

黄曲霉毒素解毒酶在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及其圆二色谱分析*

胡 熔^{1,4} 刘大岭^{1,3} 谢春芳^{1,3} 姚冬生^{1,2**}

(1 暨南大学微生物技术研究所 广州 510632 2 基因工程药物国家工程研究中心 广州 510632)

(3 广东省生物工程药物重点实验室 广州 510632 4 广州科仁生物工程有限公司 广州 510600)

摘要 目的:应用原核表达系统对黄曲霉毒素解毒酶(aflatoxin-detoxifzyme, ADTZ)进行高效可溶表达和纯化,并对其进行生物学活性与二级结构分析。方法与结果:亚克隆 ADTZ 的成熟肽,并构建与 pMAL-c2x 的重组质粒,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3),IPTG 诱导实现了 MBP_ADTZ 融合蛋白的高效可溶表达,其表达量约占总蛋白的 50%。经 Amylose 亲和层析、Factor Xa 酶切和疏水层析后得到高纯度的 rADTZ 蛋白。生物学活性分析表明 rADTZ 蛋白具有降解 AFB₁ 的酶活性,酶比活为 136U/mg。圆二色光谱对 rADTZ 蛋白二级结构的分析结果为: α -螺旋为 43.3%、 β -折叠为 31.1%、 β -转角为 10.5%和无规则卷曲为 15.1%。结论:用大肠杆菌成功表达并得到高纯度有活性的 rADTZ 蛋白,为进一步对 rADTZ 结构与功能研究奠定了基础。

关键词 黄曲霉毒素解毒酶 MBP_ADTZ 融合蛋白 可溶性表达 圆二色谱

中图分类号 Q786

黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)是一种具有强致癌性、致畸性和遗传毒性的物质。近年来,采用生物酶解法对其进行转化去毒的研究相继被报道,如 Motomura 等^[1]从平菇(*Pleurotus ostreatus*)中纯化出一种 90 kDa 的蛋白质,具有 AFB₁ 的降解能力,并研究了该酶解毒反应的最佳 pH 值、温度和荧光光谱等,推测该酶可以断裂黄曲霉毒素的内酯环。Teniola 等^[2]报道从多环芳香烃类物质污染的土壤中分离到两种细菌,红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)和分枝杆菌(*Mycobacterium fluoranthenorans*),并且证实这两种菌的胞内提取物具有 AFB₁ 解毒能力,2006 年,该研究组又报道称,红球菌的胞外提取物具有较好的 AFB₁ 解毒效率^[3]。其它细胞提取物对 AFB₁ 也有降解作用的微生物有:米曲霉(*Aspergillus oryzae* KKB4)^[4]和嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)^[5]等。还有研究报道某些过氧化物酶也能降解 AFB₁,如乳酸过氧化

物酶^[6]、过氧化物酶^[7]和辣根过氧化物酶^[8],这类酶大多在反应时需要加入 H₂O₂ 作为辅因子。综上可知,这些研究都是着力于证实对 AFB₁ 的降解是酶促作用,而对于该类酶的研究还未十分深入,酶的空间结构及酶与 AFB₁ 的作用机理均尚未解析。

黄曲霉毒素解毒酶(aflatoxin-detoxifzyme, ADTZ),即黄曲霉毒素氧化酶,来源于发光假蜜环菌(*Armillariella tabescens*)的胞内提取物,具有降解黄曲霉毒素的能力^[9-10]。动物实验结果表明,ADTZ 可以有效降低 AFB₁ 对受试动物的毒性作用,保护动物肝脏不受 AFB₁ 的损伤^[10-12]。近期研究表明,ADTZ 对 AFB₁ 的作用是氧化还原反应,且在反应过程中有 H₂O₂ 产生^[13-14]。但目前该蛋白结构与功能的关系仍不清楚,为了开展这方面的研究,需要快速制备大量高纯度且有生物学活性的 ADTZ 蛋白。本研究通过原核表达系统对 rADTZ 进行高效可溶表达和纯化,并对其进行生物学活性检测与二级结构分析。为进一步对 rADTZ 结构与功能研究奠定基础。

收稿日期:2010-11-23

* 国家“863”计划资助项目(2005AA213010)

