

文章编号: 1006-3080(2025)06-0765-09

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250308003

理性设计提高末端脱氧核苷酸转移酶在大肠杆菌中的可溶性表达

吴亚松, 王泽建, 钱江潮

(华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程全国重点实验室, 上海 200237)

摘要: 末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT)是一种非模板依赖性的 DNA 聚合酶, 可催化 DNA 的从头合成, 具有重要的应用价值。为提高重组 TdT 在大肠杆菌中的可溶性表达水平, 采用理性设计策略, 以白喉带鹀(*Zonotrichia albicollis*, Za)来源的鸟类 TdT(ZaTdT)为研究对象, 针对蛋白 N 端线性区域 131~149 位的疏水性氨基酸, 选用酸性、碱性、中性和小侧链 4 类亲水性氨基酸, 对其进行定点突变获得突变体。与野生型重组蛋白 ZaTdT-B 相比, 所获得的 8 个突变体的可溶性表达水平均有所提高, 其中, 以碱性氨基酸精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)分别替换疏水性氨基酸的突变体 TdT-RK 和 TdT-KR 效果最佳, 最适诱导温度从 16 °C 提高至 23 °C, 且酶活未受影响。在摇瓶中诱导表达时, TdT-KR 的可溶性蛋白产量最高, 达到 283.7 mg/L, 较野生型提高了 1.6 倍。在 5 L 发酵罐中, 基于摇瓶诱导条件进行验证, TdT-KR 的可溶性蛋白产量达到 2.7 g/L, 为野生型产量的 2.3 倍, 发酵周期缩短 4 h, 为 TdT 的高效生产奠定了基础。

关键词: 末端脱氧核苷酸转移酶; 理性设计; 疏水性氨基酸; 可溶性表达; 大肠杆菌

中图分类号: Q559

文献标志码: A

末端脱氧核苷酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT)属于 DNA 聚合酶 X 家族, 主要在淋巴细胞发育的早期阶段特异性表达, 并参与 V(D)J 重组过程^[1-3]。TdT 的结构主要由核定位信号(Nuclear Localization Signal, NLS)、BRCT 结构域(BRCA1 C-Terminal domain)和催化结构域 3 部分组成, 其中, NLS 和 BRCT 结构域在非模板依赖的 DNA 延伸反应中不发挥作用^[4]。作为一种独特的非模板依赖性 DNA 聚合酶, TdT 能够在无模板的条件下, 催化游离的脱氧核苷三磷酸(dNTPs)随机延伸至 DNA 的 3'-羟基末端^[5]。这种独特的催化特性使 TdT 成为 DNA 从头合成的理想酶, 在基因合成^[6-7]、数据存储^[8-9]等领域展现出重要的应用价值。

在大肠杆菌表达系统中, TdT 易发生蛋白聚集形成沉淀, 在常规诱导条件下难以获得具有生物活性的 TdT 蛋白。Boule 等^[10]采用过表达 argU tRNA 的策略, 在 15 °C 低温诱导条件下实现了 TdT 的可溶性表达。Chua 等^[11]通过融合小分子泛素相关修饰物(Small Ubiquitin-related Modifier, SUMO)促溶标签的策略, 在 15 °C 低温诱导条件下成功表达了可溶性 TdT, 但未获得理想的可溶性表达水平。Li 等^[12]采用系统性切除鸟类 TdT(ZaTdT) N 端序列的策略, 显著提高了多种来源 TdT 的可溶性表达水平, 其中, 切除 N 端 140 个氨基酸序列获得的 N-140-ZaTdT 突变体产量最高, 在摇瓶中 16 °C 诱导 20 h, 可溶性蛋白产量达到 244.7 mg/L, 进一步通过共表达分子伴侣系

收稿日期: 2025-03-08

基金项目: 祥符实验室项目(XF012022E0100); 上海市科技创新行动计划(23J21900100)

作者简介: 吴亚松(1999—), 男, 河南人, 硕士生, 主要研究方向为酶工程改造。E-mail: 2016233965@qq.com

通信联系人: 钱江潮, E-mail: jiangchaoqian@ecust.edu.cn

引用本文: 吴亚松, 王泽建, 钱江潮. 理性设计提高末端脱氧核苷酸转移酶在大肠杆菌中的可溶性表达[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(6): 765-773.

Citation: WU Yasong, WANG Zejian, QIAN Jiangchao. Enhanced Soluble Expression of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in *Escherichia coli* via Rational Design[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(6): 765-773.

统 groES-groEL (pGro7 质粒), 产量提升至 526.7 mg/L。尽管低温诱导可促进可溶性蛋白表达, 但存在需增加降温成本、发酵周期长等缺点^[13-16]。利用促溶标签的策略则需在蛋白纯化后去除标签, 面临纯化过程复杂、成本高等挑战^[17-18]。因此, 开发高效、可工业化生产的可溶性 TdT 制备方法仍是一个亟待解决的问题。

为了进一步提高 TdT 的可溶性表达水平, 实现较高诱导温度的高效表达, 并深入探索 N 端序列对 TdT 可溶性表达的影响机制, 本研究选用白喉带鹀 (*Zonotrichia albicollis*, Za) 来源的 ZaTdT 为研究对象, 区别于已报道的 N-140-ZaTdT 截断方式, 选择切除 N 端 130 个氨基酸, 保留一段较长的无规卷曲片段再进行后续优化。通过理性设计, 将蛋白 N 端线性区域 131~149 位的疏水性氨基酸定点突变为亲水

