

黑曲霉葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在酵母中的高效表达

周亚凤¹ 张先恩^{1*} 刘虹¹ 张成刚² Anthony E G Cass³

¹(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

²(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

³(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology & Medicine, London, SW72AY, UK)

摘 要 将黑曲霉葡萄糖氧化酶(GOD)基因重组进大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pPIC9, 转化甲基营养酵母 *Pichia pastoris* GS115 构建出 GOD 的高产酵母工程菌株。在酵母 α -Factor 及 AOX1 基因启动子和终止信号的调控下,黑曲霉 GOD 在甲基酵母中大量表达并分泌至胞外。经甲醇诱导 3~4d,发酵液中的 GOD 活力可达 30~40u/mL。SDS-PAGE 证实 GOD 在培养物上清中的含量显著高于其它杂蛋白,约占胞外蛋白总量的 60%~70%。经 Q Sepharose™ Fast Flow 离子交换柱一步纯化即达电泳纯。重组酵母 GOD 比活达 426.63u/mg 蛋白,是商品黑曲霉 GOD 的 1.6 倍。动力学性质分析表明,重组酵母 GOD 的 K_m 和 k_{cat} 分别为 38.25mmol/L 和 3492.66s⁻¹,与商品黑曲霉 GOD 相比,具有更高的催化效率。重组酵母 GOD 的高活力特性可有效提高葡萄糖传感器的线性检测范围。

关键词 葡萄糖氧化酶,甲基酵母 *Pichia pastoris*,基因表达,纯化,动力学分析,生物传感器
中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0400-06

葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase,EC 1.1.3.4,简称 GOD)消耗氧气催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸内酯,并释放出 H₂O₂,广泛应用于蛋白脱糖、食品除氧及葡萄糖定量分析等,也是迄今为止生物传感器领域最主要的工具酶。目前,GOD 的大规模生产广泛采用黑曲霉或青霉菌发酵,但黑曲霉和青霉菌发酵生产 GOD 过程中,过氧化氢酶、纤维素酶及淀粉酶等大量杂蛋白的存在给纯化带来相当的困难^[1]。因此,构建生产性能优良的 GOD 产生菌,研制及生产高品质的 GOD 制剂,具有重要意义。Frederick K R^[2]和 Whittington H^[3]分别在酿酒酵母中表达了黑曲霉和青霉菌的 GOD 基因,获得了具有生物学活性的酿酒酵母 GOD。Witt S 等^[1]试图在大肠杆菌中表达 GOD,但活力较低。甲基营养酵母 *Pichia pastoris* 表达系统为 80~90 年代发展起来的优良酵母表达系统^[4],已成功地表达了数十种相关蛋白。本文采用 *Pichia pastoris* GS115 高效酵母表达载体,成功地构建了 GOD 高产酵母工程菌株,实现了 GOD 在甲基酵母中的高效表达和分泌,并对重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 的性质进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:甲基营养酵母 *Pichia pastoris* GS115 和质粒 pPIC9 为中国科学院上海生命科学院生物工程研究中心杨胜利教授馈赠。T 载体和黑曲霉 9029 分别购自 Promega 公司和美国典型菌种保藏中心(ATCC),其余菌株和质粒为本室保存或本工作构建。*E. coli* DH5 α 作为受体菌用于质粒 pPIC9、T 载体及它们衍生质粒的保存与扩增。

1.1.2 培养基:大肠杆菌的培养和转化用 LB 培养基。酵母的培养、转化和蛋白的诱导生成用 YPD、MD、MM 及 RD 等培养基。

培养基组成成分如下:

LB(L⁻¹):蛋白胨 10g,酵母膏 5g,氯化钠 10g;

YPD(L⁻¹):蛋白胨 20g,酵母膏 10g,葡萄糖 20g;

MD(L⁻¹):酵母基本氮源培养基(YNB)1.7g,硫酸铵 5g,葡萄糖 20g,生物素 400 μ g;

MM(L⁻¹):YNB1.7g,硫酸铵 5g,甲醇 12mL,生物素 400 μ g,酪蛋白水解物 10g,pH5.6;

