

• 研究报告 •

云芝 NADPH-细胞色素 P450 还原酶在大肠杆菌中表达及酶学特性分析

孙雪娃^{1,2,3}, 何超^{1,2,3}, 方泽民^{1,2,3}, 肖亚中^{1,2,3}

1 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 现代生物制造安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230601

3 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230601

孙雪娃, 何超, 方泽民, 等. 云芝 NADPH-细胞色素 P450 还原酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学特性分析. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1156-1168.

Sun XW, He C, Fang ZM, et al. Expression and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Trametes versicolor* in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1156-1168.

摘要: 云芝 *Trametes versicolor* 具有很强的环境有机污染物降解能力,其烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-细胞色素 P450 还原酶 (NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR) 为细胞色素 P450 酶 (Cytochrome P450s, CYPs) 提供电子,参与有机污染物的降解过程。序列分析显示,云芝基因组拥有 1 个潜在 CPR 序列和多个潜在 CYP 序列。为深入研究云芝 CPR 参与细胞降解有机污染物的分子机制,实验进行了云芝 CPR 在大肠杆菌中异源表达和酶学特性分析。结果表明,经 IPTG 诱导后,去除预测的 N 端膜锚定区域(氨基酸残基 1-24)的 CPR 蛋白 (CPR Δ 24) 可在重组菌中实现可溶性表达,且表达蛋白的分子量与理论值 (78 kDa) 一致。镍离子亲和层析和分子筛层析纯化后测得其比活性为 5.82 U/mg。酶学性质分析显示,重组 CPR Δ 24 的最适温度和 pH 分别为 35 °C 和 8.0,并对一些金属离子及有机溶剂具有不同程度的耐受性。酶在 35 °C、pH 8.0 反应条件下对 NADPH 的动力学参数 K_m 和 k_{cat} 分别为 19.7 μ mol/L、3.31/s;对底物细胞色素 c 的动力学参数 K_m 和 k_{cat} 分别为 25.9 μ mol/L、10.2/s。以上研究为探究云芝 CPR 在环境有机污染物降解途径中的功能机制奠定基础。

关键词: 云芝, NADPH-细胞色素 P450 还原酶, 大肠杆菌, 异源表达, 酶学特性

Received: December 25, 2017; **Accepted:** February 8, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31370114, 31170056).

Corresponding authors: Yazhong Xiao. E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

Chao He. E-mail: chaohe@ahu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31370114, 31170056) 资助。

网络出版时间: 2018-06-08

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180607.1128.002.html>

Expression and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Trametes versicolor* in *Escherichia coli*

Xuewa Sun^{1,2,3}, Chao He^{1,2,3}, Zeming Fang^{1,2,3}, and Yazhong Xiao^{1,2,3}

¹ School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

² Anhui Key Laboratory of Modern Biomanufacturing, Hefei 230601, Anhui, China

³ Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: *Trametes versicolor* has strong ability to degrade environmental organic pollutants. NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) of *T. versicolor* transfers electron to cytochrome P450s (CYPs) and participates in the degradation process of organic pollutants. Sequence analysis showed that the genome of *T. versicolor* contains 1 potential CPR and multiple potential CYP sequences. To further study the molecular mechanism for the involvement of *T. versicolor* CPR in the cellular degradation of organic pollutants, a CPR gene from *T. versicolor* was cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli*. Subsequently, the main properties of the recombinant enzyme were investigated. A truncated CPR protein lacking the predicted membrane anchor region (residues 1-24), named CPR Δ 24, was overexpressed as a soluble form in *E. coli*. The recombinant CPR Δ 24 protein showed a molecular weight consistent with the theoretical value of 78 kDa. Recombinant CPR Δ 24 was purified using a Ni²⁺-chelating column followed by size exclusion chromatography. The specific activity of the purified CPR Δ 24 was 5.82 U/mg. The CPR Δ 24 enzyme displayed the maximum activity at 35 °C and pH 8.0. It has different degrees of tolerance against several types of metal ions and organic solvents. The apparent K_m and k_{cat} values of recombinant CPR Δ 24 for NADPH were 19.7 μ mol/L and 3.31/s, respectively, and those for the substrate cytochrome c were 25.9 μ mol/L and 10.2/s, respectively, under conditions of 35 °C and pH 8.0. The above research provides the basis for exploring the functional mechanism of *T. versicolor* CPR in the degradation pathway of environmental organic pollutants.

Keywords: *Trametes versicolor*, NADPH-cytochrome P450 reductase, *Escherichia coli*, heterologous expression, enzymatic properties

白腐真菌能够降解许多难降解有机污染物,除了其胞外木质素降解酶系,其胞内的细胞色素 P450 酶系 (Cytochrome P450s, CYPs) 的降解功能也越来越引起人们的关注。白腐真菌可以依赖 CYP 酶系脱毒和降解环境中的各种外源化合物^[1-2],如多环芳烃、酚类、固醇类和烷烃等化合物。云芝 *Trametes versicolor* 是白腐真菌的一种,能降解多种农药^[3]、废水中的药物残留^[4-5]以及其他环境污染物^[6-7],其 CYP 系统同样参与这些污染物的降解^[4,6-7]。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-细胞色素 P450 还原酶 (NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR) 是一类以 FMN (黄素单核苷酸) 和 FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸) 为辅基的氧化还原酶,是 CYP 系统中的重要组成部分。CPR 从电子供体 NADPH 获得电子之后传递给 CYPs,而后 CYPs 才能与底物发生氧化还原反应,发挥代谢活性。CPR 是 CYP

的主要电子供体,与 CYP 的电子传递反应是 CYP 氧化还原反应的限速步骤^[1]。真核细胞的 CPR 通常锚定在内质网上而其催化活性中心位于胞质一侧。CPR 从 N 端到 C 端包括 N 端膜锚定区、FMN 结合域、中间连接域、FAD 和 NADPH 结合域。连接域调节两个黄素辅因子正确的空间构象,使其有效传递电子^[8-9]。CPR 作为双黄素还原酶,对底物提供电子,使其参与氧化还原反应,其底物包括细胞色素 c、微粒体 CYPs、细胞色素 b5 氧化还原酶、血红素氧化酶等^[10]。

基因组序列分析表明,模式菌黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 有 149 个 CYP 和 1 个 CPR^[2,11]。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 只有 3 个 CYP 和 1 个 CPR^[12]。云芝中目前也只鉴定出一个 CPR^[13],而有多数 CYP^[14]。一些 CYP 受到外来化合物的刺激会上调表达^[14],表明云芝

