

麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因在巴斯德酵母中的表达及遗传稳定性*

苟兴华^{1,2} 王 卫^{2**} 刘达玉^{1,2} 郭秀兰^{1,2} 张佳敏² 唐仁勇² 李德华³ 胡海洋³

(¹成都大学生物产业学院 成都 610106)

(²四川省肉品加工重点实验室 成都 610106)

(³成都地奥制药集团药物研究所 成都 610041)

摘 要 海藻糖是一种具有很多功能的非还原性二糖, 在生物制品和食品等行业中具有较广泛的用途. 对来自芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) B12海藻糖酶转化过程中的关键酶基因——麦芽寡糖基海藻糖水解酶 (MTHase) 基因进行了遗传密码子的人工改造, 合成酵母偏爱密码子和修改基因遗传密码子中的A/T含量, 然后将完整的MTHase基因克隆到酵母表达载体pPICZαA, 筛选出重组载体并将其导入巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*) 细胞进行重组表达以用于海藻糖的酶转化. 最后获得了一株高效稳定表达MTHase的酵母菌株, 分泌到表达培养基上清中的MTHase的酶活大于800 U/mg(蛋白质), 该重组菌株遗传稳定率达84%以上, 为工业化酶法生产海藻糖奠定了一定基础. 图4 参21

关键词 海藻糖; 芝田硫化叶菌; 麦芽寡糖基海藻糖水解酶; 密码子偏爱性; 毕赤酵母

CLC Q78 : Q939.106

Expression of MTHase Gene in *Pichia pastoris* and Its Genetic Stability*

GOU Xinghua^{1,2}, WANG Wei^{2**}, LIU Dayu^{1,2}, GUO Xiulan^{1,2}, ZHANG Jiamin², TANG Renyong²,

LI Dehua³ & HU Haiyang³

(¹Faculty of Bioindustry, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

(²Meat Proceeding Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610106, China)

(³Di'ao Group, Chengdu 610041, China)

Abstract Trehalose is a multifunctional non-reducing disaccharide and an attractive ingredient in biological product and food. Recently, extensive attention has been made for trehalose production via enzyme transform. In this study, the maltotrioligosyl trehalose tetrahydrolase (MTHase) gene from *Sulfolobus shibatae* B12, with genetic codon preference for yeast and lower AT content, was artificially synthesized. The artificial gene was cloned into yeast expression vector pPICZαA, and then overexpressed in *Pichia pastoris*. The results showed that the yeast strains possessed a highly efficient and stably expression for MTHase production. The enzyme activity level from the secretion recombinant protein reached 800 U/mg protein. The genetic steady efficiency of the engineering *P. pastoris* strain was 84%. Our results provide a basis for trehalose production via enzyme transform in industrial scale. Fig 4, Ref 21

Keywords trehalose; *Sulfolobus shibatae*; maltotrioligosyl trehalose tetrahydrolase (MTHase); codon preference; *Pichia pastoris*

CLC Q78 : Q939.106

海藻糖[α-D-葡萄糖-(1,1)-α-D-葡萄糖苷]是一种具有很多功能的非还原性二糖^[1], 多数生物在极端逆境条件(如干旱)下体内大量合成海藻糖, 这是因为其具有稳定细胞膜、蛋白质结构, 避免细胞受到损伤的作用^[1,2]. 这些特性决定了海藻糖在医药、生物制品和食品行业的用途越来越广泛^[3-4], 如可应用于生化试剂——各种工具酶、细胞膜、细胞器、抗体、抗原及病毒等的保存^[5]. 早期科研人员从生物体内提取海藻糖, 但成本太高, 无法进行大规模的生产和应用. 后来科学家Kato从高温菌株*Sulfolobus solfataricus* KM1中分离到了麦芽寡糖基海藻糖合成酶(MTSase)和麦芽寡糖基海藻糖水解酶(MTHase), 在这两种酶的作用下, 以淀粉为原料, 可分解转化为海藻糖^[6-7]. 用该方法生产海藻糖成本低, 效率

高, 是非常有竞争力的方法. 目前科研人员对两种酶进行了基因克隆和表达, 但在大肠杆菌中的表达效果均不理想, 主要表现为大肠杆菌表达量低, 活性低, 最多达到400 U/g(湿细胞)^[8-9].