RD(L^{-1}): YNB1.7g, 硫酸铵 5g, 葡萄糖 20g, 生物素 $400\mu g$, 琼脂粉 30g, 山梨醇 184.4g。

1.1.3 试剂 限制酶、DNA 聚合酶和 T4DNA 连接酶为 TaKaRa 和 Sangon 公司产品; 酵母裂解酶、邻联茴香胺、GOD、牛血清白蛋白(BSA)等购自 Sigma 公司; 蛋白质浓度测定试剂盒为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉基因组的提取 黑曲霉基因组的制备采用氯化苄法^[5]。将黑曲霉在 $26^{\circ}C$ 条件下培养 2d, 离心收集菌体, 并将菌体依次用 10mL 水和 10mL 提取液(100mmol/L Tris-HCl, 40mmol/L EDTA, pH8.5)各洗涤 1 次。加入 10mL 提取液重悬菌体, 再加入 2mL 10% SDS, 6mL 氯化苄, 剧烈振荡混匀, 使管内混合物呈乳状。将该混合物于 $50^{\circ}C$ 保温 1h, 每隔 10min 振荡混合 1 次, 然后加入 6mL 3mol/L 醋酸钠, 冰水浴 15min, $4^{\circ}C$ 、6000r/min 离心 15min, 取上清, 加入等体积的异丙醇沉淀黑曲霉基因组 DNA。

1.2.2 酵母的转化和基因组的提取 酵母的转化采用原生质体转化法^[6]。GS115 于 YPD 中培养至 $OD_{600} = 0.2$, 离心收集细胞。依次用 10mL 水洗 1 次、10mL SED(1mol/L 山梨醇, 25mmol/L EDTA, 50mmol/L DTT)洗 1 次、10mL 1mol/L 山梨醇洗 2 次细胞, 重悬细胞于 10mL SPE 缓冲液(1mol/L 山梨醇, 10mmol/L EDTA, 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液, pH7.5), 加入 5.2mg/mL 的酵母裂解酶 $20\mu L$, 在 $30^{\circ}C$ 下缓慢摇动至镜检 80% ~ 90% 酵母细胞形成原生质体。依次用 10mL 1mol/L 山梨醇洗 2 次、10mL CaS(10mmol/L $CaCl_2$, 1mol/L 山梨醇)洗 1 次原生质体, 然后重悬原生质体于 0.6mL CaS 中。100 μL 原生质体与 4 μg 线性化质粒 DNA(*Stu* I 切), 20 μg 鲑鱼精担体 DNA 混合, 室温下放置 20min。加入 1mL 20% 聚乙二醇 3350(10mmol/L $CaCl_2$, 10mmol/L Tris-HCl, pH7.4), 继续放置 15min, 离心收集原生质体。将原生质体重悬于 150 μL SOS(1mol/L 山梨醇, 10mmol/L $CaCl_2$, 0.3 * YPD)中, 室温放置 30min 后, 用 1mol/L 山梨醇稀释至 1mL, 取 200 μL 与保温于 $55^{\circ}C$ 的 10mL RD 再生培养基混匀, 并立即倾倒入 MD 固体培养基中。

提取酵母基因组时, 首先如上所述裂解酵母细胞, 然后重悬原生质体于 8mL 裂解缓冲液(0.1% SDS, 10mmol/L Tris-HCl, 5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl, pH7.4)中。加入蛋白酶 K 和 RNA 酶至终浓度 100 $\mu g/mL$, 于 $37^{\circ}C$ 保温 2h。70 $^{\circ}C$ 加热 10min 终止反应, 冷却后, 加入 0.8mL 5mol/L 醋酸钾, 冰浴 30min,

离心去除沉淀。上清液经抽提去除蛋白后, 用等体积的异丙醇沉淀酵母基因组 DNA。

1.2.3 GOD 活力的测定 按文献[2,3]的方法, 以新鲜的 Sigma 公司产品 GOD 作标准曲线。用 pH5.6、0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液配制 2mg/mL 葡萄糖、2mg/mL 邻联茴香胺和 100u/mL 辣根过氧化物酶溶液。在 5mL 离心管中分别加入 1mL 葡萄糖溶液、2mL 甘油及邻联茴香胺和辣根过氧化物酶溶液各 100 μL , $30^{\circ}C$ 保温 10min 后, 加入 20 μL GOD 标准溶液或样品, 迅速摇匀, 在 $30^{\circ}C$ 下反应 3min 后, 加入 2mL 5mol/L 盐酸终止反应, 测定 OD_{525} 。

