

共转化大肠杆菌 *hemA* 和 *hemL* 基因增强小麦过氧化物酶 WP1 在原核系统中的功能性表达

张超¹, 单丽伟², 苏帅坤¹, 南艳妮¹, 郭忠玉¹, 范三红¹

1 西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100

张超, 单丽伟, 苏帅坤, 等. 共转化大肠杆菌 *hemA* 和 *hemL* 基因增强小麦过氧化物酶 WP1 在原核系统中的功能性表达. 生物工程学报, 2012, 28(7): 865-876.

Zhang C, Shan LW, Su SK, et al. Enhancement of functional expression of wheat peroxidase WP1 in prokaryotic system by co-transforming with *hemA* and *hemL* of *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 865-876.

摘要: 小麦种子过氧化物酶 WP1 属于含血红素的植物 III 型过氧化物酶, 该酶不仅具有抗真菌活性, 而且影响面粉加工品质。为提高 WP1 在大肠杆菌中的功能性表达, 构建了用于提高大肠杆菌内源血红素合成, 包含 *hemA* 和 *hemL* 基因的重组质粒 pACYC-A-L, 将其分别与包含 *WPI* 基因的分泌型和非分泌型表达载体 pMAL-p4x-WP1 与 pET21a-MBP-WP1 共同转化大肠杆菌 T7 Express 菌株; 利用直链淀粉 (Amylose) 亲和层析柱纯化获得 MBP-WP1 融合蛋白, 并以 2,2'-联氮-二 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 为底物检测重组 WP1 的催化能力。结果表明, 含 pACYC-A-L 的宿主菌 28 °C 诱导 12 h 后, 培养液中 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 含量可达 146.73 mg/L, 卟啉类物质含量也显著上升。共转化 pACYC-A-L 和 pMAL-p4x-WP1 比单独转化 pET21a-MBP-WP1 获得的重组 WP1 的比活力提高 14.6 倍。该研究不仅成功地增强了小麦 WP1 在大肠杆菌中的功能性表达, 同时为其他具有重要生物学功能并含血红素辅基蛋白的功能性表达提供了有益参考。

关键词: 小麦过氧化物酶 1, 原核表达, 谷氨酰 tRNA 还原酶, 谷氨酸半醛变位酶, 血红素, 二硫键

Received: November 23, 2011; **Accepted:** February 28, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30300222), Program for Innovative Experiment of Northwest A&F University.

Corresponding author: Sanhong Fan. Tel: +86-29-87092262; E-mail: shfan@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30300222), 西北农林科技大学创新性实验计划重点项目资助。

Enhancement of functional expression of wheat peroxidase WP1 in prokaryotic system by co-transforming with *hemA* and *hemL* of *Esheria coli*

Chao Zhang¹, Liwei Shan², Shuaikun Su¹, Yanni Nan¹, Zhongyu Guo¹, and Sanhong Fan¹

¹ College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Wheat grain peroxidase 1 (WP1) belonged to class III plant peroxidase with cofactor heme, which not only has antifungal activity, but also influences the processing quality of flour. In order to enhance functional expression of WP1 in prokaryotic system by increasing endogenous heme synthesis, we constructed a recombinant plasmid pACYC-A-L containing *hemA* and *hemL* of *Esheria coli*. Then, we co-transformed it into host strain T7 Express with secretive expression vector (pMAL-p4x-WP1) or non-secretive expression vector (pET21a-MBP-WP1), respectively. The MBP-WP1 fusion protein was further purified by amylose affinity chromatography and its peroxidase activity was assayed using 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) as substrate. At 12 h after induction at 28 degree, the extracellular 5-aminolevulinic acid (5-ALA) production of T7 Express/pACYC-A-L was up to 146.73 mg/L, simultaneously the extracellular porphyrins also increased dramatically. The peroxidase activity of functional MBP-WP1 obtained from T7 Express/ (pACYC-A-L + pMAL-p4x-WP1) was 14.6-folds of that purified from T7 Express/ pET21a-MBP-WP1. This study not only successfully enhanced functional expression of wheat peroxidase 1 in *Esheria coli*, but also provided beneficial references for other important proteins with cofactor heme.

Keywords: wheat peroxidase 1, prokaryotic expression, *hemA*, *hemL*, heme, disulfide bond

过氧化物酶广泛存在于植物界, 它们参与植物激素代谢、细胞延伸、木质素和软木脂形成、细胞壁组分交联及逆境响应等重要生理及发育过程^[1]。同时, 植物过氧化物酶也作为重要的商品酶应用于生物催化、临床检测和生物技术研究等领域^[2-3]。小麦种子过氧化物酶 1 (Wheat peroxidase 1, WP1) 属于含血红素的III型植物过氧化物酶, 其以 H₂O₂ 为电子受体催化多种芳香族化合物的氧化。该酶具有抗真菌活性, 可抑制病原真菌芽管的伸长^[4]; 同时该酶的存在对面粉加工性能有重要影响^[5-8]。利用大肠杆菌系统表达植物过氧化物酶已有一些报道, 如辣根过氧化物酶 HRP C、芜菁根过氧化物酶 BnPA、烟草阴

离子过氧化物酶 TOP、杨树细胞壁阳离子过氧化物酶 CWPO_C^[9-12], 但重组蛋白均主要以包涵体的形式存在, 只有经过变性复性才能获得具有部分活性的酶蛋白。本研究组曾尝试利用大肠杆菌系统表达 WP1, 虽然通过融合麦芽糖结合蛋白 (MBP) 标签实现了重组 WP1 的可溶性表达, 但仍只能检测到微弱的过氧化物酶活性^[13-14]。导致上述结果可能有两个原因: 一是大肠杆菌血红素合成量不能满足需求, 导致大部分蛋白以脱辅基形式存在; 二是肽链不能正确折叠, 二硫键不能正确形成, 导致目标蛋白以包涵体形式存在。