我们在分析了MTHase基因密码子的成分后, 以芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) B12嗜热嗜酸古细菌MTHase基因 (GenBank: AF201335) 为基础, 优化了密码子结构, 利用酵母表达系统能高密度发酵、高效分泌表达外源蛋白、对外源蛋白进行糖基化等优点^[10], 将目标基因克隆到巴斯德酵母 (*Pichia pastoris*) 进行了表达.

1 材料与方法

1.1 材料

酵母菌 (*Pichia pastoris* SMD1168H)、大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10、pPICZαA Vector、Zeocin等购自美国 Invitrogen; Taq DNA polymerase、dNTP Mixture、pMD18-T

收稿日期: 2009-06-29 接受日期: 2009-08-23

*四川省应用基础研究项目 (No. 2008JY0129-1) Supported by the Applied & Basic Research Foundation of Sichuan, China (No. 2008JY0129-1)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wangwei@163.com)

Vector, *Xho*I和*Eco*RI限制性内切酶、T₄ DNA连接试剂盒、蛋白质分子量标准等购自TaKaRa; 质粒抽提试剂盒、DNA回收试剂盒购于Tiangen公司; 蛋白胨、酵母膏购自Oxoid公司。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 按照引物相互配对的原理, 根据芝田硫化叶菌 (*S. shibatae*) B12嗜热嗜酸古细菌MTHase基因 (GenBank: AF201335) 修改后的全长DNA遗传密码子合成引物, 由Invitrogen公司合成。根据设计序列, 按照酵母菌密码子偏好性原则设计用于基因拼接的正、反链DNA引物。其中5'端加入*Xho*I酶切位点, 3'端加入*Eco*RI酶切位点序列 (以下划线表示), 便于与载体连接。其中上游引物为: 5'-CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATG ACC TTC GCT TAC AAG ATC-3'; 下游引物为: 5'-GAATTCCTACTACAACCTGT ACAAAGCGAA-3'。

1.2.2 全基因合成及PCR反应 用超纯水配制引物, 使引物浓度为: 100 pmol/μL, 分别取1.2.1中引物1 μL, 混合后于100 °C沸水中作用15 min, 立即冰浴; 加入5 μL 10X T4DNA ligase Buffer, T4 Polynucleotide Kinase 5 μL, 加水至总体积为45 μL, 37 °C作用30 min; 65 °C 20 min, 冰浴2 min; 加入5 μL T4 DNA Ligase, 16 °C反应2 h, 65 °C 20 min。取上述混合反应液1 μL作为PCR反应的模板, 其PCR扩增参数: 94 °C预变性5 min; 循环30次: 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 2 min。最终延伸: 72 °C, 10 min。

1.2.3 重组表达质粒的构建及阳性克隆的筛选 PCR产物经纯化回收, 连接到pMD18-T vector, 经过序列分析并选择正确的阳性克隆pMD8-T/MTHase, 用*Xho*I/*Eco*RI进行双酶切, 分离、回收1.7 kb左右的MTHase基因片段, 将其连接到经*Xho*I/*Eco*RI双酶切的pPICZαA酵母表达载体, 并筛选出阳性克隆pPICZαA/MTHase。将阳性克隆载体经*Bgl*II单酶切后, 转化*Pichia pastoris* SMD1168H酵母菌, 并在高浓度的Zeocin YPD固体培养基上筛选阳性克隆菌株 (*Pichia pastoris* SMD1168H/MTHase), 并对其进行进一步的PCR鉴定确认。

1.2.4 培养基及培养表达条件 参照文献[9]的培养表达条件进行。

1.2.5 表达产物的SDS-PAGE分析 参照文献[11]的方法进行。

1.2.6 基因工程菌遗传稳定性研究 连续传代: 将鉴定后的基因工程菌 (*P. pastoris* SMD1168H/MTHase) 进行适当稀释, 涂布在YPD (+) 平板上 (含1 000 μg/mL Zeocin), 于30 °C恒温培养2 d, 随机挑取50个单菌落, 同一个菌落分别接种于YPD (+) 和YPD (-) (不含1 000 μg/mL Zeocin) 上, 于30 °C恒温培养2 d (称为第1代)。将YPD (+) 上的菌接种于YPD (+) 平板上, YPD (-) 上的菌接种于YPD (-) 平板上, 于30 °C恒温培养2 d (称为第2代)。依次进行连续传代50次, 对两个平板上生长的菌落分别进行计数。