1.2.4 SDS-PAGE 分析蛋白纯度及分子量 10% 聚丙烯酰胺, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 应用 Bio-Rad 公司的 Gel Doc2000 扫描系统分析蛋白的相对含量及分子量。

1.2.5 GOD 的纯化 :Q SepharoseTM Fast Flow 离子交换层析柱纯化, 洗脱体系为 pH6.0、NaCl 梯度(0 ~ 0.1mol/L)柠檬酸钠缓冲液。

1.2.6 蛋白质浓度测定 :用 Bio-Rad 公司的蛋白质浓度测定试剂盒测定, 以 BSA 作标准曲线。

1.2.7 酶电极的制备 :参照文献[7]的方法。3 μL 20% BSA 溶液, 10 μL 2mg/mL 的 GOD 溶液和 2 μL 2.5% 的戊二醛溶液在直径 2cm 的 Teflon 薄膜上混匀扩散, 室温下静置交联 1h 形成酶膜。将此附着有酶膜的 Teflon 薄膜紧贴氧电极端部的铂阴极, 用橡皮圈固定, 即成为酶电极。

2 结果与分析

2.1 GOD 酵母表达载体的构建

根据文献[2]报道, 黑曲霉 GOD 基因结构无内含子, 无 *Sna*B I、*Hind* III、*Not* I 位点。以黑曲霉基因组为模板, 利用引物 5'-TACGTAAGCAATGCGATTGAAGCCAGC-3' 和 5'-AAGCTTCATGGAAGCATAATCTTCCAAG-5' 扩增两端分别加有 *Sna*B I 和 *Hind* III 酶切位点、大小为 1.7kb 的完整 GOD 编码序列。PCR 产物经试剂盒纯化后, 以适当的比例与 T 载体混合, 用 T4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH5 α 在氨苄青霉素平板上筛选转化子, 并经质粒 PCR 和酶切检测筛选出 GOD 基因以正确方向插入 T 载体的重组子 T-GOD。利用 T 载体本身的 *Not* I 位点, 从重组质粒 T-GOD 切下含有 GOD 基因的 *Sna*B I - *Not* I 片段, 然后与同样双酶解的 pPIC9 质粒相连, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选出含有 GOD 基因的酵母表达载体 pPICGOD(图 1)。

2.2 GOD 在甲基酵母中的高效表达和分泌

用原生质体转化法^[6]将构建的表达载体 pPIC-GOD1 引入甲基营养酵母 GS115,在缺组氨酸的 RD 再生平板上筛选出转化子约 30~40 个/平板。随机挑选 4 个转化子,提取酵母基因组作为 PCR 反应的模板,用引物:

5'-TACGTAAGCAATGGCATTGAAGCCAGC-3'和

5'-AAGCTTCATGGAAGCATAATCTTCCAAG-3'

扩增 GOD 基因,结果如图 2,有 3 个克隆子出现阳性结果,表明 pPICGOD1 已整合进酵母 GS115 的基因组中。

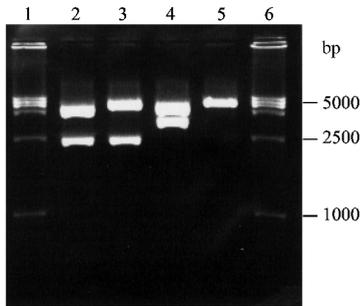


图 1 重组质粒 pPICGOD1 的酶切鉴定

Fig.1 Restriction pattern of recombinant pPICGOD1

1. DL15000 DNA marker 2. pPIC9 digested with *Bgl* II ;
3. pPICGOD1 digested with *Bgl* II 4. pPICGOD1 digested
with *Sal* I 5. pPIC9 digested with *Sal* I

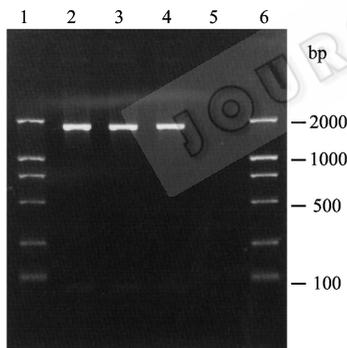


图 2 重组酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR assay of recombinant yeast genomic DNA

