

腺苷酸环化酶在大肠杆菌中的表达及初步应用

宋捷, 郑穗平*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 腺苷酸环化酶 (Adenylate Cyclase, AC) 对酶法合成环单磷酸腺苷 (Cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) 至关重要, 它催化三磷酸腺苷 (Adenosine Triphosphate, ATP) 生成 cAMP 和焦磷酸 (PPi)。本研究将 *Thermomonospora echinospora* 来源的 AC (*TeAC*) 在大肠杆菌中进行异源表达, 经过亲和层析纯化蛋白后进行酶学性质的分析, 并进一步将其用于 cAMP 的催化合成。在 16 °C 下诱导重组大肠杆菌表达 *TeAC* 后, 利用 Ni 柱亲和层析纯化 *TeAC*, 经过 SDS-PAGE 分析表明目的蛋白条带为 40 ku, 与预期蛋白大小一致。重组 *TeAC* 酶的最适温度为 50 °C, 最适 pH 值为 10.5。经酶动力学分析, 测得该酶对底物 ATP 催化的动力学参数米氏常数 (K_m) = 115.1 mmol/L, 最大反应速度 (V_{max}) = 64.52 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 催化常数 (K_{cat}) = 8.13 s^{-1} 。用 *TeAC* 催化底物 ATP 反应 11 h 后 cAMP 产量可达 19.1 g/L。该研究成功表达了一种具有高效催化性能的 *TeAC*, 并将其应用于 cAMP 的催化合成时有较高的产量和生产效率, 为酶法合成 cAMP 的应用研究奠定了基础。

关键词: 腺苷酸环化酶; 环单磷酸腺苷; 大肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2024)03-65-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0350

Expression and Preliminary Application of Adenylate Cyclase in *Escherichia coli*

SONG Jie, ZHENG Suiping*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Adenylate cyclase (AC) is essential for the enzymatic synthesis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). In fact, AC catalyzes the synthesis of cAMP and pyrophosphates (PPi) by adenosine triphosphate (ATP). In this study, *Thermomonospora echinospora*-derived AC (*TeAC*) was heterologously expressed in *Escherichia coli*. Following purification of the protein via affinity chromatography, its enzymatic properties were analyzed. Thereafter, the protein was utilized for the catalytic synthesis of cAMP. After inducing the expression of recombinant *TeAC* in *E. coli* at 16 °C, *TeAC* was purified via affinity chromatography on a Ni column. Based on SDS-PAGE, the band of the protein of interest corresponded to 40 ku, which aligns with the expected protein size. The optimal temperature and pH of recombinant *TeAC* enzyme were 50 °C and 10.5, respectively. Enzyme kinetic analysis revealed K_m , V_{max} , and K_{cat} values of 115.1 mmol/L, 64.52 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, and 8.13 s^{-1} , respectively, for enzymatic catalysis using the ATP substrate. After 11 h of the reaction catalyzed by *TeAC*, the yield of cAMP was 19.1 g/L. Overall, *TeAC* with efficient catalytic performance was successfully expressed, and its application in the

引文格式:

宋捷, 郑穗平. 腺苷酸环化酶在大肠杆菌中的表达及初步应用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 65-73.

SONG Jie, ZHENG Suiping. Expression and preliminary application of adenylate cyclase in *Escherichia coli* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 65-73.

收稿日期: 2023-03-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFA0901700)

作者简介: 宋捷 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 酶学与酶工程, E-mail: jeralyns@126.com

通讯作者: 郑穗平 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, 生物化工, 微生物学, 生化与分子生物学, E-mail: spzheng@scut.edu.cn

catalytic synthesis of cAMP led to increased yield and production efficiency. This study lays the foundation for the enzymatic synthesis of cAMP.

Key words: adenylate cyclase; cyclic adenosine monophosphate; *Escherichia coli*

环单磷酸腺苷 (Cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) 是一类在细胞中接受生长因子、激素等第一信号分子信号并传递信号的“第二信使”分子, 在体内与 PKA 形成的 cAMP-PKA 信号通路与免疫反应、离子通道的运输、清除炎症、细胞生存、神经突生长等密切相关^[1-4]。近年来, cAMP 主要应用在临床治疗、畜牧业领域, 并在这两个领域表现出巨大的应用潜力。cAMP 已经通过临床试验并上市, 有注射用环磷腺苷葡甲胺和注射用二丁酰环磷腺苷钙两类制剂, 主要用于治疗心力衰竭、心肌炎、冠心病、心绞痛、心源性休克等心血管疾病^[5-8]。在临床治疗中, cAMP 药物有缓解糖尿病、急性白血病^[9], 治疗银屑病^[10]、肾病^[11]、肝病^[12]、慢性支气管炎^[13]的功效。在畜牧业中, cAMP 可以改善肉蛋品质, 减少脂肪含量、提高瘦肉含量, 属于非激素类、无残留的新型生长调节剂, 可以作为一类激素, 具有促进生长, 减少饲料消耗以及减少激素使用的作用^[14,15]。

