

研究报告



真菌细胞色素 P450 在大肠杆菌中的表达

麦婉莹 洪葵*

武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室 湖北 武汉 430071

摘要:【背景】真菌细胞色素 P450 蛋白在大肠杆菌中表达水平低甚至不表达, 近期研究发现通过对该类蛋白氨基端(N 端)氨基酸序列的修饰可优化其表达水平。【目的】在大肠杆菌系统中表达预测功能为 P450 酶的焦曲霉 094102 菌株的 Au8002 蛋白, 为真菌 P450 蛋白在大肠杆菌表达系统中的 N 端氨基酸序列修饰策略提供有效依据。【方法】对野生型 P450 蛋白 Au8002 的氨基酸序列进行分析, 对其 N 端序列进行了 3 种序列修饰, 并在诱导蛋白表达时添加 P450 生物合成前体 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA), 研究 N 端氨基酸序列修饰策略及前体添加对真菌 P450 在大肠杆菌中蛋白表达的影响。【结果】SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示, 对目的蛋白进行的 3 种氨基酸序列修饰均使 Au8002 蛋白获得了表达, 前体 5-ALA 的添加提高了目的蛋白表达量。其中对目的蛋白进行 N 端全长截短时可部分增加其可溶性, 同时也验证了其特征性的 CO 结合能力。【结论】对预测为 P450 酶的菌株 094102 蛋白 Au8002 氨基端(N 端)氨基酸序列的修饰有效解决了其在大肠杆菌内不表达的难题, 实现了其可溶性表达; 另一方面 P450 生物合成前体 5-ALA 的添加也能有效提高该类蛋白的表达水平, 上述策略对改善其它该类蛋白在大肠杆菌内的表达水平具有借鉴意义。

关键词: 真菌细胞色素 P450, 大肠杆菌表达系统, 异源表达, N 端修饰

Heterologous expression of a fungal cytochrome P450 in *Escherichia coli*

MAI Wan-Ying HONG Kui*

Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China

Abstract: [Background] The expression of fungal P450s in *Escherichia coli* system is often in low efficiency. The N-terminal domain (NTD) amino acid sequence modification has been emerged as a potential strategy to achieve high-level expression of these membrane-bound proteins. [Objective] The Au8002 gene in *Aspergillus ustus* 094102 is predicted to encode a fungal P450. It cannot be expressed successfully in its natural sequence. Three NTD modifications were carried to prove the efficiency of this strategy on the heterologous expression in *E. coli* system. [Methods] Three NTD-modified Au8002 protein were designed to facilitate the gene expression and 5-aminolevulinic acid (5-ALA), the substrate for biosynthesis of P450s, was added during the heterologous expression to increase the yield of protein. [Results] The identifying results by SDS-PAGE and western blot indicated that the NTD modifications used in this study could

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81673331)

*Corresponding author: Tel: 86-27-68752442; E-mail: kuihong31@whu.edu.cn

Received: 19-06-2018; Accepted: 01-08-2018; Published online: 15-08-2018

基金项目: 国家自然科学基金(81673331)

*通信作者: Tel: 027-68752442; E-mail: kuihong31@whu.edu.cn

收稿日期: 2018-06-19; 接受日期: 2018-08-01; 网络首发日期: 2018-08-15

improve the fungal gene expression and the addition of 5-ALA improved the P450 protein yield in *E. coli*. When the NTD was truncated in full length, the NTD-modified Au8002 appeared to be partially soluble, and CO binding test also proved its solubility and proved that it was a P450 protein. **[Conclusion]** The NTD modification of Au8002 of strain 094102 can help to overcome the low efficiency of its heterologous expression in *E. coli* and the addition of 5-ALA can also help to increase its expression level. The observation made in this study may provide a useful guideline for improving the expression yield of fungal P450s in *E. coli*.

