

创伤弧菌 FrsA 蛋白的纯化及生化表征

鲍玲玲<sup>1</sup>,李至敏<sup>2</sup>,王小琴<sup>1</sup>,汤亚兰<sup>1</sup>,许文武<sup>1</sup>,李志敏<sup>1\*</sup>

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院,江西 南昌 330045;2. 江西农业大学 理学院,江西 南昌 330045)

**摘要:** 为确定创伤弧菌 FrsA 蛋白(VvFrsA)在大肠杆菌中的表达条件及体外纯化步骤,并对其进行生化表征分析。通过分子生物学手段将合成的创伤弧菌的 *FrsA* 基因(*VvFrsA*)连接到 pET28a 载体上,构建 pET28a-*VvFrsA* 原核表达载体。将该载体转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后,经 IPTG 诱导实现了 VvFrsA 蛋白的可溶性表达。采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化,得到重组 VvFrsA 蛋白。酶催化活性研究结果显示,VvFrsA 具有酯酶功能,可以催化对硝基苯酚脂肪酸酯的水解,并且其最适底物为对硝基苯酚短链脂肪酸酯。综上,利用大肠杆菌 BL21(DE3)菌株成功表达了可溶性 VvFrsA 蛋白,并且 VvFrsA 体外具有催化对硝基苯酚脂肪酸酯水解活性。

**关键词:** 创伤弧菌; FrsA 蛋白; 蛋白质纯化; 生化表征; 酯酶

**中图分类号:** S917.1;Q936      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2018)11-0130-04

Purification and Biochemical Characterization of FrsA from *Vibrio vulnificus*

BAO Lingling<sup>1</sup>,LI Zhimin<sup>2</sup>,WANG Xiaoqin<sup>1</sup>,TANG Yalan<sup>1</sup>,XU Wenwu<sup>1</sup>,LI Zhimin<sup>1\*</sup>

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;  
2. College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The objective of this study was to identify the expression condition and purification procedures of *VvFrsA* from *Vibrio vulnificus*, and analyze its biochemical characterization. The *FrsA* gene from *Vibrio vulnificus* (*VvFrsA*) was synthesized and ligated with pET28a vector to construct the pET28a-*VvFrsA* expression plasmid, which was then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. The soluble expression of VvFrsA protein was obtained by inducing with IPTG and the recombinant VvFrsA protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. Enzymatic catalytic activity studies indicate that VvFrsA was a type of esterase, which could catalyze the hydrolysis of p-nitrophenol fatty acid ester. Furthermore, the optimal substrate of VvFrsA was p-nitrophenol acetate. In conclusion, recombinant soluble VvFrsA could be expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cell culture and VvFrsA displayed hydrolytic activity towards p-nitrophenol fatty acid ester *in vitro*.

**Key words:** *Vibrio vulnificus*; FrsA protein; Protein purification; Biochemical characterization; Esterase

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一种嗜盐革兰氏阴性细菌,多存在于温带沿海地区的软体贝类体内<sup>[1]</sup>,该菌属于条件致病菌,在合适的条件下会感染鱼和人类<sup>[2]</sup>。人类感染创伤弧菌主要是通过生食带有该菌的海鲜或伤口接触了带菌的海水,从而导致肠胃炎、原发性败血症、慢性肝炎或肝硬化、软

组织感染等疾病<sup>[3-4]</sup>。创伤弧菌的生物多样性复杂,可分为3大类型,其中生物类型Ⅰ普遍感染人类<sup>[5]</sup>,生物类型Ⅱ主要感染鱼类贝类<sup>[6]</sup>,生物类型Ⅲ于1996年首次在以色列被分离得到,是由来源于自然环境的类型Ⅰ和其他细菌通过基因重组进化而来<sup>[7-8]</sup>。

收稿日期:2018-04-10  
基金项目:江西省自然科学基金重大项目(20161ACB21012);江西省教育厅科技研究重点项目(GJJ160353);江西农业大学国家级大学生创新创业训练项目(201710410005)  
作者简介:鲍玲玲(1995-),女,浙江湖州人,在读硕士研究生,研究方向:蛋白质工程。E-mail:1136803597@qq.com  
\* 通讯作者:李志敏(1979-),男,江西新余人,副教授,博士,主要从事酶催化反应机制研究。E-mail:zmlizm@126.com

