

膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因在毕赤酵母中的分泌表达

张健慧, 王首锋*

(浙江大学生命科学学院植物科学研究所, 杭州 310058)

摘要 通过提取膜荚黄芪叶片总 RNA 进行反转录合成 cDNA, 根据 GenBank 上已发表的膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)核酸序列设计引物, 从 cDNA 中扩增到 PAL 的开放阅读框区段, 并将该区段亚克隆到 pUCm-T 载体上. 通过设计与毕赤酵母表达载体 pPIC9K 具有同源区段的引物, 从 pUCm-T-PAL 上扩增出带同源臂的 PAL, 利用体外同源重组技术将其克隆到 pPIC9K 中构建成 pPIC9K-PAL 表达载体. 与传统的酶切连接载体构建方法相比, 该方法可避免酶切位点可利用性的限制. 将 Sal I 线性化的 pPIC9K-PAL 电转化至毕赤酵母 GS115 中, 于 2.0 mg/mL G418 抗性平板上进行筛选获得阳性克隆. 经 1% 甲醇诱导 120 h 后, 重组菌株 GS115/pPIC9K-PAL 与负对照相比, 其 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳图谱在 77.96 ku 处有 1 条明显的蛋白带, 大小与预期 PAL 蛋白一致. 利用 Q-Sepharose FF 蛋白纯化柱对总蛋白进行纯化, 获得了较纯的苯丙氨酸解氨酶. Bradford 法测得纯化后 PAL 质量浓度为 0.08 mg/mL, 含量占总蛋白的 11.54%, 最高比活达到 4 270 U/mg.

关键词 膜荚黄芪; 苯丙氨酸解氨酶; 同源重组; 毕赤酵母; 分泌表达

中图分类号 Q 78 **文献标志码** A

Expression of *Astragalus membranaceus* phenylalanine ammonia-lyase gene in *Pichia pastoris*.

Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2014, 40(1): 1-8

Zhang Jianhui, Wang Shoufeng* (Institute of Plant Science, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Summary *L*-phenylalanine, as an essential amino acid for human nutrition, is widely used in pharmaceutical and food industries. Using phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) to produce *L*-phenylalanine is one of the major routes. However, most commercial enzymes are extracted from *Rhodotorula glutinis*, which is time-consuming and over-priced. Therefore, how to efficiently construct the genetic engineering strain to produce PAL is the hot topic. *Pichia pastoris* is popular in expressing heterologous proteins due to the advantages of low nutritional demands, excellent genetic stability and high-density fermentation. Inserting the heterologous gene into pPIC9K vector to achieve secreted expression in *P. pastoris* has been reported. However, unlike other vectors, pPIC9K has few desirable restriction enzyme cutting sites, which reduces vector construction efficiency when the classical method of digestion and then ligation is adopted. Under this condition, an efficient cloning strategy, independent of

基金项目: 国家发展改革委微生物制造、绿色农用生物产品高技术产业化专项(20111158).

* 通信作者(Corresponding author): 王首锋, Tel: +86-571-88206593; E-mail: sfwang@zju.edu.cn

第一作者联系方式: 张健慧, E-mail: 07swzjh@163.com

收稿日期(Received): 2013-07-03 接受日期(Accepted): 2013-08-27 网络出版日期(Published online): 2014-01-15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3785/j.issn.1008-9209.2013.07.031.html>

digestion and ligation, is required. Homologous recombination *in vitro* between pPIC9K and gene can settle this problem. Now, we intend to employ homologous recombination *in vitro* cloning method to insert the *PAL* gene into pPIC9K vector to obtain secreted expression in *P. pastoris* in order to lay the basis for industrial fermentation.

First, total RNA extracted from *Astragalus membranaceus* was used as template for isolating cDNA. Open reading frame (ORF) of *PAL* gene was amplified by PCR from cDNA with a pair of primers designed according to the sequence of *PAL* gene published in the GenBank. Then, ORF was cloned into vector pUCm-T. The transformant was selected to sequence for further analysis of the *PAL* gene sequence with the help of bioinformatics tools. After that, pPIC9K-*PAL* was constructed by homologous recombination *in vitro*. Similarly, the transformant was selected to sequence to investigate the base mutation caused by PCR. Linearized pPIC9K-*PAL* by *Sal* I was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation. Positive strains were screened on MD and then YPD-G418 plates. The strain resistant to 2.0 mg/mL G418 was selected to express induced by 1% methanol every 24 hours. Supernatant was collected for expression analysis at 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h. The recombined *PAL* protein was purified by Q sepharose fast flow chromatography. Finally, protein concentration was measured with Bradford method and enzyme activity was analysed by measuring the absorption of resultant trans-cinnamic acid at 290 nm.

