



## 研究报告

## 6-羟基烟酸 3-单加氧酶 NicC 的纯化与结晶

郭丽华 唐鸿志 吴更\*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

**摘要:**【背景】含氮杂环吡啶化合物是重要的环境污染物之一，在人体内长期积累会导致肿瘤/畸胎等疾病，利用微生物降解含氮杂环化合物是一种非常有效的途径。【目的】在大肠杆菌中克隆表达 6-羟基烟酸 3-单加氧酶基因 *nicC*，纯化重组 NicC 蛋白并进行结晶条件的研究。【方法】以恶臭假单胞菌 KT2440 为模板对 *nicC* 基因进行 PCR 扩增，构建重组表达载体 pET28a-*nicC*，在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中诱导表达，利用亲和层析和凝胶过滤层析纯化重组蛋白。利用悬滴扩散法对 NicC 蛋白进行结晶条件筛选和优化。【结果】成功构建重组质粒 pET28a-*nicC* 并纯化获得达到结晶纯度的 NicC 蛋白。通过结晶条件初筛和正交优化实验发现，NicC 蛋白的最佳结晶条件为：0.2 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 31% PEG4000, 0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 4 °C；SeMet-NicC 蛋白和 NicC 与 6-HNA 共晶的最佳结晶条件为：0.2 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.9, 31% PEG3350, 4 °C。【结论】NicC 蛋白纯化体系的构建和结晶条件的研究为最终解析 NicC 蛋白三维结构提供了有利条件，为揭示吡啶环 β 位单加氧酶识别含吡啶环底物并催化底物的吡啶环上 β 位羟基化的分子机理奠定了基础。

关键词：NicC 蛋白，重组表达，蛋白纯化，结晶初筛，晶体优化

## Purification and crystallization of 6-hydroxynicotinic acid 3-monooxygenase NicC

GUO Li-Hua TANG Hong-Zhi WU Geng\*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Background] N-heterocyclic aromatic compounds (NHACs) are one of the important environmental pollutants. Long-term accumulation in the human body can lead to diseases. The degradation of N-heterocyclic aromatic compounds by microorganism is an effective approach. [Objective] The 6-hydroxynicotinic acid 3-monooxygenase gene *nicC* was cloned and expressed in *Escherichia coli*, the NicC protein was purified and the crystallization conditions were studied. [Methods] The *nicC* gene was amplified from the genomic DNA of *Pseudomonas putida* KT2440 and a recombinant expression vector pET28a-*nicC* was constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3). Affinity and gel filtration chromatography were used to purify NicC. The preliminary screening and optimization of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31670106)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34205914; E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn

Received: 16-12-2019; Accepted: 07-02-2020; Published online: 06-05-2020

基金项目：国家自然科学基金(31670106)

\*通信作者：Tel: 021-34205914; E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn

收稿日期：2019-12-16; 接受日期：2020-02-07; 网络首发日期：2020-05-06

crystals were done by using hanging drop diffusion method. **[Results]** The pET28a-*nicC* was constructed successfully and the purified NicC protein was obtained. Through preliminary screening of crystallization conditions and orthogonal optimization experiments, the optimal crystallization conditions were 0.2 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 31% PEG4000, 0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 4 °C for NicC, and 0.2 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.9, 31% PEG3350, 4 °C for SeMet-NicC and cocrystals of NicC and 6-HNA. **[Conclusion]** The construction of NicC protein purification system and study of crystallization conditions provided favorable conditions for the final analysis of the three-dimensional structure of NicC protein. The results laid a foundation for revealing the molecular mechanism of the pyridine ring to β-position monooxygenase to recognize the pyridine ring-containing substrate and catalyze the hydroxylation of β-position on the pyridine ring of the substrate.