在大肠杆菌中, FrsA 蛋白通过和去磷酸化的 HIA<sup>Glc</sup> 蛋白结合可以提高葡萄糖的发酵水平<sup>[9]</sup>。研究表明,当用葡萄糖作为碳源时,敲除 *FrsA* 基因会提高大肠杆菌的呼吸水平,而过表达 *FrsA* 基因会提高发酵导向的代谢水平<sup>[9]</sup>。尽管 FrsA 蛋白在葡萄糖代谢方面具有生理意义,但有关重组 FrsA 蛋白的体外生化功能的研究报道较少。2011 年, Lee 等<sup>[10]</sup>首次表达纯化了创伤弧菌的 FrsA 蛋白(VvFrsA),并研究了重组 VvFrsA 蛋白的体外生化功能,发现 VvFrsA 可在大肠杆菌表达系统中进行可溶性表达,同时 VvFrsA 是一种不依赖于焦磷酸硫胺素(TPP)辅因子的丙酮酸脱羧酶,在体外能够催化丙酮酸转化为乙醛和二氧化碳<sup>[10]</sup>。然而, Kellet 等<sup>[11]</sup>指出, VvFrsA 蛋白并不是一种丙酮酸脱羧酶,当以丙酮酸作为底物时,并未检测到乙醛和二氧化碳的产生。与此同时,计算化学的研究也证明,重组 VvFrsA 蛋白不具备丙酮酸脱羧功能<sup>[11]</sup>。目前,仅有乳清苷 5'-单磷酸脱羧酶和 2-氧-4-羟基-4-羧基-5-脲基咪唑啉脱羧酶等两类不依赖辅因子的脱羧酶被报道<sup>[12-13]</sup>。因此,重组 VvFrsA 蛋白的体外生化功能依然存在争议。

通过氨基酸序列同源比对发现,在 NCBI 数据库中和 VvFrsA 的氨基酸序列同源的蛋白质大多数被标注为酯酶。此外,已有的重组 VvFrsA 蛋白的晶体结构数据表明, VvFrsA 中存在  $\alpha/\beta$  水解酶结构域<sup>[10-11]</sup>。因此,笔者猜测重组 VvFrsA 蛋白可能具有催化某些酯类水解功能。为了验证这一假设,本研究通过分子生物学手段将化学法合成的 VvFrsA 基因连接到 pET-28a 载体上,构建了 pET28a-VvFrsA 表达质粒,探究了 VvFrsA 蛋白的表达条件及纯化步骤,并初步阐明了其作为酯酶的催化特性,为进一步探索 VvFrsA 蛋白的体外生化特征奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

创伤弧菌的 *FrsA* 基因(VvFrsA)由上海祥音生物技术有限公司合成;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态细胞、表达载体 pET-28a 由江西农业大学生物化学与分子生物学实验室保存;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、5k 核酸 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;蛋白质 Marker 购自 Thermo Scientific 公司;对硝基苯酚乙酸酯(pNPA)、对硝基苯酚丁酸酯(pNPB)和对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)均为分析纯,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 pET28a-VvFrsA 质粒构建 化学法合成包含 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点的 VvFrsA 基因。该基因经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切后,利用琼脂糖凝胶回收片段,将该片段与同样酶切的 pET-28a 载体用 T4 连接酶在 16℃ 下过夜连接。然后将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中,用含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 LB 固体平板培养基筛选阳性克隆。将阳性克隆提取质粒后用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,验证阳性克隆并送检测序。

