

诺卡氏菌腈水合酶基因在重组毕赤酵母中的表达

于慧敏 史悦 田卓玲 温斐 沈忠耀*

(清华大学化工系 生物化工研究所 北京 100084)

摘要:为从基因水平上改造腈水合酶,进行了诺卡氏菌腈水合酶基因的外源表达研究。在重组大肠杆菌表达系统内,腈水合酶的 α 亚基几乎不能正常表达,在重组 *E. coli* BL21(DE3)(pET32a-NHBAX)中,腈水合酶活性仅为 0.04U/mg。构建重组毕赤酵母表达质粒 pPIC3.5k-NHBAX 采用电穿孔转化法将其转入宿主菌 *P. pastoris* GS115 中,经过菌株培养和腈水合酶的诱导表达,筛选获得了优选菌株 *P. pastoris* NH4。对 *P. pastoris* NH4 的细胞培养和腈水合酶的诱导表达条件进行优化,结果表明,重组腈水合酶在毕赤酵母中的表达水平可以达到 0.52U/mg,但不能稳定积累。

关键词:诺卡氏菌 腈水合酶 外源表达 大肠杆菌 毕赤酵母

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0959-04

丙烯酰胺 (Acrylamide) 是一种无色鳞片状或粉状的单斜或三斜形晶体,分子式为 C_3H_5NO ,结构式为 $CH_2 = CHCONH_2$,是最简单和最重要的酰胺类化合物之一。利用丙烯酰胺合成的各种类型的聚丙烯酰胺,在水处理、造纸、采矿、冶金、洗煤和制造高吸水性树脂等工业生产中具有非常广泛的应用^[1,2]。

随着工业生物催化技术的发展,丙烯酰胺的生产工艺已经从传统的化学法发展为工艺简化、操作条件和环境污染情况极大改善的微生物法。研究发现,在红球菌 (*Rhodococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 等多种微生物体内都含有以腈水合酶为代表的腈类代谢酶系,可将毒性很强且难以降解的腈类催化变成成为酰胺或羧酸加以利用^[3,4]。由于腈代谢酶系作为生物催化剂具有反应条件温和、产率高、副产物少、产物的自聚损失小、环境污染小、成本低,符合绿色化工的发展理念等化学方法无法比拟的优越性,近年来广泛地应用于氨基酸、酰胺、羧酸及其衍生物的合成。

全世界每年通过腈水合酶生产的丙烯酰胺已经超过 30 万吨,但是其中普遍存在野生菌种的酶活稳定性差、对底物和产物的耐受性不高、以及间歇化生产,产品质量不够稳定等问题。此外,在生产过程中,产物丙烯酰胺向丙烯酸的进一步转化,也降低了丙烯酰胺的产率和纯度。这些问题极大地影响着微生物法生产丙烯酰胺这种绿色工艺的发展。

随着分子生物学的迅猛发展,利用基因重组技术,构造具有腈水合酶活性的新型基因工程菌株并进行蛋白质工程改造,有望可以在不同程度上解决实际生产问题,比如提高酶的表达水平、增强酶的热稳定性以及对底物和产物的耐受

性、阻断副反应的发生,以及与后续新工艺配合降低酶的生产 and 分离成本等等。有鉴于此,本研究对腈水合酶基因进行了分子克隆和活性表达研究,从而为进一步进行腈水合酶的稳定性改造研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:野生诺卡氏菌株 *Nocardia* YS-2002 由山东胜利油田赠送。携带激活子序列的腈水合酶基因为本实验室从 *Nocardia* YS-2002 中调取^[5]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM105 和 BL21 (DE3)购于 Promega 公司。质粒 pUC18 (北京鼎国公司)和 pET32a (Merck, USA)用于 NHase 基因在大肠杆菌中的克隆表达。毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 和毕赤酵母-大肠杆菌穿梭质粒 pPIC3.5K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 Pfu DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司,寡核苷酸由北京赛百盛公司合成。

1.1.3 培养基:大肠杆菌培养基为 LB 培养基。诺卡氏菌株的培养基和培养条件同文献 [6]。毕赤酵母培养基有 3 种,分别为 YPD 培养基 (酵母粉 10g/L,蛋白胨 20g/L,葡萄糖 20g/L,琼脂 20g/L (固体培养基),用于菌体保藏和扩增。BMGY 培养基 (甘油培养基): YNB (含硫酸铵) 13.4g/L,酵母浸膏粉 10g/L,蛋白胨 20g/L,100mmol/L 磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.0), Biotin 0.0004g/L,甘油 10g/L,用于一级种子培养。BMMY 培养基 (甲醇培养基): 将 10g/L 甘油替换为 10g/L 甲醇,其它同 BMGY 培养基,用于二级摇瓶培养。

