

透明颤菌血红蛋白基因 *vgb* 和腓水解酶基因 *bxn* 在毕赤酵母中的表达研究

王清路^{1,2} 张锐^{1,2} 倪万潮¹ 陈毓荃³ 郭三堆^{2*}

¹(江苏省农业科学院遗传生理研究所, 南京 210014)

²(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

³(西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

摘要 为获得高效表达外源蛋白的 *Pichia pastoris* 菌株而设计了重组质粒 pPIC9K-vgbbxn, 其中透明颤菌血红蛋白基因 *vgb* 胞内表达以提高菌体的发酵密度, 腓水解酶基因 *bxn* 分泌表达。转化 GS115 菌株后, 通过 PCR、SDS-PAGE 检测证实两基因已经整合进酵母基因组且能高效表达, 以及用准确的蛋白活性测定方法成功地检测到二者所表达的产物均具有正常的活性。摇瓶发酵实验证明, 血红蛋白在贫氧条件下可明显促进酵母菌体生长和 *bxn* 基因分泌表达。

关键词 毕赤酵母, 分泌型表达载体, 腓水解酶, 透明颤菌血红蛋白

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0730-06

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是日前最优秀、应用最广泛的外源基因表达系统之一^[1]。它不但克服了大肠杆菌表达系统不能表达结构复杂的蛋白质、表达的蛋白多形成不溶性包涵体、背景蛋白多、表达量一般不是很高等缺陷; 弥补了哺乳类细胞、昆虫细胞表达系统操作复杂, 表达水平低, 产业化生产造价昂贵的不足, 还具有其它酵母表达系统无法比拟的优越之处^[2]。但是酵母为高好氧微生物, 在发酵过程中常常会出现因供氧不足而限制了细胞密度的情况。透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla hemoglobin, VHb*) 是一种类似于人血红蛋白的胞内可溶物质, 它能够从分子水平上提高 VHb 工程菌对氧气的利用能力。基于此种特性, 到目前为止, VHb 已经在 α -淀粉酶、青霉素酰化酶及 PHB 等多种生化产品的发酵中成功应用^[3,4]。由 *bxn* 编码的腓水解酶可以将触杀性除草剂溴苯腓降解为无毒性的 3,5-二溴-4-羟基苯甲酸^[5]。因为检测此酶的活性较为方便, 故选用此基因与 *vgb* 基因共同构建 pPIC9K-vgb-*bxn* 酵母表达载体。

1 材料与方法

1.1 酶与主要试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶、 E_x Taq DNA 聚合酶等

均购自日本 TaKaRa 公司。酵母用培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母试剂盒操作手册, 胰蛋白胨、酵母提取物来自 OXOID 公司, DNA marker、蛋白质低分子量标准为 MBI 公司产品。其余试剂为国产分析纯。

1.2 质粒与菌株

质粒表达载体 pPIC9K 和酵母菌菌种 GS115 购于 Invitrogen 公司; 质粒克隆载体 pUC19、中间克隆载体 pGSVHB、大肠杆菌菌株 DH5 α 由本实验室保存。

1.3 基因来源

腓水解酶基因 (*bxn*) 为江苏省农科院遗传生理研究所保存; 透明颤菌血红蛋白基因 (*vgb*) 为本实验室合成。

1.4 表达载体的构建

本载体的构建思路是: 将 *vgb* 和 *bxn* 两个基因的表达盒串联插入 pPIC9K 表达载体, 即在表达载体的 5' AOX1 启动子后连接 *vgb* 基因及 Nos Ter 终止子等, 再在其后顺向插入 5' AOX1 启动子、 α -Factor 信号序列及 *bxn* 基因。具体过程为: 首先用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pGSVHb 质粒, 回收 0.8kb 的 *vgb* 基因和 Nos Ter 终止子片段, 克隆进 pUCm 载体, 获得重组质粒 pUCm-vgbNos。接下来用 *Bgl* II 与 *Eco*R I 双酶切 pPIC9K, 回收 1.2kb 的 5' AOX1 与 α -Factor 信号序列, 在 *Bgl* II 粘性末端添加 Linker (可同时钝

