海藻糖合酶基因在毕赤酵母中的表达

王瑞明，李忠奎，王腾飞，刘红娟，李丕武
（齐鲁工业大学食品与生物工程学院，山东济南 250353）

摘要：首次构建来源于恶臭假单胞菌海藻糖合酶基因（AE015451.1）的真核表达载体，探索在毕赤酵母中的表达。PCR 扩增目的基因，经 EcoRⅠ/XbaⅠ双酶切后连接至同样双酶切的 pPICZaA 中，经 PCR 检测和序列测定准确后，通过电击法将重组质粒转入毕赤酵母 GS115 中，利用含 Zeocin 的 YPD 平板筛选到阳性转化子，提取阳性转化子基因组并利用特异性引物 PCR 得到一条与目的基因大小相同的条带，说明目的基因转入成功，诱导重组蛋白表达并用 SDS-PAGE 检测可见一条约 76 ku 与目的蛋白大小预测相符合的蛋白条带，最后 HPLC 检测重组蛋白可将麦芽糖特异转化为海藻糖，说明外源表达的海藻糖合酶具有一定酶活。通过 PCR、SDS-PAGE 和 HPLC 结果说明成功构建重组 pPICZaA-TreS 质粒并整合到巴斯德毕赤酵母的基因组上，且海藻糖合酶基因得到预期的表达并具有活性，为下一步研究奠定基础。

关键词：海藻糖；海藻糖合酶；毕赤酵母

文章篇号：1673-9078(2013)11-2575-2579

Expression of Trehalose Synthase in *Pichia pastoris*

WANG Rui-ming, LI Zhong-kui, WANG Teng-fei, LIU Hong-juan, LI Pi-wu
(Department of food and Biology Engineering, QILU university of technology, Jinan 250353, China)

Abstract: The expression vector was constructed from trehalose synthase (TreS) gene（AE015451.1）of *Pseudomonas putida* to express in *Pichia pastoris*. TreS gene was amplified by PCR and double digested by EcoRⅠ/XbaⅠ, then linked to the pPICZaA which digested with same enzymes. The gene was identified, sequenced and transformed into *pichia pastoris* GS115 by electroporation. Positive colonies harboring target genes were screened out by the YPD medium with Zeocin. The genome of positive colonies were extracted and a same size band with target gene was abtained by using PCR which illustrated target gene had successfully transferred to *Pichia pastoris*. SDS-PAGE and HPLC results showed that the recombinant enzyme had a molecular of 76 ku band which was consistent with the predicted molecular mass, and it had the ability to catalyze the conversion of maltose into trehalose. The recombinant pPICZaA-TreS plasmid successfully constructed and integrated into *Pichia pastoris* genome and expressed as expected.

Key words: trehalose; trehalose synthase; *Pichia pastoris*

海藻糖是由两分子葡萄糖以 1,1-糖苷键连接而成的非还原性双糖，化学式名为 a-D-吡喃葡糖基 a-D-吡喃葡糖苷，分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11}\cdot 2H_2O$，分子量 378.33，是细胞在不良环境下产生的一种重要的抗逆应激物。它不仅是能源和碳源的储备物，还能作为应急代谢物，赋予动物、植物和微生物等抵抗营养缺乏、高温、低温、干燥、高渗透压等恶劣环境的能力。由于它独特的理化性质和生物学特性，使得海藻糖在食品工业、医药工业、分子生物学等领域有着非常广泛的应用。海藻糖合酶不作用于葡萄糖、麦芽三糖、麦芽寡糖、蔗糖异麦芽糖等，能够通过转糖基作用特异性的将麦芽糖的 a-1,4 糖苷键转化为 a-1,1 糖苷键生成海藻糖，且不需要其他任何辅酶。该酶反应流程短，易调控，海藻糖产率高且不受底物麦芽糖浓度的影响，与其它海藻糖合酶相比优势在于只需要一种酶一步反应就能够获得海藻糖，且生产原料为更加廉价的麦芽糖，因此在工业化生产中有着良好的应用前景[1]。

虽然目前来源于 *Pseudomonas putida* S1，*Pseudomonas* sp.P8005，*Rhodococcus opacus* 等海藻糖合酶基因实现了在原核细胞中的表达，但在真核表达体系中目前只有来源于水生栖热菌 FL-03 的海藻糖合酶基因成功实现外源表达。因此本实验通过将来源于恶臭假单胞菌的海藻糖合酶基因克隆并在具有强启动子且存在翻译后修饰，适合外源基因高效诱导表达[2]的毕赤酵母中进行表达，并研究表达产物的相对生物活性，旨在探讨该来源海藻糖合酶基因重组菌高效表达的可行性，构建高产海藻糖合酶的基因工程菌株，进一步降低麦芽糖生产海藻糖的生产成本，为海藻糖

