

小麦蛋白质二硫键异构酶的毕赤酵母表达及重组酶性质研究

曹佩^{1,2}, 卫娜³, 刘光^{1,2}, 王敬敬^{1,2}, 徐勇³, 胡松青^{1,2}

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室, 广东广州 510640)(3. 广东省食品工业研究所, 广东广州 510308)

摘要: 为开发天然健康的酶制剂型面粉改良剂, 利用毕赤酵母表达了小麦蛋白质二硫键异构酶(wheat protein disulfide isomerase, wPDI)。以克隆质粒 pMD19-T-w pd i 为基因模板, 亚克隆至毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 并以毕赤酵母 GS115 为宿主菌进行真核表达, 表达产物经硫酸铵沉淀和阴离子交换层析纯化后, 与大肠杆菌重组 wPDI 的酶学性质进行了对比, 并利用粉质仪探究了重组 wPDI 对面粉品质的影响。结果表明, 克隆的 w pd i 基因含有 1347 个碱基, 共编码 449 个氨基酸, 分子量约为 50.2 kd。Western blot 结果显示, 构建的重组酵母表达系统成功表达了重组 wPDI; 阴离子交换层析获得的 wPDI 的酶学性质研究表明, 酵母重组 wPDI 表现出了二硫键氧化还原活性和分子伴侣活性, 其还原活性高于大肠杆菌重组 wPDI, 氧化活性和分子伴侣活性低于大肠杆菌重组 wPDI。粉质实验结果表明, 相对于大肠杆菌重组 wPDI, 酵母重组 wPDI 表现出了更强的弱化面粉加工品质能力。研究结果为 wPDI 的深入研究及其在面制品中的应用奠定了基础。

关键词: 小麦蛋白质二硫键异构酶; 毕赤酵母; 克隆表达; 酶学性质; 粉质特性

文章编号: 1673-9078(2017)5-77-84

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.013

Expression of Wheat Protein Disulfide Isomerase in *Pichia pastoris* and the Properties of the Recombinant Enzyme

CAO Pei^{1,2}, WEI Na³, LIU Guang^{1,2}, WANG Jing-jing^{1,2}, XU Yong³, HU Song-qing^{1,2}

(1.School of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Product Safety, Guangzhou 510640, China) (3.Guangdong Food Industry Institute, Guangzhou 510308, China)

Abstract: Wheat protein disulfide isomerase (wPDI) was expressed in *Pichia pastoris* to develop a novel and healthy enzyme as a flour improver. The recombinant plasmid, pMD19-T-w pd i, was used as a template and subcloned into a *P. pastoris* expression vector, pPIC9K, and then expressed in *P. pastoris* GS115, which was used as a eukaryotic host. After the expressed products were purified by ammonium sulfate precipitation and anion exchange chromatography, the enzymatic properties of the recombinant wPDIs from *P. pastoris* and *E. coli* were compared, and their effects on the farinograph characteristics were investigated using a farinograph. The results showed that the cloned w pd i gene contained 1347 bp, encoded 449 amino acids, and had a molecular weight of about 50.2 ku. Western blot analysis showed that the recombinant wPDI was expressed in the yeast expression system. The enzymatic characteristics of the wPDI purified with anion exchange chromatography were analyzed. The results revealed that the recombinant wPDI expressed in *P. pastoris* showed both oxidoreductase activity from the disulfide bonds, as well as chaperone activity. The wPDI expressed in *P. pastoris* showed higher reductase activity than that expressed in *E. coli*; however, the oxidase and chaperone activity of the wPDI from *P. pastoris* were lower than those of the wPDI from *E. coli*. The results of the farinograph assay showed that the recombinant wPDI expressed in *P. pastoris* was better able to weaken the processing quality of flour than that expressed in *E. coli*. These results provided a basis for in-depth studies on wPDI and its application in flour products.

Key words: wheat protein disulfide isomerase; *Pichia pastoris*; cloning and expression; enzymatic properties; farinograph properties

收稿日期: 2016-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471691); 广州市科技计划项目 (201604020032); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20130172110018); 广东省科技计划项目 (2014A010107002); 佛山市科技计划项目 (2015AG10011)

作者简介: 曹佩 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 谷物化学与蛋白质工程

通讯作者: 胡松青 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 谷物化学与蛋白质工程

蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 属于硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 超家族成员, 具有多种活性, 能够催化蛋白质二硫键的还原、形成、异构以及促进新生蛋白正确折叠的分子伴侣活性^[1-3]。PDI 主要由四个 Trx 结构域按 a、b、b' 和 a' 顺序排列组成, 此外, C 末端含一段富含酸性氨基酸的延伸区, 包含内质网驻留信号肽序列 KDEL^[4,5]。a 和 a' 结构域均含一个由-CGHC-基序组成的活性位点, 参与巯基与二硫键的交换反应^[6]; b 和 b' 结构域提供主要的底物结合区域^[4,7]。

