的蛋白晶体. 晶体所属空间群为 $P2_12_12_1$, 晶胞参数为 $a = 9.74 \text{ nm}$ 、 $b = 15.67 \text{ nm}$ 、 $c = 16.91 \text{ nm}$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. 本实验中得到的蛋白晶体的相关数据为蛋白空间结构的解析提供了重要依据, 并对深入了解 Ald 蛋白的催化机制尤为重要, 能为相关药物的研发和疾病的预防奠定基础.

参考文献:

- [1] Brunhuber N M, Blanchard J S. The biochemistry and enzymology of amino acid dehydrogenases[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 29(6): 415-467.
- [2] Pernil R, Herrero A, Flores E. Catabolic function of compartmentalized alanine dehydrogenase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(19): 5165-5172.
- [3] Lodwig E, Kumar S, Allaway D, et al. Regulation of L-alanine dehydrogenase in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and its role in pea nodules[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(3): 842-849.
- [4] 何广正, 徐书景, 马宁, 等. 丙氨酸脱氢酶研究概况[J]. 生物技术通报, 2011(12): 27-32.
- [5] Siranosian K J, Ireton K, Grossman A D. Alanine dehydrogenase (ald) is required for normal sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(21): 6789-6796.
- [6] Baysal S H, Yasa I, Uslan A H. Screening and simple purification of alanine dehydrogenase in *Bacillus* strains[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2002, 32(3): 277-285.
- [7] Feng Z, Cáceres N E, Sarath G, et al. *Mycobacterium smegmatis* L-alanine dehydrogenase (Ald) is required for proficient utilization of alanine as a sole nitrogen source and sustained anaerobic growth[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(18): 5001-5010.

(下转第 77 页)