目前 cAMP 的原料药的生产方法仍以化学合成法为主。化学法合成 cAMP 存在溶剂毒性大, 环境污染大等问题, 酶法合成 cAMP 反应温和, 是公认的无溶剂残留、绿色环保的方法, 能克服化学合成 cAMP 的缺点。腺苷酸环化酶 (Adenylate Cyclase, AC, EC 4.6.1.1) 属于裂解酶的一种。腺苷酸环化酶催化三磷酸腺苷 (ATP) 底物生成 cAMP 和焦磷酸 (ppi), 如图1所示。He 等^[16]首次将节杆菌 *Arthrobacter* sp. CGMCC No.3584 来源的腺苷酸环化酶进行克隆, 并在大肠杆菌中异源表达、纯化, 该酶是最早被报道用于酶法催化合成 cAMP 的 AC 之一。Ma 等^[17]在对酶催化反应的 pH 值、温度和金属离子及其浓度等条件的优化后, 用大肠杆菌 MG1655 来源的腺苷酸环化酶 N 端 446 个氨基酸 (EAC446) 进行酶催化反应, 得到 cAMP 产量为 18.45 g/L, 这是目前文献报道酶法合成的最高产量。酶法合成需面对游离酶不稳定性和重复利用率低等问题, 已有学者通过固定化节杆菌 *Arthrobacter* sp. CGMCC No.3584 来源的 AC 解决酶法合成中常出现的酶失活、难回收等问题, 以提升 AC 在工业化

应用的潜力^[18,19]。然而目前酶法合成 cAMP 的腺苷酸环化酶资源少, 挖掘并筛选出一种具有良好性质的腺苷酸环化酶成为酶法合成 cAMP 的关键。

本研究在大肠杆菌中表达了一种 *Thermomonospora echinospora* 来源的 AC (TeAC), 该酶是在前期通过从数据库挖掘并用分子对接评分筛选获得的具有良好催化性能的酶。本研究在大肠杆菌中表达了 TeAC, 并在分析该酶的酶学性质的基础上初步利用单酶法催化合成 cAMP, 旨在挖掘并筛选出性状良好的腺苷酸环化酶, 为酶法合成 cAMP 提供研究基础。

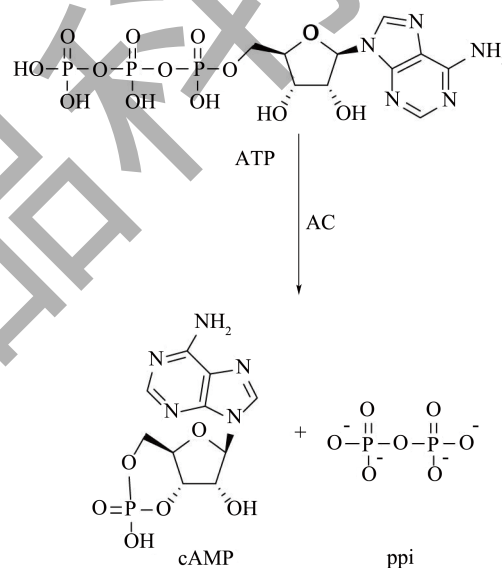


图1 AC 酶催化反应示意图

Fig.1 Schematic of adenylate cyclase catalytic reaction

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与引物

克隆宿主菌 *E. coli* Top10、表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)、pET-28a 载体由华南理工大学微生物酶学实验室保存。鉴定引物为 T7 和 T7T 通用引物。

1.1.2 主要试剂与培养基

DL5000 DNA Marker、Loading buffer, 购自广州东盛科技有限公司; 蛋白 Marker, 购自赛默飞公司; PCR Mix, 购自北京庄盟国际生物公司; 腺

苷-5'-三磷酸二钠盐(ATP·Na₂)、卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、环单磷酸腺苷标准品(cAMP),购自上海麦克林生化科技有限公司;Bradford蛋白定量试剂盒,购自上海捷瑞生物工程技术有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR产物回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒,购自广州美基(Magen)生物公司。乙腈为色谱纯,购自美国默克公司。其余试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备

ETC811基因扩增仪,苏州东胜兴业科学仪器有限公司;ZQZY-CF8V和ZQZY-88AH振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;5804R低温高速离心机,德国Eppendorf公司;AKTA Pure蛋白纯化色谱仪,美国通用电气医疗公司;MS-100恒温混匀仪,赛默飞公司;Waters 2689-2489液相色谱仪,美国Waters公司;HisTrap FF亲和层析预装柱和HiTrap Desalting凝胶层析柱,Cytiva公司。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a-TeAC重组质粒的构建与鉴定

将来源于*T. echinospora*的TeAC(Genbank:WP_103944093)进行密码子优化后合成的基因克隆至pET-28a载体中,目的基因上下游引入两个限制性核酸内切酶切位点分别为Nhe I和Not I,6×His-Tag标签加在基因N端,将获得的重组质粒命名为pET-28a-TeAC。以通用引物T7、T7T为上、下游引物对*E. coli* Top10转化子进行菌落PCR鉴定。

1.2.2 TeAC蛋白的表达、纯化及SDS-PAGE分析

将测序验证正确的质粒转化到*E. coli* BL21(DE3)菌株中以构建含有pET-28a-TeAC质粒的*E. coli* BL21(DE3)菌株。从构建的*E. coli* BL21(DE3)菌株(含有pET-28a-TeAC质粒)的平板上挑取单菌落,接种至10 mL LB培养基(含50 μg/mL卡那霉素)中,37 °C,200 r/min,培养14~16 h后,取菌液测OD₆₀₀。控制起始OD₆₀₀在0.1,计算对应菌液的添加量,将过夜培养的菌液转接至100 mL LB培养基中,37 °C,220 r/min,培养1.5 h,OD₆₀₀至0.6~0.8。此时,往发酵液中加入50 μL的IPTG(1 mol/L),即诱导的终浓度在500 μmol/L下,16 °C,180 r/min,诱导16~18 h。

用100 mL的离心管收集菌液,4 °C,7 800 r/min离心5 min后,用50 mL的Buffer A重悬菌体,用高压均质匀浆机进行破碎(破碎条件:700 bar,90 s)。