平板传代稳定性鉴定: 在传代过程中, 每隔一定天数将YPD (-) 平板上的菌落接种于YPD (+) 平板上 (含1 000 μg/mL Zeocin), 菌落计数, 计算该基因工程重组菌种在无选择压力下的遗传稳定率。

发酵条件下稳定性鉴定: 发酵液稀释10⁶倍, 分别涂布于YPD (+) 和YPD (-) 平板, 30 °C恒温培养2 d, 以两种平板菌

落数上的比值YPD (+)/YPD (-) 间接表示该条件下菌株的稳定率。

1.2.7 酶活性测定 将麦芽六糖溶于50 mmol/L pH 5.0的磷酸-柠檬酸缓冲液中, 配制成5.0 mmol/L的溶液, 取1 mL该溶液, 加入MTHase酶制剂50 μL, 75 °C反应2 h, 沸水中煮沸10 min终止反应。待溶液冷却后, 加入10 μL MTHase表达上清液, 75 °C反应15 min, 用HPLC测定糖化液中海藻糖的含量。MTHase的酶活单位定义为每分钟水解1 μmol麦芽四糖基海藻糖生成海藻糖所需要的酶量。

2 结果

2.1 全基因合成和测序

经过Invitrogen公司序列分析, 合成的全基因完全符合设计要求, 共修改密码子132个, 氨基酸序列并未发生改变, 与预期结果一致。这样, 原基因 (GenBank: AF201335) 密码子中的A/T含量大大降低了, 由63.4%降低到53.3%, 增加了G/C的含量, 由36.6%增加到46.7%。

2.2 含MTHase基因重组质粒的构建及阳性克隆菌株的鉴定

图1为重组MTHase基因工程菌的构建示意图。将人工合成的MTHase基因片段连接到pMD18-T载体, 重组中间载体pMD18-T/MTHase经*Xho*I、*Eco*RI双酶切电泳, 分离出载体片段约2.6 kb的pMD18-T载体片段和1.7 kb的MTHase基因片段 (图2-A); 酶切pMD18-T/MTHase载体, 分离MTHase DNA片段 (图2-B), 连接转化后, 插入表达载体pPICZαA, 用*Xho*I、