** 通讯作者,电子信箱:tdsyao@jnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 带有 MBP 融合标签的表达载体 pMAL-c2x 购自 BioLabs 公司, 含有黄曲霉毒素解毒酶结构基因的重组质粒 pPIC9-adtz 及大肠杆菌菌株 TOP10F', Rosetta(DE3) 由本室保存。

1.1.2 工具酶及试剂 *Bam*H I、*Xmn* I、T4 DNA ligase、Factor Xa、Amylose Resin 和带 HRP 标记的抗 MBP 单克隆抗体等均为 BioLabs 公司产品; Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水预装柱购自 GE 公司; 聚合酶 Prime STAR™ HS 购自 TaKaRa 公司; 预混合低分子量蛋白 Marker 和 pI gradient 4-7.5 的 PI Marker 为 Bio-Rad 公司产品; Wizard SV GEL and PCR Clean-up system 为 Promega 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物设计与合成 根据 NCBI 公布 ADTZ 的 cDNA 序列(AY941095) 设计引物, primer_{up}: 5'-ATGGCC ACCACAACCTGTC; primer_{down}: 5'-CGCGGATCCTCACAAT CGTCTCTCAATG, 含有 *Bam*H I 酶切位点; 由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建与鉴定 以重组质粒 pPIC9-adtz 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 预变性 5 min 后开始循环, 即 98℃ 10 s, 64.1℃ 15 s, 72℃ 2 min 30 s, 5 个循环, 98℃ 10 s, 59℃ 15 s, 72℃ 2 min 30 s, 20 个循环后, 于 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化后, 用 *Bam*H I 进行单酶切, 再与经 *Xmn* I + *Bam*H I 双酶切的 pMAL-c2x 载体连接, 构建含 MBP_ADTZ 融合基因的表达载体 pMAL-c2x-ADTZ, 并转化至表达宿主菌 Rosetta(DE3)。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达与 Western-blot 分析 分别挑取含 pMAL-c2x 和 pMAL-c2x-ADTZ 质粒的单个菌落, 37℃ 活化过夜。次日晨, 以 1:100 接种于含 0.2% 葡萄糖的 LB(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中, 37℃ 培养至 A_{600} 为 0.4~0.6; 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 20℃ 诱导表达约 24h 离心收集菌体; 10% SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。表达产物进行 SDS-PAGE 后, 电转移至 PVDF 膜上, 进行 Western blot 分析。抗体为带 HRP 标记的抗 MBP 单克隆抗体, 显色剂为 TMB。

1.2.3 rADTZ 的纯化 将离心的菌体重悬于 1/5 体积的 Column Buffer(20mmol/L Tris-HCl, 200mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH7.4)中超声破碎, 4℃, 9000g 离心 30

min 获得上清。将上清用 Column Buffer 稀释 5 倍后过已经平衡好的 Amylose 柱; 用 12 倍柱体积的 Column Buffer 洗脱杂蛋白; 用 5 倍柱体积的 Column Buffer + 10mmol/L 麦芽糖洗脱融合蛋白质。纯化得到的融合蛋白 MBP-ADTZ 用 Factor Xa 4℃ 酶切 48 h。将酶切后的样品用平衡缓冲液(0.05mol/L PBS, 2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH6.5) 10 倍稀释后过已经平衡好的 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水柱, 采用盐浓度递减的连续线性梯度洗脱, 洗脱 A 液为 0.05mol/L PBS, pH6.5, 洗脱 B 液为平衡缓冲液; 洗脱体积为 20 倍柱体积。采用部分收集仪进行收集, 用 10% SDS-PAGE 检测其纯度, Bradford 法测定蛋白浓度。纯化得到的 rADTZ 蛋白并采用 Bio-Rad 公司的 Model 111 Mini IEF Cell 测定其等电点^[15]。

1.2.4 rADTZ 的质谱与氨基酸序列分析 纯化得到的 rADTZ 酶液透析脱盐后进行冻干, 然后将蛋白干粉送至国家生物医学分析中心测定其精确分子量和 N-端蛋白序列分析。