**Keywords:** NicC, Recombinant expression, Protein purification, Preliminary crystallization, Crystal optimization

含氮杂环芳香化合物(N-heterocyclic aromatic compounds, NHACs)是工业溶剂、染料、药物以及杀虫剂的重要成分,通过人类活动进入环境,给地下水和土壤带来严重的污染<sup>[1]</sup>。研究表明,NHACs对有机体有诱导突变甚至致癌的风险,因此,寻找有效途径降解环境中的含氮杂环化合物对于维护人类健康及保护生态环境具有重要意义<sup>[2-5]</sup>。近年来研究发现,NHACs通过生物酶(羟基化酶/单加氧酶/氧化还原酶)的氧化还原过程降解成无害甚至有用的分子<sup>[6]</sup>。

烟酸作为NHACs的模型,经常被用来研究微生物降解这类化合物的机理。在恶臭假单胞菌KT2440中,烟酸在羟基化酶NicAB作用下首先转化为6-羟基烟酸(6-HNA),随后6-HNA在6-羟基烟酸3-单加氧酶NicC作用下通过氧化脱羧反应进一步被氧化成2,5-二羟基吡啶(2,5-DHP),最后通过NicX/NicD/NicF/NicE的作用降解为延胡索酸(图1)<sup>[7-10]</sup>。其中,NicC是黄素依赖性单加氧酶,以FAD为辅基,以NADH为辅酶,但是NicC重组蛋白纯化和结构生物学方面的研究尚不十分明确,因此,研究NicC的结构对于揭示吡啶环β位单加氧酶识别含吡啶环底物并催化底物的吡啶环上β位羟基化的分子机理具有重要的生物学意义。

蛋白质分子是生物体生命活动的物质基础,是当前生命科学极为重要的研究对象。因此,蛋

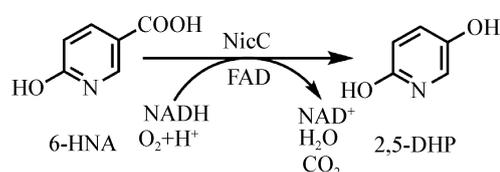


图1 NicC催化6-羟基烟酸生成2,5-二羟基吡啶

Figure 1 The transformation of 6-hydroxynicotinic acid to 2,5-dihydroxypyridine catalyzed by NicC

白质的分离与纯化是当前生命科学研究的热点领域。目前已发展了萃取法、沉淀法、离子交换层析法、分子印迹、膜分离等技术来分离和纯化蛋白质<sup>[11]</sup>。另一方面,解析蛋白质的结构对深入探究其功能具有重要意义,而X射线衍射法是当前蛋白三维结构解析的重要办法,其难点在于高质量单晶的培养<sup>[12]</sup>。

本研究通过构建表达载体和蛋白纯化得到高纯度野生型NicC蛋白和SeMet-NicC蛋白,并通过条件优化得到高质量蛋白单晶。此外,通过优化得到NicC蛋白与底物6-羟基烟酸的共晶,为解析NicC识别底物的分子机制和吡啶环β位羟基化的反应机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌株

质粒pET-28a(+)购自Novogen公司,恶臭假单胞菌株KT2440、*E. coli* DH5α和*E. coli* BL21(DE3)均为本实验室保存。

### 1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

KOD-Neo-plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; 限制性内切酶 *Xho* I / *Nde* I 购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 填料和 ÄKTA prime™ Plus 购自 GE Healthcare 公司; 结晶试剂盒购自 Hampton Research 公司。PCR 仪, 杭州朗基科仪公司。

M9 培养基(g/L): 十二水合磷酸氢二钠 20.0, 磷酸二氢钾 60.0, 氯化铵 20.0, 氯化钠 10.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物设计、目的基因的 PCR 扩增与回收

以恶臭假单胞菌 KT2440 为模板, 利用引物对 1F (5'-GCGCATATGATGCGGGGTAGGCAGAAA-3') 和 1149R (5'-CGCCTCGAGTCATGCCGCTCCCCGCT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1.5  $\mu\text{L}$ , 模板 (100 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , MgSO<sub>4</sub> (25 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2 mmol/L) 5  $\mu\text{L}$ , 10×Buffer 5  $\mu\text{L}$ , KOD plus 酶(1.0 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 68 °C 40 s, 32 个循环; 68 °C 10 min, 4 °C 保存。

