

# Xyn III 包涵体的纯化与变复性研究

陆长梅 李继影 陈阳 袁生

(南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

[摘要] 常规诱导表达后收集的粗包涵体经 3 mol/L 尿素洗涤加上表面活性剂 Triton X-100 作用,可将包涵体中 xyn III 的含量从 37% 提高到 92.4%。8 mol/L 尿素可将包涵体完全溶解,蛋白浓度在 0.2~0.25 mg/mL 时,pH 4.5 50 mmol/L NaOAc 与 pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液复性效果相当,降低蛋白浓度,则是 pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液复性效果相对较好,复性过程中加入 DTT、EDTA、尿素、木糖等处理复性效果没有明显提高,pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl、0.01 mg/mL 蛋白浓度条件下,包涵体的复性效果最佳。

[关键词] xyn III,包涵体,变性,复性

[中图分类号] Q26, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)04-0067-05

植物体内源木聚糖酶可能在植物种子萌发、生长以及花粉管萌发中起着重要作用,但由于这类木聚糖酶的特殊性,其活性须在细胞进入程序性死亡后,蛋白的 N 端和 C 端在酸性蛋白水解酶的作用下多次剪切,最终形成相对分子质量约 35 000 的核心酶后活性方可显现;只有将酶原全长 cDNA 克隆到大麦糊粉层细胞中,并诱导细胞程序性死亡时酶活才显现出来,其他任何表达体系目前均未能表达成功,在大麦糊粉层细胞中表达该类酶并不能将之与内源的木聚糖酶以及其他水解酶区分开<sup>[1,2]</sup>。目前木聚糖酶在植物体中的各种作用尚属推测,未能从分子生物学上获得直接证据。

我们将目光转向富含各植物细胞壁水解酶的微生物,希望从中找到与植物源尤其是来源于禾本科植物如小麦等糊粉层与花粉中木聚糖酶相近的木聚糖酶,通过微生物木聚糖酶来间接推测植物源木聚糖酶作用。通过搜索 GenBank,确定了 *Trichoderma reesei* QM9414(ATCC26921)突变种 PC-3-7 中表达的 xyn III(蛋白序列 GenBank 登录号 BAA89465)为进一步研究对象。由于该突变种无法获得,而该酶在 *T. reesei* QM9414 中不表达,但其基因组中具有编码该蛋白的单拷贝基因<sup>[3,4]</sup>。因此本实验室采用 PCR 方法先从基因组 DNA 中获得各段外显子序列,再采用 overlap-PCR 法将各段外显子两两拼接获得全长 cDNA 序列,并在 *E. coli* DE3 pLacI 细胞中首次将该酶蛋白表达成功<sup>[5]</sup>。但常规 37℃,1 mmol/L IPTG,3 h 诱导表达时,重组酶活性较低,表达蛋白大量形成包涵体。为进一步提高 xyn III 得率与活性,需要进一步寻找新的方法。

由于重组 xyn III 可产生大量包涵体,而粗包涵体由于含有核糖体元件、RNA 聚合酶、内毒素、外膜蛋白等等,其中含有的重组蛋白含量不会很高,但通过洗涤等措施,可进一步提高其纯度<sup>[6-8]</sup>。另外分析 xyn III 结构与理化特性时发现该蛋白是单体蛋白,等电点约为 pH 9.1,最适 pH 6.0,活性显示不需任何金属辅基,5 mmol/L 的 Mn、Fe、Zn 等离子降低酶活<sup>[3,4]</sup>。整个分子中,只有第 300 与第 306 位两个半胱氨酸,蛋白结构不复杂,理论上应该可以复性成功。因此本实验将从包涵体的洗涤、纯化与复性等方面入手,试图提高活性 xyn III 的得率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与培养方法

带有 xyn III cDNA-pETBlue-2 表达载体的 *E. coli* DE3 pLacI 细胞(Novagen)表达菌株由本实验室构建。该表达菌株在 LB 中加入 50 μg/mL 羧苄青霉素(carbenicillin)和 34 μg/mL 氯霉素(chloramphenicol)条件下按

