

龚 丽, 李云霞. 一种新型 ATP-依赖型 *ClpP* 家族蛋白质水解酶 *PlclpP* 基因的克隆、表达和酶学特性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1424-1429.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.036

一种新型 ATP-依赖型 *ClpP* 家族蛋白质水解酶 *PlclpP* 基因的克隆、表达和酶学特性

龚 丽, 李云霞

(农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估重点实验室<上海>, 上海海洋大学食品科学与技术学院, 上海 201306)

摘要: 运用基因克隆技术, 以分离鉴定获得的蛋白质水解酶高活性类芽孢杆菌(*Paenibacillus lautus*) CHN26 菌株基因组 DNA 为模板, 克隆鉴定了该菌株一种新型 ATP-依赖型 *ClpP* 家族蛋白质水解酶 *PlclpP* 基因(585 bp), 编码 194 个氨基酸, 蛋白质分子量约为 2.1×10^4 。采用大肠杆菌(*Escherichia coli*) pET 表达系统, 构建了 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28-*PlclpP*, 并在大肠杆菌 BL21 中实现了重组 PIClpP 蛋白质的表达。利用组氨酸标签(His-tag)亲和纯化法, 获得了 PIClpP 纯化蛋白质, 发现 PIClpP 可能与宿主菌未知伴侣分子形成蛋白质复合物。PIClpP 复合物具有 ATP-依赖型酪蛋白水解酶活性, 最适反应条件为 40 °C、pH 7.0。表面活性剂强烈抑制 PIClpP 复合物的酶活, 而常规丝氨酸蛋白酶抑制剂对其活性无抑制作用。

关键词: *ClpP* 家族蛋白质水解酶; 芽孢杆菌; 基因克隆; 基因表达; 酶学特性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)06-1424-06

Cloning, expression and characterization of a novel *PlclpP* gene encoding ATP-dependent *ClpP* protease

GONG Li, LI Yun-xia

(Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation <Shanghai>, Ministry of Agriculture, College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A novel ATP-dependent ClpP protease of *Paenibacillus lautus* CHN26 with high proteolytic activities which has recently been isolated and identified in our laboratory was cloned and expressed in this study. The *clpP* gene, designated as *PlclpP*, was 585 bp in size encoding 194 amino acids with a molecular weight of 2.1×10^4 . The plasmid pET-28a-*PlclpP* was constructed, and the *PlclpP* gene was heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21. The recombinant PIClpP protein was purified using Ni-NTA-His · Bind resin. PIClpP may form a complex with an unknown chaperone of *E. coli* BL21. The PIClpP complex showed a ATP-dependent proteolytic activity that reached the highest level at 40 °C with pH 7.0. In stead of conventional protease inhibitor, surfactant exhibited strong inhibition against PlclpP complex.

Key words: ClpP protease; *Paenibacillus lautus*; gene cloning; gene expression; enzymatic characteristic

蛋白质水解酶占据全球酶制剂市场约 60%, 广

泛应用于食品、医药、洗涤剂、农业等领域^[1]。微生物是水解酶的主要来源, 探索、开发微生物水解酶新基因资源对于解决目前商品化酶制剂种类和来源较少、底物单一、价格昂贵等问题具有重要意义。

ClpP (Caseinolytic peptidase) 家族 ATP-依赖型伴侣分子相连 (Chaperone-linked) 的酪蛋白水解肽

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 上海市科委项目 (09320503600)