### 1.2.2 重组质粒 pET28a-*nicC* 的构建

将 PCR 片段和 pET-28a(+)用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I 进行双酶切, 再用 T4 DNA 连接酶将目的片段和线性化的 pET-28a(+)进行连接。将连接产物热激转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆。菌落 PCR 鉴定后抽提质粒送北京擎科生物科技有限公司测序, 经过 BLAST 比对确认为目标载体 pET28a-*nicC*。

### 1.2.3 NicC 蛋白的表达与纯化

将 pET28a-*nicC* 热激转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 挑取单克隆接入 50 mL 液体 LB 培养基, 培养基中加入终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的卡那霉素, 37 °C、220 r/min 培养过夜。将菌液扩大培养至 1 L, 待菌体 OD<sub>600</sub> 为 0.8–1.0 时, 加入 1 mL 0.4 mol/L 的 IPTG, 16 °C、180 r/min 诱导 16 h。在 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 用 15–20 mL  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 平衡缓冲液(25 mmol/L Tris,

300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑 pH 8.0)重悬菌体, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 PMSF 溶液。

将收集的菌液用高压破碎仪破碎 (800–900 bar, 4 °C, 100 mL/5 min), 4 °C、14 000 r/min 离心 45 min。取上清过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析柱, 然后用  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 平衡缓冲液冲洗柱子, 最后用洗脱液洗脱蛋白, 取 10  $\mu\text{L}$  进行 SDS-PAGE 检测。将质量好的蛋白按照 2 mg 蛋白/1 U 的比例, 用凝血酶 4 °C 过夜切割 His-Tag, SDS-PAGE 检测。再用凝胶过滤层析进一步除杂, 借助 ÄKTA prime™ Plus 收集蛋白洗脱液。UV 检测蛋白质的洗脱情况, 将紫外吸收峰对应的洗脱管分别取样进行 SDS-PAGE 分析, 纯度高且均一性好的蛋白浓缩, 液氮速冻, -80 °C 保存。

### 1.2.4 SeMet-NicC 蛋白的表达和纯化

将 pET28a-*nicC* 热激转化甲硫氨酸缺陷型菌株 *E. coli* B834 感受态细胞, 挑取单克隆接入 50 mL 液体 LB 培养基, 加入终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的卡那霉素, 37 °C、220 r/min 培养过夜。4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 去上清, 用 50 mL M9 培养基重悬, 取 5–10 mL 菌液加入到灭菌的 300 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 同时加入 50 mL M9 培养基, 50 mL 20%的葡萄糖溶液, 50 mL YNB 溶液, 40 mL 19 种氨基酸的混合液, 30 mg 硒代甲硫氨酸粉末, 加入终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的卡那霉素, 37 °C、220 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.9–1.0。16 °C、180 r/min 诱导 16 h, 诱导时补加 10 mL 19 种氨基酸混合液, 20 mg 硒代甲硫氨酸粉末, 1 mL 0.4 mol/L 的 IPTG。需要注意的是, 蛋白洗脱后在洗脱液中加入终浓度为 20 mmol/L 的 DTT, 分子筛缓冲液中的 DTT 浓度增加到 20 mmol/L, 除此之外纯化方法与野生型相同。

### 1.2.5 蛋白结晶优化和 X 射线衍射

选用的结晶方法为悬滴法, 使蛋白溶液与结晶试剂通过气象扩散达到平衡, 形成晶核, 从而长出晶体。具体方法为: 在 24 孔板中加入 200  $\mu\text{L}$  结晶试剂, 在硅化后的玻璃片上加 1  $\mu\text{L}$  蛋白溶液和 1  $\mu\text{L}$  结晶试剂, 将玻璃片反扣在 24 孔板

