

3 α -羟类固醇脱氢酶的表达、纯化和酶学性质研究

张国华¹ 丛爱日² 徐国宾^{1*} 夏铁安¹

(¹ 北京大学第一医院检验科 北京 100034)

(² 山东威海文登中心医院 威海 264400)

摘 要 :从土壤中分离辜酮丛毛单胞菌 ,提取其基因组 DNA ,PCR 扩增 3 α -羟类固醇脱氢酶(3 α -HSD)基因。以质粒 pET-15b 为载体 ,构建 3 α -HSD 的原核表达系统。经 IPTG 诱导后 ,得到了具有酶活性的融合蛋白 ,细菌总蛋白的表达量为 0.73g/L ,其中融合酶蛋白占 16.4% ,活性达 1.38×10^5 U/L。利用融合蛋白 N 末端的 His-tag ,经金属螯合亲和层析纯化后 ,得到了纯度较高的融合酶蛋白 ,酶蛋白的得率为 68% ,比活性为 194.7U/mg。凝血酶切除 His-tag 后 ,经质谱鉴定 ,重组蛋白的分子量为 26.5kD ,与理论推测值基本相同。25℃以雄酮为底物 ,以 NAD⁺ 和 thio-NAD⁺ 为辅因子时 ,融合蛋白参与酶促反应的最适 pH 分别为 10.5 和 9.4。37℃条件下酶促反应较快 ,25℃时的反应速度只有 37℃时的 52% , $Q_{10}(25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C})$ 为 1.7。25℃、pH10.5、以雄酮和各级胆汁酸为底物、NAD⁺ 为辅因子时 ,融合酶蛋白的动力学常数 K_m 位于 4.2 ~ 51.1 μ mol/L 范围内。融合酶蛋白发挥催化作用并不需要金属离子的参与 ,而 Fe³⁺、Fe²⁺、Zn²⁺ 则抑制酶活性 ,反应体系中加入 EDTA 也并不影响酶的活性。活性和纯度均较高的融合蛋白 3 α -HSD 的获得及其生物学性质的研究 ,为血清总胆汁酸酶循环法测定的建立奠定了基础。

关键词 :辜酮丛毛单胞菌 3 α -羟类固醇脱氢酶 基因表达 酶学性质 胆汁酸

中图分类号 :R446.1 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2004)04-0496-04

3 α -羟类固醇脱氢酶(3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase 3 α -HSD E.C.1.1.1.50)是辜酮丛毛单胞菌分泌的一种类固醇脱氢酶 ,由 258 个氨基酸残基构成 ,理论分子量为 26.4kD。3 α -HSD 可作用于多种类固醇基质 ,可逆地催化 C₁₉~₂₇ 类固醇 3 位羟基/酮基的氧化还原^[1]。胆汁酸是 3 α -HSD 的作用底物之一 ,临床上用 3 α -HSD 作为工具酶来测定人血清中的总胆汁酸(Total bile acids ,TBA)浓度。目前 ,TBA 测定中所用的工具酶 3 α -HSD 均从辜酮丛毛单胞菌中直接提取而来。天然 3 α -HSD 提取工艺复杂 ,需经过多步层析和制备性等电聚焦电泳技术来纯化^[2] ,步骤繁琐 ,纯化过程中伴有酶活性的丢失 ,酶蛋白的得率低 ,使得天然 3 α -HSD 价格昂贵 ,在一定程度上限制了 TBA 测定的临床推广。本研究在 3 α -HSD 的原核表达系统中成功诱导表达得到了具有酶活性的融合蛋白 ,利用 pET15b 质粒编码融合蛋白 N 端的 His-tag 经 Ni²⁺-Sephrose 柱进行金属螯合亲和层析 ,得到了纯度较高的融合酶蛋白 3 α -HSD。本文对 3 α -HSD 的表达、纯化和酶学性质进行了初步研究 ,可望为融合 3 α -HSD 的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和试剂 :大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由北京大学第一医院卜定方教授提供 ;质粒 pET-15b 由首都儿科研究所伏谨老师惠赠 ;PCR 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成 ;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、*E. coli* BL21(DE3) pLysS 购自 Promega 公司 ;异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、核酸及蛋白质分子量标准购自华美生物工程公司 ;雄酮、胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、胆酸甲酯、甘氨酸、牛磺胆酸、牛脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、牛鹅脱氧胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸均为 Sigma 公司产品 ;Probond Resin 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 基因来源菌 :辜酮丛毛单胞菌由本实验室从土壤中分离获得。