After *PAL* was subcloned into pUCm-T, the result of sequencing indicated that about 2 200 bp ORF sequence of *PAL* gene was cloned from *A. membranaceus*. With the help of bioinformatics methods, it was predicted that *PAL* encoded a protein which was about 78 ku in molecular mass and 6.04 in pI, containing 718 amino acid residues. Amino acid sequence alignment revealed that the *PAL* shared 99% identity with *PAL* from *A. membranaceus* published in the NCBI. After homologous recombination *in vitro* between pPIC9K and *PAL*, the two evidences that about 900 bp fragment which was coincident with the expectation was obtained from the recombinant plasmid pPIC9K-*PAL* by *Eco*R I double digestion and that furthering analysis of sequencing both suggested that *PAL* was successfully constructed into pPIC9K without any mutation compared with the first sequencing. After linearized pPIC9K-*PAL* was transformed into *P. pastoris* GS115, colony PCR indicated *PAL* gene was integrated into the yeast chromosome in contrast to the negative control. The strain resistant to 2.0 mg/mL G418 was selected to express. SDS-PAGE demonstrated that a sharp 78 ku protein which was equal to the predicted value was expressed in the supernatant in contrast to the parent pPIC9K. By Q sepharose fast flow chromatography, the protein was well purified. The concentration of purified protein was 0.08 mg/mL, accounting for 11.54% of total proteins and the specific activity of GS115/pPIC9K-*PAL*-3 was 4 270 U/mg.

This study supplies a novel cloning strategy to insert the target gene into pPIC9K vector by homologous recombination *in vitro* which makes vector construction get rid of the limitation of restriction enzyme cutting site. Meanwhile, the expression of *PAL* gene in *P. pastoris* GS115 has laid the foundation for using genetic engineering technology to produce *PAL* in large scale.

Key words *Astragalus membranaceus*; phenylalanine ammonia-lyase; homologous recombination; *Pichia pastoris*; secreted expression

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*, EC 4.3.1.5)广泛存在于高等植物及少数微生物中,是植物苯丙烷类代谢途径中的关键酶和限速酶^[1],可催化 *L*-苯丙氨酸(*L*-Phe)脱氨生成反式肉桂酸,*PAL*也可逆向催化反式肉桂酸与氨进行加成反应生成 *L*-Phe^[2].在食品工业中,*L*-Phe 主要用作新型食品添加剂阿斯巴甜(aspartame, *L*-Asp-*L*-Phe-Me)的合成原料^[3].随着世界市场每年对阿斯巴甜需求量的增加,*L*-Phe 的合成工艺已成为当前生物化工领域研究与开发的热点.目前,国内外均有

公司利用 *PAL* 的逆向催化特性进行 *L*-Phe 的生产.其中红酵母(*Rhodotorula glutinis*)已经被作为工业生产中 *PAL* 的主要酶源,但从红酵母里提取 *PAL* 步骤繁琐,费时费力,且酶产量低,致使该生产方法已经远远不能满足工业化生产 *L*-Phe 的要求.因此,利用基因工程技术构建 *PAL* 高表达工程菌株是解决该问题的一个可行手段^[4].

1961 年 Koukal 等^[5]首次在绿色植物大麦幼苗中发现并分离纯化到了 *PAL*,并对该酶的理化性质,如最适 pH、底物质量浓度与特异性,以及金属离子的

影响等进行了研究. 随后, 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、菜豆、水稻、小麦、红酵母等物种中的 PAL 被分离纯化^[6-9], 其酶学基本特征也被进一步进行了研究. 近年来, 通过基因工程技术, Jia 等^[10]将红酵母 PAL 基因在大肠埃希菌中进行了表达, 最高比活 123 U/g; Hsieh 等^[11]将绿竹笋 PAL 在大肠埃希菌和毕赤酵母中进行了表达, 最高比活分别为 62.94 nkat/mg 和 62.70 nkat/mg, 但都是在胞内进行的表达, 不利于表达产物的分离纯化.

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为一种成熟的真核表达系统已成功应用于多种异源蛋白的表达^[12]. 该表达系统既具有易操作、细胞生长速度快、能够以甲醇为碳源进行高密度发酵等优点, 又具有真核表达系统蛋白加工修饰的功能^[13]. 目前, 植酸酶、人几丁质酶、人肝单胺氧化酶、人血清蛋白^[14-17]等多种蛋白都已在毕赤酵母中获得了高效表达.