1.2.5 rADTZ 生物活性的测定 取 10μl rADTZ 酶液与 180μl pH 6.0 0.04mol/L Na_2HPO_4 -0.02mol/L 柠檬酸混合, 加入 10μl 底物(2μg/ml 的 AFB_1 溶液)于 30℃ 水浴开盖反应 30 min, 立即用 244.4μl 甲醇终止反应。对照组在加入底物前先用甲醇灭活酶液。终止后, 对照组和反应组的甲醇提取液经 450μl 氯仿萃取 3 次。萃取液 N_2 挥干, 用 200μl 流动相溶解后经 0.45μm 尼龙滤膜过滤, 取 20μl 进行 HPLC 检测。HPLC 检测参数: 色谱柱: 15 cm × 4.6mm, 4.6μm, Shim-pack VP-ODS C18 柱; 柱温: 40℃; 流动相: 甲醇-乙腈-水(35 + 105 + 260, V + V + V); 流速: 1ml/min; 荧光检测器激发波长: 365 nm, 发射波长: 425 nm。标准曲线绘制的标准品浓度为: 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml。酶活力单位定义: 在 30℃, pH6.0 的反应条件下, 每分钟转化 1 pmol 底物 AFB_1 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

1.2.6 rADTZ 的圆二色性分析 4℃ 透析含有 rADTZ 蛋白质的组分 24 h, 透析外液为 pH 6.5, 10mmol/L PBS。透析后的蛋白浓度为 0.0365mg/ml, 使用 Jasco J-810 spectropolarimeter 仪器在室温下测定 rADTZ 蛋白的 CD 光谱, 扫描波长为 190~250 nm, 石英杯径为 2mm。扫描速度为 50 nm/min, 扫描次数为 5 次, 累加求平均值。结果用平均摩尔椭圆度 $[\theta]$ 表示, 单位是 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{d/mol}$ 。二级结构的计算采用 Jascow32 软件分析计算。

2 结果和分析

2.1 pMAL-c2x-ADTZ 融合表达载体的构建

重组质粒 pMAL-c2x-ADTZ 经 PCR 和双酶切鉴定结果见图 1,均能获得约 2 kb 大小的 DNA 片段,与预期结果相符,表明目的基因已成功插入表达载体中。DNA 测序证实插入的目的基因无碱基突变且融合基因读码正确。

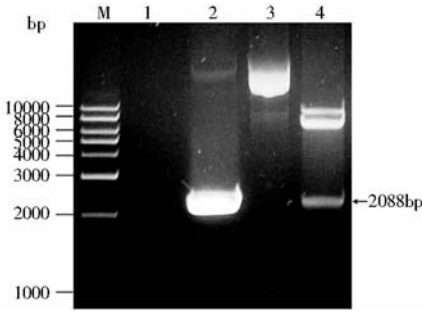


图 1 重组表达载体 pMAL-c2x-ADTZ 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 1 PCR and restriction analysis of recombinant expression vector pMAL-c2x-ADTZ

M; DNA KB ladder; 1; PCR control; 2; PCR product; 3; Plasmid pMAL-c2x-ADTZ; 4; pMAL-c2x-ADTZ digested with *SacI* + *Bam*HI

2.2 MBP-ADTZ 融合蛋白的诱导表达和 Western blot 鉴定

Rosetta(DE3)/pMAL-c2x-ADTZ 重组菌经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 能检测到约 118 kDa 大小的特异蛋白条带(图 2a),与 MBP(42.5 kDa)和 ADTZ (76 kDa)融合蛋白的预期大小相符,而空载体与非诱导的重组载体均无此带。表达的融合蛋白绝大部分为可溶的,约占菌体总蛋白的 50%(图 2b)。经 Western blot 检测,空载体表达的 MBP-β-半乳糖苷酶 α 片段融合蛋白和重组载体表达的 MBP-ADTZ 融合蛋白都能被抗 MBP 单克隆抗体特异性结合,且大小与表达条带一致(图 2c),证实了 MBP-ADTZ 融合蛋白的正确表达。

2.3 rADTZ 的纯化

破碎的上清蛋白经 Amylose Resin 亲和柱纯化,得到了纯的融合蛋白,经薄层扫描显示纯度大约为 90%,见图 3 泳道 2 所示。用 Factor Xa 酶切后,选用 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 疏水柱可以把 MBP 蛋白和 rADTZ 蛋白完全分离,经扫描分析 rADTZ 蛋白的纯度约达 98%,如图 3 泳道 4 所示。按本文所述方法,1L 菌液大约能获得 350mg 的高纯度 rADTZ 蛋白。IEF 测定其等电点为 5.90(图 4)。