1.1.3 基因工程菌 :基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 由本实验室构建、保存^[3]。

1.2 融合蛋白 3 α -HSD 的表达

将基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 于 37℃、含氨苄青霉素(50 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)

* 通讯作者。Tel 86-10-66551122 转 2042 ;E-mail bdyjyjk@sina.com

作者简介 张国华(1971-)男 山东滨州人 ,博士 ,主要从事临床生物化学与免疫学研究。E-mail zhgh71@163.com

收稿日期 2003-09-24 ,修回日期 2004-01-20

的 LB 培养基中进行培养。细菌生长至 OD_{600} 为 0.6 时加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 诱导融合蛋白 3 α -HSD 的表达。收集细菌沉淀, 超声破碎细菌后, 离心收集上清。

1.3 融合蛋白的纯化和鉴定

Probond Resin 装柱, 加入 5 倍柱床体积的去离子水进行淋洗, 5 倍柱床体积 Start Buffer(20mmol/L, pH7.4 磷酸盐缓冲液、0.5mol/L NaCl)平衡柱床。细菌裂解液上清过 0.45 μ m 孔径的膜后上柱, 用含 0~0.5mol/L 咪唑的溶液进行线性梯度洗脱, 流速为 1mL/min。收集具有酶活性的蛋白峰, 脱盐并更换缓冲液为 0.5mol/L, pH9.0 Tris-HCl 缓冲液, 超滤浓缩后保存。10% SDS-PAGE, 考马斯亮兰染色鉴定纯化的融合蛋白, 并测定其酶活性和蛋白含量。

1.4 酶活性测定

25 $^{\circ}$ C 下测定融合蛋白的酶活性^[3]。

1.5 蛋白质浓度测定

采用微量双缩脲法测定蛋白质浓度^[4]。

1.6 酶学性质

1.6.1 酶的最适 pH 值和 pH 稳定性 : 在不同 pH 的反应体系中测定融合蛋白的酶活力, 观察酶促反应的最适 pH。另将一定量的酶液分别置于一系列不同 pH 的 0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 放置 2h, 测定其对应的剩余酶活力, 观察酶的 pH 稳定性。

1.6.2 温度对酶活性的影响和酶的热稳定性 : 在不同温度下测定融合蛋白的酶活力, 观察温度对酶活性的影响。酶液在 pH 9.0、0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液中于不同温度下保温 2h, 测定其对应的剩余酶活力, 观察酶的热稳定性。

1.6.3 动力学常数 K_m 的测定 : 取一定量的酶液与不同浓度的底物, 在 25 $^{\circ}$ C 以 NAD^+ 为辅因子的条件下进行反应, 测定反应速度, 用 Lineweaver Burk 作图法求出不同底物存在时融合酶蛋白的 K_m 值。

1.6.4 金属离子和螯合剂 EDTA 对酶活性的影响 : 在不同反应体系中分别加入终浓度为 1mmol/L 的各种金属离子和 1mmol/L 的 EDTA, 测定酶活力, 以未加入金属离子(Li^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+)的酶液的活性为 100%, 观察金属离子和 EDTA 对酶活性的影响。

1.6.5 电喷雾离子源质谱(ESI-MS)测定分子量 : 用凝血酶消化纯化后的融合蛋白, 将 N 末端的 His-tag 序列切除, 反应体系: 4mmol/L 异柠檬酸、2mmol/L $MnSO_4$ 、100U 凝血酶和 10 μ L 酶液(7.9mg/mL), 37 $^{\circ}$ C

消化 2h。将消化产物 10% SDS-PAGE, 考马斯亮兰染色, 切下正确的条带, 用 Bruker ESQUIRE-LC/MS 液相色谱-质谱联用仪测定 3 α -HSD 的分子量。

2 结果

2.1 融合蛋白的表达、纯化和鉴定

IPTG 诱导后, 细菌总蛋白的表达量为 0.73g/L, 其中融合酶蛋白占 16.4%, 活性达 1.38×10^5 U/L。融合酶蛋白经纯化、脱盐、超滤浓缩后, 酶蛋白的得率为 68%, 比活性为 194.7U/mg。