PDI 的应用主要集中于生物医药、基因工程以及食品工业等领域^[8-10]。在食品工业领域, PDI 可作为一种新型的面粉改良剂, 改善面粉加工质量。如高野克己等^[11]报道了利用大肠杆菌重组小麦 PDI (wPDI) 可以改善面包的烘焙质量, 且在黄素蛋白和黄素腺嘌呤二核苷酸协同作用下, 可以大大提高 wPDI 改善面团加工品质的能力。而 Liu 等^[12]发现, 在面粉揉混过程中, 小麦内源 PDI 的氧化还原酶活性对面粉的加工质量产生负面影响。

大肠杆菌是一种公认的致病菌, 将大肠杆菌表达的重组 PDI 应用于食品行业, 不符合消费者和工业生产者追求的食品安全理念。而酵母表达体系能够解决这一不足, 毕赤酵母表达系统现已被美国食品和医药管理局 (FDA) 确定为安全表达体系, 所表达的重组蛋白已经应用到了食品与饲料行业中^[13,14]。目前, 利用酵母表达系统制备 PDI 的研究尚未见报道。

本研究在前期利用大肠杆菌表达出了具有生物活性的 wPDI 基础上^[15], 运用毕赤酵母表达系统表达了酵母重组 wPDI, 并比较了不同来源 wPDI 的酶学性质 (氧化还原活性和分子伴侣活性) 及对面粉粉质特性影响的差异。研究结果为 wPDI 在食品等工业领域的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 宿主菌株与质粒

重组克隆载体 pMD19T-wpdi、重组表达载体 pET-30b-wpdi 为本实验室保存; 克隆菌株 *E.coli* DH5 α 、表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 购于宝生物工程 (中国) 有限公司; 毕赤酵母 (*P.pastoris*) GS115 菌株、酵母表达载体 pPIC9K 购于美国英潍捷基公司。

1.1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: 还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)、

核糖核酸酶 (RNase)、胞苷 2',3'-环一磷酸单钠盐 (2',3'-cCMP) 购自西格玛奥德里奇公司; 遗传霉素 (G418)、酵母无氨基氮源 (YNB), 购自上海生工生物工程有限公司; 限制性内切酶 *SnaB* I、*Not* I、*Kpn2* I 和 T4 DNA 连接酶, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 小提试剂盒和 ECL 试剂盒, 购自广州东盛生物有限公司; 中筋粉, 上海正宝惠家食品有限公司; 其它试剂均为分析纯, 购自健阳生物科技有限公司。

主要仪器: 东胜 EDC-80 型基因扩增仪; 瑞士 TECAN Infinite M200 Pro 型酶标仪; 美国 Bio-Rad 蛋白电泳仪; 美国 GE AKTA Purifier 型快速蛋白液相层析系统; 美国 GE Nano Vue Plus 型微量紫外分光光度计; 美国 Thermo MAXQ 4000 型低温冷冻摇床; 瑞典 Perten Micro-dough LAB 型微量粉质仪。

1.2 方法

1.2.1 重组 wpdi 的亚克隆

以 NCBI 提供的 *wpdi* 基因序列 (GenBank: AF262979.1) 为模板, 利用 Primer Premier 5.0 设计上、下游引物, 上游引物 S1: 5'-TTATACGTACTCACCCCTGC ACGCCGAC-3', 下游引物 A1: 5'-ACTTGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGGATGTAGTCGACAATCT-3'。其中, 下划线序列分别为 *SnaB* I 和 *Not* I 酶切位点, 加粗的碱基为蛋白 C 末端引入的 6 \times His 标签碱基。随后, 以重组克隆载体 pMD19-T-wpdi 为模板进行 PCR 扩增反应。扩增结束后, 利用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 *wpdi* 基因。

1.2.2 重组毕赤酵母表达载体构建和鉴定

对 *wpdi* 基因回收产物和表达载体 pPIC9K 分别进行 *SnaB* I 和 *Not* I 双限制性内切酶处理, 酶切反应条件为 37 $^{\circ}$ C, 30 min。反应产物经琼脂糖凝胶电泳、染色以及切胶处理后, 进一步通过 DNA 凝胶回收试剂盒回收带有粘性末端的 *wpdi* 基因片段以及表达载体 pPIC9K 片段。将 *wpdi* 基因片段与 pPIC9K 载体片段混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 22 $^{\circ}$ C 连接 30 min 后, 将连接产物转化至 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中, 并涂布至含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 下培养 12~16 h。菌落长成后, 挑选圆润饱满的单克隆菌落至 5 mL LB 液体培养基中, 加入 Amp 至终浓度为 100 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12 h 后提取质粒, 并对提取的质粒进行 PCR 及 *SnaB* I 单酶切鉴定。将验证结果为阳性的重组表达质粒 pPIC9K-wpdi 送样测序, 测序结果与已知的 *wpdi* 碱基序列进行比对, 确认重组

质粒序列完整性。

1.2.3 重组毕赤酵母菌株构建及筛选

将测序正确的重组质粒 pPIC9K-*wpdi* 用限制性内切酶 *Kpn2* I 线性化,并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收线性化产物。将 10 μ g 线性化产物电击转化入 *P.pastoris* GS115 感受态细胞中,30 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,涂布在酵母浸出粉葡萄糖培养基 (YPD) 固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 条件下培养至组氨酸阳性 (His^+) 转化子长出。将长出的转化子点种在含 2 mg/mL G418 的 YPD 固体平板培养基上,筛选出多拷贝转化子。挑取形态完整的转化子接种至 YPD 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 16 h 后提取酵母基因组。随后,以转化子基因组为模板,利用 *wpdi* 基因的特异性引物 S1 为上游引物,3'AOX1 引物 A2: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'为下游引物,进行 PCR 鉴定。