Keywords: Fungal cytochrome P450, *Escherichia coli* expression system, Heterologous expression, N-terminal modifications

细胞色素 P450 (Cytochrome P450 monooxygenases, CYP450) 是一类具有半胱氨酸-亚铁血红素(亚铁原卟啉)结构的单加氧酶^[1-4], 广泛存在于动植物及细菌中, 能够催化饱和 C-H 键的羟基化、C=C 键的环氧化等氧化反应^[5-6]。在多种真菌来源药物分子的生物合成后修饰过程中, 细胞色素 P450 酶参与了多步氧化反应, 如蛇孢菌素的四步氧化^[7]、葑青霉素的五步氧化(PaxP)^[8]、赤霉素的四步氧化(P450-1)^[9]、单端孢霉烯的四步氧化(Tri4)^[10]、烟曲霉素的四步氧化(Fma-P450)^[11]等。

研究表明, 真核 CYP450 蛋白在其氨基酸序列的氨基端(N 端)具有一段包含 20-30 个氨基酸残基的疏水性螺旋区域和一段富含脯氨酸的区域^[12], 这段脯氨酸富集区在真核 CYP450 中具有高度保守性。以脯氨酸富集区为界限, 其下游氨基酸序列为该 CYP450 的催化功能域; 而其上游 N 端区域具有较强的疏水性, 能够使蛋白锚定在内质网膜等细胞(器)膜上^[12]。这种特征增加了该类蛋白在大肠杆菌系统内的表达难度, 使其表达水平偏低甚至不表达。

为了能使真核 CYP450 基因在大肠杆菌系统中得到可溶性表达并获得较高产量, 目前已发展出多种技术方法, 其中对于 CYP450 氨基酸序列的 N 端序列修饰已被大量实验验证, 能够有效优化真核 CYP450 在原核表达系统中的表达, 提高其蛋白表达水平, 甚至能使原本无法在原核系统内表达的真核 CYP450 获得有效表达^[12-14]。对真核 CYP450 的 N 端序列修饰技术主要包括替换和沉默, 替换是指将目的 P450 酶的 N 端氨基酸序列替

换成已知能在大肠杆菌系统中获得有效甚至是高效表达的某个 P450 酶的 N 端; 而沉默是指对目的 P450 酶 N 端氨基酸序列中的若干个氨基酸进行敲除^[13]。

焦曲霉 094102 (*Aspergillus ustus* 094102) 菌株可以合成 Ophiobolin 类化合物, 与该类化合物生物合成相关的基因簇为 POC8003, 该基因簇中 *Au8003* 基因编码 Ophiobolin F 合成酶^[15], 其上游基因 *Au8002* 编码的蛋白经 BLAST 软件进行分析, 与已报道的二倍半萜类氧化酶的一致性达 79%^[7], 表明基因 *Au8002* 可能编码催化 Ophiobolin F 后修饰氧化过程的细胞色素 P450 酶。本研究通过对 Au8002 进行 N 端氨基酸序列沉默和替换, 于大肠杆菌系统中进行异源表达, 同时通过添加 CYP450 蛋白生物合成前体 5-ALA, 提高目的蛋白的表达量, 为后续鉴定该目的蛋白功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 目的基因扩增模板、菌株及质粒

以焦曲霉 094102 菌株的 cDNA 为目的基因扩增模板; 已知细胞色素 P450 蛋白 CYP5144C1 的基因序列从 NCBI 数据库中获得, GenBank 登录号为 AB597883; 大肠杆菌 TOP10、BL21(DE3)均为本实验室保存; pMD19-T(simple)载体购于武汉友名生物技术有限公司; pET-28a(+)载体由本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。氨苄青霉素工作浓度为 100 mg/μL, 卡

那霉素工作浓度为 50 mg/μL。

1.1.3 主要试剂和仪器

Pfu 高保真酶、PCR 试剂, 天根生化科技(北京)有限公司; *EcoR* I 内切酶、*Nde* I 内切酶、*Not* I 内切酶、T4 DNA 连接酶, New England Biolabs 公司; 2×*EsTaq* Mix, 康为世纪生物科技有限公司; 组氨酸标签鼠单克隆抗体(His-Tag Mouse Monoclonal Antibody), Abbkine 公司; 羊抗鼠抗体(HRP, Goat Anti-Mouse IgG), Affbiotech 公司; 1 kb Ladder Plus DNA Marker, 东盛生物科技有限公司; PageRule Prestained Protein Ladder, 赛默飞世尔科技有限公司。裂解缓冲液、20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 实验室自行配置; 电化学发光(Electro-Chemi-Luminescence, ECL)显影液 A 和 B 液、PCR 仪、电泳仪, Bio-Rad 公司; 多用途水平电泳槽, 北京百晶生物技术公司; 分光光度计, PerkinElmer 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 目的蛋白 Au8002 疏水性 N 端的预测