性氨基酸, 成功获得具有高可溶性的突变体 TdT-KR。与野生型重组蛋白 ZaTdT-B 相比, TdT-KR 在 5 L 发酵罐中的最适诱导温度从 16 °C 提高至 23 °C, 发酵周期缩短 4 h, 可溶性蛋白产量为野生型产量的 2.3 倍, 达到 2.7 g/L。此外, TdT-KR 无需标签去除步骤, 显著简化了纯化步骤, 为 TdT 的工业化生产和实际应用提供了重要基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本研究所用表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 购自 Thermo Fisher Scientific 公司, 表达载体 pET28a 由本实验室保存。实验所用引物(表 1)合成和 DNA 测序, 由华大基因公司完成。

表 1 本文使用的引物

Table 1 Primers used in this paper

Primer	Sequence (5' to 3')
ZaTdT-B-F	CGGGATCCTCCCTGCCGCTGAACATG
ZaTdT-B-R	CCCTCGAGTTATGCATTACGTTCCACGGC
TdT-DE-F	ACGAAGATGAGGAAGACCCTGAAGACGAAGACACGAAAGAGAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-DE-R	GGGTCTTCCTCATCTTCGTCGTTCTCAGGGTCGCTGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-ED-F	AAGACGAAGACGAAGACGCCGGACGAGGATGAAACTAAGGACAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-ED-R	GGCTCTTCGTCCTCGTCTTCGTTATCCGGTTCGCTGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-RK-F	CGTAAACGCAAAGAACGTCGGAAGCGCAAACGCACCAAAAAGAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-RK-R	GGACGTTCTTTGCGTTTACGGTTTTTCGGACGAGAGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-KR-F	GCGCAAACGCGAGAAACCGCGTAAGCGTAAAACCAAACGTAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-KR-R	GTTTCTCGCGTTTTCGCTTGTACGCGTTTAGAGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-QN-F	AGAACCAGAACGAACGCCGAACCAGAACCAGACCAAGAACAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-QN-R	GGCTGTTCGTTCTGGTTCTGATTGTTTCGGCTGAGAGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-NQ-F	ACCAGAACCAGGAAAACCCGCGAGAACCAGAATACCAAGCAGAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-NQ-R	GGGTTTTCTGGTTCTGGTTGTTCTGCGGGTTGGAGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-ST-F	GCACCTCTACTGAATCCCCTACCTCCACCTCCACCAAAACCGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-ST-R	GGGGATTTCAGTAGAGGTGCTGTTGGTTCGGAGAGGAGGATCCGCGACCCATTTCG
TdT-TS-F	ACTCCACCTCTGAGACTCCGAGCACTAGCACCACCAATCCAGCCAGTACTCCTGCCAGC
TdT-TS-R	GGAGTCTCAGAGGTGGAAGTGTGCTCGGGGTGCTGGATCCGCGACCCATTTCG

1.2 主要试剂和培养基

DNA 聚合酶购自诺唯赞公司。QuickCut 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、卡那霉素、dNTPs、镍柱(HyPur T Ni-NTA 6FF (His-Tag) 预装重力柱, 1 mL)

均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

细胞裂解缓冲液: 50 mmol/L KH_2PO_4 , 100 mmol/L NaCl, pH 7.2。平衡缓冲液: 50 mmol/L KH_2PO_4 , 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH 7.2。洗脱缓冲液: 50 mmol/L KH_2PO_4 , 100 mmol/L NaCl, 500 mmol/L

咪唑, pH 7.2。蛋白储存缓冲液: 50 mmol/L KH_2PO_4 , 100 mmol/L NaCl, pH 7.2。酶活测定反应混合液: 1 $\mu\text{mol/L}$ 寡核苷酸、1 mmol/L dNTPs、20 mmol/L Tris 缓冲液、50 mmol/L $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ 、6 mmol/L MgCl_2 、0.25 mmol/L CoCl_2 , pH 7.2。

TB(Terrific Broth)培养基: 酵母提取物 24 g/L, 蛋白胨 12 g/L, 甘油 4 mL/L, KH_2PO_4 2.32 g/L, K_2HPO_4 12.54 g/L。5 L 发酵罐中所用初始培养基: KH_2PO_4 6.67 g/L, 酵母提取物 30 g/L, 一水合柠檬酸 3.25 g/L, CaCl_2 0.05 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g/L。

1.3 实验方法

1.3.1 重组质粒和菌株的构建 本研究中, ZaTdT 基因序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 并针对大肠杆菌进行密码子优化。该公司提供质粒 pET28a-ZaTdT, 将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 获得表达菌株。

以 pET28a-ZaTdT 为模板, 通过 PCR(Polymerase Chain Reaction) 扩增获得缺失 BRCT 结构域的 TdT 片段 ZaTdT-B, 编码 131~513 位的氨基酸序列。将扩增产物与 pET28a 质粒分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切, 随后利用 T4 连接酶连接两种酶切产物, 构建表达载体 pET-ZTB。经测序验证无误后, 将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 获得表达菌株, 该菌株在后续实验中作为野生型菌株使用。

以 pET-ZTB 为模板, 采用反向 PCR 技术构建 ZaTdT-B 可溶性突变体。依据大肠杆菌的密码子偏好性设计突变引物, 引入突变位点。经过 PCR 反应获得突变后的核酸序列, 随后进行 *Dpn* I 消化、转化及测序验证, 获得 TDT-DE、TDT-ED、TDT-RK、TDT-KR、TDT-QN、TDT-NQ、TDT-ST 和 TDT-TS 这 8 个突变体。验证无误后, 将正确的转化子转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 获得表达菌株。