1. DL2000 DNA marker 2~4. Positive transformants ;
5. Negative transformant

为优化产酶条件,我们研究了培养液 pH 和甲醇含量对 GOD 产量的影响,结果如图 3 A 所示。虽然酵母细胞能在较广的 pH 范围内(pH4~8)正常生长,但培养液的 pH 对 GOD 的产量有明显影响。在 pH5 和 6 的条件下,不同诱导时间发酵液中 GOD 活力普遍较高。但是,在碱性(pH=8)诱导条件下,发酵后期培养液中 GOD 活力明显偏低,这种现象可能是由于碱性条件影响 GOD 的稳定性而造成的。据报道,GOD 在 pH5.0~6.5 下具有很好的稳定性,在

碱性条件下容易失活^[8]。从图 4 可以看出,培养基的甲醇含量对 GOD 产量也有较大影响。在较低甲醇浓度下,随培养液甲醇含量的增加,GOD 的产量逐步提高,并在每天添加 1.2% 甲醇的 MM 培养基中获得最高 GOD 产量,甲醇浓度超过 1.2%,GOD 的产量反而略有下降。此外,在 MM 培养基中诱导 24h 后,各发酵液就有 GOD 活力检出。随着诱导时间的延长,GOD 活力逐步提高,培养 96h 后各发酵液 GOD 活力分别达其最高值,继续培养,无明显活力增加。因此,我们选择在每天添加 1.2% 甲醇、pH5.6 的 MM 培养基中培养 4d 作为后续研究所需 GOD 的诱导生成条件。

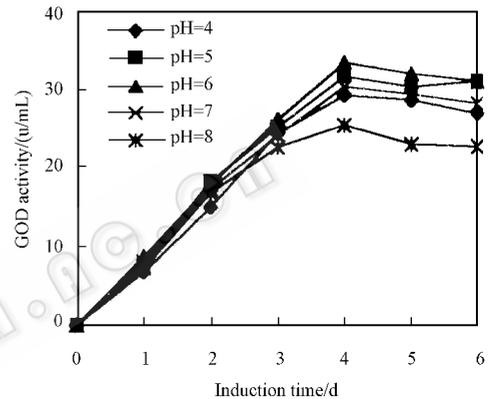


图 3 培养基 pH 对 GOD 产量的影响

Fig.3 Effect of induction pH on GOD yield

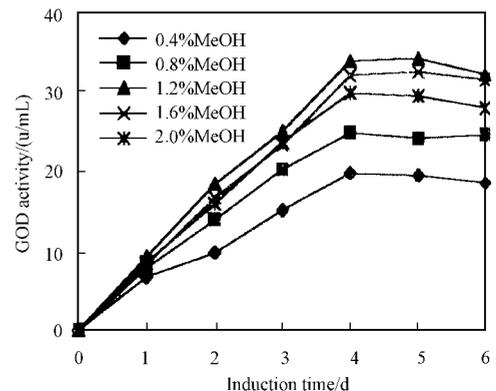


图 4 每 24h 添加的甲醇量对 GOD 产量的影响

Fig.4 Effect of methanol content on GOD yield

为了研究酶的分泌情况,将酵母转化子在 MD 培养基中培养后转入 pH=5.6 的 MM 培养基中振荡 4d,离心,测定上清液中的酶活,同时将菌体用超声波破碎后测定胞内酶活力,结果表明甲基营养酵母 GS115 在酵母 α -Factor 前导序列的调控下,具有很强的外源蛋白分泌能力,可将 95.7% 的 GOD 分泌至胞外,结果如表 1。

表 1 甲基营养酵母 GS115 产生的 GOD 活力

Table 1 Activity of GOD produced by GS115

<i>Pichia pastoris</i>	Activity/(u/mL)		
	Extracellular	Pellet	Total
GS115	34.48	1.55	36.03

2.3 重组酵母 GOD 的纯化

图 5 的发酵液上清蛋白质电泳结果表明,在甲醇的诱导下,GOD 在 GS115 中的表达量明显高于其他杂蛋白,可占胞外蛋白总量的 60%~70%(扫描法)。培养物上清经超滤浓缩后,首先在 0.002 mol/L、pH6.0 的柠檬酸钠缓冲液中透析除盐,以保证阴离子交换柱的吸附性质。Q Sepharose™ Fast Flow 离子交换层析柱经 pH6.0、0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液平衡后,上样,并以 pH6.0、含有 0~0.1 mol/L NaCl 盐梯度的柠檬酸钠缓冲液进行洗脱。收集含有 GOD 活力的洗脱峰,超滤浓缩后 SDS-PAGE 检测 GOD 的纯度见图 6。重组酵母 GOD 经 Q Sepharose™ Fast Flow 离子交换层析柱纯化后,SDS-PAGE 结果为一条略大于商品黑曲霉 GOD 的蛋白带。酵母 GOD 和黑曲霉 GOD 的分子量差异主要是由于糖基化程度不同造成的。其它外源蛋白在酵母中的表达也存在这种过糖基化现象^[21]。

