

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01251

· 短篇论著 ·

# 烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶的表达、纯化及活性测定

## Expression, purification, and enzymatic activity assay of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase

吕小群, 张佶瑜, 徐学文, 管云枫, 缪朝玉\*

第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 获得具有较高纯度和酶活性的烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶-1(Nmnat1),为进一步对其功能及调控的研究奠定基础。**方法** 在大肠杆菌中进行 Nmnat1 表达的条件优化,采用 Ni-NTA 亲和层析法对目的蛋白进行纯化,并通过酶联荧光法测定酶活性。**结果** BL21-CondonPlus (DE3)-RIL 为适宜的宿主菌,优化的蛋白表达条件为:在 2×YT 培养基(37 μg/ml 氯霉素和 75 μg/ml 卡那霉素)中于 28℃、0.5 mmol/L IPTG(isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)诱导 8 h。纯化获得的 Nmnat1 蛋白具有较高的纯度和酶活性。**结论** 适宜的宿主菌对 Nmnat1 蛋白的高效表达至关重要,进行表达条件优化后可获得大量具有较高纯度和酶活性的目的蛋白。

**[关键词]** 烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶;表达;纯化;酶活性

**[中图分类号]** R 977.3

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1251-04

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)是生命体内 200 多种还原反应的辅酶<sup>[1]</sup>,同时还是 3 类 NAD 消耗酶的底物,在各种细胞生理过程中起着至关重要的作用,NAD 的生物能量状态甚至决定了细胞的生死存亡。NAD 的代谢在健康和疾病状态中起到重要作用,已经引起了人们越来越多的关注,因而参与 NAD 生物合成和代谢的酶也成为各种疾病的药物发现中极具吸引力的靶标。Nmnat(nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase, 烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶)是 NAD 的合成酶。在 NAD 从头合成途径中,Nmnat 催化 NaMN(nicotinic acid mononucleotide)生成 NaAD(nicotinate adenine dinucleotide),NAD 合成酶(NAD synthetase)进一步合成为 NAD;在补救途径中,Nmnat 直接催化 NMN(nicotinamide mononucleotide)生成 NAD<sup>[2]</sup>。尽管不同种属来源的 Nmnat 氨基酸序列同源性有限,但蛋白质结构高度保守。在哺乳动物中,Nmnat 存在 3 种不同的亚型,分别为 Nmnat1、Nmnat2、Nmnat3,其分布具有组织细胞特异性<sup>[3]</sup>。Nmnat1 主要在细胞核内,在组织中分布广泛,存在于除脾以外的所有组织中<sup>[4]</sup>。

在哺乳动物中,Nampt(nicotinamide phosphoribosyltransferase)和 Nmnat1 构成了细胞核内 NAD 的补救途径,该途径能调节 NAD 依赖的酶活性<sup>[5]</sup>,如参与基因表达调控的去乙酰化酶 Sirtuins,参与 DNA 修复和蛋白修饰的

PARP-1(poly-ADP-ribose polymerase 1)。Nmnat1 可与 PARP-1 结合并刺激其 DNA 修复活性<sup>[6]</sup>,这种调节作用依赖于 Nmnat1 的磷酸化状态,被激酶 C 磷酸化后则不利于与 PARP-1 结合。Nmnat 也参与钙动员剂 NAADP(nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate)的合成<sup>[4, 7]</sup>。Nmnat 是肿瘤化学治疗的潜在靶标,在肿瘤细胞中活性较低<sup>[8-9]</sup>。Nmnat 能催化抗肿瘤药噻唑吩林(tiazofurin)转化为其活性形式 3,4,5-三羟基苯甲酸(TAD)。抗肿瘤药 6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)在体内转化为 ATP 类似物,从而竞争性抑制 Nmnat 合成 NAD,使细胞内 NAD 衰竭,最终导致癌细胞死亡。此外 Nmnat1 能对抗由神经系统的损伤、环境刺激(紫杉醇、氧化应激和缺血等)以及基因突变引起的神经退行性变<sup>[10-14]</sup>。

鉴于 Nmnat 蛋白的重要生理学功能,本研究在大肠杆菌体系中详细优化了小鼠 Nmnat1 重组蛋白的诱导表达条件,并经 Ni-NTA 亲和层析纯化,得到了具有较高纯度和酶活性的 Nmnat1 蛋白,为进一步研究其功能及调控奠定了基础。