利用下列在线分析软件对 Au8002 蛋白进行跨膜区的预测: TMHMM 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、InterPro 60.0 Server (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html#>)及 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。

1.2.2 不同 N 端修饰下相应目的基因的克隆及表达

用于扩增 5144C1NTD-Au8002 蛋白相应基因的上游引物序列为 F: 5'-GAATTCATGCTCTCTGCTGCTCGCCGCCACGCTGTTCTTCACTCCAGGCAGAAGCGTTATCCGCTGCCCGGTCCCAGAA TCGCC-3' (粗体部分为编码 CYP5144C1 蛋白疏水性 N 端的基因序列, 下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点); Δ41-63NTD-Au8002 蛋白相应基因的扩增通过 Overlap PCR 获得, 其上游引物序列为 5'-CATATGATGGAG

GCCTACCTGCCC-3' (下划线部分为 *Nde* I 酶切位点), Overlap PCR 的中间引物序列为 F: 5'-CGAGATGTTGCTGTACGTTCTCCCCTGGCCAAGTTT-3', R: 5'-AAACTTGGCCAGGGGAGAACGTACAGCAACATCTCG-3'; 扩增 Δ2-69NTD-Au8002 蛋白相应基因的上游引物序列为 5'-GAATTCATGCCCGGTC CCAGAATCGCC-3' (下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点); 用于扩增上述 N 端修饰蛋白基因序列的下游引物序列均为 5'-GCGGCCGCTCAATGGTACACAACGCGAA-3' (下划线部分为 *Not* I 酶切位点)。利用焦曲霉 094102 菌株的 cDNA 为模板, 采用 *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶对上述不同 N 端修饰目的基因 5144C1NTD-Au8002、Δ41-63NTD-Au8002、Δ2-69NTD-Au8002 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 模板 cDNA 1 μL, 引物 F 和 R (10 μmol/L)各 1 μL, *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶(2.5 U/μL) 0.2 μL, 5×*Pfu* 高保真 DNA 聚合酶 Buffer (含 Mg²⁺) 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, 无菌水 16.3 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。

利用 Gel Extraction Kit (200)试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶回收和纯化。将获得的纯化产物和 pET-28a(+)表达载体同时进行相应的限制性内切酶 *Nde* I 或 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 酶切条件为 37 °C、3 h。酶切产物经过纯化后, 利用 T4 连接酶将基因片段与表达载体于 16 °C 连接 5 h。连接产物经热激转化, 导入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 孵育后涂布于含 Kan 抗性的 LB 平板。随机挑取转化子培养, 提取质粒后进行酶切验证, 阳性克隆进一步进行测序验证以确定无突变产生。正确构建的基因工程菌命名如表 1 所示。

表 1 本实验构建的基因工程菌

Table 1 Engineering strains constructed in this study

Au8002 蛋白的不同 N 端序列修饰	基因工程菌名称	目的蛋白理论分子量
N-terminal modifications of Au8002 protein	Names of the engineering strains	Theoretical molecular weight of chimeric proteins (kD)
Au8002 (wt)	<i>E. coli</i> Au8002	61.78
5144C1NTD-Au8002	<i>E. coli</i> 5144C1NTD-Au8002	56.50
Δ41-63NTD-Au8002	<i>E. coli</i> Δ41-63NTD-Au8002	59.20
Δ2-69NTD-Au8002	<i>E. coli</i> Δ2-69NTD-Au8002	54.30

1.2.3 目的蛋白的诱导表达及其检测

将构建好的表达菌株单菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养液中, 37 °C、200 r/min 培养过夜作为下一步的种子液, 按 1% 的接种量扩大培养于含卡那霉素的 500 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8, 取出 2 mL 菌液作为诱导前对照样品, 其余菌液加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。16 °C 培养 20 h 后, 取 2 mL 菌液作为诱导后样品。同时设置诱导条件优化组, 向培养基中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 5-ALA, 为具有 P450 功能的目的蛋白在大肠杆菌系统内的蛋白合成提供亚铁血红素的生物合成中间体。利用紫外分光光度计检测诱导前后样品菌液的 OD_{600} , 并收集诱导前后获得的菌体样品, 加入 6×蛋白上样缓冲液后 95 °C 干浴处理 10 min, 经 10% SDS-PAGE 电泳检测, 应用 Bio-Rad 软件分析目的蛋白表达量与基因工程菌总蛋白表达量的占比。

