

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20230114

数字出版日期: 2024-01-23; 数字出版网址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240123.1013.001>

新型芳基磺基转移酶在大肠杆菌中的表达及表征

龚巧琳¹, 杨书尧², 寇梦云², 宋亚国¹, 郑迎迎², 李金山²

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

摘要: 肝素是动物源高度硫酸化、非均一的线性糖胺聚糖。芳基磺基转移酶参与肝素生物合成中磺基供体 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)的合成与再生,是实现肝素生理功能的关键酶。目前已报道的芳基磺基转移酶存在种类少、表达量低等问题。本研究采用隐马尔可夫模型挖掘获得 10 个鸟类来源的磺基转移酶,对新基因进行密码子优化并全合成到表达载体 pET-32a 上,转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 进行诱导表达。通过优化培养基成分、诱导温度、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)浓度以及摇床转速,成功实现 S4 和 S8 的异源表达。在 TB 培养基中、诱导温度为 16 °C、使用 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导、200 r/min 转速条件下,菌株 BL21/pET32a-Mbp-S4 的 S4 蛋白表达量为 60.6 mg/L。对 S4 蛋白进行纯化和酶活力表征, S4 蛋白的最适反应温度为 40 °C,最适反应 pH 为 7.0,比活力为 3.3 mU/mg。通过超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)检测酶修饰后产物,进一步验证 S4 蛋白为芳基磺基转移酶。芳基磺基转移酶 S4 的成功表达为 PAPS 再生提供了功能元件。

关键词: 磺基转移酶; 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS); 肝素; 大肠杆菌; 表达

中图分类号: Q71

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)04-0046-08

Expression and Characterization of Novel Sulfotransferases in *Escherichia coli*

GONG Qiaolin¹, YANG Shuyao², KOU Mengyun², SONG Yajian¹, ZHENG Yingying², LI Jinshan²

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

2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

Abstract: Heparin is a highly sulfated and heterogeneous linear glycosaminoglycan of animal origin. Aryl sulfotransferase participates in the synthesis and regeneration of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) of the sulfonic acid donor in heparin biosynthesis, and is a key enzyme to realize the physiological function of heparin. At present, aryl sulfotransferases have been reported to have such problems as few species and low expression amount. In our present study, the hidden Markov model was used to obtain 10 sulfotransferases derived from birds, and the codon was optimized and fully synthesized into the expression vector pET-32a, and the *E. coli* BL21 was transferred to induce expression. The heterologous expressions of S4 and S8 were achieved successfully by optimizing the medium composition, induction temperature, isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) concentration and shaker speed. In TB medium, induction at 16 °C using 0.4 mmol/L IPTG was expressed with strain BL21/pET32a-Mbp-S4 at 200 r/min. The expression of the target protein reached 60.6 mg/L. The purification and characterization of S4 proteins showed that the optimal reaction temperature, pH and specific enzyme activity reached 40 °C, 7.0 and 3.3 mU/mg, respectively. The modified product was detected by UPLC-MS, and S4 was further verified as sulfonyletransferase. The successful expression of novel sulfotransferases S4 has provided an effective element for PAPS regeneration.

Key words: sulfotransferases; 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS); heparin; *Escherichia coli*; expression

收稿日期: 2023-05-20; 修回日期: 2023-09-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2103200); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-KJGG-009)

作者简介: 龚巧琳(1997—), 女, 四川遂宁人, 硕士研究生; 通信作者: 宋亚国, 副教授, songyajian@tust.edu.cn

引文格式:

龚巧琳, 杨书尧, 寇梦云, 等. 新型芳基磺基转移酶在大肠杆菌中的表达及表征[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(4): 46-53.

GONG Q L, YANG S Y, KOU M Y, et al. Expression and characterization of novel sulfotransferases in *Escherichia coli*[J]. Journal of Tianjin university of science & technology, 2024, 39(4): 46-53.

肝素 (heparin) 是动物结缔组织中肥大细胞产生的一种高度硫酸化、非均一的线性糖胺聚糖^[1], 具有抗凝血、抗血脂、抗炎、抗肿瘤和抑制细菌黏附等作用^[2-3]。近年来, 在新冠病毒感染重症患者治疗过程中, 肝素可减少血栓和炎症形成, 导致其需求激增, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 将肝素列为目前最短缺的药品之一^[4]。我国是肝素生产大国, 肝素主要是从猪小肠提取^[5], 存在转化率低、生产过程污染严重、原料受生猪供给影响、副产物多和临床副作用大等问题^[5-7]。建立绿色、稳定的肝素制造工艺, 对于巩固我国肝素产业优势地位、提升我国多糖产业绿色发展能力具有重要意义。