作者简介: 龚 丽 (1989-), 女, 上海人, 硕士研究生, 主要从事食品质量与安全研究。(E-mail) emo_jun@163.com

通讯作者: 李云霞, (E-mail) liyunxia925@qq.com

酶广泛存在于原核和真核生物中^[2]。它们利用 ATP 驱动蛋白质底物解折叠并转位进入蛋白质水解腔 (Chamber) 中将蛋白质降解成小分子肽^[3]。*ClpP* 蛋白酶于 1988 年首次发现于 *Escherichia coli* 中^[4]。此后的大量研究结果表明,*E. coli* 中 *ClpP* 蛋白酶 (*EcClpP*) 由蛋白质水解核心 *ClpP* 和依赖 ATP 的伴侣分子 *ClpA* 或 *ClpX* 组成,其蛋白质水解腔由催化位点序列形成的 2 个反向同型七聚体环构成^[2]。在国外 *ClpP* 蛋白酶已商品化,可是在国内,迄今为止,尚无涉及 *ClpP* 家族蛋白酶的研究报道。此外,有关 *Paenibacillus* spp. 中 *clpP* 基因功能的研究国内外均无报道。本研究采用基因克隆技术,以本实验室分离鉴定获得的蛋白质水解酶高活性 *Paenibacillus lautus* CHN26 菌株基因组 DNA 为模板,克隆 *PlclpP* 基因,并在 *E. coli* BL21 中进行异源表达,为 *ClpP* 家族蛋白酶基础理论研究和应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒、Premix *Ex Taq* Version 2.0、T4 DNA ligase 均购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司;限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 购自 Promega 公司 (美国);Luria-Bertani (LB) 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司;卡那霉素和氨苄青霉素、聚丙烯酰胺和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺等 SDS-PAGE 试剂,以及蛋白质定量检测试剂盒等购自生工生物工程 (上海) 有限公司;蛋白裂解试剂 BugBuster Protein Extraction 和纯化试剂 Ni-NTA His · Bind[®] resin 购自 Merck Millipore 公司 (德国); β -酪蛋白为 Sigma-Aldrich 公司产品 (美国)。

E. coli TOP10 和 *E. coli* BL21,以及基因克隆载体 pGM-T (Amp^r) 购自天根生物技术有限公司;基因表达载体 pET-28a (Km^r) 购自 Merck Millipore (德国) 公司;蛋白质水解酶高活性类芽孢杆菌 (*P. lautus*) CHN26 菌株由本实验室分离鉴定保存^[5]。

1.2 试验方法

1.2.1 *PlclpP* 基因的克隆 采用 Primer5.0 软件 (<http://www.premierbiosoft.com/>) 设计 *PlclpP* 基因 PCR 扩增上、下游引物 *ClpP*-P1f (5'-ATGGAGGATGAAACCATGAA-3') 和 *ClpP*-P1r (5'-TCACAGTTTG-

GTGACGATGT-3'),以及在 5'端分别引入限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点 (以下划线表示) 的上、下游引物 *ClpP*-P2f (5'-CGGGATCCATG-GAGGATGA-3') 和 *ClpP*-P2r (5'-CCCAAGCTTCAGTTTGGTGAC-3')。寡核苷酸引物合成和 DNA 序列测定由生工生物工程有限公司 (上海) 完成。基因组和质粒 DNA 的提取方法参考试剂盒说明书,参考 Shi 等的方法^[6] 进行 PCR 反应、产物纯化、酶切、DNA 片段连接、转化以及菌落 PCR 检测等,利用 CLUSTAL 2.1 软件 (www.ebi.ac.uk/Tools/services) 进行多序列比对分析。

1.2.2 蛋白质表达、纯化 参考 Li 等的方法^[5] 进行 *PlclpP* 基因表达质粒的构建,蛋白质的诱导表达,组氨酸标签 (His-tag) 亲和纯化以及 SDS-PAGE 等。

1.2.3 蛋白质水解酶活性的检测 用 β -酪蛋白为底物,在 150 μ l 酶反应液 [含 2.7 μ g β -casein、5 μ l 0.1 mol/L ATP、2 mmol/L ZnCl₂、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.3)] 中加入 50 μ l 纯化酶进行反应。在 40 $^{\circ}$ C、pH 7.0 条件下,30 min 内水解 β -酪蛋白使 OD₅₆₂ 值增加 0.01 的酶量,定义为 1 个酶活力单位 (U)^[7]。参考 Li 等的方法^[5] 测定温度、pH 值、表明活性剂 (SDS、Tween-20、Tween-80) 和蛋白酶抑制剂 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 对 *PlclpP* 复合物酶活性的影响。

2 结果

2.1 *P. lautus* CHN26 菌株 *PlclpP* 基因的分子克隆及其序列分析

根据 GenBank 数据库中 *Paenibacillus* sp. Y412MC10 菌株 (GenBank: NC_013406.1) *clpP* 基因序列,设计 PCR 扩增引物 *clpP*-P1f/r。提取 *P. lautus* CHN26 基因组 DNA 并以其为模板,进行 PCR 扩增,获得 585 bp 的单一 PCR 扩增产物。PCR 产物经纯化后与克隆载体 pGM-T 连接,转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞。筛选、提取 Amp^r 阳性转化子重组质粒,经 DNA 序列测定,发现克隆获得的 *P. lautus* CHN26 *clpP* 基因 (命名为 *PlclpP*) 编码 194 个氨基酸,预测蛋白质分子量约为 2.1×10^4 。