收稿日期：2013-07-09

基金项目：山东省科技发展计划（2011GGB01160）

作者简介：王瑞明（1962.06-），男，博士，教授，研究方向：微生物酶技术

的工业化生产提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

毕赤酵母 GS115，质粒 pPICZaA 购自 Invitrogen 公司，大肠杆菌 DH5a 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

T4DNA 连接酶，限制性内切酶 EcoR Ⅰ、Xba Ⅰ、BstX Ⅰ购于大连宝生物，引物 P1、引物 P2 委托上海生工合成。DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购于北京全式金生物技术公司。蛋白标准分子量购于大连宝生物。LB 培养基、YPD 培养基、BMGY 培养基、BMMY 培养基的配制均按照 Invitrogen 公司毕赤酵母表达手册进行。其他试剂为国产和进口分析纯试剂。

1.1.3 引物

根据本实验室已经克隆、测序得到的海藻糖合酶基因序列（AE015451.1），设计引物扩增目的基因：正向引物 P1：5’-CGGAATTCATGACCCAGCCCGACC-3’(EcoR Ⅰ)，反向引物 P2：5’-GCTCTAGAT CAAACATGCCCGCTGC-3’(Xba Ⅰ)其中正向引物的 5’端引入了 EcoR Ⅰ位点，反向引物引入了 Xba Ⅰ位点。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增目的基因

以本实验室已经构建的含有海藻糖合酶基因的 PET15b-treS 质粒作为模板，进行 PCR 反应。反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s；54 ℃ 30 s；72 ℃ 2 min 30 s；30 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 结束后琼脂糖凝胶检测并回收 PCR 产物。

1.2.2 重组质粒 pPICZaA-TreS 的构建



图 1 重组质粒构建流程图

Fig.1 Flow chart of recombinant plasmid construction

按照图 1 的重组质粒构建流程，将 PCR 产物纯化后与 pPICZaA 质粒分别进行 EcoR Ⅰ和 Xba Ⅰ双酶切反应，胶回收 TreS 基因片段和相同酶切的 pPICZaA 质粒，按照一定比例连接得到重组质粒后转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞，涂布于含有 25 μg/mL Zeocin 抗性平板，37 ℃培养 12~16 h，可见菌落出现，使用牙签挑取单菌落进行菌落 PCR，对菌落 PCR 获得的阳性菌，按对应序号扩培后，使用试剂盒小提质粒，进行酶切鉴定，最后进行测序以确保序列的完整性。

1.2.3 重组质粒 pPICZaA-TreS 的转化和鉴定

将提纯的 pPICZaA-TreS 质粒用 BstX Ⅰ限制性内切酶线性化后，电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞，涂布于含有 100 μg/mL Zeocin 的 YPDS 平板，30 ℃培养 4~6 d，筛选到阳性转化子。提取重组菌的基因组，以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 鉴定，同时以转化过空载体的菌株作为对照。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达与检测

挑取 Mut$^+$的转化子接种于 25 mL BMGY 培养基中，30 ℃、250 r/min 振荡培养 18 h；3000 r/min，5 min 离心后弃去上清，用 50 mL BMMY 重悬菌体；菌液置于 500 mL 锥形瓶中，用四层纱布封口，30 ℃、250 r/min 振荡培养，进行诱导表达；每 24 h 向培养基中添加除菌的无水甲醇使其终浓度为 0.5%。

用 SDS-PAGE 对不同时间的诱导物上清液和破壁后菌体内容物进行定性检测。每 24 h 取样 5 mL，3000 r/min 离心 5 min，菌体加入 4 mL 缓冲液破壁后离心，取上清加入等体积的蛋白电泳上样缓冲液，煮沸 10 min 后，点样，电泳检测。

1.2.5 重组蛋白活性的检测

用高效液相色谱（HPLC）检测重组蛋白活性[5]。利用 1.2.4 中的上清分别加入 2 mL pH 7.5 磷酸盐缓冲液以及 100 μL 麦芽糖浆，50 ℃水浴振荡一定时间后，处理样品进行液相色谱检测转化液中海藻糖含量。