1.3.2 诱导表达 摇瓶培养: 将培养好的种子液按 1% 的接种量接种于装有 50 mL TB 培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 的条件下培养, 至菌液浓度 (OD_{600}) 达到约 0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 以启动诱导, 并将培养温度调整为诱导温度。5 L 发酵罐培养: 将培养好的种子液以 6% 的接种量接入装有 3 L 培养基的 5 L 发酵罐中。初始培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 r/min, 通气量为 1 vvm, 并通过流加 0.65 g/mL 葡萄糖进行补料培养, 流加氨水控制 pH 为 7.1。当 OD_{600} 达到 25 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 以启动诱导, 并将培养温度调整为诱导温度。

1.3.3 菌浓的测定 将发酵液稀释适当倍数后, 测定 OD_{600} 。

1.3.4 可溶性蛋白表达水平的测定 离心收集菌体后, 加入适量细胞裂解缓冲液重悬, 随后使用超声破碎仪, 设定功率 110 W 工作 2 s, 间隔 2 s, 总时长 8 min, 进行细胞破碎。将裂解液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 g 离心 10 min, 分离上清与沉淀, 以等体积细胞裂解缓冲液重悬沉淀。取适量上清和沉淀, 加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 沸水浴 10 min 后, 12000 g 离心 5 min, 取上清进行 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 分析。电泳初始电压设置为 80 V, 待样品通过浓缩胶与分离胶界面后, 将电压调整为 120 V, 直至指示剂迁移至凝胶底部。电泳结束后, 采用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 1 h, 随后使用脱色液脱色至背景清晰。使用 ImageJ 软件^[19] 对目的蛋白条带进行灰度分析, 半定量计算目标蛋白量。

1.3.5 蛋白纯化 使用 5 倍柱体积的平衡缓冲液平衡镍柱, 随后进行菌体裂解液上清上样, 待样品全部流出后, 使用平衡缓冲液将未结合在柱子上的杂蛋白洗出, 随后使用洗脱缓冲液洗脱结合在镍柱上的目的蛋白。收集蛋白洗脱液后, 采用 10 kDa 截留分子量的超滤离心管进行浓缩, 随后加入 10 倍体积的蛋白储存缓冲液稀释, 并再次浓缩至目标体积。最终将蛋白样品分装后于液氮中速冻, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.6 TdT 酶活性测定 借鉴 Li 等^[12] 的酶活性测定方法, 在 50 μL 酶活测定反应混合液中加入终质量浓度为 2 mg/mL 的纯化蛋白样品, 启动反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后, 98 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 终止反应。12000 g 离心 5 min, 取适量上清, 以流动相 A(100 mmol/L 三乙胺醋酸缓冲液, pH 7.0) 稀释 5 倍后, 通过高效液相色谱分析(HPLC) 反应混合液中核苷酸的含量。根据同样条件所测得的核苷酸标准曲线, 计算反应消耗的核苷酸速率来表征酶活。色谱柱为 Hypersil BDS C18(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 流动相 A 为 100 mmol/L 三乙胺醋酸缓冲液, pH 7.0, 流动相 B 为乙腈, 按表 2 程序进行梯度洗脱, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL , 流速 1 mL/min。

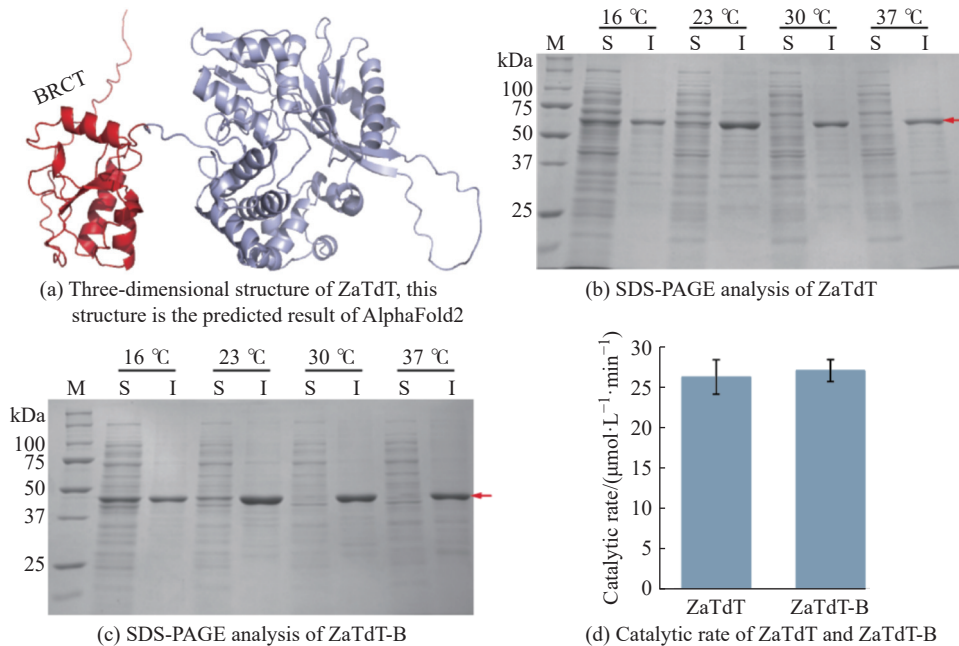
表 2 高效液相色谱洗脱程序
Table 2 Elution procedure of HPLC

t/min	ϕ (mobile phase)/%	
	A	B
0	90	10
15	90	10
20	40	60
30	40	60
35	90	10
37	90	10