1.2.4 目的蛋白诱导表达后的 Western blot 检测

(1) 将滤纸和硝酸纤维素膜分别切成与 SDS-PAGE 凝胶同样大小, 其中滤纸用适量转膜缓冲液平衡, 硝酸纤维素膜则需甲醇浸泡激活后再用适量转膜缓冲液平衡; (2) 取未经染色的 SDS-PAGE 蛋白凝胶与平衡过的滤纸及硝酸纤维素膜按次序叠放在一起, 室温 72 V 电压转膜 1 h; (3) 取出硝酸纤维素膜, 丽春红染色检测转膜效果, 再用 ddH₂O 漂洗至膜发白; (4) 称取脱脂奶粉于 1×TBS 溶液中制得脱脂奶粉终浓度为 5% 脱脂奶粉封闭液, 将硝酸纤维素膜浸在 4 mL 封闭液中, 室温下于脱色摇床上 60 r/min 摇动封闭 2 h; (5) 取 1 mL 5% 封闭液与 3 mL 1×TBS 溶液混合, 并加入终浓度为 1:5 000 的组氨酸标签鼠单克隆抗体, 将封闭后的硝酸纤维素膜浸在一抗稀释液中, 4 °C 孵育过夜; (6) 吸弃一抗稀释液, 用 1×TBS 溶液漂洗硝酸纤维素膜 3 次, 每次 10 min; (7) 用 1×TBS 溶液配制终浓度为 1:5 000 的 HRP 二抗溶液, 将经一抗孵育的硝酸纤维素膜浸于二抗稀释液中, 室温下于脱色摇床上 60 r/min 摇动孵育 1 h; (8) 吸弃二抗稀释液, 用 1×TBS 溶液漂洗 3 次, 每次 10 min; (9) 将硝酸纤维素膜置

于干净保鲜膜上, 各取 0.5 mL ECL 显影液 A、B 液, 混合后均匀滴在硝酸纤维素膜上进行显影处理 1 min; (10) 弃去多余显影液, 将硝酸纤维素膜置于照胶机中进行曝光处理, 检测目标蛋白条带。

1.2.5 目的蛋白 CO 活性检测

收集诱导后菌体, 重悬于裂解缓冲液(20 mmol/L HEPES, pH 7.4)中, 置于冰上超声破碎(超声破碎程序: 30 min, 2 s, 5 s, 30%)。破碎后的细胞裂解液经 4 °C、4 500 r/min 离心 45 min, 收集上清液为目的蛋白样品。用反应缓冲液母液 1:1 稀释含有目的蛋白的破碎后上清液至 4 mL [反应缓冲液母液: 200 mmol/L HEPES、2.0 mmol/L EDTA、40% 甘油(体积比)和 1.0% 胆酸钠(质量体积比), pH 7.4], 缓慢混合均匀后分装至 2 个 1 mL 比色皿中, 分别标记为 a、b, 利用分光光度计记录两个比色皿此时在 400–500 nm 间的基线。取出比色皿 b, 于通风橱内向其中缓慢通入一氧化碳(CO)气体, 以大约每秒 1 个气泡的速率一共通入 60 个气泡; 取出比色皿 a, 同时向比色皿 a、b 中加入约 1 mg Na₂S₂O₄ 粉末后, 用封口膜密封住比色皿, 轻柔上下颠倒数次混匀; 将各比色皿分别放置在分光光度计中, 并于上述步骤中的位置保持一致, 多次记录两个比色皿中的样品在 400–500 nm 的紫外吸收, 直至样品在 450 nm 附近的吸光值不再增加, 停止检测。

2 结果与分析

2.1 目的蛋白 Au8002 疏水性 N 端的判定

TMHMM 2.0 Server 预测 Au8002 蛋白只有一个跨膜区域, 位于多肽链第 41 位的丙氨酸 Ala 与第 63 位的苯丙氨酸 Phe 之间; SMART 及 InterPro 60.0 Server 的预测结果均与 TMHMM 2.0 Server 一致, 表明目的蛋白 Au8002 的疏水性跨膜区位于多肽链第 41–63 位氨基酸间。对目的蛋白 Au8002 跨膜区下游的氨基酸序列进行分析, 发现多肽链第 70–72 位氨基酸序列为脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸(PGP), 综合对该蛋白的跨膜区域的预测结果可以大致确定此处为 Au8002 蛋白的脯氨酸富集区(对应图 1 蓝色区域所示), 并以此为界限划分出该蛋白的 N 端疏水性区域及 C 端催化功能域(图 1)。

