

杨 静, 吴 慧, 潘一展. 外源过氧化物酶在毕赤酵母中的优化表达[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 51–53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.012

外源过氧化物酶在毕赤酵母中的优化表达

杨 静, 吴 慧, 潘一展

(商丘学院风景园林学院, 河南商丘 476000)

摘要:为提高外源过氧化物酶基因在毕赤酵母中的表达量, 对甲醇毕赤酵母诱导表达培养基进行优化, 在培养基中添加 0.5 g/L 高铁血红素, 每 12 h 补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%, 待酵母生长量达到最大值时加入 0.5 mL/L 微量元素混合物。结果表明, 优化后培养基表达量是普通培养基的 10.6 倍, 研究为后期外源蛋白进入发酵罐生产提供了理论依据。

关键词:过氧化物酶基因; 毕赤酵母; 优化培养基; 血红素; 微量元素

中图分类号:Q814 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0051-02

近年来, 酶工程在生物技术领域得到很大发展, 过氧化物酶被应用于疾病诊断及治疗、农作物品种选育及病虫害防治、染料中脱色剂生产^[1]、有机物和聚合物合成^[2]、农业废弃物处理^[3]等领域。但是, 天然酶在开发和应用中受到一定限制。本研究采用基因重组技术生产酶, 研究外源萝卜过氧化物酶在甲醇毕赤酵母中的表达, 旨在探讨高表达量的优化培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 野生型毕赤酵母 GS115 (GS115) 及商丘学院风景园林学院实验室构建的转萝卜过氧化物酶基因 (*RsPrxl*) 型毕赤酵母 GS115 (GSRP25) 均由该实验室保存。

培养基 YPD、BMGY/BMMY 组成和配制参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 挑取菌株 GSRP25 在 YPD 上进行平板划线培养, 分离后, 挑取单菌落进行优化诱导培养。

1.2.2 转基因酵母的诱导表达培养 挑取 2 个 GSRP25 单菌落分别接种于 200 mL BMGY 培养基中, pH 值 7.4、26 ℃、0.5% 甲醇、225 r/min 条件下培养^[4]。待 $D_{600\text{nm}}$ 达到 2~3 时, 静置, 收集菌体分别重悬于 20 mL BMMY 中和含有 0.5 g/L 血红素^[5] 的 20 mL BMMY 中培养, 每 12 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%, 80~90 h 间酵母生长量达到最大值, 此刻向培养基中加入 0.5 mL/L 微量元素混合物 (0.5 g/L MgCl_2 , 30 g/L $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L CuCl_2 和 0.2 g/L H_2BO_3)^[6] 继续培养。

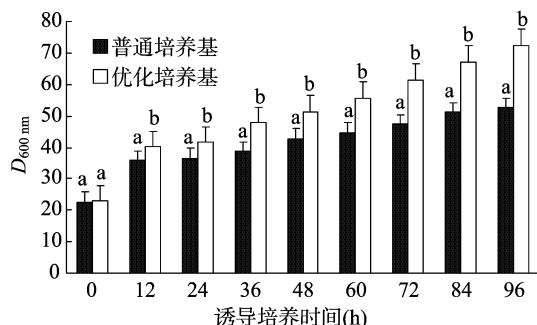
1.2.3 各项指标的测定 每 12 h 取 1 mL 菌液, 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 测 $D_{600\text{nm}}$; 采用愈创木酚法^[7]测过氧化物酶 (POD) 活性; 采用 Bradford 的微量法^[8]测定可溶性蛋白含量, 以牛血清白蛋白作标准曲线。

1.2.4 表达产物聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测 POD 同工酶活性电泳采用垂直板聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳方法, 凝胶采用 Lopes 等的方法^[9]制备, 电泳后 POD 用联苯胺染色^[10]。用天能 GIS-1000 凝胶成像和分析系统拍照分析。

2 结果与分析

2.1 不同诱导培养条件下菌体生长状态

$D_{600\text{nm}}$ 代表菌株生长速度, 由图 1 可知, 在 2 种培养条件下, $D_{600\text{nm}}$ 随时间的延长都有所增加, 说明酵母生长比较稳定; 但从 60 h 开始, 普通培养基培养的酵母生长速度缓慢, 而优化培养基培养的酵母生长速度开始加快; 96 h 取样检测发现, $D_{600\text{nm}}$ 达到 72.3, 比普通培养基培养的酵母增加了近 37%。