2 结果与讨论

2.1 目的基因扩增

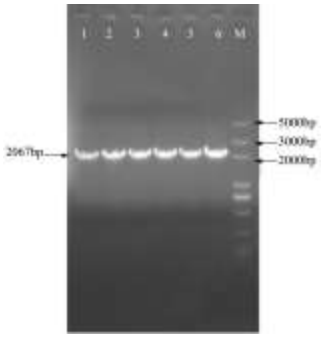


图 2 目的基因 PCR 电泳图

Fig.2 PCR results of target gene

注：Lane 1~6 为目的基因 PCR 结果；Lane M 为 Trans2K^{TM} Plus DNA Marker。

以本实验室已构建的质粒为模板，由前述 PCR 条件扩增得到约 2 kb 的目的条带，大小与理论预测相符，说明目的基因克隆成功，见图 2。

2.2 重组质粒构建与鉴定

将上述目的基因与 pPICZaA 质粒双酶切后的产物纯化后，按照一定的比例进行连接，连接成功后获得重组质粒，重组质粒经测序显示，插入表达载体的基因片段与实验室已构建的海藻糖合酶序列完全相同。说明实验构建重组表达载体成功并且基因序列未出现碱基丢失、突变，序列准确无误，为下一步的转化以及目的基因提供了保证。

2.3 重组质粒的转化

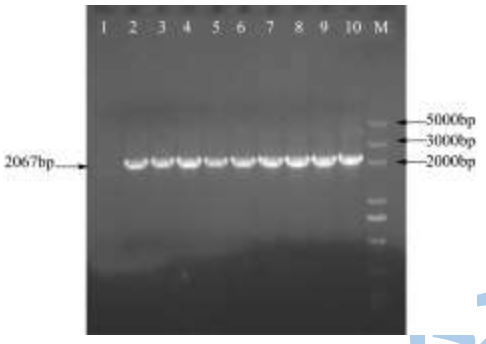


图 3 阳性转化子基因组 PCR 电泳图

Fig.3 PCR results of positive transformants genome

注：lane 1 为含空载体的基因组 PCR 产物；lane 2 为阳性对照；Lane 3~10 为基因组 PCR 产物；lane M 为 Trans2K^{TM} Plus DNA Marker。

构建完成并测序的重组质粒通过电转化法转入毕赤酵母 GS115 基因组中，从抗性平板上挑取阳性菌落，经 YPD 液体培养基培养 48 h，提取酵母基因组，以 P1、P2 为引物进行 PCR 鉴定(图 3)。图中可见转化空载体的泳道 1 未见有任何条带，泳道 3~10 可见明显目的条带与泳道 2 重组质粒的阳性对照条带处于同一水平，说明以阳性转化子基因组为模板成功克隆出海藻糖合酶基因，重组质粒成功整合进入毕赤酵母基因组。

2.4 重组蛋白的诱导表达

整合有海藻糖合酶基因的毕赤酵母阳性转化子诱导表达后经 SDS-PAGE 检测一个大小约 76 ku 白质，这与海藻糖合酶预测的相对分子质量大小相符，作为对照，整合有空载体的酵母菌株未见相应大小的条带（图 4）。图中泳道 1、3、4 为重组菌上清，泳道 2 为转化空载体的对照菌上清蛋白电泳结果，未在电泳图谱中发现任何蛋白条带，比较实验组和对照组说明重组菌上清中没有分泌蛋白。泳道 6 为转化对照菌内容物电泳结果，可见一些酵母细胞内蛋白条带，泳道 5、7、8 为重组菌胞内容物，在对照菌的基础上，在分子量约 76 ku 处可见一条明显的蛋白，与预测目的蛋白大小相符，因此通过蛋白电泳结果说明重组菌株表达的外源蛋白成功，但是并没有直接将外源蛋白分泌至胞外，而是以胞内蛋白形式存在。

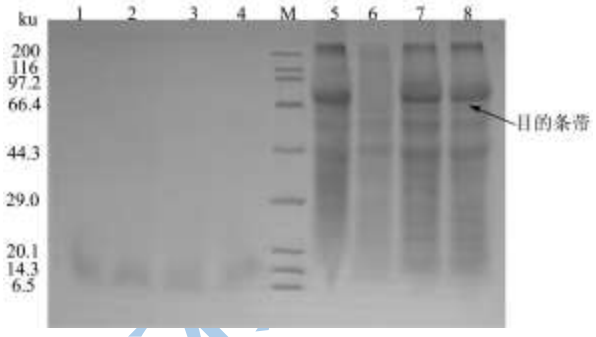


图 4 重组菌上清和胞内容物蛋白电泳图

Fig.4 SDS-PAGE results of intracellular and extracellular recombinants

注：Lane 1、3、4 为重组菌上清；lane 2 为对照菌上清；lane M 为 ProteinRuler^{TM} II Unstained Protein Marker；lane 5、7、8 为重组菌胞内容物；lane 6 为对照菌胞内容物。