### 1 材料和方法

1.1 材料 BL21(DE3) pLysS 细胞、质粒提取试剂盒、蛋白标志物、考马斯亮蓝染液购自 Tiangen; Rosetta (DE3)

**[收稿日期]** 2010-04-20 **[接受日期]** 2010-08-24

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划课题(“973 计划”,2009CB521902),国家“重大新药创制”科技专项(2009ZX09303-002),上海市优秀学科带头人计划(10XD1405300),上海市血管生物学重点实验室开放课题基金(GXY2009001001)。Supported by Grant from the National Program for Key Basic Research (Projects “973” Plan, 2009CB521902), the National Science and Technology Project for “Development of Major New Drugs” (2009ZX09303-002), the Program for Excellent Leading Scientists of Shanghai (10XD1405300), and the Foundation for Shanghai Key Laboratory of Vascular Biology (GXY2009001001).

**[作者简介]** 吕小群,硕士生。E-mail: lvxiaqun1985@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871271, E-mail: cymiao@smmu.edu.cn

pLysS, BL21-CondonPlus-RIL(DE3) 分别为 Novagen、Stratagene 公司产品; Nmnat 的 pET28a+ 重组原核表达质粒由 Washington University 的 Shin-ichiro Imai 教授惠赠; 高效感受态细胞制备试剂盒购自上海捷瑞; ADH(乙醇脱氢酶) 购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶、酵母提取物为 Oxide 公司生产。

**1.2 蛋白表达及条件优化** 将测序验证的重组质粒 (Nmnat-pET28a+) 转化到感受态细胞中, 并涂布于 LB(100 μg/ml) 卡那霉素琼脂糖平板, 37℃ 孵育过夜。将阳性克隆接种于含卡那霉素(75 μg/ml) 和氯霉素(37 μg/ml) 的 2×YT 或 TB 培养液中, 37℃、200 转/min 振荡培养过夜后, 按 1:20 比例稀释到含相同抗生素的培养液中, 培养至  $D_{600}$  为 0.6 时, 加入 IPTG 到特定终浓度, 在 28℃ 或 37℃ 诱导特定时间, 取 1 ml 菌液, 13 400×g、1 min 离心收集菌体。菌体重悬于 200 μl 1×上样缓冲液, 于 95℃ 加热 10 min 变性, 13 400×g 离心取上清液进行电泳检测。

**1.3 SDS-PAGE 分析** 制备 5% 浓缩胶和 10% 分离胶, 将蛋白样品上样到加样孔, 80~100 V 电泳约 2 h, 凝胶用考马斯亮蓝染色液根据试剂盒提供的步骤进行染色。

**1.4 蛋白质印迹法分析** 样品经过 SDS-PAGE 后, 电转移 (100 V, 1 h, 冰水浴) 至硝酸纤维素膜上, 7% 脱脂奶粉封闭非特异性免疫反应结合位点, 兔来源的多克隆 Anti-His 和 β-actin 一抗混合液室温孵育 2 h, 荧光标记羊抗兔 IgG 二抗溶液孵育 1 h 后, 用 Odyssey 近红外激光扫描系统进行扫描。

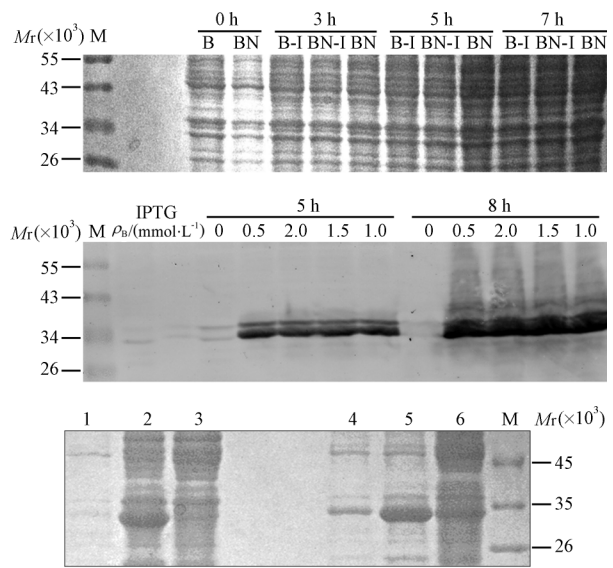
**1.5 蛋白纯化** 在 500 ml 2×YT 培养基中进行目的蛋白的诱导表达, 收集菌体重悬在裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 中, 200 W 超声裂解细胞, 超声 1 s 间隙 9 s, 共超声 30 min。将裂解液于 15 000×g、4℃ 离心 50 min 取上清液。依次用灭菌水、裂解缓冲液平衡 Ni-NTA 柱后, 将细胞裂解的上清液与 Ni 柱在冰上振荡孵育 1 h, 再依次用结合缓冲液 (5 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5)、冲洗缓冲液 (40 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5) 洗去杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液 (200 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH=7.5) 洗脱目的蛋白, 分管收集流出液, 并进行 SDS-PAGE 检测。将洗脱液转移到透析袋中, 在 4℃ 冰箱中用灭菌水透析 4~5 次, 20% PEG20000 浓缩后, 用 Bradford 方法测定蛋白浓度。