BLAST 序列比对分析结果显示,*PlclpP* 序列与 GenBank 数据库中 *Paenibacillus* 的 ATP-依赖型 *ClpP* 蛋白酶水解亚单位氨基酸序列相似性为 71%~98%,而与 *EcClpP* 的氨基酸序列相似性仅为 62%。

可是, *clpP* 基因多序列比对分析结果显示, *PlclpP* 基因序列含有 S14_ClpP 家族特征性八肽结构域 (KDIHMYIN, 59~66 aa) (图 1)。其中位于第 59 位的赖氨酸 (Lys₅₉, K)、第 60 位的天冬氨酸 (Asp₆₀, D) 以及第 64 位的催化亲核物质 (Catalytic nucleophile)

酪氨酸 (Tyr₆₄, Y) 为高度保守的催化三分体残基 (Catalytic triad residues), 在酪蛋白水解中发挥重要作用^[8]。此外, *PlclpP* 序列还含有丝氨酸蛋白水解酶高度保守的催化活性位点 (Ser₉₉-His₁₂₄-Asp₁₇₃) (图 1)。

ACX66587.1	QLLFLAAEDPEKDIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKPVNTICTGFAASYGAILLA	111
PlClpP	QLLFLAAEDPEKDIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKPVNTICTGFAASYGAILLA	107
EH68686.1	QLLFLAAEDPDRIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKPVNTICTGFAASYGAILLA	106
AJE49643.1	QLLFLAAEDPEKDIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKPVNTICTGFAASYGAILLA	107
EFU43338.1	QMLFLSAEDPEKDIHLYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKPVNTICTGFAASYGAILLA	106
EII68935.1	QMLFLSAEDPEKDIHLYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKPVNTICTGFAASYGAILLA	119
	*** **	
ACX66587.1	GAKGKRLALPNSSEIMTHPLGGVQGGATDIATKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE	171
PlClpP	GAKGKRLALPNSSEIMTHPLGGVQGGATDIATKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE	167
EH68686.1	GAKGKRLALPNSSEIMTHPLGGVQGGATDIATKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE	166
AJE49643.1	GAKGKRLALPNSSEIMTHPLGGVQGGATDIATKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE	167
EFU43338.1	GAKGKRYGLPNSSEIMTHPLGGVQGGATDIATKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE	166
EII68935.1	GAKGKRFCLPNSRVIMTHPLGGVQGGATDIATKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE	179
	***** **	
ACX66587.1	KDMDRDFYMSAEAEKEYGIIDIVTKL-----	198
PlClpP	KDMDRDFYMSAEAEKEYGIIDIVTKL-----	194
EH68686.1	KDMDRDFYMSAEAEKEYGIIDIVTKL-----	193
AJE49643.1	KDMDRDFYMSAEAEKEYGIIDIVTKL-----	194
EFU43338.1	KDMDRDFYMSAEAEKEYGIIDIVTKL-----	198
EII68935.1	KDMDRDFYMSAEAEKEYGIIDIVTKL-----	207
	*** **	

GenBank 登录号 ACX66587.1; *P. sp.* Y412MC10; EH68686.1; *Paenibacillus lactis* 154; AJE49643.1; *P. polymyxa*; EFU43338.1; *P. vortex* V453; EII68935.1; *Escherichia coli* 2.4168; PlClpP; *P. lautus* CHN26。ClpP 家族特征性八肽结构域以及丝氨酸蛋白水解酶保守的催化活性位点用黑色方框标记。

图 1 *ClpP* 蛋白酶多序列比对分析

Fig.1 Multiple sequence alignment of caseinolytic peptidase (*ClpP*)

2.2 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28a-*PlclpP* 的构建与鉴定

基于本研究获得的 *PlclpP* 基因序列, 我们设计了携带限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的引物 clpP-P2f/r, 采用 PCR 方法扩增 *PlclpP* 基因, 获得了单一 PCR 产物。采用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 产物, 回收纯化酶切产物。同时, 提取表达载体 pET-28a 的质粒 DNA, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切为线性的 DNA 片段, 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图 2 所示。