2.5 重组蛋白酶活检测

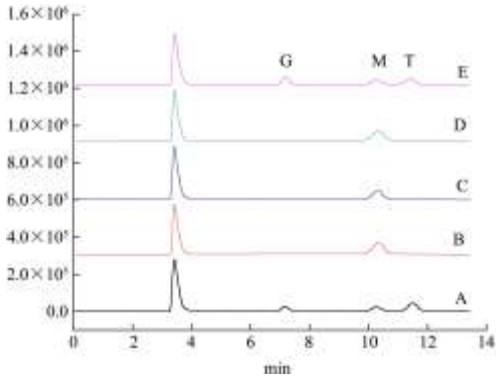


图 5 重组菌上清和胞内容物液相图谱

Fig.5 HPLC results of intracellular and extracellular recombinants

注：A：重组菌胞内容物酶活，B：重组菌上清酶活，C：对照菌胞内容物酶活，D：对照菌上清酶活，E：20 g/L 标准品（葡萄糖、麦芽糖、海藻糖）。

根据 TreS 酶活测定方法，利用 HPLC 测得液相图谱结果如图 5 所示，图 5A 为重组菌胞内容物转化结果，明显可见已有部分麦芽糖转化为海藻糖，而图 5B 重组菌上清和转化空载体的对照组上清 5C、胞内容物 5D 均未见海藻糖峰，通过液相图谱进一步说明海藻糖

合酶基因在毕赤酵母中表达成功，但是并没有以分泌蛋白的形式存在于胞外，而是将蛋白在胞内表达并具有一定酶活。分析目的蛋白没有分泌至胞外的可能原因：一是目的蛋白分泌到胞外，但是被胞外蛋白酶所降解，导致没有酶活和蛋白条带。然而通过分析蛋白电泳图谱可发现上清中没有任何条带，说明胞外不存在蛋白酶，即目的蛋白并没有分泌至胞外；原因二是目的蛋白以胞内蛋白存在，并没有按试验预期分泌至胞外，然而目的蛋白的成功表达涉及启动子、分泌信号、整合方式等多条件影响，其中外源基因的特性如基因密码子组成，AT 含量高低及表达产物对其自身转录翻译过程的影响等起着主要作用，因此任何一方面的偏差都会导致最终影响的蛋白表达。

3 结论

3.1 试验成功构建了来源于恶臭假单胞菌的海藻糖合酶基因的毕赤酵母表达载体，SDS-PAGE 以及 HPLC 结果显示外源基因在毕赤酵母 GS115 中得到初步表达。目前来源于红色亚栖热菌，*Pseudomonas* sp.P8005、*Rhodococcus opacus* 等海藻糖合酶基因均实现了在原核细胞中的表达，但由于原核表达系统产量低，对真核蛋白不能进行翻译后加工和修饰，尤其在内毒素原方面，使原核表达系统在生产食品及医药相关产品受到极大制约。本研究采用的巴斯德毕赤酵母其基因工程菌近年来已被广泛应用于商业化生产各种外源蛋白，目前已有多种外源蛋白在该宿主中获得成功表达[6]。与原核表达系统相比，该系统除了具有蛋白质翻译后修饰等特点，还具有在食品和发酵中常规使用、发酵设备简单、培养基廉价、易于扩大培养等特点，其中尤为重要一点在于外源基因是以基因重组的方式与毕赤酵母基因组发生整合，因此外源基因在毕赤酵母中非常稳定，不会发生类似于原核表达系统的质粒丢失现象[7]，并且无论外源基因以何种方式发生重组都可以同时有多个拷贝数整合到基因组中，而且整合的基因拷贝数不同，表达量也有很大差异，这为毕赤酵母做为工业化生产菌株提供了可靠保证。然而毕赤酵母表达系统并不是万能的表达系统，仍然存在缺陷和不足，有些蛋白在毕赤酵母中表达量很低或不表达，原因至今尚未完全阐明。

