

· 环境生物技术 ·

未培养厌氧甲烷氧化古菌来源细胞色素 c 的异源表达优化

崔玲炜^{1,2}, 范晓军¹, 郑艳宁²

1 太原理工大学 生物医学工程学院, 山西 太原 030024

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

崔玲炜, 范晓军, 郑艳宁. 未培养厌氧甲烷氧化古菌来源细胞色素 c 的异源表达优化. 生物工程学报, 2022, 38(1): 226-237.
CUI LW, FAN XJ, ZHENG YN. Enhanced heterologous expression of the cytochrome c from uncultured anaerobic methanotrophic archaea. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 226-237.

摘要: 细胞色素 c 是一类在生物体内广泛存在的血红素蛋白, 由亚铁血红素和细胞色素 c 前体组成, 在生物电子学、生物医药以及污染物降解等领域具有很大的潜在应用价值。然而, 细胞色素 c 很难通过异源表达而大量获取。对于未培养厌氧甲烷氧化古菌来源的细胞色素 c (CytC4), 目前尚无成功表达和功能研究。本研究首先通过在 CytC4 的 N 端分别引入组氨酸标签和凝血酶位点, 同时过量表达可帮助细胞色素 c 分子成熟的 CcmABCDEFGH, 成功在大肠杆菌中异源表达了 CytC4。接下来又以含有细胞色素 c 分子成熟系统的奥奈达希瓦氏菌为表达宿主, 提高了 CytC4 的表达量。未培养厌氧甲烷氧化古菌 CytC4 的异源表达, 为其生理功能的探索及生物工程的应用奠定了基础。

关键词: 未培养古菌; 细胞色素 c; 异源表达; 大肠杆菌; 希瓦氏菌

Received: March 8, 2021; **Accepted:** May 25, 2021; **Published online:** June 3, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (91851102, 32070034)

Corresponding authors: FAN Xiaojun. E-mail: fanxiaojun@tyut.edu.cn

ZHENG Yanning. Tel: +86-10-64806943; E-mail: zhengyn@im.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (91851102, 32070034)

Enhanced heterologous expression of the cytochrome c from uncultured anaerobic methanotrophic archaea

CUI Lingwei^{1,2}, FAN Xiaojun¹, ZHENG Yanning²

1 School of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Cytochrome c is a type of heme proteins that are widely distributed in living organisms. It consists of heme and apocytochrome c, and has potential applications in bioelectronics, biomedicine and pollutant degradation. However, heterologous overexpression of cytochrome c is still challenging. To date, expression of the cytochrome c from uncultured anaerobic methanotrophic archaea has not been reported, and nothing is known about the function of this cytochrome c. A his tagged cytochrome c was successfully expressed in *E. coli* by introducing a thrombin at the N-terminus of CytC4 and co-expressing CcmABCDEFGH, which is responsible for the maturation of cytochrome c. *Shewanella oneidensis*, which naturally has enzymes for cytochrome c maturation, was then used as a host to further increase the expression of CytC4. Indeed, a significantly higher expression of CytC4 was achieved in *S. oneidensis* when compared with in *E. coli*. The successful heterologous overexpression of CytC4 will facilitate the exploitation of its physiological functions and biotechnological applications.

Keywords: uncultured archaea; cytochrome c; heterologous expression; *Escherichia coli*; *Shewanella oneidensis*

细胞色素 c (cytochrome c) 是一类在生物体内广泛存在的血红素蛋白, 由亚铁血红素 (heme) 和细胞色素 c 蛋白前体 (apocytochrome c) 组成。依据结构细胞色素 c 大致分为 4 类: 1) 血红素结合位置接近 N 端; 2) 血红素结合位置接近 C 端; 3) 多个血红素与多肽链结合; 4) 除血红素外还有其他辅因子与多肽链结合^[1]。作为电子载体, 细胞色素 c 主要负责细胞内和细胞间电子和能量的传递, 在细胞呼吸中发挥着不可或缺的作用。根据底物和反应体系的不同, 细胞色素 c 已经被开发应用于环境污染修复^[2-3]、生物传感^[4]、微生物燃料电池^[5]以及重金属的迁移转化^[6]等多个领域。通过研究发现, 细胞色素 c 还具有诱导细胞凋亡的作用, 虽然其作用

机制还有待进一步阐释, 但是在癌症治疗方面展现了广阔的应用前景^[7-8]。另外作为生物药物, 静脉注射细胞色素 c 可用于急救或者辅助治疗各种原因引起的组织缺氧。

作为胞外蛋白 (可溶性周质蛋白或锚定在内膜、细胞表面上), 在细胞色素 c 的分子成熟过程中, 其蛋白前体和亚铁血红素都必须穿过内膜转移到胞外, 经过翻译后修饰的蛋白前体与亚铁血红素共价结合, 正确折叠后组装成具有功能的细胞色素 c。蛋白前体中负责共价结合血红素的半胱氨酸残基必须在氧化性的周质环境中保持还原状态, 而同时溶液中必须存在疏水性的血红素。最后, 前体蛋白中血红素结合基序 C-X-X-C-H 中的半胱氨酸残基与血红素的乙

烯基在硫醇氧化还原酶的催化下形成硫醚键^[9]。目前生物体中有 3 种被认可的细胞色素 c 成熟系统,其中分布最广泛且最复杂的是 Ccm 系统,由 8 个或 9 个膜相关蛋白组成^[10-11],主要存在于 α -变形菌门和 γ -变形菌门,古菌,异常球菌纲,以及一些 β 和 δ -变形菌门。第二种为由 4 种膜蛋白组成的 Ccs 系统^[12-13],主要存在于叶绿体、革兰氏阳性菌、蓝藻菌、 ϵ -变形菌门、大部分 β 变形菌门以及部分 δ -变形菌门。第三种系统由一个高分子量的跨膜蛋白细胞色素 c 铁原卟啉裂解酶组成,存在于真菌、无脊椎动物和脊椎动物线粒体中,是目前发现的最简单的细胞色素 c 成熟系统^[10-11,14-15]。