纯化后的融合酶蛋白经 10% SDS-PAGE, 考马斯亮兰染色后显示为分子量约 29kD 的单一一条带, 凝血酶切除 N 端的 His-tag 后, 重组 3 α -HSD 在电泳图谱上显示分子量约为 27kD 的条带(图 1)。

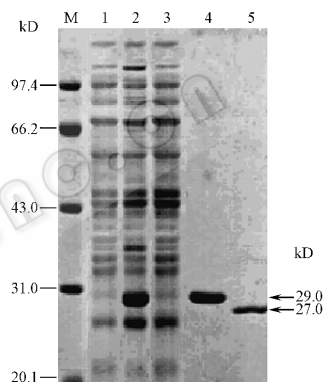


图 1 3 α -HSD 的表达与纯化

Fig.1 Overexpression and purification of fusion 3 α -HSD

M. Protein molecular mass marker ; 1. Total cell lysate supernatant of the host bacteria without IPTG induction ; 2. Total cell lysate supernatant of the host bacteria with 5h of IPTG induction ; 3. Sample load flow-through ; 4. Fusion 3 α -HSD with His-tag eluted from nickel-Sepharose column ; 5. Recombinant 3 α -HSD without His-tag (after thrombin cleavage).

2.2 酶的基本特征

2.2.1 最适 pH 和 pH 稳定性 : 25 $^{\circ}$ C 以雄酮为底物时, 酶促反应的最适 pH 因辅因子的不同而不同 : 以 NAD^+ 为辅因子时, 最适 pH 为 10.5, 而以 Thio- NAD^+ 为辅因子时, 最适 pH 则为 9.4。另外, 37 $^{\circ}$ C 以雄酮为底物、 NAD^+ 为辅因子时的最适 pH 也为 10.5。融合酶蛋白在 pH9.0 时保存最稳定, 在 pH8.5~9.5 范围内 37 $^{\circ}$ C 保温 2h 后, 酶活力仍能保持原来的 80% 左右。

2.2.2 温度对酶活力及其稳定性的影响 : 37 $^{\circ}$ C 条件下酶促反应较快, 25 $^{\circ}$ C 时的反应速度只有 37 $^{\circ}$ C 时的 52% ($Q_{10}(25^{\circ}C \sim 35^{\circ}C)$ 为 1.7)。在 2h 试验中, 该融合酶蛋白在 37 $^{\circ}$ C 以下较稳定, 但在更高的温度下变得不稳定 : 40 $^{\circ}$ C 保温 30min, 酶活性即下降约 50%, 70 $^{\circ}$ C 30min 内酶活性已全部丧失。

2.2.3 动力学常数 K_m 的测定 :25℃、pH10.5 以 NAD^+ 为辅因子的条件下 ,不同底物存在时 ,融合酶蛋白的 K_m 值不同(表 1) 。 25℃、pH10.5 以雄酮为底物 , NAD^+ 为辅因子时 ,融合酶蛋白的 K_m 值为 $144.4\mu\text{mol/L}$,而以 Thio- NAD^+ 为辅因子时的 K_m 值为 $125.4\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 不同底物存在下融合酶蛋白的米氏常数 K_m

Table 1 Kinetic constants for fusion 3α -HSD with various substrates

Substrates	$K_m(\mu\text{mol/L})$		
	Fusion protein	Natural enzyme ^[5]	Recombinant enzyme ^[6]
Androsterone	37.1	24.4	31.1
Cholic acid	17.4	30.1	18.4
Deoxycholic acid	4.2	4.2	
Lithocholic acid	51.1		
Cholic acid methyl ester	20.7		
Taurodeoxycholic acid	5.2		
Glycocholic acid	7.3		
Taurocholic acid	19.1		
Chenodeoxycholic acid	14.1		
Glycochenodeoxycholic acid	26.7		
Taurochenodeoxycholic acid	22.3		

2.2.4 金属离子和螯合剂对酶活性的影响 :除 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 抑制酶活性外 ,其余金属离子基本不影响酶的活性 ,反应体系中加入 EDTA 也并不影响酶的活性。所以 ,融合酶蛋白发挥催化作用并不需要金属离子的参与。

2.2.5 质谱结果 :凝血酶切除融合蛋白 N 末端的 His-tag 序列后 ,经 Bruker ESQUIRE-LC/MS 液相色谱-质谱联用仪鉴定 ,重组蛋白确为 3α -HSD ,分子量为 26.5kD ,与理论推算值基本一致。