微生物-酶法合成肝素因其原料稳定、过程绿色、产品结构可控等特点受到广泛关注, 是肝素绿色合成的重要方向。该方法首先通过微生物菌种发酵蔗糖合成肝素原, 再经系列磺基转移酶按序催化合成肝素^[7], 这些磺基转移酶修饰过程需要大量使用 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) 作为磺基供体, 而 PAPS 成本高 (>1 万元/g) 且易分解, 不利于工业化生产。因此, 研究 PAPS 高效合成/再生系统、实现 PAPS 高效供给具有重要应用价值^[8-9]。磺基转移酶 (sulfotransferase, ST, EC 2.8.2.-) 是指催化磺基基团从 PAPS 上转移给各种受体分子^[10]同时生成 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸 (3'-phosphoadenosine-5'-phosphate, PAP) 的一类酶。磺基转移酶存在于大多数生物组织中, 可介导不同类别受体硫酸化, 以实现各种生物功能^[11-12], 包括解毒、细胞信号转导和受体结合的调节等^[13-14]。在微生物-酶法合成肝素途径中, 芳基磺基转移酶 IV (aryl sulfotransferase, AST IV, EC2.8.2.1)^[15]可以使用廉价的对硝基苯酚磺酸盐 (p-nitrophenol sulfate, PNPS) 和催化量的 PAP 合成 PAPS, 这是目前肝素合成研究中常用的 PAPS 再生方法^[16](图 1)。该方法可以在反应体系中消除 PAP 对磺基转移酶抑制的同时促进 PAPS 再生^[17]。目前 ASTIV 在受体特异性和抑制机制^[17]等方面已取得一定研究进展, 其表达元件数量稀少, 主要来源于鼠源和人源, 且表达量低, 稳定性差^[18-22], 在工业化生产中受限, 难以发挥良好的催化作用^[23-24]。

隐马尔可夫模型 (hidden Markov model, HMM) 是一个动态的统计模型^[25], 结合计算机技术、统计学和分子生物学用于蛋白质研究, 是生物信息学研究的新领域^[26], 其构建首先基于同一催化功能家族序列进行精确建模, 其对序列描述指标不仅限于序列相似性, 而且也包括酶活性结构等指标。因此利用隐马尔可夫模型可以综合序列、结构、性能等特征更精准地挖掘新型磺基转移酶, 为 PAPS 再生系统提供新元件, 对构建高效低成本的酶法合成肝素工艺具有重要意义。本研究建立磺基转移酶数据库, 构建隐马尔可夫模型并扫描数据库, 筛选获得一系列不同来源的磺基转移酶。在本研究中, 重点关注和研究了尚未报道的鸟类来源的磺基转移酶, 并在大肠杆菌中进行异源表达和表征, 为高效 PAPS 再生系统提供核心元件。

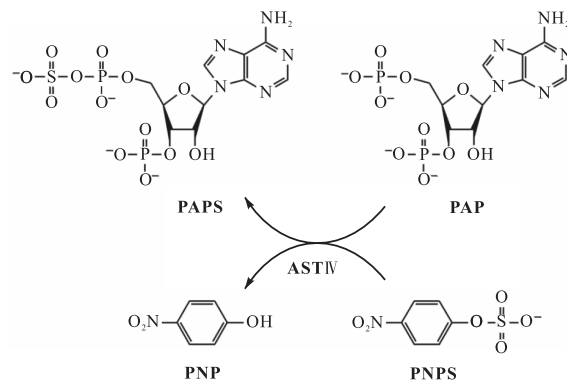


图 1 PAPS 再生系统

Fig. 1 Regeneration system of PAPS

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

本实验所用表达载体为 pET32a, 质粒保存在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株中, 构建的大肠杆菌出发菌株为 *E. coli* BL21 TrxB (DE3)。

1.1.2 试剂与仪器

检测引物: 5'-AOX (GCTAGTTATTGCTCAGCGG), 3'-AOX (TAATACGACTCACTATAGGG), 由安升达 (北京) 科技有限公司合成。

2 $\times$ M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix, 北京聚合

美生物科技有限公司;质粒提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、氨苄霉素和卡那霉素,北京酷来搏科技有限公司;C500096 淀粉树脂凝胶柱,生工生物工程(上海)股份有限公司;PAP 和 PNPS,美国 Sigma 公司;其他化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。

ZQZY-98B 型大容量全温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;SCIENTZ-207A 型高压均质机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Nexera 30A 型超高效液相色谱(UPLC)分析仪,日本 Shimadzu;TripleTOFTM 5600 型质谱(MS)仪,美国 Applied Biosystem Sciex 公司;Multiskan SkyHigh 型全波长酶标仪,赛默飞世尔科技公司;PowerPac 型电泳仪,美国 Bio-Red 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基:酵母粉 10 g/L,蛋白胨 5 g/L, NaCl 5 g/L。

TB 培养基:酵母粉 24 g/L,蛋白胨 12 g/L,甘油 4 mL/L, KH₂PO₄ 2.31 g/L, K₂HPO₄ 12.54 g/L。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的优化与合成

利用隐马尔可夫模型挖掘获得新型磺基转移酶 S1—S10(表 1),基因序列根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后交由安升达(北京)科技有限公司合成,构建到表达载体 pET-32a 的多克隆位点 BamHI 和 XhoII 之间,在 N 端添加麦芽糖结合蛋白 Mbp,并带有 TEV 酶切位点。