2 结果与讨论

2.1 去除 N 端 BRCT 结构域获得截短型蛋白酶 ZaTdT-B

分子量较小的酶具有合成代谢负担小^[20]、扩散性强^[21]、更适用于纳米限域反应^[22]等优势,鉴于 TdT N 端 BRCT 结构域不参与非模板依赖的 DNA 延伸反应^[4],我们切除 ZaTdT 的 BRCT 结构域(图 1(a)),获得截短型蛋白酶 ZaTdT-B(131~513 位)。以 pET28a 为载体,构建 ZaTdT 和 ZaTdT-B 的重组表达质粒,转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达。分析胞内蛋白表达可发现,去除 BRCT 结构域对蛋白表达影响不大,16 °C 诱导时,近一半的酶以沉淀形式存在,随着诱导温度升高至 30 °C,超过 90% 的酶以包涵体形式存在(图 1(b), (c))。纯化后测定两种酶的活性(图 1(d)),酶活无明显变化。



S is the soluble sample of cell lysates; I is the insoluble sample; Target proteins are indicated by red arrows; Samples were induced at 16 °C (16 h), 23 °C (12 h), 30 °C (8 h) and 37 °C (8 h)

图 1 截短型蛋白酶 ZaTdT-B 的设计和表达

Fig. 1 Design and expression of the truncated protein ZaTdT-B

2.2 可溶性突变体的筛选及表达

通过 SDS-PAGE 分析 16 °C 诱导时 8 个突变体的表达(图 3(a)), 并采用 ImageJ 软件对目标蛋白条带进行灰度分析, 半定量测定可溶性蛋白比例(图 3(b))。ZaTdT-B 的可溶蛋白比例为 52.4%, 8 个突变体的可溶性表达水平较野生型均有所提高, 达到 65% 以上。其中, 以碱性氨基酸 Arg 和 Lys 替换 N 端线性

2.2 理性设计 ZaTdT-B 的可溶突变体

研究表明, 蛋白的 N 端序列对其可溶性表达具有显著影响^[23-24], 通过将 N 端序列中的疏水性氨基酸替换为亲水性氨基酸, 有可能提高蛋白酶的可溶性表达水平^[25]。为选择合适的亲水性氨基酸, 并避免单一氨基酸重复对蛋白质正确折叠的潜在影响, 基于氨基酸侧链的电荷特性和空间结构特征, 将亲水性氨基酸分为 4 类, 从每类中选取亲水性最强的两个代表性氨基酸进行交替替换: 酸性氨基酸(天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)), 碱性氨基酸(精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)), 中性氨基酸(谷氨酰胺(Gln)、天冬酰胺(Asn)) 以及小侧链氨基酸(丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr))。ZaTdT-B N 端线性区域 131~149 位氨基酸序列为无规卷曲, 无需维持稳定构象, 且富含疏水性氨基酸, 易引起蛋白聚集。针对该区域的 12 个疏水性氨基酸(图 2), 分别采用上述 4 类亲水性氨基酸进行系统性的替换, 设计 8 个突变体(表 3)。

区域疏水性氨基酸后, 突变体 TdT-RK 和 TdT-KR 的可溶性蛋白比例最高, 达到 95% 左右。经镍柱亲和层析纯化得到 TdT-RK 和 TdT-KR, 用于催化 dNTPs 的延伸反应, 它们的活性与 ZaTdT-B 相比无明显差异(图 3(c))。实验结果表明, 将蛋白 N 端疏水性氨基酸替换为亲水性氨基酸可有效提高其可溶性表达水平, 其中碱性氨基酸替换策略效果最显著, 酸性氨