1.2.4 酵母重组 wPDI 的诱导表达

挑取基因组 PCR 验证正确的转化子接种至 BMGY 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 20 h 后,液体培养基于 5000 r/min 离心 15 min 后收集菌体,并将全部菌体转移至 BMMY 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 3 d,每隔 24 h 添加终浓度为 0.5% (V/V) 的无水甲醇进行重组蛋白诱导表达。

1.2.5 酵母重组 wPDI 的 SDS-PAGE 及 Western Blot 鉴定

取适量诱导表达 3 d 的发酵液上清进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),分析目的蛋白的表达情况。随后,做 western blot 鉴定,具体方法参照康静静^[16]的方法,并做适当修改,具体步骤如下:将电泳胶上条带用转膜仪转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。将 PVDF 膜置于 5% 的脱脂奶粉中,37 $^{\circ}$ C 低速摇床上孵育 1 h 后,用 TBST (20 mM Tris, 8% NaCl (m/V), 0.1% Tween 20 (V/V), pH 7.5) 缓冲液洗涤三次 (5 min/次),再用一抗鼠抗 6 \times His 标签单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 TBST 缓冲液洗涤三次后,以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,于低速摇床上 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再用 TBST 缓冲液洗涤,最后用 ECL 试剂盒显色。

1.2.6 酵母重组 wPDI 的分离纯化

大量发酵培养重组酵母,并用甲醇诱导表达重组 wPDI,5000 r/min 离心 15 min 去除菌体,收集发酵粗酶液,利用硫酸铵沉淀和阴离子交换层析组合的方式纯化 wPDI。

冰浴条件下,向粗酶液中缓慢加入硫酸铵粉末至硫酸铵质量饱和浓度达到 70% (m/V),粗酶液于 4 $^{\circ}$ C 静置过夜后,5000 r/min 离心 30 min,去除上清,用 20

mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 溶解沉淀,离心收集上清粗酶液,备用。

将上述上清粗酶液注入到预平衡的 Mono Q (GE 健康医疗) 阴离子交换柱中,先用平衡缓冲液 A (20 mM Tris, pH 7.0) 洗去未与柱子结合的蛋白,再用洗脱缓冲液 B (20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7.0) 按照梯度洗脱方式洗脱,收集各洗脱组分。按 1.2.7 所述方法测定各洗脱组分的还原活性,将活性洗脱组分合并,超滤浓缩后进行酶学性质分析。

1.2.7 酵母重组 wPDI 的活性测定

wPDI 具有二硫键的氧化还原活性和分子伴侣活性,各活性的具体测定方法如下。

二硫键还原活性测定: wPDI 能还原胰岛素 A、B 两条链之间的二硫键,使二硫键断裂,随后胰岛素 B 链发生聚集沉淀^[17],通过测定 650 nm 吸光值的增加可表征 wPDI 的还原酶活性。还原活性测定方法具体参照 Liu 等^[12]的方法。以大肠杆菌表达的 wPDI 为阳性对照,无任何蛋白添加的反应体系为阴性对照。wPDI 的还原活性定义为:反应条件为 30 $^{\circ}$ C, pH 7.0,反应体系为 200 μ L,光路为 0.625 cm,每分钟胰岛素在 650 nm 处吸光值变化 0.1 所需酶量为一个活力单位 (U)。

二硫键氧化活性测定: wPDI 能够催化变性的 RNase 复性,恢复变性 RNase 催化 2',3'-cCMP 生成 3'-cCMP 的能力^[18,19],通过测定 296 nm 处吸光值变化可表征 wPDI 的氧化酶活性。氧化活性测定方法参照 Liu 等^[12]的方法。以大肠杆菌表达的 wPDI 为阳性对照,无任何蛋白添加的反应体系为阴性对照。wPDI 氧化活性定义为:反应条件为 30 $^{\circ}$ C, pH 7.0,反应体系为 200 μ L,光路为 0.625 cm,每分钟催化 2',3'-cCMP 生成 1 μ mol/L 3'-cCMP 所需酶量为一个活力单位 (U)。

分子伴侣活性测定: wPDI 的分子伴侣活性表现为抑制变性蛋白的聚集,促进其恢复天然构象。本实验以变性的 GAPDH 为底物测定 wPDI 的分子伴侣活性。变性 GAPDH 的制备方法参照 Cai^[21]的方法,并稍作修改,具体步骤为:将 0.14 mM GAPDH 加入到 3 M 盐酸胍溶液 (含 1 mM DTT) 中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,使其完全变性。分子伴侣活性测定方法参照 Liu 等^[12]的方法。以大肠杆菌表达的 wPDI 为阳性对照,无任何蛋白添加的反应体系为阴性对照。

