

荧光素酶表达载体构建及其在巴斯德毕赤酵母的表达

罗展浩^{1,2}, 吴清平², 张菊梅², 丁郁³, 李程思², 潘力¹, 吴慧清²

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070) (3. 暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要: 萤火虫荧光素酶 (Firefly Luciferase, FL) 是 ATP 快速检测技术的核心组件, 通过荧光强度与 ATP 浓度的对应关系, 在食品行业检测微生物数量发挥着重大作用。本文为实现荧光素酶在重组毕赤酵母 GS115 中的异源表达, 通过从载体 pGL2-control 中扩增荧光素酶基因 *luc*, 克隆到真核表达载体 pPIC9K 中, 线性化后电击转化毕赤酵母 GS115 菌株, 筛选阳性重组菌株。在甲醇的诱导下进行酶的表达, 对粗酶液进行生物活性发光分析, 然后对粗酶进行超滤、阴离子层析和分子筛凝胶层析三步纯化。甲醇诱导表达 96 h 发现胞外和胞内粗酶液均有相对较高的酶发光活性, 酶活分别为 1.45×10^6 RLU/mL 和 1.58×10^9 RLU/mL。SDS-PAGE 与 Western blot 分析重组荧光蛋白大小约为 70 ku, 最终纯化得到的荧光素酶, 其比活为 7.0×10^8 RLU/mg, 纯化倍数达到 19.3 倍, 产量为 48 mg/L。以上结果表明, 荧光素酶能够在毕赤酵母表达系统获得较好的表达和纯化效果。

关键词: ATP 生物发光; 真核表达; 荧光素酶; 毕赤酵母; 纯化

文章编号: 1673-9078(2018)06-88-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.013

Construction of Luciferase Expression Vector and Its Expression in *Pichia pastoris*

LUO Zhan-hao^{1,2}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², DING Yu³, LI Cheng-si², PAN Li¹, WU Hui-qing²

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China) (3. Department of Food Science & Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Firefly Luciferase (Fireflyluciferase, FL) is the core component of ATP bioluminescence assay, which plays a critical role in the detection of foodborne microorganisms in food industry through the correlation between the luminous intensity and ATP concentrations. In order to realize the heterologous expression of luciferase in recombinant *P. pastoris* GS115, the luciferase gene was amplified and cloned into the eukaryotic expression vector pPIC9K. And then the vector was linearized and was transformed into the strain GS115 by electricity to screen the positive transformants. Later ATP bioluminescence assay was employed to test the enzyme activity of both extracellular and intracellular crude enzyme liquid following the expression induced by methanol. The crude enzyme was then purified by ultrafiltration, anion exchange and size exclusion chromatography sequentially. The extracellular and intracellular crude enzyme liquid all had relatively higher enzyme activity after a 96 h-methanol induction, which were 1.45×10^6 RLU/mL and 1.58×10^9 RLU/mL, respectively. SDS-PAGE and western blot analysis indicated that the protein size of FL was about 70 ku. The purified luciferase activity was 7.0×10^8 RLU/mg with the purification fold of 19.3 and the yield of 48 mg/L. In conclusion, our study here demonstrated that the firefly luciferase could be well expressed and purified in the eukaryotic

收稿日期: 2017-11-21

基金项目: 国家 863 项目 (2013AA102202); 广州市科技计划科学研究重点项目 (201504010036); 广州市科技项目 (201604016068); 广州市科技计划项目 (201604020005)

作者简介: 罗展浩 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全监测和检测

expression system as *P. pastoris* GS115.

Key words: ATP bioluminescence; eukaryotic expression; luciferase; *Pichia pastoris*; purification

萤火虫荧光素酶(Firefly Luciferase, FL)能在 O₂、Mg²⁺、ATP 存在条件下,催化 D-荧光素转化为氧合荧光素并发出蓝绿荧光(550~580 nm)^[1]。ATP 生物发光反应产生的荧光强度在一定范围内与 ATP 的量成正比,通过一定阶段恒定的 ATP 的量可以反映细菌等微生物的数量,该方法与传统的细菌培养菌落计数法有良好的相关性^[2],由于 ATP 生物发光具有高灵敏度、检测简便等优点,该方法已广泛应用于食品工业各个领域。此前本实验室在荧光素酶的活体提取^[3]、荧光素的化学合成^[4]和微生物的生物发光快速检测试剂性质研究^[5]上进行较为系统的探索,开发了基于 ATP 生物发光的微生物快速检测盒。面对食品生产过程微生物污染的问题,基于 ATP 生物发光的微生物快速检测盒的研发愈发重要,因此通过不同表达系统大量快速生产荧光素酶可迎合市场需求。

1985 年,De Wet^[6]首次克隆北美萤火虫荧光素酶,并在大肠杆菌内表达,随后各种荧光素酶被克隆和鉴定^[1]。不少研究学者选择大肠杆菌作为表达系统^[7-9],以研究酶的生产 and 应用。但是通过大肠杆菌表达蛋白需要抗生素添加以保持遗传性和存在着大量表达时会产生包涵体等问题。戎晶晶等^[10]发现荧光素酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达形式主要为包涵体,夏蕾等^[11]采用大肠杆菌 M15 表达可溶蛋白,比活达到 1.43×10⁹ RLU/mg,但产量只有 0.68 mg/30 mL,对于大规模生产相当不利。