作为异源表达的模式宿主,野生型大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在氧气缺乏条件下能够将细胞色素 c 作为厌氧呼吸链的一部分进行组装^[16],而 pEC86 质粒的成功构建,使 *E. coli* 能够表达细胞色素 c 成熟相关蛋白 CcmABCDEFGH,为细胞色素 c 的异源表达提供了便利。目前对于细胞色素 c 的研究主要集中在 γ 变形菌和 δ -变形菌中^[1,17-19],而对于古菌来源的细胞色素 c 仍然缺乏研究。已知存在于甲烷厌氧氧化古菌 (anaerobic methanotrophic archaea, ANME) 中的细胞色素 c 在甲烷厌氧氧化 (anaerobic oxidation of methane, AOM) 过程中发挥着举足轻重的作用,但是由于至今未能成功表达来源于 ANME 的细胞色素 c, AOM 的电子传递机制仍未可知^[20-21],阻碍了进一步的环境生物技术应用。

本研究通过对密码子、表达载体、诱导条件以及表达宿主等一系列蛋白表达条件的优化,成功表达了来自未培养厌氧甲烷氧化古菌的细胞色素 c,为难培养微生物细胞色素 c 的异源表达提供了重要的指导,同时也为深入研究该类型细胞色素 c 介导的电子传递机制以及将来的环境生物技术应用,迈出了关键的一步。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和菌株

pET28a (Novagen) 为常规蛋白表达载体,携带卡那霉素抗性基因; pET22b (Novagen) 携带与目的蛋白融合的信号肽序列 (pelB) 以及氨苄青霉素抗性基因; pEC86 质粒用于过量表达 *E. coli* 的 *ccmABCDEFGH* 基因簇,以辅助细胞色素 c 的成熟^[22]; 携带氯霉素抗性基因的 pBBR1MCS1 质粒用于在奥奈达希瓦氏菌 (*Shewanella oneidensis*) 中过量表达细胞色素 c^[23]。*E. coli* BL21(DE3) 和 *S. oneidensis* MR-1^[24] (中国科学院微生物研究所李寅课题组惠赠) 用作细胞色素 c 过量表达的宿主菌株。

1.1.2 培养基和培养条件

TB 培养基 (% *W/V*): 1.2 蛋白胨, 2.4% 酵母粉, 0.4% 甘油, 17 mmol/L KH_2PO_4 , 72 mmol/L K_2HPO_4 , 121 °C 灭菌 20 min; LB 培养基 (% *W/V*): 1 蛋白胨, 0.5 酵母粉, 1 氯化钠, 1.5–2.0 琼脂 (固体培养基加入), 121 °C 灭菌 20 min。卡那霉素 (Kan)、氨苄青霉素 (Amp) 和氯霉素 (Cm) 在 *E. coli* 培养基中的使用浓度分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 和 34 $\mu\text{g/mL}$; *S. oneidensis* MR-1 培养基中氯霉素 (Cm) 的使用浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 。*E. coli* 和 *S. oneidensis* MR-1 均在 200 r/min 转速条件下振荡培养,常规培养温度分别为 37 °C 和 30 °C。

1.1.3 主要试剂和仪器

1 000×金属离子溶液 (mmol/L): 0.15 CuSO_4 , 4.3 FeSO_4 , 0.1 Mo^{6+} , 45 CaCl_2 , 3.8 ZnSO_4 , 0.9 MnSO_4 , 0.086 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 。所有的抗生素均来源于北京索莱宝科技有限公司,各种限制性内切酶、Q5 超保真 DNA 聚合酶和 T5 外切酶均购于 New England Biolabs (NEB), 2× rapid mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。质粒提

取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, DNA 纯化试剂盒购自 Omega 试剂公司。

pH 计, Mettler Toledo 公司; PCR 仪和离心机, Eppendorf 公司; 紫外-可见分光光度计, ThermoFisher Scientific 公司; 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因克隆

PCR 反应体系 (50 μ L): 5 μ L 5 \times Reaction 缓冲液、5 μ L 5 \times High GC 缓冲液、0.5 μ L dNTPs (10 mmol/L)、1 μ L 引物 F、1 μ L 引物 R、0.5 μ L 模板 DNA、0.2 μ L Q5 polymerase (2 U/ μ L), 最后加去离子水补足至 25 μ L。PCR 用到的引物罗列在表 1 中。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 变性 \rightarrow 复性 \rightarrow 延伸过程重复 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 6 min。PCR 产物经 1%琼脂

糖凝胶电泳检验后, 进行纯化。

1.2.2 表达载体的构建

我们采用 T5 外切酶组装的方法对 DNA 片段和酶切的质粒载体进行连接, 以此构建重组质粒^[25]。T5 外切酶组装反应体系: 2 μ L 5 \times TEDA, 酶切后质粒载体摩尔质量与 DNA 片段的摩尔质量相等, 最后用去离子水补至 10 μ L; 连接方法: 将以上反应体系在 30 $^{\circ}$ C 下进行反应, 根据片段长度判断所需的反应时间 (10–50 min); 最后将此连接产物转化到 *E. coli* 感受态细胞中。所有构建的菌株和质粒列于表 2 中。质粒抽提、DNA 片段回收、酶切、酶连反应等均参照试剂 (盒) 说明书, 相关分子生物学方法参照文献[26]。DNA 测序委托金唯智生物科技有限公司。