关于增加大肠杆菌菌体内血红素的累积已有很多报道, 根据原理可分为两种策略。第一种

策略通过外加血红素、提高血红素转运能力实现胞内血红素的累积。1994年 Rosenthal 研究组在培养基中加入外源血红素,发现血红素具有一定的穿透性,但不同的菌种有差异, JM109 菌株具有较好的穿透性^[15]。2004年, Varnado 研究组,将大肠杆菌血红素转运基因 *ChuA* 和过氧化氢酶基因 *kat* 共表达,在外加血红素的条件下,实现了过氧化氢酶在大肠杆菌中的大规模表达^[16]。2008年, Graves 等将类志贺邻单胞菌 *Plesiomonas shigelloides* 中血红素转运相关基因 *hugA*、*hugB*、*hugC/D* 与血红蛋白基因共表达,在外加血红素的条件下,全蛋白的表达显著增加^[17]。第二种策略则是通过过量表达血红素合成途径中限速酶的基因实现内源血红素的累积。2006年,何晓梅等将面包酵母 5-氨基酮戊酸合酶 (ALAS) 的基因导入大肠杆菌,促进了大肠杆菌中血红素的累积,且胞外浓度高于胞内浓度^[18]。2006年,王俊卿等将类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* A1AS 的基因导入大肠杆菌,导致血红素前体 5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 在大肠杆菌中累积,但其表达受 C4 合成途径前体甘氨酸的限制,需要在培养基中外加 20 mmol/L 的甘氨酸^[19]。2010年, Sudhamsu 等将亚铁螯合酶基因 (*FC*) 和芽胞杆菌一氧化氮合成酶基因 (*gsNOS*) 共表达,在外加 25 mg/L 5-ALA 条件下,促进了完整的血红蛋白的形成,从而达到提高含血红素辅基蛋白酶活力的目的^[20]。但这些报道中大多使用了外源的血红素转运或合成相关基因,而且需要外加血红素或者血红素合成的前体物质 (5-ALA 或甘氨酸)。

大肠杆菌血红素合成采用 C5 途径,以谷氨酰 tRNA 为前体,经过 7 个中间产物最终形成血

红素。该合成途径的第一步,即由谷氨酰 tRNA 合成 5-ALA 的反应是限速步骤,该步骤由 *hemA* 和 *hemL* 基因编码的谷氨酰 tRNA 还原酶 (GluTR, HemA) 和谷氨酸半醛变位酶 (GSAM, HemL) 催化^[21]。本研究拟过表达大肠杆菌自身的 *hemA* 和 *hemL* 基因,提高细胞内血红素含量,并在此基础上导入小麦过氧化物酶基因 *WPI*,增强 *WPI* 在原核系统中的功能性表达。该研究不仅有利于 *WPI* 的深入研究与利用,也为其他植物 III 型过氧化物酶超家族成员的活性表达和功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 Turbo、T7 Express 为 NEB 公司产品, OrigamiTM B (DE3) 为 Novagen 公司产品;克隆载体 pMD[®]19-T 购自 TaKaRa 公司,双基因共表达载体 pACYCDuet-1 为 Novagen 公司产品;包含小麦过氧化物酶基因 *WPI* 的 MBP 融合表达载体 pET21a-MBP-*WPI* 和 pMAL-p4x-*WPI* 由本实验室保存。

1.1.2 工具酶和试剂

PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;质粒 DNA 小量试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;限制性内切酶 *Nco* I、*Bam*H I、*Nde* I、*Xho* I 和 *Not* I, Amylose resin、2-Log DNA Ladder、protein marker 均为 NEB 公司产品;2,2'-联氮-二 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 和氨基乙酸丙酸盐 (5-ALA·HCl) 购自 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *hemA* 和 *hemL* 基因的克隆

利用细菌基因组 DNA 小量制备法^[22], 从大肠杆菌中提取其基因组 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳及分光光度法检测 (EVOLUTION 300, Thermo) 基因组 DNA 的完整性和质量。参考 GenBank 中大肠杆菌 K12 基因组序列 (Accession No. NC_010473) 设计用于 *hemA* 和 *hemL* 基因扩增的特异性引物, 具体序列见表 1, 其中下划线代表的酶切位点依次为 *Nco* I、*Bam*H I、*Nde* I、*Xho* I, 框选部分代表 *hemL* 中的 *Nde* I 突变位点。以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 使用特异引物 *hemA*-f 和 *hemA*-r 通过 PCR 扩增获得 *hemA*; 为了将 *hemL* 基因中 *Nde* I 切点进行同义突变, 通过两步 PCR 法获得 *hemL*, 以 *hemL*-f 和 *hemL*-mr 为引物扩增获得的片段为 *hemL*₁, 以 *hemL*-mf 和 *hemL*-r 为引物扩增获得的片段为 *hemL*₂; 最后以回收的 *hemL*₁ 和 *hemL*₂ 为模板, *hemL*-f 和 *hemL*-r 为引物扩增获得全长 *hemL*。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带, 纯化产物连接到 pMD[®]19-T 载体上, 将重组质粒转入大肠杆菌菌株 Turbo 感受态细