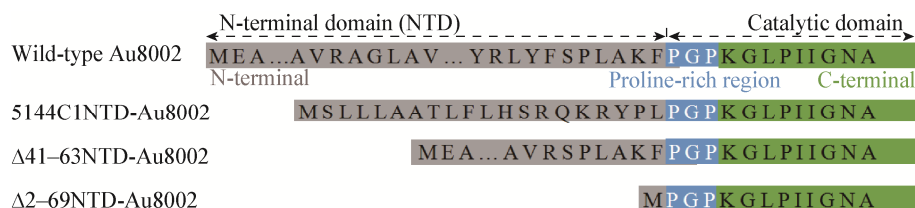


图1 Au8002 蛋白氨基酸序列分析结果及其 N 端序列修饰

Figure 1 Identifications of the amino acid sequence of Au8002 protein and the NTD modifications for Au8002

Note: Amino acid sequences of the N-terminal domain (gray), proposed proline-rich region (blue), and the following catalytic domain (green) of wild-type Au8002 protein and three NTD-modified Au8002 protein. The catalytic domain (blue and green) of protein Au8002 was fused to the N-terminal domain (gray) from CYP5144C1 to construct NTD-modified protein 5144C1NTD-Au8002. The amino acids 41–63 and 2–69 in the NTD (gray) of wild-type Au8002 were deleted to construct NTD-modified protein Δ 41–63NTD-Au8002 and Δ 2–69NTD-Au8002, respectively.

2.2 目的蛋白 Au8002 氨基酸序列修饰设计

Ichinose 等多种真菌 CYP450 进行疏水性 N 端序列修饰后发现, CYP5144C1 蛋白的 N 端氨基酸序列能有效提高这类蛋白在大肠杆菌体内的表达水平^[12], 本研究选取这段 N 端序列替换 Au8002 蛋白的 N 端序列, 构建 N 端替换蛋白 5144C1NTD-Au8002; 由于真菌 Au8002 蛋白序列中包含的疏水性跨膜区能使该蛋白在表达过程中锚定在细胞生物膜上, 使其无法可溶表达, 因此本研究敲除 Au8002 蛋白氨基酸序列中的跨膜区域构建 N 端沉默蛋白 Δ 41–63NTD-Au8002; 同时, 由于真菌 CYP450 疏水性 N 端中的氨基酸大部分均呈疏水性, 可能影响目的蛋白在大肠杆菌系统中的可溶性, 因此敲除 Au8002 蛋白疏水性 N 端全长构建 N 端沉默蛋白 Δ 2–69NTD-Au8002 (图 1)。

2.3 不同序列修饰蛋白基因序列的克隆及其诱导表达

以焦曲霉 094102 菌株的 cDNA 片段为模板分别 PCR 扩增获得大小约 1 500 bp 的 5144C1NTD-Au8002、1 550 bp 的 Δ 41–63NTD-Au8002 以及 1 450 bp 的 Δ 2–69NTD-Au8002 的基因片段, 如图 2 所示。将上述片段分别与载体 pET-28a(+)连接并转化到菌株 *E. coli* BL21(DE3)中, 经酶切和基因测序等验证插入目的片段无突变, 分别得到能够表达 3 种序列修饰蛋白的基因工程菌 *E. coli* 5144C1NTD-Au8002、*E. coli* Δ 41–63NTD-Au8002 和 *E. coli* Δ 2–69NTD-Au8002。

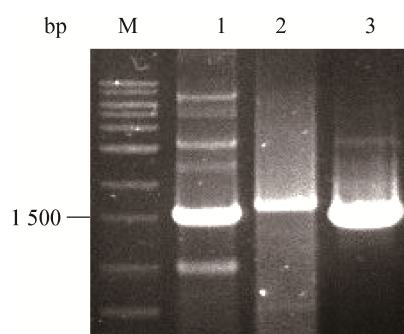


图2 不同修饰蛋白的基因序列的 PCR 扩增

Figure 2 PCR products encoding the modified Au8002 proteins

Note: M: DNA marker; 1: Amplification products of 5144C1NTD-Au8002; 2: Amplification products of Δ 41–63NTD-Au8002; 3: Amplification products of Δ 2–69NTD-Au8002.