本研究从膜荚黄芪中克隆了苯丙氨酸解氨酶基因, 利用体外同源重组技术将其克隆到 pPIC9K 表达载体中, 构建了 PAL 毕赤酵母表达载体 GS115/pPIC9K-PAL. 通过将表达载体整合到酵母染色体上, 获得了 PAL 的分泌表达. 同时, 分泌表达的总蛋白通过 Q-Sepharose FF 一步纯化便获得了较高纯度的 PAL. 本研究为构建 PAL 高产基因工程菌株和 PAL 在食品工业生产中的应用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 膜荚黄芪种子购自河北保定药华药材种子站.

1.1.2 菌株、质粒 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , pUCm-T 购自生工生物工程(上海)有限公司; *P. pastoris* GS115 及 pPIC9K 由浙江大学化学工程与生物工程专业研究生刘悦惠赠.

1.1.3 试剂 反转录试剂盒 (PrimeScript RT-PCR Kit), DNA 聚合酶 (*Ex Taq* HS) 购自 TaKaRa 公司, DNA 聚合酶 (*easy Taq*) 购自 TransGen Biotech, 阴离子交换色谱 (Q sepharose fast flow chromatography) 购自 Amersham 公司.

1.1.4 培养基 细菌基础 (Luria-Bertani, LB) 培养基, 酵母膏胨葡萄糖琼脂 (yeast extract peptone dextrose medium, YPD) 培养基, 最小葡萄糖 (minimal dextrose medium, MD) 培养基, 毕赤酵母诱导表达前 (buffered minimal glycerol-complex

medium, BMGY) 培养基, 毕赤酵母诱导表达 (buffered minimal methanol-complex medium, BMMY) 培养基配方参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册.

1.2 方法

1.2.1 试验材料的准备 挑选籽粒饱满、无病菌的膜荚黄芪种子, 用 70% 乙醇表面消毒 5 min, 然后用无菌水浸种 24 h, 播种于已灭菌砂壤的花盆中, 置于温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照为 3 000 lx, 光暗周期比为 16 h : 8 h, 湿度 60% 的培养室中培养. 植物生长 1 个月后, 取幼苗的叶子作为本实验的供试材料.

1.2.2 PAL 基因克隆 根据北京天恩泽基因科技有限公司柱式植物 RNAout 试剂盒, 从膜荚黄芪 (*A. membranaceus*) 中提取总 RNA, 然后用 TaKaRa 公司的 PrimeScript RT-PCR 试剂盒进行反转录反应. 先在离心管中配制混合液 10 μL : dNTP 混合物 (10 mmol/L each) 1 μL , Random 6 mers (20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL (表 1), Template RNA 3 μL , 加 RNase Free H₂O 5 μL . 将混合液置于 PCR 仪上进行 RNA 变性, 退火反应, 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$. 取出, 离心数秒钟使模板 RNA/引物等的混合液聚集于管底. 配制反转录反应液: 上述变性、退火后反应液 10 μL , 5 \times PrimeScript 缓冲液 4 μL , RNase Inhibitor (40 U/ μL) 0.5 μL , PrimeScript RTase (for 2 Step) 0.5 μL , 加 RNase Free H₂O 5 μL . 在 PCR 仪上按下列条件进行 cDNA 的合成: 30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$.

根据 GenBank 公布的苯丙氨酸解氨酶基因序列 (EF567076) 设计引物 F₁, R₁ (表 1). 以反转录反应得到的 cDNA 为模板, 以 F₁/R₁ 为引物进行 PCR 反应. PCR 反应体系 (50 μL): 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , dNTP Mixture (10 mmol/L each) 2 μL , 引物 F₁ (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 引物 R₁ (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , TaKaRa *Ex Taq* HS (5 U/ μL) 0.5 μL , 上述反转录反应液 2 μL , H₂O 39.5 μL . 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物纯化后, 克隆到 pUCm-T 载体中, 送上海生工生物工程技术有限公司进行测序.