**1.6 酶活性检测** Nmnat 酶活性检测的反应体系为: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.02% BSA, 12 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L ATP, 1.5% 乙醇, 45 μg/ml ADH, 60 ng/ml Nmnat, 100 μmol/L NMN 混匀后于 37℃ 反应 30 min, 用 0.155 mol/L EDTA 终止酶反应, 在激发波长 340 nm, 发射波长 460 nm 测定终产物 NADH 的荧光强度。

## 2 结果

**2.1 选择适宜 Nmnat1 蛋白表达的宿主菌** Nmnat1 的基因序列插入 pET28a+ 原核表达载体的 *EcoR* I 和 *Nde* I 单克隆酶切位点之间, 表达所得的重组蛋白 N 端加上了 6×

His 的标签。我们首先将该重组质粒转化到 BL21 (DE3) pLysS 的化学感受态细胞中, 1.5 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白表达, 不同时间吸取菌液并离心收获菌体, 变性裂解后用 SDS-PAGE/考马斯亮蓝染色显示全菌蛋白条带。如图 1 的上图所示, IPTG 诱导至 7 h 仍无明显的目的条带出现。我们随后通过改变诱导蛋白表达的温度、IPTG 浓度、起始诱导时菌液  $D$  值等条件, 考马斯亮蓝染色仍不能检出目的蛋白的表达。然而较灵敏的蛋白质印迹法可检测到在相对分子质量约 35 000 处有目的蛋白表达 (图 1 中图), 提示 Nmnat-pET28a+ 载体虽然能够表达目的蛋白, 但在 BL21 (DE3) pLysS 中表达量非常低。



**图 1 鉴定重组蛋白 Nmnat1 在不同宿主菌中的表达**

上图: SDS-PAGE 法分析重组蛋白 Nmnat1 在宿主菌 BL21 (DE3) pLysS 中的表达。B: BL21 (DE3) pLysS 未加 IPTG 诱导; BN: Nmnat/BL21 (DE3) pLysS 未加 IPTG 诱导; B-I: BL21 (DE3) pLysS 经 IPTG 诱导; BN-I: Nmnat/BL21 (DE3) pLysS 经 IPTG 诱导。中图: 蛋白质印迹法分析 Nmnat1 在宿主菌 BL21 (DE3) pLysS 中用不同浓度 IPTG 诱导 5 h 和 8 h 后的表达情况。下图: SDS-PAGE 法分析 Nmnat1 在宿主菌 Rosetta (DE3) pLysS 和 BL21-CondonPlus RIL 中的表达情况。Nmnat/Rosetta (DE3) pLysS, 1: 诱导前; 2: 1.5 mmol/L IPTG 诱导 12 h; 3: 不加 IPTG 培养 12 h; Nmnat/BL21-CondonPlus RIL, 4: 诱导前; 5: 1.5 mmol/L IPTG 诱导 12 h; 6: 不加 IPTG 培养 12 h。M: 标志物

进行稀有密码子分析表明, Nmnat1 基因含有 20 个稀有密码子 (表 1), 且存在连续稀有密码子的排列, 可能降低了在原核 *E. coli* 中的表达能力。这提示我们, 选择经过稀有密码子优化的菌株可能改善 Nmnat1 的表达。由 Novagen 公司提供的 Rosetta (DE3) pLysS 菌株对 AUA、AGG、AGA、CUA、CCC 及 GGA 6 个稀有密码子进行了优化, Stratagene 公司提供的 BL21-condonplus (DE3) RIL 进行了 AGA、AGG、AUA 及 CUA 4 个稀有密码子的优化。我们将 Nmnat-PET28a+ 分别转化到这 2 种菌株的感受态细胞中, 1.5 mmol/L IPTG 于 28℃ 诱导 12 h, 考马斯亮蓝染色检测到 Nmnat1 在这 2 个菌株中均大量表达, 在 Rosetta 中的表