表 1 新型磺基转移酶信息

Tab. 1 Novel sulfotransferases information

编号	GenBank	来源	长度/aa
S1	OPJ76008.1	斑尾鸽	576
S2	POI24850.1	灰胸竹鸡	309
S3	POI29181.1	灰胸竹鸡	272
S4	POI29183.1	灰胸竹鸡	296
S5	POI34478.1	灰胸竹鸡	184
S6	RMB94193.1	家燕	466
S7	RMC02322.1	家燕	197
S8	RMC11524.1	家燕	309
S9	RMC13930.1	家燕	296
S10	RMC14328.1	家燕	319

1.2.2 大肠杆菌重组菌株的构建

过夜培养构建的 DH5 α /pET32a-Mbp-S1-S10 菌株,提取质粒 pET32a-Mbp-S1-S10,化学热激法转化到 *E. coli* BL21 TrxB(DE3)菌株中;涂布于 LB 固体培养基(氨苄霉素和卡那霉素抗性),培养 12 h 后挑

取单克隆进行菌落 PCR 验证,经过测序验证正确后保藏菌株。

1.2.3 诱导表达

挑取测序正确的 BL21/pET32a-Mbp-S1-S10 单菌落置于 2 mL TB 液体培养基中,添加 100 μ g/mL 氨苄霉素和 50 μ g/mL 卡那霉素,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养。按照 1%接种量转接到含有相同抗性的 20 mL TB 培养基(100 mL 三角瓶)培养,当测定 A_{600} = 0.6 ~ 0.8 时,摇床降温到 16 $^{\circ}$ C,加入 0.4 mmol/L IPTG(终浓度),诱导培养 20 h。培养结束后,取 1 mL 发酵液在 4 $^{\circ}$ C、5 500 r/min 条件下离心 10 min,收集菌体,加入 500 μ L 磷酸盐缓冲液重悬菌体,放置在冰上,使用超声破碎仪破碎(功率 300 W,工作 5 s,停止 3 s,工作 10 min),低温高速离心 10 min,分离并收集破碎上清液和不溶物,对样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.2.4 表达条件优化

为获得较多可溶性目的蛋白,对目的蛋白进行表达优化,即不同的培养基、诱导温度、IPTG 终浓度和摇床转速对目的蛋白表达量的影响^[27]。诱导表达条件优化见表 2。

表 2 诱导表达条件优化

Tab. 2 Optimization of induced expression conditions

编号	培养基	温度/ $^{\circ}$ C	IPTG 终浓度/(mmol $\cdot$ L ⁻¹)	转速/(r $\cdot$ min ⁻¹)
1	TB	16	0.2	120
2	TB	16	0.2	200
3	TB	16	0.4	120
4	TB	16	0.4	200
5	TB	16	0.6	120
6	TB	16	0.6	200
7	TB	22	0.2	120
8	TB	22	0.2	200
9	TB	22	0.4	120
10	TB	22	0.4	200
11	TB	22	0.6	120
12	TB	22	0.6	200
13	LB	16	0.2	120
14	LB	16	0.2	200
15	LB	16	0.4	120
16	LB	16	0.4	200
17	LB	16	0.6	120
18	LB	16	0.6	200
19	LB	22	0.2	120
20	LB	22	0.2	200
21	LB	22	0.4	120
22	LB	22	0.4	200
23	LB	22	0.6	120
24	LB	22	0.6	200

1.2.5 重组蛋白的纯化

取诱导培养发酵液 0.8 L, 在 4 °C、5 500 r/min 条件下离心 10 min, 收集菌体。加入纯化缓冲液 (pH 7.4, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L NaCl, 200 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT) 重悬菌体, 使用高压均质机在 4 °C、1 000 MPa 压力下破碎菌体 5 min。在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集破碎上清液, 得到粗酶液。

利用淀粉树脂凝胶柱 C500096 纯化目的蛋白, 用 5 倍柱体积的过柱缓冲液洗涤平衡柱料备用, 将粗酶液流经淀粉树脂柱; 用 10 倍柱体积的过柱缓冲液清洗柱子, 再向过柱缓冲液中加入 10 mmol/L 麦芽糖混匀后洗脱目的蛋白。

1.2.6 酶学性质表征

酶活性测定: 将 20 μ g S4 加入含有 50 μ mol/L PNPS、50 μ mol/L PAP 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 中, 用蒸馏水补齐至总体积为 200 μ L。使用酶标仪每间隔 1 min 测定 400 nm 处吸光度, 利用标准曲线计算 PNP 浓度, 以不添加酶的体系为对照。酶活力定义为: 在测定条件下, 每分钟催化生成 1 μ mol PNP 所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

最适温度: 在 pH 7.0 的缓冲体系中测定不同温度下 S4 的酶活力, 以最高酶活力为 100% 计算相对酶活力, 考察温度对重组酶活力的影响。

最适 pH: 设置不同 pH 的缓冲液, 当 pH = 4.0 ~ 5.0 时, 选用乙酸-乙酸钠缓冲液; 当 pH = 6.0 ~ 7.0 时, 选用 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸缓冲液; 当 pH = 8.0 ~ 9.0 时, 选用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液。配制 pH 4.0 ~ 9.0 的缓冲液, 在最适温度下测定酶活力, 探究不同 pH 条件下的酶活力。以最高酶活力计为 100% 计算相对酶活力, 考查 pH 对酶活力的影响。