1.2.3 蛋白表达和鉴定

SDS-PAGE: 配置 12%分离胶和 5%的浓缩胶, 先在低压 120 V 下将蛋白样品跑到浓缩胶

表 1 菌株构建所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Primer sequence (5' \rightarrow 3')	Size (bp)
28a-deSP-CytC4-F	<u>CTTAAGAAGGAGATATACCATGCTGTTTGTGGTCAGCATAATTG</u>	46
28a-deSP-CytC4-R	<u>GATGATGATGATGGCTGCTGCCCTTACGGAATGGTAACGGTTGC</u>	43
22b-deSP-cytC4-F	<u>GAATTAATTCGGATCCGAATCTGTTTGTGGTCAGCATAATTG</u>	43
22b-deSP-cytC4-R	<u>CTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGAATGGTAACGGTTGCATTAC</u>	44
22b-new-deSP-cytC4-F	<u>GTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTGTTTGTGGTCAGCATAAT</u>	42
22b-new-deSP-cytC4-R	<u>GGAGCTCGAATTCGGATCCTTACGGAATGGTAACGGTTGC</u>	40
cytC4-opt-1-R	CGGTACCTGCATCATTTCATTGCGC	26
cytC4-opt-2-F	GCAAATGATGCAGGTACCGTTGATAGCTTTC	31
cytC4-opt-2-R	GGTCAGGCTCATAACCGGTACGTTTG	25
cytC4-opt-3-F	GTACCGGTATGAGCCTGACCGCCGAAGAAAC	31
pB1-pBAD-pelB-cytC4-F	<u>CTAAGGAGGTTATAAAAAAGCTTATGAAATACCTGCTGCCGAC</u>	44
pB1-pelB-cytC4-R	<u>CCCCGGGGTCGACCATATGTTACGGAATGGTAACGGTTGC</u>	41
pB1-pBAD-cytC4-F	<u>GGAGGTTATAAAAAAGCTTATGCAGAATAAAACCCTGCTG</u>	41
pB1-cytC4-R	<u>CCCCGGGGTCGACCATATGTCAGTGGTGGTGGTGGTGCTC</u>	44
pB1-Tac-pelB-cytC4-F	<u>GAAACACTGCAGGAGGAAGCTTATGAAATACCTGCTGCCGACCG</u>	44
pB1-pTac-cytC4-F	<u>GGAAACACTGCAGGAGGAAGCTTATGCAGAATAAAACCCTGCTG</u>	44
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7-term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19
pBBR1-test-F	TTGCGCCGACATCATAACG	19
pBBR1-test-R	CTGTCTGTTGACCCTCGTG	20

Homologous regions are underlined.

表 2 文中所用菌株和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Description	References
Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Thermo scientific
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Expression host (WT)	[24]
BL21(DE3)-pET28a-deSP-CytC4	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) harboring pET28a-deSP-CytC4	This work
BL21(DE3)-pET22b-deSP-CytC4	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) harboring pET22b-deSP-CytC4	This work
BL21(DE3)-pET22b-new-deSP-CytC4	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) harboring pET22b-new-deSP-CytC4	This work
MR-1-pBBR1MCS1-cytC4-6his	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 harboring pBBR1MCS1-cytC4-6his	This work
Plasmids		
pEC86	Cm ^r , containing ccmABCDEFGH	[22]
pET28a	Kan ^r , pUC ori, T7 promoter	Novagen
pET22b	Amp ^r , pUC ori, pelB signal sequence, T7 promoter	Novagen
pET22b-new	Amp ^r , pUC ori, pelB signal sequence, thrombin site, T7 promoter	This work
pBBR1MCS1	Cm ^r , pBBR1 oriV, Tac promoter	[23]
pET28a-deSP-CytC4	Kan ^r , pUC ori, T7 promoter, containing cytC4 (Remove its own signal peptide sequence), no tag	This work
pET22b-deSP-CytC4	Amp ^r , pUC ori, pelB signal sequence, T7 promoter, containing cytC4 (Remove its own signal peptide sequence), C-6His	This work
pET22b-new-deSP-CytC4	Amp ^r , pUC ori, pelB signal sequence, N-thrombin site, T7 promoter, containing cytC4 (Remove its own signal peptide sequence), N-6His	This work
pBBR1MCS1-araC-pBAD-pelB-CytC4	Cm ^r , pBBR1 oriV, BAD promoter, pelB signal sequence, containing cytC4 (Remove its own signal peptide sequence), N-6His	This work
pBBR1MCS1-araC-pBAD-CytC4	Cm ^r , pBBR1 oriV, BAD promoter, containing cytC4, C-6His	This work
pBBR1MCS1-lacI-pTac(OO)-pelB-CytC4	Cm ^r , pBBR1 oriV, Tac promoter, pelB signal sequence, containing cytC4 (Remove its own signal peptide sequence), N-6His	This work
pBBR1MCS1-lacI-pTac(OO)-CytC4	Cm ^r , pBBR1 oriV, Tac promoter, containing cytC4, C-6His	This work

尾部至同一水平线，再在高压 150 V 下分离不同大小的蛋白，最后经考马斯亮蓝染色并脱色处理直至看到清晰的蛋白条带。

Western blotting: 一抗为小鼠抗 His•Tag 抗体，二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG。首先将蛋白样品进行 SDS-PAGE 垂直电泳，切胶转 PVDF 膜，按阴极/海绵/两层滤纸/胶/膜/两层滤纸/海绵/阳极的顺序放入电转仪中，电转在 4 °C 下进行，条件为 100 V、20 min；随后将膜转到封闭液中室温封闭 2 h，随后加入适当浓度的一抗，4 °C 过夜，用缓冲液漂洗，加入二抗，室温静置 2 h，再用 BeyoECL Moon 极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (Beyotime, 中国) 进行显色，最后目的条带通过净光密度进行定

量分析 (Tanon 1600 GIS 1D 分析软件)。

细胞色素 c 的光谱表征：菌体细胞破碎后取上清，加入终浓度为 5 mmol/L 的连二亚硫酸钠，对氧化型的细胞色素 c 进行还原，并在 400–600 nm 波长范围内测定其吸收光谱。还原型细胞色素 c 具有明显的可见光谱吸收现象，在 3 个不同波长下具有吸收峰：分别为 α (550 nm)、 β (521 nm) 和 γ (415 nm)。

1.2.4 进化树构建

首先在 NCBI 中对目的蛋白 CytC4 进行序列比对，将数据库中所有相似蛋白序列合并至一个 fasta 格式文件中，导入 MEGA7，并通过 Clustal W 进行多序列比对分析。通过最大似然法进行发育分析^[27]，bootstrap 参数设置为 1 000