1.2.3 表达载体 pPIC9K-PAL 的构建、转化与筛选 由于在 PAL 基因中含有 pPIC9K 多克隆位点处的常用酶切位点, 因此传统的酶切连接方法不适合将全长的 PAL 克隆到该表达载体上. 本研究采用体外同源重组的方式来构建表达载体. 先用

表1 膜荚黄芪 *PAL* 反转录、基因克隆及菌落 PCR 鉴定所用引物Table 1 Primer sequences for reverse transcription, *PAL* gene cloning and colony PCR analysis

| 引物名称 Primer name | 引物序列(5'—3') Primer sequences (5'—3') |
|------------------------------|---|
| Random 6 mers | NNNNNN |
| <i>Am PAL</i> F ₁ | AGCTACGTAATGGAGGGAGAAGGAGC |
| <i>Am PAL</i> R ₁ | AAAGCGGCCGCAGCTAAGAAATTG |
| <i>Am PAL</i> F ₂ | GAAGCTTACGTAGAAATTCATGGAGGGAGAAGGAG |
| <i>Am PAL</i> R ₂ | GAATTAATTCGCGGCCGCAGCTAAGAAATTG |

EcoR I + *Not* I 双酶切载体 pPIC9K,使之线性化,然后以测序验证过的 pUCm-T-*PAL* 为模板,利用与线性化的 pPIC9K 末端具有 15~20 个同源碱基的引物 F₂/R₂ (表 1)再次扩增出 *PAL*. PCR 反应体系 50 μ L: PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25 μ L, 引物 F₂ (10 μ mol/L) 1 μ L, 引物 R₂ (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板 pUCm-T-*PAL* (100 ng/mL) 0.5 μ L, ddH₂O 23 μ L. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 57.3 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. 纯化后的 PCR 片段与线性化的 pPIC9K 利用 Clontech 的 In-Fusion HD Cloning Kit 进行载体构建. 重组反应体系 10 μ L: 纯化的目的片段 0.5 μ L, 双酶切后的 pPIC9K 1.5 μ L, 5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix 2 μ L, 无菌 ddH₂O 6 μ L. 50 $^{\circ}$ C 反应 15 min. 取 3 μ L 反应液转化到感受态大肠埃希菌 DH5 α 中, 在含 100 μ g/mL 氨苄西林的平板上筛选阳性转化子.

将构建好的阳性 pPIC9K-*PAL* 用 *Sal* I 限制性内切酶线性化, 乙醇沉淀回收得到高质量浓度的 DNA 片段用于转化. 毕赤酵母 GS115 的转化采用 Eppendorf Eporator 2510 电穿孔仪进行电转化.

采用组氨酸缺陷性的 MD 平板 (1.34% 酵母氮源, 2% 葡萄糖, 4×10^{-5} 生物素, 1.5% 琼脂) 筛选出发生同源重组的 His⁺ 转化子. 用无菌水将 MD 平板上的转化子洗下, 将混合菌涂布在 G418 质量浓度为 1.0, 2.0 mg/mL 的 YPD 平板 (1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖) 上, 进行多拷贝重组菌株的筛选.

1.2.4 重组酵母 GS115/pPIC9K-*PAL* 的菌落 PCR 鉴定 分别从 G418 质量浓度为 1.0, 2.0 mg/mL 的 YPD 平板上挑取多拷贝单菌落, 接种于 YPD 液体培养基上, 培养 24 h 后, 取 200 μ L 培养液, 10 000 r/min 离心 5 min. 用等体积无菌水洗 3

次后, 取 1 μ L 作为 PCR 的模板. 同时, 转化了 pPIC9K 空载体的重组酵母作为阴性对照, 进行相同处理; 以重组载体 pPIC9K-*PAL* 为模板, 作为阳性对照. 反应体系和扩增程序按照全式金 easy *Taq* 酶的说明书进行. PCR 产物用于进行核酸电泳验证.

1.2.5 重组酵母 GS115/pPIC9K-*PAL* 的诱导表达 将 PCR 鉴定阳性的重组酵母接种于 5 mL BMGY 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇菌培养至 $D(600 \text{ nm}) = 2 \sim 6$, 室温下 3 000 g 离心 5 min, 弃上清液, 菌体用 BMMY 培养基重悬至 $D(600 \text{ nm}) = 1$. 上述接种物继续培养, 每 24 h 补加无水甲醇至终体积分数 1%, 诱导重组蛋白的表达. 期间, 每 24 h 取样 1 mL 备用. 培养 144 h 后, 收集发酵液, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液经三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA) 沉淀后, 进行 SDS-PAGE 分析, 并用 Bradford 法测蛋白浓度.