化学压力响应系统参与异生物的代谢。另一方面, *CPR*的 mRNA 水平在有无化学压力的细胞中几乎不变, 表明 *CPR* 组成型表达, 该 *CPR* 对 *CYP* 的专一性要求可能不高, 可以对一系列的 *CYPs* 起到提供电子的作用, 也可能支持来源于近源物种的 *CYP* 电子传递途径。

一个 *CPR* 如何驱动那么多 *CYPs* 和其他类型的底物参与氧化还原反应是一个重要的研究领域。已有的研究发现, *CPR* 和 *CYPs* 主要通过静电力相互作用^[15-16]。电子从 FMN 转移到 *CYP* 的血红素的过程中, *CPR* 经历大的构象变化, 使 FMN 辅因子暴露在溶剂中^[9,17]。有研究推测一些膜上的 *CYPs* 在一个 *CPR* 分子周围集结成簇, *CPR* 在不同 *CYPs* 分子间穿梭, 与 *CYPs* 接触反应很快^[18-19]。磷脂双分子层也会影响 *CPR* 和 *CYPs* 的相互作用, 它可能通过和 *CPR* 正电荷区域的弱相互作用而调节 *CPR* 的还原电势^[20]。目前, 对 *CPR* 和不同 *CYPs* 之间相互作用机制的研究还在发展阶段^[21]。

为了体外研究 *CPR* 和各种底物之间的相互作用, 以及构建 *CYP* 生物反应酶系, 需对 *CPR* 进行单独表达和纯化。目前已有一些关于 *CPR* 在大肠杆菌中异源表达和功能鉴定的报道^[22-24]。为利于 *CPR* 在大肠杆菌细胞内高效可溶性表达, 通常的策略是对其 N 端膜结合的疏水区域进行序列改造或者截除^[22-24]。真核生物的 *CYP* 也是膜结合蛋白, 通常也利用 N 端疏水区域替换或去除的策略实现其在大肠杆菌中的可溶且活性形式的表达^[25-27]。

本研究通过将云芝的全长 *CPR* 和去除预测的 N 端膜锚定区域 (第 1-24 个氨基酸残基) 的 *CPR* Δ 24 分别在大肠杆菌中异源表达, 最终获得可溶性表达的 *CPR* Δ 24 蛋白, 对该蛋白进行纯化, 并对其酶学特性进行分析, 为体外构建 *CYP* 生物反应酶系, 研究云芝 *CPR* 和不同底物之间的相互作用, 以及进一步探究云芝 *CPR* 在环境有机污染物降解途径中的功能机制提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

宿主菌大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 为本实验室保藏。质粒 pET-28_TEV 为本实验室在 pET-28a(+)基础上改造, 即将凝血酶 (Thrombin) 酶切位点替换成烟草蚀纹病毒蛋白酶 (Tobacco etch virus protease, TEV) 酶切位点后保藏 (图 1)。

1.1.2 试剂及仪器

DNA marker 2K Plus II、DNA 聚合酶、DNA 连接酶、限制内切酶均为 TaKaRa 产品。柱纯化试剂盒 Ni-NTA、蛋白浓度测试试剂盒 Bradford 为生工生物工程 (上海) 股份有限公司产品。质粒提取试剂盒以及胶回收试剂盒购自康宁生命科学 (吴江) 有限公司; 其他试剂为国产和进口分析纯试剂。所用仪器: Eppendorf PCR 仪 (Thermo Fisher Scientific-US)、DYY-6C 电泳仪 (上海天能科技公司)、水平式电泳槽以及垂直电泳槽 (上海天能科技公司)、超声波细胞粉碎机 SCIENTZ-IIID (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.1.3 引物

云芝全长 *CPR* (GenBank Accession No. AB065368.1, 2 190 bp, 编码全长 *CPR* 蛋白 730 个氨基酸) 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行全基因合成, 并将酶切位点 *Nde* I、*Xho* I 引入, 与 pET-22b(+)载体连接, 导入感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3)。设计去除 N 端膜锚定区域的 *CPR* Δ 24 的上下游引物分别命名为 N1、N2, 将酶切位点 *Nde* I、*Xho* I 分别引入, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 获取目的片段