(一般认为 500 以上时, 节点分析结果可信)^[28], 由此通过 MEGA7 得到 CytC4 的系统进化树^[29]。

2 结果与分析

2.1 编码蛋白基因序列的优化

通过对第 405 天的锰依赖型甲烷厌氧氧化生物反应器中的样品基因组进行信息挖掘, 在未培养厌氧甲烷氧化古菌 *Candidatus Methanoperedens* sp. 中发现了一段全长为 693 bp (NJD76635.1) 且具有 4 个血红素结合基序 -CXXCH- 的编码序列(FIB08_05990), 并将该基因命名为 *cytC4*。细胞色素 c 为呼吸链上一个重要的电子传递蛋白, 进化相对保守, 依据最大似然法对该蛋白序列进行进化树分析 (图 1), 找到两个近源蛋白。但目前尚无对这两个近源蛋白的相关报道, 无法对 CytC4 的表达提供参考依据。为使该厌氧甲烷氧化古菌来源的细胞色素 c 能够在 *E. coli* 中表达, 首先根据 *E. coli* 密码子偏好性对 *cytC4* 基因进行了首次密码子优化, 但并未发现明显的目的蛋白表达。随后, 使用 *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 by Morris Maduro (<http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm>) 对基因序列进行分析, 发现编码苏氨酸的密码子 ACA 的使用频率在 10% 以下, 因此将首次优化序列中的两个 ACA 密码子优化为 *E. coli* 高频苏氨酸密码子 ACC, 得到最终优化后的基因序列。

2.2 细胞色素 c 异源表达载体的优化

首先通过金唯智合成密码子优化后的基因序列, 再通过在线信号肽预测网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析信号肽的位置 (图 2), 最后利用同源重组以及 T5 外切酶将去掉自身信号肽序列的 *cytC4* 基因构建到 pET28a 上, 利用质粒 *Nco* I 酶切位点上 ATG 起始不带标签的目的蛋白的表达, 获得重组质粒

pET28a-deSP-CytC4, 利用该重组质粒表达 CytC4, 结果在超声破碎后的细胞上清液中未发现目的蛋白, 且与连二亚硫酸钠反应未检测到特征吸收峰 (图 3A)。根据目的蛋白的性质, 将表达载体更换为携带有 pelB 信号肽序列的 pET22b, pelB 属于 Sec 转运途径的典型信号肽, 将去除原始信号肽并在 C 端添加有组氨酸标签 (His•Tag) 的基因序列构建到 pET22b 上, 获得重组质粒 pET22b-deSP-CytC4, 利用该重组质粒表达 CytC4, 同样未检测到蛋白表达和特征吸收峰 (图 3B)。将 His•Tag 置于目的蛋白的 N 端或 C 端可能会对目的蛋白的折叠产生严重影响, 因此对 pET22b 质粒进行了改造, 在 pelB 信号肽序列后插入了 His•Tag 序列, 借此将 His•Tag 改为融合到目的蛋白的 N 端, 同时在 His•Tag 序列后添加一个凝血酶位点, 以避免 His•Tag 与目的蛋白距离过近而影响目的蛋白的正确折叠, 所获得质粒命名为 pET22b-HisTb。然后以 pET22b-HisTb 为表达载体, 对已有报道的 *Geobacter sulfurreducens* 来源的细胞色素 c7 编码基因和 *cytC4* 基因进行相同条件的异源表达, 对诱导表达后的细胞裂解上清液进行光谱分析, 均检测到了细胞色素 c 的特征吸收峰 (图 3C-D), 表明 pET22b-HisTb 可用于细胞色素 c 的异源表达。

2.3 诱导条件的优化

诱导剂浓度、微量元素元素、诱导温度与转速等不同培养条件可能会在很大程度上影响目的蛋白的表达量。许多细胞色素对诱导时的 IPTG 浓度非常敏感, 低浓度的 IPTG 可以更好地促进细胞色素 c 的分子成熟, 因此将 IPTG 浓度从 50 $\mu\text{mol/L}$ 降为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞色素 c 的成熟依赖于多种微量元素元素, 因此在原有培养基的基础上加入了微量元素元素溶液。同时为减少包涵体的形成, 将诱导温度从 30 $^{\circ}\text{C}$ 降低