收稿日期:2004-06-01。

基金项目:国家自然科学基金(30170005)、江苏省自然科学基金(BK2001112)、江苏省高校自然科学基金(01KJB180004)资助项目。

作者简介:陆长梅,女,1969-,南京师范大学生命科学学院副教授,博士研究生,主要从事植物生理学方向的教学与研究。

E-mail: luchangmei@njnu.edu.cn

通讯联系人:袁生,1956-,南京师范大学生命科学学院教授,博士生导师,主要从事微生物与细胞生物学方向的教学与研究。

E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

万方数据

说明书 37℃ ,1 mmol/L IPTG ,3 h 诱导表达.

1.2 实验方法

1.2.1 xynⅢ 包涵体的获得

诱导表达结束后,参照 Sheng Yuan 等的方法收集菌体,洗涤,溶菌酶与超声波共同处理破碎细胞、离心,沉淀为粗包涵体<sup>[9]</sup>.

1.2.2 包涵体的纯化与变性

粗包涵体经过 4 次洗涤与离心过程,具体为 1. pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 洗涤、离心;2.3 mol/L 尿素洗涤、离心;3.1% Triton X-100 pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 洗涤、离心;4. pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 洗涤、离心.最后所得沉淀即为纯化后的包涵体,该包涵体用 8 mol/L 尿素室温 20 min 即可完全溶解得变性包涵体.

1.2.3 包涵体纯度的检验

采用 SDS-PAGE 电泳,常规考马斯亮蓝 R-250 染色,凝胶光密度扫描确定包涵体中 xynⅢ 的相对含量.

1.2.4 包涵体的复性

采用透析法进行包涵体复性,第一次对各种不同处理液透析,后 3 次分别对 pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 或 50 mmol/L pH 4.5 NaOAc 缓冲液透析,每次透析体积为 150 倍,每隔 8 h 换液 1 次.

1.2.5 木聚糖酶活性测定与酶活力单位定义

参照 Kenneth C. Gross 的方法<sup>[10]</sup>测定反应液中的还原糖(以木糖为标准)含量.酶活力单位定义:在最适反应条件下,以生成还原糖的速率为 1 μmol/min 所需的酶量作为一个酶活力单位(IU).

1.2.6 琼脂糖平皿结合刚果红染色法显示木聚糖酶酶活性

参照 Sakamoto S 等的方法进行<sup>[11]</sup>.

1.2.7 可溶性蛋白含量测定

参照 Bradford 的方法<sup>[12]</sup>.

2 结果

2.1 包涵体的洗涤与变性

37℃、1 mmol/L IPTG、3 h 诱导表达后,破碎细胞,并用 50 mmol/L pH 4.5 NaOAc 缓冲液抽提上清后获得的粗包涵体中含有 xynⅢ 目的蛋白,但也含有大量杂蛋白,双波长凝胶扫描显示其中目的蛋白仅占 37% 左右(图略).将粗包涵体经过 4 次洗涤与离心后,最终获得的包涵体中主含 xynⅢ 目的蛋白,考马斯亮蓝染色显示其他蛋白条带肉眼难以观察到(图 1).双波长扫描显示其中 92.4% 为 xynⅢ,表明洗涤效果较好(图 1)

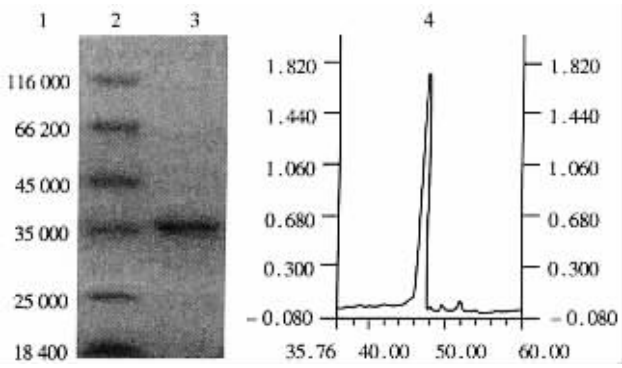
将洗涤后的包涵体以每 0.1 g 包涵体加入 10 mL 8 mol/L 尿素,涡旋振荡器振荡 2 min,使包涵体充分重悬后,室温下静置 20 min,肉眼观察澄清,表明包涵体已变性完全.离心,上清即为变性后的 xynⅢ 溶液.