CPR Δ 24 片段由全长 *CPR* 序列经 PCR 扩增获得。PCR 体系为: 模板即公司合成的包含全长 *CPR*

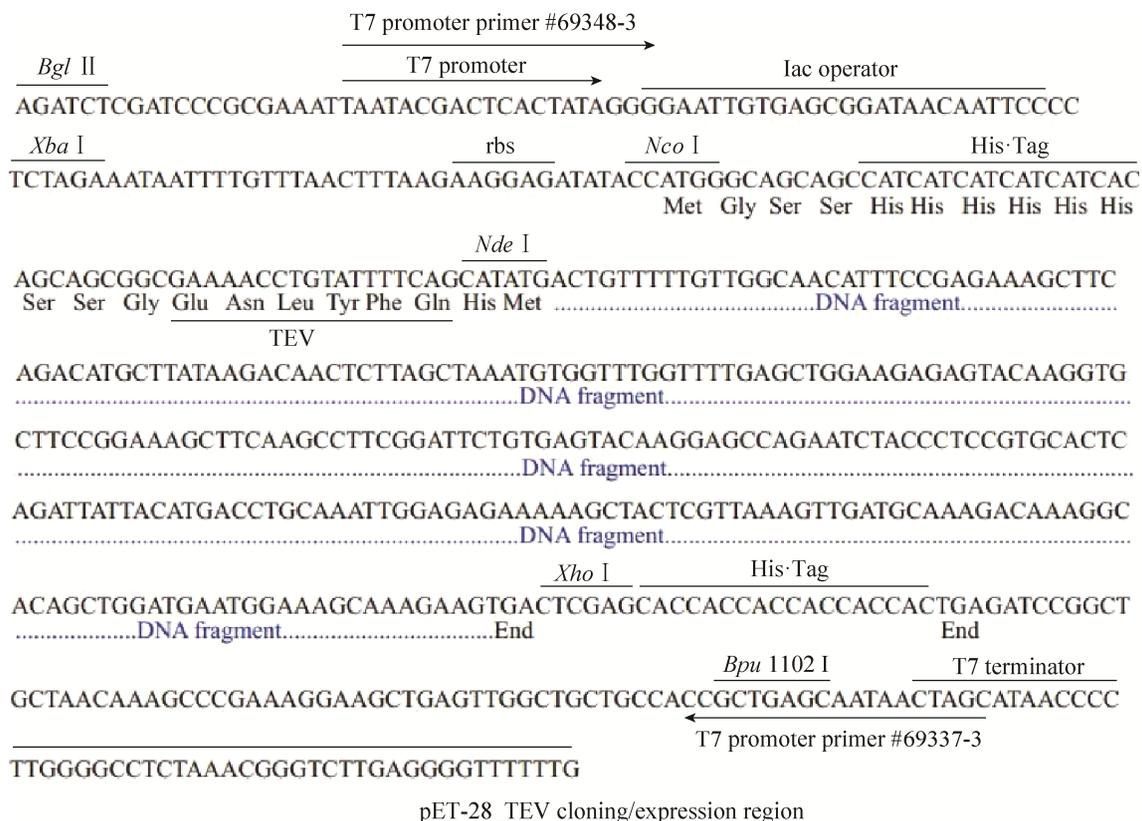


图 1 pET-28_TEV 质粒克隆/表达区域图

Fig. 1 Schematic overview of the cloning/expression region of plasmid of pET-28_TEV.

表 1 引物序列

Table 1 Primers used for amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Forward (N1)	CGACATATGCGTGATCAGCTGTTTGCAGCAAG	32
Reverse (N2)	CGCTCGAGCTAACTCCAAACATCGGTCAGAAAACGA	36

The underlined letters indicate recognition site of specific restriction enzyme.

质粒 (94 ng/ μ L) 1 μ L; 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L; Premix DNA 聚合酶 (2 \times) 25 μ L; 加水补齐至 50 μ L。PCR 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完成后以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并对目的产物进行柱纯化回收。

1.2.2 云芝 CPR 氨基酸序列分析

云芝 CPR N 端 24 个氨基酸残基组成的疏水膜锚定区域通过 TMHMM Server v. 2.0 ([http://](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)

www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 预测得到。应用 Clustal X2 软件对已获得的云芝 CPR 氨基酸序列与 GenBank 已登录的黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*、肉质显丝菌 *Phanerochaete carnosa*、绵腐卧孔菌 *Postia placenta*、干朽菌 *Serpula lacrymans*、新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 的 CPR 氨基酸序列进

行多序列对比分析。

1.2.3 构建重组表达质粒 pET28-CPR 和 pET28-CPR Δ 24

将含有空载质粒 pET-28_TEV 和公司提供的含有质粒 pET22b(+)-CPR 的 *E. coli* 分别摇瓶过夜培养并提取质粒。将所得 pET-28_TEV 空载质粒、pET22b(+)-CPR 质粒和 PCR 扩增获得的 CPR Δ 24 分别进行 *Nde* I、*Xho* I 双酶切, 酶切条件为 37 °C 反应 4 h。胶回收相应的基因片段和 pET-28_TEV 载体。载体与片段按摩尔比约 1:17 连接获得重组表达质粒 pET28-CPR 和 pET28-CPR Δ 24; 连接体系为: 载体 pET-28_TEV (约 30 ng/ μ L) 1 μ L, CPR 或 CPR Δ 24 酶切回收片段 (约 50 ng/ μ L) 4 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ L, 加入超纯水补齐至 10 μ L, 16 °C 连接过夜。

1.2.4 重组质粒 pET28-CPR 和 pET28-CPR Δ 24 的转化和鉴定

将上述获得的重组表达载体 pET28-CPR 和 pET28-CPR Δ 24 转化至新鲜制备的表达宿主大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 并涂布于含有终浓度为 30 μ g/mL 卡那霉素的抗性平板, 37 °C 恒温隔夜培养, 用已灭菌牙签挑取抗性单克隆菌落, 15% 甘油保菌并将菌株送样至生工生物 (上海) 股份有限公司测序鉴定。

1.2.5 重组蛋白的诱导表达

取经验证无误并冷冻保藏 pET28-CPR 和 pET28-CPR Δ 24 大肠杆菌转化子各 50 μ L, 分别接入含有 30 μ g/mL 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床过夜培养后转接到含有 30 μ g/mL 卡那霉素的 400 mL LB 液体培养基中, 继续 37 °C、220 r/min 培养至菌体 OD_{600} 达到 0.6–0.8, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 转入 16 °C、120 r/min 摇床培养, 并诱导目的蛋白表达 16–24 h。4 °C、8 000 r/min 离心收集菌体, 各用 80 mL 结合缓冲液 (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L

NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬菌体并超声破碎, 超声功率 250 W, 开 2 s, 关 3 s, 破碎 30 min。将菌体破碎液 12 000 r/min 离心 30 min 后对上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 重组蛋白纯化

取出保存在 4 °C 冰箱的镍柱, 用酒精重悬填料并在填料完全下沉后将柱内酒精全部放出。先用 3 个柱体积去离子水冲洗柱子, 然后加入约 5 mL 的电荷缓冲液 (0.2 mol/L NiSO₄), 使 Ni²⁺ 结合至柱材料上, 然后用适量的去离子水洗去多余的 Ni²⁺, 最后用至少 3 个柱体积的结合缓冲液平衡镍柱。待镍柱平衡好后, 缓慢上样破碎上清液。上样结束后用 2 个柱体积的结合缓冲液洗去非特异性结合在柱子上的杂蛋白, 接着用 20 mmol/L 和 50 mmol/L 的咪唑洗脱吸附在柱子上的杂蛋白, 至洗脱液无蛋白 ($OD_{280}<0.05$) 后, 再用 200 mmol/L 咪唑洗下目的蛋白并收集洗脱液, 至目的蛋白完全被洗脱下来 (最后一滴洗脱液 $OD_{280}<0.05$)。用分子筛预装柱 Hiloal 16/60 Superdex 200 column (GE healthcare) 继续纯化目的蛋白, 分子筛所用缓冲液为: 20 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, pH 8.0。

1.2.7 重组酶学特性分析

最适作用 pH: 分别在不同 pH 缓冲液 (pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0) 下测定酶活性。pH 5.0–8.0 (1/15 mol/L KH₂PO₄-Na₂HPO₄)、pH 7.5–9.0 (50 mmol/L Tris-HCl)、pH 9.0–10.0 (100 mmol/L NaHCO₃-Na₂CO₃)。其他条件按方法 1.2.8, 计算相对酶活。将 pH 梯度中对应的最高酶活定义为 100%。

