新型重组 Ulp1 的制备工艺研究

徐海悦[1]，吴　勇[2]，李乐乐[2]，黄宗庆[2]，化浩举[2]，冯　军[1,2]*
（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：类泛素特异性蛋白酶 1（Ulp1）是从融合蛋白中移除小分子泛素相关修饰物蛋白（SUMO）标签工艺中的重要工具蛋白酶，在重组多肽和蛋白生产制备中具有广泛应用。Ulp1 蛋白易聚集的特性给下游分离纯化工艺带来了诸多挑战。为克服这些问题，本研究设计并重组表达制备了一种 S13-Ulp1 融合蛋白，以提高 Ulp1 酶的溶解度，减少聚集，同时降低蛋白等电点，便于采用阴离子交换色谱纯化。通过对发酵、澄清等步骤的工艺参数进行优化，建立了一条发酵表达产量高、纯化工艺简便的 S13-Ulp1 融合蛋白制备工艺。优化后发酵产量达到了 2.34 g/L，下游分离纯化总收率为 64%，制得的 S13-Ulp1 蛋白的 SDS-PAGE 纯度为 95%。经酶切试验验证，S13-Ulp1 融合蛋白具有与 Ulp1 相同的特异性，可高效地移除 SUMO 标签，获得目的多肽。

关键词：小分子泛素相关修饰物蛋白（SUMO）蛋白酶；类泛素特异性蛋白酶 1（Ulp1）；重组；表达；纯化；离子交换色谱
中图分类号：Q783　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）10-1432-07
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.10.008

Preparation Process of Novel Recombinant Ulp1

XU Haiyue[1], WU Yong[2], LI Lele[2], HUANG Zongqing[2], HUA Haoju[2], FENG Jun[1,2]*
(*1. China Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Duomirui Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Ubiquitin-like protein-specific protease 1(Ulp1) is a crucial tool for protease in removing small ubiquitin-related modifier protein(SUMO) tags from the fusion protein. It has been widely used in the production of recombinant peptides and proteins. The easy aggregation of Ulp1 protein brings many challenges to the downstream separation and purification process. An S13-Ulp1 fusion protein was designed and recombinantly expressed to improve the solubility of Ulp1, reduce its aggregation, and decrease its isoelectric point for the convenient purification by anion exchange chromatography. After optimizing the parameters of fermentation and clarification, a preparation process of S13-Ulp1 fusion protein with high yield and simple purification was established. Finally, for S13-Ulp1, the fermentation yield reached 2.34 g/L, the total yield of downstream separation and purification was 64%, and the purity shown in SDS-PAGE analysis was about 95%. The enzymatic reaction assay showed that S13-Ulp1 fusion had the same specificity as Ulp1, which could efficiently remove the SUMO tag to obtain the targeted peptide.

Key Words: small ubiquitin-related modifier protein(SUMO) protease; ubiquitin-like protein-specific protease 1(Ulp1); recombination; expression; purification; ion-exchange chromatography

小分子泛素相关修饰物蛋白（small ubiquitin-related modifier protein，SUMO）是多肽和蛋白质融合表达中常用的标签蛋白，具有提高蛋白质表达水平、促进目的蛋白正确折叠、显著改善蛋白质稳定性和溶解性的功能[1]。SUMO 融合蛋白可以被 SUMO 蛋白酶［来自酿酒酵母的类泛素特异性蛋白酶 1（Ulp1）］特异性识别并切割。与肠激酶、凝血酶或烟草蚀纹病毒（TEV）蛋白酶等其他常用蛋白酶识别某肽段一级序列不同，Ulp1 识别 SUMO 蛋

收稿日期：2022-03-17
作者简介：徐海悦（1997—），女，硕士研究生，专业方向：重组蛋白和多肽药物。
通信作者：冯　军（1971—），男，研究员，主要从事蛋白质及多肽药物的研究与开发工作。
E-mail：fengjdmr@163.com

