

毕赤酵母基因工程菌胞内 AOX 酶的检测方法

顾小勇 李强* 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084)

关键词 巴斯德毕赤酵母,溶氧, AOX 酶

中图分类号 Q814.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0474-04

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为外源基因的表达宿主,已成功表达出一系列胞内和胞外蛋白^[1-6],并已建立起了一套较成熟的发酵工艺。巴斯德毕赤酵母基因工程菌的外源基因,由胞内 AOX 酶(乙醇氧化酶)基因启动子调控。在非甲醇碳源条件下(如甘油或葡萄糖),AOX 酶基因表达被抑制,外源基因也处于不表达状态。而以甲醇为唯一碳源时,AOX 酶在胞内大量合成,同时外源基因被调控表达。在一般情况下,AOX 酶的变化直接反映了外源基因的表达状况,因此通过分析检测胞内 AOX 酶的含量和变化速率,就可以确定外源基因所处的状态。

有关学者对酵母中醇氧化酶活性进行了测定^[7],他们首先从酵母中提取相应的酶,然后通过测定酶催化醇氧化成醛的量或消耗氧的量定义酶活性。这种方法的主要问题是需从细胞中提取相应的酶,由于酵母细胞破碎比较困难,而且在提取过程中酶会部分失活,很难达到对其中酶的定量提取和纯化,因此很难定量研究细胞内醇氧化酶的变化,尤其是处于发酵不同阶段的活细胞内酶的变化。AOX 酶作为甲醇利用途径的第一个酶,催化甲醇和氧反应。细胞在利用甲醇的同时,也要按一定的摩尔比消耗氧,在特定的条件下,即只有甲醇作为唯一营养源时,氧的消耗速率可以反映甲醇的消耗速率,用甲醇的消耗速率或氧的消耗速率来定义 AOX 酶的活性,通过测定活体细胞对氧的消耗情况,就可以确定 AOX 酶活力。本文选择了 *P. pastoris* 基因工程菌表达尿激酶原体系统作为研究对象,根据活细胞氧化甲醇过程中消耗氧的情况,通过测定溶氧的变化,建立一种简便、可行的 AOX 酶活力的检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)基因工程菌,已将人尿激酶原基因整合到了染色体中。该基因工程菌在发酵培养过程中分为生长阶段和表达阶段,生长阶段以甘油

作为碳源,在甘油存在时外源基因的表达受到抑制,表达阶段以甲醇作为唯一碳源,目的蛋白尿激酶原得到正常表达。该基因工程菌由北京大学蛋白质工程国家重点实验室提供。

1.1.2 培养基:平皿培养基:葡萄糖 20 g/L,酵母氮源碱基 3.4 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L,琼脂 15 g/L;生长培养基: $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.93 g/L, MgSO_4 7.28 g/L, KOH 4.13 g/L, K_2SO_4 18.2 g/L,甘油 30 mL/L, H_3PO_4 26.7 mL/L,生物素 0.2 g/L,微量元素 4.3 mL/L;表达培养基:以 160 mg/L 甲醇替代甘油,其它成分同生长培养基。微量元素组成: $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g, KI 0.088 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, H_3BO_3 0.02 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ZnCl_2 7.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g,生物素 0.2 g, H_2SO_4 1 mL 定容至 1 L。上述培养基均在 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 AOX 酶活性检测用磷酸盐缓冲液:0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液。

1.1.4 培养方法:生长菌体培养:挑一环菌落加入装有生长培养基的三角瓶中,装液量为每 1000 mL 瓶 100 mL 培养基,28 °C 200 r/min 培养 48 h。表达菌体培养:将培养后的上述菌体悬浮液在无菌条件下 3000 r/min 离心 10 min,收集菌泥,加入同等体积的表达培养基,在同样条件下培养,根据需要在培养的不同时刻取样离心,用磷酸盐缓冲液稀释到不同浓度,配置成菌体悬浮液样品,用于 AOX 酶活性的测定。

1.2 实验设备

实验设备如图 1 所示。溶氧检测方法:将按 160 mg/L 比例加入甲醇的磷酸盐缓冲液预热至 28 °C,充分搅拌使溶氧饱和,从加样口加入到测氧容器中,直到缓冲液从溢流孔溢出测氧容器(注意测氧容器中不要有气泡存在),当温度稳定在 28 °C 后,调节溶氧值为 100。在搅拌条件下从加样口加入菌体,立即开始计时,每 20 s 记录 1 次溶氧值,直到溶氧值接近零为止。在测定过程中搅拌转子大小、搅拌转数固定。待测定完毕后,取样分析测氧容器中的菌体吸光度,波长 600 nm,用吸光度作为菌体浓度。