1.2.8 反应产物分析

取 400 μ g 纯酶加入含有 3 mmol/L PAPS、3 mmol/L PNP、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 的体系中, 用蒸馏水补齐至 200 μ L, 在最适反应条件下反应 10 h。将上一步中的反应体系置于 100 °C 金属浴中 10 min 后, 冷却至室温。

在负电喷雾电离 (ESI) 模式下, 使用超高效液相色谱 (UPLC) 系统结合质谱分析酶修饰产物。使用 SeQuant ZIC-HILIC 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m) 进行液相色谱鉴定, 分别以 10 mmol/L 乙酸铵 (A) 和 100% 乙腈 (B) 为流动相, 流量为 0.2 mL/min。梯度如下: 0 ~ 3 min, 90% B; > 3 ~

6 min, 90% ~ 60% B; > 6 ~ 25 min, 60% ~ 50% B; > 25 ~ 30 min, 50% B; > 30 ~ 30.5 min, 50% ~ 90% B; > 30.5 ~ 38 min, 90% B。

2 结果与分析

2.1 基因挖掘

利用 BLAST 程序分析建立含有 17 720 条磺基转移酶基因容量数据库, 以此作为目标物种蛋白质数据库。图 2 显示了数据库分类情况, 选择鸟类 (Aves) 来源的 4 614 条序列作为目标物种蛋白质数据库。使用 HMMER 命令行工具分析多序列比对结果, 构建 HMM 数据集, 使用 HMM 数据集扫描目标物种蛋白质数据库, 挖掘磺基转移酶基因家族未报道与未注释的新基因, 比较候选基因组学分析获得 10 条来源于鸟类的磺基转移酶 (S1—S10), 使用 SignalP 5.0 对序列在线分析信号肽和跨膜区, 确定蛋白质表达区域。

2.2 重组大肠杆菌表达载体的构建

将 pET32a-Mbp-S1—S10 质粒分别转化到 *E. coli* BL21 TrxB (DE3) 菌株中, 利用菌落 PCR 验证筛选得到阳性转化子 (图 3)。理论上 S1—S10 PCR 检测目的片段大小分别为: 3 171 bp、2 370 bp、2 259 bp、2 331 bp、1 914 bp、2 754 bp、1 863 bp、2 319 bp、2 332 bp、2 340 bp。选择核酸电泳条带正确的菌株送往安升达 (北京) 科技有限公司进行测序分析, 将测序结果与目标序列进行比对, 得到重组菌株 BL21/pET32a-Mbp-S1—S10。

2.3 诱导表达及条件优化

对菌株 BL21/pET32a-Mbp-S1—S10 进行诱导表达, 胞内可溶蛋白电泳结果如图 4 所示, 目的蛋白大部分以包涵体的形式存在 (图 5)。由图 4 分析可知, S4 和 S8 条带与目标蛋白的相对分子质量相符 (理论相对分子质量分别为 7.61×10^4 和 7.60×10^4), 结合质谱检测结果, 表明实现了 S4 和 S8 两种磺基转移酶在大肠杆菌表达体系中的异源表达。

参考大肠杆菌表达优化策略进行诱导条件优化^[22], 诱导温度、摇床转速、IPTG 浓度以及培养基种类等因素可能对蛋白质折叠、菌体生长等方面有重要影响。本实验对影响因素进行了组合优化 (见表 2), 选择表达量较好的菌株 BL21/pET32a-Mbp-S4 进行诱导表达条件优化, 进一步提高目的蛋白 S4 的可溶性表达。利用 SDS-PAGE 检测不同培养条件下蛋白质表达情况, 结果如图 6 所示。