最适作用温度: 分别在不同的温度 (25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C) 下测定酶活性。其他条件按照方法 1.2.8, 计算相对酶活。将温度梯度中对应的最高酶活定义为 100%。

添加剂 (金属离子、添加物) 对酶活的影响:

在标准反应体系中分别加入金属离子 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 EDTA 终浓度为 5 mmol/L, 甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮的终浓度为 10% (体积比)。对照组无任何添加剂并将其酶活定义为 100%, 其他条件按方法 1.2.8, 计算相对酶活。

1.2.8 重组酶比酶活测定

酶活以氧化型细胞色素 c 作为重组酶的底物。根据最适 pH 和最适温度以及动力学参数确定饱和底物浓度 (见方法 1.2.9), 定义标准酶反应体系为: 1 mL 酶活反应体系中加入 4 μg 的重组酶, 氧化型细胞色素 c 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, NADPH 终浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$, 测定在 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 的反应条件下在 5 min 初始反应阶段产物还原型细胞色素 c 在 550 nm 处的吸收值。 OD_{550} 的增长速率换算成细胞色素 c 由氧化型向还原型的转变速率。还原型细胞色素 c 的消光系数为 21.1 mmol/(L·cm)。

1.2.9 重组酶动力学参数的表征

测定重组酶对细胞色素 c 和 NADPH 的动力学表征参照 Warrilow 等的方法^[23]。在酶反应体系中加入不同浓度 (终浓度为 0–200 $\mu\text{mol/L}$) 的氧化型细胞色素 c 和 4 μg 的重组酶, 添加终浓度为 120 $\mu\text{mol/L}$ 的 NADPH 启动反应, 测定并记录开始与在 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 反应条件下反应 5 min 后的 OD_{550} 。在酶反应体系中加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的氧化型细胞色素 c 和 4 μg 的重组酶, 添加不同浓度 (终浓度为 0–200 $\mu\text{mol/L}$) 的 NADPH 启动反应, 测定并记录开始与在 35 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 反应条件下反应 5 min 后的 OD_{550} 。 OD_{550} 的增长速率换算成细胞色素 c 由氧化型向还原型的转变速率。以上数据均重复测定 3 次。利用 Origin Pro 9.0 和公式 (1) 对测定的数据进行拟合, 由公式 (1)、(2) 计算 CPR Δ 24 对细胞色素 c 和 NADPH 的 V_{max} 、 K_m 和 k_{cat} 值。

$$V = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$K_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 目的基因获得和重组表达质粒构建

云芝全长 CPR (GenBank Accession No. AB065368.1) 由公司合成并连接到 pET-22b 载体上, 导入感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞。去除由 N 端 24 个氨基酸残基组成的膜锚定区域的 CPR Δ 24 序列的获得是以全长基因为模板, 经 PCR 扩增实现。

将云芝去除膜锚定区域的 CPR Δ 24 扩增片段插入到表达载体。经菌落 PCR 及对重组质粒酶切验证 (图 2), 显示成功构建重组质粒 pET28-CPR Δ 24, 同时证明重组质粒 pET28-CPR Δ 24 成功导入表达宿主大肠杆菌细胞中。

2.2 云芝 CPR 氨基酸序列分析

云芝 CPR 的氨基酸序列和其他物种多序列比对结果如图 3 所示。云芝 *T. versicolor* 与白腐菌黄

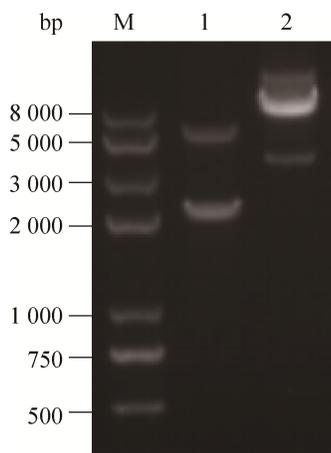
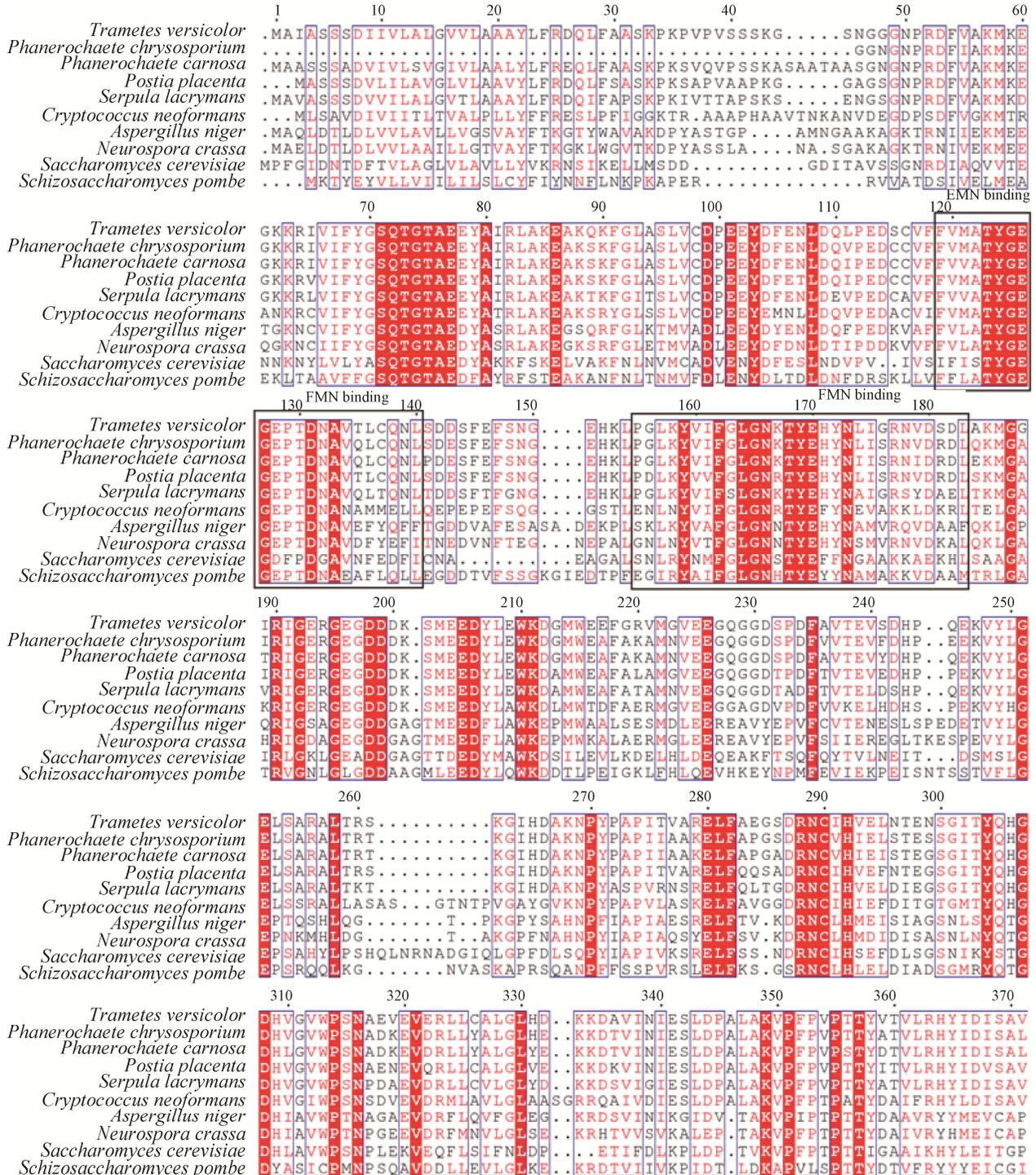