1.2 分子克隆

重组 DNA 技术、感受态细胞制备和质粒 DNA 转化的方法参照文献 [7]。

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(2026014),全国百篇优秀博士学位论文作者专项(200345)

* 通讯作者。Tel 86-10-62788568; Fax 86-10-62770304; E-mail: szy-dce@tsinghua.edu.cn

作者简介:于慧敏(1973-),女(满族),辽宁建昌人,副研究员,博士,主要从事工业生物催化、基因工程和生物信息学研究。

E-mail: yuhm@tsinghua.edu.cn

收稿日期:2005-04-15,修回日期:2005-08-29

1.3 毕赤酵母的培养

从甘油管移取菌液,以 0.5% 的接种量接种于 25mL BMGY 液体培养基,28℃ 振荡培养 48h 后,4℃ 下 4000g 离心 10min 收集菌体,按 1:10 用 BMMY 重悬菌体,使 $OD_{600} = 1.0$,转移到 500mL 三角瓶中,28℃、200r/min 进行二级培养。每 24h 向培养基中添加加入甲醇(终浓度 5g/L)及 INX 100mg/L,经过 4 个甲醇诱导周期(96h)收获菌体。每隔一定时间根据需要取适量菌液检测 OD_{600} (或干菌重)进行水合反应用气相色谱法检测酶活力或者进行 SDS-PAGE。

1.4 毕赤酵母细胞的电穿孔转化

重组质粒在毕赤酵母中的转化采用电穿孔转化法^[7]。收获培养至 $OD_{600} = 1.3 \sim 1.5$ 的毕赤酵母菌液,4℃、1500g 离心 5min,沉淀用 250mL 预冷至 0℃ 的无菌水两次重悬,离心分离后,再分别用 20mL 和 1mL 预冷至 0℃ 的 1mol/L 山梨糖醇溶液重悬,终体积约为 1mL。将制备好的细胞 80 μ L 和 5~20 μ g 的线性 DNA 混合均匀,冰浴 5min,采用脉冲电压 1500V 进行转化(电转化仪为 Invitrogen Electroporator II),迅速加入 1mL 预冷至 0℃ 的 1mol/L 山梨糖醇溶液于电转化杯中,再将杯中的溶液转入无菌离心管,涂布平板,在 30℃ 培养至重组菌出现。

1.5 分析方法

菌体浓度测定采用光密度法和衡重法^[6],脲水合酶活性测定采用气相色谱法^[5,6],细胞形态分析采用显微观察法,蛋白质电泳采用 SDS-PAGE^[5]。

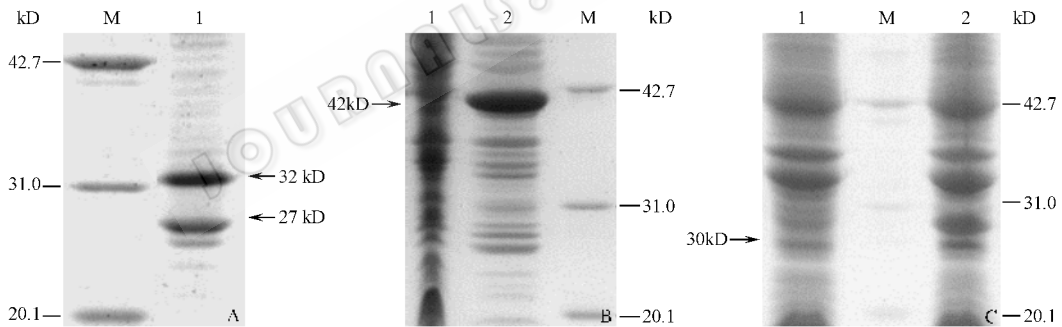


图 1 诺卡氏菌和重组大肠杆菌诱导前后的全细胞 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analyses of whole cells of *Nocardia* sp. and recombinant *E. coli* before and after inducing of NHase

A: *Nocardia*. M. Marker; 1. After inducing. B: *E. coli* JM105 (pUC18-NHBAX). 1. Before inducing; 2. After inducing; M. Marker; C: *E. coli* BL21(DE3) (pET32a-NHBAX). 1. Before inducing; M. Marker; 2. After inducing.