达量约占总蛋白量的 20%，在 BL21-condonplus 中的表达量约占总蛋白的 34% (图 1 下图)，因此我们在后者的宿主菌中

进一步优化了诱导表达条件。

表 1 Nmnat1 基因中稀有密码子的分析

稀有密码子	CCC(P)	AGG(R)	GGA(G)	CGA(R)	AGA(R)	CGG(R)
频率	5	7	1	1	2	4

2.2 Nmnat 蛋白诱导表达条件的优化 我们在 BL21-condonplus (DE3) RIL 中考察了蛋白诱导表达适宜的温度、时间、IPTG 浓度和培养基。当菌液培养至  $D_{600}$  达到 0.6 左右时加入 1.5 mmol/L IPTG，分别在 28℃ 和 37℃ 诱导蛋白表达，从图 2A、2B 可以看到，在 0~8 h 内随着诱导时间的延长蛋白表达量逐渐达到最大值，8 h 后诱导时间延长对蛋白表达没有提高。比较这 2 个温度下 8 h 时蛋白的表达量可发现，较低温度 28℃ 更适合，其表达量是 37℃ 的 1.3 倍。接下来，分别加入终浓度为 0.3、0.5、0.8、1.0、1.5 mmol/L 的 IPTG，在 28℃ 诱导表达 8 h，由图 2C 可以看到，0.3 mmol/L IPTG 即能诱导目的蛋白大量表达，继续增加 IPTG 浓度不明显改善目的蛋白的表达。最后我们进行了培养基的优化，TB 和 2×YT 是 2 种营养较丰富的培养基，分别在这 2 种培养基中用前述的最佳条件诱导目的蛋白表达，我们发现，2×YT 培养基更适于该蛋白的表达，其表达量为 TB 培养基的 1.2 倍 (图 2D)。

收集菌体后按照 1 : 20 比例用同样的新鲜培养基重悬，37℃ 培养至  $D_{600}$  约为 0.6，在 0.5 mmol/L IPTG、28℃ 条件下诱导 8 h。

2.3 Nmnat 蛋白的纯化 我们利用 Ni-NTA 亲和和层析柱纯化了带有 6×His 标签的 Nmnat 重组蛋白。图 3 显示了亲和和纯化过程中粗酶液、穿流液以及各流出液的 SDS-PAGE 检测结果。从图中 3 可以看到，菌体裂解液与 Ni 柱孵育后，大部分目的蛋白结合在 Ni 柱上，穿流液中仅残留少量 Nmnat。依次经过多轮结合缓冲液和冲洗缓冲液冲洗 Ni 柱去除杂蛋白，在洗涤过程中有极少量目的蛋白流出。最后用含有 200 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱可得到大量具有较高纯度的目的蛋白，2 次洗脱便可以收获绝大部分目的蛋白。