2.2 蛋白浓度对包涵体复性效果的影响

大量文献显示不同蛋白浓度对包涵体复性影响较大,但不同包涵体所需蛋白浓度不一样.图 2 显示不同 xynⅢ 包涵体蛋白浓度在 pH 4.5 与 pH 7.5 条件下对包涵体复性效果的影响,具体分析可见在 0.2 ~ 0.25 mg/mL 时,50 mmol/L、pH 4.5 NaOAc 与 pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液复性效果相当,进一步随着蛋白浓度降低,前者的复性效率逐渐降低,后者则越来越高.

2.3 不同 pH 对包涵体复性效果的影响

不同 pH 对不同包涵体蛋白复性的影响效果不一.图 2 已经显示 pH 4.5 与 pH 7.5 条件下 xynⅢ 包涵



1 相对分子质量 2 标准蛋白 3 纯化包涵体 4 双波长扫描图谱  
图 1 纯化包涵体中 xynⅢ 显示与相对含量测定

体复性效果不同,在此基础上,又增设 pH 4.0、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5 等复性体系进行包涵体复性.图 3 结果显示在包涵体蛋白浓度为 0.2 mg/mL 时, pH 5 ~ pH 6.5 缓冲体系对  $\alpha$ -yn III 包涵体复性不利; pH 7.5 复性效果最好, pH 4.5 效果次之. pH 值大于 8.0 时,复性效率与 pH 5 ~ pH 6.5 时相似(结果略).

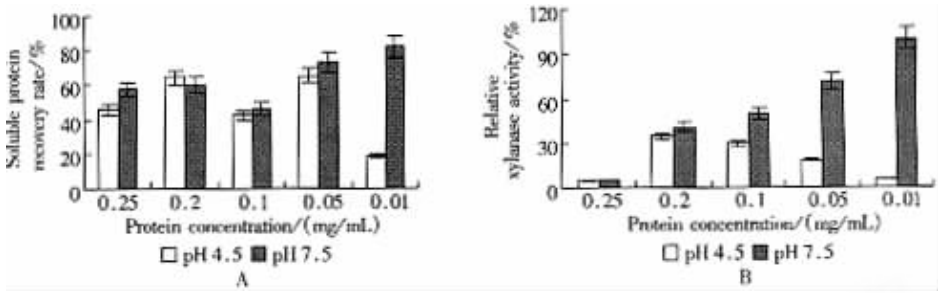


图 2 蛋白浓度对包涵体复性后可溶性蛋白回收率(A)与酶活性(B)的影响

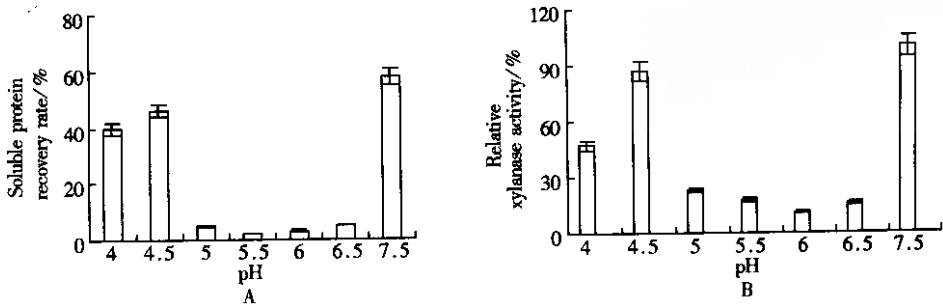


图 3 不同 pH 值缓冲系统对包涵体复性后可溶性蛋白回收率(A)与水解酶活性(B)的影响(原始蛋白浓度 0.2 mg/mL)