破碎完成后取2 mL的破碎液,分装两管,一管离心用以获取破碎上清和沉淀,另一管用以获取粗酶液,用于SDS-PAGE分析蛋白表达的结果。剩余的破碎液4 °C,10 000 r/min,离心40 min后,用0.22 μm无机滤膜将上清液过滤至新的100 mL离心管中,所有蛋白样品全程置于低温的环境下,冰上操作,且在低温离心机中离心。

将5 mL HisTrap FF亲和层析柱装在AKTA Pure蛋白纯化色谱仪后,先后用超纯水、Buffer B、Buffer A平衡系统后,将准备好的菌株破碎上清液过柱,收集穿过液用于SDS-PAGE分析。待Buffer A平衡系统后,设置Buffer B比例为6%(V/V)洗去杂蛋白,收集杂蛋白样品用于SDS-PAGE分析。待系统平衡后,设置Buffer B比例为100%(V/V)并收集纯蛋白(预实验中梯度洗脱已确定纯化条件),收集蛋白样品用于SDS-PAGE分析。最后将柱子保存于20%(V/V)乙醇中。用10 ku滤径的Millipore超滤管(15 mL内管)收集纯化后的蛋白,4 °C,4 000 r/min离心以浓缩蛋白。

将5 mL HiTrap Desalting凝胶层析柱装在AKTA Pure蛋白纯化色谱仪后,用储存Buffer(11.7 g/L NaCl,2.725 g/L Na₂HPO₄,0.575 g/L NaH₂PO₄)平衡系统后,往进样口处注射样品约3~4次(每次1 mL)。纯化蛋白样品经脱盐处理并将蛋白样品的浓度测定后,放置于-20 °C保存备用。柱子保存于20%(V/V)乙醇中。在热稳定测定中,用上述操作将储存缓冲液替换为氢氧化钠-甘氨酸缓冲液(pH值10,浓度与酶活反应体系保持一致)。

1.2.3 腺苷酸环化酶酶活的测定

酶活测定的反应体系和cAMP的检测方法参考专利^[20]。

腺苷酸环化酶的反应体系:0.36 mol/L氢氧化钠-甘氨酸缓冲液,36 g/L腺苷-5'-三磷酸二钠盐,27 g/L六水合氯化镁,10 μg酶。反应体积为1 mL,反应时间为10 min,加入100 μL的6 mmol/L盐酸终止反应。

一个腺苷酸环化酶酶活单位(U)定义:每分钟生成1 μmol/L cAMP所需要的酶量定义为一个酶活单位。

用HPLC高效液相色谱法检测产物cAMP的量。检测条件为:色谱柱Unitary C18(5 μm,100 Å,4.6 mm×250 mm),流动相为乙腈:100 mmol/L PBS缓冲液(pH值7.0)=7:93,进样量为10 μL,流

速为 1.0 mL/min, 检测波长设为 259 nm, 柱温为 30 ℃。流动相均需经过 0.22 μm 滤膜超滤后超声脱气 30 min 后使用。

配制 10 mmol/L cAMP 标准品, 用超纯水依次稀释至 0.125、0.25、0.5、1、2、4 mmol/L 后, 将标准品 cAMP 浓度与对应 HPLC 检测的峰面积之间的关系绘制成 cAMP 标准曲线如图 2 所示。

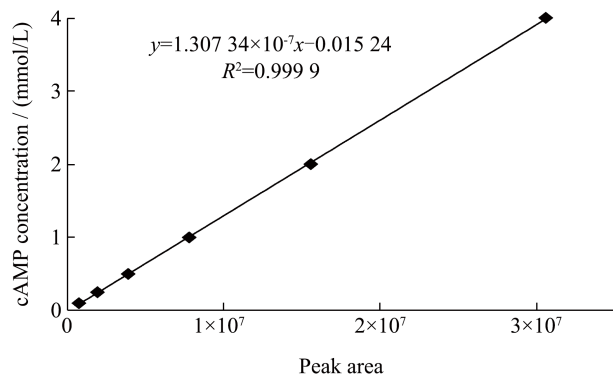


图 2 cAMP 标准曲线

Fig.2 cAMP Standard curve

1.2.4 腺苷酸环化酶最适温度和最适pH值的测定

为测定腺苷酸环化酶的最适催化温度, 将标准反应混匀液放在设定温度 (30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 ℃) 下预热 10 min 后, 分别加入 10 μg 的酶于反应液中, 反应 10 min 后测得 TeAC 在这些温度下的产物的量以测定酶活。用等量纯水代替酶液的反应体系作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行, 以最适温度下的酶活力为 100%, 计算其余温度下的相对酶活力 (%), 并绘制温度 - 酶相对活力曲线。

为测定腺苷酸环化酶的最适催化 pH 值, 将 65.3 mmol/L 的底物 ATP 分别用 pH 值为 6.0、7.0、8.0、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、12.0 的缓冲液溶解, 置于最适温度 50 ℃ 下, 反应 10 min 后测得 TeAC 在这些温度下的产物的量以测定酶活。用等量纯水代替酶液的反应体系作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行, 以 pH 值 10.0 条件下的酶活力为 100%, 计算其余 pH 值下的相对酶活力 (%), 并绘制 pH 值 - 酶相对活力曲线。

1.2.5 腺苷酸环化酶酶动力学参数的测定

在 50 ℃ 和 pH 值 10 条件下测定酶的动力学参数。按照方法 1.2.3, 设置若干个不同底物 ATP 浓度 (0.65~65.3 mmol/L) 的反应体系, 用等量纯水代替酶液的反应体系作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行,

根据底物浓度 [S] 的倒数和反应速度 V 的倒数的关系, 绘制双倒数曲线, 以计算酶动力学参数米氏常数 (K_m)、最大反应速度 (V_{max})、催化常数 (K_{cat})。