将上述纯化后的酶切片段经 T4-DNA 连接酶连接后, 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 在含有 30 μg/ml 卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 采用菌落 PCR 方法筛选获得阳性转化子克隆 (图 2)。提取阳

性转化子重组质粒 DNA, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证为单一 DNA 片段插入, 大小约 0.6 kb (图 2)。经 DNA 序列测定验证插入片段为 *PlclpP* 基因。

2.3 *PlclpP* 基因的表达和纯化

采用 LB 液体培养基 (含 30 μg/ml 卡那霉素) 于 20 °C 培养含有重组表达质粒的 *E. coli* BL21 (pET-28a-*PlclpP*), 通过 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达 18 h, 获得含有组氨酸标签的重组 PlClpP 蛋白质, 分子量约为 2.1×10^4 , 与预测的 ClpP 蛋白质分子量大小相一致 (图 3)。同时还获得了分子量约为 2.5×10^4 的复合 PlclpP 蛋白质。利用 Ni-NTA-His · Bind resin 纯化法, 纯化 *E. coli* BL21 菌体裂解后的无细胞提取液, 经 SDS-PAGE 分析洗脱液各组分, 获得纯化的目标蛋白质 PlClpP (图 3)。

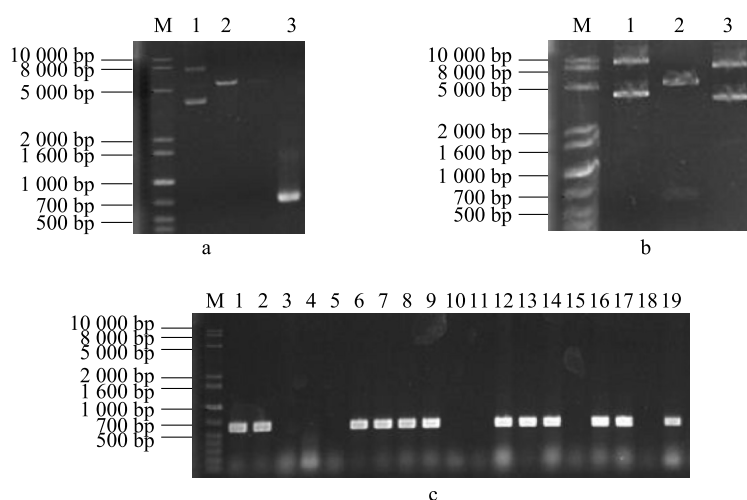


图 a 中 M:10 kb DNA marker;1:pET-28a 质粒 DNA;2:pET-28a 质粒 DNA 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物;3:*PlclpP* 基因的 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物。图 b 中 M:10 kb DNA marker;1:pET-28a-*PlclpP* 重组质粒 DNA;2:pET-28a-*PlclpP* 重组质粒 DNA 的双酶切产物;3:pET-28a 质粒 DNA。图 c 中 1、2、6、7、8、9、12、13、14、16、17、19:菌落 PCR 检测为阳性的转化子克隆(含有约 0.6 kb 插入片段)。

图 2 *Paenibacillus lautus* CHN26 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28a-*PlclpP* 的构建与鉴定

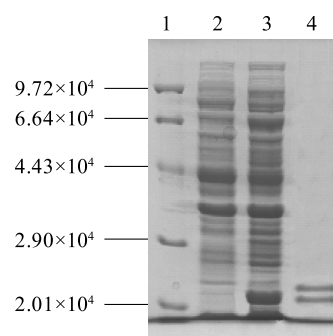
Fig.2 Construction and identification of the expression plasmid pET-28a-*PlclpP* of *Paenibacillus lautus* CHN26 *PlclpP*

2.4 PIClpP 复合物的蛋白水解酶活性

以非折叠态模式底物 β -酪蛋白为底物,在含有 2.5 mmol/L ATP 的反应液中分析了纯化 PIClpP 复合物在不同温度下的蛋白水解酶活性,结果显示 PIClpP 复合物的最适反应温度为 40 °C (图 4),明显高于 *P. lautus* CHN26 和 *E. coli* BL21 的最适生长温度 37 °C。分析该复合物在不同温度下的稳定性,发现 PIClpP 复合物在 10~40 °C 条件下处理 3 h 后相对酶活性仍高于 90%,说明 PIClpP 复合物具有嗜中温反应特性(图 4)。此外,还分析了 pH 对 PIClpP 复合物蛋白水解酶活性的影响,结果显示,该复合物的最适反应 pH 值为 7.0。在酸性(pH \leq 6.0)和碱性(pH \geq 7.0)条件下 40 °C 处理 12 h 后相对酶活性迅速下降,而在 pH 6.0~7.0 条件下相对酶活性大于 87%,证明 PIClpP 复合物为中性反应特性。