2.4 不同处理对包涵体复性效果的影响

包涵体复性一般在尿素浓度 4 mol/L 时开始,到 2 mol/L 左右时结束<sup>[3]</sup>.先将变性  $\alpha$ -yn III 溶液直接对 2 mol/L 尿素溶液透析 8 h,然后再对 pH 7.5 缓冲液复性体系透析,复性效率反而下降(图 4); $\alpha$ -yn III 酶活性表达不需任何金属辅基,金属离子的存在反而会降低酶活<sup>[4]</sup>,在 pH 7.5 缓冲液复性体系中加入 1 mmol/L EDTA 以去除金属离子,复性效果反不如单纯 pH 7.5 缓冲液复性体系(图 4);整个  $\alpha$ -yn III 分子中,有两个半胱氨酸,在复性时有可能形成了链间或链内的非活性二硫键,在 pH 7.5 缓冲液复性体系中加入 1 mmol/L DTT 以还原二硫键,检测结果显示包涵体复性效率没有提高(图 4);有的包涵体在复性过程中可加入酶底物或产物以诱导酶活性中心形成正确折叠,从而带动整个蛋白的正确折叠,因本实验中底物木聚糖难溶,因此在复性过程中,在 pH 7.5 缓冲液复性体系中加入 1 mmol/L 木糖( $\alpha$ -yn III 酶反应产物),但包涵体复性效果反而不如对照(图 4).图 5 为各种不同处理下包涵体复性后木聚糖酶活性显示结果,与还原糖法测定木聚糖酶活性结果类似.

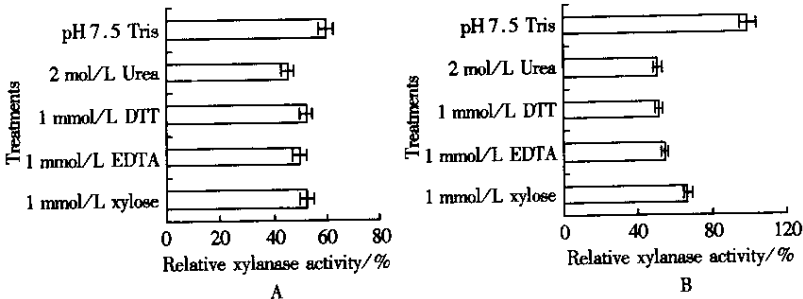


图 4 不同处理对包涵体复性后可溶性蛋白回收率(A)与水解酶活性(B)的影响(原始蛋白浓度 0.2 mg/mL)



各复性条件为 pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl 加上以下各种处理分别进行 (1) 2 mol/L Urea (2) 1 mmol/L EDTA (3) 1 mmol/L xylose (4) 阳性对照; pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl 复性 (5) 阴性对照; 变性包涵体 (6) 1 mmol/L DTT.

图 5 包涵体复性处理后  $\alpha$ -yn III 活性显示

### 3 讨论

重组蛋白在宿主系统中高水平表达时,在重组蛋白的表达过程中,由于表达太快或缺乏某些蛋白质折叠过程中需要的酶或辅助因子,或环境不适等等,常常无法形成正确的次级键,因而常常会形成包涵体。包涵体的形成有利有弊,弊端在于大量的蛋白虽然得到表达,但不具有生物学活性,优越性在于不仅可获得高表达、高纯度的重组蛋白质,还可避免细胞水解酶对重组蛋白质的破坏。本实验室首次将 xynⅢ 在原核系统表达成功,大肠杆菌裂解液上清中具有木聚糖水解酶活性,同时在细胞中形成了包涵体。