1.2.6 腺苷酸环化酶储存稳定性的测定

将保存在储存 Buffer 中的 TeAC 取出, 分别在 30、35、40、45、50 ℃ 下保存 15、30、60、90、120 min, 以及在 4 ℃ 下保存 25、45、85、125 min。为测定 TeAC 的储存稳定性, 将标准反应混匀液放在最适温度下预热 10 min 后, 分别加入 10 μg 的酶 (已在上述条件保温处理) 于反应液中, 在 50 ℃ 和 pH 值 10 条件下反应 10 min 后测定 TeAC 在上述温度下保温不同时间后的残余酶活。用等量纯水代替酶液的反应体系作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行, 以 0 min 的酶活力为 100%, 计算不同温度下保存一定时间的酶的相对活力 (%), 并绘制时间 - 酶相对活力曲线。

1.2.7 腺苷酸环化酶热稳定性的测定

将保存在氢氧化钠 - 甘氨酸缓冲液中的 TeAC 取出, 在 35 ℃ 下保存 15、30、60、90、120 min 后, 为测定 TeAC 的热稳定性, 将标准反应混匀液放在最适温度下预热 10 min 后, 分别加入 10 μg 的酶 (已在上述条件保温处理) 于反应液中, 在 50 ℃ 和 pH 值 10 条件下反应 10 min 后测定 TeAC 在 35 ℃ 下保温不同时间后的残余酶活。用等量纯水代替酶液的反应体系作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行, 以 0 min 的酶活力为 100%, 计算不同温度下保存一定时间的酶的相对活力 (%), 并绘制时间 - 酶相对活力曲线。

1.2.8 腺苷酸环化酶单酶催化生产cAMP

反应在 2 mL 离心管内进行。催化反应体系包括 0.36 mol/L 氢氧化钠 - 甘氨酸缓冲液, 36 g/L 的腺苷 -5'-三磷酸二钠盐, 27 g/L 六水合氯化镁, 10 μg 酶。将标准反应混匀液放在最适温度下预热 10 min 后, 每管反应体系中加入 10 μg 的酶, 35 ℃ 反应 1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12 h 后测定 cAMP 的产量。用等量纯水代替酶液的反应体系作为空白对照, 每个样品设置 3 个平行, 并绘制 cAMP 的产量 - 时间曲线。

1.2.9 数据分析

所有试验均设置 3 个平行, 用 Microsoft Excel 2019 软件计算三个平行反应的 cAMP 峰面积平均值和标准误差, 所有图表均用 GraphPad Prism 9.5.0 绘制。

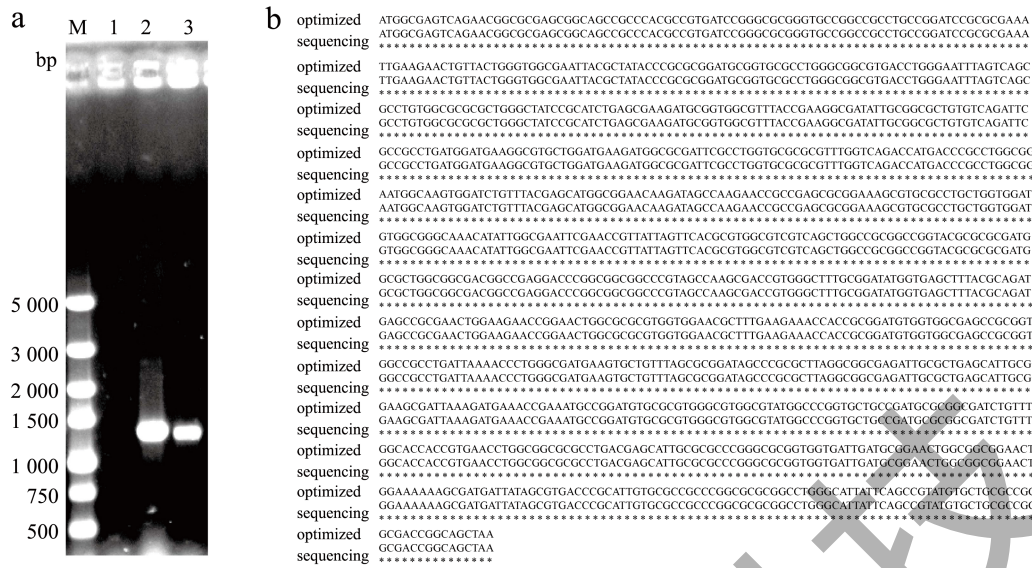


图3 Top10/pET-28a-TeAC 的菌落 PCR 鉴定图与测序结果对比图

Fig.3 Colony PCR identification and sequencing results comparison of Top10/pET-28a-TeAC

注: (a) 为 Top10/pET-28a-TeAC 菌落 PCR 鉴定图, (b) 为测序结果对比图。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒pET-28a-TeAC构建及鉴定

将密码子优化的 *TeAC* 基因克隆至 pET-28a 载体中, 然后转化至 *E. coli* Top10 菌株中, 通过随机挑取单菌落进行菌落 PCR 后, 琼脂糖凝胶电泳结果如图 3a 所示。如图 3a 所示, *TeAC* 克隆菌株菌落 PCR 的条带大小在 1 300 bp 左右, 与目的片段大小 (1 313 bp) 一致。提取重组质粒后, 将质粒送到北京擎科生物科技有限公司进行测序, 并将测序结果与优化后的基因序列进行比对, 如图 3b 所示。测序结果显示重组质粒 pET-28a-*TeAC* 构建成功。将重组质粒 pET-28a-*TeAC* 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态后, 涂布至卡那霉素抗性的 LB 固体培养基后过夜培养。菌落 PCR 鉴定成功后, 用 30% (V/V) 甘油保种并放置于 -80 °C 保存。