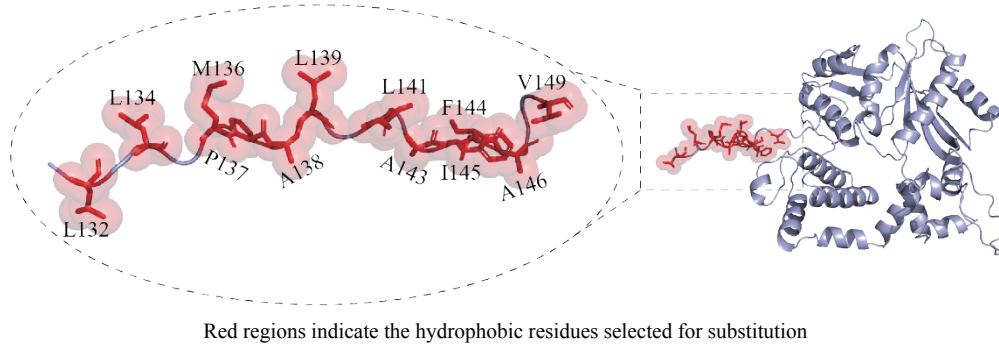


图 2 ZaTdT-B 的三维结构

Fig. 2 Three-dimensional structure of ZaTdT-B

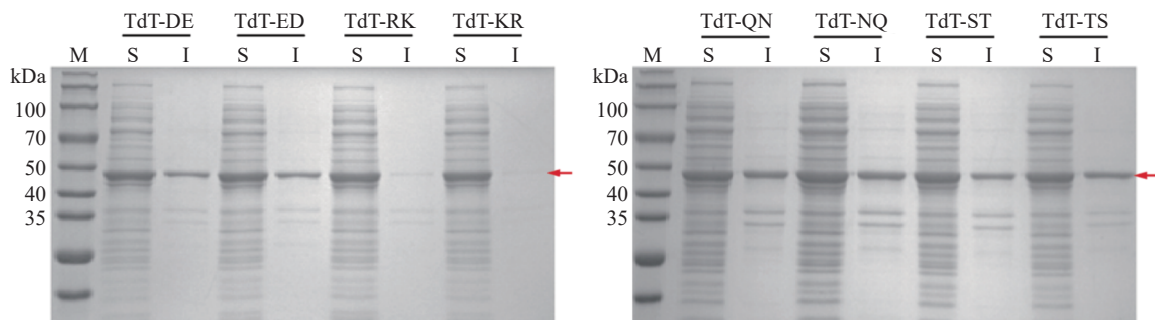
表 3 ZaTdT-B 突变体的 N 端突变区域氨基酸序列

Table 3 Amino acid sequences in the N-terminal region of ZaTdT-B mutants

TdT	Amino acid sequence(131—149)
ZaTdT-B	SLPLNMPALEMPAFIATKV
TdT-DE	SDPENDEDEEDPEDEDTKE
TdT-ED	SEPDNEDEDEEPEDETKD
TdT-RK	SRPKNRKRKERPKRKRKTKK
TdT-KR	SKPRNKRKRKREKPRKRKTKR
TdT-QN	SQPNNQNQNEQPNQNQTKN
TdT-NQ	SNPQNNQNQENPNQNQNTKQ
TdT-ST	SSPTNSTSTESPTSTSTKT
TdT-TS	STPSNTSTSETPSTSTTKS

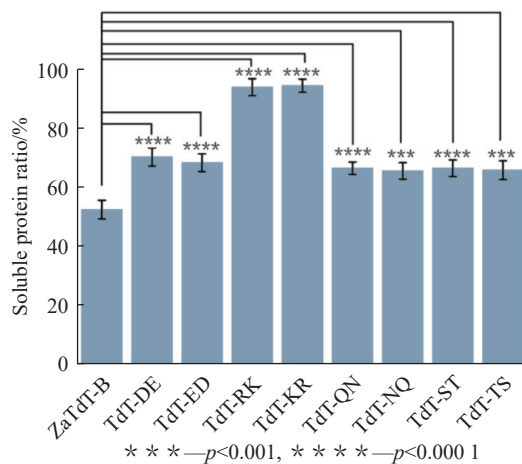
基酸次之。通过 pymol 计算 131~149 位序列的净电荷, ZaTdT-B 的净电荷为 0, 经酸性氨基酸替换的突变体 TdT-DE 和 TdT-ED 净电荷变为 -11 e, 而碱性氨基酸替换突变体 TdT-RK 和 TdT-KR 静电荷变为 +12 e。酸性和碱性氨基酸替换引入的电荷增强了蛋白分子间的静电排斥作用, 可能有助于减少蛋白聚集, 使得蛋白可溶性提高, 而碱性氨基酸较长的侧链更易嵌入疏水核心, 可以更有效地抑制蛋白聚集^[26]。

进一步考察 TdT-RK 和 TdT-KR 在不同诱导温度时的表达, 结果如图 4 所示。由图 4(a) 可得, 16 °C 诱导时, 两种蛋白几乎均为可溶性表达, 蛋白可溶性

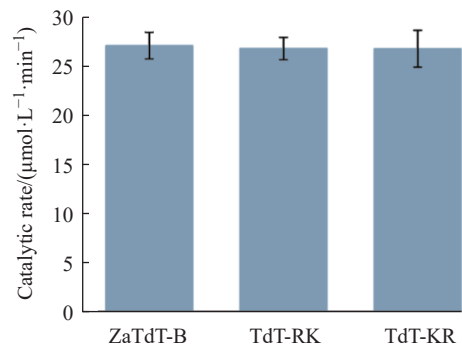


S is the soluble sample of cell lysates; I is the insoluble sample; Target proteins are indicated by red arrows