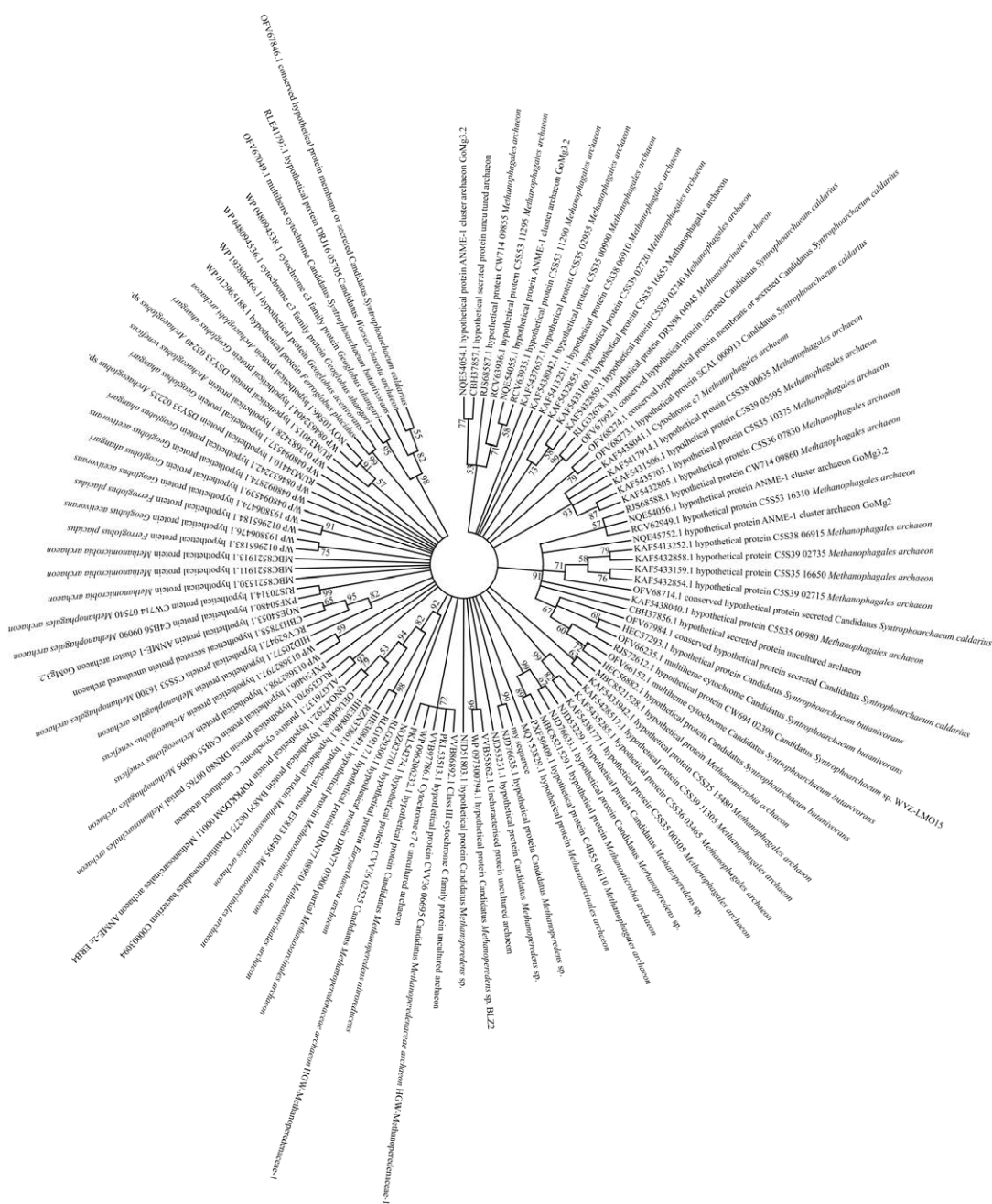


图 1 CytC4 的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of CytC4. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model^[27]. The bootstrap consensus tree inferred from 1 000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed^[28]. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. Initial tree (s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The analysis involved 101 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 56 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7^[29].

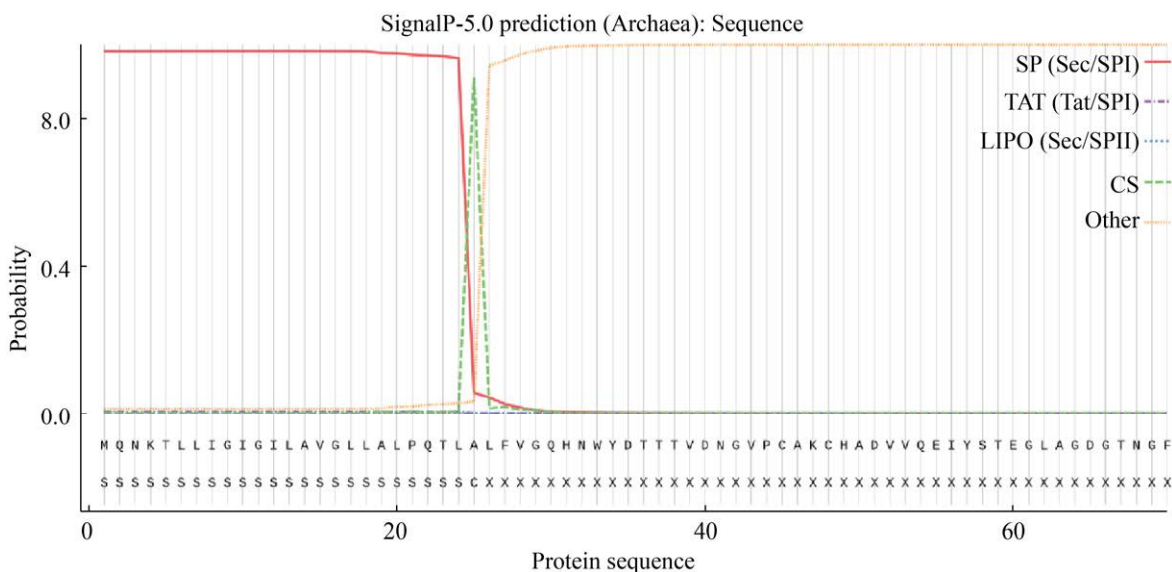


图2 蛋白序列中信号肽的预测

Figure 2 Prediction of signal peptide in the protein sequence.

到 16 °C。最后，为避免过多氧气对细胞色素 c 分子成熟的影响，将转速从 200 r/min 调整至 100 r/min。结果显示，通过一系列培养条件的优化，和图 3C 相比，细胞上清液中 CytC4 的特征吸收峰得到了明显的加强，说明培养条件的优化对细胞色素 c 的表达有促进作用，另外利用 His•Tag 抗体对 CytC4 的表达进行了 Western blotting 分析，进一步验证了 CytC4 的成功表达 (图 4B)。但是通过 SDS-PAGE 分析，没有发现明显的目的蛋白条带，说明 CytC4 的表达量仍然较低。

2.4 异源表达宿主的优化

虽然对以 *E. coli* 为表达宿主进行一系列优化后，目的蛋白能够成功表达，但是表达量仍然较低，不足以进行大量纯化。而 *S. oneidensis* 属于 γ 变形菌门，以呼吸多样性和生物发电著称，含有大量的细胞色素 c。通过分析其基因组，发现 *S. oneidensis* 能够利用 Ccm 系统有效进行自身细胞色素 c 的成熟。*S. oneidensis* MR-1 在该属中是最早完成全基因组测序的菌株，也是