进一步优化重组大肠杆菌的培养和诱导表达条件,考察了诱导剂浓度、诱导温度、诱导时间、糖浓度、添加剂等各种因素对脲水合酶重组表达的影响,结果表明, α 亚基在各种优化条件下,仍然没有明显表达。在最优诱导条件下,没有检测出 *E. coli* JM105 (pUC18-NHBAX) 中的脲水合酶活性,而在 *E. coli* BL21(DE3) (pET32a-NHBAX) 中,脲水合酶的活性也极低,不超过 0.04U/mg。分析原因,可能是 α 亚基中的某些密码子不适于在大肠杆菌中表达。为此,我们一方面对 α 亚基的密码子进行了定点突变改造,另一方面,则尝试采用毕赤酵母表达体系,对脲水合酶进行重组表达。

2.2 携带脲水合酶基因的毕赤酵母重组质粒的构建

从质粒 pUC18-NHBAX 中采用 BamHI 和 EcoRI 双酶切

2 结果和讨论

2.1 脲水合酶基因在重组大肠杆菌中的缺陷表达

提取野生诺卡氏菌 *Nocardia* YS-2002 中的基因组 DNA 为模板,调取携带激活子序列的脲水合酶基因 NHBAX^[5],与质粒 pUC18 和 pET32a 进行连接,连接后的质粒分别转化宿主 *E. coli* JM105 和 BL21(DE3)。在 37℃、1mmol/L IPTG 的强化诱导条件下,收获 5h 诱导后的重组大肠杆菌细胞,进行 SDS-PAGE 分析,考察外源脲水合酶基因在重组大肠杆菌中的表达情况,并以超声破碎后的野生诺卡氏菌的蛋白质电泳作为参照(图 1)。由图可见,野生诺卡氏菌诱导表达的脲水合酶呈现特征的两个诱导条带,分别对应脲水合酶的 β 亚基(31.6kD)和 α 亚基(27.5kD)。但重组大肠杆菌中脲水合酶的表达结果却不尽人意。在重组大肠杆菌 JM105 (pUC18-NHBAX) 和 BL21(DE3) (pET32a-NHBAX) 中,都只有一条明显的重组蛋白诱导条带出现,且在 JM105 (pUC18-NHBAX) 中,重组蛋白诱导带的分子量高达 42kD,远远高于预期的 β 亚基和 α 亚基本应呈现的 32kD 和 27kD。根据前人的研究结果^[8],该 42kD 处出现的诱导条带应该是 β 亚基与 pUC 质粒上的 β -半乳糖苷酶形成的融合蛋白,但是 α 亚基则没有表达或表达量极低。在 BL21(DE3) (pET32a-NHBAX) 中,脲水合酶的 α 亚基同样没有明显的诱导条带。

获得含有激活子的脲水合酶基因片段 NHBAX,插入重组毕赤酵母质粒 pPIC3.5k 中位于乙醇氧化酶(AOX1)内部的多克隆位点,得到重组质粒 pPIC3.5k-NHBAX。该质粒通过甲醇诱导调控 AOX1 的表达,继而调控外源脲水合酶的表达。

对构建好的重组质粒进一步进行酶切验证。分别对原质粒 pPIC3.5k 和重组质粒 pPIC3.5k-NHBAX 用 BamHI 和 EcoRI 进行双酶切后进行 DNA 电泳检测发现,重组质粒(环状)明显大于原质粒,且重组质粒双酶切后明显可以观察到长度为 1.6kb 左右的携带激活子的脲水合酶基因序列,说明毕赤酵母重组质粒 pPIC3.5k-NHBAX 已经构建成功。

2.3 重组毕赤酵母的筛选

相对于大肠杆菌表达系统,巴斯德毕赤酵母 *Pichia*
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

pastoris 表达系统具有许多独特的优点,如:可以用甲醇严格地调控表达;易于高密度培养;蛋白产量高;细胞生存能力强,可以在廉价的合成培养基中生长;基因表达产物既可在胞内积聚,又可被分泌到胞外,等等。由于在大肠杆菌系统中,脲水合酶的 α 亚基不能正常表达,因此,本研究进一步选用毕赤酵母为宿主,构建 *P. pastoris* 重组表达系统,对脲水合酶的活性表达进行研究。