近年来由于荧光素酶的高灵敏度,单纯作为报告基因,在真核系统中的表达如在裂殖酵母和毕赤酵母^[12]、酿酒酵母^[13,14]表达也有过报道,但是作为外源蛋白在毕赤酵母内的表达和纯化以及作为 ATP 检测试剂进行测试评估和应用却未见报道。毕赤酵母作为一种常用的高效生产蛋白的真核表达系统,相比大肠杆菌具有遗传稳定、可进行高密度培养、具有蛋白翻译后糖基化修饰,蛋白能正确折叠,能进行目标蛋白的定向转运如胞外分泌等一系列优点^[15]。

本研究将北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 荧光素酶基因 *luc* 克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K,并进行毕赤酵母的稳定转化。在得到阳性转化子的基础上进行甲醇诱导发酵,成功表达了荧光素酶。本研究首次实现了荧光素酶在毕赤酵母 GS115 体内的稳定表达、纯化及酶活鉴定的初步研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

巴斯德毕赤酵母菌株 GS115 (*P. pastoris* GS115) 和大肠杆菌 DH5α (*Escherichia coli* DH5α) 为本实验室保存,质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司, pGL2-control 购自 Promega 公司。

1.1.2 主要试剂和培养基

Pfu DNA 聚合酶、*AvrII*、*NotI*、*SacI* 限制酶、T4 DNA 连接酶、Page Ruler prestained protein ladder 购自赛默飞世尔科技公司; DNA marker、氨苄青霉素、遗传霉素 (G418)、购自上海生工生物工程公司; 鼠抗荧光素酶抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 羊抗鼠 IgG 抗体购自全式金公司; 质粒提取试剂盒、普通 DNA 胶回收试剂盒、普通 DNA 纯化试剂盒均购自天根生化科技公司; DEAE Sepharose FF 层析柱、Superdex 75pg 购自纯原生物公司; 超滤离心管、luminol 购自 Merck Millipore 公司; D-荧光素为本实验室制备; 其他试剂为国产分析纯试剂。

LB 培养基、YPD 培养基、MD 培养基、MM 培养基、BMMY 培养基、BMGY 培养基按照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册制备。

1.1.3 仪器设备

蛋白纯化仪 AKTA start, GE Healthcare 公司; Multiporator 多功能电转移电融仪, Eppendorf 公司; Milli-Q 纯水机, Millipore; Avanti J-26S XP 高速冷冻离心机, Beckman 公司; Centrifuge 5424 小型离心机, Eppendorf 公司; Nexus GSX1 梯度 PCR 仪, eppendorf 公司; VC-505 超声波细胞破碎仪, Sonics 公司; Chemidoc MP 全能型成像系统, Bio-rad 公司; Glomax 20/20 luminometer 荧光检测仪, Promega 公司。

1.1.4 引物

本文所用的引物如表 1 所示。

1.2 方法

1.2.1 北美萤火虫荧光素酶基因 *luc* 的克隆与表达载体的构建

从 NCBI (GenBank: X65324.2) 获取北美萤火虫荧光素酶基因序列 *luc*, 设计 PCR 引物见上表 1, 由华大基因合成。以 pGL2-control 为模板, 引物 *luc*-F、*luc*-R, PCR 扩增获得荧光素酶全长基因 *luc*。反应条件: 96 °C 10 min; 96 °C 40 s, 60 °C 40 s, 72 °C 2 min,

35 个循环; 72 °C 8 min。PCR 产物纯化后, 与质粒 pPIC9K 分别进行双酶切, 产物回收后用 T₄ 连接酶进行连接。连接产物热击转化感受态大肠杆菌 *E.coli*DH5a, 感受态细胞制备及转化方法参考《分子

克隆实验指南》^[16]进行。转化后在 LB 固体培养基 (Amp 终浓度为 100 μg/mL), 挑选阳性转化子过夜培养后提取质粒进行酶切验证, 并送华大基因公司测序。构建正确的质粒命名为 pPIC9K-luc。

表 1 荧光素酶基因扩增与验证的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for luciferase gene amplification and confirmation

引物名称	序列 (5'→3')	酶切位点
luc-F	CCGGATCCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG	<i>Avr</i> II
luc-R	TAGCGGCCGCTTACAATTTGGACTTTCCGCC	<i>Not</i> I
α -factor	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	None
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	None

注: 下划线部分为酶切位点, None 代表序列不含酶切位点。

1.2.2 重组菌 GS115/pPIC9K-luc 的构建及转化子的筛选

重组质粒 pPIC9K-luc 经 *Sac*I 线性化后, 用普通 DNA 纯化试剂盒纯化, 电转化 *P.pastoris* GS115 感受态, 转化产物加入 1 mol/L 冰冷山梨醇, 低速振荡培养 1 h 后, 涂布 MD 选择性固体培养基, 30 °C 培养至单菌落出现。酵母感受态细胞制备参考文献^[17]。

将单菌落转移到含 0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL 遗传霉素 G418 的 YPD 固体培养基, 30 °C 培养 3~6 d, 筛选能在高浓度遗传霉素 G418 的 YPD 培养基上生长的单菌落。单菌落转接到 YPD 液体培养基培养 1 d, 用煮-冻-煮^[18]方法提取基因组作为扩增模板进行 PCR 验证, 引物为 α -factor 和 3'AOX1, 反应条件同上。同样的方法将空质粒 pPIC9K 转化 GS115 感受态细胞作为对照。

