

中国木薯醇腈酶在汉逊酵母中的表达

张冬冬¹ 雷白时¹ 姜军坡¹ 牛振东² 邱并生² 朱宝成^{1*}

(1. 河北农业大学生命科学学院 河北 保定 071001)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100091)

摘要: α -醇腈酶(α -hydroxynitrilelyase, HNL)是手性醇腈化合物生物合成十分有用的工具,能够催化羰基化合物和 HCN 立体选择性的加工形成手性醇腈化合物。应用 PCR 扩增得到 HNL 基因,连接到 pMD18-T 中进行测序,然后通过 *EcoR* I 和 *Not* I 将其连接到汉逊酵母表达载体 pHMOXG α A 中。通过在含有 4 mg/mL 的 G418 的 YPD 培养基上进行筛选获得阳性重组子,用 0.5% 的甲醇诱导 96 h。酶活测定和 SDS-PAGE 分析显示 HNL 在汉逊酵母 NCYC495(leu1.1)中得到正确表达,每毫升发酵液中获得 2.015 U 的醇腈酶。

关键词: 中国木薯醇腈酶, 汉逊酵母, 25S rDNA, 自主复制序列

Expression of Hydroxynitrile Lyase from Chinese Subspecies of *Manihot Esculenta* in *Hansenula Polymorpha*

ZHANG Dong-Dong¹ LEI Bai-Shi¹ JIANG Jun-Po¹ NIU Zhen-Dong²
QIU Bing-Sheng² ZHU Bao-Cheng^{1*}

(1. College of life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract: α -Hydroxynitrilelyase (HNL), a vital tool in the bio-synthesis of optically active cyanohydrin, which can catalyze carbonyls and HCN selective forming optically active cyanohydrin. HNL gene was amplified by PCR using pET30a-HNL as template and then ligated into pMD18-T vector. Validated HNL gene by sequenced was linked into pHMOXG α A vector. Positive recombinants grown in the medium containing 4 mg/mL of G418 were screened using PCR. Bio-active α -hydroxynitrilelyase expressed in *Hansenula polymorpha* after 0.5% methanol induction was obtained with 2.015 U determined by analysis of enzyme activity and SDS-PAGE.

Keywords: Hydroxynitrile lyase from Chinese subspecies of *Manihot esculenta*, *Hansenula polymorpha*, 25S rDNA, *Hansenula* auto-replication sequence

手性醇腈化合物是一类非常重要的手性分子,是制备精细化工、医药、农用化学品的中间体,具有广泛的应用前景^[1,2]。由醇腈酶(HNL)催化的生物

转化法制备手性醇腈化合物,具有不污染环境、效率高、能耗低等优点而倍受关注,从而极大地推动了HNL在结构、酶学性质、催化机理以及分子、基

* 通讯作者: Tel: 86-312-7528258; E-mail: zhu2222@163.com
收稿日期: 2008-10-29; 接受日期: 2009-02-10

因水平和生物转化等方面的研究, 并取得显著的进展。1965 年, Pfeil 等证实从杏仁提取的粗酶制品能催化苯甲醛与HCN合成右旋扁桃腈^[3], 此后大量的实验证据和不断的新发现, 使人们对HNL产生了极大的关注。

近年来, 人们一直把汉逊酵母作为细胞工厂表达外源基因特别是真核生物基因的理想宿主^[4], 是一种优于大肠杆菌和其他酵母的外源基因表达系统, 已得到广泛关注。尤其在分泌表达中, 外源蛋白通过分泌途径可完成蛋白水解成熟、糖基化修饰和二硫键形成等翻译后加工过程, 使所表达的蛋白更接近具有生物活性的天然蛋白形式^[5]。

本研究通过PCR方法克隆HNL基因, 连接到汉逊酵母分泌表达载体 pHMOXGaA 中, 并引入 25S rDNA 和 HARS 等重组序列, 电击转化汉逊酵母, 用 0.5%甲醇诱导 96 h, 获得了具有生物活性的木薯醇腈酶。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: pET30a-HNL 由中国科学院微生物研究所孙万儒研究员惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 和汉逊酵母表达载体 pHMOXGaA 由本实验室保存, *Hansenula polymorpha* NCYC495(leu1.1)由荷兰格罗宁根大学(University of Groningen, Netherland)的 Jan Kiel 博士惠赠。