图 2 重组质粒 pET28-CPR Δ 24 的构建和双酶切鉴定
Fig. 2 Construction and restriction enzymes analysis of the pET28-CPR Δ 24 recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: double digestion of the recombinant plasmid; 2: the pET28-CPR Δ 24 recombinant plasmid.

孢原毛平革菌 *P. chrysosporium*、肉质显丝菌 *P. carnosa* 及褐腐菌绵腐卧孔菌 *Postia placenta*、干朽菌 *Serpula lacrymans* 的氨基酸序列同源性较高, 分别为 83%、81% 和 81%、78%。与非木腐菌新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans*、黑曲霉

Aspergillus niger 和粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 的同源性分别为 57%、45%、42%。与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 的 CPR 氨基酸序列同源性较低, 分别为 37% 和 39%。



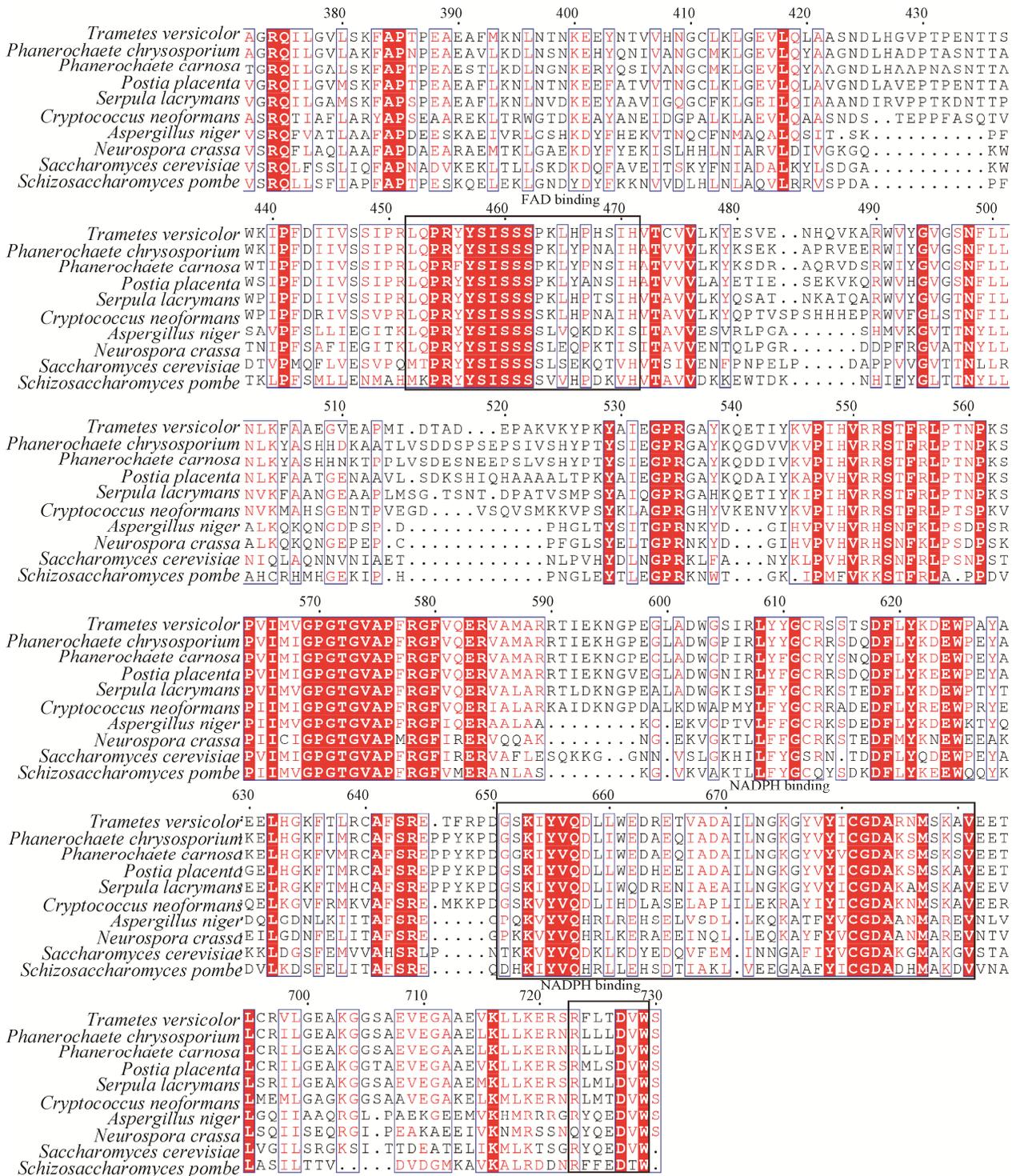


图3 云芝 CPR 和其他物种 CPR 的氨基酸序列比对
Fig. 3 Amino acid sequence alignment of CPR.