白的三维空间结构，因而其酶切效率高、特异性好。文献报道，尚未观察到该酶用于移除 SUMO 标签时发生错切的情况[2]。此外，Ulp1 的酶切位点位于 SUMO 标签蛋白的 C 末端 Gly 的羧基侧，融合蛋白经过 Ulp1 切割后，靶蛋白的 N 端不含任何多余的氨基酸残基[2]。Ulp1 在较宽泛的温度（4 ～ 37 ℃）和 pH（5.5 ～ 10.5）内都具有高效的酶切活性[3]。可依据目的蛋白的特性在较宽泛的工艺条件下进行酶切。随着 SUMO 标签融合表达技术被越来越多地用于多肽和蛋白质药物的研发和生产，开发更加高效的 Ulp1 制备工艺具有重要的应用价值。

全长 Ulp1 由 621 个残基组成，其催化结构域位于 C 端 218 个氨基酸，即 Ulp1（404 ～ 621）[4]。目前文献报道商业化的 Ulp1 几乎均为通过大肠埃希菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）重组表达的 Ulp1（404 ～ 621）蛋白，下游纯化工艺多采用 Ni 柱亲和色谱[5—10]。由于 Ni 填料价格昂贵、载样量衰减快，且存在镍离子脱落导致潜在毒性等问题，该方法通常难以实现大规模工业化生产[11]。本研究采用 *E. coli* 表达 S13-Ulp1 融合蛋白，N 端引入 S13 标签后可以增加 Ulp1 溶解性，减少蛋白聚集，同时降低 Ulp1 的等电点，便于下游分离纯化，并通过对发酵、澄清等步骤的工艺参数进行优化[12]，为实现 Ulp1 的工业化生产奠定了基础。

1 仪器与试药

GBJS-10L C 型 5 L 机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；SCG-100 型蛋白色谱系统（苏州赛谱科技仪器有限公司）；PowerPac Basic 电泳仪（美国 BioRad 公司）；0.22 μm 水系微孔过滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）；Alliance 分析型高效液相色谱仪、XevoG2-XS 型 Qtof 高分辨质谱仪（美国 Waters 公司）；SpectraMaxi3x 型酶联免疫检测仪（美国 Molecular Devices 公司）。

重组 *E. coli* DMR502、N 端融合有 SUMO 标签的促肾上腺皮质激素（SMsACTH）、促肾上腺皮质激素（ACTH）对照品均由本实验室自制保存；聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）快速制备试剂盒（批号 02321060）、双色预染蛋白相对分子质量标准（10 000 ～ 250 000，批号 02351800）均购于上海雅酶生物医药科技有限公司；异丙基硫代 -β-D- 半乳糖苷（IPTG，批号 E112BA0015）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 G824DA0001）均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；色谱柱 YMC-Pack Pro C_{18} 柱购于日本 YMC 公司；三氟乙酸（TFA，上海泰坦科技股份有限公司）；DEAE Sepharose FF 离子交换柱（美国通用电气公司）；酵母提取物（安琪酵母股份有限公司，批号 2019022301B9）；壳聚糖、培养基成分及其余试剂均购自国药集团化学试剂有限公司，规格为分析纯。

宿主菌 *E. coli* BL21（DE3）、质粒 pET28a 均由本实验室保存。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

LB 培养基 /g·L^{-1}：氯化钠 10、胰蛋白胨 10、酵母提取物 5；用 4 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0；高压蒸汽 121 ℃灭菌 30 min。

SM504 培养基 /g·L^{-1}：甘油 5、酵母浸粉 5、胰蛋白胨 10、硫酸铵 5、十二水合磷酸氢二钠 17.1、磷酸二氢钾 3、无水硫酸镁 0.3；调至 pH 7.0；高压蒸汽 121 ℃灭菌 30 min。

SM502 发酵培养基 /g·L^{-1}：葡萄糖 2、甘油 30、酵母浸粉 15、硫酸铵 3、十二水合磷酸氢二钠 17.2、磷酸二氢钾 3、氯化钾 1、氯化钠 0.5、无水硫酸镁 0.51、无水氯化钙 0.011、聚醚消泡剂 0.2；高压蒸汽 121 ℃灭菌 30 min。

补料液 /g·L^{-1}：甘油 750、酵母浸粉 22.5、无水硫酸镁 15；高压蒸汽 121 ℃灭菌 30 min。

微量元素母液 /g·L^{-1}：六水合氯化钴 1.8、四水合氯化锰 24.4、七水合硫酸锌 20、五水合硫酸铜 7.5、七水合硫酸亚铁 67.2、浓盐酸 2.5。