一株新兴的高效异源表达宿主^[30]。因此利用 *S. oneidensis* 作为细胞色素 c 的异源表达宿主，有可能获得更高的 CytC4 蛋白表达量。

首先，通过红色荧光蛋白 (mCherry) 检测 araC-pBAD 与 lacI-pTac 两种启动子在 *S. oneidensis* MR-1 中的启动子强度，当分别使用 2 mg/mL 的阿拉伯糖和 0.2 mmol/L 的 IPTG 时，红色荧光蛋白在 *S. oneidensis* 中分别取得了相应启动子的最高表达强度 (图 5A–B)。之后将 *cytC4* 基因构建到 pBBR1MCS1 质粒上，利用两种诱导型启动子 araC-pBAD 和 lacI-pTac 启动 CytC4 的表达，同时在 CytC4 上分别用两种不同的信号肽-pelB 和 *cytC4* 本身的信号肽，获得的重组质粒分别命名为 pBBR1MCS1-araC-pBAD-pelB-CytC4、pBBR1MCS1-araC-pBAD-CytC4、pBBR1MCS1-lacI-pTac(OO)-pelB-CytC4、pBBR1MCS1-lacI-pTac(OO)-CytC4 (图 5C)，并将该重组质粒通过接合转移的方式转入 *S. oneidensis* MR-1 中，利用其自身的 Ccm 系统来帮助 CytC4 的分子成熟。在 30 °C 下培养携带有重组质粒的 *S. oneidensis* 菌

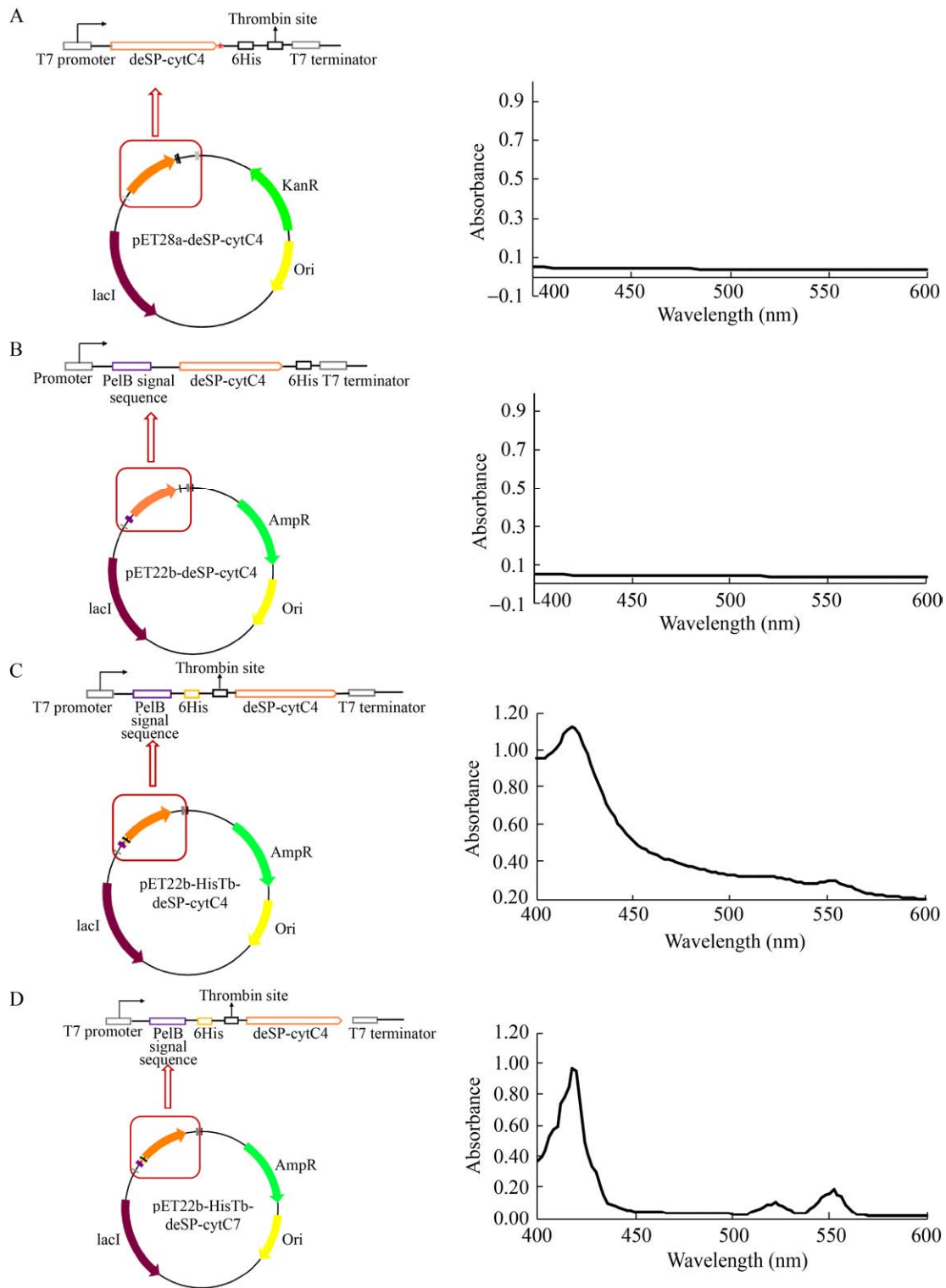


图3 不同表达载体的重组质粒图谱与细胞色素c的特征性吸收峰

Figure 3 Maps of different expression vectors and the featured absorption peaks of cytochrome c.

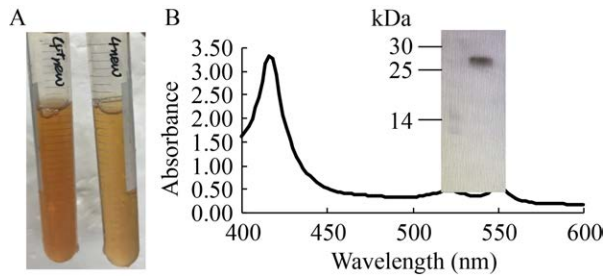


图 4 金属离子对细胞色素 c 表达的影响

Figure 4 Effect of metal ions on the expression of CytC4. (A) The presence of metal ions in the medium affects the color of the cell material after fragmentation. (B) In the presence of some metal ions, the featured absorption peak of cytochrome c displayed in the same reaction system after induced expression under the same conditions.