2.3 重组蛋白的诱导表达及分离纯化

SDS-PAGE 检测分析结果显示, 未见有重组 CPR 蛋白在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中可溶性表达

(图 4A), 而重组 CPR Δ 24 获得了明显的可溶性表达, 且表达蛋白的分子量与理论值 (78.35 kDa) 吻合 (图 4B)。利用重组 CPR Δ 24 的 N 端 His 标签,

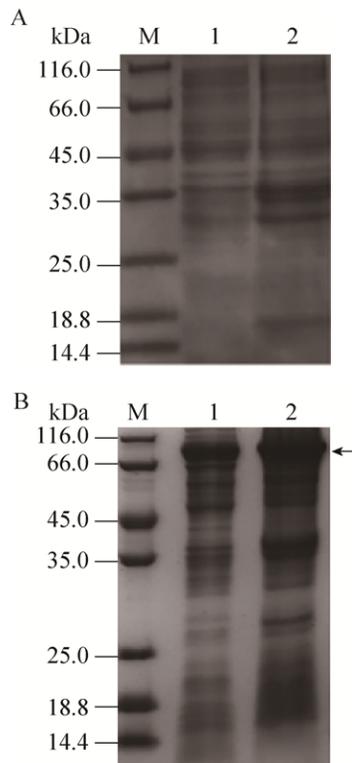


图4 CPR全长(A)及CPRA24(B)在大肠杆菌中重组表达的SDS-PAGE分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the CPR full length (A) and CPRA24 proteins (B). M: protein marker; 1: supernatant; 2: precipitation.

通过镍柱法分离纯化目的蛋白, 并利用分子筛层析法进一步分离纯化目的蛋白。重组蛋白的SDS-PAGE检测结果见图5和图6。

2.4 活性测定及酶学特性分析

2.4.1 比酶活

在35℃、pH 8.0的反应条件下测定5 min内 OD_{550} 的变化, 拟合重组CPRA24反应初速度阶段, 定义酶活单位(U)为在35℃、pH 8.0的反应条件下每分钟产生1 μmol 还原型的细胞色素c所需要的酶量。计算得出重组酶比酶活为5.82 U/mg。

2.4.2 最适pH和最适温度

测定云芝重组CPRA24的最适温度为35℃。由图7分析得出温度在25–35℃间酶活逐渐升高, 当温度大于40℃酶活明显降低, 表明该酶不适合在温度较高条件下使用。酶的最适pH为8.0,

当pH低于6.5或高于9.0后酶活性均低于60%。

2.4.3 金属离子和有机溶剂等对酶活性的影响

经测定(图8), 没有发现对重组CPRA24具有明显促进作用的金属离子, 其中5 mmol/L Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活影响较小, Co^{2+} 和 Ni^{2+} 使酶活明显降低, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 使酶失活, EDTA使酶活保持在80%以上。同时, 加入不同的有机溶剂对酶活都有不同程度的抑制作用。10%的乙醇、异丙醇和丙酮使酶活降低50%多, 10%甲醇存在时酶活保持在60%以上。

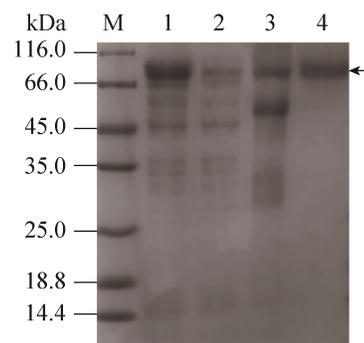


图5 重组CPRA24镍柱纯化的SDS-PAGE分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant CPRA24 purification. The arrow points to the target protein band. M: protein marker; 1: supernatant; 2: flow through; 3: fraction eluted from 200 mmol/L imidazole; 4: the target protein after purified on a Hiload 16/60 Superdex 200 column (GE healthcare).

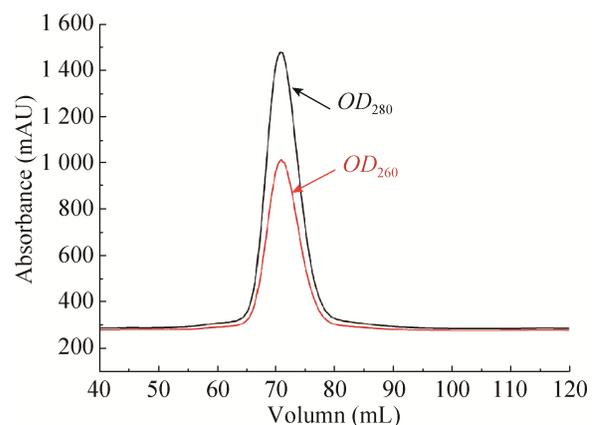


图6 重组CPRA24分子筛纯化结果图

Fig. 6 Purification of recombinant CPRA24 on a Hiload 16/60 Superdex 200 column.

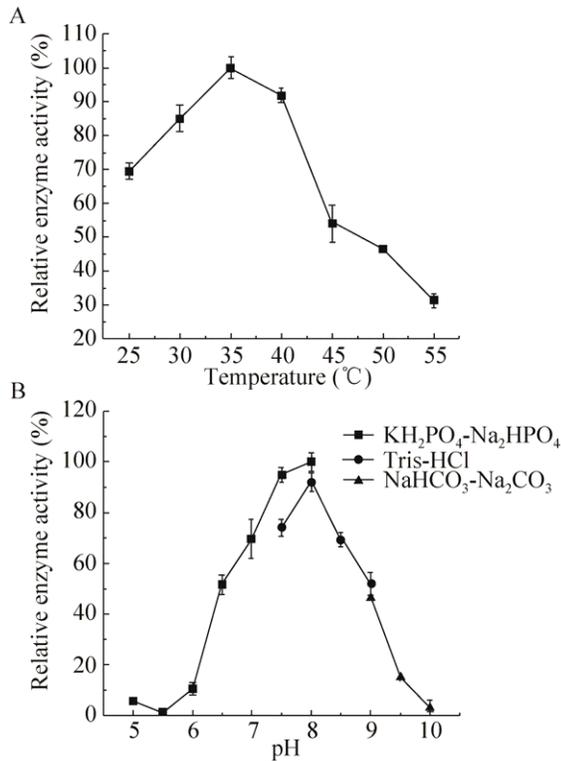


图 7 温度 (A) 和 pH (B) 对重组 CPRΔ24 酶活的影响
Fig. 7 Effects of (A) and temperature pH (B) on the activity of recombinant CPRΔ24.