2.2 TeAC的SDS-PAGE分析和比酶活的测定

从 LB 平板上挑取鉴定正确的大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a-*TeAC*, 按照方法 1.2.2 将重组 AC 在大肠杆菌中用摇瓶发酵并诱导表达后收菌, 对菌体进行破碎处理并经过 Ni 柱亲和层析纯化后, 将蛋白样品收集并用于 SDS-PAGE 分析。在 EXPASY 网站的 protparam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 输入 *TeAC* 的氨基酸序列 (带有组氨酸标签), 预测蛋白分子量的大小为 40.3 ku。将收集的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4

所示。图 4 泳道 5 表明 *TeAC* 纯化后所得蛋白条带的分子量在 40 ku 附近有一条单一条带, 结果与预期的蛋白分子量大小一致。*T. echinospora* 来源的 *TeAC* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中为可溶表达, 并通过 Ni 柱亲和层析纯化出来。在 50 °C、pH 值 10.0 的条件下, 测定其比酶活为 69.9 U/mg。

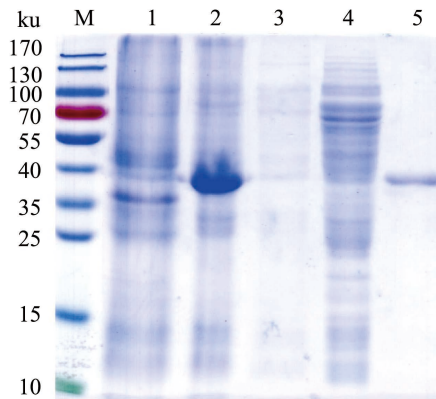


图4 SDS-PAGE 分析 TeAC 的表达和纯化

Fig.4 SDS-PAGE analysis of *TeAC* expression and purification

注: 泳道 1 为 BL21(DE3) 空菌全细胞破碎液; 泳道 2 为 BL21(DE3)/pET-28a-*TeAC* 菌体全细胞破碎液; 泳道 3 为 *TeAC* 亲和层析穿过液; 泳道 4 为 *TeAC* 杂蛋白; 泳道 5 为 *TeAC* 纯蛋白。

2.3 腺苷酸环化酶最适温度和最适pH值的测定

为确定 *TeAC* 酶的最适反应温度, 在 pH 值 10.0 条件下, 测其不同温度 (30、35、40、45、50、

55、60、65、70、75 ℃) 下的 *TeAC* 的酶活, 结果如图 5a 所示。在 pH 值 10.0 下, 测得 *TeAC* 的最适温度为 50 ℃。图 5a 表明 35~55 ℃ 下, *TeAC* 能保持 50% 以上相对酶活力; 反应温度在 60 ℃ 时, *TeAC* 相对酶活力保留 3.3%; 当反应温度上升至 65 ℃ 以上时, *TeAC* 失去酶活。

为确定 *TeAC* 酶的最适反应 pH 值, 在最适温

度 50 ℃ 下测其在不同 pH 值 (6.0、7.0、8.0、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、12.0) 下 *TeAC* 的酶活, 结果如图 5b 所示。在最适温度 50 ℃ 下, 测得 *TeAC* 的最适反应 pH 值为 10.5。*TeAC* 酶有嗜碱的性质, 该酶 pH 值范围较窄, 在 pH 值 10.0~12.0 之间有酶活, 在 pH 值 6.0~9.5 之间几乎检测不到酶活。

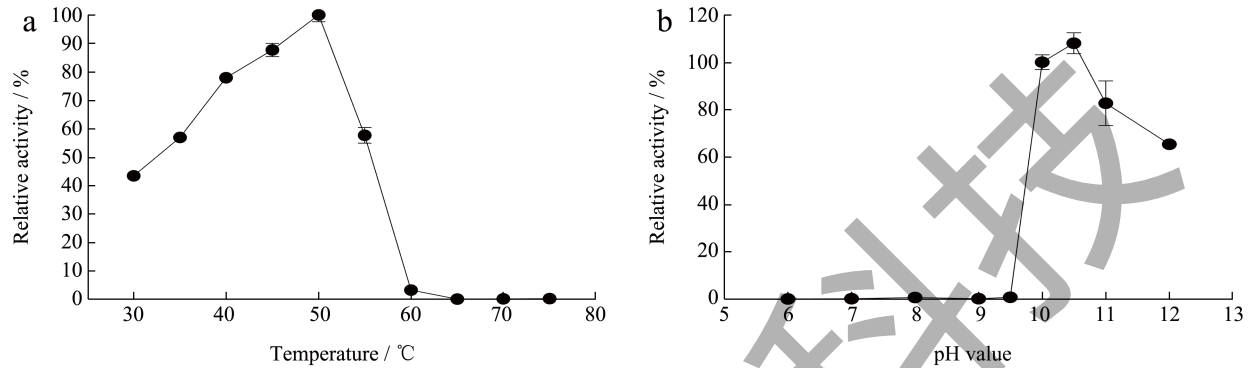


图 5 温度、pH 值对 *TeAC* 酶活性的影响

Fig.5 Effect of temperature and pH on activity of *TeAC*

表 1 AC动力学参数和比酶活比较

Table 1 Comparison of AC kinetic parameters and specific activity from different sources