1.2.8 重组 wPDI 对面粉粉质特性的影响

利用微量粉质仪探究了不同来源 wPDI 对面粉粉质参数的影响。粉质实验方法参照美国谷物化学师协会标准方法操作^[22],并稍作修改,具体步骤为:设置

微量粉质仪程序参数（反应温度 30 °C，搅拌速度 63 r/min，预混时间 1 min，搅拌时间 18 min）后，准确称取 4.0 g 面粉缓慢倒入混合池，启动程序，预混结束后，加入适量水或重组蛋白，盖上塑料板，以相同速度持续搅拌 18 min 后结束程序，记录面团的粉质参数包括稳定时间和弱化度等。其中，重组 wPDI 的添加水平为 0.10% 和 0.20% (m/m, 面粉基)。以添加大肠杆菌表达的 wPDI 为阳性对照，无任何蛋白添加的体系为阴性对照。

2 结果与讨论

2.1 wPDI 基因的酵母表达载体构建

wPDI 分子 C 末端的酸性延伸区含 48 个氨基酸，不影响 wPDI 的活性。因此，本实验利用酵母重组表达了不含该 C 末端延伸区的 wPDI 蛋白。表达的重组蛋白加上 C 末端的 6×His 标签，共含 449 个氨基酸，理论分子量为 50.2 ku。

将从 pMD19-T-wPDI 上亚克隆的 wPDI 基因连接至 pPIC9K 酵母表达载体上，并转化至 *E.coli* DH5α 中。菌落长成后挑取单克隆菌落培养并提取质粒进行质粒 PCR 及单酶切鉴定，以空质粒 pPIC9K 作为阴性对照，结果如图 1 所示。以重组质粒为模板的实验组能够观察到单一的 DNA 条带，长度约为 1300 bp，与目的基因的长度基本相符，而对照组则未见明显条带（图 1a），表明目的基因已成功插入到所选载体上。为防止假阳性结果，进一步利用限制性内切酶对重组质粒进行酶切鉴定，结果表明，经 *Sna*B I 单酶切后，重组质粒片段在琼脂糖胶上的条带位置要高于空载体，也即重组质粒的片段长度要大于空质粒（图 1b），同样证明了目的片段与表达载体成功重组。将重组质粒送样测序，将测序结果与原始 wPDI 碱基序列比对发现，pPIC9K-wPDI 无碱基突变（图 2）。值得指出的是，重组质粒 pPIC9K-wPDI 的 N 端带有载体上的 α-信号肽序列（图 2 黑色框标示），C 端则带有 6×His 标签碱基（图 2 红色框标示）。经 NetNGlyc 1.0 Server 在线预测 N-糖基化位点分析发现，wPDI 含有一个糖基化位点，位于第 242 位氨基酸天冬酰胺（图 2 蓝色框标示的是编码天冬酰胺的碱基），而毕赤酵母表达外源蛋白时，容易对存在 N-糖基化位点的蛋白进行糖基化修饰。以上结果表明成功构建出了重组表达质粒 pPIC9K-wPDI。

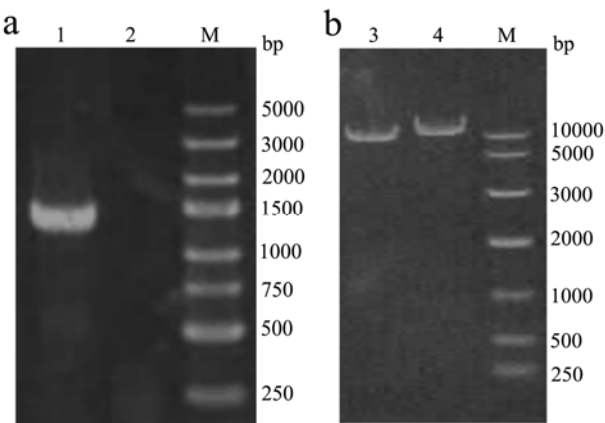


图 1 重组表达质粒鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant expression plasmid

注：a 表示 pPIC9K-wPDI 的 PCR 鉴定；b 表示 pPIC9K-wPDI 的单酶切鉴定；M 表示 DNA marker；1 表示 pPIC9K-wPDI 的 PCR 扩增产物；2 和 3 表示空质粒对照；4 表示 pPIC9K-wPDI 单酶切产物。



图 2 测序结果与原始 wPDI 核酸序列比对

Fig.2 Nucleotide sequence alignment of pPIC9K-wPDI with the original wPDI

2.2 重组毕赤酵母表达菌株筛选

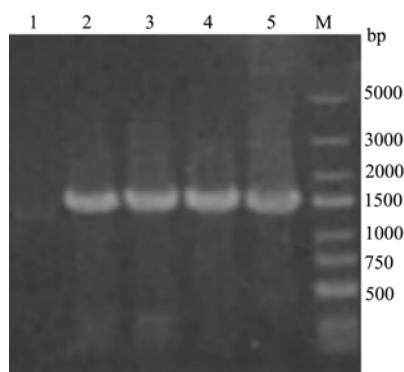


图3 重组转化子基因组 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of the genome of recombinant transformants