1.2.3 重组菌 *P.pastoris* GS115/pPIC9K-luc 的 Mut⁺、Mut^S 表型鉴定

将筛选所得的转化子均影印到 MD 和 MM 培养基, 同时能在两种培养基中良好快速生长的为 Mut⁺ 表型; 在前者快速生长但在 MM 培养基中生长缓慢的为 Mut^S。

1.2.4 重组 *P.pastoris* GS115/pPIC9K-luc 甲醇诱导表达

挑取重组的 *P.pastoris* 单菌落接种到 10 mL 液体 BMGY 培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养约 24 h 作为种子液。取 1 mL 种子液接种于 50 mL BMGY 培养基培养 24 h 至 OD₆₀₀ 约为 3~6。4 °C, 5000 r/min 离心 5 min, 沉淀重悬于 50 mL BMMY 培养基 (含 2% 甲醇), 进行甲醇诱导表达, 20 °C、200 r/min, 每隔 24 h 补加甲醇至终浓度为 2%, 同时每 12 h 取样, 直接测量发酵液的酶活性, 96 h 后最终收获发酵液。

1.2.5 发酵粗酶液的提取

50 mL 发酵液 5000 r/min 离心 5 min 得到上清粗

酶液 I, 沉淀用 2 mL 荧光素酶溶解液 (0.2 mol/L Tris-HCl, 5 mmol/L Mg²⁺, 1 mmol/L EDTA, pH 7.8) 冲洗, 离心后得到上清粗酶液 II。菌体沉淀纯水洗涤数次后加入 2 mL 酵母裂解缓冲液 (0.2 mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L PMSF, 5 mmol/L EDTA, 10% 甘油, pH 8.0), 加入直径为 425 μm~600 μm 玻璃珠进行涡旋破碎 12 次 (30 s 涡旋, 30 s 冰上放置为 1 次) 后, 冰浴超声破碎 8 min (5 son, 5 soff), 12000 r/min 离心 10 min, 得到胞内酶液 III。

1.2.6 重组菌 GS115/pPIC9K-luc 表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 western blotting 鉴定

三种粗酶液 I、II、III, 加入 SDS proteinloading buffer 沸水浴 5 min, 短暂离心作电泳上样样品。同时 GS115/pPIC9K 全菌体作为阴性对照, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (5% 浓缩胶, 12% 分离胶) 分析。电泳过后, 电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 4 °C 过夜封闭, 分别用鼠抗荧光素酶抗体作为一抗孵育 40 min, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗孵育 20 min 后, H₂O₂ 与 luminol 混合为反应底物显影, 进行蛋白印迹分析。

1.2.7 粗酶液的酶活测定

20 μL 甘氨酸缓冲液 (GDB) (25 mmol/L 甘氨酸甘氨酸二肽, 5 mmol/L Mg²⁺, 1 mmol/L EDTA-Na₂, 0.4% α -环糊精, 0.15% 二乙氨基乙基葡聚糖, pH 7.2), 10 μL 1 mmol/L D-荧光素, 10 μL 1 mmol/L ATP 溶液组成的反应液, 加入 10 μL 粗酶液开始生物发光反应, 立即放入荧光检测仪中, integrate time 4 s 模式测定荧光强度室温下测定, 发光强度以荧光检测仪的读数-相对发光单位 RLU (Relative Light Units) 表示酶活。

若测试粗酶液本底荧光发光强度, 将反应体系中的 10 μL ATP 溶液换成超纯水, 以评估细胞残留 ATP 对发光的影响程度。

1.2.8 粗酶液中蛋白的纯化

50 mL 诱导表达 96 h 的培养液，离心取沉淀，加入 2 mL 酵母裂解缓冲液，玻璃珠与超声破碎后，离心取上清液作为粗酶液。粗酶液用超滤离心管（MWCO 50 ku）进行超滤并且更换缓冲液 NTE（20 mmol/L NaHCO₃，10 mmol/L Tris，1 mmol/L EDTA，pH 7.8）。蛋白浓缩液经 DEAE-FF 阴离子交换柱进行第二步纯化，用含 0~1 mol/L NaCl 的 NTE 缓冲液进行梯度洗脱，收集蛋白峰。后经 Superdex 75 pg 分子筛凝胶层析第三步纯化，NTE 洗脱收集蛋白峰。最后用 SDS-PAGE 检验纯化效果，并对相应粗酶液进行酶活鉴定。

1.2.9 ATP 浓度生物发光检测

将酶稀释到 0.1~0.5 mg/mL，采用如下体系进行 ATP 生物发光检测：20 μL GDB，20 μL 酶液，5 μL 1 mmol/L 荧光素作为反应体系。分别加入 5 μL 1×10⁻⁶~1×10⁻¹² mol/L ATP 后，立即放入荧光检测仪中，integrate time 4 s 模式测定荧光强度，室温下进行测定。取发光强度的对数和 ATP 浓度的对数作荧光发光值-ATP 浓度的 ATP 标准曲线。

取 1×10⁻⁶~1×10⁻¹⁰ mol/L 范围内的浓度已知的 ATP 样品作为待测 ATP 样品，根据标准曲线估计待测样品 ATP 浓度，并对检测体系进行评价。