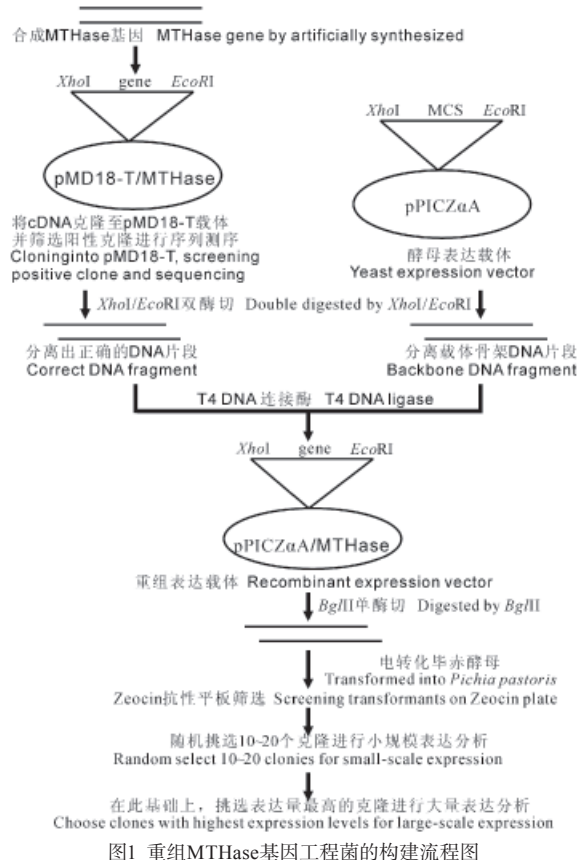


图1 重组MTHase基因工程菌的构建流程图

Fig. 1 Construction of recombinant MTHase in *P. pastoris* strain

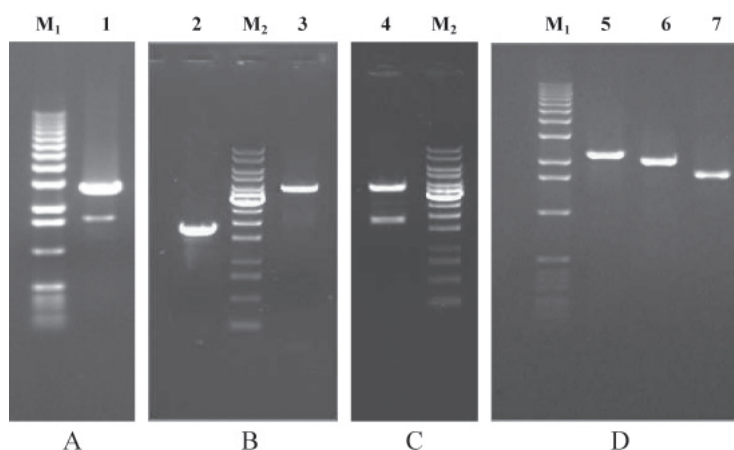


图2 重组子鉴定结果

Fig. 2 Identification of rMTHase in *P. pastoris* strain

M1: 1 kb DNA分子量标准 (Invitrogen公司); M2: 1 kb DNA分子量标准 (MBI公司); 1: pMD18-T/MTHase双酶切 (*EcoRI/XhoI*) 鉴定; 2: MTHase基因PCR产物双酶切 (*EcoRI/XhoI*) 片段; 3: pPICZαA载体双酶切 (*EcoRI/XhoI*) 片段; 4: 重组质粒pPICZαA/MTHase双酶切 (*EcoRI/XhoI*) 鉴定; 5: 以 *P. pastoris* 基因组DNA为模板扩增AOX1基因 (副对照); 6: 以重组 *P. pastoris* 基因组DNA为模板扩增AOX1基因; 7: 以重组 *P. pastoris* 基因组DNA为模板扩增麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因片段

Lane M1: 1 kb DNA ladder (Invitrogen); Lane M2: 1 kb DNA ladder (MBI); Lane 1: Identification of plasmid pMD18-T/MTHase (digested with *EcoRI* and *XhoI*); Lane 2: MTHase DNA fragment (digested by *EcoRI* and *XhoI*); Lane 3: pPICZαA DNA fragment (digested by *EcoRI* and *XhoI*); Lane 4: Identification of plasmid pPICZαA/MTHase (digested by *EcoRI* and *XhoI*); Lane 5: PCR product with *P. pastoris* yeast total DNA as template by AOX1 primers (negative control); Lane 6: PCR product with recombinant *P. pastoris* yeast total DNA as template by AOX1 primers; Lane 7: PCR product with recombinant *P. pastoris* yeast total DNA as template by MTHase primers

*EcoRI*酶切鉴定pPICZαA/MTHase重组子, 切出了预期大小的DNA片段1.7 kb和pPICZαA载体片段3.6 kb (图2-C)。将重组子载体转化酵母菌 (*Pichia Pastoris* strain), 筛选并得到了酵母的阳性克隆, 用AOX1引物进行PCR检测: 阳性克隆酵母基因组DNA模板扩增产物大小约为2.1 kb, 空白对照酵母基因组DNA模板扩增产物大小为2.2 kb; 用MTHase引物进行PCR检测: 阳性克隆酵母基因组DNA模板扩增产物大小为1.7 kb (图4-D)。试验结果证实pPICZαA/MTHase重组到酵母基因组的AOX1位点。

2.3 表达产物的SDS-PAGE电泳

SMD1168H-MTHase诱导表达的SDS-PAGE图谱见图3, 将诱导后的培养基离心, 取上清20 μL加电泳Buffer后电泳。由图3的结果可知, MTHase实现了高水平的分泌表达, 表达出的相对分子质量约为 64×10^3 , 与文献[1]报道和预期的一致。