注: M 表示 DNA marker; 1 表示对照 (转入空质粒的转化子); 2~5 表示重组转化子。

随机选取 4 个饱满圆润的重组转化子进行基因组 PCR 鉴定, 结果如图 3 所示。重组转化子基因组的 PCR 产物大小约为 1500 bp (目的基因加质粒 3'AOX1 基因序列长度), 符合预期大小, 而对对照组无明显条带产生, 表明目的基因已正确整合到酵母基因组上, 选取的 4 个转化子可用于发酵培养, 表达目的蛋白。

2.3 酵母重组 wPDI 的 SDS-PAGE 分析及 Western Blot 鉴定

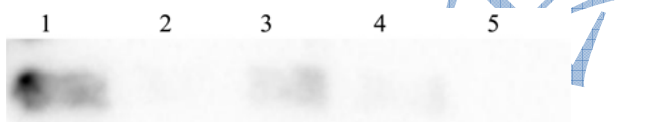


图4 重组酵母发酵液上清的 western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of the supernatant of the recombinant GS115 fermentation broth

注: 1-4 表示 GS115-pPIC9K-wpdi 的发酵液上清; 5 表示 GS115-pPIC9K 的发酵液上清。

选取基因组 PCR 鉴定正确的 4 个重组转化子进行目的蛋白的诱导表达, 诱导表达 72 h 后, 取发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析。然而, 电泳胶图上并未发现明显的目的条带, 这可能是由于上清中目的蛋白含量过低导致的。随后继续取发酵液上清进行 SDS-PAGE 用于 western blot 鉴定, 结果如图 4 所示。与对照组 (泳道 5) 相比, 其它泳道都可见或亮或暗的免疫蛋白条带, 且 1 号泳道的免疫条带颜色最深, 说明对应的转化子蛋白表达量相对较高, 因此, 选取 1 号转化子进行后续实验。

2.4 酵母重组 wPDI 的分离纯化

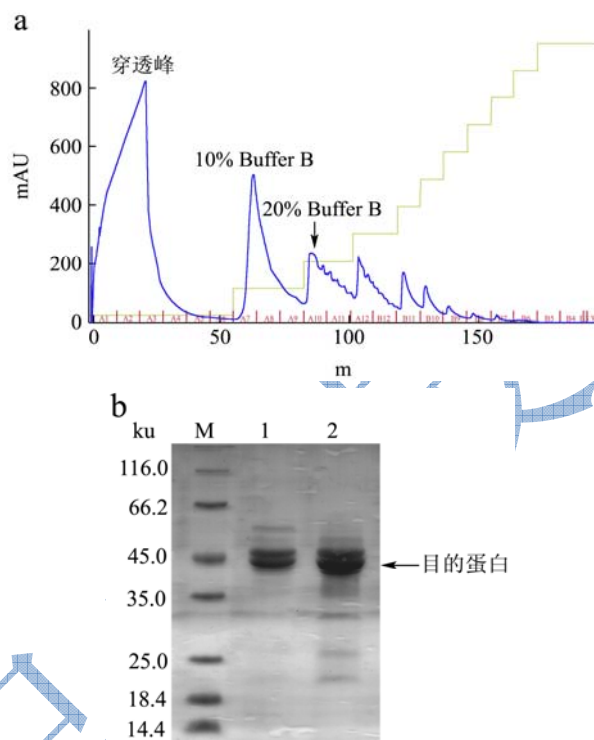


图5 重组 wPDI 的阴离子交换层析分离(a)及 SDS-PAGE 分析(b)

Fig.5 Anion-exchange chromatography (a) and SDS-PAGE analysis of wPDI (b)

注: M 表示蛋白质 marker; 1 表示 10% Buffer B 洗脱组分; 2 表示 20% Buffer B 洗脱组分。

重组蛋白 wPDI 的 C-端带有 6×His 融合标签, 能够使用金属螯合亲和层析进行纯化。因此, 本研究首先选择了 Ni-NTA 亲和柱进行纯化, 然而实验发现重组 wPDI 并不能特异性地结合到柱填料上, 而是从穿透峰中被洗脱出来。wPDI 不能结合到柱子上的原因可能与其 C-端所带 6×His 标签的构象有关, 其被包埋在蛋白的内部, 阻碍了与镍离子的螯合作用, 从而使目的蛋白不能与亲和柱结合。

进一步采用硫酸铵沉淀和阴离子交换层析组合方式对重组 wPDI 进行纯化。将硫酸铵沉淀后得到的粗酶液经脱盐柱除盐后, 用 Mono Q 阴离子交换柱采用梯度洗脱方式进行纯化, 收集各个洗脱峰组分, 以二硫键还原活性检测目的组分, 纯化图谱及 SDS-PAGE 分析结果如图 5 所示。纯化结果表明, 目的组分主要存在于 10%和 20%洗脱缓冲液 B 的洗脱峰中。收集这两个洗脱峰组分, 并用超滤管浓缩, 随后分别取适量浓缩液进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 10%的洗脱组分所含重组 wPDI 纯度较 20%的洗脱组分高, 20%的洗脱组分含有少量的杂蛋白 (图 5)。此外, 两个梯度收集

的组分在电泳图上都出现了两个紧邻的 wPDI 条带,这一现象引起的原因可能与部分 wPDI 糖基化有关^[23]。因此,选取 10%洗脱组分进行下一步酶学性质研究。