2个处理间不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

图1 不同诱导培养条件下菌体生长情况

2.2 POD 活性的变化

由图 2 可见, 优化培养基中 POD 的活性显著高于普通培养基。转基因酵母 GSRP25 在普通诱导培养基条件下, 随着培养时间延长, 外源 POD 的表达量增加不明显, 在培养 72 h 后趋于稳定。在优化后的诱导表达培养基培养下, 随着培养时间延长, 外源 POD 活性显著增加, 在培养 72 h 后也慢慢趋于稳定, 培养 96 h 酶活性达到最大值, 为 30.9 U/mL, 是普通

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (编号: 132102210158)。

作者简介: 杨 静 (1985—), 女, 河南商丘人, 硕士, 讲师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: yangjing7198@126.com。

通信作者: 潘一展, 教授, 从事植物生理学研究。E-mail: yzh1717@126.com。

BMMY 培养基酶活性的 5.9 倍;且在培养 12 h 时,酶活性为 4.7 U/mL,几乎达到普通培养基培养的最大酶活量,说明优化后的诱导表达培养基对酶活性的表达有显著提高作用。

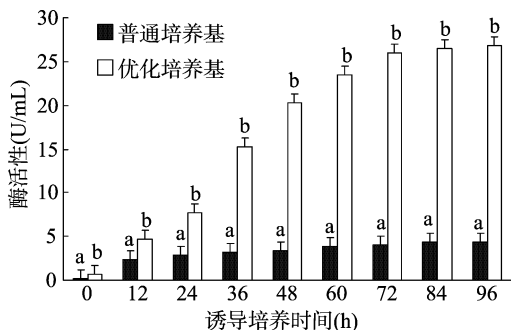


图2 不同培养基诱导表达 POD 活性变化

2.3 可溶性蛋白含量变化

巴斯德毕赤酵母作为外源基因表达的酵母宿主,自身分泌的蛋白非常少,外源 POD 的表达量可以用培养基上清中蛋白含量来衡量。由图 3 可知,在普通 BMMY 培养基条件下,外源蛋白的表达量很低,培养 96 h 后蛋白含量只有 0.018 g/mL;而优化 BMMY 培养基培养的外源蛋白表达量很高,培养 36 h 后蛋白含量迅速增加,培养 72 h 后蛋白表达量趋于稳定,培养 96 h 时蛋白表达量达到最大值,为 0.18 g/mL,约是普通 BMMY 培养基表达量的 10 倍。说明优化 BMMY 培养基显著提高了外源 POD 蛋白的表达量。

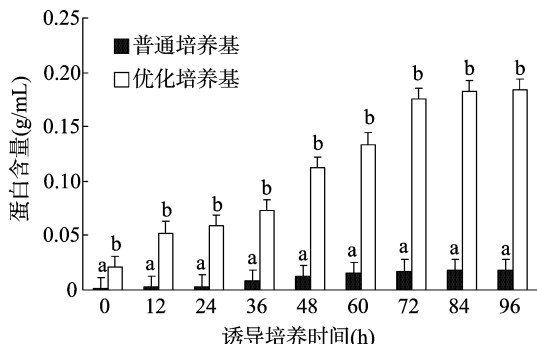
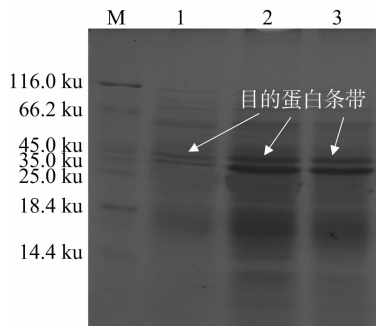


图3 不同培养基内可溶性蛋白含量的变化

2.4 SDS-PAGE 检测目的蛋白

已知目的蛋白的分子量约 37 ku,由图 4 可见,优化后培养基培养目的蛋白的条带比普通培养基培养的目的蛋白条带粗、颜色深,说明优化后的培养基诱导表达的蛋白量明显增多。