体细胞, 并加入 2 mg/mL 阿拉伯糖或 0.2 mmol/L IPTG 诱导 CytC4 的表达, 菌体细胞超声破碎取上清液后进行 Western blotting 分析 (图 5D), 发现虽然 lacI-pTac 启动子的启动强度明显高于 araC-pBAD, 却几乎检测不到 CytC4 的表达, 因此推测高强度表达 CytC4 影响了其正确折叠, 无法获得有功能的可溶性 CytC4。而采用诱导型启动子 araC-pBAD, CytC4 在 *S. oneidensis* 中均取得了较高的表达量, 其中表达量最高的为 *S. oneidensis* pBBR1MCS1-araC-pBAD-CytC4 菌株, CytC4 在该菌株中的表达量较以 *E. coli* 作为表达宿主时高 10 倍左右, 表明 *S. oneidensis* 是表达 CytC4 较为理想的宿主。

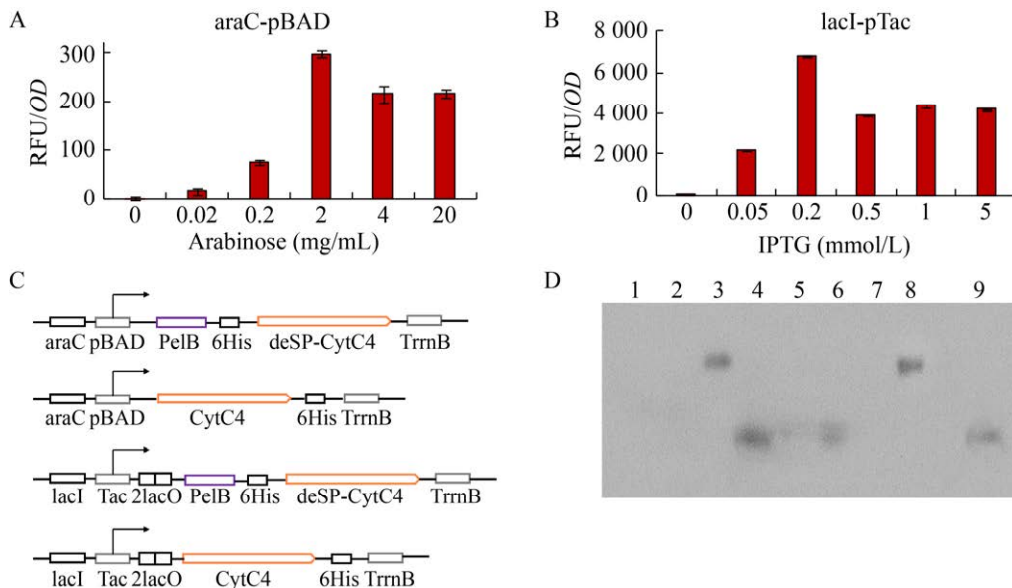


图 5 不同诱导型启动子表达条件分析

Figure 5 Analysis of expression conditions of two different inducible promoters. (A) Fluorescence intensity values of the inducible promoter pBAD under different concentrations of arabinose. (B) Fluorescence intensity values of the inducible promoter pTac under the induction of different concentrations of IPTG. (C) Schematic diagram of different elements on the plasmid when pBBR1MCS1 is used as the expression vector. (D) Western blotting results of different expression hosts. 1: MR-1-pBBR1MCS1-araC-pBAD; 2: MR-1-pBBR1MCS1-lacI-pTac; 3: protein marker; 4-7: MR-1-pBBR1MCS1-araC-pBAD-CytC4, MR-1-pBBR1MCS1-lacI-pTac(OO)-CytC4, MR-1-pBBR1MCS1-araC-pBAD-pelB-CytC4, MR-1-pBBR1MCS1-lacI-pTac(OO)-pelB-CytC4; 8: protein marker; 9: BL21-pET22b-HisTb-CytC4+pEC86.

3 讨论

近年来,有关细胞色素 c 在电化学方面的作用机制及其应用的研究日益受到重视。随着分子生物学技术的发展,异源表达可以摆脱原始菌株的可培养限制,同时细胞色素 c 的分子成熟过程非常复杂,需要一整套辅助蛋白的参与,因此构建表达水平高,稳定性好的表达系统成为一项重要的研究内容,将为解决难培养微生物中细胞色素 c 的电子传递机制及其应用奠定基础。

本研究在 *E. coli* 为表达宿主的基础上进行了一系列的条件优化,虽然成功获得了带有 His•Tag 的目的蛋白 CytC4,但是表达量很低。已有研究表明,His•Tag 会干扰细胞色素 c 的分子成熟,尤其是对于含有多个血红素辅基的细胞色素 c,进而减少成熟细胞色素 c 的收率^[31]。其中的原因可能是非天然组氨酸配体的配位作用会造成蛋白的错误折叠,导致一个动力学陷阱,进而积累错误折叠的蛋白质^[32-33]。但是对于 CytC4 来说,即使去除了 His•Tag,其蛋白表达量也没有明显提高,说明 His•Tag 可能并不是影响 CytC4 高水平表达的一个主要因素。

此外,利用 *E. coli* 来表达成熟的 CytC4,需要辅助质粒 pEC86 的参与,该质粒表达 *E. coli* 来源的 Ccm 系统,即由 8 个蛋白组成的 CcmABCDEFGH,而 *S. oneidensis* 的 Ccm 系统由 9 个蛋白组成,即 CcmABCDEFGHI。虽然 *E. coli* 的 CcmH_{Ec} 被认为融合了 CcmH 和 CcmI 两个蛋白的功能,但是在 *S. oneidensis* 中,CcmH_{So} 和 CcmI_{So} 并不是 CcmH_{Ec} 蛋白的简单拆分。另外在荚膜红细菌 *Rhodobacter capsulatus* 中,CcmH_{Rc} 和 CcmI_{Rc} 这两个蛋白也是分开的^[34],并且对细胞色素 c 的成熟过程是必需的。虽然 CcmI_{So} 对于典型细胞色素 c 的成熟不是必需的,但是很可能在此厌氧甲烷氧化古菌来源 CytC4