2.5 重组 wPDI 的活性测定及比较

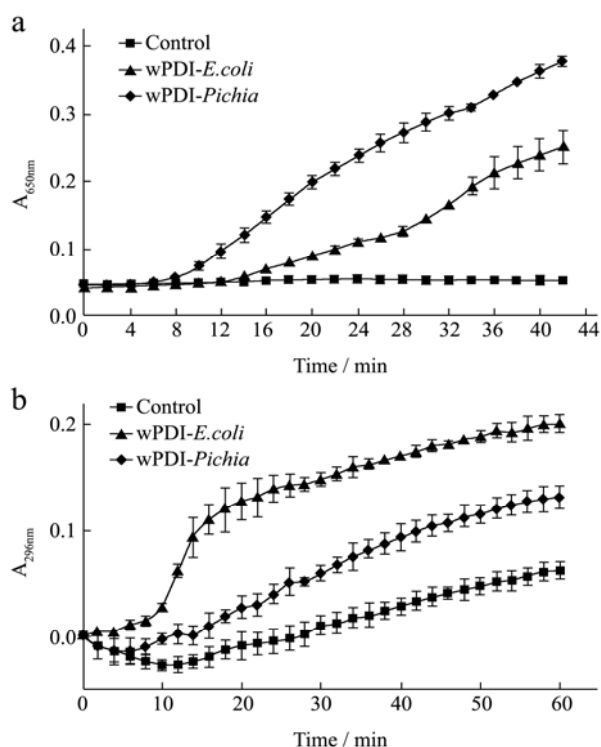


图6 重组 wPDI 活性分析

Fig.6 Activity analysis of recombinant wPDI

注: a 表示重组 wPDI 还原活性测定; b 表示重组 wPDI 氧化活性测定。

酵母和大肠杆菌重组 wPDI 还原活性测定结果如图 6a 所示,在没有 wPDI 存在时,溶液吸光值不发生显著变化,说明胰岛素未被 DTT 还原引起沉淀。当添加酵母或大肠杆菌重组 wPDI 后,溶液吸光值显著提高,说明在 DTT 提供还原当量的情况下,重组酵母和大肠杆菌 wPDI 都能还原胰岛素两条链之间的二硫键,引起 B 链的聚集。然而,相比于大肠杆菌重组 wPDI,酵母重组 wPDI 表现出了更高的还原活性,原因可能与不同来源重组表达 wPDI 的氧化还原状态有关。Hatahet 等^[24]报道 PDI 活性位点的氧化还原电位越低, PDI 的还原活性越高,氧化活性则越低。酵母来源的 wPDI 经过加工、修饰后,其活性位点的氧化还原电位可能较大肠杆菌来源的 wPDI 低,活性位点半胱氨酸更倾向于形成还原态,导致酵母重组 wPDI 比大肠杆菌重组 wPDI 具有更强的二硫键还原活性。在所选条件下,按照酶活性定义计算得到大肠杆菌表达的重组 wPDI 还原活性的比活为 2.40 U/mg,酵母表达的重组 wPDI 还原活性的比活为 6.41 U/mg。

不同来源重组 wPDI 氧化活性测定结果如图 6b 所示,在没有 wPDI 存在时,变性的 RNase 复性率很低,在 60 min 时吸光值仅上升到 0.05。而添加酵母和大肠杆菌表达 wPDI 的实验组,吸光值在 30 min 和 15 min 时即达到 0.05,表明不同来源重组 wPDI 都能够催化变性 RNase 的复性,具有二硫键氧化活性。在所选条件下,按照酶活性定义计算得到大肠杆菌重组 wPDI 氧化活性的比活为 4.02 U/mg,酵母表达的重组 wPDI 还原活性的比活为 7.50×10^{-3} U/mg,酵母重组 wPDI 的氧化活性远低于大肠杆菌重组 wPDI。发挥二硫键氧化活性需要 wPDI 活性位点处于氧化态,而二硫键还原活性测定表明,酵母重组 wPDI 的活性位点比大肠杆菌重组 wPDI 的活性位点更倾向形成还原态,这就解释了酵母重组 wPDI 的二硫键氧化活性低于大肠杆菌重组 wPDI 原因。

2.6 重组 wPDI 分子伴侣活性测定及比较

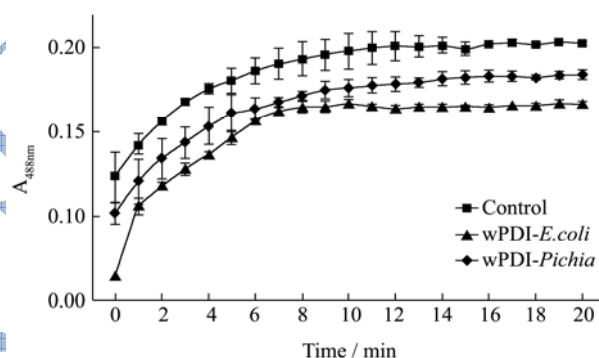


图7 重组 wPDI 分子伴侣活性分析

Fig.7 Molecular chaperone activity of recombinant wPDI

分子伴侣是可介导蛋白质正确折叠与装配,但并不构成被介导蛋白质组成部分的一类蛋白^[25],而 PDI 就是一种重要的具有分子伴侣活性的蛋白。PDI 分子伴侣的功能表现在 PDI 能识别未折叠或部分折叠的新生肽折叠中间物,通过与其多肽结合部位结合,防止靶蛋白和底物蛋白之间错误结合^[26]。研究表明,人来源 PDI 可以有效抑制盐酸胍变性的 GAPDH 的聚集,提高其复性效率^[25]。