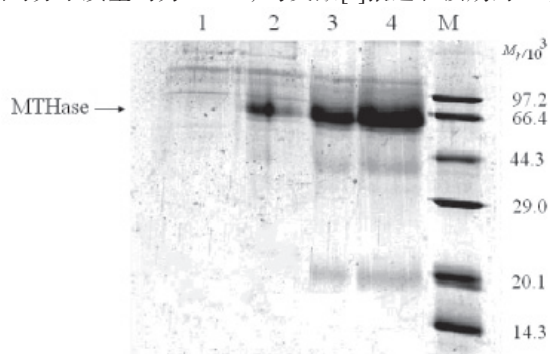


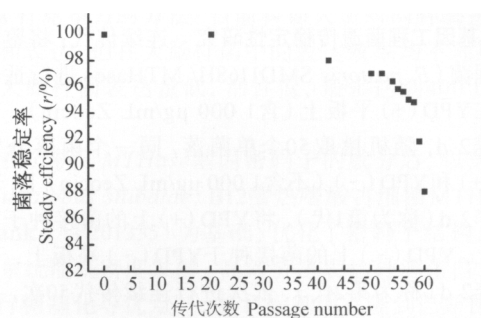
图3 MTHase表达产物

Fig. 3 Product of MTHase expression

1: 诱导前; 2: 24 h诱导; 3: 48 h诱导; 4: 72 h诱导; M: 蛋白质分子量标准
Lane 1: Before induction; Lane 2: Induction for 24 hour; Lane 3: Induction for 48 hour; Lane 4: Induction for 72 hour; Lane M: Protein molecular weight marker (Low)

2.4 遗传稳定性

*P. pastoris*酵母真核表达系统价格低廉, 操作简便, 能够高密度发酵, 其分泌表达的目标蛋白占可达分泌表达总蛋白的90%以上, 便于纯化和分析, 同时不会形成像大肠杆菌表达蛋白的包涵体形式^[12]。然而, 在研究中发现, 随着传代次数过多, 外援基因表达衰减或者丢失, 从而影响产物的得率。重组酵母菌经过60代的传代中, 从40代以后菌体的抗性开始丢失, 但丢失的速率较小, 50代后仅仅发现2个重组基因工程菌株的抗性丢失; 在无选择压力下的传代, 酵母抗性丢失较高, 50个单菌中有6个菌落丢失抗性, 丢失率达到了12%; 将发酵后的酵母稀释后涂于有Zeocin抗性的平板和无Zeocin抗性的平板, 两平板上生长菌落数之比为517/613=0.84 (稳定率) (图4)。

图4 重组工程菌传代后的稳定率
Fig. 4 Steady efficiency of the engineering *P. pastoris* strain

2.5 酶活力

经测定, MTHase的酶比活达到837 U/mg(蛋白质)。

3 讨论

MTHase基因在大肠杆菌中表达量不高^[7], 不能满足生

产要求, 本研究分析了芝田硫化叶菌MTHase基因的密码子组成, 修改了密码子中高富集A/T的含量, 增加了密码子中G/C的含量, 以及修改了密码子偏爱性, 然后将基因导入酵母表达菌株. 甲醇酵母是常用的外源蛋白表达系统之一, 基因组具有两个乙醇氧化酶基因(Alcohol oxidase I, AOXI和alcohol oxidase II, AOXII), 其中AOXI为主要代谢途径, 当用甲醇作为碳源时, AOXI基因得到高效表达, 并且受到甲醇浓度的调控, 将目标蛋白基因重组到AOXI基因启动子后, 酵母利用甲醇作为碳源时, 目标蛋白得以有效表达. 甲醇浓度太高和太低都会抑制AOXI基因的表达, 研究表明, 甲醇浓度维持在0.5%时, 外源蛋白能够高效表达. pPICZαA载体是invitrogen公司构建的酵母表达载体, 载体上构建有AOXI基因的左右臂, 便于酵母的体内重组, 将目的基因定点整合到酵母染色体; 另外载体上还具有α-factor信号肽, 能将表达的外源蛋白从酵母细胞内高效地转运到细胞外^[13], 使目标蛋白能够进行分泌表达, 简化了对于目标蛋白的纯化难度, 增加了蛋白在发酵上清的累积量. 目前, 来源于*Thermobifida fusca*^[14]、*Thermus aquaticus* ATCC 33923^[15]、*Picrophius torridus*^[16]、*Pseudomonas stutzeri* CJ38^[17]、*Mycobacterium smegmatis* ATCC14468^[18]、*Thermus caldophilus* GK24^[19]和*Enterobacter hormaechei*^[20]等的海藻糖合酶基因均已在大肠杆菌中实现表达, 但一般表达量较低^[21]. 从本试验结果看, MTHase基因的表达增强, 达到了837 U/mg(蛋白质), 为工业化用酶法以淀粉为原料生产海藻糖奠定了基础.