上,密封。在4℃培养3、7、10、15、30 d后分别在显微镜观察。选取形状好的晶体,加入合适的防冻保护剂冻存在液氮中,用X射线衍射获得晶体数据。

蛋白晶体的优化是基于晶体初筛的条件进行的,影响蛋白质结晶的因素有很多,但是一般根据初筛条件调节结晶试剂的pH值、沉淀剂的种类和浓度及盐的浓度,同时还要调整蛋白质的浓度。本实验结晶试剂的沉淀剂使用的是PEG4000和PEG3350,并设置29%–34%的6个梯度变化,pH值优化使用的是Tris-HCl Buffer Kit (pH 7.8–8.7),采用正交试验对pH、沉淀剂和温度进行优化,确定最适生长条件。

晶体X射线的衍射数据在上海同步辐射光源(Shanghai synchrotron radiation facility, SSRF) BL19U1线站收集。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET28a-nicC 表达载体的构建和鉴定

*nicC* 基因经过PCR扩增之后,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,可以看出在1 000–1 500 bp之间有一条与预期大小(1 149 bp)相符的条带(图2A)。随机挑取平板上的转化子进行菌落PCR检测,4、5、7、8、9号转化子扩增出的片段与阳性对照大小相当,处在1 000–1 500 bp之间(图2B),抽提质粒测序,确定为目标克隆pET28a-nicC。

### 2.2 NicC 蛋白的表达与纯化

Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和层析的SDS-PAGE检测可以看出(图3A),在40、60、80、110、200 mmol/L咪唑洗脱液中45 kD处有条带,与目的蛋白(42.7 kD)大小接近,110 mmol/L和200 mmol/L咪唑洗脱液中NicC纯度较高,未见明显杂带,所以将110 mmol/L和200 mmol/L咪唑洗脱液合并。用凝血酶切除N端的6×His-Tag。凝血酶切除效果用SDS-PAGE检测(图3B),可以看出酶切之后的样品只有一条带,而且酶切之后的蛋白分子量明显比酶切前小,所以可以认为野生型NicC蛋白N端的6×His-Tag被凝血酶切割完全。

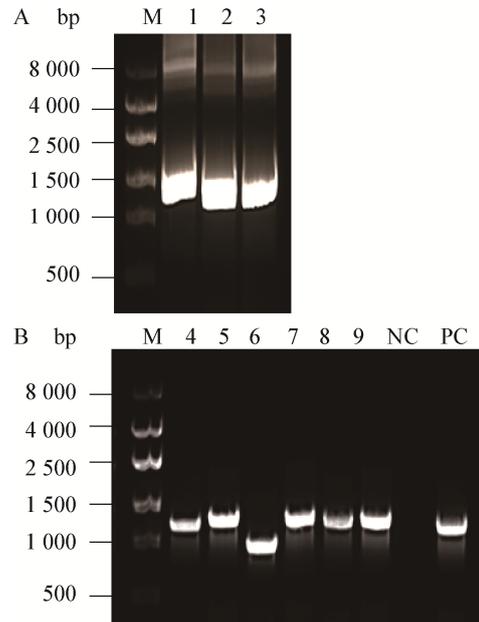


图2 pET28a-*nicC* 表达载体的构建

Figure 2 Construction of pET28a-*nicC* plasmid

注: A: *nicC* 基因的 PCR 扩增; B: 重组载体 pET28a-*nicC* 的菌落 PCR 鉴定。M: 1 kb-II DNA ladder; 1–3: *nicC* 片段; 4–9: pET28a-*nicC* 转化子; NC: 阴性对照; PC: 阳性对照。

Note: A: PCR amplification of *nicC* gene; B: PCR identification of colony of recombinant vector pET28a-*nicC*. M: 1 kb-II DNA ladder; 1–3: *nicC* fragments; 4–9: pET28a-*nicC* transformants; NC: Negative control; PC: Positive control.

