

菠菜乙醇酸氧化酶基因的克隆及表达

晋剑锋¹ 谭天伟^{1*} 苏国富²

¹(北京化工大学生物化工系 北京 100029)

²(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 采用 RT-PCR 技术从菠菜总 RNA 中分离扩增了乙醇酸氧化酶(GO)基因的 cDNA 序列,首先克隆到质粒 pMD18-T 进行了测序。然后将乙醇酸氧化酶的 cDNA 分别亚克隆至质粒 pThioHisC、pTIG-Trx、pBV220 和 pET-2b(+),分别转化大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3),并对重组乙醇酸氧化酶在大肠杆菌中的表达进行了研究。SDS-PAGE 和酶活分析表明,菠菜乙醇酸氧化酶在 *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)和 *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)里得到了高水平的表达,其中 *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)的乙醇酸氧化酶活性较高。

关键词 乙醇酸氧化酶,克隆与表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0212-04

乙醇酸氧化酶(GO, glycolate oxidase, EC1.3.3.1)是植物光呼吸过程中的关键酶之一,可以催化乙醇酸氧化成乙醛酸。乙醇酸氧化酶广泛存在于动植物细胞中。在植物中,该酶催化光呼吸的关键步骤,在动物体内,该酶参与了从丝氨酸和糖类到草酸的代谢途径^[1]。目前,国外已有在大肠杆菌^[2]、酿酒酵母^[3]、毕赤氏酵母^[4]、汉氏多形酵母^[5]和冠状构巢曲霉^[6]中表达重组乙醇酸氧化酶的报道,并且将菌体直接用于催化生成乙醛酸^[7]。菠菜乙醇酸氧化酶在大肠杆菌中表达的主要问题是形成包涵体,因而酶活较低,而在酵母中表达虽然活性较高,但是由于酵母细胞壁较厚,菌体不能直接用于催化反应,还需要用去污剂进行通透处理。本文探索了在大肠杆菌中表达乙醇酸氧化酶的一些新策略,目的是为了提高菌体的酶活,为以后用生物法生产乙醛酸奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、菌株及培养条件

质粒 pTIG-Trx 由军事医学科学院生物工程研究所赵志虎博士赠送,质粒 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,其余质粒和菌株均为本室保存或本工作构建。大肠杆菌 DH5 α 用于质粒 pThioHisC、pTIG-Trx、pBV-220 和 pET-22k(+)及其衍生质粒的保存或扩增的标准菌株。大肠杆菌 BL21(DE3)和 DH5 α 用于乙醇

酸氧化酶基因表达的受体菌。

大肠杆菌的培养基用 LB 培养基^[9],培养温度 37 $^{\circ}$ C 摇床转速 200r/min 氮苄青霉素浓度为 100 μ g/mL。

1.2 酶和试剂

限制酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司、Promega 公司和 New England Biolab 公司;总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自博大公司;DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司、鼎国公司和博大公司;其余试剂为国产分析纯。

1.3 菠菜组织

购自市场的新鲜菠菜,液氮保存至使用。

1.4 菠菜总 RNA 的制备及 RT-PCR 扩增

菠菜总 RNA 的制备及 RT-PCR 扩增按照试剂盒说明书并参考《分子克隆》进行。扩增乙醇酸氧化酶基因的 PCR 引物:

p1 5'-CCG CTCGAGTGGTGGAGGTAGTATGGAGAT-CACAAATGTGAAC-3',划线部分是 *Xho*I 酶切位点,斜体字为人为添加的 6 个氨基酸连接区(SSGGGS);

p2 5'-CCG GAATTCGATGGAGATCACAAATGTGAAC-3'划线部分是 *Eco*R I 酶切位点;

引物合成和目的基因的测序均在上海博亚(BioAsia)公司完成。

RNA 经 MMLV 反转录酶反转录获得的 cDNA 用作 PCR 扩增模板,30 个 PCR 热循环按 95 $^{\circ}$ C 50s,

62℃ 50s, 72℃ 1min 进行。

1.5 重组质粒的构建

有关分子克隆,大肠杆菌的感受态制备及转化均按《分子克隆》方法进行。重组质粒构建如下:

以 cDNA 为模板, p1 和 p3 为引物进行 PCR, PCR 产物直接与质粒 pMD18-T 连接, 得到质粒 pMD18-T-GO 转化大肠杆菌 DH5 α , 在涂有 IPTG 和 X-gal 的 LB (100 μ g/mL amp) 平板上筛选白斑菌落, 提取质粒进行酶切鉴定, 并进行测序, 然后依次将 GO 基因克隆到表达载体 pTIG-Trx, pThio-HisC, pBV220 和 pET-226 (+) 上, 见图 1。

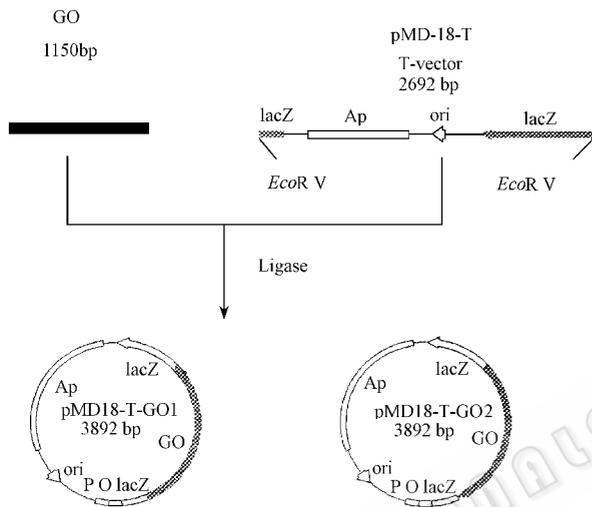


图 1 乙醇酸氧化酶基因克隆示意图

Fig. 1 Strategy for cloning the gene of glycolate oxidase in cloning plasmid

1.6 GO 在大肠杆菌中诱导表达

含重组质粒 pBV220-GO 的大肠杆菌 DH5 α 在含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中 30℃ 下培养过夜, 按 1% 接种量转接, 30℃ 培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$, 迅速升温至 42℃, 诱导 5h 后离心收菌。含重组质粒 pThioHisC-GO、pTIG-Trx-GO 和 pET-226 (+)-GO 的大肠杆菌 DH5 α 或 BL21 (DE3) 在含氨苄的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜, 按 1% 接种量转接, 37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$, 加 IPTG 至 1mmol/L, 培养 5h 后离心收集菌体。

GO 的表达用 SDS-PAGE 检测, 分离胶浓度 13.5% 浓缩胶浓度 5%, 电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色检测。蛋白含量的测定参照 Bradford 法^[8]。

1.7 表达产物的定位

1.7.1 周质部分: 4℃, 12000g 离心 1min, 收集 IPTG 诱导培养物, 将细菌沉淀悬于 30mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0), 20% 蔗糖中, 冰浴

10min, 12000g 离心 10min, 上清为周质部分。

1.7.2 胞内可溶和包涵体部分: 同上收集 IPTG 诱导培养物, 弃上清, 重悬沉淀于 1/10 培养物体积的 50mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 2mmol/L EDTA 和 0.1 mg/mL 溶菌酶中, 并加 Triton X-100 至终浓度 1%, 30℃ 放置 20min 后冰浴下超声破碎至溶液较清亮, 12000g 4℃ 离心 15min, 上清为可溶性部分, 沉淀为包涵体。

1.8 酶活分析

在光径 1.0cm 石英比色皿中加入 1.68mL 0.1 mol/L 盐酸苯胍, 0.02mL 10mmol/L FMN 和 0.1mL 酶液或菌液。平衡一段时间后加入 0.1mL 0.1mol/L 乙醇酸起始反应。反应在室温 (26~28℃) 下进行。用 Shimadzu UV-3000 在 324nm 处测定光密度上升值。^[9] 酶活定义一个乙醇酸氧化酶单位相当于在特定条件下, 每分钟合成 1 μ mol 乙醛酸所需的酶量。