1.1.2 酶和试剂: Ex Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、pMD18-T vector、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa, Expand high-fidelity PCR system 购自 Roche, DNA 回收试剂盒购自 Gene, G418 购自 Invitrogen, (dl)-扁桃腈购自 Fluka, 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: LB、YPD 培养基参考文献[6]配制。

1.2 方法

1.2.1 基因操作: DNA 分子克隆技术和分析表达水平的 SDS-PAGE 参考文献[6]进行。

1.2.2 转化方法: 大肠杆菌和汉逊酵母的转化分别参考文献[7]和[8]进行。

1.2.3 工程菌的培养及诱导表达: 将电击转化后的培养物吸取 0.1 mL 涂布于含有 0.2 mg/mL G418 抗生素的 YPD 培养基, 28°C 恒温培养箱中培养 3 d。

挑取十几个菌落到装有 0.2 mL 新鲜 YPD 培养基的 eppendorf 管里, 混合均匀, 吸取 0.05 mL 接种到 5 mL 新鲜的 YPD 培养基中, 培养 2 d。按照 1%的接种量转接到新鲜的 YPD 培养基中, 培养 1 d, 转接 1 次。吸取 0.1 mL 培养液涂布在抗生素 G418 浓度分别为 0.2 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL 和 4.0 mg/mL 的 YPD 平板上。培养 2 d 后, 挑取 G418 浓度为 4.0 mg/mL 的 YPD 平板上的菌落接种到新鲜的含有 5 mL 培养基的试管里。培养 2 d 后, 用 0.5%的甲醇进行诱导, 每隔 12 h 添加 1 次甲醇, 诱导 96 h 后进行鉴定。

1.2.4 表达产物的鉴定及活性检测: 取发酵液离心收集细胞并加细胞裂解液和直径为 0.5 mm 的玻璃珠强烈振荡破壁, 提取蛋白质, 经 SDS-PAGE 分析, 检测目的蛋白表达水平和分子量。活性检测参照文献[9]进行。

1.2.5 遗传稳定性检测: 将构建的基因工程菌 *Hansenula polymorpha* NCYC495 于 YPD 培养基中继代培养 50 代, 检测 *Hansenula polymorpha* NCYC495 每一代发酵培养基中木薯醇腈酶的活力, 酶活力的检测按照 1.2.4 的方法进行, 以此为指标来考察构建的基因工程菌汉逊酵母 NCYC495 产生木薯醇腈酶的遗传稳定性。

2 结果和讨论

2.1 木薯 HNL 基因的克隆

以 pET30a-HNL 质粒为模板, 参照程树华等^[10]报道的木薯 HNL 基因的 cDNA 序列和汉逊酵母分泌表达载体 pHMOXGaA 多克隆位点, 设计上下游引物, 并分别引入 *EcoR* 和 *Not* 酶切位点, 具体序列为上游 5'-GAATTCATGGTAAGTGCACATTTTGTTCTGA-3', 下游 5'-GCGGCCGCTCAAGCGTATGCATCAGCCACCTCT-3'。划横线的部分为酶切位点。产物通过 TA 克隆连接到 pMD18-T 上, 转化 *Escherichia coli* DH5 α , 挑取阳性克隆命名为 pMD18T-HNL。HNL 基因由 777 bp 组成, 编码 258 个氨基酸。

2.2 汉逊酵母重组表达载体的构建

将 pMD18T-HNL 和汉逊酵母分泌表达载体 pHMOXGaA 分别用 *EcoR* 和 *Not* 双酶切, HNL 和 pHMOXGaA 用 T4 DNA Ligase 连接, 转化 *E. coli*