通过各种方法破碎细胞得到的粗包涵体由于含有脂类和膜蛋白等杂蛋白包裹其上,在包涵体溶解和复性的过程中常会导致重组蛋白质的降解<sup>[13]</sup>,因此包涵体的洗涤与纯化在包涵体的变复性中就显得尤为重要。我们采用 3 mol/L 尿素与 Triton X-100 以及 pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 等的共同作用,经过 4 次简单的洗涤离心过程就将包涵体中 xynⅢ 相对含量从 37% 提高到 92.4%,表明这 4 次洗涤过程成功有效。经过洗涤后的包涵体在 8 mol/L 尿素,室温条件下可以完全溶解变性。

对于包涵体的复性,已有大量文献报道。但由于不同蛋白形成包涵体的机制各不相同,不同包涵体的复性措施与复性效果也各不相同,有些蛋白非常容易复性,如牛胰 RNA 酶有 12 对二硫键,在较宽松的条件下复性效率可达 95% 以上,有些蛋白如 IL-11 至今没有找到能够使之复性的方法,还有很多蛋白的复性效率只有百分之零点几<sup>[3,14]</sup>。虽然各大生物工程公司也有不少包涵体试剂盒销售,但总的来说目前对包涵体的复性还没有一个统一的模式,对于某一特定的蛋白必须分析其蛋白结构与理化特点,并经过一系列摸索才能确定该包涵体是否能复性,以及最佳复性条件<sup>[3,14]</sup>。由于 xynⅢ 是在本实验首次表达成功,其复性条件与复性效果均属首次报道。

一般认为包涵体的复性体系 pH 值必须高于 7.0,因为这样可以防止自由硫醇的质子化作用影响正确配对的二硫键的形成,而且对绝大多数蛋白而言最适宜的复性 pH 值一般是 8.0~9.0<sup>[7]</sup>。由于 xynⅢ 蛋白 pI 为 9.0,理论上 pI 附近附近蛋白易沉淀不利于复性的进行,我们实验也证明 xynⅢ 在此条件下几乎无法复性,xynⅢ 的最适 pH 为 6.0,实验显示,在此条件下复性效率依然极低,为此,我们将变性体系 pH 范围扩大到 4.0~12.0,结果表明包涵体在 pH 4.5 与 pH 7.5 两种条件下,复性效果相对较好,在酸性条件下包涵体可以得到部分复性,这尚属首次报道,这为一些至今尚未能成功复性的包涵体的进一步研究提供一个有益的思路。

在 xynⅢ 包涵体复性过程中第一次透析时直接对 2 mol/L 尿素透析或透析缓冲体系中分别加入 1 mmol/L DTT、1 mmol/L EDTA 或 1 mmol/L 木糖等处理,进行包涵体的复性,均未能有效提高复性效率,表明二硫键、金属离子等等均不是影响 xynⅢ 复性的主要原因。

总结上述各种不同复性处理后包涵体复性效率,在 pH 7.5、20 mmol/L Tris-HCl 透析条件、0.01 mg/mL 蛋白浓度条件下 xynⅢ 包涵体复性效率最高,此时木聚糖酶比活达 11.43 U,约为纯化天然 xynⅢ 酶(比活 121 U)的 9.4%,结合纯化包涵体 xynⅢ 纯度,表明此时 xynⅢ 包涵体复性效率约为 10%。有关该酶的进一步工作将继续报道。

### [参考文献]

- [1] Chrispeels M J, Varner J E. Gibberelic acid enhanced synthesis and release of  $\alpha$ -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone-layer[J]. Plant Physiol, 1967, 42: 398—406.
- [2] Sherry S H, Wu D, Fen Suan, Han Chang Chang, et al. Maize tapetum xylanase is synthesized as a precursor, processed and activated by a serine protease, and deposited on the pollen[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(50): 49055—49064.
- [3] J Xu, N Takakuwa, M Nogawa, et al. A third xylanase from *Trichoderma reesei* PC-3-7[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 718—724.
- [4] J Xu, M Nogawa, H Okada, et al. Regulation of xyn3 gene in *Trichoderma reesei* PC-3-7[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54: 370—375.
- [5] 陆长梅,袁生,赵庆新.用 Dverlap-PCR 法从 *Trichoderma reesei* QM9414 基因组 DNA 中克隆并表达木聚糖酶Ⅲ[J].生物工程学报, 2004, 20(5): 764—769.
- [6] 冯小黎.重组包涵体蛋白质的折叠复性[J].生物化学与生物物理进展, 2001, 28(4): 482—485.