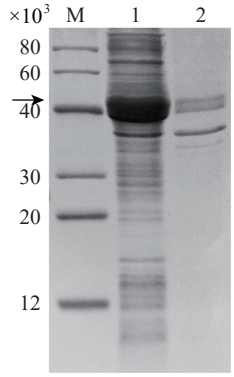
十二烷基硫酸钠（SDS）-PAGE 缓冲液 /g·L^{-1}：Tris 15、甘氨酸 72；每升加入 100 μg/ml SDS 溶液 50 ml。

2% 的壳聚糖溶液：含壳聚糖 20 g/L 的 20 g/L 乙酸溶液。

2.2 重组 Ulp1 菌株的构建

利用 *Nco* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点将 Ulp1p（Ulp1 的催化亚基片段）基因亚克隆到 pET28a 载体中。卡那霉素抗性和目的基因表达的质粒编码由 T7 启动子控制。将构建的质粒 pET28a-S13-Ulp1 转化到 *E. coli* BL21（DE3）中，表达 N 端带 S13 标签的 Ulp1。

挑取单克隆菌落摇瓶发酵，结果如图 1 所示，重组菌经 IPTG 诱导后，泳道 1 中有一条明显的相对分子质量约 46 000 的条带（图中箭头所示），与理论相对分子质量一致，说明该条带为 S13-Ulp1 融合蛋白，并且在 *E. coli* 中主要以可溶形式高效表达。



M—蛋白相对分子质量标准；1—诱导细胞产物上清；2—诱导细胞产物沉淀。

图 1　*E. coli* 表达的 S13-Ulp1 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1　SDS-PAGE Analysis of S13-Ulp1 Expressed by *E. coli*

2.3　重组 Ulp1 的高密度发酵

2.3.1　种子培养

种子液：取实验室保藏的甘油管菌种（批号 20210420）10 μl，接种在含硫酸卡那霉素（终质量浓度 25 μg/ml）的液体 LB 培养基 100 ml 中，于 37 ℃、220 r/min 的摇床中振荡培养 5 h。

2.3.2　发酵罐初始工艺

准备 SM502 培养基 3 L，转移至 5 L 发酵罐中，加入聚醚消泡剂 3 ml，于 121 ℃高压灭菌 30 min。然后，向发酵罐中接种种子液 100 ml，并控制罐中的通气量为 8.0 m^3/min，初始转速为 400 r/min，温度为（32±0.5）℃，通过体积分数 50％的氨水溶液和体积分数 6％的硫酸维持发酵液 pH 为（7.0±0.1），通过转速和罐压维持溶氧（DO）>40％。

发酵液中碳源耗尽后开始补料，维持补料速度为每升菌液 27 ml/h。在发酵开始后 4 h 及以后每隔 1 h 取样测定发酵液的吸光度（OD_{600}），至发酵液的 OD_{600} ≥ 80 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 进行诱导蛋白表达，并且调整补料速度为每升菌液 12 ml/h，温度为 25 ℃，继续培养 6 h 后结束发酵。

获得发酵液 3.36 L，然后于 10 ℃离心（11 000×*g*）25 min，收集菌体约 330 g。

2.4　重组 Ulp1 的酶活检测

取发酵液离心（8 000×*g*）15 min，收集菌体，然后照 1 g ∶ 10 ml 的比例加入缓冲液（50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液，pH 7.0）重悬菌体，于 120 MPa 高压匀浆 2 遍，所得匀浆液离心（12 000×*g*）25 min，收集匀浆液上清，用上述缓冲液稀释不同倍数后用于酶活性检测。

酶活检测方法：向 3 mg/ml 底物蛋白 SMsACTH 溶液 200 μl 中加入酶液（100 ～ 500 U/ml）10 μl，混合均匀后立即于 32 ℃反应 30 min，然后加入 100 μg/ml TFA 溶液 5 μl 终止反应。取酶切产物进行 HPLC 分析，以外标法以峰面积计算产物 ACTH 的浓度并计算酶活性。