(a) SDS-PAGE analysis of soluble mutants induced at 16 °C



(b) Grayscale analysis of the soluble protein ratio in mutants



(c) Catalytic rate of TdT-RK and TdT-KR

图 3 可溶性突变体的筛选

Fig. 3 Screening for soluble mutants

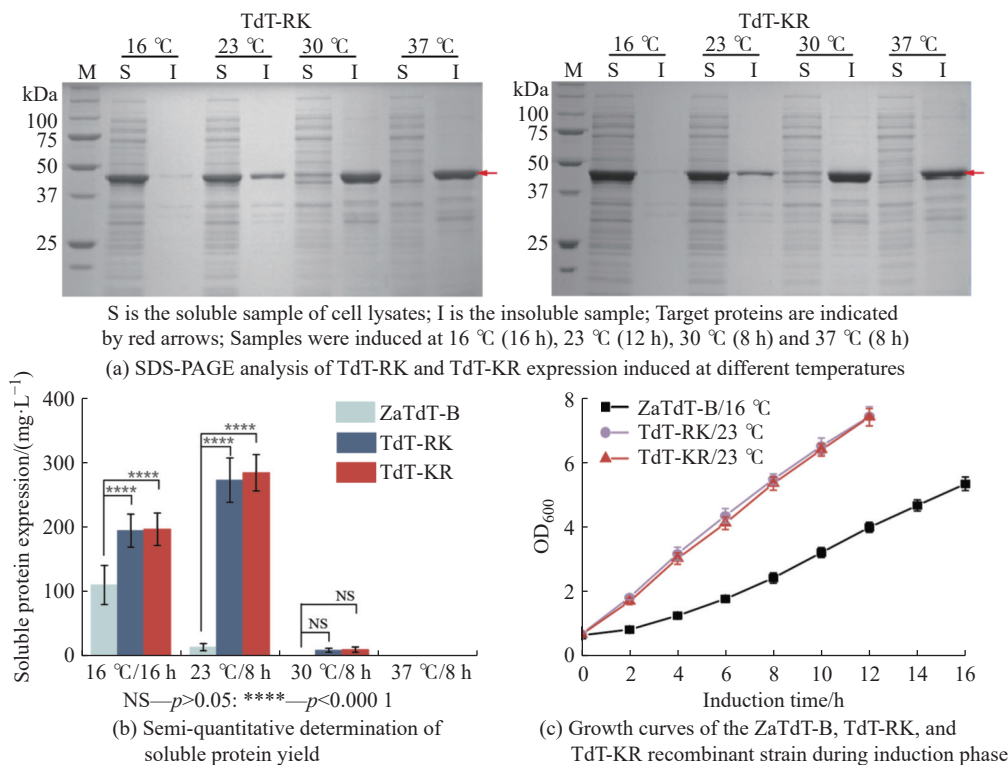


图 4 诱导温度对 TdT-RK 和 TdT-KR 可溶性表达的影响

Fig. 4 Effect of induction temperature on the soluble expression of TdT-RK and TdT-KR

明显高于 ZaTdT-B(图 1(c))。诱导温度提高到 23 °C 时, TdT-RK 和 TdT-KR 的可溶性蛋白比例可分别下降为 71.43% 和 75.25%。当诱导温度升高至 30 °C 时, 超过 90% 的蛋白以沉淀形式存在。可溶性蛋白半定量分析表明(图 4(b)), TdT-KR 在 23 °C 诱导时产量最高, 达到 283.7 mg/L, 较野生型提高 1.6 倍。此外, 23 °C 诱导显著提升了 TdT-KR 重组菌的生长速率, 诱导周期较 ZaTdT-B 的 16 °C 缩短 4 h(图 4(c))。Li 等^[12]通过切除 ZaTdT N 端 140 个氨基酸获得 N-140-ZaTdT 突变体, 在摇瓶培养中 16 °C 诱导 20 h, 可溶性蛋白产量达到 244.7 mg/L。相较于 N-140-ZaTdT, 本研究获得的突变体 TdT-KR 可在 23 °C 的较高温度条件下实现高效表达, 更具应用优势。ZaTdT-B 较 N-140-ZaTdT 多出的 131~140 位氨基酸序列中富含疏水性氨基酸, 易形成聚集位点, 导致 ZaTdT-B 在表达时易形成沉淀。而 TdT-KR 将 ZaTdT-B N 端线性区域 131~149 位的疏水性氨基酸替换为带有正电荷的碱性氨基酸, 在减少蛋白表面聚集位点的基础上, 通过静电斥力进一步抑制蛋白聚集, 这一机制可能是 TdT-KR 的可溶性表达水平高于 N-140-ZaTdT 的原因^[26]。