1.2.10 数据统计分析

所有酶活性测定均重复 3 次，结果以平均值和标准偏差表示，图表采用 Excel 2010 和 Origin 8.0 数据处理软件加工处理。

2 结果与讨论

2.1 表达载体的构建

2.1.1 荧光素酶基因的克隆与验证

根据方法 1.2.1 构建的重组表达载体 pPIC9K-luc 如图 1 (a)，荧光素酶基因 *luc* 插入到 5'AOX1 与 3'AOX1 (TT) 之间的表达框内。用 *NotI* 与 *AvrII* 双酶切 pPIC9K-luc 验证转化子，酶切结果如图 1 (b)，得到两条明显条带：荧光素酶基因 *luc* (1653 bp) 与线性化质粒 pPIC9K (9273 bp)，测序结果也验证荧光素酶基因序列正确，表达载体 pPIC9K-luc 构建成功。

2.1.2 重组菌的构建及转化子的筛选

限制酶 *SacI* 酶切得到线性化的重组载体 pPIC9K-luc，电转化山梨醇制备的毕赤酵母感受态细胞 *P. pastoris* GS115，在缺乏组氨酸的 MD 筛选平板上初筛一批转化子 41 个，并且进一步复筛，挑选了最高能在含 1 mg/mL G418 的 YPD 平板上生长的菌落 2

个。G418 筛选浓度的高低反映着整合到染色体组目的基因的拷贝数目，剂量效应被认为影响异源蛋白在毕赤酵母表达系统中最重要的因素，基因拷贝数越高，表达量越大^[19]。本文未能筛选到抗 2 mg/mL G418 的高拷贝转化子，较大可能因为初筛的转化子数目远不足，只有 41 个，一般 His⁺转化子中自发多拷贝整合的概率为 1~10%。

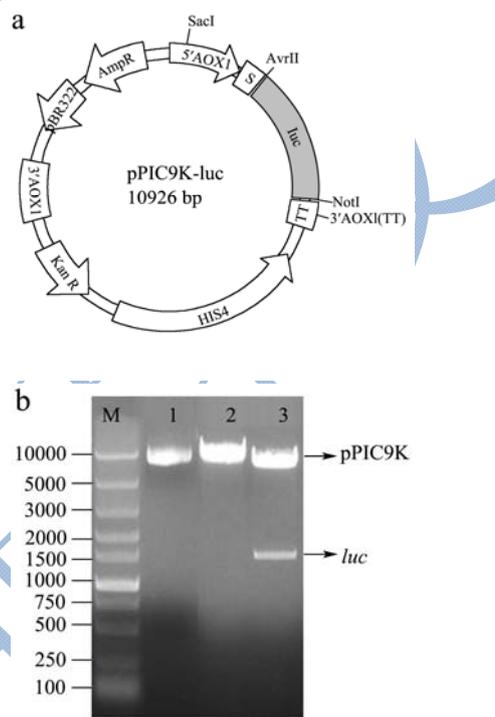


图 1 重组质粒 pPIC9K-luc 的构建 (a) 和重组质粒 pPIC9K-luc 的酶切鉴定 (b)

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-luc (a) and gel electrophoresis of pPIC9K-luc digested with restriction enzymes(b)

注：M：DNA 分子量标准；1：NotI+AvrII 双酶切 pPIC9K；2：NotI 酶切 pPIC9K-luc；3：NotI+AvrII 双酶切 pPIC9K-luc。

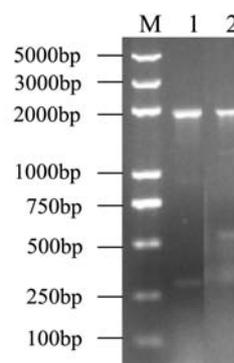


图 2 重组酵母 GS115/pPIC9K-luc 的 PCR 验证

Fig.2 PCR identification of recombinant *P. pastoris* GS115/pPIC9K-luc

注：M：DNA 分子量标准；1、2：阳性转化子。

本文复筛得到的抗 1 mg/mL G418 的转化子, 进一步提取的酵母染色体组 DNA, 进行 PCR 验证如图 2 所示。出现接近 2 kb 的条带, 与 α -factor 和荧光素酶融合的基因片段 (约 1.9 kb) 相吻合, 证明重组载体的目的基因成功重组插入到核染色体组。筛选得到的 2 个菌株编号为 GS115/pPIC9K-1, GS115/pPIC9K-2, 经验证均为 Mut^r表型。同时空载体转化的酵母命名为 GS115/pPIC9K。