2.5 表面活性剂和蛋白酶抑制剂对 PIClpP 复合物酶活性的影响

用表面活性剂 SDS、Tween-20、Tween-80 于 40 °C 条件下分别处理纯化的 PIClpP 复合物 1 h,然后在最适温度和 pH 条件下测定残余酶活性,结果显示,终浓度为 0.5% 的表面活性剂强烈抑制 PIClpP 复合物酶活性 50%~60%。相反,PIClpP 复合物对常规的丝氨酸蛋白酶抑制剂具有较强抗性,10



1:蛋白分子量标准(TaKaRa, Cat.No. DPP530S);2:*E. coli* BL21 (含 pET-28a) 细胞可溶性蛋白质;3:*E. coli* BL21 (含 pET-28a-*PlclpP*) 细胞可溶性蛋白质;4:纯化的 PIClpP 蛋白质及其复合物。

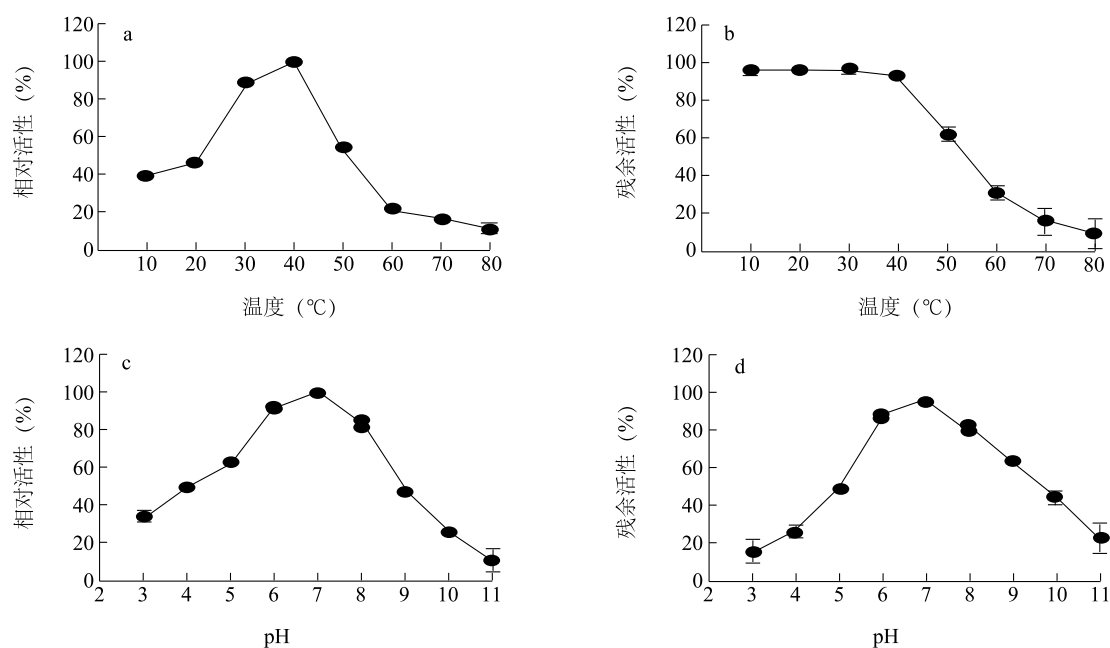
图 3 SDS-PAGE 检测 PIClpP 的表达及其纯化

Fig.3 The expression and purification of PIClpP detected by SDS-PAGE

mmol/L PMSF 处理 PIClpP 复合物 1 h 对酶活性无明显影响。

3 讨论

迄今为止,国内外涉及 *P. lautus* 中 *clpP* 基因功能的研究尚无文献报道。本研究克隆鉴定了 *P. lautus* CHN26 的一种新型蛋白水解酶基因 *PlclpP*, 编码 194 个氨基酸,蛋白质分子量约为 2.1 \times 10⁴。采



a: PIClpP 复合物在 10~80 °C、pH 7.0 反应条件下的蛋白水解酶活性; b: 分别于 10~80 °C 处理 3 h 后 PIClpP 复合物的残余酶活; c: PIClpP 复合物在 pH 3.0~11.0 反应条件下的蛋白水解酶活性; d: 分别于 pH 3.0~11.0、40 °C 处理 12 h 后 PIClpP 复合物的残余酶活。