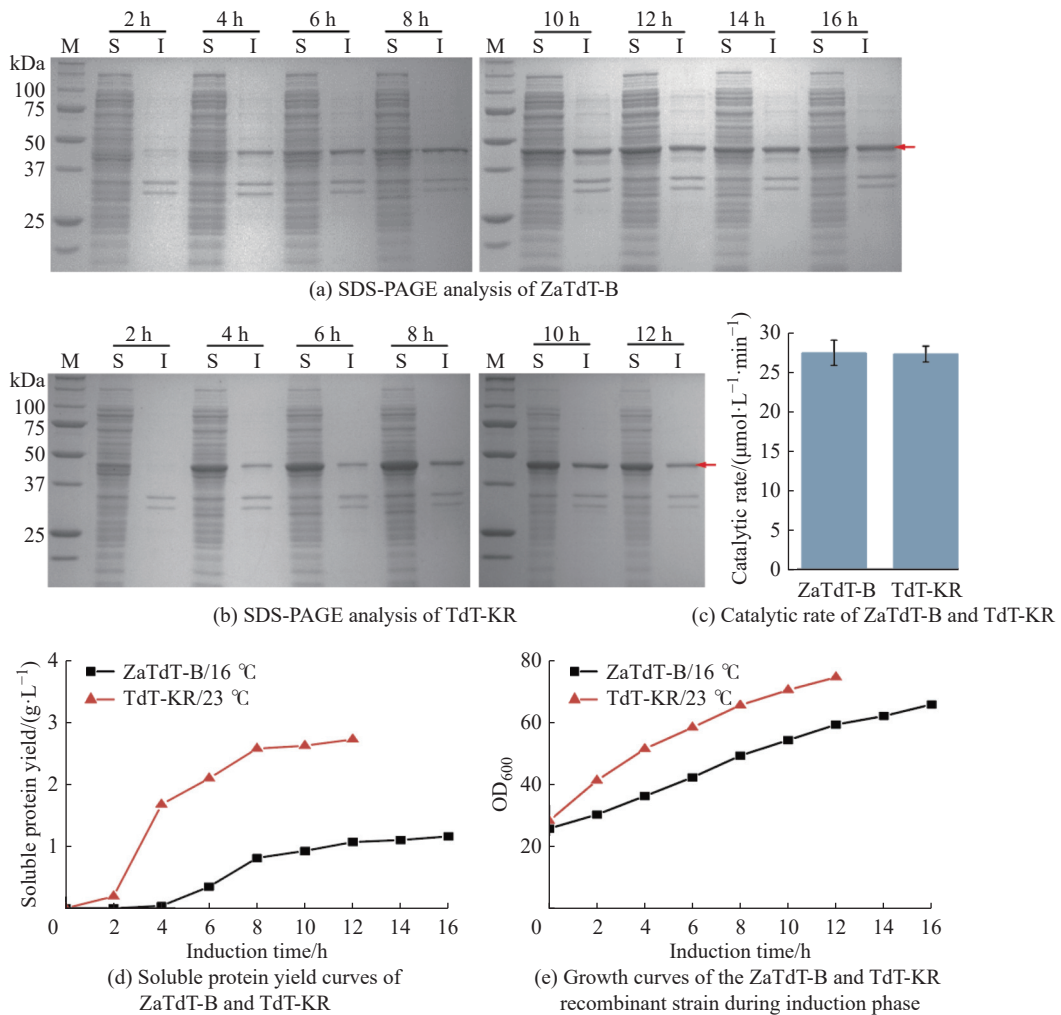
2.4 5 L 发酵罐验证 TdT-KR 可溶性表达

基于摇瓶诱导条件, 在 5 L 发酵罐中验证 TdT-KR 的表达水平, 结果如图 5 所示。ZaTdT-B 只能在

16 °C 诱导, 随着诱导的进行, 在 4 h 可观察到目的蛋白条带, 约 50% 为沉淀, 后续蛋白产量增加, 诱导 12 h 达到峰值, 但可溶性蛋白比例基本保持不变(图 5(a))。在 23 °C 诱导 4 h 时, 大部分 TdT-KR 均为可溶性蛋白, 随诱导时间延长, 蛋白产量显著增加, 在 8 h 达到最高水平, 这时蛋白沉淀也略有增加(图 5(b))。经分离纯化后, 用于催化 dNTPs 的延伸反应, 它们的活性与摇瓶结果相比无明显差异(图 3(d), 5(c))。对电泳结果进行半定量分析, ZaTdT-B 经 16 °C 诱导 16 h, 可溶性蛋白产量为 1.16 g/L, 而 TdT-KR 在 23 °C 诱导 12 h 后可溶性蛋白产量达到 2.7 g/L, 为 ZaTdT-B 产量的 2.3 倍(图 5(d))。此外, 较高的诱导温度使 TdT-KR 重组菌快速生长和合成外源蛋白, 发酵周期较 ZaTdT-B 重组菌缩短了 4 h(图 5(e)), 显著提高了可溶性 TdT 的生产效率。TdT-KR 具有诱导温度高、发酵周期短、产量高等优势, 更适合大规模工业化生产, 通过进一步优化发酵工艺参数、改进分离纯化策略, 有望实现更高的蛋白产量。

3 结论

针对 ZaTdT 等 TdT 可溶性表达水平低的问题, 在去除 N 端 BRCT 结构域不影响截短型突变体 ZaTdT-B 活性的基础上, 对其 N 端线性区域(131~



S is the soluble sample of cell lysates; I is the insoluble sample; Target proteins are indicated by red arrows

图 5 TdT-KR 和 ZaTdT-B 在 5 L 发酵罐中的表达水平

Fig. 5 Expression level of TdT-KR and ZaTdT-B in a 5 L fermenter

149 位) 的 12 个疏水性氨基酸进行定点突变, 分别替换为酸性、碱性、中性及小侧链 4 类亲水性氨基酸, 获得了可溶性提高的 8 种突变体。其中, 采用碱性氨基酸(Arg 和 Lys) 替换疏水氨基酸所得的 TdT-KR 突变体效果最好, 在保持原有酶活性的同时, 摇瓶培养中可溶性蛋白产量达到 283.7 mg/L, 较 ZaTdT-B 提高 1.6 倍; 在 5 L 发酵罐规模下, 产量进一步提升至 2.7 g/L, 为 ZaTdT-B 最高产量的 2.3 倍, 发酵周期从 16 h 缩短到 12 h。目前所报道的最高水平采用分子伴侣系统共表达 N-140-ZaTdT^[12], 在摇瓶培养中 16 °C 诱导 20 h, 可溶蛋白产量达到 526.7 mg/L。与之相比, 本研究开发的 TdT-KR 突变体在 5 L 发酵罐规模, 可溶性蛋白产量达到 2.7 g/L, 提高了 3.78 倍, 诱导周期缩短了 8 h, 具有可溶性表达水平高、发酵周期短等显著优势, 为 TdT 的工业化生产奠定了基础。此外, 该策略可进一步拓展应用于其他 TdT 酶的改造, 在 DNA 从头合成和数据存储等前沿应用领

域具有重要发展潜力。

参考文献:

[1] MOTEA E A, BERDIS A J. Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymerase[J]. *Biochimica & Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2010, 1804(5): 1151-1166.

[2] GILFILLAN S, DIERICH A, LEMEURE M, et al. Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire[J]. *Science*, 1993, 261(5125): 1175-1178.

[3] KOMORI T, OKADA A, STEWART V, et al. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes[J]. *Science*, 1993, 261(5125): 1171-1175.

[4] DELARUE M, BOULE J B, LESCAR J, et al. Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: Murine terminal deoxynucleotidyltransferase[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(3): 427-439.