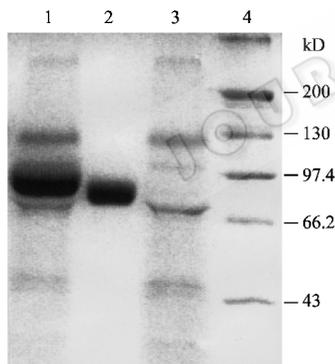


图 5 培养物上清的蛋白质 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of crude protein extract

1. GS115 carrying pPICGOD1 2. Commercial GOD ;

3. GS115 carrying pPIC9 4. HMW Protein marker

2.4 重组酵母 GOD 的动力学性质分析

为研究重组酵母 GOD 催化动力学性质,在 30℃、pH5.6 溶液为氧所饱和的条件下,我们分别测定了重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 对 10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、80、100 mmol/L 底物葡萄糖的反应速度,以双倒数作图法求出两酶的动力学常数,如表 2 所示。与商品黑曲霉 GOD 相比,重组酵母 GOD 具有更高的比酶活力,其比活高达 426.63 u/mg 蛋白,是商品酶(266.82 u/mg 蛋白)的

1.6 倍。重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 对葡萄糖具有相似的亲和力,它们 K_m 值分别为 38.25 mmol/L 和 33.44 mmol/L。但是,两酶的转换数 k_{cat} 值及二级动力学常数 k_{cat}/K_m 却相差较大,酵母 GOD 的 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值分别为 3492.66 s⁻¹ 和 91.31 (s⁻¹ mmol⁻¹ · L),而商品酶仅为 2303.56 s⁻¹ 和 68.89 (s⁻¹ mmol⁻¹ · L)。可见,重组酵母 GOD 对底物葡萄糖具有更高的催化效率。

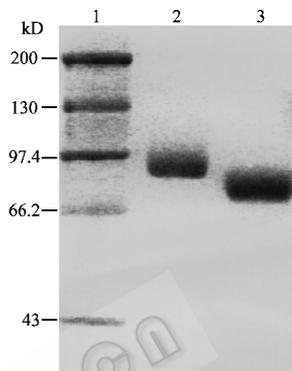


图 6 纯化后重组酵母 GOD 的 SDS-PAGE

Fig.6 SDS-PAGE of purified GOD from yeast

1. HMW protein marker 2. Purified recombinant GOD ;

3. Commercial GOD

表 2 重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of Glucose oxidase

Source of GOD	Specific activity/ (u/mg protein)	K_m / (mmol/L)	k_{cat} / (s ⁻¹)	(k_{cat}/K_m) (s ⁻¹ mmol ⁻¹ · L)
<i>A. niger</i>	266.82	33.44	2303.56	68.89
<i>P. pastoris</i>	426.63	38.25	3492.66	91.31

2.5 重组酵母 GOD 热稳定性和酸碱稳定性分析

将 15 u/mL (pH5.6) 的重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 分别于不同温度下保温 1 h,然后测定剩余酶活,结果如图 7。从图 7 可以看出,重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 的热稳定性基本一致,两酶均在 4~40℃ 范围内稳定,温度超过 40℃,活力开始下

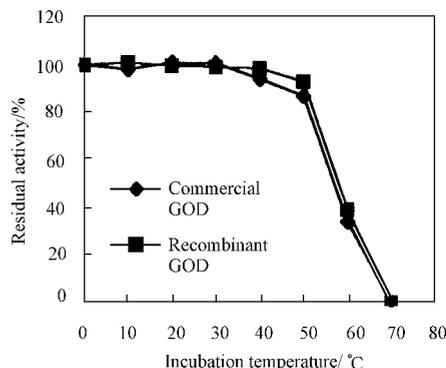


图 7 酵母 GOD 与黑曲霉 GOD 的热稳定性比较

Fig.7 Comparison of GOD temperature stability

降,至 70℃ 活力几乎降至 0。

比较重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 的酸碱稳定性时,首先用不同 pH 值的缓冲液(pH8 以下用柠檬酸钠缓冲液,pH8 及 pH8 以上用 Tris-HCl 缓冲液)分别将重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 稀释成 15u/mL 的酶液,于 30℃ 保温 12h 后,测定 GOD 活力(图 8)。酵母 GOD 和黑曲霉 GOD 均在 pH4~7 范围内有较高稳定性,pH 小于 4 及大于 7 时,酶活开始下降。