3 讨论

胆汁酸是胆固醇在肝内分解以及在肠肝循环中的一组代谢产物 ,分为初级胆汁酸和次级胆汁酸 ,是一类 24 碳胆烷酸的总称 ,其共同结构特点是 3α 位上都有一个羟基。当肝功能损伤或肠肝循环发生障碍时 ,血中 TBA 浓度升高。血清 TBA 检测是敏感的肝功能指标之一 ,已成为肝功能试验的常规项目。但胆汁酸在正常血清中的浓度很低($\mu\text{mol/L}$ 水平) ,不易检测 ,这就要求检测方法的灵敏度要高。自从 70 年代由睾酮丛毛单胞菌中提取到高纯度 3α -HSD

后 ,TBA 酶法测定逐步发展起来。目前 TBA 检测多用第四代的酶循环法^[7](图 2) ,通过脱氢酶—辅酶体系循环底物 ,将微量的胆汁酸放大 ,提高了反应的灵敏度。我国自上世纪 80 年代末开始应用酶循环法测定血清 TBA 浓度 ,这十几年来所用试剂均从国外进口 ,价格昂贵。因此 ,试剂的国产化长期以来备受关注。要解决试剂的国产化 ,关键是解决工具酶的问题。目前胆汁酸测定中所用的工具酶 3α -HSD 均是从睾酮丛毛单胞菌中直接提纯得到 ,酶蛋白的得率低 ,价格昂贵 ,限制了 TBA 测定的临床推广。分子生物学技术的进步 ,极大地推动了蛋白质生物合成的发展。Mobus 等^[8,9]已在大肠杆菌中成功表达了融合 3α -HSD ,但未对其性质作深入研究 ,也没有将融合酶蛋白作为工具酶 ,应用到临床实践中。

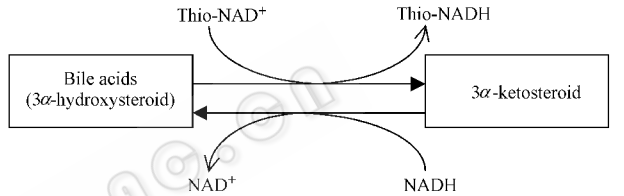


图 2 第四代 TBA 酶学测定方法——酶循环法测定原理
Fig.2 The principle of the TBA enzymatic cycling method

本研究以 pET15b 质粒为载体 ,成功构建了 3α -HSD 的原核表达系统 ,经 IPTG 诱导后 ,得到了具有酶活性的融合蛋白。pET15b 作为载体所表达的重组蛋白在其 N 端有一 6 个 His 组成的“标签”His-tag ,对 Ni^{2+} 有较高的亲和力。因此 ,可用 Ni^{2+} -Sephrose 柱对融合蛋白进行固定化金属螯合亲和层析纯化。另外 ,融合蛋白 N 端 His-tag 后是一凝血酶切割位点 ,可用凝血酶将 N 末端的 His-tag 等序列切除 ,得到与天然酶蛋白序列相同的重组蛋白。虽然带有 N 端的 His-tag 和凝血酶切割位点 ,融合蛋白仍表现出天然酶蛋白的活性 ,可催化雄酮等底物(3α -羟类固醇)脱氢。与天然酶蛋白相同^[11] ,以雄酮为底物 , NAD^+ 和 Thio- NAD^+ 分别为辅因子时 ,融合酶蛋白参与酶促反应的最适 pH 分别为 10.5 和 9.4 ,温度系数 $Q_{10}(25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C})$ 为 1.7。米氏常数 K_m 是酶的特征性常数 ,但在不同条件下 ,酶的 K_m 值不同。从表 1 可看出 ,由于测定条件中 pH 的不同 ,该融合酶蛋白与天然酶^[5]的米氏常数 K_m 值有所不同 ,但相差不大 ,与 Maser 等^[6]在大肠杆菌中表达得到的重组酶的 K_m 值基本相同。温度和 pH 是影响酶的稳定性的重要因素之一 ,该融合酶蛋白在 pH9.0 时保存最稳定 ,在 37°C 以下较稳定 , 40°C 以上酶活性则很快丧失。此外 ,融合酶蛋白发挥催化作用并不需要金属离子的参与 ,而有些金属离子如 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 则抑制酶