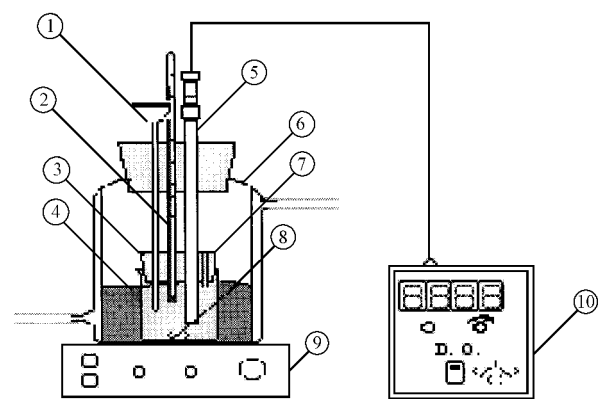


图 1 AOX 酶活性检测装置

Fig.1 Equipment for measuring the activity of alcohol oxidase
1. Inlet; 2. Thermometer; 3. Cork; 4. Container; 5. Electrode;
6. Attenuator; 7. Overflow; 8. Stirrer; 9. Pulsator; 10. Oxygen-meter

1.3 测定 AOX 酶活性原理

在甲醇为唯一底物的情况下,菌体中 AOX 酶催化甲醇的反应可以表示为:



在 28℃、0.101 MPa,含氧 20.9%,水蒸汽饱和的大气,纯水中的饱和氧浓度为 7.168 mg/L,即使全部反应完全,消耗甲醇 9.56 mg/L 左右,比加入的甲醇量 160 mg/L 小很多,因此整个催化过程可以视为溶氧控制。根据米氏方程,氧消耗速率 r_{O_2} 可以表示为式(1)的形式

$$r_{\text{O}_2} = \frac{r_{\text{O}_2\text{max}} \times [\text{DO}]}{K_m + [\text{DO}]} = \frac{k \times e_x \times \text{OD}_{600} \times [\text{DO}]}{K_m + [\text{DO}]} \quad (1)$$

比氧消耗速率 q_{O_2} 用式(2)表示:

$$q_{\text{O}_2} = \frac{q_{\text{O}_2\text{max}} \times [\text{DO}]}{K_m + [\text{DO}]} = \frac{k \times e_x \times [\text{DO}]}{K_m + [\text{DO}]} \quad (2)$$

其中 $r_{\text{O}_2\text{max}}$ —最大氧消耗速率; r_{O_2} —氧消耗速率; $[\text{DO}]$ —溶氧浓度; e_x —单位菌体内的酶浓度; k —比例系数; K_m —米氏常数; OD_{600} —以吸光度表示的菌体浓度; $q_{\text{O}_2\text{max}}$ —最大比氧消耗速率; q_{O_2} —比氧消耗速率。

如果溶氧浓度远大于 K_m ,则氧的比消耗速率与单位菌体内的 AOX 酶活成正比,因此可以用溶解氧的变化速率来表示 AOX 酶的活性。

2 结果和讨论

2.1 有甲醇和无甲醇情况下的菌体溶氧变化

用溶氧变化速率检测 AOX 酶活性的关键是能否比较灵敏地检测出溶氧的变化。在只有甲醇存在时,菌体内的 AOX 酶是否能催化甲醇,溶氧的变化是否敏感,单纯加入菌体是否也能引起溶氧的变化,针对这些问题设计了如下实验:取表达阶段培养 60 h 的菌体,分别测定加入甲醇和不加甲醇时溶氧的变化情况,结果如图 2 所示。从图中可以看出,在菌体浓度基本相同的情况下,有甲醇存在时氧的消耗很快,比

氧消耗速率达到 $24[\text{溶氧}/\text{min}/\text{OD}_{600}]$,而无甲醇条件下比氧消耗速率只有 $3.7[\text{溶氧}/\text{min}/\text{OD}_{600}]$,明显低于有甲醇的情况。这个结果说明,在只有甲醇作为营养源的情况下细胞内的 AOX 酶可以催化甲醇的反应,通过测定溶氧的变化可以反映胞内 AOX 酶的活性。值得注意的是:在没有营养源的情况下,磷酸盐缓冲液中的菌体也可以消耗溶液中的氧,这说明菌体中存在着维持其能量代谢的碳源,这种代谢引起的溶氧变化只占有甲醇时的 12%,但是实际上在有外源碳源存在并维持一定水平的情况下,细胞内部的碳源应该保持恒定,因此说这种影响可以忽略。