2 结果

2.1 乙醇酸氧化酶 cDNA 的克隆

因为质粒 pMD18-T 是在 pUC18 基础上改建的 T-载体, 所以 PCR 产物有正向和反向两种插入方式, 其中 pMD18-T-GO1 是正向插入, pMD18-T-GO2 是反向插入。之后对克隆的 DNA 进行了测序, 结果与文献发表序列一致^[10] (图 2)。

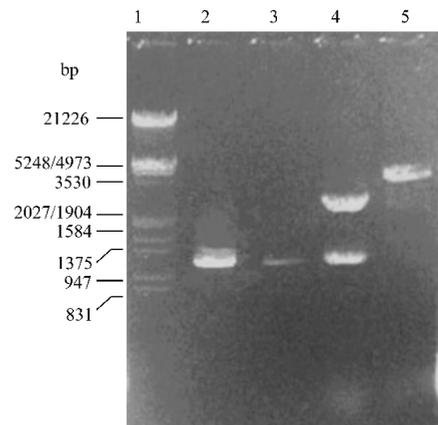


图 2 RT-PCR 产物和重组质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of GO and cloning vector pMD18-T-GO digested with restriction enzymes

1. DNA size marker (Lambda digested with *EcoR* I and *Hind* III);

2, 3. RT-PCR products of the cDNA of glycolate oxidase from spinach;

4. pMD18-T-GO digested with *Xho* I and *Sal* I;

5. pMD18-T-GO digested with *Xho* I

2.2 乙醇酸氧化酶基因在大肠杆菌中的诱导表达

本研究的目的是构建一种可以高效表达乙醇酸

氧化酶的工程菌以用于生物法生产乙醛酸,因此需要在大肠杆菌中可溶性表达乙醇酸氧化酶,使得菌体的酶活尽可能高。我们采用了胞内直接表达(pBV220)、分泌表达(pET-22k(+))与硫氧还蛋白融合表达(pThio-HisC)和硫氧还蛋白共表达(pTIG-ATrx)4套系统。

经过温度诱导的 *E. coli* DH5 α (pBV220-GO)和用 IPTG 诱导的 *E. coli* DH5 α (pThioHisC-GO)的全菌裂解物经 13.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色后未观察到外源蛋白的表达。

用 IPTG 诱导 *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)和 *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)全菌裂解物、周质蛋白、超声后上清和沉淀经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色后观察外源蛋白的表达,可以看到表观分子量约为 38kD 的特异表达带,与文献报道的乙醇酸氧化酶分子量一致^[11],另外 *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)的全菌裂解物还有一条带约为 16kD,与硫氧还蛋白的分子量一致。用蛋白扫描仪对 SDS-PAGE 干胶扫描分析表明,诱导 5h 后 *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)表达的乙醇酸氧化酶达到大肠杆菌总蛋白的 29%,而硫氧还蛋白高达 58.7%,是乙醇酸氧化酶的 2 倍(图 3);

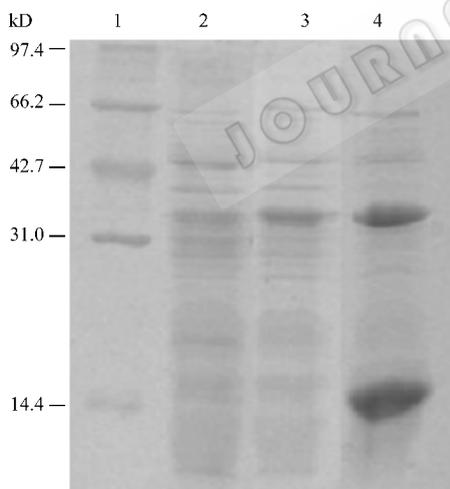


图 3 乙醇酸氧化酶在 *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression of spinach glycolate oxidase gene in *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)

1. Protein size marker 2. Cell extract from *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO) before induction with IPTG 3. Extract from the supernatant after superspinification of the cells induced with IPTG 4. Extract from the pellet after superspinification of the cells induced with IPTG