1.2.2 重组 VvFrsA 蛋白的诱导表达与纯化 将测序正确的 pET28a-VvFrsA 质粒重新转化到大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)中,挑取阳性单克隆点接种于含卡那霉素终质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB 液体培养基中进行扩大培养,次日按 1% 的接种量接种于新鲜 LB 液体培养基,37℃、180 r/min 条件下继续培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时,立即冰水浴 30 min,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导剂,于 25℃、180 r/min 的培养箱中诱导表达 24 h。然后于 4℃、5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。将菌体用 10 倍体积的 20 mmol/L PBS 缓冲液重悬后于冰水浴中超声破碎,然后于 4℃、12 000 r/min 离心破碎后的细胞全菌液 2 h。将经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后的上清液样品流穿事先用结合缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 值 7.5)平衡好的 Ni-NTA 柱,随后用含 20~200 mmol/L 咪唑的缓冲液进行浓度梯度洗脱,分别收集每个浓度的洗脱液进行 SDS-PAGE 检测目的蛋白。合并含有重组 VvFrsA 蛋白的洗脱液,浓缩脱盐处理,最终得到的 VvFrsA 蛋白用 Bradford 方法进行定量。

1.2.3 重组 VvFrsA 蛋白底物特异性测定 重组 VvFrsA 蛋白对 pNPA、pNPB 和 pNPP 3 种对硝基苯酚脂肪酸酯底物的催化活性根据 Vorderwülbecke 等<sup>[14]</sup>提出的酯酶检测方法适当修改后测定。首先将上述 3 种底物分别溶解于异丙醇中构成溶液 1,底物浓度均为 1 mmol/L。同时配置含有 0.4% Triton X-100 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值为 7.5)构成溶液 2。测定前将溶液 1 和 2 均置于 37℃ 恒温水浴。测定时将溶液 1 和溶液 2 按 1:9 的比例混合后加入终浓度为 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的重组 VvFrsA 蛋白,于 37℃ 开始反应,使用紫外分光光度计连续监测 410 nm 处吸收值。根据对硝基苯酚在 410 nm 处的摩尔消光系数计算生成的产物量。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET28a-VvFrsA 表达质粒的构建与鉴定

将从阳性单克隆菌落中提取的重组质粒经

*Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后,经琼脂糖凝胶电泳出现 2 个条带,如图 1 所示,接近 5 000 bp 的大片段为 pET-28a 载体片段,小片段基因约为 1 200 bp,与 *VvFrsA* 基因理论大小(1 248 bp)相符。基因测序发现该 1 200 bp 片段基因序列与 GenBank 数据库中登录号为 HM172799 的 *FrsA* 基因序列一致。可见,成功构建了 pET28a-*VvFrsA* 重组表达质粒。

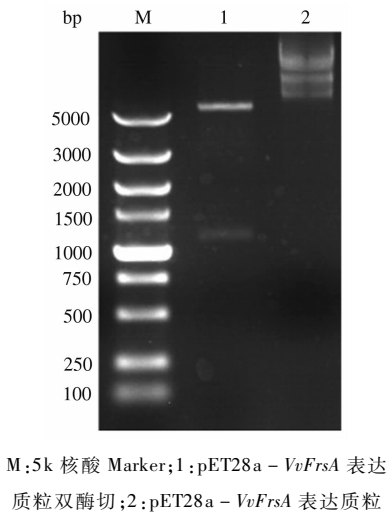


图 1 pET28a-*VvFrsA* 表达质粒的酶切鉴定结果

2.2 重组 *VvFrsA* 蛋白的表达与纯化

*VvFrsA* 基因的碱基数为 1 248 bp,编码含有 415 个氨基酸残基的蛋白质,预测其分子质量为 47.014 ku,与图 2 中泳道 1、2、3 中条带基本一致。由图 2 可知,重组 *VvFrsA* 蛋白的表达量较高,且在上述表达条件下重组蛋白的溶解性较好。

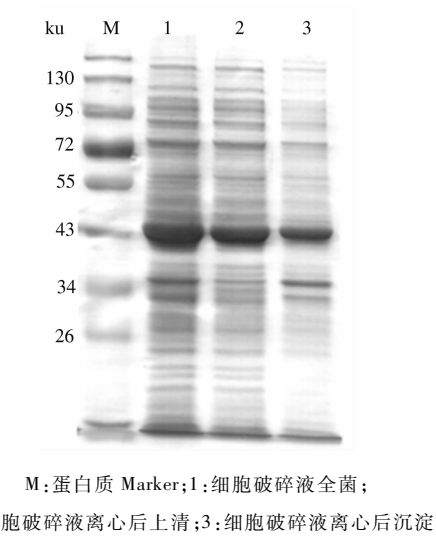


图 2 重组 *VvFrsA* 蛋白 SDS-PAGE 电泳

将含有目的蛋白的上清液用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化。用含有 20~200 mmol/L 咪唑的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.5)进行洗脱