3.2 外源蛋白的成功表达涉及基因转录、翻译、蛋白质折叠加工、囊泡运输等分泌表达过程的多个环节，是一个精细调控的复杂系统，任何一个环节发生错误都会导致最终的蛋白表达出现差异[8~9]。虽然目前通过不同启动子或增加基因拷贝数的策略来增强毕赤酵母的外源蛋白的表达[10]，但是相当含量的外源蛋白仍然滞留在胞内而未被分泌表达[11]。国外一些研究表明[12~14]，初生多肽链在内质网中的折叠、加工等是影响外源蛋白分泌表达的限速步骤，但目前对外源蛋白的分泌途径中加工修饰的分子机制还不是十分的了解。因此，分析目的蛋白滞留在胞内而未被分泌表达的原因，应该在研究蛋白分泌表达的分子机制的同时从毕赤酵母的整个系统水平综合考虑各种限制因素[7]，随着当前分子生物学技术的快速蓬勃发展，相信在不久的将来会对毕赤酵母的外源蛋白分泌表达分子机制作出更加详细的解释和说明。

参考文献

[1] 井瑞洁,王腾飞,王瑞明.海藻糖合酶研究进展[J].中国酿造,2008,15:1-4
JING Rui-jie, WANG Teng-fei, WANG Rui-ming. Reearch progress on the immobilization of trehalose synthase and cell permeabilization [J]. China Brewing, 2008, 15: 1-4

[2] 杨蕾蕾,袁其朋,李文进,等.玫瑰微球菌中 treZ 基因在毕赤酵母中的表达研究[J].生物技术通报,2009,10:173-177
YANG Lei-lei, YUAN Qi-peng, LI Wen-jin, et al. Secretory Expression of Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase *Pichia pastoris* from *Micrococcus roseus* QS412 [J]. Biotechnology Bulletin, 2009, 10: 173-177

[3] 封建凯,孙万邦,陈富超,等.重组 Hil-10 质粒构建及其在毕赤酵母 SMD1168 中的表达和纯化[J].生物技术通报,2010, 3:168-172
FENG Jiankai, SUN Wanbang, CHEN Fuchao, et al. Plasmid Construction and Expression in *Pichia pastoris* SMD1168 of Recombinant Human Interleukin-10 and Purification [J]. Biotechnology Bulletin, 2010, 3: 168-172

[4] 张卉,袁其朋.Hepcidin 的基因克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达[J].生物工程学报,2007,23(3):381-385
ZHANG Hui, YUAN Qi-peng. Cloning and Secretion Expression of Hepcidin in Pichia pastoris [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(3): 381-385

[5] Yueming Zhu, Dongsheng Wei, Jun Zhang, et al. Overexpression and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Meiothermus ruber* [J]. Extremophiles, 2010, 14: 1-8

[6] Xiang-Shan Tang, Zhi-Ru Tang, Sheng-Ping Wang, et al. Expression, Purification, and Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrampin-Lactoferricin in *Pichia pastoris* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166: 640-651

[7] 段作营,姚林,毛忠贵.*Pseudomonas putida* S1 海藻糖合成酶基因在大肠杆菌中的克隆表达[J].工业微生物,2008,38(6):7-12
DUAN Zuo-ying, YAO Lin, MAO Zhong-gui. Cloning and expression of trehalose synthase gene from *Pseudomonas putida* S1 in *Escherichia coli* [J]. Industrial Microbiology, 2008, 38(6): 7-12

[8] 关波,金坚,李华钟.改良毕赤酵母分泌表达外源蛋白能力的研究进展[J].微生物学报,2011,51(7):851-857
GUAN Bo, JIN Jian, LI Hua-zhong. Genetic engineering of *Pichia pastoris* expression system for improved secretion of heterologous proteins [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(7): 851-857

[9] Leonardo M Damasceno, Chung Jr Huang, Carl A Batt. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93: 31-39

[10] YU Haojie, YAN Xin, SHEN Wei-liang, et al. Expression of Methyl Parathion Hydrolase in Pichia pastoris [J]. Curr Microbiol, 2009, 59: 573-578

[11] 刘俊梅,聂海彦,郑薇薇,等.水生栖热菌 FL-03 海藻糖合酶基因的克隆及真核表达[J].食品科学,2010,31(23):267-270
LIU Jun-mei, NIE Hai-yan, ZHENG Wei-wei, et al. Cloning and Eukaryotic Expression of Trehalose Synthase Gene from Thermus aquaticus FL-03 [J]. Food Science, 2010, 31(23): 267-270

[12] Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 93(4): 771-778

[13] Gasser B, Sauer M, Maurer M, et al. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts [J]. Applied and environmental microbiology, 2007, 73(20): 6499-6507

[14] Xu P, Robinson AS. Decreased secretion and unfolded protein response up-regulation are correlated with intracellular retention for single-chain antibody variants produced in yeast [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 104(1): 20-29

现代食品科技