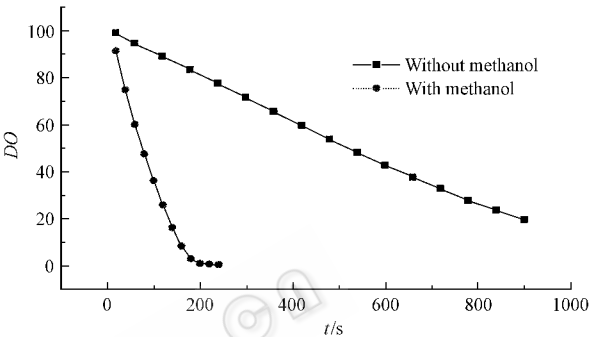


图 2 有甲醇和无甲醇细胞耗氧比较

Fig.2 Comparison of the effect of methanol to oxygen-consume

2.2 AOX 酶活性检测的影响因素

为了测定 AOX 酶活性,必须首先确定各种因素对检测条件的影响。主要的影响因素有温度、缓冲液 pH、检测菌体的适宜浓度等。因为该体系的发酵温度为 28℃,人们所关心的也正是在该温度下 AOX 酶的活性,因此 AOX 酶的测定温度选择 28℃。为了排除甲醇浓度变化的影响,甲醇浓度必须过量,因此本文选择了甲醇浓度为 160 mg/L(表达培养的初始甲醇浓度)。本文只研究了 pH 和菌体浓度对检测的影响。

2.2.1 缓冲液 pH 的影响:将溶有甲醇的不同 pH、浓度为 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液加入测氧容器中,加入相同浓度的表达阶段的菌体,测定其溶氧变化曲线,结果列于图 3 中,对应的比氧消耗速率列于表 1 中。从实验结果可以看出,缓冲液的 pH 在本实验范围内对溶氧变化曲线没有明显的影响,pH 从 4.9 变化到 7.4 时比氧消耗速率变化不到 16%,对检测的灵敏度影响不大,因此本文选择适合目的蛋白表达的 pH 进行 AOX 酶活性测定,其值为 pH6.2。

表 1 pH 对检测 AOX 酶时氧比消耗速率的影响

Table 1 Oxygen consumption ratios of the AOX under different pH						
pH	4.9	5.3	6.2	6.6	7	7.4
$\text{DO}(t/\text{OD}_{600})$	0.453	0.473	0.508	0.505	0.522	0.524

2.2.2 菌体浓度的影响:加入不同浓度的菌体,对溶氧变化的影响结果列于图 4 中。从图中可以看出,溶氧在开始以直线速度下降,当溶氧降低到一定值以后下降速度减慢,溶氧成为 AOX 酶催化反应的限制因素,此时的溶氧浓度用 DO_{crit} 表示。

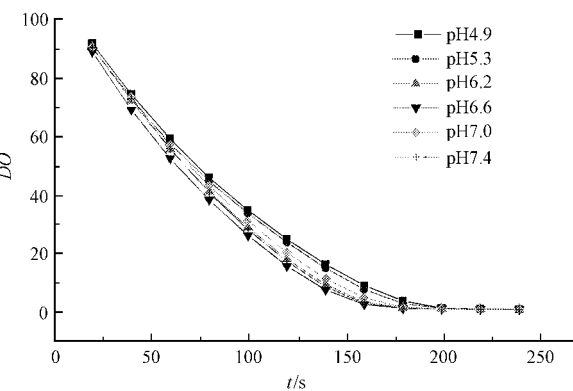


图 3 pH 对溶氧变化的影响

Fig.3 Effect of pH to the change of dissolved-oxygen

表示。在溶氧浓度大于 DO_{cri} 时,溶氧的下降与时间成直线关系(图中的直线部分相关系数均在 0.99 以上,数据未列),这个结果说明在本文条件下, AOX 酶催化甲醇的反应对于溶氧为零级反应,反应速度只与样品中菌体浓度有关。

