

毕赤酵母甲酸脱氢酶在大肠杆菌中的高表达及纯化*

陈少欣 史炳照

(上海医药工业研究院生物部 上海 200040)

摘要: 用PCR方法从毕赤酵母(*Pichia pastoris*)基因组DNA扩增甲酸脱氢酶(FDH)基因,通过定点突变密码子TAG(649-651位碱基)为GAG,突变后的基因片段插入表达载体pET-22b(+)构建质粒pET-FDH,转化*E. coli* BL21(DE3)。基因工程菌在IPTG诱导下高效表达可溶性的FDH融合蛋白,蛋白的表达量占基因工程菌株总蛋白的30%。工程菌破壁上清液采用一步亲和层析分离,得到比活力为6.45 U/mg的重组FDH。

关键词: 毕赤酵母,甲酸脱氢酶,基因表达,分离纯化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2007)01-0015-04

Over-expression and Purification of Formate Dehydrogenase from *Pichia pastoris* in *Escherichia coli**

CHEN Shao-Xin SHI Bing-Zhao

(Biochemistry Department of Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040)

Abstract: Formate dehydrogenase (FDH) coding gene was amplified from genomic DNA of *Pichia pastoris* by polymerase chain reaction, and the codon TAG (bases 649-651) was mutated to GAG using site-directed mutagenesis. The recombinant plasmid pET-FDH was constructed by inserting the mutated DNA fragment into expression vector pET-22b(+), and transformed into *E. coli* BL21(DE3). FDH was expressed as a form of soluble protein fused with 6 × His tag at high level through IPTG induction. The amount of FDH was up to about 30% of the total cell protein. The cells-free crude extract was purified by one affinity chromatographic step, and resulting enzyme preparation revealed a specific activity of 6.45 U/mg.

Key words: *Pichia pastoris*, Formate dehydrogenase, Gene expression, Purification

甲酸脱氢酶(FDH, EC 1.2.1.2)的功能是催化甲酸盐氧化为CO₂,同时把NAD还原为NADH。由于FDH催化的反应是不可逆的,在需要辅酶NADH再生的反应中具有重要的应用价值,特别是应用于手性化合物的合成^[1,2]。德国Degussa公司利用博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)FDH再生NADH生产tert-L-亮氨酸,是利用酶法生产医药产品最为成功的例子之一^[3]。

FDH存在于能够利用甲醇的酵母和细菌中,但是直接来源于野生型微生物的FDH的酶活力低,价格很贵,限制了它在酶催化反应中的应用。近年来利用基因工程的方法,直接克隆和表达FDH基因可以有效解决这一问题。多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)FDH基因最先被克隆,随后克隆了细菌假单胞属(*Pseudomonas* sp.)FDH基因,近年来又克隆了牦牛分支杆菌(*Mycobacte-*

rium vaccae)、莫拉菌属(*Moraxella* sp.)、*C. boidinii*、毕赤酵母(*P. pastoris*)等微生物的FDH基因^[4]。由于野生型*C. boidinii*FDH已经在工业上被成功应用,目前文献对它的基因克隆和表达方面的报道最多,但其在重组*E. coli*宿主中的表达量还不高^[5,6]。*P. pastoris*FDH与*C. boidinii*FDH具有较高的DNA同源性(75%),目前还没有对其进行高表达、分离纯化和酶学方面的研究报道。本文构建了高表达毕赤酵母FDH的*E. coli*基因工程菌,并进行重组酶的分离纯化,为研究FDH的酶学性质及其应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶、TaKaRa Ex Taq DNA聚合酶、

*上海市科技启明星(B类)项目资助(No. 05QMB1439)

通讯作者 Tel: 021-62479808-455, E-mail: szxlb@263.net

收稿日期: 2006-02-27, 修回日期: 2006-04-25

PrimerSTAR™ HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准、定点突变试剂盒 (TaKaRa MutanBEST kit) 购自大连宝生物工程公司 (TakaRa); DNA 胶回收试剂盒、IPTG、氨苄青霉素购自上海生物工程公司; 酵母基因组 DNA 提取试剂盒为北京天为时代公司产品; His-trap FF 柱购自 Amersham 公司; 其它试剂均为分析级产品, 购自上海化学试剂公司。