凝胶过滤层析结果表明,洗脱体积在70–90 mL(对应洗脱管数为65–73管)左右时有一个明显的紫外吸收峰,峰高350 mAu左右,对称尖细,取紫外吸收峰对应洗脱液进行SDS-PAGE检测(图3C和3D),可以看出蛋白的大小在45 kD左右,与目标蛋白大小一致,纯度高达90%,达到点晶标准。

### 2.3 SeMet-NicC 蛋白的表达与纯化

将 *E. coli* B834 菌体破碎高速离心之后,取上清进行 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和层析,将洗脱液用 SDS-PAGE 检测,所有咪唑洗脱液中都有 SeMet-NicC 蛋白(图4A)。80、110、200、300、500 mmol/L 咪唑洗脱液中杂蛋白较少,所以将其收集起来。用凝血酶切除N端的6×His-Tag,酶切后的 SeMet-NicC 进行 SDS-PAGE 检测,从酶切前后的对比中可以明显看出,酶切后的泳道中只有

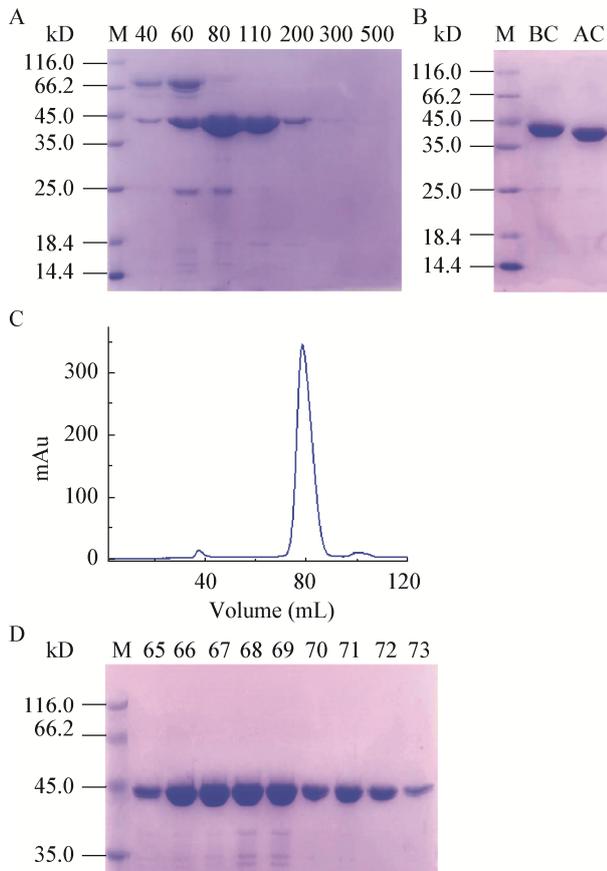


图 3 NicC 蛋白的表达和纯化

Figure 3 The expression and purification of NicC protein

注: A: NicC 蛋白  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析结果; B: 凝血酶酶切 NicC 的 6×His-Tag 结果; C: NicC 凝胶过滤层析的紫外吸收峰; D: 主要紫外洗脱峰所对应的 SDS-PAGE 检测结果. M: 蛋白分子量标准; 40、60、80、110、200、300、500: 洗脱液中咪唑浓度(mmol/L); BC: 酶切前样品; AC: 酶切后样品; 65-73: 紫外吸收峰对应的洗脱管数.

Note: A:  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography results of NicC protein. B: The result of 6×His-Tag of NicC digested by Thrombin. C: The UV absorption peak of NicC gel filtration chromatography. D: The SDS-PAGE result for the main UV elution peaks. M: Marker; 40, 60, 80, 110, 200, 300, 500: The concentration of imidazole (mmol/L); BC: The sample before digestion; AC: The sample after digestion; 65-73: The number of elution tubes corresponding to UV absorption peaks.