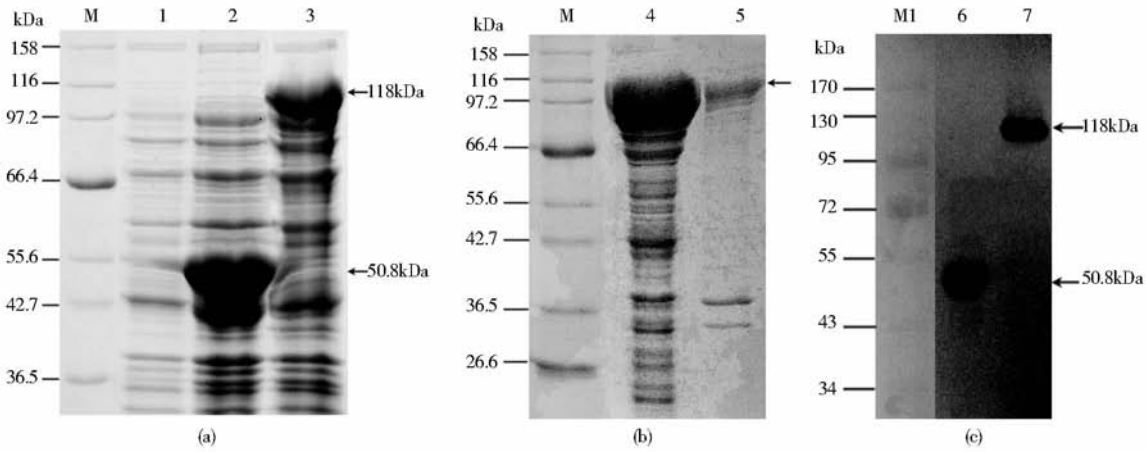


图 2 MBP-ADTZ 融合蛋白的表达及鉴定

Fig. 2 Expression and identification of the MBP-ADTZ fusion protein

(a)SDS-PAGE analysis of MBP-ADTZ fusion protein expression (b)Soluble analysis of MBP-ADTZ fusion protein (c) Western blot identification of MBP-ADTZ fusion protein

M;Protein molecular weight marker; 1;Total protein of Rosetta(DE3) containing pMAL-c2x-ADTZ before IPTG induction; 2;Total protein of Rosetta(DE3) containing pMAL-c2x induced with IPTG; 3;Total protein of Rosetta(DE3) containing pMAL-c2x-ADTZ induced with IPTG; 4;Expression of recombinant protein MBP-ADTZ in supernatant after sonication; 5;Expression of recombinant protein MBP-ADTZ deposition after sonication; 6;The hybridized band for the fusion protein MBP-β-gal-α by Western blot; 7;The hybridized band for the fusion protein MBP-ADTZ by Western blot; M1: Pre-stained protein marker

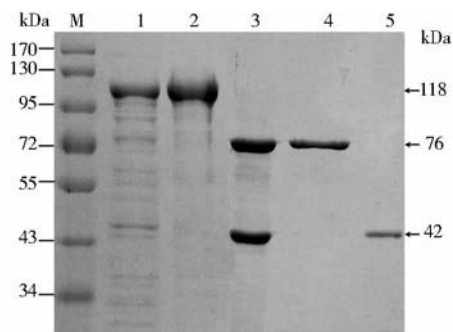


图3 MBP-ADTZ 融合蛋白的纯化、切割与分离

Fig. 3 The purification, cleavage and separation of the MBP-ADTZ fusion protein

M: Protein molecular weight marker; 1: Soluble fraction of sonicated cells; 2: The purified MBP-ADTZ protein; 3: The mixture of MBP and rADTZ proteins after cleavage by Factor Xa; 4: The purified rADTZ protein; 5: The purified MBP protein

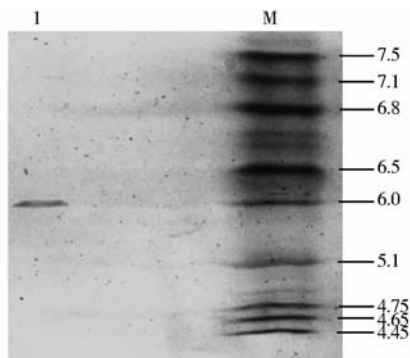


图4 rADTZ 的等电聚焦电泳图

Fig. 4 Result of rADTZ IEF

M: pI gradient 4 ~ 7.5 of pI marker; 1: rADTZ

2.4 rADTZ 的质谱与氨基酸序列分析结果

纯化后的 rADTZ 蛋白经基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法分析,测得精确分子量为 76894 Da 与理论值相符(图5),且未见其它杂峰。N 端氨基酸序列测定,共测定 10 个氨基酸,测序结果为 MATTTVHRER,与 NCBI 公布的 ADTZ 蛋白 N 端 10 个氨基酸序列完全一致。