Source	Substrate	$K_m/(mmol/L)$	$V_{max}/[\mu mol/(mg \cdot min)]$	$K_{cat}/(s^{-1})$	$K_{cat}/K_m/(Ms^{-1})$	Specific activity/(U/mg)	Reference
<i>Thermomonospora echinospora</i>	ATP	115.10	64.52	8.13	70.63	69.90	This work
<i>Arthrobacter</i> sp. CGMCC 3584	ATP	7.56	5.06	/	/	3.04	2012 ^[16]
<i>Yersinia pestis</i>	ATP	0.21±0.01	8.4±0.2	0.0057	2.7×10 ⁷	/	2011 ^[21]
<i>Bordetella pertussis</i>	ATP	0.60	/	4600	7.6×10 ⁶	/	2014 ^[22]
<i>Escherichia coli</i>	ATP	0.17	/	/	/	0.78	2008 ^[23]
<i>Rattus norvegicus</i>	ATP	0.6	/	/	/	67	2002 ^[24]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATP	0.05	/	/	/	0.48	2001 ^[25]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATP	1.6	/	/	/	/	1976 ^[26]
<i>Turneriella parva</i>	ATP	/	/	/	/	0.0533	2015 ^[27]

注: “/” 表示未测定或未公布。

表 2 *Thermomonospora echinospora* 来源的腺苷酸环化酶蛋白质序列信息

Table 2 Information of the Adenylate cyclase from *Thermomonospora echinospora*

名称	相似度/%	Genbank 编号	氨基酸数量	分子量/ku	等电点	来源
<i>TeAC</i>	36.68	WP_103944093	350	37.88	4.93	<i>Thermomonospora echinospora</i>

注: “相似度” 表示与 *Arthrobacter* sp. CGMCC 3584 来源的 AC 的相似度。

2.4 腺苷酸环化酶动力学参数的测定

按照方法 1.2.5, 在 50 °C、pH 值为 10.0 条件下, 通过测定一系列不同底物 ATP 浓度下酶的活性, 探究 *T. echinospora* 来源的 AC 对底物的亲和力和催化效率, 并与文献报道不同来源的 AC 进行比较。经双倒数曲线拟合后计算得, 以 ATP 为底物, *TeAC* 的 K_m 为 115.1 mmol/L, V_{max} 为 64.52 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, K_{cat} 为 8.13 s^{-1} , 双倒数曲线如图 6 所示。将不同来源的 AC 动力学参数和比酶活进行比较如表 1 所示。将 *T. echinospora* 来源的腺苷酸环化酶蛋白质序列信息整理列表, 如表 2 所示。*T. echinospora* 来源的 *TeAC* 的比酶活高于目前文献报道的酶活性, 提示该酶在 cAMP 的酶法催化合成中有潜力。而 *TeAC* 的 K_m 值远高于其他来源的 AC, 表示该酶与底物 ATP 的亲和力较弱。目前报道的 *Yersinia pestis* 和 *Bordetella pertussis* 来源的 AC 具有较低的 K_m 值, 且 K_{cat}/K_m 也远高于 *TeAC*, 表示上述两种来源的 AC 与底物 ATP 的亲和力强且催化效率高, 但 *Y. pestis* 和 *B. pertussis* 分别是鼠疫耶尔森氏杆菌和百日咳博德特氏菌, 是众所周知的致病菌, 对人体危害极大, 且目前针对这两种来源 AC 的研究多与其病理机制相关, 因此不适合用于 cAMP 的工业生产。

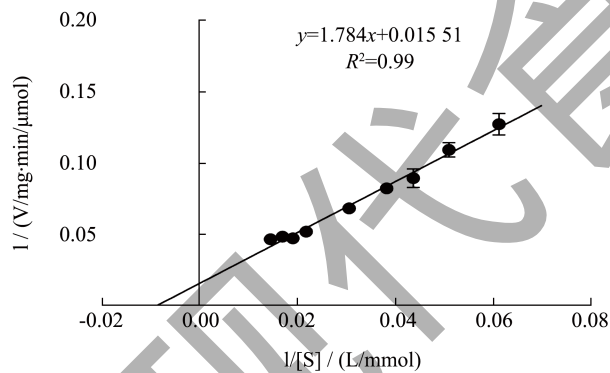


图 6 双倒数曲线法测定 *TeAC* 的动力学参数

Fig.6 Determination of kinetic parameters of *TeAC* by double reciprocal curve method

注: [S]: 底物 ATP 的浓度; V: 反应速率。

2.5 腺苷酸环化酶储存稳定性的测定

按照方法 1.2.6, 测定了放置在储存 Buffer 的 *TeAC* 在不同温度下保存一定时间后的酶活力, 以测定该酶的储存稳定性, 结果如图 7 所示。

图 7 表明, 虽然 50 °C 是 *TeAC* 的最适温度, *TeAC* 在 50 °C 下保温 15 min 后无残余酶活; 而 *TeAC* 在 45 °C 下保温 15 min 后残余酶活降至 2% 左

右; *TeAC* 在 40 °C 下保温 15 min 后残余酶活降至 7% 左右。因此尝试测定 *TeAC* 在 30、35 °C 下保温一定时间后的酶活力, 发现该酶在 35 °C 保温 15 min 后残余酶活保留近 20%; 30 °C 保温 15 min 后残余酶活保留约 50%, 保温 15 min 后残余酶活降低的幅度减少, 30 min 后残余酶活仍保留近 40%, 90 min 后残余酶活保持在约 20%, 120 min 后残余酶活保持在 10% 以上。*TeAC* 在 4 °C 下保存 2 h 内, 残余酶活保留约 80%~90%。