胞中, 筛选阳性克隆, 重组质粒命名为 pMD[®]19-T-A, pMD[®]19-T-L, 送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.2.2 重组质粒的构建

pMD[®]19-T-A 经 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切获得的 *hemA* 片段与用相同酶切的 pACYCDuet-1 连接, 获得的重组质粒命名为 pACYC-A; pMD[®]19-T-L 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切获得的 *hemL* 片段与用相同酶切的 pACYCDuet-1 连接, 获得的重组质粒命名为 pACYC-L。pACYC-L 经 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切获得的 *hemL* 片段插入经相同酶切的 pACYC-A 载体, 获得重组质粒命名为 pACYC-A-L。

1.2.3 HemA 和 HemL 蛋白在大肠杆菌中的表达

分别将已构建好的 3 种重组质粒 pACYC-A、pACYC-L 及 pACYC-A-L 转入大肠杆菌 T7 Express 感受态细胞, 将阳性单克隆接种于含抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 按 1:100 的比例接种到 50 mL 的 LB 培养基中, 培养至对数期 ($OD=0.4\sim0.6$), 加入 IPTG (终浓度为 0.5 mmol/L), 28 °C 诱导 6 h 后, 收集菌体。用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 重悬菌体, 超

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer name	Primer sequences (5'-3')
<i>hemA</i>	<i>hemA</i> -f	TAT <u>ACCATGGCT</u> ACCCTTTTAGCACTCGGTATC
	<i>hemA</i> -r	ATT <u>CGGATCC</u> CTACTCCAGCCCGAGGCTGTCTG
<i>hemL</i>	<i>hemL</i> -f	TATACATATGAGTAAGTCTGAAAATCTTTACA
	<i>hemL</i> -r	CAGACTCGAGTCACTCGCAAACACCCG
	<i>hemL</i> -mf	TAAGCGTTTCTTCCACATGATGCTGGACGAA
	<i>hemL</i> -mr	TCCAGCATCATGTGGAAGAAACGCTTAAAGCG

The underlined nucleotides indicate creation of a restriction site.

声波破碎细胞, 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min。使用 15% SDS-PAGE 检测总蛋白和裂解后的菌液上清。

1.2.4 5-ALA 含量的测定

参考 Mauzerall 的方法^[23]测定培养液中 5-ALA 的含量。对照菌 (T7 Express/pACYCDuet-1) 及重组菌 (T7 Express/pACYC-A、T7 Express/pACYC-L 和 T7 Express/pACYC-A-L) 28 °C 诱导培养, 在 6、8、10、12 h 分别取 2 mL 培养液, 向离心后的上清中加入 0.5 mL 乙酰丙酮和 1 mL 的 2 mol/L 的乙酸钠缓冲液 (pH 4.6), 沸水浴 15 min, 冷却至室温后, 加入埃利希氏 (Ehrlich's) 显色剂^[24], 显色 30 min, 用分光光度计检测 554 nm 光吸收。以 5-ALA·HCl 为标准品绘制标准曲线, 根据标准曲线计算 5-ALA 的含量。

1.2.5 卟啉类物质的定性检测

卟啉类化合物的测定参考临床化学诊断方法大全一书^[25]。取 15 mL 诱导后菌液上清和 5 mL 冰乙酸: 乙酸乙酯 (HAc-EtAc, 1 : 4) 于离心管中, 剧烈振荡离心至有机相与水相分离, 小心地将有机相吸出, 移至另一试管, 加入 3 mol/L HCl 2.5 mL, 剧烈振荡, 卟啉类物质被抽提到下面的盐酸层。将抽提液进行波长扫描 (350~800 nm), 记录数据。

1.2.6 融合蛋白的表达与纯化

将包含 *WPI* 基因的两种融合表达载体 pMAL-p4x-WPI 和 pET21a-MBP-WPI 分别与 pACYC-A-L 共转入大肠杆菌 T7 Express 感受态细胞, 同时, 将两载体单转入该菌株, 作为对照组。利用含有氨苄青霉素 (50 µg/mL) 和氯霉素 (34 µg/mL) 两种抗生素的 LB 平板筛选同时包含两种质粒的阳性菌株, 其中 pMAL-p4x-WPI 和

pET21a-MBP-WPI 为氨苄抗性, pACYC-A-L 为氯霉素抗性。蛋白表达具体过程参见 1.2.3, 收集到的菌体用低盐缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA (pH 8.0) 重悬, 超声波破碎细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min。将离心后的上清液载入 Amylose 亲和层析柱, 依次用 20 倍柱体积低盐缓冲液, 30 倍柱体积高盐缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)), 20 倍柱体积低盐缓冲液洗柱, 最后用洗脱缓冲液 (含 5 g/L 麦芽糖的低盐缓冲液), 获得 MBP-WPI 融合蛋白。然后用 15% SDS-PAGE 检测总蛋白和纯化后的蛋白, 并通过考马斯亮蓝 G-250 显色与标准蛋白曲线比较, 计算纯化的 MBP-WPI 浓度。

1.2.7 融合蛋白 MBP-WPI 的活性检测

以 ABTS 为底物, 检测融合蛋白 MBP-WPI 的过氧化物酶活性^[26]: 在 25 °C, 将纯化到的 MBP-WPI 加入到 1 mL 反应体系中, 使其终浓度为 0.01 g/L, 体系包括 2.5 mmol/L ABTS、2 mmol/L H₂O₂、5 mmol/L CaCl₂、50 mmol/L pH 5.0 的 HAc-NaAc。使用紫外可见分光光度计检测反应产物在 405 nm 的光吸收。