通过电穿孔转化法,将构建好的重组毕赤酵母质粒 pPIC3.5k-NHBAX 转入宿主菌 *P. pastoris* GS115 中,涂布 YND 平板,过夜培养后从不同平板上的菌落中,挑选了6个形态饱满的菌落,进行菌体培养和脲水合酶的诱导研究。初始诱导条件为:脲水合酶诱导剂 IND 100mg/L,甲醇初始浓度 0.5%,100mL 摇瓶,15mL 装液量。在诱导后不同时刻检测6株重组菌中脲水合酶的活性(表1)。

表1 重组毕赤酵母的诱导表达和筛选结果

Table 1 Selection and induction of recombinant *P. pastoris*

No.	NHase activity(U/L)		
	3h	6h	8h
1	179.33	276.33	179
2	139.67	291.67	138.67
3	-	105	-
4	208.33	360.33	208.33
5	200.67	250	-
6	229.67	271.67	228.33

从表1可以看出,几乎在所有的重组酵母菌株中都能检测出脲水合酶的活性,其中4号菌株总体来说具有较高的酶活,而且酶活比较稳定。将4号菌株命名为 *P. pastoris* NH4, 作为优选菌株用于后续的培养及脲水合酶诱导条件的优化研究。

2.4 重组毕赤酵母的培养

在甘油培养基中,对重组毕赤酵母 *P. pastoris* NH4 进行培养,培养温度为 28℃。结果表明,在甘油培养基中,保存在 YPD 平板上的酵母单菌落在接种后 48h 处于对数生长中后期,活力旺盛。此时将酵母菌离心收集后以 10% 的接种量转入第二级甲醇培养基进行摇瓶培养,并加入 60mg/L 的 IND 和 0.5% 甲醇进行诱导,然后每隔 24h 补充终浓度 0.5% 的甲醇,测 *P. pastoris* NH4 在甲醇培养基中的生长情况。结果表明,在甲醇培养基中,初始阶段菌体生长没有明显的迟滞期,直接进入对数生长期,而 48h 后细胞没有经过稳定期就开始衰亡。

对重组毕赤酵母的细胞形态取样进行监测发现,在两种培养基中毕赤酵母细胞均呈椭圆形,随着培养过程的进行,细胞密度逐渐增大。进一步考察同时作为碳源和诱导剂的甲醇浓度对于菌体生长和蛋白表达的影响,结果表明,在低浓度范围内($<2\%$),甲醇浓度越高对于菌体的生长越有利。培养基 pH 的研究则表明,在重组菌生长过程中,pH 基本保持在 6 左右。由于诱导毕赤酵母的适宜 pH 为 5.5~6.0,因此诱导过程中不需调节 pH。

2.5 脲水合酶的诱导表达

甲醇是诱导表达脲水合酶的最重要的因素之一。定义加入甲醇开始诱导的时刻为 0 时刻,两次诱导的时间间隔为一个诱导周期 T,则当诱导周期为 24h 时,脲水合酶活性的变化规律如图 2 所示。由图可见,甲醇和 IND 诱导后,脲水合酶活性在诱导后 6h 左右迅速升高到约 300U/L,随后又开始下降,至 12h 时仅为最高水平的一半。其原因可能是重组脲水合酶在毕赤酵母细胞内表达时会被某些毕赤酵母自身的蛋白酶降解。

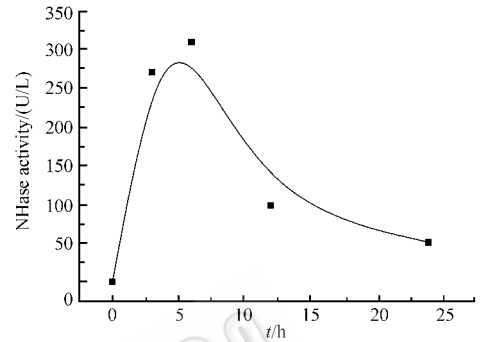


图2 一个甲醇诱导周期内脲水合酶活性的变化

Fig.2 Change of NHase activity during one circle

为提高脲水合酶的诱导表达水平,将甲醇的诱导周期 T 由原来的 24h 分别缩短为 16h 和 8h,诱导 48h 后进行比较(图 3)。由图可见,缩短甲醇诱导周期确实可以提高脲水合酶的累积酶活,T=8h,6 次诱导时的脲水合酶活性为 T=24h,2 次诱导时的 2.3 倍。但该活性仍远远低于甲醇一次诱导 6h 后得到的酶活水平。说明脲水合酶在毕赤酵母中的外源表达不是很稳定,其最优诱导时间为 6h。