实验测定过程中,菌体浓度 OD_{600} 以 0.5~2.0 为好,菌体浓度太低,溶氧变化到 DO_{cri} 以下,需要的时间较长。菌体浓度太高,溶氧变化太快,溶氧电极指示滞后,影响测量结果。

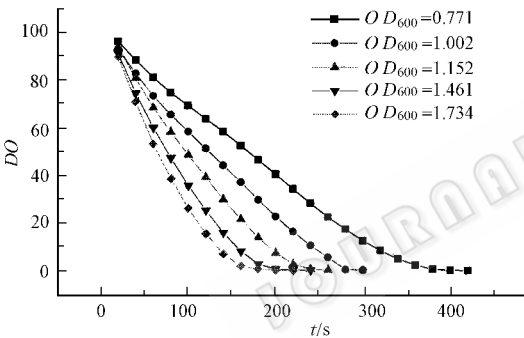


图 4 菌体浓度对耗氧情况的影响

Fig.4 Effect of concentration of *P. pastoris* to oxygen-consume

将耗氧速率对菌体浓度做图,得到图 5 的结果。从图 5 可以看出,耗氧速率与菌体浓度成很好的直线关系,相关系数达到 0.997。这个结果说明,氧消耗速率可以直接反映菌体浓度。在相同条件下,菌体浓度与 AOX 酶浓度成正比,因此氧消耗速率实际上反映的是 AOX 酶的活性。

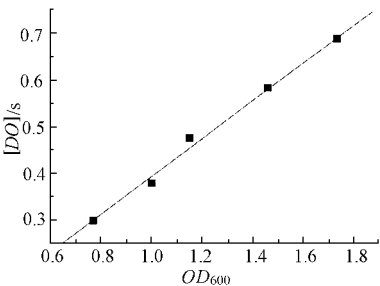


图 5 耗氧速率与菌体浓度的关系

Fig.5 Relationship of oxygen-consume and concentration of *P. pastoris*

2.3 AOX 酶催化反应动力学规律

图 4 和图 5 的结果说明,在甲醇为唯一碳源的情况下,

溶氧值高于 DO_{cri} 时,酶催化反应与溶氧值无关,比氧消耗速率等于最大比消耗速率 $qO_{2\text{max}}$,其值等于图 5 直线的斜率,通过计算 $qO_{2\text{max}} = 0.409$ 。由图 2 可知,当溶氧值低于 DO_{cri} 时,供氧成为控制因素。对于表达菌体的反应可以表示成(3)式的形式:

$$r_{O_2} = - \frac{d[DO]}{dt} = q_{O_2} \times OD_{600} \tag{3}$$

将式(2)代入式(3)积分整理得式(4):

$$\frac{[DO] - [DO]_0}{t} = q_{O_{2\text{max}}} \times OD_{600} + \frac{K_m}{t} \times \ln \frac{[DO]_0}{[DO]} \tag{4}$$

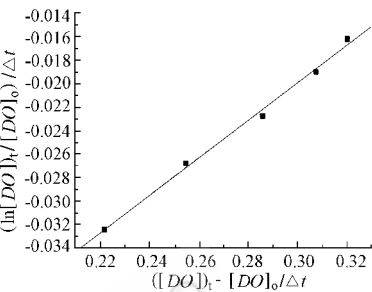


图 6 K_m 的求取

Fig.6 Evaluation of K_m

根据(4)式,对图 2 中 $OD_{600} = 1.002$ 的数据进行处理,以 $\Delta[DO]/\Delta t$ 和 $\ln([DO]_0/[DO])/\Delta t$ 为坐标做图 6,直线的斜率就是 K_m 值,二者成很好的直线关系,直线的斜率 $K_m = 0.16$ 。这个结果进一步说明,在甲醇过量并作为唯一营养源的情况下,溶氧在很大范围内(大于 10 倍 K_m)均不构成限制因素,溶氧浓度的下降速率只和胞内 AOX 酶活性有关,用溶氧的变化作为衡量 AOX 酶活性的方法是可行的。

综上所述本文定义 AOX 酶活力如下:

在一个大气压、28℃、pH6.2、浓度为 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液中,以过量的甲醇 160 mg/L 为唯一营养源进行酶催化反应,单位时间内溶氧的变化值为 AOX 酶活力单位。单位菌体浓度的酶活力为比活力 \hat{E}_{AOX} ,同时也是胞内 AOX 酶含量的值。酶活力 E_{AOX} 和酶比活力 \hat{E}_{AOX} 可以分别用式(5)和(6)表示:

$$\text{酶活力 } E_{\text{AOX}} = \Delta DO / \Delta t = \text{氧消耗速率} \tag{5}$$

$$\text{酶的比活力 } \hat{E}_{\text{AOX}} = E_{\text{AOX}} / OD_{600} = \text{比氧消耗速率} \tag{6}$$