收稿日期: 2004-03-05, 修回日期: 2004-04-30。

基金项目: 江苏省农业科学院博士后基金 (No. 0110201)。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-62136406; Fax: 86-10-62136406; E-mail: gsdui@mail.caas.net.cn

化 *Bgl* II 和 *Eco* RI)后插入经 *Eco* RI 单酶切脱磷处理的 pUCm-*vgb*Nos 质粒中,用 *Bam* HI 单酶切鉴定此重组克隆的连接方向,挑取顺向连接克隆子 pUCm-*vgb*NosAOX1,用 *Sna* BI 和 *Eco* RI 将 *bxn* 基因插入,得到 pUCm-*vgbbxn* 重组质粒。最后,对 pUCm-

vgbbxn 用 *Eco* RI 完全酶切、*Bam* HI 部分酶切将 *vgb* 基因 + Nos Ter 终止子 + 5'AOX1 + α -Factor 信号序列 + *bxn* 基因插入经 *Eco* RI 和 *Bam* HI 双酶切的 pPIC9K 中,获得重组克隆 pPIC9K-*vgbbxn*。

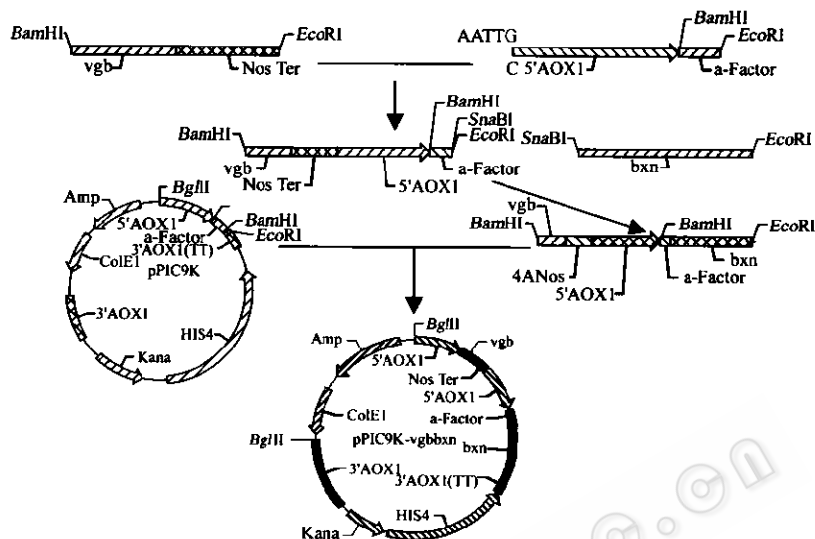


图1 质粒的构建过程

Fig.1 Construction of plasmids

1.5 酵母的转化和初筛

制备酵母 GS115 的感受态细胞,并将 *Bgl* II 线性化的重组质粒 DNA pPIC9K-*vgbbxn* 转化此感受态细胞,转化完成后涂布于 RDB 再生板上,30℃ 培养直至转化子出现。用牙签挑取转化子同时点种于 MD、MM 板上,选取在 MD 上生长正常而在 MM 平板上生长缓慢(表型为 His⁺ Mut⁺)的转化子为阳性克隆子进行表达菌株的培养和诱导表达。

1.6 表达菌株的培养及诱导表达

接种菌株于 2mL YPD 中(10g/L 酵母提取物,20g/L 胰蛋白胨,20g/L 葡萄糖),30℃、250r/min 摇床培养过夜,再以 1% 的量接种于 10mL BMGY 培养液中(10g/L 酵母提取物,20g/L 胰蛋白胨,0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0,13.4g/L YNB,4 × 10⁻⁴g/L 生物素,10g/L 甘油),置于 30℃,250r/min 的摇床上培养至 OD₆₀₀ 达 4 ~ 8;5 000r/min 离心收集菌体后,用 20mL BMMY 培养液(10g/L 酵母提取物,20g/L 胰蛋白胨,0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0,13.4g/L YNB,4 × 10⁻⁴g/L 生物素,5mL/L 甲醇)轻悬细胞后于 30℃,250r/min 诱导培养 48h,12 000r/min 离心 10min,吸取上清 -20℃ 保存。