2.5 rADTZ 的生物活性测定结果

将不同浓度 AFB₁ 标准品溶液进行色谱测定,计算不同浓度下的峰面积。以峰面积(y)对标准品的质量浓度(x)进行线性回归,即得标准曲线为 $y = 0.0003x - 4.0801$,相关系数 $r = 0.9995$ 。从图6中可以看出与对照组相比,AFB₁ 的吸收峰在反应后明显降低,说明 AFB₁ 底物经 rADTZ 处理后减少了。根据 AFB₁ 的标准

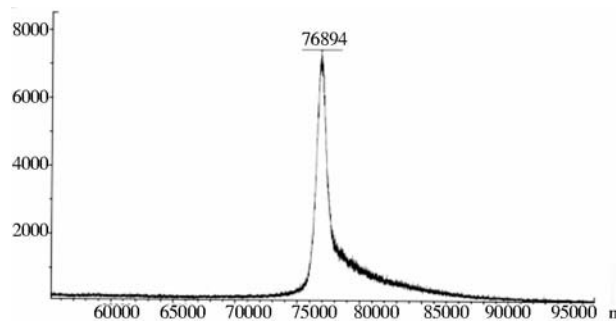


图5 rADTZ 的基质辅助激光解吸电离

飞行时间质谱分析

Fig. 5 MALDI-TOF-MS of rADTZ

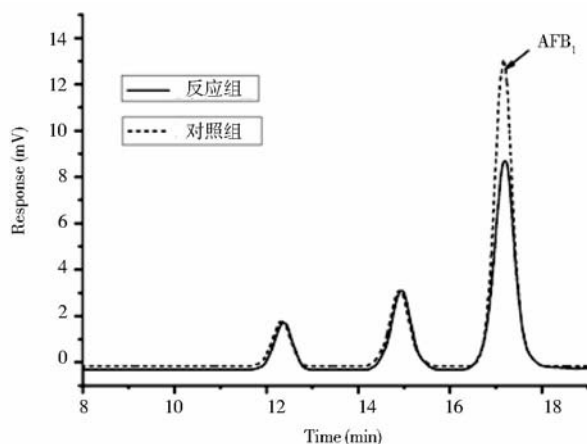


图6 AFB₁ 样品经 rADTZ 处理后 HPLC 的检测结果

Fig. 6 HPLC chromatogram of AFB₁ degraded by rADTZ

曲线及样品反应组和对照组中 AFB₁ 的峰面积计算出 AFB₁ 的残留量,两者比较可计算出 rADTZ 的酶比活为 136U/mg。

2.6 rADTZ 的圆二色性分析结果

rADTZ 蛋白在 Jasco J-810 spectropolarimeter 仪器上经 190 ~ 250 nm 远紫外扫描显示,在 192 nm 处有一正峰,在 208 nm 与 222nm 附近显示双负峰,且 208nm 比 222nm 的 CD 值要小,属于 α/β 型蛋白结构(图7)。用 Yang-Chen 公式^[16]计算其各二级结构成分含量为: α -螺旋为 43.3%、 β -折叠为 31.1%、 β -转角为 10.5% 和无规则卷曲为 15.1%。

3 讨论

目前利用大肠杆菌表达系统高效表达有活性的重组蛋白仍是蛋白结构和功能研究的重要基础,该系统

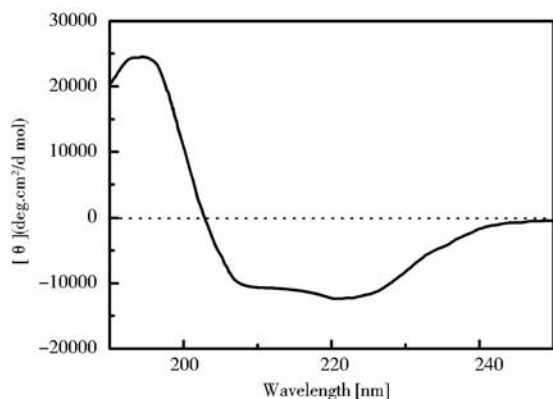


图7 rADTZ 的圆二色谱分析

Fig.7 Analysis of rADTZ by circular dichroism

的低成本和高表达量使其成为应用最广泛的表达系统。但许多外源蛋白在细菌胞内是以不可溶的包涵体形式表达,需经过变性、复性等复杂过程才能重新折叠成有活性的可溶性蛋白质。因此如何在大肠杆菌中高效表达可溶性外源蛋白质,仍是引起研究者们关注的问题。