E. coli BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)表达的乙醇酸氧化酶占全菌总蛋白的 25.4%,占周质蛋白的 22%。因为用 T7 启动子表达的水平比较高,如果产

物位于胞内容易形成包涵体。*E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)菌体经过超声裂解后分别取上清和沉淀部分的蛋白,SDS-PAGE 显示表达的蛋白主要在沉淀部分,同样 *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)渗透休克后对其进行菌体超声裂解,表达的蛋白主要集中在沉淀部分,这说明在胞内的乙醇酸氧化酶大部分是不可溶的包涵体(图 4)。

直接测定菌体的乙醇酸氧化酶的活性结果是 *E. coli* BL21(DE3)(pTIG-Trx-GO)为每克菌体(干重)6.3u,*E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)为每克菌体(干重)41.6u,该菌体超声破碎液的比活为每克蛋白 70.5u,而菠菜粗提液的比活为蛋白 22u。

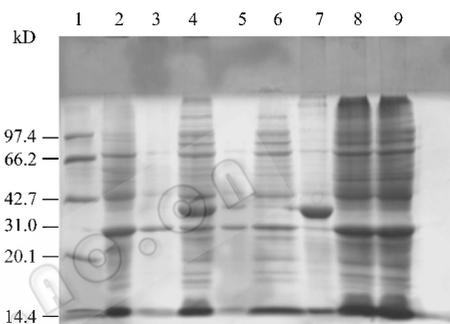


图 4 乙醇酸氧化酶在 *E. coli* BL21(DE3)(pET22k(+)-GO)中表达的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the expression of spinach glycolate oxidase gene in *E. coli* BL21(DE3)(pET22k(+)-GO)

1. Protein size marker 2. Cell extract from *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO) before induction with IPTG 3. Extract from periplasm of *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO) before induction with IPTG 4. Cell extract from *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO) 5h after induction with IPTG 5. Extract from periplasm of *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO) 5h after induction with IPTG 6. Extract from the supernatant after superspinification of the cells of *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO) induced with IPTG 7. Extract from the pellet after superspinification of the cells of *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO) induced with IPTG 8. Cell extract of *E. coli* BL21(DE3)(pET-22b(+)) before induction with IPTG 9. Cell extract of *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)) 5h after induction with IPTG

2.3 在不同 IPTG 浓度和 OD_{600} 值进行诱导对 *E. coli* BL21(DE3)(pET-22k(+)-GO)表达乙醇酸氧化酶的影响

由于 pET-22k(+)采用 IPTG 诱导,而 IPTG 的价格比较高,所以减少 IPTG 的用量可以降低今后发酵的成本。我们将 IPTG 的浓度从 1mmol/L 减少到 0.1 mmol/L,发现乙醇酸氧化酶均有表达,酶活在 40~42u/g 菌体之间,说明在该浓度范围之内 IPTG 的用量对表达没有影响。

为了确定在不同细胞培养密度下诱导对表达水平的影响,我们分别在 OD_{600} 为 0.4、0.6 和 1.0 时加

入 IPTG (0.2 mmol/L) 对 *E. coli* BL21 (DE3) (pET-22b (+)-GO) 进行诱导, 其中当 $OD_{600} = 0.6$ 时表达水平和菌体的酶活最高。

表 1 在不同细胞生长密度下诱导对表达的影响

Table 1 Induction of glycolate oxidase expression at different cell density

Induction at OD_{600}	Activity (u/g)*
0.4	20.3
0.6	41.6
1.0	32.1

* Cell dry weight

3 讨 论

在本研究中, 我们从菠菜叶提取总 RNA, 通过反转录-PCR 扩增出了菠菜乙醇酸氧化酶的基因。为了实现菠菜乙醇酸氧化酶在大肠杆菌中可溶性表达, 我们分别对比了直接在胞内表达、分泌表达、融合表达和与助溶配体共表达 4 种策略。