M—标准蛋白;1—普通培养基处理;2、3—优化后的培养基处理

图4 SDS-PAGE 蛋白电泳结果

3 结论与讨论

纵观近年来的文献报道,提高外源蛋白在巴斯德毕赤酵母中表达量主要有 2 种途径,一是优化诱导表达的时间、温度、pH 值、摇床转速、通氧量、添加微量元素等,如 RsPHGPx 在 1% 甲醇、pH 值 6.28 ℃ 条件下诱导 60 h 后得到最大表达量,产率约为 102 mg/L^[11]。本研究结果与文献报道一致,在 0.5% 甲醇、pH 值 7.4、26 ℃、通气面积 1.5 cm²、225 r/min 条件下,有利于萝卜过氧化物酶 RsPrx1 表达。二是结合外源目的蛋白自身的结构特点,利用适合外源蛋白合成的某些诱导剂可以提高重组蛋白的表达量^[12]。POD 蛋白分子的活性中心含 Fe(Ⅲ)-原卟啉 IX(血红素)辅基,只有在辅基存在的条件下,酶才被称为全酶,具有活性。所以血红素是组成 POD 分子的必需基团,在一定程度上增加血红素含量,有助于辅基卟啉含量的增加,从而促进 POD 合成。Gu 等报道,利用甲醇毕赤酵母 GS115 表达外源锰过氧化物酶时,在培养基中添加 0.5 g/L 血红素,锰过氧化物酶的表达量增加^[5]。有报道表明,在添加 0.5 g/L 高铁血红素的培养基中,锰过氧化物酶在曲霉菌中的表达量增加^[13]。Conesa 等研究证实,用曲霉菌表达锰过氧化物酶,在培养基中加入 0.5 g/L 血红素,过氧化物酶的产量达到 100 mg/L^[14]。以上研究为本研究中添加 0.5 g/L 高铁血红素提供一定的理论依据。另外,无机盐或矿物质元素在微生物生长过程中提供了各种重要元素,在配制酵母诱导表达培养基时添加必要的微量元素,有助于酵母生长。其中 Fe 是目的蛋白 POD 的分子成分,Na⁺ 维持渗透压,Mg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ 可以作为酶的激活剂^[15]。表达系统含有适量的 Mg²⁺、K⁺、NH₄⁺、Ca²⁺ 有利于降低蛋白质合成中的错读^[16]。因此在本研究中,在优化诱导培养基中添加了各种微量元素。结合以上理论依据,本研究从培养条件、培养基成分入手进行改良,结果表明,在 BMMY 培养基中添加 0.5% 甲醇、0.5 g/L 高铁血红素、0.5 mL/L 微量元素,获得的酶活性达 30.9 U/mL,是普通培养基的 5.9 倍,说明优化后的诱导表达培养基有效提高了外源蛋白的表达量。

参考文献:

- [1] An S Y, Min S K, Cha I H. Decolorization of triphenylmethane and azodyes by *Citrobacter* sp. [J]. *Biotech Lett*, 2002, 24(12): 1037-1040.
- [2] Lim Y H, An A S, Song B K. Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material [J]. *Biotech Lett*, 2003, 25(18): 1521-1524.
- [3] 赵红霞, 杨建军, 詹勇. 白腐真菌在秸秆作物资源开发中的研究 [J]. *饲料工业*, 2002, 23(11): 40-42.
- [4] 王一帆, 李芳军, 杨静, 等. 转萝卜过氧化物酶基因毕赤酵母株系培养条件的优化 [J]. *生物技术通报*, 2010(4): 203-206.
- [5] Gu L, Lajoie C, Kelly C. Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(5): 1403-1409.
- [6] Kristensen B K, Bloch H, Rasmussen S K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(2): 501-512.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 246-247.

唐会会,郑玉才,王鹏非,等. 牦牛 *PRDX5* 基因的克隆测序及其在牦牛与犏牛睾丸中的表达差异[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):53-56.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.013

牦牛 *PRDX5* 基因的克隆测序 及其在牦牛与犏牛睾丸中的表达差异

唐会会, 郑玉才, 王鹏非, 金素钰, 黄 林

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

摘要:测定牦牛 *PRDX5* 基因序列,并比较其在牦牛和雄性不育犏牛睾丸组织中的表达差异,以探究该基因与犏牛雄性不育的关系。从牦牛睾丸组织中提取总 RNA,采用 RT-PCR 技术克隆并测序获得牦牛 *PRDX5* 基因的 cDNA 序列;利用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测该基因在牦牛与犏牛睾丸组织中的表达情况。结果表明:克隆获得的牦牛 *Prdx5* 序列长 759 bp,包含长 660 bp 的 CDS 区,该序列与普通牛基因相差 4 个碱基,序列同源性和 99.47%,相差的 4 个核苷酸导致推导的氨基酸序列存在 3 个氨基酸残基差异;*Prdx5* 在牦牛和犏牛睾丸组织中均有表达,在牦牛睾丸组织中的表达量极显著高于犏牛($P < 0.01$),是犏牛睾丸组织中表达量的 6 倍,提示 *Prdx5* 在犏牛睾丸组织中低水平表达可能与其雄性不育有关。