2.2 荧光素酶的诱导表达与纯化

2.2.1 发酵液与上清液的酶活初步测定

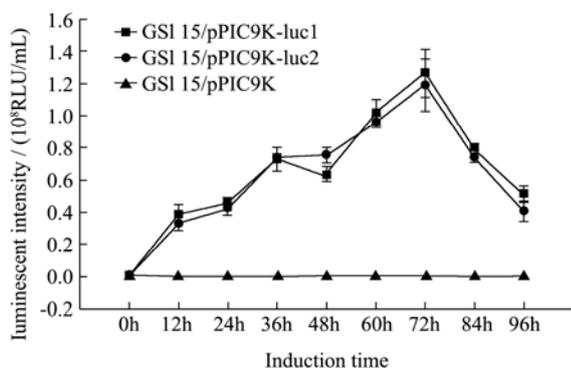


图 3 发酵液酶活测定

Fig.3 The enzyme activity assay of fermentation broth

每 12 h 取样保存于 -20 °C 冰箱的发酵液样品作为粗酶液, 取 10 μ L 加入到荧光素酶发光反应液中进行活性测定, 发光强度如图 3 所示, 发酵时间在 72 h 内, 两株 GS115/pPIC9K-luc 的发酵液的酶活性呈增长趋势, 荧光素酶逐渐累积。在 72 h 时, GS115/pPIC9K-luc1 发酵的酶清液达到峰值为 1.25×10^8 RLU/mL。随着发酵时间延长, 发酵液酶活迅速降低, 96 h 仅剩下 40.7% 最高酶活: 5.09×10^7 RLU/mL。这种酶活迅速降低的原因可能是蛋白酶水解所致。该结果也为日后的优化实验选取最佳发酵时间提供了参考。GS115/pPIC9K-luc2 菌株的发酵所得酶活变化趋势和每个时间点的绝对酶活与菌株 1 相差不大。



图 4 上清粗酶液酶活测定

Fig.4 The enzyme activity assay of supernatants

诱导表达 96 h 最终收获的发酵液, 经过离心、洗涤沉淀、破碎细胞再离心后得到 3 份上清粗酶液 I、II、III, 同样进行酶活测定。如图 4 所示, 发酵液上清即粗酶液 I 的发光活性较低为 1.45×10^6 RLU/mL; 上清粗酶液 II 的酶活约为前者的 20 倍, 为 3.21×10^7 RLU/mL; 酵母裂解的胞内粗酶液 III 的酶活最高, 达到 1.58×10^9 RLU/mL。这组结果表明酵母表达的荧光素酶没有完全释放到胞外, 大部分保留细胞内。

本研究构建了毕赤酵母-荧光素酶表达株, 期望在 α 因子分泌肽的引导下进行胞外表达荧光素酶^[20], 但绝大多数荧光素酶未能有效分泌到胞外。与 Yasuo 等^[21]在烟草植物真核细胞表达 FL, 只在胞内发现酶发光活性的结果一致。某些研究^[22-24]表明, 荧光素酶羧基端的丝氨酸-赖氨酸-亮氨酸三肽 (SKL 过氧化物酶体定位序列), 能够将其转运到过氧化物酶体中, 导致荧光素酶分泌胞外分泌量较低。但胞外清液粗酶活也达到 1.45×10^6 RLU/mL, 表明荧光素酶转运到过氧化物酶体的途径可能被过表达的荧光素酶饱和, 而逃逸进入外泌途径。有报道证明, 发酵过程添加酸水解酪蛋白能够有效增加蛋白的表达量^[25], 表面活性剂如吐温-20 的添加能显著增加蛋白的分泌量^[26], 这些方面都为提高荧光素酶表达量和促进胞外分泌提供可能, 也指明了后续研究工作的方向。三种粗酶液的酶活测试试验中, 测试体系不外加 ATP, 以纯水代替, 观察粗酶液中残留的细胞 ATP 对发光强度产生的影响, 通过本底发光值表示。测试体系外加 ATP 的发光强度作为非本底值, 发现前者为后者的 5%~6%, 表明发酵液和胞内破碎粗酶液仍然含有一定量酵母细胞产生的 ATP 残留, 对表达蛋白的酶活测定造成一定影响, 在处理上作相应扣除以反映酶液的真实酶活水平。

2.2.2 重组菌 GS115/pPIC9K-luc 表达产物 SDS-PAGE 电泳以及 western blot 分析

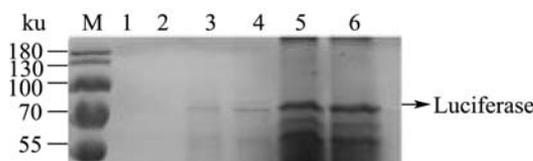


图 5 重组菌 GS115/pPIC9K-luc 表达产物 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of protein expressed by recombinant GS115/pPIC9K-luc

注: M: 蛋白分子量标准; 1、2: 上清粗酶液 I; 3、4: 上清粗酶液 II; 5、6: 上清粗酶液 III。

将上清粗酶液 I、II、III 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果如图 5 所示。结合 western blot 分析, 发现表达的荧光素酶分子量略大于 70 ku (高于理论预测大小 62 ku), 且大部分存在于细胞内而非胞外。在大

肠杆菌内表达的荧光素酶均为 60 ku^[8], 推测可能有潜在糖基化发生。用 NetNGlyc 1.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对重组蛋白潜在糖基化位点进行预测, 发现 3 个潜在的 N-糖基化位点, 导致酶实际分子量较其理论分子量大。糖基化作为毕赤酵母系统最常见的蛋白翻译后加工形式, 不同位点的糖基化发挥不同作用^[27]。文献报道显示, N-糖基化能显著提高酶的稳定性、分泌性和活性^[28]。Yang^[29]在毕赤酵母表达的中华根霉脂肪酶时发现, 部分位点糖基化可提高分泌性, 部分可提高酶的活性和稳定性。Chang^[30]通过表达特定糖基化位点缺失的烟曲霉木聚糖酶, 发现糖基化的缺失导致酶热稳定性显著降低。同理, 荧光素酶的糖基化亦为提高其热稳定性和酶活性提供了可能, 对提高荧光素酶的可利用程度是有帮助的 SDS-PAGE 分析中上清粗酶液 III 的荧光素酶蛋白条带较为明显, 而上清粗酶液 I 没有显示相应条带, 这与三份样品的酶活分析结果相一致, 再次证明表达的蛋白大部分存在于细胞内。