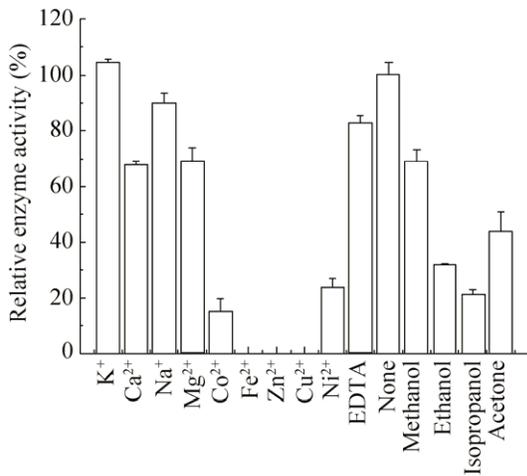


图 8 添加剂对重组 CPRΔ24 酶活的影响
Fig. 8 Effects of additives on activity of recombinant CPRΔ24.

2.4.4 对底物细胞色素 c 和 NADPH 的动力学表征

酶动力学分析表明, 重组 CPRΔ24 对底物细胞色素 c 的 K_m 为 $(25.9 \pm 2.09) \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 为 $10.2/\text{s}$ 。对 NADPH 的 K_m 为 $(19.7 \pm 1.33) \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 为 $3.31/\text{s}$ (图 9)。

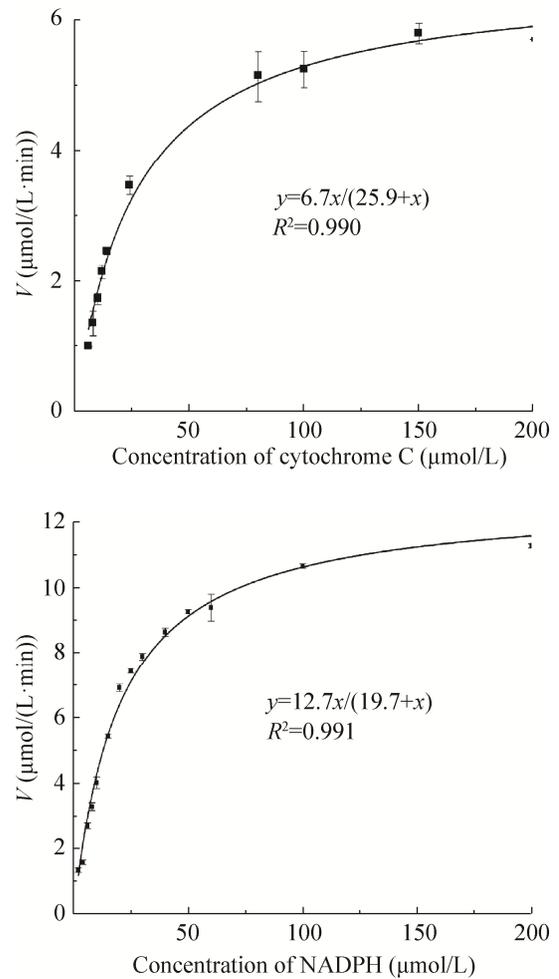


图 9 重组 CPRΔ24 对细胞色素 c 和 NADPH 的动力学参数
Fig. 9 The enzyme kinetics of recombinant CPRΔ24 for cytochrome c and NADPH.

3 讨论

白腐真菌能利用细胞色素 P450 酶系代谢一系列内源和外源的化合物。黄孢原毛平革菌 *P. chrysosporium*^[11]、肉质显丝菌 *P. carnosa*^[28]、灵芝 *Ganoderma lucidum*^[29]和毛栓孔菌 *T. hirsuta*^[30-31]等真菌已完成基因组测序, 已有多个 CPR 得到鉴定, 而关于白腐真菌 CPR 异源表达和酶学特性的研究还较少。实验成功构建云芝 CPRΔ24 (去除 N 端膜锚定区域) 的表达载体 pET-CPRΔ24, 并实现其在大肠杆菌中的异源表达, 利用镍柱亲和纯化

和分子筛层析后测得重组 CPR Δ 24 的比酶活为 5.82 U/mg, 酶的最适温度与最适 pH 分别为 35 °C 和 8.0; 金属离子 Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺使酶失活, Co²⁺和 Ni²⁺使酶活明显降低, Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺对酶活影响较小, EDTA 使酶活保持在 80% 以上。同时, 加入不同的有机溶剂对酶活都有不同程度的抑制作用。乙醇、异丙醇和丙酮使酶活降低 50% 以上, 而甲醇存在时相对酶活保持在 60% 以上。重组 CPR Δ 24 对细胞色素 c 的动力学参数 K_m 和 k_{cat} 分别为 25.9 μ mol/L 和 10.2 /s; 对 NADPH 的动力学参数 K_m 和 k_{cat} 分别为 19.7 μ mol/L 和 3.31/s。

黄孢原毛平革菌重组 CPR Δ 23 (去除 N 端膜锚定区域) 在 25 °C、pH 7.8 的反应条件下对细胞色素 c 的动力学参数 K_m 为 (11.54 \pm 0.29) μ mol/L, 比酶活为 14.76 U/mg^[23]; 而云芝重组 CPR Δ 24 在 35 °C、pH 8.0 的反应条件下对细胞色素 c 的动力学参数 K_m 为 (25.9 \pm 2.09) μ mol/L, 比酶活为 5.82 U/mg。二者在动力学参数和比酶活数值上的差异可能与测试温度和 pH 条件, 以及二者因氨基酸序列上的不同导致的酶学特性的差异相关。

云芝 *T. versicolor* 的 CPR 在大肠杆菌中重组表达、纯化和酶学特性的研究为体外构建 CYP 酶反应系统, 以及体外研究云芝 CPR 和不同 CYPs 及其他类型底物之间的相互作用奠定基础。此外, 研究者还发现一些不依赖于 CPR 的 CYP 电子传递体, 如细胞色素 b5 和 NADH 依赖的细胞色素 b5 还原酶^[32-34]。本研究也为分析云芝中其他类型的 CYP 电子传递体和 CPR 之间的差异和联系提供指导。

基于 CPR 和 CYPs 之间的作用关系及其电子供体的特性, CPR 已被运用到生物转化及药物代谢等多个研究领域。例如, 在酵母细胞中共表达酵母的 CPR 和担子菌的 CYPs 从而构建有毒异生物转化的功能筛选系统^[35-36]; 在酵母细胞中构建人源 CPR 和 CYP 共表达的体系用作体外药物代

谢的筛选^[37]等。虽然将某个 CPR 和一系列的 CYP 编码蛋白共表达以构建功能筛选体系是对 CYPs 催化潜力更为系统的评价, 但是在研究某个 CYP 的具体功能和电子传递路径时往往需要将该 CYP 和特定的 CPR 分别表达、纯化以进行体外酶活检测^[27,38]。本实验室前期异源表达和纯化了来源于毛栓菌 *T. hirsuta* AH28-2 的一个 CYP 编码蛋白。鉴于云芝 *T. versicolor* 的 CPR 专一性不高, 我们正在将该 CYP 编码蛋白和本研究中的 CPR 适配, 进行体外酚化合物脱毒反应体系的构建。这也为进一步探究云芝 CPR 在环境有机污染物降解途径中的功能机制提供帮助。