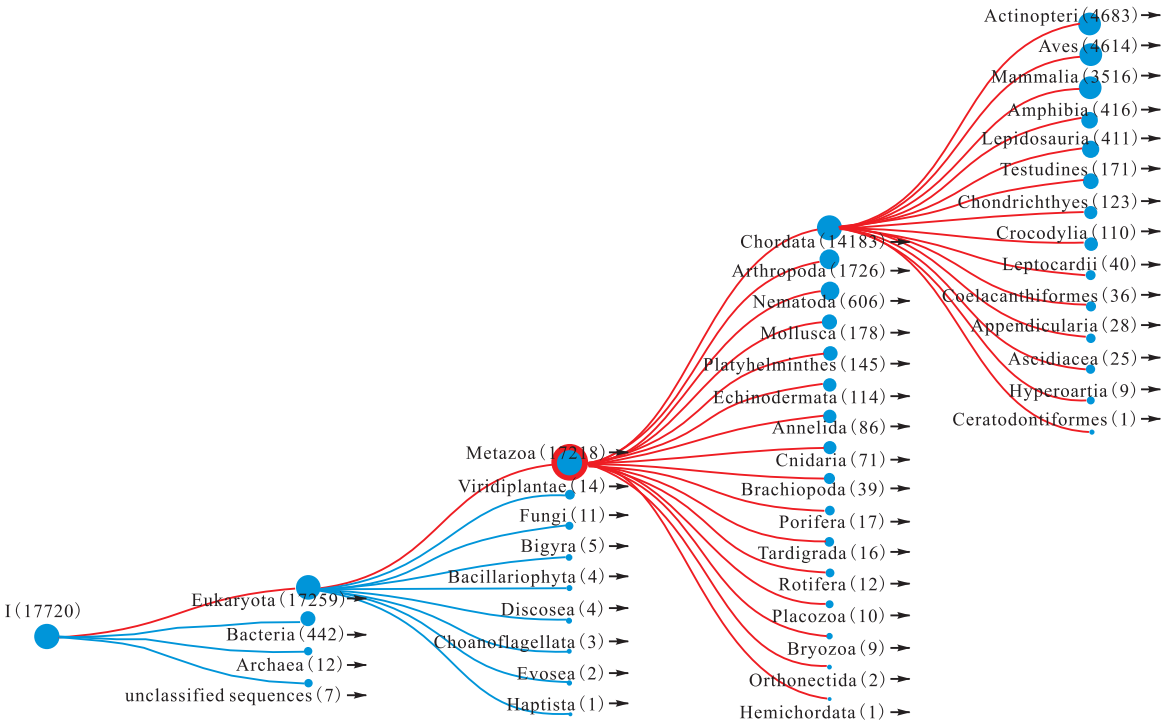
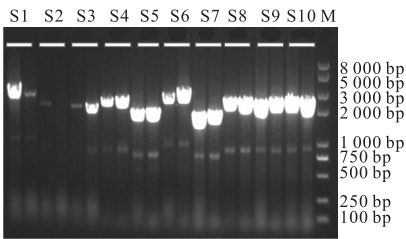
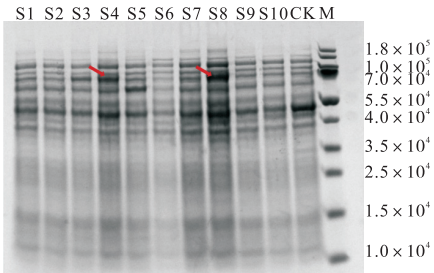


图 2 磺基转移酶基因检索结果分类分布情况
Fig. 2 Taxonomic distribution of all search hits



S1—S10. 重组菌株; M. marker。

图 3 重组菌株 BL21/pET32a-Mbp-S1—S10 的 PCR 验证
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of BL21/pET32a-Mbp-S1-S10 PCR product

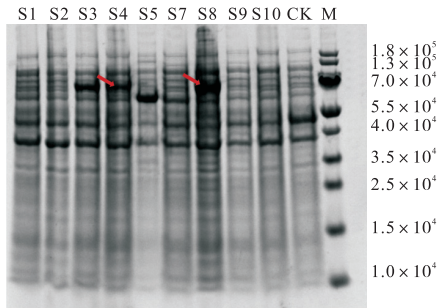


S1—S10. 重组菌株; CK. BL21/pET32a-Mbp; M. marker。

图 4 BL21/pET32a-Mbp-S1—S10 菌株胞内可溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳条带
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of intracellular soluble proteins in BL21/pET32a-Mbp-S1-S10

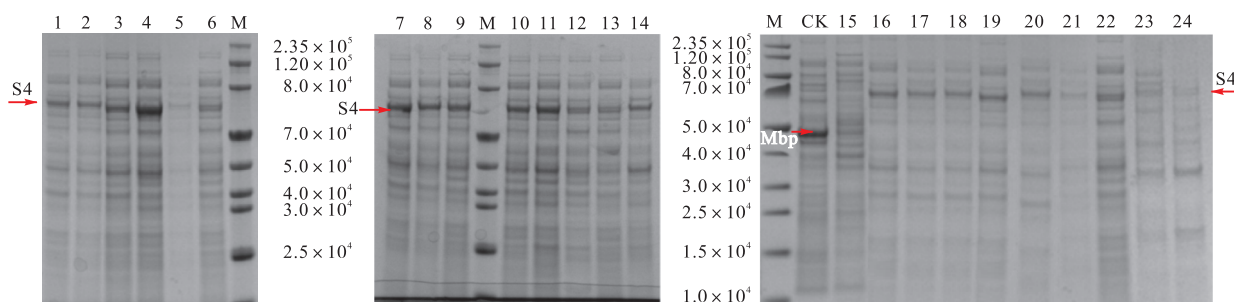
对照组为 BL21/pET 32a-Mbp, 仅含有 Mbp 标签, 大小为 4.29×10^4 , 带有 Mbp 标签的 S4 蛋白大小

为 7.61×10^4 。目的蛋白在 TB 培养基条件下的表达情况普遍优于 LB 培养基, 可能是由于 TB 培养基成分较 LB 培养基更为丰富。另外, 在诱导温度较低条件下, 目的蛋白表达普遍较好, 较高的温度可能增加了蛋白质合成的速度、折叠中间体形成聚集体的速度以及疏水相互作用力, 表达的蛋白质易于以包涵体的形式存在。在 TB 培养基中、诱导温度 16°C 、使用 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导、 200 r/min 转速条件下, 菌株 BL21/pET32a-Mbp-S4 表达效果最好 [图 6(a)泳道 4]。