的成熟过程中发挥了重要作用,使 CytC4 在 *S. oneidensis* 中的表达量得到了较明显的提高^[1]。

总之,本研究成功表达了未培养厌氧甲烷氧化古菌来源的 CytC4,为难培养微生物细胞色素 c 的大量表达创造了一个良好的技术平台,同时也为体外深入研究细胞色素 c 的生理功能,电子传递机制以及今后潜力巨大的环境生物技术应用,迈出了重要的一步。

REFERENCES

- [1] Paquete CM, Rusconi G, Silva AV, et al. A brief survey of the “cytochromome”. *Advances in Microbial Physiology*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 69-135.
- [2] Lovley DR, Widman PK, Woodward JC, et al. Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(11): 3572-3576.
- [3] 曹占平, 张景丽, 张宏伟. 电辅助微生物还原降解五氯酚的电子传递机理. *化工学报*, 2012, 63(12): 4042-4047. Cao ZP, Zhang JL, Zhang HW. Electron transfer mechanism of pentachlorophenol reduction in electro-assisted microbial system. *CIESC J*, 2012, 63(12): 4042-4047 (in Chinese).
- [4] Su L, Fukushima T, Ajo-Franklin CM. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 165.
- [5] Yen PH, Su GDJ. Uncooled long-wavelength infrared sensors using cytochrome C protein on suspension electrodes with CMOS readout circuits. *IEEE Sensor J*, 2019, 19(22): 10221-10227.
- [6] Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, et al. Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(1): 15-23.
- [7] Santucci R, Sinibaldi F, Cozza P, et al. Cytochrome c: an extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136: 1237-1246.
- [8] Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, et al. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell*, 2012, 148(5): 988-1000.
- [9] Londer YY, Giuliani SE, Pepler T, et al. Addressing *Shewanella oneidensis* “cytochromome”: the first step towards high-throughput expression of cytochromes C. *Protein Expr Purif*, 2008, 62(1): 128-137.

- [10] Kranz RG, Richard-Fogal C, Taylor JS, et al. Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2009, 73(3): 510-528.
- [11] Verissimo AF, Daldal F. Cytochrome c biogenesis System I: an intricate process catalyzed by a maturase supercomplex? *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837(7): 989-998.
- [12] Feissner RE, Richard-Fogal CL, Frawley ER, et al. Recombinant cytochromes c biogenesis systems I and II and analysis of haem delivery pathways in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2006, 60(3): 563-577.
- [13] Simon J, Hederstedt L. Composition and function of cytochrome c biogenesis System II. *FEBS J*, 2011, 278(22): 4179-4188.
- [14] Ferguson SJ, Stevens JM, Allen JWA, et al. Cytochrome c assembly: a tale of ever increasing variation and mystery? *Biochim et Biophys Acta BBA-Bioenerg*, 2008, 1777(7/8): 980-984.
- [15] Travaglini-Allocatelli C. Protein machineries involved in the attachment of heme to cytochrome c: protein structures and molecular mechanisms. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 2013: 505714.
- [16] Thöny-Meyer L, Fischer F, Künzler P, et al. *Escherichia coli* genes required for cytochrome c maturation. *J Bacteriol*, 1995, 177(15): 4321-4326.
- [17] Hopper DJ, Kaderbhai MA, Marriott SA, et al. Cloning, sequencing and heterologous expression of the gene for lupanine hydroxylase, a quinocytochrome c from a *Pseudomonas* sp.. *Biochem J*, 2002, 367(pt 2): 483-489.
- [18] Carpenter JM, Zhong F, Ragusa MJ, et al. Structure and redox properties of the diheme electron carrier cytochrome c4 from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Inorg Biochem*, 2020, 203: 110889.
- [19] Rocco G, Battistuzzi G, Bortolotti CA, et al. Cloning, expression, and physicochemical characterization of a new diheme cytochrome c from *Shewanella baltica* OS155. *JBIC J Biol Inorg Chem*, 2011, 16(3): 461-471.
- [20] Leu AO, Cai C, McIlroy SJ, et al. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae*. *ISME J*, 2020, 14(4): 1030-1041.
- [21] 何丹, 张尔翼, 余林鹏, 等. 微生物甲烷厌氧氧化耦合金属还原研究进展. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 844-856.
- He D, Zhang EY, Yu LP, et al. Advances in the anaerobic microbial oxidation of methane that is coupled with metal reduction. *Chin J Appl Environ Biol*, 2020, 26(4): 844-856 (in Chinese).
- [22] Arslan E, Schulz H, Zufferey R, et al. Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(3): 744-747.
- [23] Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, et al. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*, 1994, 16(5): 800-802.
- [24] Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, et al. Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(11): 1118-1123.
- [25] Xia Y, Li K, Li J, et al. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(3): e15.
- [26] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20-25.
- [27] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, 1992, 8(3): 275-282.
- [28] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [29] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [30] Sybirna K, Antoine T, Lindberg P, et al. *Shewanella oneidensis*: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 73.
- [31] Londer YY, Pokkuluri PR, Tiede DM, et al. Production and preliminary characterization of a recombinant triheme cytochrome c7 from *Geobacter sulfurreducens* in *Escherichia coli*. *Biochim et Biophys Acta BBA-Bioenerg*, 2002, 1554(3): 202-211.
- [32] Elove GA, Bhuyan AK, Roder H. Kinetic mechanism of cytochrome c folding: involvement of the heme and its ligands. *Biochemistry*, 1994, 33(22): 6925-6935.
- [33] Sosnick TR, Mayne L, Hiller R, et al. The barriers in protein folding. *Nat Struct Biol*, 1994, 1(3): 149-156.
- [34] Stevens JM, Mavridou DA, Hamer R, et al. Cytochrome c biogenesis System I. *FEBS J*, 2011, 278(22): 4170-4178.

(本文责编 陈宏宇)