大量实验研究证实,通常表达系统中只能以包涵体形式表达的许多蛋白质,在 MBP 融合表达体系中则能以可溶性形式表达^[17-20]。MBP 作为原核生物的组成蛋白,具有与分子伴侣相似的功能,可以辅助外源蛋白质在大肠杆菌细胞内折叠成正确的空间构象^[21]。同时,利用支链淀粉亲和层析,可以很方便地将融合蛋白从细菌裂解液中纯化出来。所以本研究选用了 pMAL 系统将 ADTZ 基因在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行了诱导表达。研究初期发现,在 37℃ 条件下诱导表达的融合蛋白,虽然表达量很高,但是绝大部分都是包涵体沉淀,其原因可能是蛋白质合成速度太快,以至于没有足够的时间进行折叠。而把诱导温度降至 20℃ 时,可以明显提高可溶性目的蛋白的含量,并且表达水平可达到菌体总蛋白的 50%。经 Amylose 亲和层析、Factor Xa 酶切和疏水柱层析后得到了大于 98% 纯度的 rADTZ 蛋白,质谱的结果也说明所获得的 rADTZ 蛋白的纯度较高。

本实验中采用高效液相色谱检测 AFB₁ 含量的方法发现,rADTZ 蛋白与 AFB₁ 溶液反应 30 min 后,能使 AFB₁ 的含量降低,表明 rADTZ 蛋白具有降解 AFB₁ 的能力。通过圆二色谱首次测定了 rADTZ 蛋白的二级结构,结果表明 rADTZ 属于 α/β 型蛋白结构,与其生物信息学预测的结果相一致。

综上所述,成功实现了黄曲霉毒素解毒酶在原核细胞的表达,制备了高纯度、有活性的 rADTZ 蛋白。本研究为今后进一步利用蛋白质结晶和 X-射线衍射的技术,研究蛋白质的结构,阐述蛋白质功能的机制提供了重要的基础。

参考文献

- [1] Motomura M, Toyomasu T, Mizuno K, et al. Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research*, 2003, 158: 237-242.
- [2] Teniola O D, Addo PA, Brost I M, et al. Degradation of aflatoxin B₁ by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov DSM44556^T. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105: 111-117.
- [3] Alberts J F, Engelbrecht Y, Steyn PS, et al. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 121-126.
- [4] Sardjono Raharjo S, Rahayu E S. The role of extracellular enzymes produced by *Aspergillus oryzae* KKB4 in biodegradation of Aflatoxin B₁. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 2004, 11 (2): 65-71.
- [5] Guan S, Ji C, Zhou T, et al. Aflatoxin B₁ degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9: 1489-1503.
- [6] Doyle M P, Marth E H. Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase. *Z Lebensm Unters-Forsch*, 1978, 166: 271-273.
- [7] Doyle M P, Marth E H. Peroxidase activity in mycelia of *Aspergillus parasiticus* that degrade aflatoxin. *European J Appl Microbiol Biotechnol*, 1979, 7: 211-217.
- [8] Das C, Mishra H N. *In vitro* degradation of aflatoxin B₁ in groundnut (*Arachis hypogea*) meal by horse radish peroxidase. *Lebensm-Wissu-Technol*, 2000, 33: 308-312.
- [9] 刘大岭, 姚冬生, 陈敏峰. 真菌提取液对黄曲霉毒素解毒作用的研究. *广东药学院学报*, 1995, 11 (2): 92-94.
Liu D L, Yao D S, Chen M F. ACAD J GCP, 1995, 11 (2): 92-94.
- [10] Liu D L, Yao D S, Liang R, et al. Detoxification of aflatoxin B₁ by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 1998, 36: 563-574.
- [11] 尹逊慧, 陈善林, 曹红, 等. 日粮添加黄曲霉毒素解毒酶制剂对黄羽肉鸡生产性能、血清生化指标和毒素残留的影响. *中国家禽*, 2010, 32 (2): 29-33.
Yin X H, Chen S L, Cao H, et al. *China Poultry*, 2010, 32 (2): 29-33.
- [12] 曹红, 尹逊慧, 陈善林, 等. 黄曲霉毒素解毒酶对岭南黄肉仔鸡日粮中黄曲霉毒素 B₁ 解毒效果的研究. *动物营养学报*, 2010,