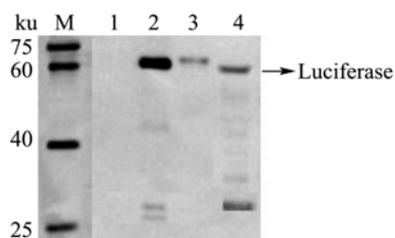


图 6 重组菌 GS115/pPIC9K-luc 表达产物蛋白印迹分析

Fig.6 Western blotting analysis of protein expressed by recombinant GS115/pPIC9K-luc

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 空白对照 GS115/pPIC9K; 2: 上清粗酶液 III; 3: 上清粗酶液 II; 4: 上清粗酶液 I。

Western blot 结果如图 6 所示, 胞外、胞内粗酶存在其他微弱的杂带, 空白对照不存在任何条带出现, 而泳道 4 更在 30 ku 出现较深杂带, 这表示蛋白受到不同程度的降解, 造成降解片段与抗体的结合显现条带, 与图 3 所示结果吻合。研究表明^[31-34], 低温诱导蛋白表达利于提高蛋白稳定性, 降低蛋白酶浓度与活力, 增加细胞的存活率。20 °C 诱导时, AOX1 酶及与甲醇诱导过程中能量代谢途径相关酶的活性比 30 °C 诱导时的都要高^[35]。因此选用 20 °C 作为诱导温度,

表 2 不同纯化步骤后重组酵母表达的荧光素酶的特性分析

Table 2 The characteristics of luciferase expressed by recombinant *Ppastoris* after different purification steps

步骤	总体积/ μ L	总活力/RLU	总蛋白/mg	比活力/(RLU/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	3200	5121575040	141.2	36271778	1.00	100
超滤	3200	4003325184	15.1	265120873	7.3	78
DEAE 阴离子层析	1200	2333058624	4.0	583264656	16.1	46
分子筛凝胶层析	6300	1679710284	2.4	699879285	19.3	33

一方面能够较好地利用碳源, 另一方面尽可能降低蛋白酶酶活, 提高酶活性表达。前期实验工作确实发现 30 °C 表达的胞外荧光素酶酶活只有 20 °C 的 5%~17%。20 °C 的发酵温度有一定的表达优势, 但结果表明 20 °C 还不足以完全抑制蛋白酶的水解作用。

2.2.3 荧光素酶的纯化

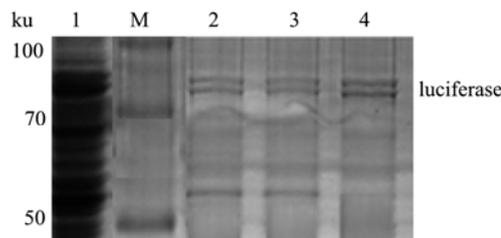


图 7 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE analysis for each step of purified products

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 粗酶液; 2: 超滤液; 3: DEAE 阴离子层析液; 4: 分子筛凝胶层析液。

50 mL 菌液培养所得的菌体, 直接破碎得到粗酶液经过超滤、DEAE 阴离子交换层析和分子筛凝胶层析, 得到 2.4 mg 蛋白, 其比活达到 7.0×10^8 RLU/mg, 纯化倍数达到 19.3, 如表 2, 与夏蕾^[8]报道的在大肠杆菌纯化的比活为 1.43×10^9 RLU/mg, 纯化倍数为 10.6, 比活上并不突出, 但是在酶的回收上有着优势, 未来可通过改变发酵条件和高密度发酵技术, 在大规模生产上取得突破。如图 7 所示, 纯化后的荧光素酶的电泳图出现两条大小略大于 70 ku 的条带, 为不同程度糖基化的荧光素酶。萤火虫荧光素酶作为一种来源于真核细胞的蛋白, 适度的糖基化更接近于萤火虫体内的存在形式, 对酶活稳定存在一定作用。因此在毕赤酵母中表达糖基化的酶是大肠杆菌系统无法实现的, 针对该系统表达的荧光素酶, 未来可以就糖基化对荧光素酶所产生的效应作进一步的研究。

Verma^[12]曾在比较真核启动子的活性中, 使用 AOX1 启动子在裂殖酵母表达荧光素酶, Leskinen^[36]、Ainsworth^[37]也同样就酿酒酵母系统中启动子活性检测的研究中使用过荧光素酶, 但均没有在纯化和活性上作过多的研究。本研究初次在毕赤酵母中以荧光素酶的异源表达纯化、应用为目的, 获得的荧光素酶达到预期的产量和活性。

2.3 ATP 浓度生物发光检测

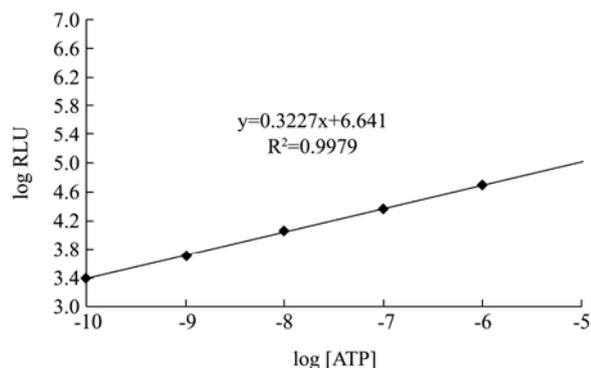


图 8 ATP 生物发光标准曲线

Fig.8 Standard curve of ATP assay

采用本研究的荧光素酶进行 ATP 生物发光反应，绘制 ATP 标准曲线，发现本研究的酶在 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ mol/L 存在良好线性关系， $y=0.3227x+0.641$ ， $R^2=0.9979$ （图 8）。选取线性范围内的三个浓度 ATP，配制成为 ATP 溶液作为待测样品，进行 ATP 浓度检测来评价酶的实用效果。具体 ATP 测量结果如下表 3。