其中: E_{AOX} —酶活力 u(溶氧/min)

\hat{E}_{AOX} —酶的比活力 u/单位吸光度。

2.4 基因工程菌胞内 AOX 酶比活力随时间的变化

为了进一步证明本文研究的检测 AOX 酶活性方法的科学性,对 *P. pastoris* 基因工程菌表达尿激酶原体系,在表达外源基因阶段,对胞内酶活性进行了跟踪测定,结果列于图 7 中。从图中可以看出,在甲醇的诱导下,细胞内的 AOX 酶比活力不断增加,27 h 以后 t/h 趋于恒定。

3 结 论

通过以上的实验讨论和对实际体系 AOX 酶活性的检测

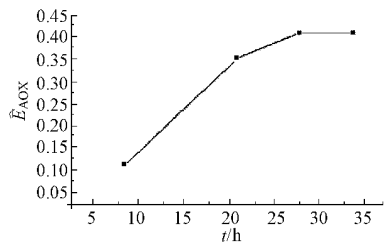


图 7 表达菌胞内 AOX 酶活力随时间的变化

Fig.7 The change of activity of AOX in cells with time

表明 通过检测以甲醇为唯一营养源的磷酸盐缓冲溶液中细胞消耗氧的速率,可以反映胞内 AOX 酶的活性。该方法简便、灵敏,可以用于 *P. pastoris* 酵母表达尿激酶原体系胞内 AOX 酶活性的检测。同时该方法对于其它胞内氧化还原酶活性的检测也有很高的参考价值。

REFERENCES (参考文献)

[1] DU I(杜瓴),YU R R(余瑞荣),HUA Z C(华子春) *et al.* Hybridization to an anti-activated platelet monoclonal antibody enhances fibrinolytic potency on urokinase. *Science in China(series B)* (中国科学 B 辑),1992 **23** (1) 32 ~ 37

[2] TU X L(涂宣林),ZHU Y S(朱运松),SONG H Y(宋后燕). Cloning and expression of t-PAcDNA in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),1998 **14** (4) 439 ~ 444

[3] QIU R I(邱荣德),ZHU J R(朱建蓓),WANG I(王垒) *et al.* Expression of recombinant Human p53 in methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),1999 **15** (4) 477 ~ 481

[4] Clare J J. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* ,1991 **9** (5) 455 ~ 460

[5] Romanos M A , Clare J J , Beesley K M *et al.* Recombinant bordetella pertactin from the Yeast *Pichia pastoris*. *Vaccine* ,1991 **9** (12) :901 ~ 906

[6] Digan M E ,Lair S V ,Brierley R S *et al.* Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* ,1989 **7** :160 ~ 164

[7] Atsumi N ,karlerik , E. Formation , purification , and partial characterization of methanol oxidase , a H₂O₂-producing enzyme in phanerochaete chrysosporium. *Biotech Appl Biochem.* 1987 **9** (4) 325 ~ 338

The Measurement of Intra-cellular AOX in Recombinant *Pichia pastoris*

GU Xiao-Yong LI Qiang* CAO Zhu-An

(Department of Chemical Engineering , Tsinghua University , Beijing , 100084 , China)

Abstract The activities of intracellular alcohol oxidase(AOX) in recombinant *P. pastoris* expressing Pro-UK were determined by a self-designed dissolved oxygen measuring equipment. The enzyme vitality and specific enzyme vitality were defined and the condition for detecting the enzyme vitality was also established. The experimental results showed that with a certain quantity of biomass in a phosphate buffer containing methanol , the consuming rate of dissolved-oxygen reflected the enzyme vitality of intra-cellular AOX. It was also found that the pH of the buffer could be very freely between 4.7 and 7.4 and the suitable optical density of cell concentration at 600 nm was between 0.5 and 2.0. Furthermore , the values of $q_{O_{2max}}$ and K_m of AOX versus oxygen consumption , which were 0.409 s^{-1} and 0.16 respectively , were calculated. It is a simple and sensitive and feasible method for quick measuring of AOX.

Key words *Pichia pastoris* , DO , alcohol oxidase