色谱条件：色谱柱 YMC-Pack Pro C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为含 1 μg/ml TFA 的 5 μg/ml 硫酸铵溶液，B 为乙腈，线性梯度洗脱，程序见表 1；流速 1.0 ml/min；柱温 40 ℃；检测波长 215 nm；进样量 10 μl。

表 1　线性梯度洗脱程序

Tab.1　Linear Gradient Elution Procedure

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	71	29
15.0	68	32
17.0	50	50
20.0	50	50
20.1	71	29
30.0	71	29

酶活定义为在上述条件下，每分钟催化生成 ACTH 1 μg 所需的酶量为 1 个活性单位。

2.5　发酵条件的优化

2.5.1　种子液 OD_{600}

按照“**2.3.1**”项下方法培养种子液至 OD_{600} 分别为 0.6、1、2 和 3，再分别以 100 ml 的接种量接种至发酵罐中，然后按“**2.3.2**”项下条件进行高密

度发酵。种子液 OD_{600} 对发酵产量的影响如图 2 所示，结果显示 OD_{600} 为 2 时，发酵液总酶活（产量）最高，因此选择的最适种子液 OD_{600} 为 2。

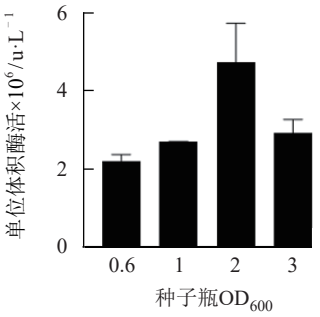


图 2　种子液菌浓对发酵液酶活的影响（*n*=2）

Fig.2　Effect of Seed Fermentation Broth Concentration on Enzyme Activity of Fermentation Broth（*n*=2）

2.5.2　诱导后培养温度

设置诱导后培养温度分别为 25、30 和 37 ℃，其他发酵参数条件按“**2.3.2**”项下所述，结果如图 3 所示，当诱导温度为 30 ℃时，发酵液总酶活（产量）最高，因此选择的最适诱导温度为 30 ℃。

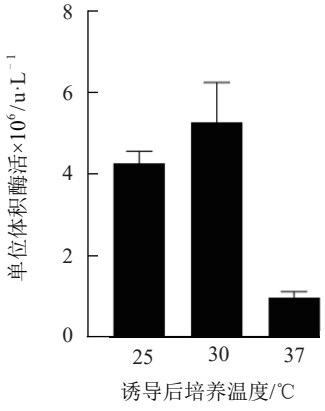


图 3　诱导温度对发酵液酶活的影响（*n*=2）

Fig.3　Effect of Induction Temperature on Enzyme Activity of Fermentation Broth（*n*=2）

2.5.3　诱导时菌液浓度

控制诱导时菌液 OD_{600} 值为 30、40、60、80、110，其他发酵参数按“**2.3.2**”项下所述，结果如图 4 所示，诱导时菌液 OD_{600} 为 60 时，发酵液总酶活（产量）最高，因此选择的最适诱导菌浓 OD_{600}=60。

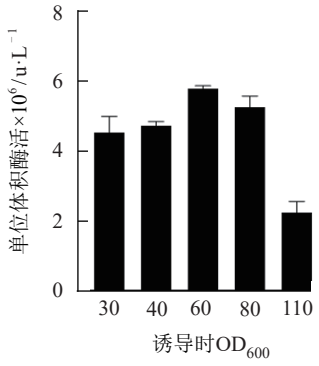


图 4　诱导时菌液浓度对发酵液酶活的影响（*n*=2）

Fig.4　Effect of Bacterial Concentration on Enzyme Activity of Fermentation Broth during Induction（*n*=2）

2.5.4　诱导剂浓度

控制诱导时诱导剂 IPTG 浓度为 0.1、0.2、0.3、0.5、1.0 mmol/L，其他发酵参数如“**2.3.2**”项下所述，结果如图 5 所示，诱导时加入的 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时，发酵液单位酶活最高，因此选择的最适诱导诱导剂浓度为 0.3 mmol/L。