S1—S10. 重组菌株; CK. BL21/pET32a-Mbp; M. marker。

图 5 BL21/pET32a-Mbp-S1—S10 菌株胞内不溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳条带
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of intracellular insoluble proteins in BL21/pET32a-Mbp-S1-S10



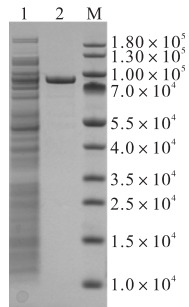
1—24. BL21/pET 32a-Mbp-S4 的细胞内上清液, 培养条件依次与表 1 中的相对应; CK. BL21/pET 32a-Mbp 的细胞内上清液; M. marker。

图 6 S4 异源表达条件优化 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of S4 expression in *E. coli*

2.4 重组蛋白纯化

重组大肠杆菌 BL21/pET32a-Mbp-S4 和 BL21/pET32a-Mbp-S8 表达的重组蛋白 N 端添加 Mbp 融合标签, 利用此融合标签使用淀粉树脂亲和层析纯化目的蛋白。图 7 泳道 1 为 S4 粗酶液, 因此含有大量杂蛋白, 纯化后得到较纯的重组蛋白 S4 (图 7 泳道 2)。S4 重组蛋白质量浓度为 9.7 mg/mL, 产量为 60.6 mg/L。S8 多次纯化都无法得到样品, 可能是由于蛋白质未正确折叠导致标签暴露不充分, 因此后续实验重点探究高效可溶性表达蛋白 S4。



M. marker; 1. S4 粗酶液; 2. 纯化后重组蛋白 S4。

图 7 重组 S4 酶纯化前后的 SDS-PAGE 电泳条带

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of S4 purified before and after

2.5 酶学性质表征

2.5.1 最适温度

本研究挖掘到的 S4 来源于鸟类, 其最适反应温度可能接近于 36~42 °C (大多数的鸟类体温)。S4 的最适温度结果如图 8 所示。结果表明, 当反应温度达到 40 °C 时, S4 的相对酶活力最大 (图 8), 随着反应温度继续升高, 相对酶活力逐渐减小, 当温度为 50 °C 时, S4 仍保持 70% 相对酶活力, 其催化反应温度范围较宽, 与常见的鼠源 ASTIV (反应温度在 25~37 °C) [28-33] 相比具有较好的耐高温能力, 可为工业生产提供稳定性更高、耐受性更强的生物催化剂。

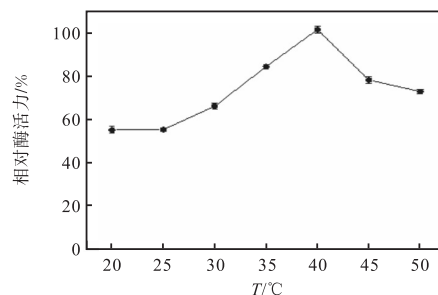


图 8 S4 的最适温度

Fig. 8 Optimal temperature of S4

2.5.2 最适 pH

S4 的最适 pH 如图 9 所示。结果表明, 当反应 pH 为 7.0 时, S4 的相对酶活力最大 (图 9), 当 pH 为 9.0 时, S4 的相对酶活力降低至 50% 左右, 其催化反应 pH 范围较宽, 可在复杂反应体系中稳定发挥作用, 具有较好的应用前景。

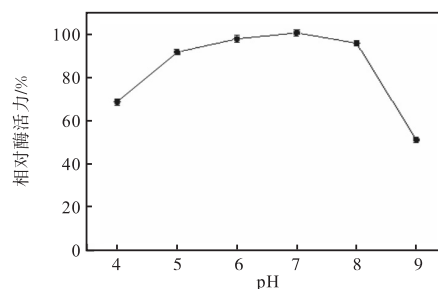


图 9 S4 的最适 pH

Fig. 9 Optimal pH of S4

2.5.3 酶活力

在重组蛋白 S4 的最适反应条件, 即 40 °C、pH = 7.0 的缓冲体系下, 测定 S4 纯酶的比活力为 3.3 mU/mg, 纯酶的总酶活力为 13.2 U/L 是粗酶液的 4.73 倍。

2.6 反应产物分析

反应体系以 PNPS 为磺基供体, 生成 PAPS, 但

是 PAPS 在体外极不稳定,极易降解为 PAP。芳基磺基转移酶参与该反应的催化作用是可逆的^[20],其正向反应为催化磺基从 PAPS 转移到 PNP 上,并生成 PNPS。本实验采用正向测定体系,验证 S4 反应修饰产物。使用 UPLC-MS 检测,在负电模式下,标准品

在保留时间为 0.680 min 的液相峰〔图 10(a)〕 m/z 为 215.977 0〔图 11(a)〕,实验组在保留时间为 0.688 min 的液相峰〔图 10(b)〕 m/z 为 215.977 2〔图 11(b)〕,重组蛋白 S4 反应修饰后得到的产物为 PNPS,进一步验证 S4 为芳基磺基转移酶。