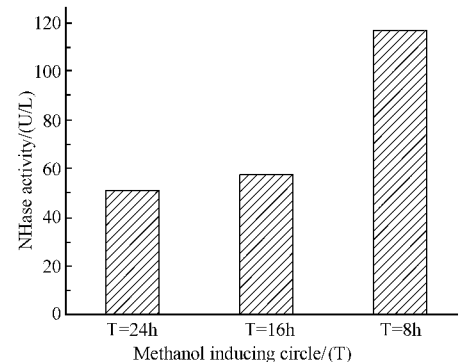


图3 甲醇诱导周期对脲水合酶累积活性的影响

Fig.3 Effect of methanol inducing circle on NHase activity

进一步研究甲醇浓度、IND 加入量、接种量等因素对脲水合酶表达的影响,结果表明,当重组菌在 28℃、220r/min 的甘油培养基中培养 48h 后离心除去甘油,以 10% 接种量转入甲醇培养基,以 1.0% 终浓度的甲醇和 0.2mg/L IND 诱导 6h 后收获菌体,重组酵母菌 *P. pastoris* NH4 的总酶活水平可以达到 2100U/L,比酶活为 0.52U/mg 干菌,比脲水合酶在重组大肠杆菌中的表达水平提高了一个数量级。这一结果对重组脲水合酶在不同宿主中的外源表达,乃至进一步基因工程改造研究具有重要的学术意义。

参 考 文 献

- [1] 沈寅初, 张国凡, 韩建生. 微生物法生产丙烯酰胺. 工业微生物, 1994, **24**(2): 24 - 32.
- [2] 王宏岗. 聚丙烯酰胺市场分析. 现代化工, 2000, **20**(7): 52 - 56.
- [3] 陈 跖, 孙旭东, 史 悦, 等. 微生物发生产丙烯酰胺的研究 I)——脲水合酶产生菌株的培养和高活力表达. 生物工程学报, 2002, **17**(1): 55 - 58.
- [4] Nagasawa T, Shimizu H, Yamada H. The superiority of the third-generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrylamide. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **40**: 189 - 195.
- [5] Shi Y, Yu H M, Sun X D, *et al.* Cloning of the nitrile hydratase gene from *Nocardia* sp. in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and its functional expression using site-directed mutagenesis. *Enz Microb Technol*, 2004, **35**(6 - 7): 557 - 562.
- [6] Sun X D, Shi Y, Yu H M, *et al.* Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using hollow-fiber membrane bioreactor system. *Biochem Eng J*, 2004, **18**(3): 239 - 243.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [8] Kobayashi M, Nagasawa T, Yamada H, *et al.* Cloning nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1129**: 23 - 33.

Heterogenous expression of nitrile hydratase gene of *Nocardia* sp. in recombinant *Pichia pastoris*

YU Hui-min SHI Yue TIAN Zhuo-ling WEN Fei SHEN Zhong-yao*

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

Abstract: Heterogenous expression of active nitrile hydratase (NHase) was focused for its great potential in genetically evolution of the operational stability of NHase. Two recombinant *Escherichia coli* strains, *E. coli* JM105 (pUC18-NHBAX) and *E. coli* BL21 (DE3) (pET32a-NHBAX), were first constructed and used for heterogenous expression of a NHase gene cloned from *Nocardia* YS-2002. It was found that the α subunit of NHase can not be effectively expressed in both recombinant *E. coli*, which results in as low as 0.04U/mg (dry cell weight) activity of NHase in *E. coli* BL21 (DE3) (pET32a-NHBAX), and no activity in JM105 (pUC18-NHBAX) at all. Therefore, the recombinant and active expression of NHase in *Pichia pastoris* was especially interested. A new plasmid, pPIC3.5k-NHBAX, was constructed by insertion of the NHase gene, and then successfully transformed into the cell of *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. A novel superior strain, *P. pastoris* NH4, was selected from 6 target-clones and used for optimization of cell culture and NHase expression. The final activity of NHase expressed in *P. pastoris* NH4 under optimal conditions is 0.52U/mg (dry cell weight), which is 13-fold higher than that in recombinant *E. coli*. However, the activity of NHase expressed in recombinant *P. pastoris* NH4 can not be stably maintained longer than 6 h.

Key words: *Nocardia*, Nitrile hydratase, Heterogenous expression, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (20206014); Foundation for The Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200345)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62788568; Fax: 86-10-62770304; E-mail: szy-dce@tsinghua.edu.cn; yuhm@tsinghua.edu.cn

Received date: 04-15-2005