(图 3)。当咪唑浓度增加到 80 mmol/L 时,有少量重组 *VvFrsA* 蛋白被洗脱。然后用含 200 mmol/L 咪唑的缓冲液将重组 *VvFrsA* 蛋白全部洗脱。合并图 3 中泳道 8—9 的洗脱液后浓缩脱盐,得到纯度大于 95% 的重组 *VvFrsA* 蛋白。用 Bradford 方法对浓缩后的蛋白质质量浓度进行测定,最终得到蛋白质质量浓度为 20 mg/mL,蛋白质回收率约为 15 mg/g 菌体。

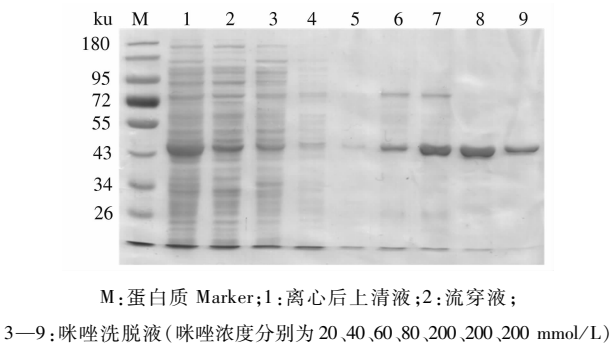


图 3 纯化的重组 *VvFrsA* 蛋白 SDS-PAGE 电泳

2.3 重组 *VvFrsA* 蛋白的底物特异性

按照上述测定方法,当分别用 pNPA、pNPB 和 pNPP 作为底物时,加入重组 *VvFrsA* 蛋白后,反应体系在 410 nm 处的吸收值逐渐增加。由此可知,重组 *VvFrsA* 蛋白可以催化 pNPA、pNPB 和 pNPP 3 种对硝基苯酚脂肪酸酯的水解反应,生成对硝基苯酚。由图 4 可知,当用 pNPA 作为底物时,重组 *VvFrsA* 蛋白的催化活性最高。重组 *VvFrsA* 蛋白催化 pNPB、pNPP 水解的活性分别是催化 pNPA 水解活性的 75%、22%。可见,重组 *VvFrsA* 蛋白倾向于催化对硝基苯酚短链脂肪酸酯水解。

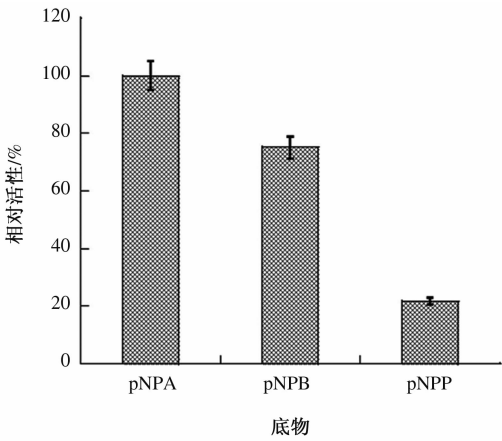


图 4 重组 *VvFrsA* 蛋白催化不同底物的相对活性

3 结论与讨论

首个被报道的 *FrsA* 蛋白来自于大肠杆菌<sup>[9]</sup>。

研究人员发现,在大肠杆菌中 FrsA 蛋白以 1:1 的比例特异性地结合去磷酸化的 IIAGlc 蛋白形成复合物,从而调控细胞中葡萄糖的发酵水平<sup>[9]</sup>。尽管 FrsA 蛋白在大肠杆菌中的生理功能已被阐明,然而 FrsA 蛋白的体外生化功能依然不清楚。

本研究将构建的 pET28a - *VvFrsA* 重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达,成功实现了重组 *VvFrsA* 蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达。通过 Ni - NTA 亲和层析法一步纯化得到纯度较高的重组 *VvFrsA* 蛋白。