- 22(2):424-430.
- Cao H, Yin X H, Chen S L, et al. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(2):424-430.
- [13] Chen J H, Liu D L, Li S C, et al. Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for sterigmatocystin detection. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 47: 119-126.
- [14] Li S C, Chen J H, Cao H, et al. Amperometric biosensor for aflatoxin B₁ based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes. Food Control, 2011, 22(1):43-49.
- [15] 孙琳, 张培因, 戴莉, 等. 薄层分析等电聚焦方法测定重组 MUC1 等电点及其性质的应用. 中国现代医学杂志, 2006, 16(20):3101-3103.
- Sun L, Zhang P Y, Dai L, et al. China Journal of Modern Medicine, 2006, 16(20):3101-3103.
- [16] Chen Y H, Yang J T, Chau K H. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. Biochemistry, 1974, 13(16):3350-3359.
- [17] Kapust R B, Waugh D S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. Protein Sci, 1999, 8(8):1668-1674.
- [18] 高凤山, 夏春, 张强, 等. 大肠杆菌表达的重组猪 β_2 微球蛋白二级结构的圆二色谱分析. 微生物学报, 2009, 49(12):1596-1600.
- Gao F S, Xia C, Zhang Q, et al. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(12):1596-1600.
- [19] 单丽伟, 罗海霞, 范三红, 等. 小麦种子过氧化物酶基因 wp1 的克隆及在大肠杆菌中的表达. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(3):213-218.
- Shan L W, Luo H X, Fan S H, et al. Journal of Northwest A & F University, 2009, 37(3):213-218.
- [20] 雷荣悦, 乔玉欢, 闫继东, 等. 重组人 BMP6 在大肠杆菌中可溶表达、纯化及活性分析. 生物工程学报, 2008, 24(3):452-459.
- Lei R Y, Qiao Y H, Yan J D, et al. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(3):452-459.
- [21] Lauritzen C, Tüchsen E, Hansen PE, et al. BPTI and N-terminal extended analogues generated by factor Xa cleavage and cathepsin C trimming of a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 1991, 2(5-6):372-378.

Soluble Expression, Purification of Recombinant Aflatoxin-detoxifzyme in *E. coli* and Analysis of Circular Dichroism Spectrum

HU Rong^{1,4} LIU Da-ling^{1,3} XIE Chun-fang^{1,3} YAO Dong-sheng^{1,2}

(1Institute of Microbial Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Guangzhou 510632, China)

(3GuangDong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Guangzhou 510632, China)

(4Guangzhou Co-win Bioengineering Co., Ltd., Guangzhou 510600, China)

Abstract Objective: To express and purify the aflatoxin-detoxifzyme (ADTZ) in *E. coli*. and to study the biological activities and secondary structure of rADTZ. Methods and Results: the mature peptide of ADTZ was subcloned into pMAL-c2x vector to construct the prokaryotic expression plasmid. The recombinant plasmid was transformed into Rosetta (DE3) and the soluble fusion protein MBP-ADTZ was highly induced by IPTG. The expression level was approximately 50% of the total bacterial protein. The pure fusion protein was got from the cell lysate by amylose affinity chromatography. 42kDa MBP and 76kDa rADTZ were gained via digestion of fusion protein by Factor Xa, and pure rADTZ was obtained by Hydrophobic interaction chromatography (HIC). Biological activities of rADTZ had been examined and results showed that the protein had AFB₁-detoxifying activity with the specific activity of 136U/mg. Circular dichroism spectra analysis revealed that rADTZ was composed of 43.3% of α -helix, 31.1% of β -sheet, 10.5% of β -turn and 15.1% of random coil. Conclusion: Purified rADTZ protein with AFB₁-detoxifying activity was obtained and that laid the foundation for exploration of the relationship between the structure and function of rADTZ.

Key words Aflatoxin-detoxifzyme MBP-ADTZ fusion protein Soluble expression Circular dichroism spectrum