1.7 高分泌表达菌株的筛选

vgb 基因被诱导表达的菌株比不含 *vgb* 基因的

菌株生长速度快、细胞密度高且表现出明显的红色,这种现象被用于 *vgb* 基因重组菌的初筛。根据溴苯腈溶于水成乳白色油状乳浊液而被胍水解酶降解后成无色溶液的原理设计如下选择方案:取 48μL (1.6)中的上清与 1μL 溴苯腈原液充分混合,置于 37℃ 温育,最先使混合液变透明的上清对应着胍水解酶表达量最高的菌株。

1.8 酵母转化子的 PCR 鉴定

将表达量最高的菌株接种于 10mL MGY 中,振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 5,按照 Invitrogen 公司操作手册推荐的方法提取转化子的基因组 DNA。采用 DNA Star 设计 *bxn* 鉴定引物(链 1:GAAAAAATTCGCT-GCGCGGCTCAGGA;链 2:ACCTCACGATCCCCCTCGT-CGG),两者之间为 800bp 左右;*vgb* 引物为链 1:ATGTATGGCAAACC,链 2:TTC AACCGCTTGAGC。反应条件:95℃,1min;58℃,30s;72℃,1min;30 个循环。

1.9 表达产物的 SDS-PAGE 分析

bxn 经所选高分泌表达菌株诱导培养后,取适当发酵上清液进行 SDS-PAGE 分析;VHb 参照 Invitrogen 公司毕赤酵母试剂盒操作手册上的胞内表达蛋白 SDS-PAGE 方法进行电泳分析。采用 BIO-RAD 公司的蛋白质电泳系统,浓缩胶 5%,分离胶

15%,考马斯亮蓝 R-250 染色观察。

1.10 脲水解酶的活性检测

将转 pPIC9K-vgbbxn 载体与对照载体 pPIC9K 的酵母经过甲醇诱导培养 48h, 12 000r/min 离心 10min, 各取 48 μ L 上清与 1 μ L 溴苯腈混匀, 37 $^{\circ}$ C 3h 后用棉球均匀涂布于苜蓿叶片表面, 观察其变化。

1.11 VHb 蛋白的活性检测

因为 CO 与 VHb 蛋白结合后在约 420nm 光波处会产生强烈的吸收峰, 形成典型的 VHb 蛋白特征曲线, 故采用此法来检测所表达的 VHb 蛋白是否具有活性。取 6mL 酵母诱导培养液离心, 沉淀用生理盐水缓冲液(100mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L NaCl, pH7.5)洗涤 1 次, 后重悬于 3mL 缓冲液中, 超声破碎, 4 $^{\circ}$ C, 10 000r/min 离心 15min, 取上清, 上清用 3mL 缓冲液稀释 1 倍, 并加入底二亚硫酸钠至终浓度 2.5 mg/mL, 然后通入 CO 气体, 3min 后用 Perkin Elmer 公司紫外可见分光光度计, 在 400 ~ 500 nm 波段扫描, 所得曲线即为 CO-差示光谱图^[6,7]。

1.12 贫氧对 *bxn* 表达和菌体生长的影响

按照(1.6)中酵母的培养与诱导表达方法, 转 pPIC9K-vgbbxn 载体与对照载体 pPIC9K 的酵母各设一个正常组和一个贫氧对照组。贫氧方法: 用 PARAFILM 膜将摇瓶密封, 每间隔 12h 往摇瓶中放一次气。各组每 12h 取摇瓶中少许菌液稀释 5 倍后测定 OD_{600} 值。转 pPIC9K-vgbbxn 载体组诱导 48h 后, 用紫外分光光度计和 SDS-PAGE 蛋白带的浓度分析上清中的脲水解酶含量。