图 4 温度和 pH 对 PIClpP 复合物蛋白水解酶活性的影响

Fig.4 Effects of the temperature and pH on proteolytic activity of PIClpP complex

用 *E. coli* pET 表达系统, 构建 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28-*PlclpP*, 在 *E. coli* BL21 中实现了重组 PIClpP 蛋白质的表达。利用组氨酸标签 (His-tag) 亲和纯化法, 获得了 PIClpP 纯化蛋白质。意外发现, 在 *E. coli* BL21 中异源表达的 PIClpP 蛋白质在 SDS-PAGE 图谱上呈现 2 条带, 分子量分别约为 2.1×10^4 和 2.5×10^4 。鉴于 *E. coli* EcClpP 蛋白酶伴侣分子 ClpA 或 ClpX 分别为 8.0×10^4 和 4.6×10^4 [9-10], 推测 PIClpP 可能与 *E. coli* BL21 中未知伴侣分子形成复合物。未知伴侣分子的序列和功能有待进一步的研究。采用 BCA 蛋白质定量试剂盒检测了 PIClpP 的表达量, 结果显示, 每 1 g 湿细胞可以产生纯化的重组 PIClpP 蛋白质复合物约 0.54 mg, 占细胞总蛋白质约 5.25%。PIClpP 复合物具有 ATP-依赖型酪蛋白水解酶活性, 最适反应温度为 40 °C, 明显高于 *P. laetus* CHN26 和 *E. coli* BL21 的最适生长温度。此外, 终浓度为 0.5% 的表面活性剂 SDS、Tween-20、Tween-80 强烈抑制 PIClpP 复合物的酶活, 而常规丝氨酸蛋白酶抑制剂 (PMSF) 对其活性无抑制作用, 表明 PIClpP 属于一类非常规的丝氨酸蛋白酶。

参考文献:

- [1] KRIK O, BORCHERT T V, FUGLSANG C C. Industrial enzyme applications [J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2002, 13 (4): 345-351.
- [2] KRESS W, MAGLICA Z, WEBER-BAN E. Clp chaperoneproteases: structure and function [J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160: 618-628.
- [3] SCHMITZ K R, CARNEY D W, SELLO J K, et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1P2 suggests a model for peptidaseactivation by AAA + partner binding and substrate delivery [J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 2014, 111 (43): 4587-4595.
- [4] HWANGS B J, WOOS K M, GOLDBERG A L, et al. A new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*, contains protein-activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263 (18): 8727-8734.
- [5] LI Y, PAN Y, SHE Q, et al. A novel carboxyl-terminal protease derived from *Paenibacillus laetus* CHN26 exhibiting high activities at multiple sites of substrates [J]. *BMC Biotechnology*, 2013, 13: 89.
- [6] SHI Y, PAN Y, LI B, et al. Molecular cloning of a novel *bioH* gene from an environmental metagenome encoding a

- carboxylesterase with exceptional tolerance to organic solvents [J]. BMC Biotechnology, 2013, 13: 13.
- [7] KASANA R C, YADAV S K. Isolation of a psychrotrophic *Exiguobacterium* sp. SKPB5 (MTCC 7803) and characterization of its alkaline protease [J]. Current Microbiology, 2007, 54 (3): 224-229.
- [8] BEWLEY M C, GRAZIANO V, GRIFFIN K, et al. Turned on for degradation: ATPase-independent degradation by ClpP [J]. Journal of Structural Biology, 2009, 165: 118-125.
- [9] GRIMAUD R, KESSEL M, BEURON F, et al. Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP [J]. The Journal of Biological chemistry, 1998, 273(20): 12476-12481.
- [10] WOJTKOWIAK D, GEORGOPOULOS C, ZYLICZ M. Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(30): 22609-22617.

(责任编辑:张震林)