References

- 1 Pascale D, Sasso MP, Lerinia I D, Lazzaro A, Furia A, Carteni FM, Rossi M, Rosa M. Recombinant thermophilic enzymes for trehalose and trehalosyl dextrins production. *J Mol Catal B Enzym*, 2001, **11** (4): 777~786
- 2 Nielsen K. Stability of Freeze dried horseradish peroxidase conjugated monoclonal antibodies used in diagnostic serology. *J Immunoassay*, 1995, **16** (2): 183~197
- 3 Shima J, Takagi H. Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: Stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, **53** (3): 155~164
- 4 Camilo C, Shevanti S, Madan T, Stephen P, Bruce R. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Biotechnology*, 1992, **10** (9): 1007~1011
- 5 Hédoux A, Willart JF, Paccou L, Guinet Y, Affouard F, Lerbret A, Descamps M. Thermostabilization mechanism of bovine serum albumin by trehalose. *J Phys Chem B*, 2009, **113** (17): 6119~6126
- 6 Kato M, Miura Y, Kettoku M, Kettoku M, Shindo K, Iwamatsu A, Kobayashi K. Purification and characterization of new trehalose-producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archae, *Sulfolobus solfataricus* KMI. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60** (3): 546~550
- 7 Kato M. Trehalose production with a new enzymatic system from *Sulfolobus solfataricus* KMI. *J Mol Catal B Enzym*, 1999, **6** (3): 223~233
- 8 Chen XB (陈晓斌), Lin JP (林建平), Jin ZH (金志华), Cen PL (岑沛霖). Cloning and expression of MTSase and MTHase from *Sulfolobus solfataricus* in *E. coli*. *Microbiology* (微生物学通报), 2006, **33** (5): 54~58
- 9 Liu L (刘莉), Chen W (陈炜), Jin C (金城). Cloning and expression of the gene encoding maltotriose synthase from *Sulfolobus shibatae* in *E. coli*. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2000, **40** (1): 57~61
- 10 David RH, James MC. *Pichia* Protocols. Totowa, USA: Humana Press, 1998
- 11 Li DH (李德华), Gou XH (苟兴华), Hu HY (胡海洋), Xu Q (徐琦), Liu ZR (刘忠荣), Wu QX (吴治庆), Yu XD (余晓东). Construction, high-density fermentation and purification of recombinant enterokinase catalytic subunit in *Pichia pastoris*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (6): 819~823
- 12 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol 3). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002
- 13 Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein UA, Masiaz FR, Mullenbach GT, Urdea MS, Valenzuela P, Barr PJ. α-factor directed synthesis and secretion of mature foreign protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 4642~4646
- 14 Wei YT, Zhu QX, Luo ZF. Cloning, expression and identification of a new trehalose synthase gene from *Thermobifida fusca* genome. *Acta Biochim et Biophys Sin*, 2004, **36** (7): 477~484
- 15 Wang JH, Tsai MY, Lee GC. Construction of a recombinant thermostable β-amylase-trehalose synthase biofunctional enzyme for facilitating the conversion of starch to trehalose. *J Agric Food Chem*, 2007, **55** (4): 1256~1263
- 16 Chen YS, Lee GC, Shaw JF. Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophius torridus* in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2006, **54**: 7098~7104
- 17 Lee JH, Lee KH, Kim CG. Cloning and expression of a trehalose synthase from *Pseudomonas stutzeri* CJ38 in *Escherichia coli* for the production of trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**: 213~219
- 18 Pan YT, Korothe Edavana V, Jourdan WJ. Trehalose synthase of *Mycobacterium smegmatis*: Purification, cloning, expression, and properties of the enzyme. *Eur J Biochem*, 2004, **271** (21): 4259~4269
- 19 Koh S, Kim J, Shin HJ. Mechanistic study of the intramolecular conversion of maltose to trehalose by *Thermus caldophilus* GK24 trehalose synthase. *Carbohydr Res*, 2003, **338**: 1339~1343
- 20 Yue M, Wu XL, Gong WN, Ding HB. Molecular cloning and expression of a novel trehalose synthase gene from *Enterobacter hormaechei*. *Microb Cell Fact*, 2009, **8**: 34~40
- 21 Wu XL (吴秀丽), Yue M (岳明), Ding HB (丁宏标). Research progress on trehalose synthase. *Microbiology* (微生物学通报), 2009, **36** (7): 1067~1072