在 *E. coli* DH5 α (pBV220-GO) (采用 λ PL 温度诱导启动子) 和 *E. coli* DH5 α (pThioHisC-GO) (融合表达) 中, 乙醇酸氧化酶和硫氧还蛋白-乙醇酸氧化酶融合蛋白都没有看到明显的表达。文献中报道将乙醇酸氧化酶和 β -半乳糖苷酶融合表达以及用温度诱导启动子 λP_L 诱导乙醇酸氧化酶的表达水平都非常低^[2]。本研究的结果也支持了这一点。*E. coli* BL21 (DE3) (pTIG-Trx-GO) 经过诱导后表达的乙醇酸氧化酶可以达到总蛋白含量的 29%, 但是主要是以不可溶的包涵体形式存在。这说明硫氧还蛋白对乙醇酸氧化酶没有助溶和促进折叠的作用, 而且硫氧还蛋白也可能不适合作为与该酶融合的配体。只有在分泌表达系统中, 我们检测到了较高的乙醇酸氧

化酶活性。其中活性部分来自周质, 而在胞内基本是包涵体。通过对菠菜乙醇酸氧化酶氨基酸序列的研究发现, 该序列中编码大肠杆菌 Arg 稀有碱基密码子 AGA 和 AGG (共 12 个) 和 Pro 稀有碱基密码子 CCC (3 个) 共占 1.355%, 特别是 AGG 和 AGA, 其 tRNA 在大肠杆菌中的含量是最低的。本研究的结果表明密码子的偏好性对菠菜乙醇酸氧化酶在大肠杆菌中的表达影响并不大。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Clagett C O, Tolbert N E, Burriss R H. Oxidation of α -hydroxy acids by enzymes from plants. *J Biol Chem*, 1949, **181**: 905 ~ 914
- [2] Macheroux P, Mulrooney S B, Williams C H Jr et al. Direct expression of active spinach glycolate oxidase in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, **1132**: 11 ~ 16
- [3] Macheroux P, Massey V, Thiele D J. Expression of spinach glycolate oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*: purification and characterization. *Biochemistry*, 1991, **30**: 4612 ~ 4619
- [4] Anton D, Dicosomo R et al. Glycolate oxidase production. WO95/01444, 12 Jan 1995
- [5] Gellissen G, Piontek M, Dahlems U et al. Recombinant *Hansenula polymorpha* as a biocatalyst: coexpression of the spinach glycolate oxidase (GO) and the *S. cerevisiae* catalase T (CTT1) gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**: 46 ~ 54
- [6] Payne M S, Petrillo K L, Gavagan J E et al. Engineering *Pichia pastoris* for biocatalysis: co-production of two active enzymes. *Gene*, 1997, **194**: 179 ~ 182
- [7] Garagan J E, Fager S K, Seip J et al. Glyoxylic Acid Production Using Microbial Transformant Catalysts. *J Org Chem*, 1995, **60** (13): 3957 ~ 3963
- [8] Ausubel F M. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed, John Wiley & Sons, Inc, 1995
- [9] Lord M J, Merrett M J. Glycolate oxidase in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta*, 1968, **159**: 543 ~ 544
- [10] Volokita M, Somerville R C. The primary structure of spinach glycolate oxidase from the DNA sequence of a cDNA clone. *J Biol Chem*, 1987, **262** (33): 15825 ~ 15828
- [11] Lindqvist Y. Refined structure of spinach glycolate oxidase at 2 Å resolution. *J Mol Biol*, 1989, **209**: 151 ~ 166

Cloning and Expression of Spinach Glycolate Oxidase in *Escherichia coli*

JIN Jian-Feng¹ TAN Tian-Wei^{1*} SU Guo-Fu²

¹(Department of Biochemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

²(Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract The cDNA coding spinach glycolate oxidase (GO) was amplified by RT-PCR using the total RNA of spinach leaves as the template, and was cloned into cloning vector pMD18-T. After the DNA sequence was determined, the *go* gene was sub-cloned into *E. coli* expression vector pBV220, pET-22b(+), pTIG-Trx and pThioHisC. SDS-PAGE analysis revealed that the recombinant *E. coli* BL21 (DE3) (pTIG-Trx-GO) and *E. coli* BL21 (DE3) (pET-22b(+)-GO) expressed the predicted 38 kD glycolate oxidase, and the enzyme activity was also detected.

Key words glycolate oxidase, cloning and expression