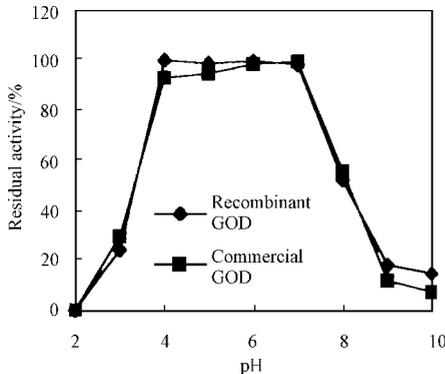


图 8 酵母 GOD 与黑曲霉 GOD 的酸碱稳定性比较

Fig.8 Comparison of GOD pH stability

2.6 重组酵母 GOD 生物传感器的制备

GOD 的一个重要应用就是制备葡萄糖检测传感器,用于临床血糖和发酵醪液葡萄糖浓度的快速测定。为进一步研究重组酵母 GOD 的应用性质,我们采用酶电极流动注射分析系统(EFIA)^[7]比较了重组酵母 GOD 电极和商品黑曲霉 GOD 电极对不同浓度葡萄糖的响应特性(图 9)。在固定流速为 2.0mL/min,进样量为 25 μ L 时,重组酵母 GOD 电极测定标准葡萄糖溶液的线性范围达 0~50mmol/L,而商品黑曲霉 GOD 电极的线性范围为 0~35mmol/L。可见,重组酵母 GOD 的高比活特性有效地增加了 GOD 电极的线性响应范围。

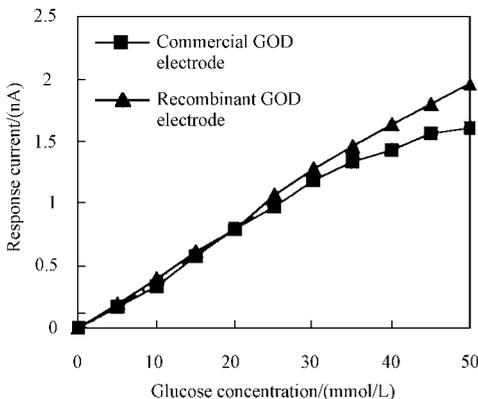


图 9 重组酵母 GOD 电极与商品 GOD 电极的响应特性

Fig.9 Comparison of GOD electrode responses

3 讨 论

如前所叙,GOD 是一种非常重要的应用酶。我国学者在 GOD 产生菌的筛选及产酶条件的优化上做了大量工作,并取得一些成果^[10~12]。本文首次进行了黑曲霉 GOD 基因在甲基营养酵母 *Pichia pastoris* GS115 中的克隆和表达,并获得了有应用前景的 GOD 生产酵母工程菌株。甲基营养酵母表达 GOD 有如下特点:a.在成分简单的 MD 培养基中细胞就能迅速生长至 130g 干重细胞/L 发酵液;b.在 AOX1 基因启动子和终止信号调控下,以甲醇作为细胞生长唯一碳源时,GOD 大量表达,其表达量可占胞外蛋白总量的 60%~70%;c.在酵母 α -Factor 前导序列作用下,具有很强的外源蛋白分泌能力,可将 95% 以上的 GOD 分泌至胞外,甲醇诱导生长 3~4d,培养液中的 GOD 活力可达 30~40u/mL;d.发酵液含杂蛋白少,目标蛋白纯化较容易,纯化成本低。在本研究中,我们采用 Q Sepharose™ Fast Flow 离子交换层析柱对 GOD 进行纯化,通过不断调整洗脱溶液的 pH 和盐离子浓度达到了较好的纯化效果。动力学性质分析表明,重组酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 的 K_m 值相近,但酵母 GOD 的比活、转换数 k_{cat} 值及二级动力学常数 k_{cat}/K_m 值却明显高于商品酶,酵母 GOD 比活和催化效率提高的原因,还有待于进一步的深入研究。重组酵母 GOD 的高催化活力和催化效率特性具有重要的实际意义,例如,我们将等量酵母 GOD 和商品黑曲霉 GOD 分别制成葡萄糖电极,前者测定葡萄糖的线性范围明显高于后者,使葡萄糖生物传感器的性能得到改善。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Witt S, Singh M, Kalisz H M. Structural and kinetic properties of nonglycosylated recombinant *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64** (4): 1405 ~ 1411
- [2] Frederick K R, Tung J *et al.* Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 3793 ~ 3802
- [3] Whittington H, Kerry-Williams S *et al.* Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1991, **18**: 531 ~ 536
- [4] Cregg J M, Vedick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BIO/TECHNOLOGY*, 1993, **11**: 905 ~ 910
- [5] ZHU H (朱衡), QU K (瞿峰), ZHU L H (朱立煌). Exacting fungi DNA for molecular biology analysis with benzyl chloride. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), 1994, **13** (1): 34 ~ 40