REFERENCES

- [1] Durairaj P, Hur JS, Yun H. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 125.
- [2] Syed K, Yadav JS. P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Crit Rev Microbiol*, 2012, 38(4): 339–63.
- [3] Mir-Tutusaus JA, Masís-Mora M, Corcellas C, et al. Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Sci Total Environ*, 2014, 500–501: 235–242.
- [4] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, et al. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 2009, 74(6): 765–772.
- [5] Rodriguez-Rodríguez CE, Garcia-Galán MA, Blázquez P, et al. Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. *J Hazard Mater*, 2012, 213–214: 347–354.
- [6] Marco-Urrea E, Perez-Trujillo M, Caminal G, et al. Dechlorination of 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *J Hazard Mater*, 2009, 166(2–3): 1141–1147.
- [7] Marco-Urrea E, Gabarrell X, Sarrà M, et al. Novel

- aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(24): 7796–7802.
- [8] Pandey AV, Flück CE. NADPH P450 oxidoreductase: structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(2): 229–254.
- [9] Laursen T, Jensen K, Møller BL. Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochim Biophys Acta-Prot Proteom*, 2011, 1814(1): 132–138.
- [10] Wiśniewska A, Jagiełło K, Mazerska Z. NADPH-cytochrome P450 reductase, not only the partner of cytochrome P450. *Postepy Biochem*, 2009, 55(3): 272–278.
- [11] Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6): 695–700.
- [12] Lah L, Kraševc N, Trontelj P, et al. High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. *Fungal Genet Biol*, 2008, 45(4): 446–458.
- [13] Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H. Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(6): 658–664.
- [14] Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H. Identification and characterization of novel cytochrome P450 genes from the white-rot basidiomycete, *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(1): 97–105.
- [15] Shen AL, Kasper CB. Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome *c*. *J Biol Chem*, 1995, 270(46): 27475–27480.
- [16] Sevrioukova IF, Li HY, Zhang H, et al. Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 1863–1868.
- [17] Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, et al. Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J Biol Chem*, 2009, 284(52): 36628–36637.
- [18] Bayburt TH, Sligar SG. Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(10): 6725–6730.
- [19] Nikfarjam L, Izumi S, Yamazaki T, et al. The interaction of cytochrome P450 17 α with NADPH-cytochrome P450 reductase, investigated using chemical modification and MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta-Prot Proteom*, 2006, 1764(6): 1126–1131.
- [20] Das A, Sligar SG. Modulation of the cytochrome P450 reductase redox potential by the phospholipid bilayer. *Biochemistry*, 2009, 48(51): 12104–12112.
- [21] Johnson EF, Connick JP, Reed JR, et al. Correlating structure and function of drug-metabolizing enzymes: progress and ongoing challenges. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(1): 9–22.
- [22] Lamb DC, Kim Y, Yermalitskaya LV, et al. A second FMN binding site in yeast NADPH-cytochrome P450 reductase suggests a mechanism of electron transfer by diflavin reductases. *Structure*, 2006, 14(1): 51–61.
- [23] Warrilow AG, Lamb DC, Kelly DE, et al. *Phanerochaete chrysosporium* NADPH-cytochrome P450 reductase kinetic mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(2): 189–195.
- [24] Qu XX, Pu X, Chen F, et al. Molecular cloning, heterologous expression, and functional characterization of an NADPH-Cytochrome P450 reductase gene from *Camptotheca acuminata*, a camptothecin-producing plant. *PLoS ONE*, 2015, 10(8): e0135397.
- [25] Ichinose H, Hatakeyama M, Yamauchi Y. Sequence modifications and heterologous expression of eukaryotic cytochromes P450 in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2015, 120(3): 268–274.
- [26] Ichinose H, Wariishi H. High-level heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 438(2): 289–294.
- [27] Ichinose H, Wariishi H. Heterologous expression and mechanistic investigation of a fungal cytochrome P450 (CYP5150A2): involvement of alternative

- redox partners. Arch Biochem Biophys, 2012, 518(1): 8–15.
- [28] Suzuki H, MacDonald J, Syed K, et al. Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosae* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. BMC Genomics, 2012, 13: 444.
- [29] Morin E, Kohler A, Baker AR, et al. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(43): 17501–17506.
- [30] Wang JJ, Zhang YL, Xu Y, et al. Genome sequence of a laccase producing fungus *Trametes* sp. AH28-2. J Biotechnol, 2015, 216: 167–168.
- [31] Pavlov AR, Tyazhelova TV, Moiseenko KV, et al. Draft genome sequence of the fungus *Trametes hirsuta* 072. Genome Announc, 2015, 3(6): e01287-15.
- [32] Syed K, Kattamuri C, Thompson TB, et al. Cytochrome b₅ reductase-cytochrome b₅ as an active P450 redox enzyme system in *Phanerochaete chrysosporium*: atypical properties and *in vivo* evidence of electron transfer capability to CYP63A2, Arch Biochem Biophys, 2011, 509(1): 26–32.
- [33] Porter TD. The roles of cytochrome b₅ in cytochrome P450 reactions. J Biochem Mol Toxicol, 2002, 16(6): 311–316.
- [34] Guengerich FP. Reduction of cytochrome b₅ by NADPH-cytochrome P450 reductase. Arch Biochem Biophys, 2005, 440(2): 204–211.
- [35] Hirose S, Tazaki M, Hiratsuka N, et al. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(1): 118–123.
- [36] Ide M, Ichinose H, Wariishi H. Molecular identification and functional characterization of cytochrome P450 monooxygenases from the brown-rot basidiomycete *Postia placenta*. Arch Microbiol, 2012, 194(4): 243–253.
- [37] Cheng J, Wan DF, Gu JR, et al. Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s *in vitro*. Protein Expr Purif, 2006, 47(2): 467–476.
- [38] Hatakeyama M, Kitaoka T, Ichinose H. Heterologous expression of fungal cytochromes P450 (CYP5136A1 and CYP5136A3) from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: functionalization with cytochrome b₅ in *Escherichia coli*. Enzym Microb Technol, 2016, 89: 7–14.

(本文责编 陈宏宇)