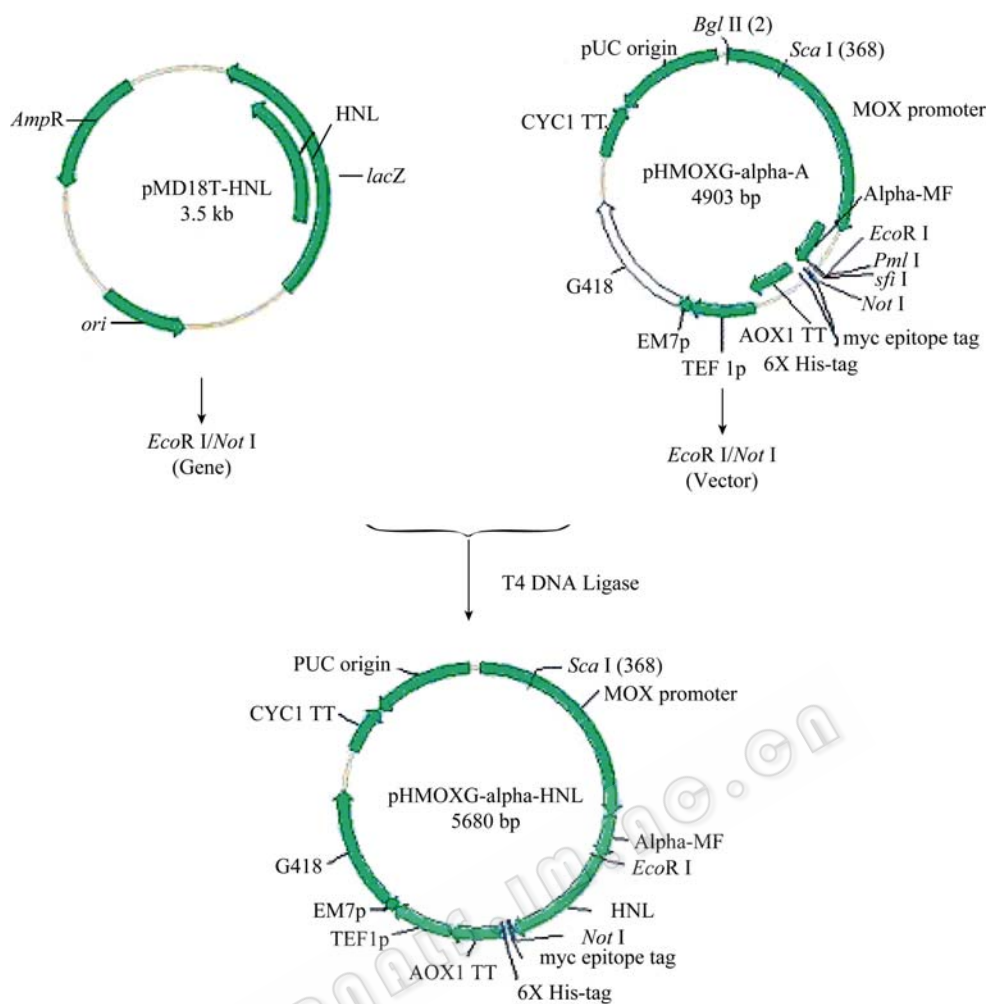


图 1 汉逊酵母表达载体的构建
Fig. 1 Construction of recombinant expression vector (pHMOXGαA-HNL)

DH5α, 挑取阳性克隆命名为 pHMOXGαA-HNL。载体构建流程如图 1 所示。

2.3 重组质粒的转化及阳性酵母菌转化子的筛选

将 pHMOXGαA-HNL 用 *Sca* I 线化后, 电击转化 *Hansenula polymorpha* NCYC495, 利用在 G418 浓度逐渐增加的 YPD 培养基中筛选多拷贝的重组子。拷贝数越高, 转化子能够承受的抗生素浓度越大^[11]。挑取 G418 浓度为 4.0 mg/mL YPD 平板上的单菌落接种到新鲜培养基, 培养 2 d, 提取酵母基因组, 用 *HNL* 基因的上下游引物进行 PCR 鉴定(图 2), 筛选阳性重组子。

2.4 木薯 *HNL* 重组子的诱导表达及活性测定

挑取阳性重组子, 将菌液按 1% 的接种量接种到新鲜的培养基中, 培养 2 d 后诱导表达, 同时每隔 12 h 取样, 测定细胞的干重^[12]、OD 值和上清液的酶活性, 如图 3 和图 4 所示。

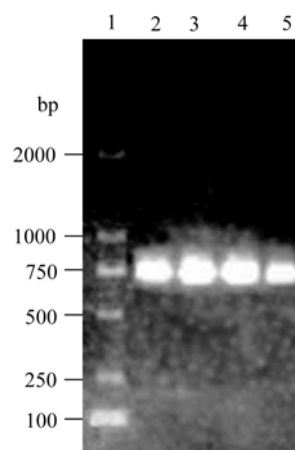


图 2 PCR 检测阳性重组子

Fig. 2 PCR analysis of positive recombination

注: 1: DL2000 DNA 分子量标准; 2-5: PCR 检测重组子。

Note: 1: DL2000 DNA marker; 2-5: PCR analysis of positive recombination.