1.2 菌株及质粒

E. coli DH5 α , BL21 (DE3)、*P. pastoris* GS115 均为本实验室保藏菌株; pMD18-T 质粒购于大连宝生物工程公司; PET-22b (+) 为 Novagen 公司产品。

1.3 基因操作及蛋白质操作

LB 培养基、分子克隆、表达产物 SDS-PAGE 分析参照文献 [7, 8] 进行。酵母基因组 DNA 提取、DNA 胶回收和蛋白质定点突变根据试剂盒提供的方法进行。

1.4 FDH 基因的扩增及克隆

根据 GenBank 中 FDH 基因序列, 设计引物 FDHFP: CATATGAAAATC GTTCTCGTTTGT-TACTCC 和 FDHBP: CTCGAGTGGCAGCT TTTTGT-CATTAC, 在两条引物的 5' 端分别加上 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点。以 *P. pastoris* 基因组 DNA 为模板, 用上述引物进行 PCR 扩增。反应体系 (50 μ L): 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μ L, FDHFP (20 μ mol/L) 1 μ L, FDHBP (20 μ mol/L) 1 μ L, *P. pastoris* GS115 基因组 DNA (10 pg/ μ L) 1 μ L, TaKaRa *Ex Taq* 1 μ L, dH₂O 37 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C, 30s; 55 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C, 10min。PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶分析和回收目标 DNA 片段。

FDH 的 PCR 产物与 pMD18-T 连接, 构建 pT-FDH 质粒, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布含 100 μ g/mL 氨苄青霉素、IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取白色菌落, 提质粒, 用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切验证和 DNA 序列测定。

1.5 FDH DNA 定点突变

利用 TaKaRa 公司的 TaKaRa MutanBEST 试剂盒进行定点突变。以 pT-FDH 质粒为模板, 设计引物 FDHMUF: AG G AGCTGGTTGCTCAAGCCGAT,

↑
突变位点

FDHMUBP: CGACAGTGTCCACTCTTCTGGCAC, 根据试剂盒说明书进行操作, 构建含单点突变的 pT-FDH^{MUT} 质粒, DNA 序列测定以保证产生正确的碱基突变。

1.6 表达质粒构建及 FDH 基因的表达

pT-FDH^{MUT} 质粒经过 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切, 回收 1.1 kb 大小的片段, 与经过相同酶切的 pET-22b (+) 连接, 构建表达质粒 pET-FDH, 转化感受态 *E. coli* BL21 (DE3), 涂布含 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落, 提质粒, 用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切验证, 得到含 FDH 基因的重组 *E. coli* (FDH)。

把重组 *E. coli* (FDH) 接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基 (5 mL), 37 $^{\circ}$ C, 培养至 OD 为 0.6 左右, 把培养温度降至 28 $^{\circ}$ C, 加入 0.1 mmol/L IPTG, 诱导过夜。培养液离心, 收集菌体, 分别分析 FDH 酶活力和蛋白质表达量。

1.7 重组 FDH 的分离纯化

2g 重组菌细胞溶于含 0.5 mol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4), 超声破壁, 离心, 上清液经过用上述缓冲液平衡的亲层析 His-trap FF 柱吸附。经过缓冲液洗涤后, 再用 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 咪唑的 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 洗脱, 收集目标蛋白, 分析 FDH 的酶活力和蛋白质浓度 (Bradford 法)。

1.8 FDH 酶活力测定

FDH 酶活力测定采用分光光度法, 检测波长为 340 nm。反应液组成为: 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 162 mmol/L 甲酸钠, 1.62 mmol/L NAD。反应混合物于 30 $^{\circ}$ C 保温, 加入一定单位的 FDH 酶液后开始计时, 每隔 60s 检测 NADH 在 340 nm 吸光度的增加量, NADH 的浓度根据它在 340 的摩尔消光系数 $\epsilon = 6220 (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 来计算。FDH 活力定义为在 pH 7.5, 30 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟还原 1 mmol NAD 的所需的酶量为 1 个单位 (U)。

2 结果

2.1 FDH 的基因克隆及定点突变

以 *P. pastoris* GS115 基因组 DNA 为模板, PCR

扩增得到 1.1kb 大小的 DNA 片段，与估计的 FDH 基因大小相符合。PCR 产物与 PMD18-T 质粒连接后，转化 *E. coli* DH5 α ，构建 pT-FDH 质粒，经过 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定有 FDH 基因的插入（图 1）。pT-FDH 质粒进行 DNA 序列测定，分析结果