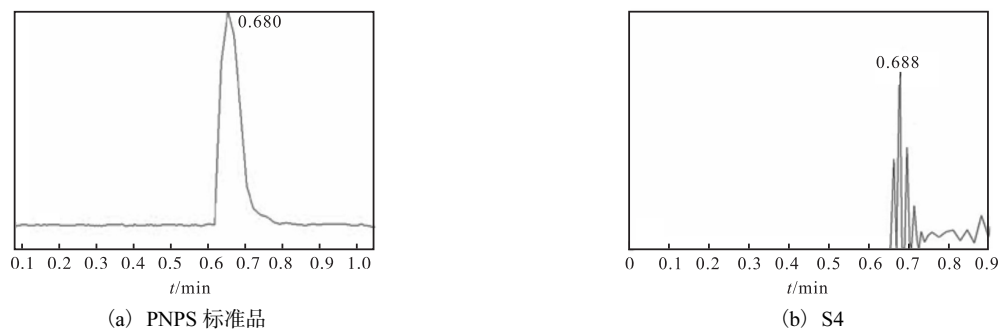


图 10 PNPS 标准品和 S4 的超高效液相色谱图

Fig. 10 UPLC of S4 and PNPS standards

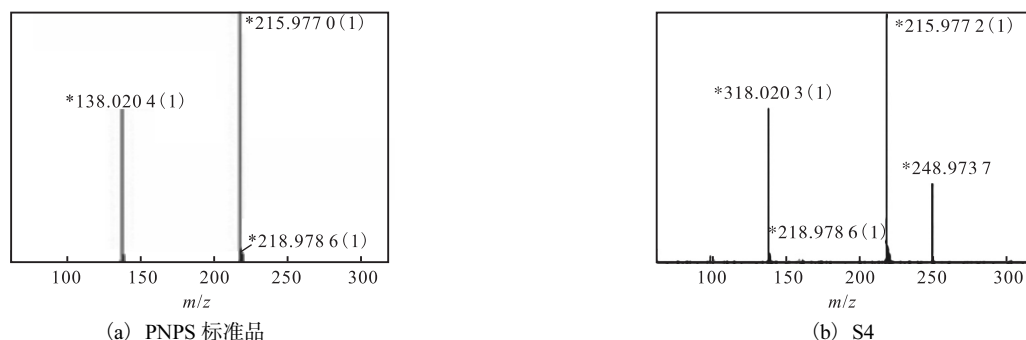


图 11 PNPS 标准品和 S4 的质谱图

Fig. 11 MS of S4 and PNPS standards

3 结 语

通过隐马尔可夫模型挖掘筛选了 10 条鸟类来源的磺基转移酶,并在大肠杆菌中进行表达。通过添加 Mbp 融合标签和培养条件优化等,实现了 S4 的可溶性表达。对 S4 蛋白进行了纯化和表征,S4 的比活力达到 3.3 mU/mg,最适反应温度为 40℃,最适反应 pH 为 7.0。与已报道的磺基转移酶相比,S4 在温度耐受性和 pH 作用范围方面具有显著优势,为构建高效 PAPS 再生系统提供了功能元件。本研究建立的基于隐马尔可夫模型的磺基转移酶筛选方法为选育功能酶元件进行了积极探索。后续将解析 S4 蛋白质结构,通过理性设计和高通量筛选进一步提升酶蛋白催化活性,通过优化表达系统,提升酶蛋白表达水平,支撑高效 PAPS 再生系统和低成本微生物-酶法合成肝素工艺构建。

参考文献:

- [1] LIU H,ZHANG Z,LINHARDT R J. Lessons learned from the contamination of heparin[J]. Natural product reports,2009,26(3):313-321.
- [2] RABENSTEIN D L. Heparin and heparan sulfate: structure and function[J]. Natural product reports,2002,19(3):312-331.
- [3] 张红玉,崔慧斐. 肝素药理作用和药物制剂的研究新进展[J]. 中国药学杂志,2019,54(22):1831-1839.
- [4] CHAPPELL E P,LIU J. Use of biosynthetic enzymes in heparin and heparan sulfate synthesis[J]. Bioorganic and medicinal chemistry,2013,21(16):4786-4792.
- [5] SUFLITA M,FU L,HE W,et al. Heparin and related polysaccharides:synthesis using recombinant enzymes and metabolic engineering[J]. Applied microbiology and biotechnology,2015,99(18):7465-7479.
- [6] WARDROP D,KEELING D. The story of the discovery of heparin and warfarin[J]. British journal of haematology,2008,141(3):757-763.
- [7] FU L,LI G,YANG B,et al. Structural characterization of pharmaceutical heparins prepared from different animal tissues[J]. Journal of the American medical association,2013,307(5):1447-1457.