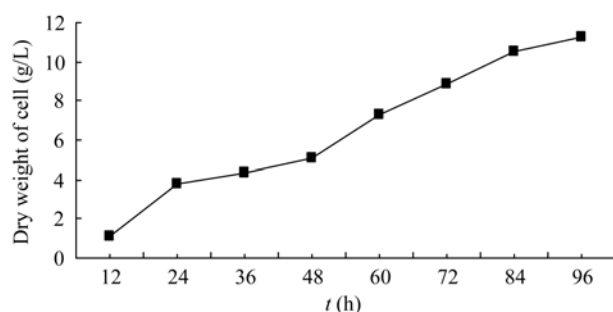


图3 酵母细胞干重的变化

Fig. 3 The variety of yeast cell dry weight

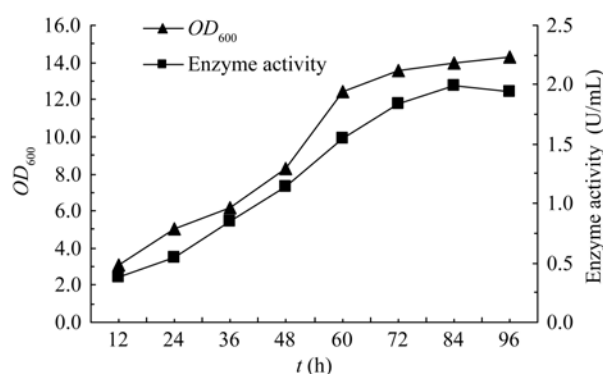
图4 酵母细胞密度(OD_{600})和酶活性的变化

Fig. 4 The variety of yeast cell density and enzyme activity

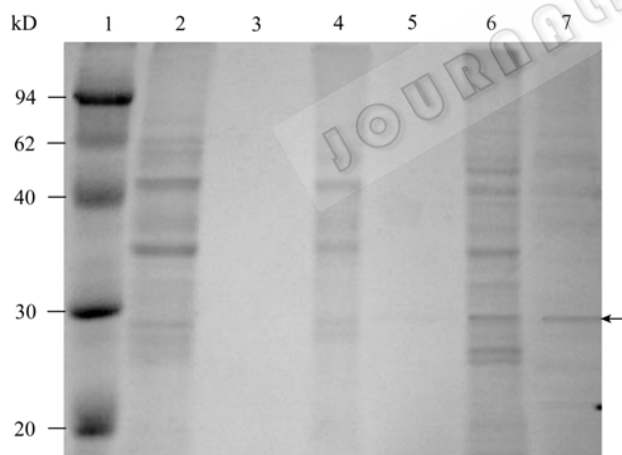


图5 HNL 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of HNL expression product

注: 1: 蛋白分子量标准; 2: 空载体转化子菌体超声波破碎物; 3: 空载体转化子培养液的上清; 4: 重组子诱导前的菌体超声波破碎物; 5: 重组子诱导前的培养液上清; 6: 诱导 96 h 后的菌体超声波破碎物; 7: 诱导 96 h 后的培养液上清。

Note: 1: Protein marker; 2: Negative control/no recombinant (cell lysate); 3: Negative control/no recombinant (supernatant of fermentation); 4: Negative control/recombinant but no induce (cell lysate); 5: Negative control/recombinant but no induce (supernatant of fermentation); 6: Recombinant/induced for 96 h (cell lysate); 7: Recombinant/induced for 96 h (supernatant of fermentation).