关键词:牦牛;杂交雄性不育;*PRDX5* 基因;基因表达;睾丸

中图分类号: Q785;S823.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0053-04

过氧化物氧化还原酶(Peroxiredoxin, PRDX)家族是过氧化物酶超家族成员^[1],广泛分布于原核及真核生物体内^[2-3]。该家族蛋白利用其 N-端保守的 Cys 残基催化还原细胞内活性氧(ROS),从而保护细胞免受内外界环境中氧化胁迫带来的损害,是一类巯基依赖性抗氧化蛋白酶^[3]。PRDX5 别称 AOEB166、PMP20、AOPP,是哺乳动物 Prx 家族中唯一的非典型 2-Cys Prx^[4],主要分布于细胞的线粒体、溶酶体、细胞质、细胞核中^[5-8]。该酶不仅在免疫调控^[9]、细胞凋亡^[10]、信号通路调节^[11]等方面发挥作用,其功能主要在于还原细胞内过量的 ROS。过量的 ROS 会引起细胞及组织损伤,对动物精子细胞更易造成损害,使精子细胞膜脂质过氧化、DNA 结构

破坏、凋亡加速,最终导致哺乳动物雄性不育^[12]。据估计,约 1/4 不育男性患者精液中 ROS 水平升高^[13-14]。PRDX5 能以高效的还原能力^[15]保护精子免受氧化胁迫损害,因此 *Prdx5* 水平偏低可能与哺乳动物雄性不育有关。

牦牛(*Bos grunniens*)是青藏高原特有牛种,其与普通牛(*Bos taurus*)的杂交后代(犏牛)表现出 F₁ 至 F₃ 代雄性不育,这极大限制了犏牛杂种优势的固定,是牦牛杂交改良的一大难题。目前,有关犏牛雄性不育分子机制研究的相关基因如 *b-Boule*^[16]、*Dmrt7*^[17]、*Sycp3*^[18]、*Fabp5*、*Fabp9*^[19]、*Piwil1*^[20]、*Bvh*^[21]、*Ldhe*^[22]等,主要涉及精子减数分裂阻滞、能量代谢、DNA 甲基化、转录调控等方面,但从睾丸过氧胁迫角度探究犏牛雄性不育的机制尚未见报道。对牦牛与犏牛睾丸组织蛋白质组学研究结果进行比较发现,牦牛睾丸 PRDX5 蛋白水平远高于犏牛(约 3.9 倍),过低的 PRDX5 蛋白水平可能会使犏牛睾丸组织遭受 ROS 氧化胁迫,影响精子的正常发生。本研究通过基因克隆的方法获得了牦牛 *PRDX5* 基因的完整编码区序列,并比较了牦牛与普通牛的基因序列及氨基酸序列;同时利用实时荧光定量 PCR 方法分析该基因在牦牛和犏牛

收稿日期:2015-06-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31240053)。

作者简介:唐会会(1995—),女,贵州六盘水人。E-mail:18224022329@163.com。

通信作者:黄 林,硕士,讲师,主要从事动物生物化学与分子遗传学研究。E-mail:huanglin200426@hotmail.com。

[8] Gazaryan I G, Lagrimini L M, Ashby G A, et al. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases[J]. The Biochemical Journal, 1996, 313(3): 841-847.

[9] Lopes T S, Hakkaert G J, Koerts B L, et al. Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Gene, 1991, 105(1): 83-90.

[10] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 58-61.

[11] 李 洋, 李 晖, 祝建波, 等. 重组萝卜磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶在毕赤酵母优化表达初步纯化与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(4): 54-59.

[12] 张 毅, 屈贤铭, 杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 464-468.

[13] Stewart P, Whitwam R E, Kersten P J, et al. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(3): 860-864.

[14] Conesa A, van den Hondel C A, Punt P J. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 3016-3023.

[15] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 82-86.

[16] 许崇利, 杨 梅, 许崇波. 大肠杆菌表达系统的影响因素[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(8): 66-68.