各重组工程菌株经 IPTG 诱导表达目的蛋白后, 对各工程菌通过 SDS-PAGE 及 Western blot 进行菌体内总蛋白表达量的检测, 结果分别如图 3A、B 所示。与诱导前相比, 诱导后各重组工程菌株均在 50–60 kD 处有特异表达条带(图 3A 中箭头所指处), 其分子量大小分别与 N 端序列修饰蛋白 5144C1NTD-Au8002、 Δ 41–63NTD-Au8002 和 Δ 2–69NTD-Au8002 预测大小基本一致, 而野生型 Au8002 蛋白(条带 1)在同样的诱导表达条件下无法获得蛋白表达(图 3B), 证明原本无法在大肠杆菌内进行蛋白表达的野生型 Au8002 蛋白在经过上述 3 种疏水性 N 端序列修饰后成功获得了蛋白表达。其中, Δ 2–69NTD-Au8002 的蛋白条带最浓(图 3A, 条带 5), 其蛋白表达量占工程菌总蛋白表达量的 14.8%, 比 5144C1NTD-

Au8002 (14.1%)、 $\Delta 41-63\text{NTD-Au8002}$ (11.6%)高,说明在本研究采用的 3 种 N 端修饰中,疏水性 N 端全长的沉默对 Au8002 蛋白在大肠杆菌系统中的表达具有最佳优化效果。选取重组工程菌 *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 进行诱导表达条件优化的研究,在诱导目的蛋白表达的过程中添加 CYP450 蛋白生物合成前体 5-ALA 后,目的蛋白的表达量从工程菌总蛋白表达量的 14.8%提高至 41.7%,说明 5-ALA 的添加能提高目的蛋白的表达水平。

2.4 $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 蛋白的 CO 活性检测^[16]

收集诱导表达后的上述各工程菌菌体,破碎细胞后分别通过 SDS-PAGE 对菌体和破碎后上清液样品进行检测,仅在工程菌 *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 的菌体破碎上清液中检测到目的蛋白条带(图 4A),但该条带浓度与全菌样品中的目的蛋白条带相比较淡,表明 $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 仅部分可溶。*E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 菌体破碎后的上清液呈现橙红色,与 P450 酶特征相符,初步说明目的蛋白为 P450 酶。同时,取该上清液作 CO 活性检测,其差示光谱如图 3B 所示,显示蛋白 $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 在 450 nm 处有一个特征吸收峰(图 4B 箭头所指),与

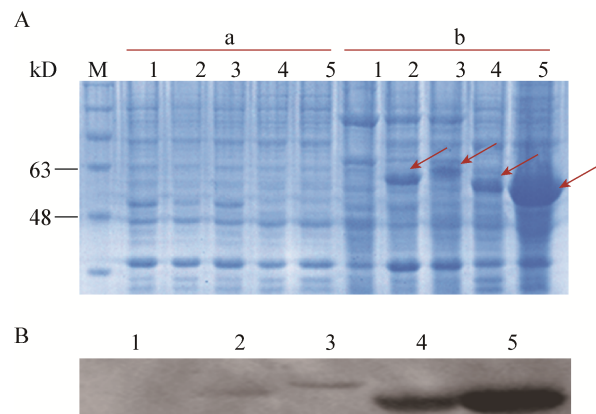


图 3 各工程菌体内的总蛋白表达检测

Figure 3 Expression of total protein in engineered strains

Note: A: SDS-PAGE. M: Protein marker; a: Uninduced; b: Induced; 1: *E. coli* Au8002; 2: *E. coli* 5144C1NTD-Au8002; 3: *E. coli* $\Delta 41-63\text{NTD-Au8002}$; 4: *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$; 5: *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ with 5-ALA. B: Western blot. 1: *E. coli* Au8002; 2: *E. coli* 5144C1NTD-Au8002; 3: *E. coli* $\Delta 41-63\text{NTD-Au8002}$; 4: *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$; 5: *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ with 5-ALA.