2 结果

2.1 表达载体 pPIC9K-vgbbxn 的构建

*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pGSVHb 质粒得 0.8kb 片段加 Linker 后与用 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切 pPIC9K 得 1.2kb 片段连接构成重组克隆子 pUCm-vgbNosAOX1。*Bam*H I 单酶切鉴定此克隆子出现约 1.7kb 与 3.0kb 的带, 如图 2 所示(1.8kb 处有没有酶切的超螺旋质粒带, 所以带亮一些), 与预期结果一致。根据表达载体构建过程, 我们决定用 *Bam*H I 单酶切与 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切来鉴定 pPIC9K-vgbbxn, 如果插入的基因方向与位置正确则 *Bam*H I 单酶切会出现约 1.8kb 和 12.0kb 左右的带; *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切则会出现 1.8kb、1.45kb 与 10.5kb 大小的三条带。如图 3 所示结果证实了插入片段及其方向的正确性, 表明了外源蛋白阅读框的正确性。

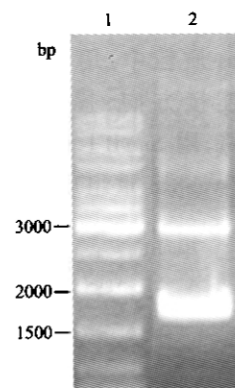


图 2 pUCm-vgbNosAOX1 鉴定

Fig.2 Identification of pUCm-vgbNosAOX1

1: MBI marker; 2: pUCm-vgbNosAOX1 digested by *Bam*H I

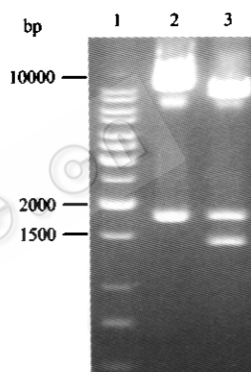


图 3 pPIC9K-vgbbxn 鉴定

Fig.3 Identification of pPIC9K-vgbbxn

1: MBI marker; 2: pPIC9K-vgbbxn digested by *Bam*H I ;

3: pPIC9K-vgbbxn digested by *Bam*H I + *Eco*R I

2.2 甲醇诱导型酵母的筛选及 PCR 鉴定

宿主细胞 GS115 为 His 缺陷型 (His⁻), 而重组载体上带有 His⁴ 基因而无酵母复制起始位点。以 *Bgl* II 线性化的 pPIC9K-vgbbxn 转化感受态 GS115 后能通过 AOX1 基因位点的替换使外源基因同源重组到酵母染色体上。因此, 在不加 His 的再生培养基 RDB 上只有重组酵母才能生长, 而重组酵母又使宿主菌的醇氧化酶基因受到破坏, 使它在甲醇作为碳源的 MM 培养基上生长缓慢, 在 MD 培养基上正常生长。由此我们筛选出 72 个转化子, 再通过酵母菌液的变红程度与菌体生长的快慢 (VHb 蛋白有促进菌体生长的作用) 以及上清降解溴苯腈的速度 (方法见 1.7) 最终确定 49 号为最优转化子。为进一步证实 *vgb* 与 *bxn* 确实已经整合进酵母基因组, 用 (1.8) 方案对其 PCR 扩增, 对照为转空载体 pPIC9K 酵母基因组, 结果如图 4: 对照无论是使用 *vgb* 特异引物扩增 (泳道 2) 还是使用 *bxn* 特异引物扩增 (泳道 4),

均没有出现扩增带;而49号转化子在使用 *vgb* 特异引物扩增时出现450bp左右的带(泳道3),与实际相符;在使用 *bxn* 特异引物扩增时出现800bp左右的带(泳道5),也与理论值一致。从而确证两个基因已经整合进酵母基因组。