不同来源重组 wPDI 的伴侣活性比较如图 7 所示,变性的 GAPDH 在大量稀释后都表现出了明显的聚集沉淀,引起溶液吸光值提高。然而,在有重组 wPDI 存在的实验组中,溶液吸光值低于对照组,也即重组 wPDI 压制了变性 GAPDH 的沉淀,表现出了分子伴侣活性。相比于大肠杆菌重组 wPDI,酵母重组 wPDI 抑制变性 GAPDH 沉淀的效率低。PDI 的伴侣活性受到活性位点的氧化还原状态调控,当活性位点为氧化态时, PDI 分子处于更加开放的构象,有利于底物的

结合,促进了伴侣活性的发挥;而当活性位点处于还原态时,PDI分子表现为更加紧密的构象,不利于结合底物,也就降低了其伴侣活性^[27,28]。因此,酵母重组wPDI伴侣活性低于大肠杆菌wPDI的原因应与其活性位点处于还原态有关,这与上文二硫键氧化还原反应分析所得到的结论相一致。

2.7 重组wPDI对面粉粉质特性的影响比较

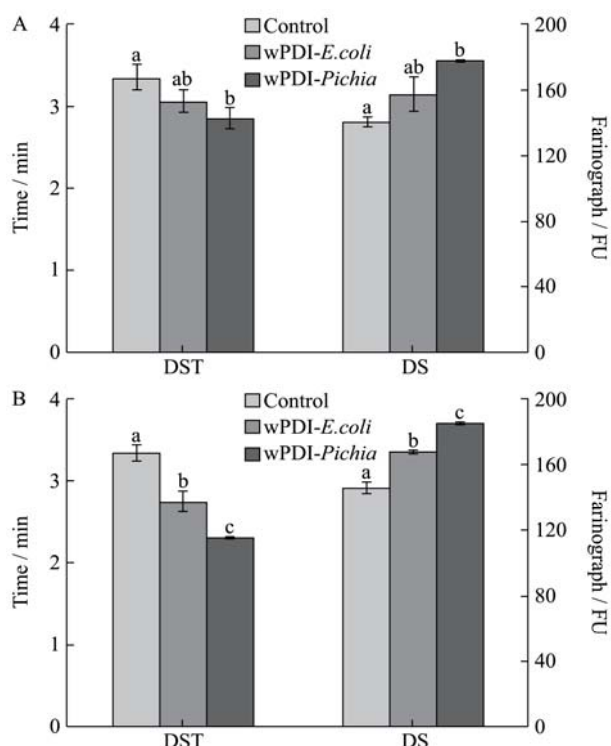


图8 大肠杆菌和毕赤酵母重组wPDI对面粉粉质特性的影响比较

Fig.8 Effects of recombinant wPDIs expressed in *E. coli* and *P. pastoris* on the farinograph characteristics of flour

注: a表示重组wPDI添加水平为0.10% (m/m,面粉基); b表示重组wPDI添加水平为0.20% (m/m,面粉基)。DST和DS分别表示面团稳定时间和弱化度,同一组中的不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

面团稳定时间和弱化度是反映面团强度的重要指标。面团稳定时间与面粉加工品质呈正相关关系,其值越长,说明面粉粉质特性越好;而面团弱化度与面粉加工品质呈负相关关系,其值越大,说明面粉粉质特性越差^[29]。不同来源的重组wPDI对面粉粉质特性的影响如图8所示。相比于对照组,添加两种来源的wPDI都降低了面团稳定时间,提高了面团弱化度,表明不同来源的wPDI都表现出了弱化面粉品质的作用,其在面团揉混中应表现出了二硫键还原活性,破坏了维持面团强度的二硫键交联面筋网络结构。该结果与Every等发现添加wPDI降低面包烘烤品质的结

果相一致^[10]。另外,相比于大肠杆菌重组wPDI,酵母重组wPDI对粉质特性弱化效果更为显著。添加0.20%的大肠杆菌重组wPDI缩短了17.97%的面团稳定时间,提高了17.97%的弱化度;而添加相同水平的酵母重组wPDI缩短了31.34%的面团稳定时间,33.12%的弱化度。酵母重组wPDI表现出比大肠杆菌重组wPDI更强的弱化面粉品质作用的原因应与前者比后者具有更大的二硫键还原活性有关。在饼干的生产中,蛋白酶是最常用于降低面团筋力及提高饼干延展率的酶类^[30]。本文获得的酵母重组wPDI具有与蛋白酶相似的弱化面筋的效果,因此,酵母重组wPDI理应具有改良饼干品质的潜在应用。