2 结果与分析

2.1 *hemA* 和 *hemL* 基因的扩增

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 使用特异引物 *hemA*-f 和 *hemA*-r 扩增获得 *hemA* 基因片段, 扩增结果见图 1 (泳道 1), 与预期大小 1 257 bp 相当。因后续克隆过程中要使用内切酶 *Nde* I, 因而在扩增 *hemL* 基因时, 通过两步 PCR 法将基因内部的 *Nde* I 切点进行了同义突变

(T₁₁₅₂/C₁₁₅₂)。hemL-f 和 hemL-mr 扩增片段 *hemL*₁ (1 163 bp)、hemL-mf 和 hemL-r 扩增片段 *hemL*₂ (115 bp) 及两者重叠延伸获得的全长 *hemL* (1 278 bp) 如图 1 中 3、4 和 2 泳道所示。扩增片段连接到 pMD[®]19-T 载体, 测序结果显示克隆的序列与设计完全一致。

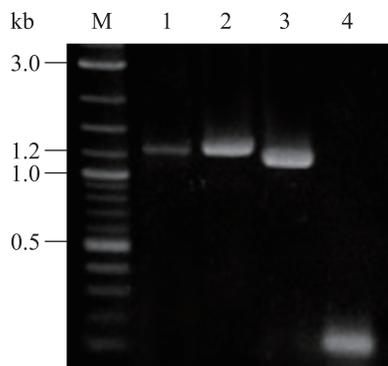


图 1 大肠杆菌 *hemA*、*hemL* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 Amplification of *hemA* and *hemL* of *E. coli* by PCR. M: 2-Log DNA ladder; 1: *hemA* gene; 2: *hemL* gene; 3: *hemL*₁; 4: *hemL*₂.

2.2 包含 *hemA* 和 *hemL* 表达载体的构建

将 *hemA*、*hemL* 分别连入表达载体

pACYCDuet-1 获得重组载体 pACYC-A 和 pACYC-L; pACYC-L 经 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切获得 *hemL* 片段, 将其连入经相同酶切的 pACYC-A 获得双基因重组载体 pACYC-A-L, 三者结构如图 2A 所示。3 种重组载体双酶切鉴定结果如图 2B 所示, pACYC-A 和 pACYC-L 双酶切后均获得两个条带, 一条是与对照 (泳道 1) 一致的空载体, 另一条则是与预期一致的目的基因。重组载体 pACYC-A-L 经 *Not* I、*Xho* I 双酶切获得与预期大小一致的两个条带。酶切验证后的载体进一步进行测序验证, 确证无误后用于后续实验。

2.3 HemA 和 HemL 在大肠杆菌中的诱导表达

将构建好的重组质粒 pACYC-A、pACYC-L 和 pACYC-A-L, 分别转入大肠杆菌 T7 Express 感受态细胞, 28 °C 诱导后的菌体总蛋白和可溶性蛋白的 SDS-PAGE 分析结果如图 3 所示。从电泳图中可看出, HemA 和 HemL 均获得高效过量表达, 且目的蛋白均以可溶性形式存在。单独过量

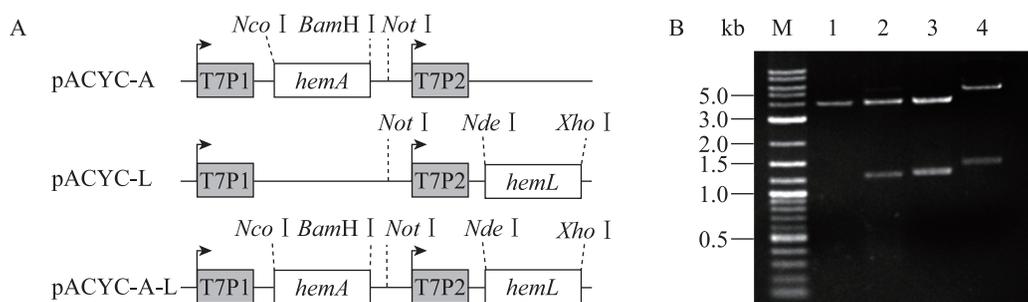


图 2 重组质粒示意图及载体酶切鉴定结果

Fig. 2 Construction and confirmation of recombination vectors. (A) Diagram of recombination vectors. (B) Confirmation of recombination vectors by double digestion. M: 2-Log DNA ladder; 1: pACYCDuet-1 digested with *Nco* I and *Bam*H I; 2: pACYC-A digested with *Nco* I and *Bam*H I; 3: pACYC-L digested with *Nde* I and *Xho* I; 4: pACYC-A-L digested with *Not* I and *Xho* I.

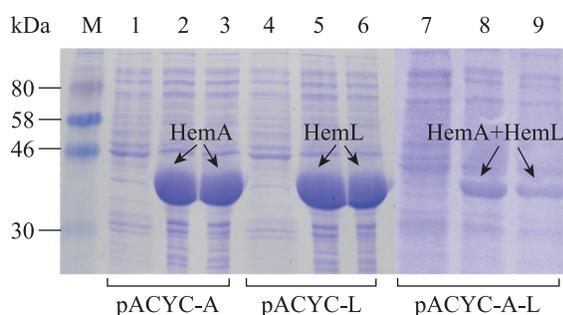


图3 SDS-PAGE 分析 HemA 和 HemL 在大肠杆菌中的过量表达

Fig. 3 Over-expression of HemA and HemL in *E. coli* analyzed by SDS-PAGE. 1–3: protein of T7 Express/pACYC-A; 4–6: protein of T7 Express/pACYC-L; 7–9: protein of T7 Express/pACYC-A-L; M: protein marker; 1,4,7: un-induced control; 2,5,8: total protein after inducing; 3,6,9: soluble protein after inducing.