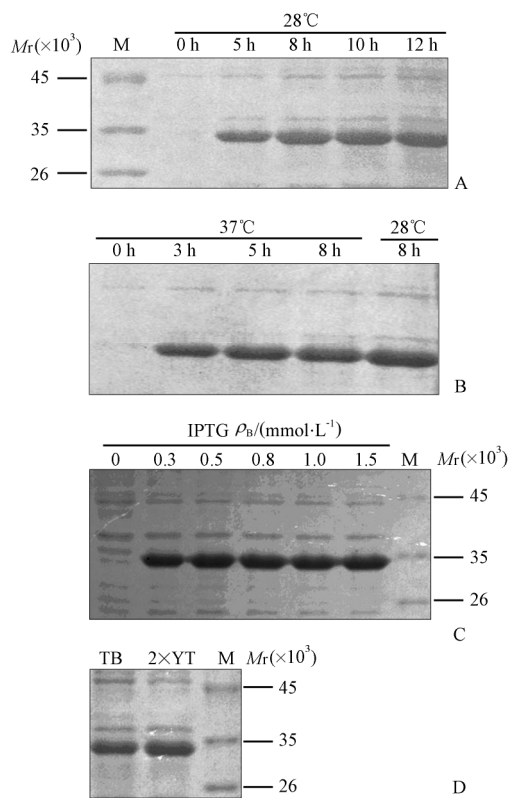


图 2 Nmnat 蛋白诱导表达条件的优化

综上所述，我们选用的蛋白表达条件为：2×YT 培养基 (37 μg/ml 氯霉素和 75 μg/ml 卡那霉素) 中 37℃ 振荡过夜，

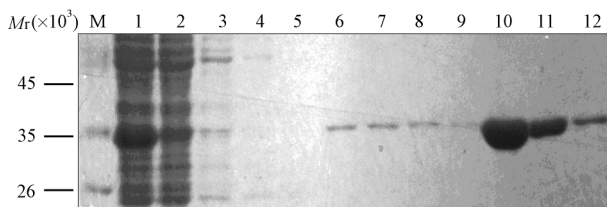


图 3 Ni-NTA 亲和和层析法纯化重组蛋白 Nmnat

1: 菌体裂解液; 2: 穿流液; 3-5: 结合缓冲液的洗脱液; 6-9: 冲洗缓冲液的洗脱液; 10-12: 洗脱缓冲液的洗脱液; M: 标志物

2.4 Nmnat 活性测定 我们利用酶联荧光法检测 Nmnat 酶的活性<sup>[15]</sup>，检测原理如图 4 所示：NMN 在 ATP 的存在下，由 Nmnat 催化生成 NAD，NAD 可被乙醇脱氢酶 (ADH) 转化为 NADH。NAD 本身没有荧光，而其还原形式 NADH 具有荧光，最大激发波长 340 nm、最大发射波长 460 nm。我们的实验亦证明，ADH 将 NAD 转化为 NADH 的反应中，在 0~125 μmol/L 范围内 NAD 的浓度与 NADH 的荧光信号呈线性，由图 5 可得其标准曲线为  $y = 3.085x + 19.704$  ( $R^2 = 0.9935$ )。表明 NADH 的荧光信号可定量指示溶液中 Nmnat 酶产物 NAD 的浓度，从而检测重组蛋白 Nmnat 的酶活性。

在 Nmnat 酶浓度为 0.5 μg/ml 的条件下，检测不同浓度的底物 NMN 经酶反应后的荧光信号。通过 Lineweaver-Burk 作图法 (双倒数作图法) 测定米氏常数  $K_m$ ，由图 6 可得  $1/[v]$  与  $1/[s]$  之间的线性关系为  $y = 4.6825x + 0.3195$  ( $R^2 = 0.9899$ )，从而计算得  $K_m$  为 14.66 μmol/L，最大反应速率  $V_{max}$  为 6.26 μmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup>。