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的活性。因此,在酶活性测定和酶的保存以及将融合酶蛋白作为工具酶测定血清 TBA 时,均可加入 EDTA,螯合重金属离子,防止金属离子对酶活性的抑制。另外,在酶的保存和冷冻干燥过程中,缓冲液的 pH 应选择 9.0,还要加入海藻糖等稳定剂和保护剂^[10],保护融合酶蛋白的活性。

胆汁酸是 3 α -HSD 的作用底物之一,可将表达的融合酶蛋白作为工具酶,进一步建立敏感的血清 TBA 酶促动力学测定法,将具有很高的临床应用价值和经济价值。

参 考 文 献

- [1] Boyer J, Baron D N, Talaly P. Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemistry*, 1965, **4**(9): 1825 - 1833.
- [2] Skalhegg B A. On the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* Purification and Properties. *Eur J Biochem*, 1974 **46**(1): 117 - 125.
- [3] 张国华,徐国宾,刘英民,等. 睾酮假单胞菌 3 α -羟类固醇脱氢酶基因的质粒载体构建及表达. *生物化学与生物物理进展*, 2002 **29**(6): 966 - 969.
- [4] 焦莉莉,徐国宾,朱立华. 改良双缩脲比色法自动测定尿和脑脊液中总蛋白. *北京医科大学学报*, 2000, **32**(6S): 142 - 143.
- [5] Oppermann U C, Maser E. Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur J Biochem*, 1996 **241**(3): 744 - 749.
- [6] Maser E, Morbus E, Xiong G. Functional expression, purification, and characterization of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000 **272**(2): 622 - 628.
- [7] 许叶,杨昌国. 酶循环法测定血清总胆汁酸. *临床检验杂志* 2002 **20**(1): 11 - 12.
- [8] Suzuki K, Ueda S, Sugiyama M, et al. Cloning and expression of a *Pseudomonas* 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene*, 1993, **130**(1): 137 - 140.
- [9] Mobus E, Maser E. Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase: carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*, a novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem*, 1998 **273**(47): 30888 - 30896.
- [10] 任媛媛,刘景芳,戴秀玉,等. 海藻糖代谢途径相关基因及生物工程. *微生物学报* 2003 **40**(6): 821 - 825.

Overexpression, Purification and Characterization of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase in *Escherichia coli*

ZHANG Guo-Hua¹ CONG Ai-Ri² XU Guo-Bing^{1*} XIA Tie-An¹

(¹ Department of Clinical Laboratory Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

(² Shandong Weihai Wendeng Central Hospital, Weihai 264400, China)

Abstract: To clone and overexpress the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) in *E. coli* and to study its characterization, the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *Comamonas testosteroni* which was isolated from pond mud. The 3 α -HSD prokaryotic expression system was constructed with plasmid pET15b as the vector. The fusion protein with enzyme activity was overexpressed in the host bacteria of *E. coli* BL21(DE3) pLysS after IPTG induction. The fusion protein with an N-terminal His-tag sequence was purified in one step using metal chelate affinity chromatography to homogeneity on a Ni²⁺-Sephrose column. The overall yield of the fusion protein was 64% and the relative activity was 194.7U/mg. After thrombin cleavage of the His-tag, the molecular weight of the recombinant protein was 26.5kD according to the mass spectrum, which was identical to that predicted from the genomic sequence. With androsterone as the substrate and NAD⁺ and thio-NAD⁺ as the cofactor, the optimum pH for the enzymatic reaction at 25 $^{\circ}$ C was 10.5 and 9.4 respectively. The rate of the enzymatic reaction was more quickly at 37 $^{\circ}$ C than at 25 $^{\circ}$ C and $Q_{10}(25^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C})$ was 1.7. The fusion 3 α -HSD could efficiently catalyze 3 α -hydroxyl dehydrogenation of androsterone and bile acids series with K_m values in the range of 4.2 ~ 51.1 μ mol/L. The enzyme activity didn't need the participation of metal ions, but was inhibited by Fe³⁺, Fe²⁺ and Zn²⁺. And EDTA did not affect its activity. The obtainment of fusion 3 α -HSD with high purity and activity and the investigation on its characterization laid a necessary foundation for the construction of an enzymatic cycling method to determine the human serum total bile acids.

Key words: *Comamonas testosteroni* 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase Gene expression, Enzyme properties, Bile acids

* Corresponding author. Tel: 86-10-66551122Exe2042; E-mail: bdyjyk@sina.com

Received date 09-24-2003