表 3 纯化后荧光素酶对 ATP 样品的生物发光检测

Table 3 Biological luminescence detection for ATP solution

sample by purified luciferase		
ATP 浓度/(mol/L)	ATP 浓度测量值/(mol/L)	回收率/%
5×10^{-9}	$(4.89 \pm 0.19) \times 10^{-9}$	97.8
1×10^{-8}	$(1.09 \pm 0.27) \times 10^{-8}$	109
2.5×10^{-7}	$(2.70 \pm 0.26) \times 10^{-7}$	108

上述结果表明，纯化的荧光素酶能够较好地检测 ATP 并反映其真实浓度。

3 结论

3.1 荧光素酶的一个重要应用就是通过检测微量 ATP 从而对微生物进行定量检测，与传统的琼脂平板培养法相比，有着快速、简便、高灵敏度、可自动化操作等优点^[38]，如果采用免疫磁珠对样品进行前处理，使用含有荧光素酶的微生物 ATP 快速检测盒，则可对食源性致病微生物进行检测，从而能够监测、预防食品加工过程食源性致病微生物的污染。

3.2 相比起大肠杆菌表达系统，毕赤酵母有着其独特的优势：外源基因的遗传性能稳定、可对产物进行糖基化修饰，能够进行高密度培养发酵。本研究构建了荧光素酶的表达载体 pPIC9K-luc，运用毕赤酵母表达系统，成功表达荧光素酶。但是未能使酶进行有效的分泌，诱导表达 96 h 后胞内酶活达到了 1.58×10^9 RLU/mL。对胞内酶进行了有效的阴离子层析和分子筛凝胶层析纯化，获得单一的荧光素酶，比活为

7.0×10^8 RLU/mg，纯化倍数达到 19.3 倍，产量为 48 mg/L。

3.3 本研究利用真核表达系统毕赤酵母来表达荧光素酶，为商业化生产荧光素酶提供了理论依据。未来可通过过氧化氢酶体定位序列的缺失和发酵条件的优化，增加异源表达荧光素酶的胞外分泌量以简化下游纯化步骤，使其更加适应酶的工业化生产要求。

参考文献

- [1] 张菊梅,吴清平,周小燕,等.荧光素酶研究进展[J].微生物学通报,2001,28(5):98-101
ZHANG Ju-mei, WU Qing-ping, ZHOU Xiao-yan, et al. The advances in Luciferase [J]. Microbiology China, 2001, 28(5): 98-101
- [2] 李玉元,米志强,安小平,等.基于重组溶葡萄球菌酶和 ATP 生物发光技术特异定量检测金黄色葡萄球菌[J].生物工程学报,2014,30(8):1283-1290
LI Yu-yuan, MI Zhi-qiang, AN Xiao-ping, et al. Quantitative specific detection of *Staphylococcus aureus* based on recombinant lysostaphin and ATP bioluminescence [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(8): 1283-1290
- [3] 吴慧清,吴清平,张菊梅,等.规模化提取和纯化天然萤火虫荧光素酶的方法: CN1982442 A[P] 2007
WU Hui-qing, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. A method for extration and purification of natural firefly luciferase on a large scale: CN1982442 A [P] 2007
- [4] 吴慧清,吴清平,张菊梅,等.高纯度 D-荧光素酶的制备与纯化:CN102532053 B[P] 2014
WU Hui-qing, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. Preparation and purification methods of high-purity D-fluorescein: CN102532053 B [P] 2014
- [5] 张菊梅,吴清平,李程思,等.生物发光法微生物快速检测试剂的性质及其影响因素研究[J].微生物学通报,2006, 33(3): 36-41
ZHANG Ju-mei, WU Qing-ping, LI Cheng-si, et al. Study on the characteristics and influential factors of microbial rapid detection reagent by bioluminescence [J]. Microbiology China, 2006, 33(3): 36-41
- [6] De Wet J R, Wood K V, Helinski D R, et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985, 82(23): 7870-7873
- [7] 朱术会,邹秉杰,武海萍,等.热稳定生物素化荧光素酶的制备及其在焦测序中的应用[J].分析化学,2010,38(4):458-463
ZHU Shu-hui, ZHOU Bing-jie, WU Hai-ping, et al.