表达 HemA 或 HemL 时,目的蛋白的表达量可达菌体总蛋白的 50% 以上;而同时过量表达 HemA 和 HemL, 目的蛋白的表达量则仅占菌体总蛋白的 20% 左右。这可能是由于两蛋白同时过表达会导致血红素合成途径中间产物的过量累积,而这些物质的累积影响了宿主菌的生长和蛋白合成。另外需要说明的是,*hemA* 和 *hemL* 基因长度仅差 21 bp, 表达的蛋白相差不到 1 kDa, 15% 的 SDS-PAGE 不能很好地将它们分离,因此,共表达时只能看到一条重叠的蛋白条带。

2.4 5-ALA 含量的测定

对照菌 (T7 Express/pACYCDuet-1) 及重组菌 (T7 Express/pACYC-A、T7 Express/pACYC-L 和 T7 Express/pACYC-A-L) 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导不同时间后,分别对它们离心后的培养液中的 5-ALA 含量进行测定,结果见图 4。由图知:诱导 12 h 后, T7 Express/pACYC-A-L 培养液中 5-ALA 含量高达 146.73 mg/L, 对照菌中仅为

7.27 mg/L, 而 T7 Express/pACYC-A 和 T7 Express/pACYC-L 培养液中的 5-ALA 含量分别为: 9.67 mg/L、9.54 mg/L。虽然, T7 Express/pACYC-A 和 T7 Express/pACYC-L 相比于对照菌培养液中的 5-ALA 的含量略有增加,但远远低于重组菌 T7 Express/pACYC-A-L, 说明 HemA、HemL 同时表达要比它们单独表达更利于大肠杆菌 5-ALA 的合成,为血红素合成提供更多的前体。

2.5 卟啉类物质定性检测

重组菌 T7 Express/pACYC-A-L 通过 0.5 mmol/L IPTG, 28 °C 诱导后,菌体和培养液均呈淡粉红色,而对照菌 T7 Express/pACYCDuet-1 无此现象。Piao 等报道^[27],尿卟啉原是无色的,但它氧化产生的卟啉类物质在 400~405 nm 处有光吸收,因而可以利用 400~405 nm 的光吸收判断培养液中卟啉类化合物的含量。波长扫描结果 (图 5) 发现重组菌 T7 Express/pACYC-A-L 的培养液在 403 nm 处有

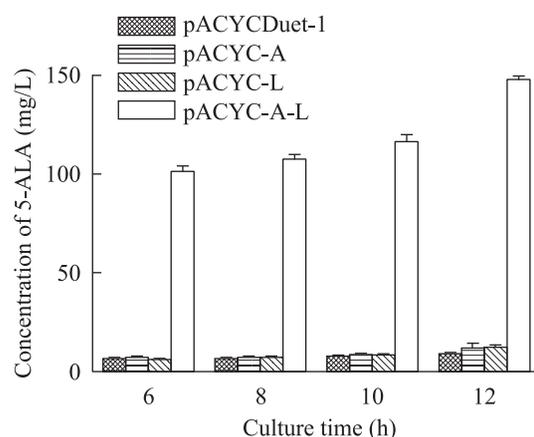


图4 重组菌和对照菌培养液中 5-ALA 的含量

Fig. 4 5-ALA concentration of the culture solution of the recombinant strain and comparative strain.

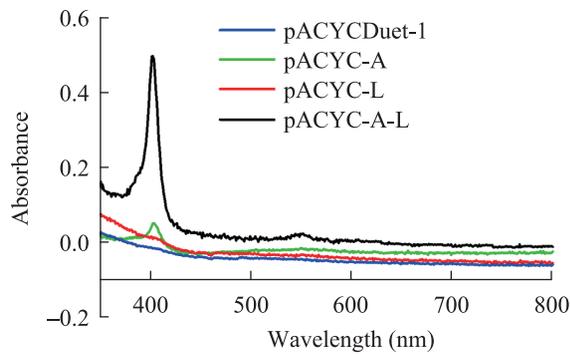


图5 重组菌与对照菌培养液提取物光吸收扫描

Fig. 5 Wavelength scan of the culture extraction of the recombinant strain and comparative strain.

明显的光吸收，吸收值达 0.50，重组菌 T7 Express/pACYC-A 的培养液也有微弱的光吸收，而对照菌 T7 Express/pACYCDuet-1 和重组菌 T7 Express/pACYC-L 则没有明显的光吸收。此结果与 5-ALA 含量的测定结果相吻合，说明 5-ALA 含量越高，则卟啉类化合物含量也越高。

2.6 融合蛋白的表达与纯化

将融合表达载体 pMAL-p4x-WP1 和 pET21a-MBP-WP1 分别与重组载体 pACYC-A-L 共同转入大肠杆菌 T7 Express 感受态细胞进行诱导表达，同时分别将它们单独转入此菌株，作为对照。各种重组菌的菌体总蛋白、可溶性蛋白及从中纯化获得的 MBP-WP1 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析结果如图 6A 和 6B 所示。从图 6A 可以看到，融合表达载体 pMAL-p4x-WP1 与重组载体 pACYC-A-L 共转入 T7 Express 后，MBP-WP1 部分以可溶性蛋白形式存在，但是表达量比 pMAL-p4x-WP1 单转受体菌低；从图 6B 可以看出，pET21a-MBP-WP1 与 pACYC-A-L 共转后，MBP-WP1 的表达量同样低于其单转受体菌，而且蛋白可溶性下降。共转化菌株中 MBP-WP1 表达量的下降可能是其与 HemA 和 HemL 竞争菌体内蛋白合成资源所致。