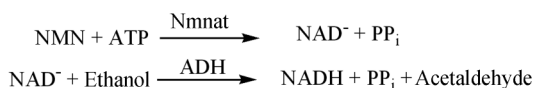


图 4 Nmnat 酶活性检测原理

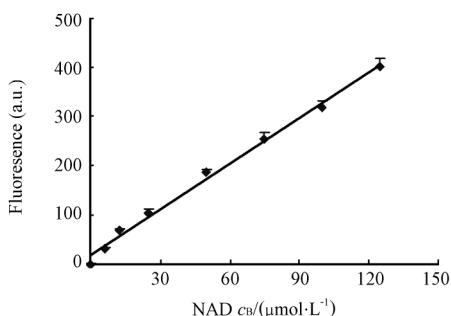


图5 NAD浓度与终产物NADH  
荧光信号的线性关系  
 $n=3, \bar{x} \pm s$

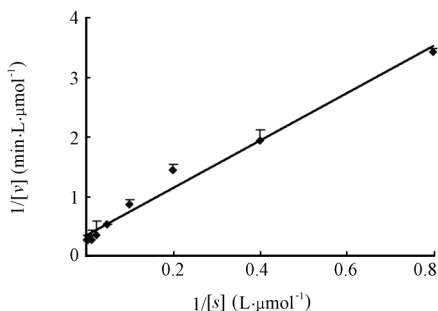


图6 米氏常数的测定  
 $n=3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

大肠杆菌遗传图谱明确,容易培养且费用低,对许多蛋白质有很强的耐受能力,能较高水平地表达蛋白质,是许多异源蛋白质的首选表达系统。在近20年中,人们已经在大肠杆菌中表达了数百种重组蛋白,但是大肠杆菌也并非万能的宿主。在64个遗传密码子中,有8个密码子极少在大肠杆菌被利用,这些不被经常利用的称为稀有密码子。连续出现的稀有密码子将抑制蛋白翻译时核糖体沿mRNA的移动,这也为真核基因在大肠杆菌中表达带来挑战。BL21-CondonPlus-RIL (DE3)宿主菌是经过改造的BL21衍生菌,通过一个相容性氯霉素抗性质粒补充大肠杆菌中稀有密码子的tRNA,增加大肠杆菌识别稀有密码子的能力,能有效克服蛋白翻译中稀有密码子的限制。在本研究中,该宿主菌显著增加了目的基因Nmnat1在大肠杆菌中的表达。我们的工作也表明,适宜的宿主对蛋白的表达具有至关重要的作用,否则即使通过优化表达的温度、时间、IPTG浓度等外界条件,都不能起到质的改变。

在适宜的宿主菌BL21-CondonPlus-RIL (DE3)中,我们摸索并确定了Nmnat重组蛋白表达的最优条件,包括诱导的温度、时间、IPTG浓度以及培养基,纯化获得具有较高纯度的目的蛋白,并利用酶联荧光法检测了Nmnat的酶活性。Nmnat的酶活性在肿瘤化学治疗、能量代谢和信号通路中起重要作用,然而目前很少有该酶的活性调控分子报道,报道的抑制剂有单宁酸、6-巯基嘌呤等<sup>[9,16]</sup>。本研究为筛选

Nmnat的活性调控分子奠定了初步基础。

### [参考文献]

- [1] Penberthy W T. Nicotinamide adenine dinucleotide biology and disease[J]. *Curr Pharmaceut Design*, 2009, 15: 1-2.
- [2] Luk T, Malam Z, Marshall J C. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83: 804-816.
- [3] Yahata N, Yuasa S, Araki T. Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase expression in mitochondrial matrix delays wallerian degeneration[J]. *J Neurosci*, 2009, 29: 6276-6284.
- [4] Zhai R G, Rizzi M, Garavaglia S. Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 2805-2818.
- [5] Zhang T, Berrocal J G, Frizzell K M, Gamble M J, DuMond M E, Krishnakumar R, et al. Enzymes in the NAD<sup>+</sup> salvage pathway regulate sirt1 activity at target gene promoters[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 20408-20417.
- [6] Berger F, Lau C, Ziegler M. Regulation of poly (ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear nad biosynthetic enzyme NMN adenylyltransferase 1 [J]. *PNAS*, 2007, 104: 3765-3770.
- [7] Schweiger M, Hennig K, Lerner F, Niere M, Hirsch-Kauffmann M, Specht T, et al. Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (nmnat), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis[J]. *FEBS Lett*, 2001, 492: 95-100.
- [8] Boulton S, Kyle S, Durkacz B W. Low nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity in a tiazoofurin-resistant cell line: Effects on nad metabolism and DNA repair[J]. *Br J Cancer*, 1997, 76: 845-851.
- [9] Magni G, Amici A, Emanuelli M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase[J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11: 873-885.
- [10] Press C, Milbrandt J. Nmnat delays axonal degeneration caused by mitochondrial and oxidative stress[J]. *J Neurosci*, 2008, 28: 4861-4871.
- [11] Sasaki Y, Vohra B, Lund F E, Milbrandt J. Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase-mediated axonal protection requires enzymatic activity but not increased levels of neuronal nicotinamide adenine dinucleotide[J]. *J Neurosci*, 2009, 29: 5525-5535.
- [12] Watanabe M, Tsukiyama T, Hatakeyama S. Protection of vincristine-induced neuropathy by wlds expression and the independence of the activity of nmnat1[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 411: 228-232.
- [13] Zhai R G, Cao Y, Hiesinger P R, Zhou Y, Mehta S Q, Schulze K L, et al. Drosophila nmnat maintains neural integrity independent of its nad synthesis activity[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4: 2336-2348.
- [14] Zhai R G, Zhang F, Hiesinger P R, Cao Y, Haueter C M, Bellen H J. NAD synthase nmnat acts as a chaperone to protect against neurodegeneration[J]. *Nature*, 2008, 452: 887-891.
- [15] Revollo J R, Grimm A A, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates sir2 activity in mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 50754-50763.
- [16] Berger F, Lau C, Dahlmann M, Ziegler M. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 36334-36341.