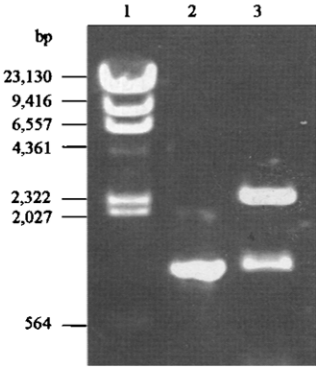


图 1 DNA 琼脂糖电泳图

1 λ DNA/ *Hind*III marker, 2 *P. pastoris* GS115 FDH 基因 PCR 产物, 3 pT-FDH/ *Nde*I + *Xho*I 酶切产物

发现 FDH 的 DNA 序列在第 649 位碱基发生改变 (G \rightarrow T)，导致 FDH 编码序列的密码子 GAG 突变终止密码子 TAG，造成蛋白质表达提前中止。用此 FDH 基因进行外源蛋白表达，经 SDS-PAGE 分析，证实表达产物大小确实只有 2.4 kD（数据没列出），比估计的 FDH 的分子量小，而且没有活性。我们推测突变是由 PCR 扩增引起的，但是改用保真性极高的 PrimerSTARTM HS DNA 聚合酶进行 PCR 反应，在此位置的碱基突变仍然存在。因此，这个碱基突变可能是 *P. pastoris* GS115 基因组自身存在的。

为了表达完整的 FDH 基因，需要对第 649 位碱基进行点突变，利用 TaKaRa MutanBEST kit 直接以 pT-FDH 质粒为模板，把第 649 位的 T 突变为 G，构建 pT-FDH^{MUT} 质粒，通过 DNA 测序证实产生预期的碱基突变 (T \rightarrow G)。

2.2 构建 FDH 基因的表达质粒

pT-FDH^{MUT} 质粒经过 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切，得到的 1.1kb 的 FDH DNA 片段，与表达质粒 pET-22b (+) 连接，构建质粒 pET-FDH（图 2）。该质粒以 T7 为启动子，表达在蛋白质 C 端融合有 6（His 的 FDH，方便下游的分离纯化。质粒的 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定图谱见图 3，表明 FDH DNA 片

段已正确插入 pET-22b (+) 中。

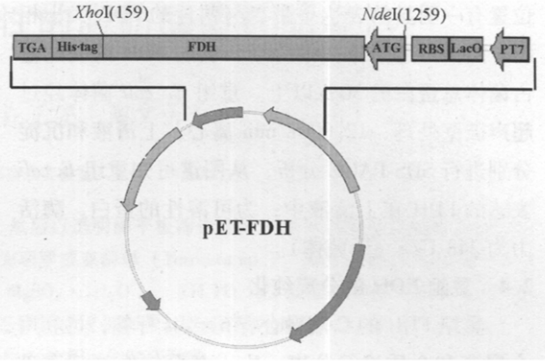


图 2 重组质粒 pET-FDH 图谱

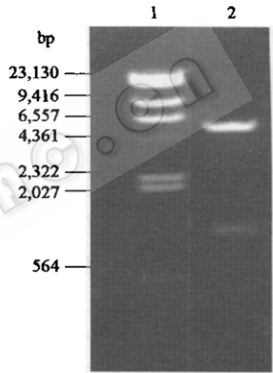


图 3 重组质粒 pET-FDH 酶切图谱

1 λ DNA/ *Hind*III marker, 2 pET-FDH/ *Nde*I + *Xho*I 酶切产物

2.3 重组 FDH 的表达

重组 *E. coli* (FDH) 培养至对数生长期中期，降温至 28 $^{\circ}$ C，加入 IPTG 进行外源蛋白的诱导表达，结果见图 4。从图可知，与未加诱导剂相比，

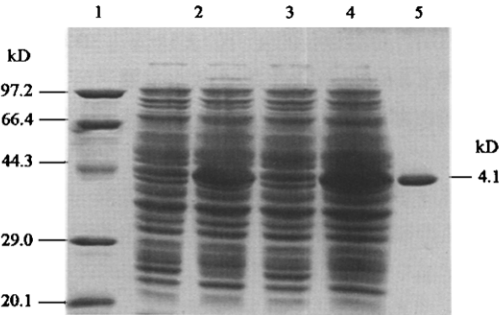


图 4 重组 FDH 表达的 SDS-PAGE 图谱分析

1 蛋白质标准, 2 *E. coli* (FDH) 诱导前产物, 3 *E. coli* (FDH) IPTG 诱导后产物, 4 *E. coli* (FDH) 破壁后沉淀物, 5 *E. coli* (FDH) 破壁上清液, 6 重组 FDH 柱层析洗脱液