P450 酶的蛋白质生化特征相符^[17],从而进一步验证了 $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 蛋白是一个具有能与 CO 结合的亚铁血红素的可溶性 P450 蛋白。但由于 $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 蛋白溶解度较低,因此其与 CO 结合后在 450 nm 处产生的吸收峰值较小。

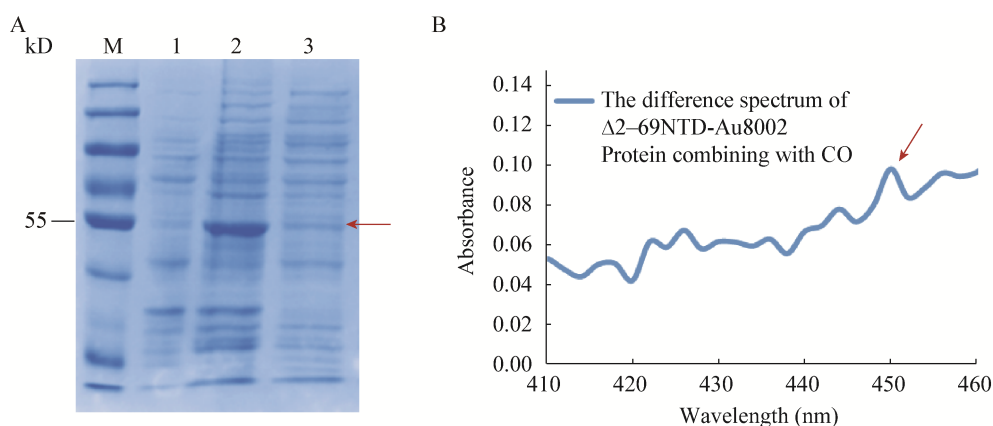


图 4 $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 蛋白在大肠杆菌系统中的表达及其可溶性蛋白的 CO 结合检测

Figure 4 SDS-PAGE analysis of $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ expression and the CO-combining test of the soluble protein

注: A: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导的工程菌 *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$; 2: 诱导后的工程菌 *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$; 3: 诱导后工程菌 *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 的破壁上清. B: $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ 蛋白与 CO 结合的差示光谱.

Note: A: M: Protein marker; 1: *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ without IPTG induction; 2: *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ with IPTG induction; 3: Supernatant of induced *E. coli* $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ crude enzyme mixture. B: The difference spectrum of $\Delta 2-69\text{NTD-Au8002}$ protein combining with CO.

3 讨论与结论

由于大肠杆菌原核表达系统具有系统可控、产量高的优点,目前研究常采用大肠杆菌表达系统进行蛋白异源表达并验证功能。但大肠杆菌 *Escherichia coli* 的基因组中尚未发现 P450 基因^[5],且真核 CYP450 蛋白序列中未经修饰的 N 端序列会增加该蛋白在原核大肠杆菌表达系统中蛋白表达的难度。近年来,通过揭示真核 CYP450 氨基酸的序列特征,发现对真核 CYP450 疏水性 N 端进行氨基酸序列替换或者沉默,改变该酶的拓扑结构,能够优化该类蛋白在原核表达系统中的可溶性表达水平^[12-14]。

前期研究中发现,焦曲霉 094102 菌株中有一个可能与二倍半萜类化合物 Ophiobolins 生物合成后修饰氧化相关的 P450 基因 *Au8002*,与已报道的二倍半萜类氧化酶的一致性达 79%^[7],表明 *Au8002* 可能是一个同样能催化 Ophiobolin F 氧化的 P450 酶。由于真菌来源的 *Au8002* 蛋白序列中包含的疏水性跨膜区能够使该蛋白在表达过程中锚定在细胞的生物膜上从而无法在大肠杆菌中获得蛋白表达(图 3),本研究通过对 *Au8002* 蛋白疏水性 N 端氨基酸序列的替换及沉默,构建了 3 种不同的序列修饰蛋白,实现了 *Au8002* 蛋白在大肠杆菌系统中的蛋白表达。由于 CYP5144C1 的疏水性 N 端序列已被证实能有效提高多个真菌来源的 P450 蛋白在大肠杆菌体内的表达水平^[14],具有显著的高效性和一定的广泛适用性,因此在对目的蛋白 N 端序列进行替换修饰时,选取了 CYP5144C1 的 N 端序列进行替换,构建了 5144C1NTD-*Au8002* 蛋白;此外,通过敲除疏水性跨膜区序列构建了 $\Delta 41-63$ NTD-*Au8002* 蛋白、敲除疏水区序列全长构建了 $\Delta 2-69$ NTD-*Au8002* 蛋白。在上述 3 种不同的 *Au8002* 蛋白疏水性 N 端序列修饰中, $\Delta 2-69$ NTD-*Au8002* 蛋白在大肠杆菌表达系统中的表达水平最高,且只有在该序列修饰下才能使目的蛋白具有一定的水溶性,以上结果说明对同一个真菌 P450 蛋白疏水性 N 端氨基酸序列的不同修饰将会在不同程度上改善目的蛋