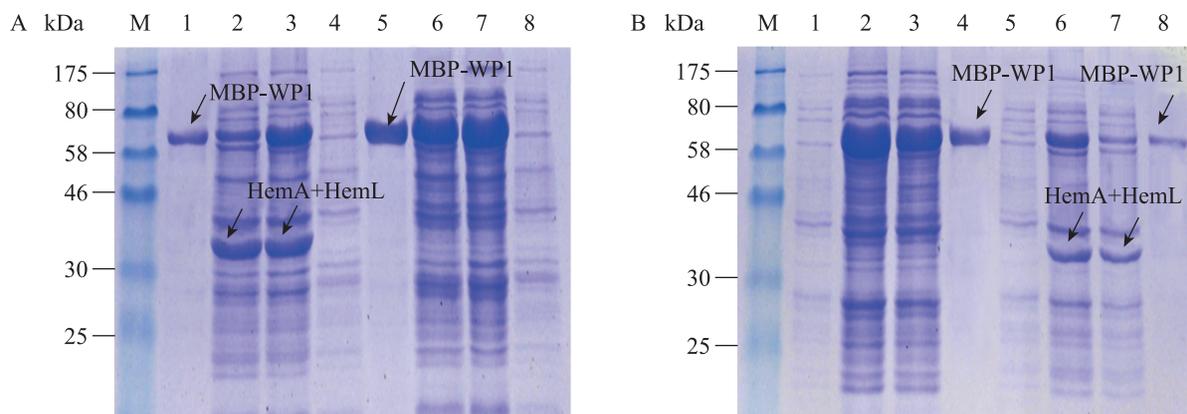


图6 MBP-WP1 融合蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 Expression and purification of fusion protein MBP-WP1 analyzed by SDS-PAGE. (A) Expression of MBP-WP1 in T7 Express/pMAL-p4x-WP1 (5-8) and T7 Express/(pMAL-p4x-WP1+pACYC-A-L) (1-4). M: protein marker; 4,8: un-induced control; 3,7: total protein after inducing; 2,6: soluble protein after inducing; 1,5: purified MBP-WP1. (B) Expression of MBP-WP1 in T7 Express/pET21a-MBP-WP1 (1-4) and T7 Express/ (pET21a-MBP-WP1+pACYC-A-L) (5-8). M: protein marker; 1,5: un-induced control; 2,6: total protein after inducing; 3,7: soluble protein after inducing; 4,8: purified MBP-WP1.

2.7 融合蛋白 MBP-WP1 的活性检测

以 ABTS 为底物测定融合蛋白 MBP-WP1 的过氧化物酶活性, 1 mL 的测活体系中 MBP-WP1 的终浓度为 0.01 g/L, 从不同菌株中分离纯化获得的融合蛋白的催化能力测定结果如图 7 所示。图中纵坐标为酶促反应速率, 用每分钟内反应液在 405 nm 吸光度值的变化量表示; 横坐标为利用不同表达体系纯化获得的 4 种融合蛋白。非分泌型表达载体 pET21a-MBP-WP1 单独转入大肠杆菌 T7 Express 获得的 MBP-WP1 融合蛋白的过氧化物酶活性与它和重组载体 pACYC-A-L 共转后 MBP-WP1 的活性相比, 几乎没有变化, 而同条件下分泌型表达载体 pMAL-p4x-WP1 与重组载体 pACYC-A-L 共转后 MBP-WP1 的活性是 pET21a-MBP-WP1 单独转化的 14.6 倍, 说明分泌表达和提高内源血红素含量均可增强重组 WP1 的活性表达。另外, 分泌表达有利于蛋白的

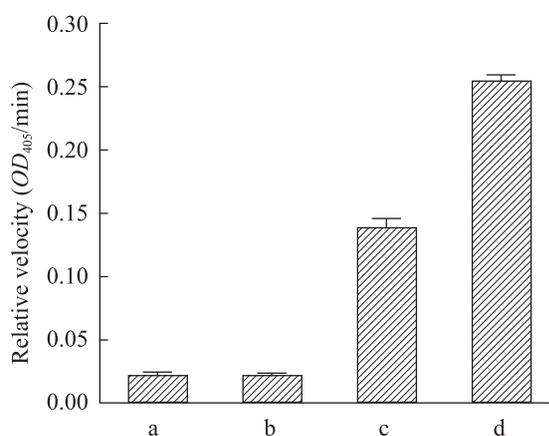


图 7 不同重组菌株 MBP-WP1 过氧化物酶活力比较
Fig. 7 Comparison of the peroxidase activity of MBP-WP1 from different recombinant strains. a: T7 Express/pET21a-MBP-WP1; b: T7 Express/(pET21a-MBP-WP1+pACYC-A-L); c: T7 Express/pMAL-p4x-WP1; d: T7 Express/(pMAL-p4x-WP1+ pACYC-A-L).