IPTG 加入能够诱导 FDH 基因的表达, 在 4.1 kD 位置有一明显的表达条带, 与估计的 FDH 大小相符。图谱经过图像扫描分析, 表明 FDH 的表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。重组 *E. coli* 菌体经过超声破壁处理, 12,000r/min 离心, 上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 从图谱可知重组 *E. coli* 表达的 FDH 在上清液中, 为可溶性的蛋白, 酶活力为 248 U/g (干菌体)。

2.4 重组 FDH 的分离纯化

重组 FDH 的 C 端融合有 6×His 标签, 可利用金属亲和介质进行分离。*E. coli* 菌体经过超声破壁, 上清液用含 Ni-NTA 树脂吸附, 经过洗涤和洗脱, 得到纯化的重组 FDH。酶蛋白的回收率为 86%, 纯化倍数 10 倍, 比活力达到 6.45 U/mg。

3 讨论

FDH 在需 NADH 再生系统的反应中具有重要的应用价值, 目前对来源于 *C. boidinii* FDH 的酶学性质、基因表达及应用方面的研究最多。但是 *C. boidinii* FDH 在 *E. coli* 系统中的表达水平不高, 表达量少于 25%^[7], 限制了它的大规模的应用。因此提高其基因的表达水平, 或者寻找其它微生物来源的 FDH 是很有必要的。通过 DNA 序列和氨基酸序列比对分析, 表明 *P. pastoris* 的 FDH 基因与 *C. boidinii* 具有较高的同源性, 可能具有相类似的酶学性质。把 *P. pastoris* 的 FDH 编码基因插入含 T7 启动子的表达载体 pET22b (+), 可以在 *E. coli* 宿主中高效表达具有可溶性和酶活性的 *P. pastoris* FDH, 可溶性目的蛋白的表达量达 30% 以上, 比重组 *C. boidinii* FDH 的表达水平高。下一步的工作可以对 *E. coli* 高密度发酵条件进行优化, 以

期进一步提高酶的表达量, 为 FDH 的大规模应用打下基础。重组 FDH 在蛋白质 C 端融合有 6×His 的标签, 它对 FDH 的酶活性没有影响, 便于采用一步亲和层析分离纯化目的蛋白。

根据来源的不同, FDH 纯酶的比活力在 0.1-10 U/mg, 来源于 *Pseudomonas* sp. 101 的 FDH 最高, 为 10 U/mg^[8]。本文得到的 *P. pastoris* FDH 与 *C. boidinii* FDH 的纯酶 (比活力为 6.5 U/mg) 相当^[10], 可用于的酶学研究和需 NADH 再生反应的系统中。

参考文献

- [1] Slatner M, Nagl G, Haltrich D, et al. Biocatal Biotrans, 1998, 16: 351 ~ 363.
- [2] Bommaris A S, Schwann M, Drauz K. J Mol Cat B: Enzymatic, 1998, 5: 1 ~ 11.
- [3] Bommaris A S, Schwann M, Stingl K, et al. Tetrahedron: Asymmetry, 1995, 6: 2851 ~ 2888.
- [4] Tishkov V I, Popov V O. Biochem (Moscow), 2004, 69: 1252 ~ 1267.
- [5] Slusarczyk H, Felber S, Kula M R, et al. Eur J Biochem, 2000, 267: 1280 ~ 1289.
- [6] Labrou N E, Rigden D J. Biochem J, 2001, 354: 455 ~ 463.
- [7] Sambrook J, Fritse E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Marshak D R, Kadonaga J T, Burgess R R, et al. Strategies for protein purification and characterization: A Laboratory course manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- [9] Iida M, Kitamura-Kimura K, Maeda H, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1992, 56: 1966 ~ 1970.
- [10] Slusarczyk H, Felber S, Kula M R, et al. Eur J Biochem, 2000, 267: 1280 ~ 1289.