白在大肠杆菌中的蛋白表达水平和可溶性水平,实验结果与现有报道相符^[13-14],也验证了真菌 P450 疏水性 N 端的序列修饰优化策略的可行性。同时,对培养基的优化实验结果显示,亚铁血红素生物合成前体 5-ALA 的加入也能在一定程度上提高目的蛋白在大肠杆菌中的表达水平。然而, $\Delta 2-69$ NTD-*Au8002* 蛋白的可溶性仍偏低,且即使其在氨基酸序列上、下游均带有组氨酸标签也无法经镍柱亲和和层析获得纯化蛋白,该现象可能是目的蛋白在大肠杆菌体内形成时多肽链折叠过于紧密、无法暴露融合标签导致。上述结果说明真菌蛋白 *Au8002* 在大肠杆菌系统中的表达仍具有挑战性,本研究采用的 N 端序列修饰策略虽有效实现了其在大肠杆菌中的表达,但其可溶性仍有待提高。

由于经过修饰的序列位于保守的脯氨酸富集区上游的非催化域,因此理论上经过 N 端序列修饰的嵌合型蛋白将保留原有蛋白功能。对于该序列修饰蛋白的功能验证需要进行进一步研究。

REFERENCES

- [1] Hayaishi O. Molecular Mechanisms of Oxygen Activation[M]. New York: Academic Press, 1974
- [2] Gunsalus IC, Pederson TC, Sligar SG. Oxygenase-catalyzed biological hydroxylations[J]. Annual Review of Biochemistry, 1975, 44: 377-407
- [3] Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y. Cytochrome P450[M]. Kodansha: Tokyo, 1993
- [4] Ortiz de Montellano PR, de Voss JJ. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450[J]. Natural Product Reports, 2002, 19(4): 477-493
- [5] Meunier B, de Visser SP, Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(9): 3947-3980
- [6] Luo Q, He Y, Hou DY, et al. Construction and characterization of engineered diesel-degrading bacterium[J]. Microbiology China, 2017, 44(6): 1271-1279 (in Chinese)
罗群,何颖,侯登勇,等.柴油降解基因工程菌的构建及降解特性[J].微生物学通报,2017,44(6): 1271-1279
- [7] Narita K, Chiba R, Minami A, et al. Multiple oxidative modifications in the ophiobolin biosynthesis: P450 oxidations found in genome mining[J]. Organic Letters, 2016, 18(9): 1980-1983
- [8] Saikia S, Parker EJ, Koulman A, et al. Defining paxilline biosynthesis in *Penicillium paxilli*: functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(23): 16829-16837

- [9] Malonek S, Rojas MC, Hedden P, et al. Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450-1 and P450-4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1462-1472
- [10] Tokai T, Koshino H, Takahashi-Ando N, et al. *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 353(2): 412-417
- [11] Lin HC, Tsunematsu Y, Dhingra S, et al. Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(11): 4426-4436
- [12] Ichinose H, Wariishi H. High-level heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 438(2): 289-294
- [13] Zelasko S, Palaria A, Das A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems[J]. Protein Expression and Purification, 2013, 92(1): 77-87
- [14] Ichinose H, Hatakeyama M, Yamauchi Y. Sequence modifications and heterologous expression of eukaryotic cytochromes P450 in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(3): 268-274
- [15] Chai HZ, Yin R, Liu YF, et al. Sesterterpene ophiobolin biosynthesis involving multiple gene clusters in *Aspergillus ustus*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27181
- [16] Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, Cheng Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase[J]. Nature Protocols, 2009, 4(9): 1245-1251
- [17] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239: 2370-2378

~~~~~  
(上接 p.1091)

### 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010