- [5] JENSEN M A, DAVIS R W. Template-independent enzymatic oligonucleotide synthesis (TiEOS): Its history, prospects, and challenges[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(12): 1821-1832.
- [6] PALLUK S, ARLOW D H, DE ROND T, *et al.* De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(7): 645-650.
- [7] LU X, LI J, LI C, *et al.* Enzymatic DNA synthesis by engineering terminal deoxynucleotidyl transferase[J]. *ACS Catalysis*, 2022, 12(5): 2988-2997.
- [8] LEE H H, KALHOR R, GOELA N, *et al.* Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2383.
- [9] LEE H, WIEGAND D J, GRISWOLD K, *et al.* Photon-directed multiplexed enzymatic DNA synthesis for molecular digital data storage[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5246.
- [10] BOULE J B, JOHNSON E, ROUGEON F, *et al.* High-level expression of murine terminal deoxynucleotidyl transferase in *Escherichia coli* grown at low temperature and overexpressing argU tRNA[J]. *Molecular Biotechnology*, 1998, 10(3): 199-208.
- [11] CHUA J P S, GO M K, OSOTHPRAROP T, *et al.* Evolving a thermostable terminal deoxynucleotidyl transferase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(7): 1725-1735.
- [12] LI A N, SHI K, ZENG B B, *et al.* Enhancing the expression of terminal deoxynucleotidyl transferases by N-terminal truncation[J]. *Biotechnology Journal*, 2024, 19(9): e2400226.
- [13] DE GROOT N S, VENTURA S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(27): 6471-6476.
- [14] PETERNEL S, GRDADOLNIK J, GABERC-POREKAR V, *et al.* Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins[J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7: 1-9.
- [15] GUTIERREZ-GONZALEZ M, FARIAS C, TELLO S, *et al.* Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 16850.
- [16] 夏祯, 赵兴聪, 王学东. 重组大肠杆菌表达豹蛙酶发酵培养基和发酵条件的优化[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2021, 47(5): 592-597.
- [17] SILVA F S R, SANTOS S P O, MEYER R, *et al.* In vivo cleavage of solubility tags as a tool to enhance the levels of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(11): 4159-4167.
- [18] NGUYEN M T, KRUPA M, KOO B K, *et al.* Prokaryotic soluble overexpression and purification of human VEGF165 by fusion to a maltose binding protein tag[J]. *Plos One*, 2016, 11(5): e0156296.
- [19] SCHNEIDER C A, RASBAND W S, ELICEIRI K W. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 671-675.
- [20] SNOECK S, GUIDI C, DE MEY M. "Metabolic burden" explained: Stress symptoms and its related responses induced by (over)expression of (heterologous) proteins in *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 96.
- [21] RIEDEL C, GABIZON R, WILSON C A, *et al.* The heat released during catalytic turnover enhances the diffusion of an enzyme[J]. *Nature*, 2015, 517(7533): 227-230.
- [22] VÁZQUEZ-GONZÁLEZ M, WANG C, WILLNER I. Biocatalytic cascades operating on macromolecular scaffolds and in confined environments[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 256-273.
- [23] PENG S L, DING Y, XIANG M H, *et al.* Enhanced soluble expression and characterization of human N-acetylglucosaminyltransferase IVa in *Escherichia coli*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2024, 181: 110524.
- [24] SUN W, XIE J, LIN H, *et al.* A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies[J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 83(1): 21-29.
- [25] LI M, TANG H, QING R, *et al.* Design of a water-soluble transmembrane receptor kinase with intact molecular function by QTY code[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4293.
- [26] LOUROS N, SCHYMKOWITZ J, ROUSSEAU F. Mechanisms and pathology of protein misfolding and aggregation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(12): 912-933.

Enhanced Soluble Expression of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in *Escherichia coli* via Rational Design

WU Yasong, WANG Zejian, QIAN Jiangchao

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) is a unique DNA polymerase that catalyzes template-independent DNA synthesis. This distinctive enzymatic property makes TdT highly valuable for various biotechnological applications, particularly in *de novo* gene synthesis and data storage. To enhance the soluble expression of recombinant TdT in *Escherichia coli*, a rational design approach was employed. Hydrophobic residues in the *Zonotrichia albicollis* TdT N-terminal region (positions 131—149) were systematically replaced with four categories of hydrophilic amino acids (acidic, basic, neutral, and small side chains) using site-directed mutagenesis. Comparative analysis revealed that all eight engineered variants exhibited significantly higher soluble expression levels than the wild-type enzyme. Notably, the TdT-RK and TdT-KR mutants, in which hydrophobic residues were substituted with basic amino acids (arginine and lysine), demonstrated the most substantial improvements. The optimal induction temperature was increased from 16 °C to 23 °C while preserving full enzymatic activity. In shake-flask induction experiments, the TdT-KR variant achieved the highest soluble protein yield at 283.7 mg/L, a 1.6-fold increase compared to the wild-type. When scaled up to a 5 L bioreactor under optimized conditions derived from shake-flask experiments, the TdT-KR variant achieved a remarkable soluble protein yield of 2.7 g/L, representing a 2.3-fold enhancement over the wild-type protein. Additionally, the fermentation process was more efficient, reducing the production cycle by 4 h. These significant improvements provide a strong foundation for the large-scale industrial production of TdT.

Key words: terminal deoxynucleotidyl transferase; rational design; hydrophobic amino acid; soluble expression; *Escherichia coli*

(责任编辑: 王晓丽)