一条带, 而且相比切前的样品, 分子量稍小, 说明 SeMet-NicC 蛋白 N 端的 6×His-Tag 被酶切完全(图 4B)。为了进一步除杂, 将 SeMet-NicC 进行凝胶过滤层析, 洗脱体积在 105–123 mL (对应洗脱管为 67–75 管)时有一个明显的紫外吸收峰, 峰高 330 mAu 左右, 吸收峰尖细对称, 将吸收峰对应的

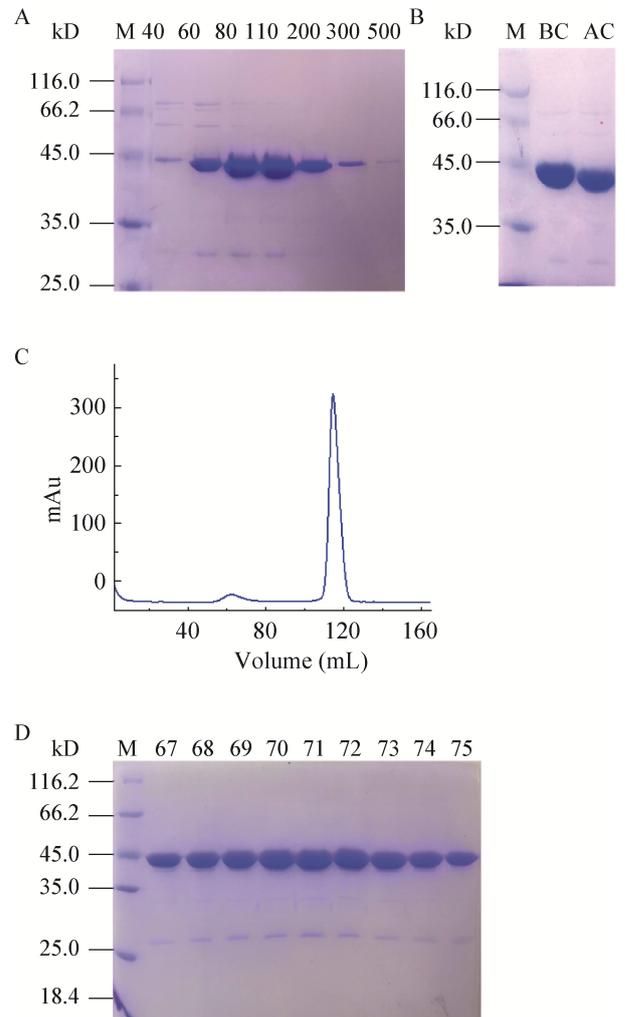


图 4 SeMet-NicC 蛋白的表达和纯化

Figure 4 The expression and purification of SeMet-NicC

注: A: SeMet-NicC 蛋白  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析结果; B: 凝血酶酶切 SeMet 的 6×His-Tag 结果; C: SeMet-NicC 凝胶过滤层析的紫外吸收峰; D: 主要紫外洗脱峰所对应的 SDS-PAGE 检测结果. M: 蛋白分子量标准; 40、60、80、110、200、300、500: 洗脱液中咪唑浓度(mmol/L); BC: 酶切前样品; AC: 酶切后样品; 67-75: 紫外吸收峰对应的洗脱管数.

Note: A:  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography results of SeMet-NicC protein. B: The result of 6×His-Tag of SeMet-NicC digested by Thrombin. C: The UV absorption peak of SeMet-NicC gel filtration chromatography. D: The SDS-PAGE result for the main UV elution peaks. M: Marker; 40, 60, 80, 110, 200, 300, 500: The concentration of imidazole (mmol/L); BC: The sample before digestion; AC: The sample after digestion; 67-75: The number of elution tubes corresponding to UV absorption peaks.