[1] LIU H,ZHANG Z,LINHARDT R J. Lessons learned

- [8] LIN C H, SHEN G J, GARCIA-JUNCEDA E, et al. Enzymatic synthesis and regeneration of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (paps) for regioselective sulfation of oligosaccharides[J]. Journal of the American chemical society, 1995, 117(30): 8031–8032.
- [9] WANG Z, LI J, CHEONG S, et al. Response surface optimization of the heparosan N-deacetylation in producing bioengineered heparin[J]. Journal of biotechnology, 2011, 156(3): 188–196.
- [10] DUFFEL M W, MARSHALL A D, MCPHIE P, et al. Enzymatic aspects of the phenol (aryl) sulfotransferases [J]. Drug metabolism reviews, 2001, 33(4): 369–395.
- [11] 周正雄, 堵国成, 康振. 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸的高效合成及其应用[J]. 生物工程学报, 2019, 35(7): 1222–1233.
- [12] ROTH J A. Phenol sulfotransferase[J]. Neuromethods, 1986, 5: 575–604.
- [13] FALANY C N. Sulfation and sulfotransferases. Introduction: changing view of sulfation and the cytosolic sulfotransferases[J]. FASEB Journal, 1997, 11(1): 1–2.
- [14] KAYSSER L, EITEL K, TANINO T, et al. A new aryl-sulfate sulfotransferase involved in liponucleoside antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Journal of biological chemistry, 2010, 285(17): 12684–12694.
- [15] BHASKAR U, LI G Y, FU L, et al. Combinatorial one-pot chemoenzymatic synthesis of heparin[J]. Carbohydrate polymer, 2015, 122: 399–407.
- [16] 齐晨, 杨修亮, 李晓燕, 等. 重组大肠杆菌高效可溶性表达芳基磺基转移酶的研究[J]. 药物生物技术, 2014, 21(5): 385–388.
- [17] BURKART M D, WONG C H. A continuous assay for the spectrophotometric analysis of sulfotransferases using aryl sulfotransferase IV [J]. Analytical biochemistry, 1999, 274(1): 131.
- [18] RIGHETTI P G, BROST B C W, SNYDER R S. On the limiting pore size of hydrophilic gels for electrophoresis and isoelectric focusing[J]. Journal of biochemical and biophysical methods, 1981, 4(5): 347–363.
- [19] MANGOLD J B, MCCANN D J, SPINA A. Aryl sulfotransferase-IV-catalyzed sulfation of aryl oximes: steric and substituent effects[J]. Biochimica et biophysica acta, 1993, 1163(2): 217.
- [20] MARSHALL A D, DARBYSHIRE J F, MCPHIE P, et al. A review of the effects of manipulation of the cysteine residues of rat aryl sulfotransferase IV [J]. Chemico-biological interactions, 1998, 109(1/2/3): 107.
- [21] PURCHARTOVÁ K, ENGELS L, PETR MARHOL P, et al. Enzymatic preparation of silybin phase II metabolites: sulfation using aryl sulfotransferase from rat liver[J]. Applied microbiology & biotechnology, 2013, 97(24): 10391–10398.
- [22] BIDWELL L M, GILLAM E M J, GAEDIGK A, et al. Bacterial expression of two human aryl sulfotransferases[J]. Chemico-biological interactions, 1998, 109(19): 137–141.
- [23] LEE J W, NA D, Park J M, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals[J]. Nature chemical biology, 2012, 8(6): 536–546.
- [24] ATALAH J, CÁCERES-MORENO P, ESPINA G, et al. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts[J]. Bioresource technology, 2019, 280: 478–488.
- [25] ATTWOOD T K. The quest to deduce protein function from sequence: the role of pattern database[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2000, 32(2): 139.
- [26] AYDIN Z, ALTUNBASAK Y, BORODOVSKY M. Protein secondary structure prediction for a single-sequence using hidden semi-Markov models[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7(1): 1–15.
- [27] KAUR J, KUMAR A, KAUR J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements[J]. International journal of biological macromolecules, 2017, 106: 803–822.
- [28] ZHOU Z, DU G, KANG Z. Production and application of 3-phosphoadenosine-5-phosphosulfate[J]. Chinese journal of biotechnology, 2019, 35(7): 1222–1233.
- [29] CHANG C H, LICO L S, HUANG T Y. Synthesis of the heparin-based anticoagulant drug fondaparinux[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2000, 382(1): 95–104.
- [30] PURCHARTOVÁ K, VALENTOVÁ K, PELANTOVÁ H, et al. Prokaryotic and eukaryotic aryl sulfotransferases: sulfation of quercetin and its derivatives[J]. ChemCatChem, 2015, 7(19): 3152–3162.
- [31] FOLDES A. Rat brain phenolsulfotransferase: partial purification and some properties[J]. Biochimica et biophysica acta, 1973, 327(2): 365–373.
- [32] HONMA W, KAMIYAMA Y, YOSHINARI K, et al. Enzymatic characterization and interspecies difference of phenol sulfotransferases, ST1A forms[J]. Drug metabolism and disposition, 2001, 29(3): 274–281.
- [33] ZHOU, ZHENGXIONG, LI QING, et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans[J]. Biotechnology & bioengineering, 2018, 115(6): 1561–1570.

责任编辑: 郎婧