1.2.6 表达产物的纯化 为了从发酵液中纯化出目标蛋白 *PAL*, 本研究使用 Q-Sepharose FF 阴离子交换层析柱进行纯化, 然后用 Sephadex G-25 脱盐处理. Q-Sepharose FF 阴离子交换层析柱先经过 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液进行预平衡. 将离心后的发酵液上清液上柱后, 用含 0.1, 0.2, 0.4 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液梯度洗脱, 平均流速 1 mL/min, 分别收集各峰的产物, 并进行 SDS-PAGE 检测. 将含目的蛋白的收集产物过 Sephadex G-25 进行脱盐处理. 纯化脱盐后的产物用 Bradford 法进行蛋白浓度的测定.

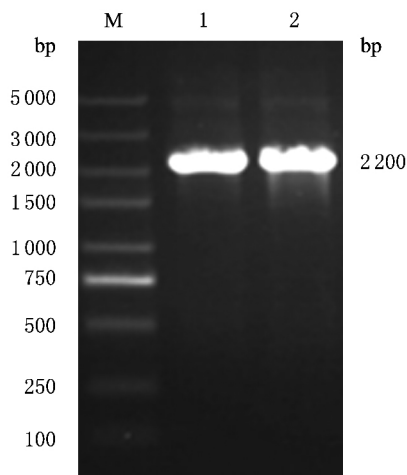
1.2.7 重组酵母表达产物酶活性测定 由于苯丙氨酸解氨酶可以催化 *L*-Phe 脱氨生成反式肉桂酸, 产物在 290 nm 具有特征吸收值, 因此可以通过测定该酶催化反应中产物的生成量来表征 *PAL* 的酶活.

在本研究中,酶活性以每小时反应液在波长 290 nm 处的光密度增加 0.01 为 1 U. 1 U 相当于生成肉桂酸 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[18]. 反应体系:0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 2 mL, 0.02 mol/L L-Phe 1 mL, 纯化的酶 0.5 mL. 以不加酶的一组作为空白对照. 30 °C 水浴反应 1 h 后,用紫外分光光度计测定反应液的 $D(290\text{ nm})$ 光密度值,计算出酶的比活.

酶的比活/(U/mg) = (酶活/U)/(酶质量/mg).

2 结果与分析

2.1 PAL 基因的克隆 通过 RNA 提取,以反转录得到的第 1 链为模板,利用 *Ex Taq* HS 酶扩增出约 2 200 bp 的目的片段(图 1). 将目的片段构建到 pUCm-T,对转化子 pUCm-T-PAL 进行 PCR 鉴定,并测序分析. 将所得序列进行 Blast 分析,结果表明本研究中所扩增到的基因其核苷酸序列及氨基酸序列均与膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶 EF567076.1 有 99% 的一致性. 证明目的片段为苯丙氨酸解氨酶基因. 生物信息学分析表明:该基因编码 718 个氨基酸,蛋白相对分子质量为 77 960,等电点为 6.04.



M: DL5000 DNA 标志物; (1~2): PAL 基因 PCR 产物.

M: DL5000 DNA marker; (1-2): Amplified PCR product of PAL gene.

图 1 PAL 基因的 PCR 产物

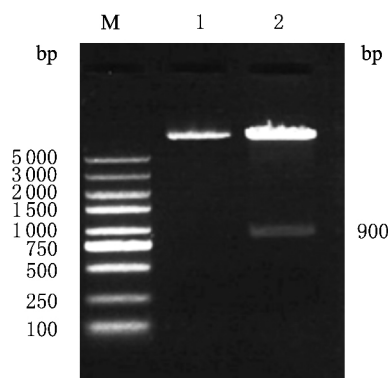
Fig. 1 PCR product of PAL gene

2.2 表达载体 pPIC9K-PAL 的构建

因 PAL 基因内部含有 *EcoR* I 酶切位点,所以如果按照常规的酶切,连接法构建载体就不能选择 *EcoR* I 酶切目的基因和载体. 因此,为了避免可利

用酶切位点的限制,本文采用体外同源重组技术将目的基因插入到 pPIC9K 上.

重组载体 pPIC9K-PAL 构建完后,用 *EcoR* I 对转化子质粒 pPIC9K-PAL 双酶切,得到约 900 bp 大小的片段(图 2),与预期值相符. 酶切正确的阳性转化子测序序列用 DNASTar 软件的 MegAlign 程序包序列进行分析比较,结果表明目的基因在 pUCm-T 上与 pPIC9K 的序列有 100% 的一致性,中间 PCR 过程没发生碱基突变,载体构建与预期一致.



M: DL5000 DNA 标志物; 1: 重组载体 pPIC9K-PAL; 2: pPIC9K-PAL 酶切分析.