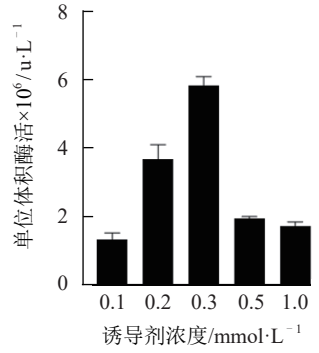


图 5　诱导剂浓度对发酵液酶活的影响（*n*=2）

Fig.5　Effect of Concentration of Inducer on Enzyme Activity of Fermentation Broth（*n*=2）

综上所述，通过高密度发酵条件优化后最终选择的最优高密度发酵条件为种子液浓度 OD_{600}=2，诱导温度 30 ℃，诱导时菌液浓度 OD_{600}=60，诱导剂浓度为 0.3 mmol/L，重复高密度发酵，初始条件表达产量为 4.0×10^6 u/L，优化后表达产量为 9.1×10^6 u/L，

为优化前的 2.25 倍，产量经计算可达 2.34 g/L。

2.6　重组 Ulp1 的纯化工艺

2.6.1　匀浆液澄清

按“**2.4**”项下方法制得匀浆上清液后，向匀浆上清液中加入壳聚糖至终质量浓度分别为 0、1、2、2.5、3、4 μg/ml，室温搅拌 20 min 后静置 1 h，然后离心（8 000×*g*）20 min，收集上清，取样测定上清液的 OD_{600} 和酶活性，计算澄清处理步骤的酶活性收率。试验结果如图 6 所示，当壳聚糖终浓度为 2.5 μg/ml 时，其对匀浆液的澄清效果较好，酶活性回收率为 79.9%。

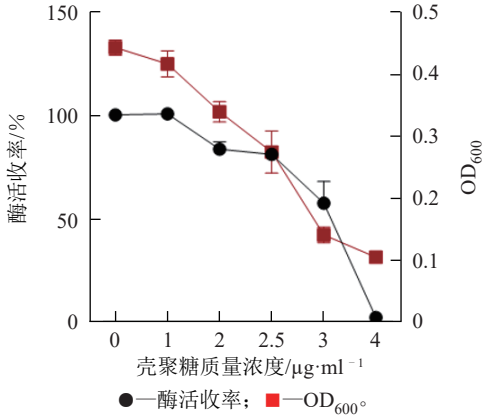
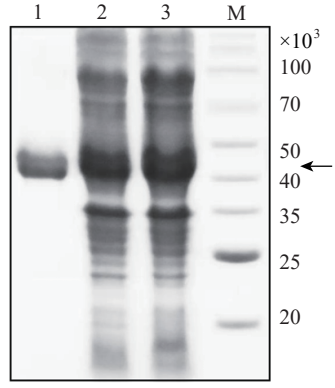


图 6　壳聚糖浓度对酶活收率和澄清效果的影响（*n*=2）

Fig.6　Effect of Chitosan Concentration on Enzyme Activity Yield and Clarification Effect (*n*=2)

2.6.2　重组 Ulp1 的纯化

Ulp1 匀浆上清液经 2.5 μg/ml 壳聚糖澄清后，调至 pH 7.8，经 0.2 μm 滤膜过滤后使用采用阴离子交换柱色谱法进行纯化，纯化条件如下：DEAE Sepharose FF 离子交换色谱柱（柱体积 5 ml）；缓冲液 A 为 50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液，pH 7.8；缓冲液 B 为含 50 mmol/L NaH_2PO_4 的 0.8 mol/L NaCl 溶液，pH 7.8；流速 15 ml/min；用缓冲液 A 平衡色谱柱 3 个柱体积后开始上样，上样结束后以体积分数 26%缓冲液 B 冲洗 6 个柱体积，然后使用体积分数 26%～100%的缓冲液 B 进行 10 个柱体积的梯度洗脱，在吸收峰开始出现时收集洗脱液，观测 280 nm 处吸光度降至 100 mAU 以下时结束收集，合并收集的洗脱液，SDS-PAGE 测定结果如图 7，得到重组 Ulp1，采用 Image J（1.50i）软件计算 Ulp1 纯度为 95%，离子交换纯化收率为 80%，同壳聚糖絮凝计算重组 Ulp1 的纯化总收率为 64%。