正确折叠和二硫键的正确形成, 如果蛋白不能正确折叠, 即便有充足的血红素, 重组 WP1 的活力也无明显变化。

3 讨论

WP1 是典型的植物 III 型分泌型过氧化物酶, 这类酶通常以单体形式存在, 包含 1 个血红素分子和 8 个保守的半胱氨酸残基, 因而血红素能否正确结合及二硫键能否正确形成是影响该蛋白在大肠杆菌系统中功能性表达的 2 个核心问题。大肠杆菌 *hemA* 和 *hemL* 基因分别编码 GluTR 和 GSAM, 它们催化了以谷氨酰 tRNA 为底物形成 5-ALA 的反应, 该反应是细菌血红素合成的限速步骤。本研究将单独包含 *hemA* 或 *hemL* 基因的重组质粒 pACYC-A 或 pACYC-L, 及同时包含两基因的重组质粒 pACYC-A-L 导入宿主菌, SDS-PAGE 分析结果显示三者均出现与预期大小一致的目标蛋白条带 (图 3), 由于 HemA 和 HemL 分子量非常接近, 无法判断导入 pACYC-A-L 后出现的目标条带是 HemA、HemL 或两者的重叠条带。但与分别导入 *hemA* 或 *hemL* 的菌株相比, 同时导入 *hemA* 和 *hemL* 后, 去除菌体后的培养液中 5-ALA 的含量远远高于前两者 (图 4), 因而可以推断, 导入 pACYC-A-L 后宿主菌中的 *hemA* 和 *hemL* 同时实现了过表达, 并可将其培养基中游离 5-ALA 的含量提高到 146.73 mg/L。5-ALA 累积并不代表血红素的累积, 为了进一步确认卟啉类化合物是否增加, 本研究测定了培养液在 403 nm 的光吸收。与对照菌株、导入 pACYC-A 或 pACYC-L 的菌株相比, 导入 pACYC-A-L 后菌落及培养液呈粉红色, 且

培养液中卟啉类物质大量累积,该结果与前面测定的不同菌株培养液中 5-ALA 的累积量一致。上述结果表明,同时过量表达 *hemA* 和 *hemL* 可显著提高大肠杆菌 5-ALA、血红素及其他卟啉类化合物的生物合成。

然而,充足的血红素并不能保证表达的蛋白一定具有生物学功能,肽链的正确折叠、二硫键的正确形成同样非常关键。二硫键未形成或错误形成都会导致这些蛋白积聚形成包涵体,或者导致蛋白结构松散而被降解^[28],而先前利用原核系统表达许多过氧化物酶时目标蛋白通常形成包涵体的现象便是最好的佐证。大肠杆菌胞质是高度还原的介质,不利于二硫键的形成和稳定;而外周质中包含促进二硫键形成的二硫键氧化还原酶(DsbA, DsbB, DsbC等)和促进肽链正确取向的肽酰脯氨酰顺反异构酶(PPIase),因而将胞质中不能正确折叠的富半胱氨酸残基蛋白分泌到外周质,则可获得部分或全部生物活性^[29-31]。本实验用到了包含 *WPI* 基因的分泌型表达载体 pMAL-p4x-WP1 和非分泌型表达载体 pET21a-MBP-WP1,由图 7 可知,利用分泌型载体获得的重组 WP1 的活力约为非分泌型载体的 7.5 倍。事实上也有商业化可增强细胞质中二硫键正确折叠的菌株,如 Novagen 公司的 OrigamiTM 系列菌株和 NEB 公司的 Shuffle[®] 系列菌株,这些菌株均可提高细胞质中二硫键的正确折叠。我们也曾将 pMAL-p4x-WP1 和 pET21a-MBP-WP1 导入 OrigamiTM B (DE3) 菌株,但获得的重组 WP1 的活力与 pMAL-p4x-WP1 导入常规的表达菌株 T7 Express 时相当。由于 WP1 和其他 III 型植物过氧化物酶均为分泌型蛋白,直接

将这类过氧化物酶分泌到外周质比使用商业化菌株更便捷。将 pACYC-A-L 与 pMAL-p4x-WP1 共转后,重组 WP1 的过氧化物酶活性是单独转化 pMAL-p4x-WP1 的 2 倍,是单独转化 pET21a-MBP-WP1 的 14.6 倍,说明通过过表达 *hemA* 和 *hemL* 增加内源血红素水平、通过分泌表达促进肽链正确折叠和二硫键正确形成均可提高 WP1 在原核系统中的功能性表达,而且两种效应可以叠加。将 pACYC-A-L 与非分泌型载体 pET21a-MBP-WP1 共转化宿主菌,获得的重组 WP1 的过氧化物酶活性与单独转化 pET21a-MBP-WP1 相比,活力没有明显的变化,说明即便有充足的血红素,如果蛋白不能正确折叠,则血红素不能正确结合,酶活性也无法提高。上述结果从正反两方面说明,血红素和酶蛋白的正确结合是 WP1 功能性表达的关键。

植物 III 型过氧化物酶家族成员众多,它们不仅在植物生长发育、逆境响应中发挥重要功能,而且在工业领域具有潜在应用价值,然而利用大肠杆菌表达该类酶时目标蛋白通常以无活性的包涵体形式存在。本研究在不外加血红素、5-ALA 或甘氨酸的条件下,通过过表达 *hemA* 和 *hemL* 提高胞内血红素水平、融合 MBP 增溶、分泌到外周质促进正确折叠等策略,实现了小麦种子过氧化物酶 WP1 的功能性表达,为 WP1 进一步的功能研究和开发利用奠定了基础。该研究为植物 III 型过氧化物酶在大肠杆菌中的表达提供了一个可行的方案,同时也为其他具有重要生物学功能的血红素辅基蛋白的活性表达提供了有益参考。