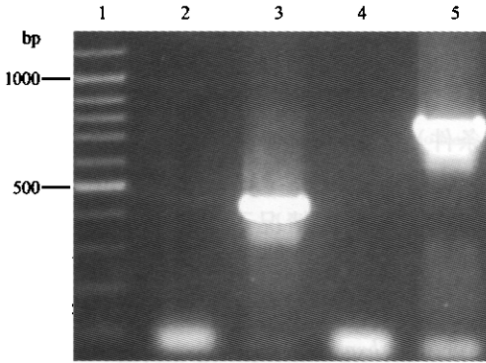


图4 PCR产物的鉴定

Fig.4 Identification of PCR products

1: MBI marker; 2: CK of *vgb*; 3: PCR products of *vgb*; 4: CK of *bxn*; 5: PCR products of *bxn*

2.3 SDS-PAGE 的检测

vgb 基因的表达产物 Vhb 蛋白有160个氨基酸残基的蛋白,分子量约为15.47kD; *bxn* 基因的表达产物为349个氨基酸残基的蛋白,分子量约为37.81kD。按照毕赤酵母试剂盒操作手册上的方法获得胞内蛋白电泳图5:对照空载体菌株 GS115-pPIC9K(泳道2)在相应位置无带,而转 pPIC9K-*vgb*-*bxn* 菌株(泳道3)有明显的蛋白带;取酵母发酵液分析胞外表达蛋白所得结果如图6:转 pPIC9K-*vgb*-*bxn* 菌株(泳道3)有明显的蛋白带,而对照空载体菌株 GS115-pPIC9K(泳道2)在相应位置无带。

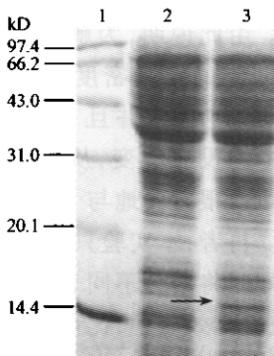


图5 Vhb 的蛋白电泳

Fig.5 SDS-PAGE of Vhb

1: protein marker; 2: CK; 3: Vhb

2.4 表达产物的生物活性检测

2.4.1 转化子酵母的初筛结果:将转 pPIC9K-*vgb*-*bxn*

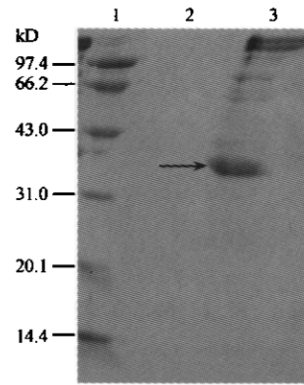


图6 腓水解酶的蛋白电泳

Fig.6 SDS-PAGE of nitrilase

1: protein marker; 2: CK; 3: nitrilase

载体酵母与转空载体酵母用 BMGY 培养基 30℃, 250r/min 培养 48h, 可见转 pPIC9K-*vgb*-*bxn* 载体的酵母明显比相同条件下转空载体的酵母发红且细胞密度高,可初步确定 *vgb* 基因已经表达; *bxn* 基因按(1.7)中的方案结果为:转空载体 pPIC9K 酵母上清中的溴苯腈仍以乳白色油状乳浊液形式存在,而转 pPIC9K-*vgb*-*bxn* 载体酵母的上清已经变得清澈透明,表明分泌表达的腓水解酶已经将溴苯腈降解。

2.4.2 表达产物活性的进一步检测:按照(1.11)中的方法检测 Vhb 蛋白活性结果如图7。转 pPIC9K-*vgb*-*bxn* 酵母菌胞内蛋白在420nm处有强烈的吸收峰,而转空载体对照吸收峰不大。按照(1.10)中的方法检测腓水解酶的活性所得结果如图8。1为用转空载体酵母菌诱导表达液处理溴苯腈后涂抹叶片所得结果,叶片死亡,说明溴苯腈没被降解;2为用转 pPIC9K-*vgb*-*bxn* 酵母菌诱导表达液处理溴苯腈后涂抹叶片所得结果,叶片正常,说明溴苯腈已被降解;3为没涂任何物质的正常叶片。从而说明在巴斯德毕赤酵母胞内表达的透明颤菌血红蛋白与分泌表达的腓水解酶蛋白均具有正常的生物活性。