一般认为,丙酮酸脱羧酶的催化活性依赖于 TPP 辅因子<sup>[15]</sup>。Lee 等<sup>[10]</sup>研究表明,*VvFrsA* 蛋白是一个不依赖 TPP 辅因子的丙酮酸脱羧酶。这一发现颠覆了传统的对于丙酮酸脱羧酶的认识。本研究以丙酮酸为反应底物时,没有检测到 *VvFrsA* 在体外具有催化丙酮酸脱羧生成乙醛和二氧化碳的活性。进一步的酶催化活性研究发现,*VvFrsA* 蛋白是一个酯酶,可以催化对硝基苯酚脂肪酸酯的水解,其最适底物是对硝基苯酚短链脂肪酸酯。这一发现与 *VvFrsA* 蛋白的晶体结构特征及氨基酸序列比对结果相一致。研究表明,*VvFrsA* 蛋白具有酯酶的催化三联体<sup>[16-18]</sup>,并且 pNPA 可以在 *VvFrsA* 的活性中心稳定存在长达 300 ns (未发表数据)。本研究结果为后续对重组 *VvFrsA* 蛋白进行生化表征和对硝基苯酚乙酸酯水解的酶动力学与催化机制奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] Koton Y, Gordon M, Chalifa-Caspi V, *et al.* Comparative genomic analysis of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates revealed biotype 3 evolutionary relationships[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 803.

[2] Strom M S, Paranjpye R N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(2): 177-188.

[3] Gulig P A, Tucker M S, Thiaville P C, *et al.* USER friendly cloning coupled with chitin-based natural transformation enables rapid mutagenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 4936-4949.

[4] Gulig P A, Bourdage K L, Starks A M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(S): 118-131.

[5] Jones M K, Oliver J D. *Vibrio vulnificus*: Disease and pathogenesis [J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(5): 1723-1733.

[6] Tison D L, Nishibuchi M, Greenwood J D, *et al.* *Vibrio vulnificus* biogroup 2: New biogroup pathogenic for eels [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 44(3): 640-646.

[7] Efimov V, Danin-Poleg Y, Raz N, *et al.* Insight into the evolution of *Vibrio vulnificus* biotype 3's genome [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 393.

[8] Danin-Poleg Y, Elgavish S, Raz N, *et al.* Genome sequence of the pathogenic bacterium *Vibrio vulnificus* biotype 3 [J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(2): e0013613.

[9] Koo B M, Yoon M J, Lee C R, *et al.* A novel fermentation/respiration switch protein regulated by enzyme IIAGlc in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(30): 31613-31621.

[10] Lee K J, Jeong C S, An Y J, *et al.* FrsA functions as a cofactor-independent decarboxylase to control metabolic flux [J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(7): 434-436.

[11] Kellett W F, Brunk E, Desai B J, *et al.* Computational, structural, and kinetic evidence that *Vibrio vulnificus* FrsA is not a cofactor-independent pyruvate decarboxylase [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(11): 1842-1844.

[12] Chan K K, Wood B M, Fedorov A A, *et al.* Mechanism of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase-catalyzed reaction: Evidence for substrate destabilization [J]. *Biochemistry*, 2009, 48(24): 5518-5531.

[13] Cendron L, Berni R, Folli C, *et al.* The structure of 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazole decarboxylase provides insights into the mechanism of uric acid degradation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(25): 18182-18189.

[14] Vorderwülbecke T, Kieslich K, Erdmann H. Comparison of lipases by different assays [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(8): 631-639.

[15] Paulikat M, Wechsler C, Tittmann K, *et al.* Theoretical studies of the electronic absorption spectra of thiamin diphosphate in pyruvate decarboxylase [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(13): 1854-1864.

[16] Lee C, Kim J, Hong S, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a recombinant esterase from cold-adapted *Pseudomonas mandelii* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(1): 29-40.

[17] Rao L, Xue Y, Zheng Y, *et al.* A novel alkaliphilic bacillus esterase belongs to the 13(th) bacterial lipolytic enzyme family [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60645.

[18] Park H J, Jeon J H, Kang S G, *et al.* Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 52(2): 340-347.