TeAC 在储存 Buffer 中 4 °C 低温保存 2 h 较稳定, 不适宜在 30 °C 以上的温度中放置。

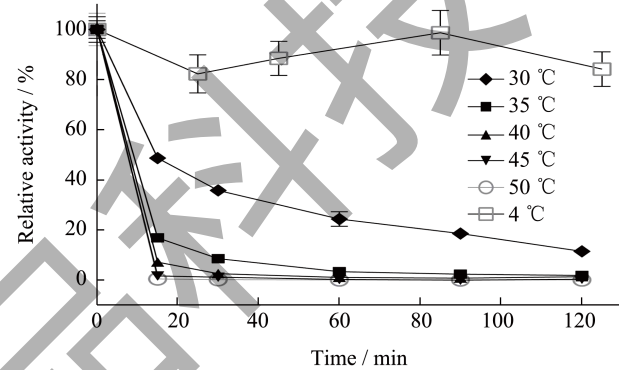


图 7 *TeAC* 的储存稳定性分析

Fig.7 Storage stability analysis of *TeAC*

2.6 腺苷酸环化酶热稳定性的测定

按照方法 1.2.7 测定了放置在氢氧化钠-甘氨酸缓冲液 (反应缓冲液, pH 值 10) 的 *TeAC* 的在不同温度下保存一定时间后的相对酶活力, 以测定该酶的热稳定性, 结果如图 8 所示。

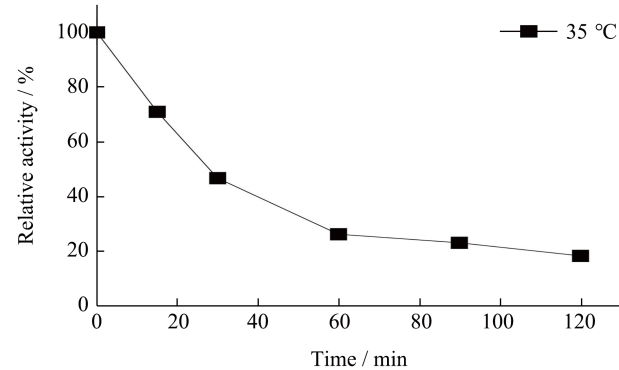


图 8 *TeAC* 的热稳定性分析

Fig.8 Thermal stability analysis of *TeAC*

在反应缓冲液中, *TeAC* 在 35 °C 下保温 30 min 残余酶活保留 46.8%, 保温 1 h 残余酶活保留 26.4%; 1 h 后酶活力降低幅度大幅减小, 1.5、2 h 残余酶活保留约 20%。

TeAC 催化性能良好, 但是热稳定性一般。为适应工业生产的需要, 仍需要进一步地改造来提升其热稳定性。

2.7 腺苷酸环化酶法催化合成 cAMP

在测定了 *TeAC* 的酶学性质及热稳定性后, 尝试将 *TeAC* 初步应用于酶法催化合成 cAMP。图 8 表明 *TeAC* 在 11 h 催化率合成 cAMP 的产量为 19.10 g/L, 前 2 h 内转化率增幅大, 在 2~11 h 增幅降低并趋于稳定。用该酶进行酶法催化合成 cAMP 的产量高于目前微生物发酵法合成的 cAMP 的最高产量 11.04 g/L, 并略高于目前文献报道的酶法合成的最高产量 18.45 g/L。虽然最高产量高于酶法合成的最高产量, 但当产量达最大值约 19.10 g/L 时, 生产效率为 1.74 g/(L·h), 不及酶法合成最高产量下的生产效率 3.08 g/(L·h)。生产效率低的原因与酶的热稳定性不良有关, 前 2 h 内的催化反应产量大幅增加, 而 2 h 后酶活降低从而导致产量增幅不如前 2 h。后续可以通过酶的热稳定性改造策略提升 cAMP 生产效率。

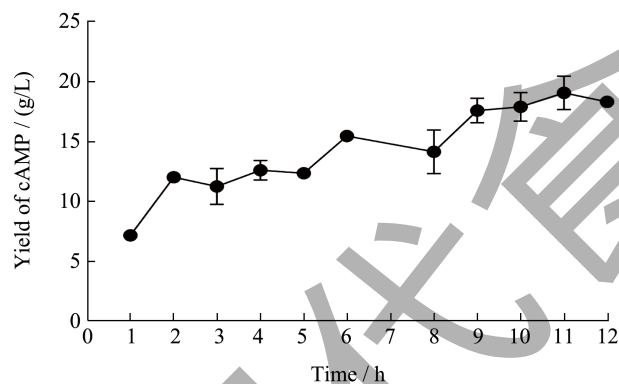


图 9 *TeAC* 催化生产 cAMP

Fig.9 *TeAC* catalyzes production of cAMP

3 结论

本研究成功构建了 pET-28a-*TeAC* 重组质粒, 并在大肠杆菌中表达了 *Thermomonospora echinospora* 来源的腺苷酸环化酶。通过最适温度和 pH 值测定, 确定 *TeAC* 的最适温度为 50 °C, 最适 pH 值为 10.5。在 50 °C、pH 值 10.0 条件下, 以 ATP 为底物, 测定 *TeAC* 对的酶动力学参数 K_m 为 115.1 mmol/L, V_{max} 为 64.52 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, K_{cat} 为 8.13 s^{-1} 。初步将 *TeAC* 应用于酶法催化合成 cAMP, 在催化反应进行到 11 h 时, 能达到最大产量 19.10 g/L, 用该酶进行酶法催化合成 cAMP 的产量高于目前微生物发

酵法合成的 cAMP 的最高产量 11.04 g/L, 并略高于酶法合成的最高产量 18.45 g/L。虽然 *TeAC* 酶法催化最高产量略高于文献报道的最高产量, 但生产效率为 1.74 g/(L·h), 不及酶法合成最高产量下的生产效率 3.08 g/(L·h)。本研究为酶法合成 cAMP 提供良好的研究基础。