1—离子交换色谱收集的样品；2—壳聚糖絮凝后的澄清匀浆液；3—匀浆上清液；M—蛋白相对分子质量标准。

图 7　重组 Ulp1 的各纯化步骤样品的 SDS-PAGE 分析

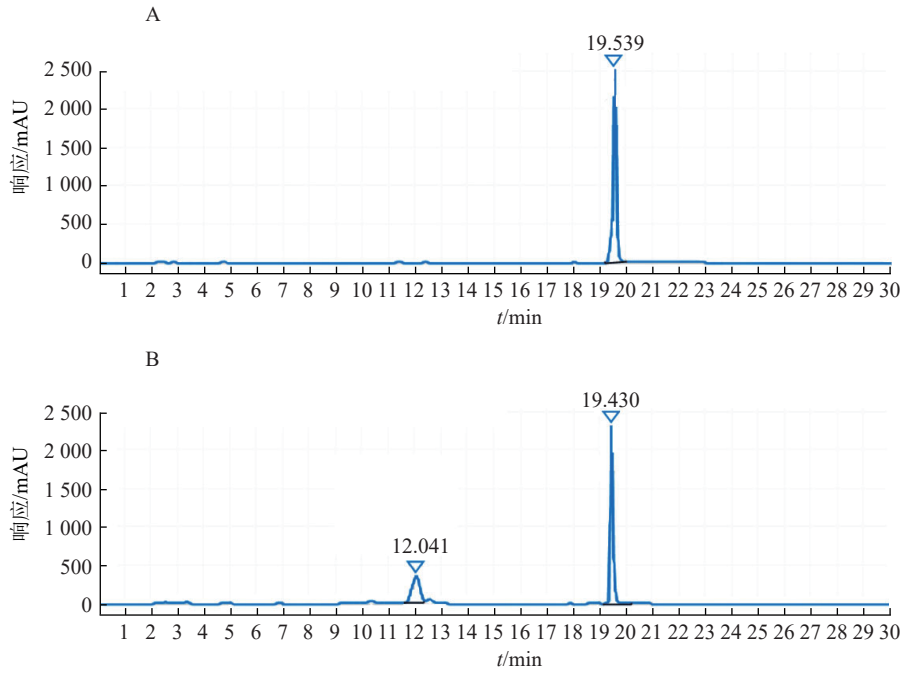
Fig.7　SDS-PAGE Analysis of the Purified Recombinant Ulp1 Samples

2.7　重组 Ulp1 的活性鉴定

采用纯化后的重组 Ulp1 进行酶活性鉴定，按“**2.4**”项下酶切体系，酶切前后样品的 HPLC 分析比较见下图 8，结果显示酶切后可得到与 ACTH 对照品具有相同保留时间的产物峰。收集该产物峰并进行质谱分析，结果如图 9 所示，质谱结果显示产物 ACTH 的单同位素相对分子质量（$[M+H]^+$）为 4 565.32，与其理论值 4 567.20 基本一致。HPLC 和 MS 分析结果表明酶切产生的 ACTH 结构完整且 N 端无多余氨基酸残留，证明本研究制备的重组 Ulp1 可正确识别并切割 SUMO 标签。

3　讨论

Ulp1/SUMO 是一种比泛素系统（DUB/Ub）更稳定经济的融合系统[3]，目前文献报道的 Ulp1 酶制备工艺大多采用 *E. coli* 重组表达 Ulp1（404～621），其发酵产量为 20～355 mg/L[6—10,13]，且主要采用 Ni 柱亲和色谱或弱酸型的羧甲基纤维素柱（CM 柱）离子交换色谱进行纯化[13]。本实验室重组表达 Ulp1 蛋白后参照文献工艺进行 CM 柱纯



A：SMsACTH，B：S13-Ulp1+SMsACTH 酶切液。

图 8 酶切反应前后样品的 HPLC 色谱分析图

Fig.8 HPLC Chromatographic Analysis of Samples before and after Enzyme-catalyzed Reaction