- formations. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(12): 3376 ~ 3385
- [7] ZHANG X E(张先恩), ZHANG X(张兴) *et al.* Determination of glucose by an enzyme electrode flow injection analyze system (EFIA). *Chinese Biochemical Journal*(生物化学杂志), 1990, 6: 294 ~ 300
- [8] Mao Q X(毛秋霞), Huang Y F(黄永芳) *et al.* Comparison of the partial qualities of several glucose oxidases. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), 2000, 21(2): 54 ~ 56
- [9] Mackay V L. Biological Research on Industrial Yeasts, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, 1987, 2: 27 ~ 36
- [10] Glucose oxidase interworking group(葡萄糖氧化酶协作组). Studies of *Penicillium notatum* AS 3.3871 glucose oxidase. *Microbiology* (微生物学通报), 1974, 1(1): 1 ~ 5
- [11] LI Y R(李友荣), ZHANG Y I(张艳玲) *et al.* Biosynthesis of glucose oxidase 1. Screening of glucose oxidase producing strain and study on the enzyme producing conditions. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 1993, 23(3): 1 ~ 6
- [12] YANG H Y(杨惠英), LI H Y(李弘毅) *et al.* Exploration on the extraction of glucose oxidase from *Aspergillus niger* I The synthesis of glucose oxidase and its properties. *ACTA SCIENTIARUM NATURALIUM UNIVERSITATIS SUNYATSENI*(中山大学学报 自然科学版), 1998, 37(5): 49 ~ 52

Cloning and Expression of *Aspergillus niger* Glucose Oxidase Gene in Methylophilic Yeast

ZHOU Ya-Feng¹ ZHANG Xian-En^{1*} LIU Hong¹ ZHANG Cheng-Gang² Anthony E G Cass³

¹(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

²(Shenyang Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015, China)

³(Biochemistry Department, Imperial College of Science, Technology & Medicine, London, SW72AY, UK)

Abstract The DNA fragment encoding *A. niger* glucose oxidase was amplified by PCR using *A. niger* genomic DNA as template and was cloned into vector of pPIC9 for expression in *Pichia pastoris*. When transformed into methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS115, the constructed plasmid pPICGOD1 directed the synthesis and secretion of functionally active GOD. After induction in MM medium for 4 days, the GOD activity in the medium reached 30 ~ 40 U/mL. SDS-PAGE revealed that recombinant yeast GOD was expressed up to 60% ~ 70% of the total soluble protein, and the secreted GOD could be purified to electrophoretic homogeneity with one purification step using Q Sepharose™ Fast Flow ion exchange chromatography. The recombinant yeast GOD had very high catalytic activity, showed about 1.6-fold increase of specific activity over the commercial *A. niger* GOD. Kinetic analysis clearly demonstrated that recombinant yeast GOD showed similar substrate affinity for glucose to *A. niger* GOD, but the turnover number of the GOD from yeast was determined to be much higher than that of *A. niger* GOD. In addition, the linear range of glucose electrode made with recombinant yeast GOD was efficiently widened due to the high catalytic activity of yeast GOD.

Key words glucose oxidase, *Pichia pastoris* gene expression, purification, kinetic analysis, biosensors

Received: December 25, 2000

This work was supported by grant from National Natural Sciences Foundation of China (39870204)

* Corresponding author. Tel: 86-27-87641492, Fax: 86-27-87641492, E-mail: x.zhane@pentium.whioy.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>