REFERENCES

- [1] Hiraga S, Sasaki K, Ito H, et al. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(5): 462–468.
- [2] Wallace G, Fry SC. Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 1999, 52(5): 769–773.
- [3] Regalado C, García-Almedárez BE, Duarte-Vázquez MA, et al. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev*, 2004, 3(1/2): 243–256.
- [4] Caruso C, Chilosi G, Leonardi L, et al. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry*, 2001, 58(5): 743–750.
- [5] Hosney RC, Faubion JM. A Mechanism for the oxidative gelation of wheat flour water-soluble pentosans. *Cereal Chem*, 1981, 58: 421–423.
- [6] Gélinas P, Poitras E, McKinnon CM, et al. Oxido-reductases and lipases as dough-bleaching agents. *Cereal Chem*, 1998, 75(6): 810–814.
- [7] Dunnewind B, van Vliet T, Orsel R. Effect of oxidative enzymes on bulk rheological properties of wheat flour doughs. *J Cereal Sci*, 2002, 36(3): 357–366.
- [8] Takasaki S, Kato Y, Murata M, et al. Effects of peroxidase and hydrogen peroxide on the dityrosine formation and the mixing characteristics of wheat-flour dough. *Biosci Biotech Bioch*, 2005, 69(9): 1686–1692.
- [9] Smith AT, Santama N, Dacey S, et al. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme. *J Biol Chem*, 1990, 265(22): 13335–13343.
- [10] Rodríguez-Cabrera NA, Regalado C, García Almedárez BE. Cloning, heterologous expression and properties of a recombinant active turnip peroxidase. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(13): 7120–7126.
- [11] Hushpulia DM, Savitski PA, Rojkova AM, et al. Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68(11): 1189–1194.
- [12] Pham le TM, Kim SJ, Song BK, et al. Optimized refolding and characterization of S-peroxidase (CWPO_C of *Populus alba*) expressed in *E. coli*. *Protein Expr Purif*, 2011, 80(2): 268–273.
- [13] Shan LW, Luo HX, Fan SH, et al. Cloning and expression of wheat peroxidase 1 (*WPI*) in *E. coli*. *J Northwest A&F Univ: Nat Sci Ed*, 2009, 37(3): 213–218.
单丽伟, 罗海霞, 范三红, 等. 小麦种子过氧化物酶基因 *WPI* 的克隆及在大肠杆菌中的表达. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(3): 213–218.
- [14] Shan LW, Tang RC, Liu SY, et al. Prokaryotic expression, purification and preparation of polyclonal antibody for wheat grain peroxidase *WPI* gene. *Chin J Biotech*, 2011, 27(1): 26–30.
单丽伟, 唐如春, 刘三阳, 等. 小麦种子过氧化物酶 *WPI* 基因的原核表达、纯化及多克隆抗体制备. 生物工程学报, 2011, 27(1): 26–30.
- [15] Rosenthal GJ, Gerber MJ. Method of stimulating hematopoiesis with hemoglobin: US, 5631219, 1997-05-20.
- [16] Varnado CL, Goodwin DC. System for the expression of recombinant hemoproteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2004, 35(1): 76–83.
- [17] Graves PE, Henderson DP, Horstman MJ, et al. Enhancing stability and expression of recombinant human hemoglobin in *E. coli*: progress in the development of a recombinant HBOC source. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784(10): 1471–1479.
- [18] He XM, Zhou J, Cheng Y, et al. Purification and production of the extracellular 5-aminolevulinic acid from recombinant *Escherichia coli* expressing yeast *ALAS*. *Chin J Biotech*, 2007, 23(3): 520–524.
何晓梅, 周静, 程郢, 等. 表达酿酒酵母 *ALAS* 的重组大肠杆菌胞外 5-氨基乙酰丙酸的产量和纯化. 生物工程学报, 2007, 23(3): 520–524.

- [19] Wang JQ, Zhang ZM. Effect of levulinic acid and precursors on synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Rhodobacter sphaeroides*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, 11(5): 611–613.
王俊卿, 张肇铭. 乙酰丙酸和前体物对 *Rhodobacter sphaeroides* 5-氨基乙酰丙酸合成的影响. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(5): 611–613.
- [20] Sudhamsu J, Kabir M, Airola MV, et al. Co-expression of ferrochelatase allows for complete heme incorporation into recombinant proteins produced in *E. coli*. *Protein Expr Purif*, 2010, 73(1): 78–82.
- [21] Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 474(2): 238–251.
- [22] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. *Short Protocols in Molecular Biology*. 5th ed. Beijing: Science Press, 2008: 55.
奥斯伯 FM, 布伦特 R, 金斯顿 RE. 精编分子生物学实验指南. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008: 55.
- [23] Mauzerall D, Granick S. The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem*, 1956, 219(1): 435–446.
- [24] Zhang LL. Separation and purification of 5-Aminolevulinic Acid from recombinant *E. coli* fermentation broth [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2010.
张露露. 重组大肠杆菌发酵液中 5-氨基乙酰丙酸的分离纯化 [D]. 浙江: 浙江大学, 2010.
- [25] Pesce AJ, Kaplan LA. *Methods in clinical Chemistry*, Beijing: Peking University Press, 1990: 1079–2065.
Pesce AJ, Kaplan LA. 临床化学诊断方法大全. 北京: 北京大学出版社, 1990: 1079–2065.
- [26] Dicko MH, Gruppen H, Hilhorst R, et al. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *FEBS J*, 2006, 273(10): 2293–2307.
- [27] Piao YZ, Kiatpapan P, Yamashita M, et al. Effects of expression of *hemA* and *hemB* genes on production of porphyrin in *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12): 7561–7566.
- [28] Schultz SC, Dalbadie-McFarland G, Neitzel JJ, et al. Stability of wild-type and mutant RTEM-1 β -lactamases: effect of the disulfide bond. *Proteins*, 1987, 2(4): 290–297.
- [29] Mössner E, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*, 1998, 7(5): 1233–1244.
- [30] Batisson I, Vartanian MD. Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa *in vitro*. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10582–10589.
- [31] Raina S, Missiakas D. Making and breaking disulfide bonds. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 179–202.