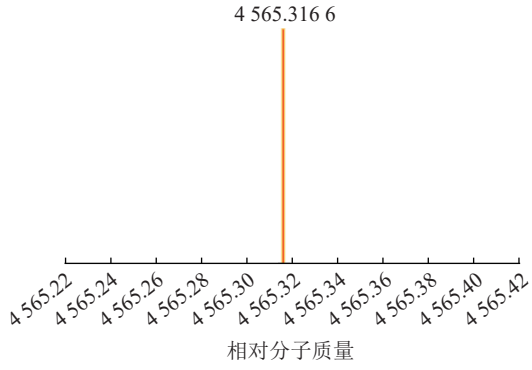


图 9 酶切产物 ACTH 的质谱分析

Fig.9 Mass Spectrogram of Enzyme Catalyzed Product ACTH

化[11]，结果显示在上样早期阶段即有酶活性存在于流穿液，表明该条件下 CM 柱对 Ulp1 的吸附载量较低，其原因可能是所用纯化缓冲液的 pH 值为 5.80，与 Ulp1 等电点（7.14）较近，蛋白所带正电荷较少导致其与 CM 填料间的吸附力较弱。因此为了克服现有制备工艺中存在的诸多不足，本研究在 Ulp1 的 N 端添加一个酸性标签蛋白后进行融合表达，使蛋白等电点由 7.14 下降至 4.33，以便于匀浆液澄清和离子交换纯化。融合标签蛋白还可增加 Ulp1 蛋白的溶解度，减少工艺处理过程中的蛋白聚集和失活。通过对发酵、澄清等步骤的工艺参数进行优化，建立了一条发酵表达产量高、纯化工艺简便的 S13-Ulp1 融合蛋白制备工艺。优化后发酵产量达到了 2.34 g/L，下游分离纯化总收率为 64%，纯度约 95%。经酶切试验验证，S13-Ulp1 融合蛋白具有与 Ulp1 相同的特异性，可高效地酶切 SUMO 标签，获得目的多肽。本研究可为大规模生产 Ulp1 奠定基础。

参考文献：

[1] PANAVAS T, SANDERS C, BUTT T R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, **497**: 303-317.

[2] BUTT T R, EDAVETTAL S C, HALL J P, *et al*. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins [J]. *Protein Expr Purif*, 2005, **43**(1): 1-9.

[3] MALAKHOV M P, MATTERN M R, MALAKHOVA O A, *et al*. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins [J]. *J Struct Funct Genomics*, 2004, **5**(1/2): 75-86.

[4] 缪 语, 赵文博, 李 青, 等. SUMO特异性蛋白酶家族的结构、分布、功能和调控[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2014, **34**(11): 1683-1687.

[5] KUO D, NIE M, COUREY A J. SUMO as a solubility tag and *in vivo* cleavage of SUMO fusion proteins withUlp1 [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, **1177**: 71-80.

[6] 陈兴华, 李校堃, 苏志坚, 等. SUMO蛋白酶活性片段的表达、纯化及活性测定[J]. 中国生物工程杂志, 2007, (3): 34-41.

[7] 周 旋. 酵母SUMO和SUMO蛋白酶在大肠杆菌中的高效表达[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2016.

[8] 李诗洁, 杨艳坤, 刘 萌, 等. SUMO蛋白酶Ulp1的高效表达纯化并通过His-SUMO标签制备scFv[J]. 中国生物工程杂志, 2018, **38**(3): 51-61.

[9] 张叶明, 付正豪, 陈云雨. 重组泛素样特异性蛋白酶1在大肠杆菌中的表达条件优化与分离纯化[J]. 锦州医科大学学报, 2020, **41**(6): 1-4.

[10] 傅俊华, 王 琪, 尹杰超, 等. 融合蛋白GST-Ulp1在大肠杆菌中的高效可溶性表达及其活性鉴定[J]. 生物工程学报, 2010, **26**(6): 837-842.

[11] PINA A S, LOWE C R, ROQUE A C. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, **32**(2): 366-381.

[12] 陈 理, 俞昌喜. 重组大肠杆菌高密度发酵工艺进展[J]. 海峡药学, 2011, **23**(3): 15-18.

[13] 冯秀萍, 杜柏榕, 闫东梅, 等. SUMO蛋白酶的发酵和纯化工艺的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2009, **29**(2): 81-86.