M: DL5000 DNA marker; 1: Recombinant pPIC9K-PAL; 2: Restriction analysis of recombinant pPIC9K-PAL.

图 2 重组表达载体 pPIC9K-PAL 的酶切分析

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant expression vector pPIC9K-PAL

2.3 表达载体 pPIC9K-PAL 的转化与筛选

线性化的 pPIC9K-PAL 电转 GS115 后,经 MD 平板筛选,结果如图 3A: MD-Am, 约 200 个克隆, MD-9K 为阴性对照,转化的是 pPIC9K; MD-Am 上的转化子再分别经 1.0, 2.0 mg/mL 的 G418 筛选,结果如图 3B: G418-2.0-Am, G418-1.0-Am, 各有 1 个克隆,结果筛选出了对 2.0 mg/mL G418 有抗性的多拷贝重组菌株.

2.4 重组酵母 GS115/pPIC9K-PAL 菌落 PCR 鉴定

从 1.0, 2.0 mg/mL YPD-G418 平板上挑取多拷贝单菌落,以 F_2 , R_2 (表 1) 为引物进行 PCR 鉴定,扩增出了 1 条 2 200 bp 左右的条带(图 4),而阴性对照空质粒 pPIC9K 转化的酵母无目的条带,阳性对照 pPIC9K-PAL 载体有明显的目的条带. 表明 pPIC9K-PAL 已经整合到了酵母染色体上.

2.5 重组蛋白 PAL 的表达与纯化

从 2.0 mg/mL YPD-G418 平板上挑取经 PCR

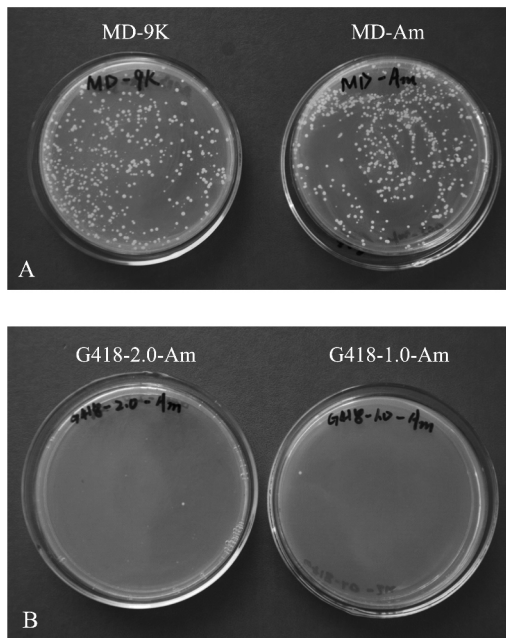
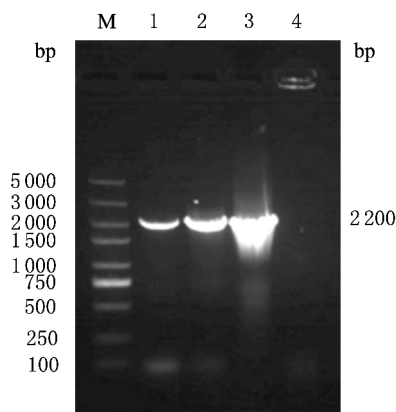


图 3 重组酵母 GS115/pPIC9K-PAL 筛选结果

Fig.3 Screening result of recombinant yeast GS115/pPIC9K-PAL



M:DL5000 DNA 标志物;1 抗 1.0 mg/mL G418 的重组酵母;2 抗 2.0 mg/mL G418 的重组酵母;3 以重组载体 pPIC9K-PAL 为模板作阳性对照;4 以空载体转化的酵母为模板作负对照.

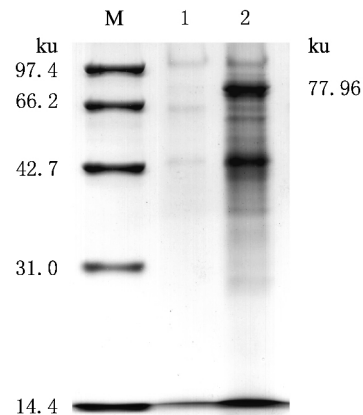
M: DL5000 DNA marker; 1: Recombinant yeast resistant to 1.0 mg/mL G418; 2: Recombinant yeast resistant to 2.0 mg/mL G418; 3: Recombinant vector pPIC9K-PAL as positive control; 4: Parent vector pPIC9K as negative control.