目的蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果如图 5 所示: 阳性克隆菌株经甲醇诱导发酵后, 所表达的特异蛋白条带在 29 kD 处清晰可见, 分子质量约为 30 kD, 这与理论值相符, 而空白对照株在此处无清晰的条带, 说明 HNL 基因在汉逊酵母中得到表达。

2.5 遗传稳定性分析

一株具有木薯醇腈酶活性的基因工程菌 *Hansenula polymorpha* NCYC495 被用来分析其遗传稳定性。将其在 YPD 培养基中継代培养 50 代, 以确定其生产木薯醇腈酶的稳定性。结果显示, 在传代过程中该菌株转化子生产木薯醇腈酶的能力没有下降。

3 结论

本研究应用汉逊酵母表达系统成功表达了有活性的中国木薯醇腈酶, 避免了大肠杆菌表达繁琐的变性复性操作, 节省了大量工作程序, 表达产物分泌到培养基中, 可以不经过细胞破壁处理, 直接进行发酵液纯化。

在汉逊酵母中表达所应用的载体 pHMOXGαA 转化到酵母细胞后, 均采用同源重组的方式整合到酵母染色体基因组中, 这种整合方式比游离的质粒更稳定, 并且实验表明其拷贝数不丢失。其启动子为甲醇氧化酶启动子 (Methanol oxidase promoter, MOXp), 采用 PCR 方法从多形汉逊酵母基因组中扩增得到, 所以酵母基因组和表达载体都存在序列一致的 MOXp 序列, 为同源重组提供了前提条件。同时采用来自啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中的分泌信号 α-MF (Mating factor-α) 进行分泌表达。

对于表达载体 pHMOXGαA, 在转化酵母之前需要线性化。假如目的基因本身也有线性化位点 *Sca*, 表达载体则无法线性化。相关报道介绍了在载体中引入汉逊酵母自动复制序列 HARS, 该序列相当于原核表达/克隆载体中的 PUC-ori 序列, HARS 允许表达载体不用线性化, 可以直接转化酵母细胞, 此时载体在 HARS 作用下能自动复制, 边复制边向酵母基因组中整合, 整合方式以非同源重组为主, 一般整合到染色体末端^[13]。25S rDNA 作为位点特异的重组元件被广泛应用。它能够使重组质粒在酵母基因组中稳定, 并且能够增加其拷贝数^[14]。

酶活性和细胞重量呈现正相关性, 随着细胞的

积累,酶活性逐渐提高,提高发酵细胞密度能够有效提高酶的表达。研究中发现,目的产物除了分泌到胞外,在细胞内还有相当的含量,提高目的蛋白的分泌能力不仅能够增加产物的回收率,而且能有效避免产物的反馈抑制^[15]。寻找强分泌能力的信号肽的实验正在进行。同时,增加细胞通透性能够有效促进蛋白的分泌,对培养基及增加细胞通透性试剂的选择正在陆续展开。

参 考 文 献

- [1] Efferberger F. Synthesis and reaction of optically active cyanohydrins. *Angewandte Chemie International edition in English*, 1994, **33**(15-16): 1555–1564.
- [2] White WLB, Arias-Garzon DI, McMahon JM, *et al.* Cyanogenesis in cassava. The role of hydroxynitrile lyase in root cyanide production. *Plant Physiology*, 1998, **116**: 1219–1225.
- [3] Becker W, Freund H, Pfeil E. Stereospecific synthesis of D-hydroxynitriles and optically active ethanolamines. *Angewandte Chemie International edition in English*, 1965, **4**: 1079–1086.
- [4] Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, **54** (6): 741–750.
- [5] vanDijk R, Faber KN, Kiel JA, *et al.* The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme and Microbiol Technology*, 2000, **26**(9-10): 793–800.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp.27–96, 1595–1604.
- [7] Song H, Li Y, Fang W, *et al.* Development of a set of expression vectors in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**: 1999–2006.
- [8] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National of Sciences of the United States of America*, 1989, **86**: 2172–2175.
- [9] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2): 248–254.
- [10] 程树华, 严共鸣, 孙万儒, 等. 木薯 α -羟腈酶的克隆、表达及初步应用. *生物工程学报*, 2001, **17**(1): 78–83.
- [11] Cornelis P, Hollenberga, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, **8**(5): 554–560.
- [12] Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, *et al.* An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **63**: 373–381.
- [13] Sohn JH, Choi ES, Kim CH, *et al.* A novel autonomously replicating sequence (ARS) for multiple integration in the yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(15): 4420–4428.
- [14] Wartmann T, Kunze G. Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adeninivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, **54**(5): 619–624.
- [15] Gellissen G, Janowicz ZA, Weydemann U, *et al.* High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*, 1992, **10**(2): 179–189.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括9以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材、两种商品等。