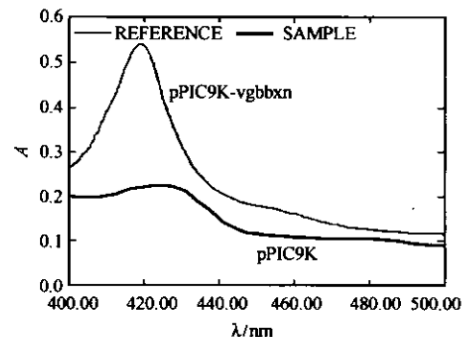


图7 Vhb 的活性检测结果

Fig.7 Verification result of Vhb activity

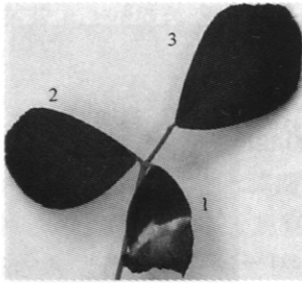


图 8 脲水解酶活性检测结果

Fig.8 Verification result of nitrilase activity

2.5 贫氧条件下的菌体生长和 *bxn* 表达

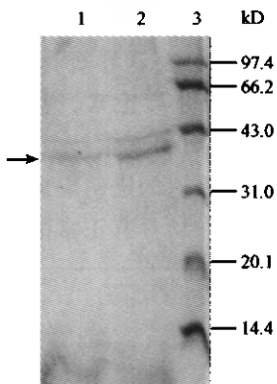
(1.12)中测定的菌体密度见表 1(OD_{600} 值是菌液稀释 5 倍的结果),诱导前转 pPIC9K-*vgbbxn* 载体的菌株与转 pPIC9K 载体的菌株对照在供氧正常状态下,两者的菌体密度基本一致,在贫氧状态下也基

本一致,说明在 *vgb* 基因不表达的情况下,两种菌株生长状态不存在差别;诱导后,转 pPIC9K-*vgbbxn* 载体的菌株与其对照菌株在正常供氧条件下,前者的菌体密度略高于后者,而在贫氧条件下,前者的菌体密度显著高于后者,说明 *vgb* 基因的表达有助于菌株的生长。测量正常状态下与贫氧状态下转 pPIC9K-*vgbbxn* 载体菌株的诱导表达液上清中的总蛋白含量,结果 OD_{280} (正常条件)值为 6.0000, OD_{280} (贫氧条件)值为 5.8511,表明正常状态下上清中的总蛋白含量略高。SDS-PAGE 后结果如图 9 所示:在上样量均为 $20\mu\text{L}$ 的情况下,从染色的深浅看,贫氧条件下(泳道 2)分泌表达的目的带反而浓于正常条件下(泳道 1)的。表明在贫氧状态下 *vgb* 基因的表达能促进外源 *bxn* 基因的表达。

表 1 贫氧对菌体生长的影响

Table 1 Effects of hypoxic habitats on cell growth

	pPIC9K- <i>vgbbxn</i> (OD_{600})		Time	pPIC9K (OD_{600})	
	Normal	Hypoxic		Normal	Hypoxic
Before induced	2.7731	1.4864	12 th h	2.6005	1.5231
	3.7271	2.9472	24 th h	3.6039	2.8563
	4.0772	3.6235	36 th h	3.9821	3.7112
	4.4383	3.8075	48 th h	4.3563	3.8109
After induced	4.5316	4.0208	12 th h	4.3786	3.8233
	4.6852	4.4608	24 th h	4.4001	3.9331
	4.7385	4.5689	36 th h	4.5446	4.0111
	4.7932	4.5843	48 th h	4.5751	3.9652