洗脱液用 SDS-PAGE 电泳检测(图 4C 和 4D), 可以明显看出蛋白质的含量高且纯度高, 适合结晶。

#### 2.4 蛋白结晶与 X 射线衍射

经过筛选, 野生型 NicC 蛋白在 Natrix 1 第 48 号结晶试剂中有晶体生长, 结晶条件为: 蛋白浓度 17.5 mg/mL, 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.5, 30% PEG4000, 4 °C。单晶数量多, 细碎如针尖, 均匀地分散在结晶液滴中, 不适合 X 射线衍射, 需要进行进一步优化。

根据初筛条件进一步调整了结晶试剂中沉淀剂的浓度和 pH 值, 在蛋白浓度为 17.5 mg/mL、0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、31% PEG4000、0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.0、4 °C 条件下得到晶体, 相比于初筛条件, 晶体的数量变少, 体积变大, 呈比较粗的杆状(图 5A)。

将结晶溶液中的 PEG4000 换为 PEG3350, 用晶种法对 SeMet-NicC 蛋白进行结晶, 蛋白浓度为 17.5 mg/mL、结晶溶液为 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、

0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.9、31% PEG3350、结晶温度为 4 °C 时得到晶体, 晶体表面光滑, 呈杆状, 体积更大, 更加具有立体感(图 5C)。

用晶种法对 NicC 和 6-HNA 的混合溶液进行结晶, 发现在蛋白浓度为 17.5 mg/mL、结晶溶液为 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.9、31% PEG3350、结晶温度为 4 °C 时有晶体生长, 晶体为亮黄色, 呈细长的杆状, 表面光滑有光泽(图 5E)。

将优化的 NicC 晶体、SeMet-NicC 晶体、NicC 与 6-HNA 的共晶在上海同步辐射光源 BL19U1 进行 X 射线衍射, 衍射图片见图 5B、5D、5F。

### 3 讨论与结论

蛋白质的分离纯化是研究其结构和功能的前提, 也是当前生命科学研究的热点。本实验成功克隆 pET28a-nicC 重组质粒, 并使用  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 亲和层析法和凝胶过滤层析法对所得蛋白进行分离纯化, 得到较高纯度的 NicC/SeMet-NicC 蛋白。

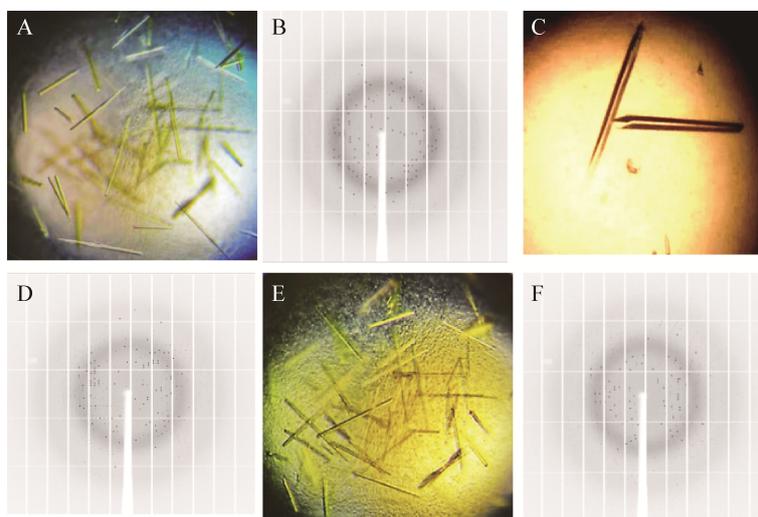


图 5 NicC/SeMet-NicC 和 NicC 与 6-HNA 共晶的晶体照片和 X 射线衍射结果

Figure 5 The photographs and X-ray diffraction results of NicC crystals, SeMet-NicC crystals and cocrystals of NicC and 6-HNA

注: A: NicC 晶体照片; B: NicC 的 X 射线衍射结果; C: SeMet-NicC 晶体照片; D: SeMet-NicC 的 X 射线衍射结果; E: NicC 与 6-HNA 共晶的晶体照片; F: NicC 与 6-HNA 共晶的 X 射线衍射结果。

Note: A: The photograph of NicC crystals; B: The X-ray diffraction results of NicC crystals; C: The photograph of SeMet-NicC crystals; D: The X-ray diffraction results of SeMet-NicC crystals; E: The photograph of cocrystals of NicC and 6-HNA; F: The X-ray diffraction results of cocrystals of NicC and 6-HNA.