图 4 重组酵母基因组的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of PCR amplified from recombinant yeast genome DNA

鉴定的单菌 pPIC9K-PAL 及 pPIC9K,每 24 h 补加 1%甲醇诱导表达,取上清液,TCA 沉淀后,进行 SDS-PAGE 分析,考马斯亮蓝染色.结果表明,与负对照相比,重组菌诱导表达上清液在约 78 ku 处有

特异性条带,与预期相对分子质量大小相符(图 5).重组蛋白经 Q-Sepharose FF 阴离子交换层析柱纯化后,得到了较好的结果(图 6).用 Bradford 法测蛋白含量,在发酵上清液中菌株 pPIC9K-PAL-3 蛋白含量为 0.675 mg/mL,纯化之后,蛋白含量为 0.08 mg/mL,纯化的蛋白占总蛋白含量的 11.54%.

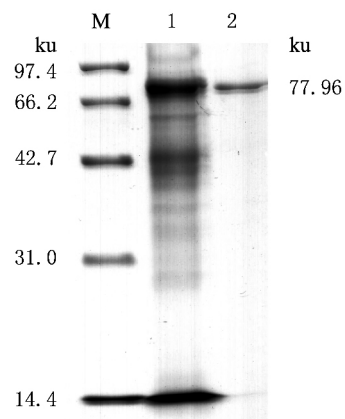


M:标准蛋白标志物;1:pPIC9K 负对照;2:pPIC9K-PAL 重组蛋白.

M: Protein marker; 1: pPIC9K as negative control; 2: pPIC9K-PAL recombinant protein.

图 5 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expressed protein



M:标准蛋白标志物;1 纯化前的粗蛋白;2 纯化后的蛋白.

M: Protein marker; 1: Crude proteins; 2: Purified protein.

图 6 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified protein

2.6 PAL 酶活分析

本实验通过测定生成物反式肉桂酸在 290 nm 处光密度值的增加来分析 PAL 的酶活,并用 Bradford 法测酶液中蛋白含量,计算出苯丙氨酸解氨酶 PAL 的比活力,结果见表 2.菌株 1,3,5 最初来自于 MD 平板;菌株 3 对 2.0 mg/mL G418 有抗性.

表 2 不同菌株酶活分析

Table 2 Analysis of enzyme activity in different strains

| 菌株 Strain | 酶活 Enzyme activity/ (U/h) | 酶比活 Specific activity/ (U/mg) |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| GS115-pPIC9K-PAL-1 | 62.8 | 1 570 |
| GS115-pPIC9K-PAL-3 | 170.8 | 4 270 |
| GS115-pPIC9K-PAL-5 | 59.0 | 1 475 |

3 讨论

本研究尝试利用毕赤酵母这一成熟、高效的真核表达系统来分泌表达膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶. 毕赤酵母能够利用甲醇作为碳源进行高密度发酵, 具有与其他真核生物非常相似的分泌途径和很强的真核蛋白质修饰功能, 并且其自身分泌的蛋白质很少, 因此在表达和分离纯化异源蛋白方面具有很大的优势^[15]. 目前, 通过将异源基因构建到载体 pPIC9K 上实现了异源蛋白的表达, 如马乳铁蛋白、假丝酵母脂肪酶、虾抗菌肽^[19-21]等.

然而, pPIC9K 上的多克隆位点非常有限, 仅有 *Not*I, *Avr* II, *Eco*R I, *Sna*B I 4 个酶切位点. 并且, *Avr* II 切出的突出末端连接效率比较低, 要用平滑末端的连接条件, *Sna*B I 切出的是平末端, 连接效率也比较低下. 当使用传统的酶切、连接载体构建方法时, 这些不利因素增加了表达载体构建的难度, 影响了载体的构建效率.

膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因内部含有 *Eco*R I 酶切位点, 在本研究的前期工作中曾尝试过使用 *Not*I 和 *Sna*B I 双酶切载体和目的基因, 然后进行连接构建载体, 但没有得到相应的阳性克隆. 本实验采用体外同源重组的方法成功地将目的基因构建到 pPIC9K 上. 本方法中的目的基因不需要酶切, 仅需要对载体进行线性化以及在目的基因 2 端加上与线性化载体约 15~20 个碱基的同源区段, 两者通过同源重组, 将目的基因插入到 pPIC9K 上. 此载体构建方法短时高效, 不需要增加任何额外的序列, 可实现外源片段与载体的无缝克隆. 若通过 PCR 方法线性化载体, 还可以将目的基因插入到任何感兴趣的位点^[22]. 本实验尝试的这种载体构建方法, 为异源基因构建到 pPIC9K 上提供了一种新思路.