图 9 *bxn* 在贫氧与正常环境下的表达Fig.9 Expression of *bxn* in hypoxic and normal habitats

1: normal habitats; 2: hypoxic habitats; 3: marker

3 讨论

本实验以现今实验研究与工业化生产中最常用的巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 的分泌型表达载体 pPIC9K 为研究对象,成功地将能够提高发酵细胞

密度的 *vgb* 基因和 *bxn* 基因导入酵母且应用可靠的手段检测到其表达的蛋白及蛋白活性,并且观察到酵母生长速度变快,细胞密度增加,与贺鹏等人^[8]报道的情况一致。由此说明,为解决工业酵母发酵中因供氧不足而限制的细胞密度提高所设计的质粒 pPIC9K-*vgbbxn* 是成功的,并且 pPIC9K 多克隆区的 *Sna*B I、*Eco*R I 均没有改变,从而其他需要分泌表达的蛋白基因可以很方便地与 *bxn* 发生替换达到高效表达的目的。再者,本实验只使用了 pPIC9K 分泌型表达载体就同时将两种不同表达方式的基因导入了酵母,并均获得高效表达,比传统的构建两种表达载体、分两次转化的方案省时、省工、省钱,这一结果为酵母基因工程菌株的构建提供了一定的理论依据。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotro-

- phic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**(1):55 - 62
- [2] Peng Y(彭毅), Bu W(步威), Kang LY(康良仪). Methylotrophic yeast system. *Biotechnology Information*(生物技术通报), 2000, 1: 38 - 41
- [3] Yu HM(于慧敏), Shen ZY(沈忠耀). Progress in research of *Vitreoscilla* hemoglobin and *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Acta Microbiol Sinica*(微生物学报), 1999, **39**(5), 478 - 482
- [4] Khosla C, Bailey JE. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1988, **214**:158 - 161
- [5] D'Halluin K, Bonne E, Bossut M *et al.* Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell*, 1992, **4**:1495 - 1505
- [6] Webster DA, Liu CY. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome o reductase associated with cytochrome o purified from *Vitreoscilla*. *J Biol Chem*, 1974, **249**(13):4257 - 4260
- [7] Liu CY, Webster DA. Spectral characteristics and interconversions of the reduced, oxidized and oxygenated forms of purified cytochrome o. *J Biol Chem*, 1974, **249**(13):4261 - 4266
- [8] He J(贺鹏), Lu DJ(卢大军), Wang QH(王钦宏) *et al.* Cloning and expilfrion of VHB gene in D-Arabitol producing yeast. *Acta Microbiol Sinica*(微生物学报), 2001, **6**:315 - 319

Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin and Nitrilase in the Yeast *Pichia pastoris*

WANG Qing-Lu^{1,2} ZHANG Rui^{1,2} NI Wan-Chao¹ CHEN Yu-Quan³ GUO San-Dui^{2*}

¹(Institute of Agrobiological Genetics and Physiology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

²(Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

³(College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract The expression of the *vgb* gene *in vivo* could improve the fermentation density and then contribute the extracellular secretion of the product of *bxn* gene. Constructed the recombination plasmid pPIC9K-vgbbxn and transformed into *Pichia pastoris* GS115. The results of PCR and SDS-PAGE indicate that the *vgb* gene and *bxn* gene had integrated into the genome of *Pichia pastoris* GS115 and expressed in efficient level. Also, the protein activity of their products had been verified respectively. Shake flask fermentation experiments showed that the presence of VHB in yeast *Pichia pastoris* efficiently enhanced cell growth and secretive expression of *bxn* gene under hypoxic habitats.

Key words *Pichia pastoris*, secretion express carrier, nitrilase, *Vitreoscilla hemoglobin*

Received: 03-05-2004

This work was supported by Grant from Jiangsu Academy of Agricultural Sciences Postdoctor Fund(No.0110201).

* Corresponding author. Tel:86-10-62136406; Fax:86-10-62136406; E-mail:gsdui@caas.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>