3 结论

从pMD19-T-wpdi亚克隆了wpdi基因,成功构建了酵母表达载体pPIC9K-wpdi,并在GS115酵母菌株中表达了重组wPDI;经硫酸铵沉淀和阴离子交换层析制备了具有较高纯度的重组wPDI;酶学性质结果表明,酵母表达的wPDI具有二硫键氧化还原活性及分子伴侣活性,且还原活性是大肠杆菌表达wPDI的三倍,氧化活性远低于大肠杆菌表达的wPDI,分子伴侣活性略低于大肠杆菌表达wPDI;不同来源表达的重组wPDI都表现为弱化面粉加工品质作用,且酵母重组wPDI弱化效果优于大肠杆菌重组wPDI。研究结果为wPDI的深入研究以及在食品中的应用奠定基础。

参考文献

- [1] Araki K, Nagata K. Functional *in vitro* analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(37): 32705-32712
- [2] Muller C, Bandemer J, Vindis C, et al. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, 18(7): 731-742
- [3] Song J L, Wang C C. Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 231(2): 312-316
- [4] Pimeskoski A, Klappa P, Lobell M, et al. Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(11): 10374-10381
- [5] Alanen H I, Salo K E, Pekkala M, et al. Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases [J].

- Antioxidants & Redox Signalling, 2003, 5(4): 367-374
- [6] Darby N J, Creighton T E. Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(37): 11725-11735
- [7] Klappa P, Ruddock L W, Darby N J, et al. The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins [J]. *Embo Journal*, 1998, 17(4): 927-935
- [8] Laurindo F R, Pescatore L A, Fernandes D C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2012, 52(9): 1954-1969
- [9] Zhang J H, Wu D, Chen J, et al. Enhancing functional expression of β -glucosidase in *Pichia pastoris* by co-expressing protein disulfide isomerase [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, 16(6): 1196-1200
- [10] Every D, Simmons L D, Ross M P. Distribution of redox enzymes in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour [J]. *Cereal Chemistry*, 2006, 83(1): 62-68
- [11] Katsumi Takano, Tomomi Arai. Modifier for wheat processed products and methods for producing wheat processed products. Japanese, 5115982 [P]. 2010-3-11
- [12] Liu G, Wang J J, Hou Y, et al. Improvements of modified wheat protein disulfide isomerases with chaperone activity only on the processing quality of flour [J]. *Food & Bioprocess Technology*, 2017, 10: 568-581
- [13] Spohner S C, Müller H, Quitmann H, et al. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 202:118-134
- [14] Cho I J, Yeo I C, Lee N K, et al. Heterologous expression of polygalacturonase genes isolated from *Galactomyces citri-aurantii* 1J-1 in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(2): 332-340
- [15] 刘光,张婷婷,王敬敬,等.小麦蛋白质二硫键异构酶基因的克隆、表达及重组酶性质研究[J].*食品科学*,2017,38(2):1-6
LIU Guang, ZHANG Ting-ting, WANG Jing-jing, et al. Gene cloning, expression and characterization of protein disulfide isomerase from wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Food Science*, 2017, 38(2): 1-6
- [16] 康静静.牛中性粒细胞 β -防御素 4 和 5 成熟肽的毕赤酵母表达及其抗分枝杆菌活性研究[D].北京:中国农业大学, 2014
KANG Jing-jing. Antimicrobial activity of *Pichia pastoris*-derived, mature, bovine neutrophil β -defensins 4 and 5 against *Mycobacterium* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014
- [17] Norgaard P, Winther J. Mutation of yeast Eug1p CXXS active sites to CXXC results in a dramatic increase in protein disulphide isomerase activity [J]. *Biochemical Journal*, 2001, 358(Pt 1): 269-274
- [18] Lyles M M, Gilbert H F. Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(3): 613-619
- [19] Goldberger R F, Epstein C J, Anfinsen C B. Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239(5): 1406-1410
- [20] Walker K W, And M M L, Gilbert H F. Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(6): 1972-1980
- [21] Quan H, Fan G, Wang C C. Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(29): 17078-17080
- [22] A A O C Chemists. Approved methods of the American association of cereal chemists [M]. The Association: St. Paul MN, 2000
- [23] 顾园,诸欣平,王少华.毕赤酵母表达蛋白质的糖基化[J].*生命的化学*,2004,24(4):353-355
GU Yuan, ZHU Xin-ping, WANG Shao-hua. Glycosylation of proteins expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Chemistry of Life*, 2004, 24(4): 353-355
- [24] Hatahet F, Ruddock L W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(11): 2807-2850
- [25] Ellis R J. The general concept of molecular chaperones [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 1993, 339(1289): 257-261
- [26] Gruber C W, Cemazar M, Heras B, et al. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006, 31(8): 455-464
- [27] Wang C, Yu J, Huo L, et al. Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a' [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(2): 1139-1149
- [28] Wang C, Li W, Ren J, et al. Structural insights into the

- redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 19(1): 36-45
- [29] Miś A, Grundas S, Dziki D, et al. Use of farinograph measurements for predicting extensograph traits of bread dough enriched with carob fibre and oat wholemeal [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108(1): 1-12
- [30] Kara M, Sivri D, Koksel H. Effects of high protease-activity flours and commercial proteases on cookie quality [J]. *Food Research International*, 2004, 38(5): 479-486

现代食品科技