- Preparation of thermostable biotinylated firefly luciferase and its application to pyrosequencing [J]. *Chines Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(4): 458-463
- [8] Mitani Y, Futahashi R, Liu Z, et al. Tibetan firefly luciferase with low temperature adaptation [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 2017, 93(2): 466-472
- [9] Ishibashi M, Arake M, Tokunaga H, et al. Improved expression in *Escherichia coli* and stability of halophilic β -lactamase-firefly luciferase fusion protein [J]. *Bulletin of the Society of Japan Sea Water Science*, 2014, 68(6): 341-343
- [10] 戎晶晶,陈之遥,周国华.生物素化荧光素酶的克隆表达及其固定化研究[J].*中国生物工程杂志*,2007,27(9):41-46
RONG Jing-jing, CHEN Zhi-yao, ZHOU Guo-hua. Immobilization of luciferase by cloning and expression of biotinylated luciferase [J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(9): 41-46
- [11] 夏蕾,饶志明,沈微,等.荧光素酶编码基因 luc 在大肠杆菌中的克隆,表达及纯化[J].*食品与生物技术学报*,2008, 27(5): 62-66
XIA Lei, RAO Zhi-ming, SHEN Wei, et al. Cloning, expression and purification of firefly luciferase in *E.coli* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(5): 62-66
- [12] Verma H K, Shukla P, Alfatah M, et al. High level constitutive expression of luciferase reporter by lsd90 promoter in fission yeast [J]. *Plos One*, 2014, 9(7): e101201
- [13] McNabb D S, Reed R, Marciniak R A. Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(9): 1539-1549
- [14] Krzewska J, Langer T, Liberek K. Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding [J]. *Febs Letters*, 2001, 489(1): 92-96
- [15] Yu Y, Zhou X, Wu S, et al. High-yield production of the human lysozyme by *Pichia pastoris* SMD1168 using response surface methodology and high-cell-density fermentation [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014, 17(6): 311-316
- [16] Green MR, Sambrook J, Russell D W, et al. *Molecular cloning: A laboratory manual (Fourth Edition)*[M]. Beijing: Science Press, 2013
- [17] Lin-cereghino J, Wong W W, Xiong S, et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotechniques*, 2005, 38(1): 48-50
- [18] Sang M, Wei H, Zhang J, et al. Expression and characterization of the antimicrobial peptide ABP-dHC-ccropin A in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2017, 140(8): 44-51
- [19] Zheng J, Guo N, Zhou H B. A simple strategy for the generation of multi-copy *Pichia pastoris* with the efficient expression of mannanase [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(12): 1410-1416
- [20] Polez S, Origi D, Zahariev S, et al. A simplified and efficient process for insulin production in *Pichia pastoris* [J]. *PloS One*, 2016, 11(12): e0167207
- [21] Mitani Y, Oshima Y, Mitsuda N, et al. Efficient production of glycosylated *Cypridina* luciferase using plant cells [J]. *Protein Expression & Purification*, 2017, 133: 102-109
- [22] Walton P, Gould S, Feramisco J, et al. Transport of microinjected proteins into peroxisomes of mammalian cells: inability of Zellweger cell lines to import proteins with the SKL tripeptide peroxisomal targeting signal [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12(2): 531-541
- [23] Spiltoir J I, Strickland D, Glotzer M, et al. Optical control of peroxisomal trafficking [J]. *ACS synthetic biology*, 2016, 5(7): 554-560
- [24] Gould S J, Keller G-A, Hosken N, et al. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1989, 108(5): 1657-1664
- [25] Hu S, Li L, Qiao J, et al. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 47(1): 249-257
- [26] Apte-deshpande A, Rewanwar S, Kotwal P, et al. Efficient expression and secretion of recombinant human growth hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: potential applications for other proteins [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 54(4): 197-205
- [27] Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(7): 2645-2653
- [28] Damasceno L M, Huang C J, Batt C A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2012, 93(1): 31-39
- [29] Yang M, Yu X W, Zheng H, et al. Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1-14
- [30] Chang X, Xu B, Bai Y, et al. Role of N-linked glycosylation

- in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Plos One*, 2017, 12(2): e0171111
- [31] Zhu T, You L, Gong F, et al. Combinatorial strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline β -mannanase in *Pichia pastoris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49(4): 407-412
- [32] Jin H, Liu G, Dai K, et al. Improvement of porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* via induction at low methanol concentration and low temperature [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(2): 559-571
- [33] 廖锡豪,陈明祥,谢万勇,等.低温诱导对毕赤酵母表达重组外源蛋白的影响[J].*中国酿造*,2013,32(2):9-12
LIAO Xi-hao, CHEN Ming-xiang, XIE Wan-yong, et al. Influence of low inducing temperature on foreign protein production in recombinant *Pichia pastoris* [J]. *China Brewing*, 2013, 32(2): 9-12
- [34] Li YY, Zhong K X, Hu A H, et al. High-level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 108(4): 90-96
- [35] 金虎,戴科科,汪汇慧,等.降低诱导温度提高毕赤酵母甲醇代谢关键酶基因转录水平和猪- α 干扰素生产性能[J].*工业微生物*,2011,41(6):52-57
JIN Hu, DAI Ke-ke, WANG Hui-hui, et al. Enhanced Transcriptional Levels of Key Enzymes in *Pichia pastoris* Methanol Metabolism and Improved Porcine Interferon- α Production by Decreasing Induction Temperature [J]. *Industrial Microbiology*, 2011, 41(6): 52-57
- [36] Leskinen P, Virta M, Karp M. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast [J]. *Yeast*, 2003, 20(13): 1109-1113
- [37] Ainsworth W B, Rome C M, Hjorts M A, et al. Construction of a cytosolic firefly luciferase reporter cassette for use in PCR-mediated gene deletion and fusion in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2012, 29(12): 505-517
- [38] Venkateswaran K, Hattori N, La Duc M T, et al. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(3): 367-377