重组的毕赤酵母在诱导表达目的蛋白时会产生一些杂蛋白. 这些杂蛋白来自目的蛋白的降解物及

色素, 还有少部分酵母自身产生的蛋白. 本研究通过阴离子交换色谱 Q-Sepharose FF 去除杂蛋白, 纯化目的蛋白. 结果目的蛋白被含 0.4 mol/L NaCl 的 Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液洗脱下来. 与凝胶过滤法分离蛋白相比, 此方法样品上样量大, 耗时短, 易于在工业上放大使用. 增加外源基因在毕赤酵母基因组上的拷贝数是提高外源蛋白表达量的常用方法, 而本研究筛选到了对 2.0 mg/mL G418 有抗性的菌株, 这样可以做到高表达^[23].

本研究通过体外同源重组的方法成功将苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 整合到 pPIC9K 上, 为异源基因构建到 pPIC9K 上提供了新方法. *PAL* 在毕赤酵母中得到分泌表达, 这样不仅避免了目的蛋白被胞内蛋白酶降解, 还大大简化了产物的分离纯化过程, 为大规模生产 *PAL* 及其应用到食品工业提供了便利条件.

参考文献 (References):

- [1] MacDonald M J, D' Cunha G B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 85(3):273-282.
- [2] Yamada S, Nabe K, Izuo N, *et al.* Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42(5):773-778.
- [3] Klausner A. Building for success in phenylalanine. *Nature Biotechnology*, 1985, 3(4):301-307.
- [4] 缪元颖, 杨顺楷, 刘成君. 苯丙氨酸解氨酶的分子生物学研究进展. 应用与环境生物学报, 2002, 8(6):672-675.
Miu Y Y, Yang S K, Liu C J. Research progress in molecular biology of phenylalanine ammonia-lyase. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2002, 8(6):672-675. (in Chinese with English abstract)
- [5] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(10):2692-2698.
- [6] Kalghatgi K, Rao P S. Microbial L-phenylalanine ammonia-lyase. Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctonia solani*. *Biochemical Journal*, 1975, 149(1):65-72.
- [7] Bolwell G P, Bell J N, Cramer C L, *et al.* L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Biochemistry*, 1985, 149(2):411-419.
- [8] 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究: VI. 水稻, 小麦 *PAL* 的纯化及基本特性. 植物生理与分子生物学报, 1985, 11(2):204-214.
Ouyang G C, Ying C Y, Wo S G, *et al.* The research on

- phenylalanine ammonia-lyase from plants: VI. Purification and basic characteristics of PAL from rice and wheat. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1985,11(2):204-214. (in Chinese)
- [9] D'Cunha G B, Satyanarayan V P, Madhusudan N. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 1996,42(1):17-20.
- [10] Jia S R, Cui J D, Li Y, *et al.* Production of L-phenylalanine from *trans*-cinnamic acids by high-level expression of phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2008,42(3):193-197.
- [11] Hsieh L S, Yeh C S, Pan H C, *et al.* Cloning and expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPAL2*) from *Bambusa oldhamii* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2010,71(2):224-230.
- [12] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000,24(1):45-66.
- [13] Daly R, Hearn M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 2005,18(2):119-138.
- [14] Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, *et al.* High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006,72(5):1039-1047.
- [15] Goodrick J, Xu M, Finnegan R, *et al.* High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001,74(6):492-497.
- [16] Newton-Vinson P, Hubalek F, Edmondson D E. High-level expression of human liver monoamine oxidase B in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2000,20(2):334-345.
- [17] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, *et al.* High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000,89(1):55-61.
- [18] Zucker M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 1965,40(5):779-784.
- [19] Paramasivam M, Saravanan K, Uma K, *et al.* Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2002,26(1):28-34.
- [20] Brunel L, Neugnot V, Landucci L, *et al.* High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2004,111(1):41-50.
- [21] Li L, Wang J X, Zhao X F, *et al.* High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2005,39(2):144-151.
- [22] Benoit R M, Wilhelm R N, Scherer-Becker D, *et al.* An improved method for fast, robust, and seamless integration of DNA fragments into multiple plasmids. *Protein Expression and Purification*, 2006,45(1):66-71.
- [23] Vassileva A, Arora Chugh D, Swaminathan S, *et al.* Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2001,21(1):71-80.