NicC 蛋白的 N 端 His-Tag 的摆动会影响蛋白质堆积的稳定性, 进而影响晶体的质量, 加入凝血酶切除 N 端的 His-Tag, 可能会提高晶体的分辨率, 对晶体的优化具有一定的参考价值。X 射线衍射法是目前解析蛋白三维结构最直接的方法, 其难点在于高质量蛋白单晶的获得。本研究通过晶体初筛和条件优化, 确定了 NicC 蛋白的最适结晶条件 (0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 31% PEG4000, 0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 4 °C)。由于 NicC 的同源结构还没有被解析, 无法通过分子置换的方法得到 NicC 的三维结构, 所以尝试获得 SeMet-NicC 的单晶, 以确定衍射过程中丢失的相位。通过结晶条件优化发现 SeMet-NicC 的最佳结晶条件为: 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.9, 31% PEG3350, 4 °C。

蛋白与底物复合物共晶的获得对于揭示蛋白功能具有重要的意义<sup>[13]</sup>。通过条件筛选优化发现, 在 0.2 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.01 mol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.9、31% PEG3350、4 °C 条件下可获得 NicC 与 6-HNA 的共晶。

本研究对烟酸降解途径中的关键酶 NicC 进行了分离和纯化, 得到了高纯度的 NicC 和 SeMet-NicC 蛋白, 并通过结晶条件优化, 得到高质量的 NicC、SeMet-NicC 的单晶和 NicC 与 6-HNA 的共晶, 为解析 NicC 的三维结构并揭示其结构与功能之间的相互关系奠定了基础<sup>[14]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Barnes KK, Kolpin DW, Furlong ET, et al. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 402(2/3): 192-200
- [2] Biradar DP, Rayburn AL. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1995, 24(6): 1222-1225
- [3] Hirao K, Shinohara Y, Tsuda H, et al. Carcinogenic activity of quinoline on rat liver[J]. *Cancer Research*, 1976, 36(2): 329
- [4] Willems MI, Dubois G, Boyd DR, et al. Comparison of the mutagenicity of quinoline and all monohydroxyquinolines with a series of arene oxide, *trans*-dihydrodiol, diol epoxide, *N*-oxide and arene hydrate derivatives of quinoline in the Ames/Salmonella microsome test[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1992, 278(4): 227-236
- [5] Pašková V, Hilscherová K, Feldmannová M, et al. Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their *N*-heterocyclic derivatives[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(12): 3238-3245
- [6] Fetzer S. Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of *N*-heteroaromatic compounds: Molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases[J]. *Naturwissenschaften*, 2000, 87(2): 59-69
- [7] Behrman EJ. The bacterial oxidation of nicotinic acid. *N*-formylmaleamic and *N*-formylfumaramic acids[J]. *Archives of Microbiology*, 1976, 110(1): 87-90
- [8] Jiménez JI, Canales Á, Jiménez-Barbero J, et al. Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the *nic* cluster from *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(32): 11329-11334
- [9] Kincaid VA, Sullivan ED, Klein RD, et al. Structure and catalytic mechanism of nicotinate (Vitamin B<sub>3</sub>) degradative enzyme maleamate amidohydrolase from *Bordetella bronchiseptica* RB50[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(1): 545-554
- [10] Wu G, Chen DD, Tang HZ, et al. Structural insights into the specific recognition of *N*-heterocycle biodenitrogenation-derived substrates by microbial amide hydrolases[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 91(5): 1009-1021
- [11] Labrou NE. Protein Downstream Processing[M]. New York: Humana Press, 2014: 3-10
- [12] Pusey ML, Liu ZJ, Tempel W, et al. Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2005, 88(3): 359-386
- [13] Cheng WY, Yang ZH, Wang SH, et al. Recent development of CDK inhibitors: an overview of CDK/inhibitor co-crystal structures[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 164: 615-639
- [14] Zhang KZ, Wu G, Tang HZ, et al. Structural basis for the transcriptional repressor NicR2 in nicotine degradation from *Pseudomonas*[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 103(1): 165-180