本研究虽然成功表达了酶学性质良好的 *TeAC*, 但后续研究仍面临着许多挑战。本研究用到 *TeAC* 酶的热稳定性有待改进, 后续可以通过热稳定性改造的策略, 以系统地提升 *TeAC* 酶的热稳定性。与化学合成 cAMP 相比, 腺苷酸环化酶催化的底物 ATP 价格较为昂贵, 影响了酶法合成 cAMP 的经济效益, 后续可以开发新的酶合成 cAMP 的途径, 用多酶催化法合成 cAMP, 例如使用多聚磷酸盐激酶 (PPK, EC 2.7.4.1) 和腺苷酸环化酶可以催化底物二磷酸腺苷 (ADP) 合成 cAMP。此外, 后续还可以固定化腺苷酸环化酶以增加其稳定性和可重复利用次数, 以适应工业生产的需要, 但固定化仍需面临酶活损失等问题。

参考文献

- [1] FAJARDO A M, PIAZZA G A, TINSLEY H N. The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment [J]. *Cancers*, 2014, 6(1): 436-458.
- [2] BASSLER J, SCHULTZ J E, LUPAS A N. Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals [J]. *Cellular Signalling*, 2018, 46: 135-144.
- [3] KHANNPNAVAR B, MEHTA V, QI C, et al. Structure and function of adenylyl cyclases, key enzymes in cellular signaling [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 63: 34-41.
- [4] ZHANG H, KONG Q, WANG J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2020, 9(1): 32.
- [5] 王福军, 慈书平. 环磷腺苷葡胺治疗充血性心力衰竭的疗效观察[J]. *中国乡村医药*, 2005, 6: 16-17.
- [6] 吴梅. 环磷腺苷葡胺治疗心力衰竭的疗效观察[J]. *内蒙古中医药*, 2011, 30(13): 46.
- [7] 黄维刚. 环磷腺苷葡胺治疗老年慢性心力衰竭的疗效分析[J]. *现代诊断与治疗*, 2015, 4: 793-794.
- [8] 王朝阳. 注射用二丁酰环磷腺苷钙辅助治疗冠心病心力衰竭患者的临床疗效[J]. *河南医学研究*, 2021, 30(24): 4538-4540.
- [9] 卫姝岑. 应用复方环磷酸腺苷的肠内营养对急性白血病化疗患者的支持作用研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2017.
- [10] 李迎. 环磷腺苷治疗寻常性银屑病临床疗效观察[J]. *临床*

- 皮肤科杂志,2007,36(8):533-534.
- [11] 郭琿,罗静,张升校,等.环磷酸腺苷葡胺在延缓慢性肾功能衰竭与肾功能恶化速度中的应用CN108635366A[P]. 2018-10-12.
- [12] 詹雨林,李国航,杨志援.环磷酸腺苷联合果糖二磷酸钠治疗慢性淤胆型肝炎的疗效观察[J].青海医药杂志,2001, 31(6):10-11.
- [13] 李磊,叶燕青.环磷酸腺苷治疗毛细支气管炎74例疗效观察[J].长江大学学报(自然科学版)医学卷,2010,7(3):146-147.
- [14] 方伟.二丁酰环腺苷酸对肥育猪脂肪沉积调控的机理研究[D].广州:中山大学,2010.
- [15] 王丽.二丁酰环腺苷酸对肥育猪胴体品质和肉质的影响及机理研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2009.
- [16] HE Y, LI N, CHEN Y, et al. Cloning, expression, and characterization of an adenylate cyclase from *Arthrobacter* sp CGMCC 3584 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 963-970.
- [17] MA C, WANG J, WANG X, et al. Efficient production of cyclic adenosine monophosphate from adenosine triphosphate by the N-terminal half of adenylate cyclase from *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2020, 28(8): 2167-2172.
- [18] LIU T, RAO Y, ZHOU W, et al. Improved adenylate cyclase activity via affinity immobilization onto co-modified GO with bio-inspired adhesive and PEI [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 205: 111888.
- [19] ZHU Q, ZHUANG W, NIU H, et al. Affinity induced immobilization of adenylate cyclase from the crude cell lysate for ATP conversion [J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2018, 164: 155-164.
- [20] 李晓燕,李恒,王宏,等.一种腺苷酸环化酶制备环磷酸腺苷的方法CN112063670A[P].2020-12-11.
- [21] GALLAGHER D T, KIM S K, ROBINSON H, et al. Active-site structure of class IV adenylyl cyclase and transphyletic mechanism [J]. J Mol Biol, 2011, 405(3): 787-803.
- [22] SELWA E, DAVI M, CHENAL A, et al. Allosteric activation of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase by calmodulin: molecular dynamics and mutagenesis studies [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(30): 21131-21141.
- [23] LINDER J U. Structure-function relationships in *Escherichia coli* adenylate cyclase [J]. Biochemical Journal, 2008, 415(3): 449-454.
- [24] HATLEY M E, GILMAN A G, SUNAHARA R K. Expression, purification, and assay of cytosolic (catalytic) domains of membrane-bound mammalian adenylyl cyclases [J]. Methods Enzymol, 2002, 345: 127-140.
- [25] REDDY S K, KAMIREDDI M, DHANIREDDY K, et al. Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization [J]. J Biol Chem, 2001, 276(37): 35141-35149.
- [26] VARIMO K, LONDESBOROUGH J. Solubilization and other studies on adenylate cyclase of baker's yeast [J]. Biochemical Journal, 1976, 159(2): 363-370.
- [27] PENZKOFER A, TANWAR M, VEETIL S K, et al. Photo-dynamics of photoactivated adenylyl cyclase TpPAC from the spirochete bacterium *Turneriella parva* strain H(T) [J]. J Photochem Photobiol B, 2015, 153: 90-102.