- [ 7 ] Bernhard Fischer , Ian Sumner , Peter Goodenough. Isolation , renaturation , and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies[ J ]. Biotechnology and Bioengineering ,1993 41( 1 ) 3—13.
- [ 8 ] Hong Jin , Mohammad S , Uddin , *et al.* Purification and renaturation of recombinant Human Lymphotoxin( Tumour Necrosis Factor beta ) expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies[ J ]. J Chem Tech Biotechnol ,1994 59 67—72.
- [ 9 ] Sheng Yuan , Yajun Wu , Daniel J Cosgrove. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity[ J ]. Plant Physiology , 2001 ,127 324—333.
- [ 10 ] Kenneth C Gross. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-Cyanoacetamid[ J ]. Hort Science ,1982 ,17( 6 ) 933—934.
- [ 11 ] Sakamoto S , Tamura G , Ito K , *et al.* Cloning and sequencing of cellulose cDNA from *Aspergillus Kawachii* and its expression in *Sacharomyces cerevisiae*[ J ]. Current Genetics ,1995 27 435—439.
- [ 12 ] Bradford M A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[ J ]. Anal Biochem ,1970 ,72 248—254.
- [ 13 ] Cowley D T , Mackin R B. Expression , purification and characterization of recombinant human proinsulin[ J ]. FEBS Lett ,1997 402 : 124.
- [ 14 ] de Bernardez C E. Refolding of recombinant proteins[ J ]. Curr Opin Biotechnol ,1998 9( 2 ) :157—163.

## Study of Purification , Denaturation and Renaturation of xynⅢ 's Inclusion Body

Lu Changmei , Li Jiying , Chen Yang , Yuan Sheng

( School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China )

**Abstract** XynⅢ was cloned and expressed for the first time in our lab , and the purification , denaturation and renaturation of its inclusion body were studied in the present paper. XynⅢ inclusion body would be produced in great quantity under 37℃ , 220 rpm in LB medium added with IPTG to the final concentration of 1 mmol/L and expressed for 3h. Cells were harvested , sonicated and centrifuged after expression under this condition , and the pellet( crude xynⅢ inclusion body ) was washed by 4 successive steps as follows : pH 7.5 20 mmol/L Tris - HCl , Triton X - 100 , pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl combined with 3 mol/L Urea and at last pH 7.5 20 mmol/L Tris-HCl. XynⅢ content in the pellet increased from 37% to 92.4% . This pellet could be dissolved completely in 8 mol/L Urea. As to the renaturation effects , they were similar in 50 mmol/L NaOAc buffer system at pH 4.5 and in 20 mmol/L Tris-HCl buffer system at pH 7.5 when the inclusion body protein content was from 0.2 to 0.25 mg/mL. This was reported for the first time that inclusion body could be renaturated in an acid condition. The renaturation effect of 20 mmol/L Tris-HCl buffer system at pH 7.5 would be better when the inclusion body protein content decreased , and it did not increased when this renaturation system containing 1 mmol/L DTT , or 1 mmol/L EDTA , or 2 mol/L Urea , or 1 mmol/L xylose *etc.* Renaturation effect would be the best when in 20 mmol/L Tris-HCl buffer system at pH 7.5 with the inclusion body protein content was 0.01 mg/mL.

**Key words** xynⅢ , inclusion body , denaturation , renaturation

[ 责任编辑 孙德泉 ]