

琥珀酸半醛脱氢酶 GabD4 的表达、纯化及酶学性质分析

贾东旭^{1,2}, 刘东^{1,2}, 郑裕国^{1,2*}

1(浙江工业大学 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 浙江 杭州, 310014)

2(浙江工业大学 生物转化与生物净化教育部工程研究中心, 浙江 杭州, 310014)

摘要 人工合成琥珀酸半醛脱氢酶 GabD4 基因, 经蛋白表达和纯化, 对其酶学性质进行研究。结果表明, GabD4 的最适反应温度为 37 ℃; 最适 pH 为 7.5(磷酸盐缓冲液)或 9.0(甘氨酸-氢氧化钠缓冲液); 金属离子中, Cu^{2+} 对 GabD4 酶活力的影响较大; GabD4 对 3~5 个碳的醛底物具有更高的催化效率; 以乙醛为底物, 计算得到米氏常数(K_m)、最大反应速率(V_{max})分别为 6.86 mmol/L 和 20.6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 。该结果为深入了解 GabD4 的酶学性质提供参考。

关键词 醛脱氢酶; 重组表达; 分离纯化; 酶学性质

3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)是重要的平台化合物, 可用于合成丙烯酸、1,3-丙二醇、丙烯酸酯、丙二酸和丙内酯等多种化合物^[1], 应用前景广阔。合成 3-HP 的方法有化学法和生物法, 前者包括 3-羟基丙醛氧化法^[2]、1,3-丙二醇氧化法^[3]和丙烯酸水合法^[4]等; 后者则以葡萄糖或甘油为底物进行微生物发酵。相对化学法, 生物法具有反应条件温和、环境友好和避免使用石油化工原料等优势。随着近年来过产生物柴油导致副产物甘油价格下降, 利用甘油发酵生产 3-HP 成为研究热点^[5]。

生物法的微生物宿主有大肠杆菌(*Escherichia coli*)和肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)。两宿主在利用甘油制备 3-HP 过程中, 均需要甘油脱水酶(DhaB)和醛脱氢酶(AldH)参与反应。DhaB 依赖辅酶 VB₁₂, 将甘油氧化成 3-羟基丙醛(3-HPA); AldH 在 NAD(P)⁺ 存在时将 3-HPA 转化为 3-HP^[6]。

近年来, 出现了很多宿主菌表达 DhaB 和不同的 AldH 利用甘油发酵生产 3-HP 的报道。RAJ 等^[7]将 AldH 导入 *E. coli*, 最高 3-HP 产量达 31 g/L。RATHNASINGH 等^[8]利用高表达的 KGSADH, *E. coli* 发酵得到 38.7 g/L 的 3-HP。ASHOK 等^[9]将 PuuC 导入 *K. pneumoniae* 宿主, 并敲除甘油激酶(glpK)和 1,3-丙二醇脱氢酶(dhaT), 产量达 28.1 g/L。KIM 等^[10]在 *E. coli* BL21 star(DE3)中表达了 *Pseudomonas*

aeruginosa 的 PSALDH, 同时敲除 glpK 和丙二醇氧化还原酶(yqhD), 3-HP 产量 57.3 g/L。最近, CHU 等^[11]指出, 来自 *Cupriavidus necator* 的 succinate-semialdehyde dehydrogenase GabD4 是活力最高的 AldH, 比酶活达到 55.1 U/mg(protein), 并通过定点突变和基因敲除等技术, 利用 *E. coli* 生产 3-HP 的产量高达 71.9 g/L。

GabD4 作为一种新型高效醛脱氢酶, 应用前景广阔, 因此, 详细表征 GabD4 的酶学性质具有重要意义。本研究人工合成 *C. necator*succinate-semialdehyde dehydrogenase GabD4 基因, 通过异源表达, 以乙醛为底物探索其性质, 为丰富 GabD4 的酶学性质信息提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)由本实验保存; *C. necator*gabD4 基因由上海旭冠生物发展有限公司合成, 并连接到表达载体 pET28b 上。

1.1.2 主要试剂

卡那霉素(Kanamycin, Kan)、异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 二巯苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)购于北京百灵威科技有限公司; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)购于北京经科宏达生物有限公司上海分公司; AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒购于康

第一作者: 博士, 讲师(郑裕国教授为通讯作者)。

基金项目: 国家自然科学基金(21306173); 浙江省自然科学基金青年基金(LQ15C010001)

收稿日期: 2015-12-23, 改回日期: 2016-01-12

宁生命科学(吴江)有限公司; DNA marker、DNA Loading Buffer 购于南京诺唯赞生物科技有限公司; Unstained Protein Ladder、2 × Unstained Prot Loading Buffer 购于上海博彩生物科技有限公司; Profinity IMAC Ni-Charged Resin 购于美国伯乐(BIO-RAD)公司。

1.1.3 培养基配方

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、NaCl 10、固体培养基补加琼脂粉 2。

1.2 方法

1.2.1 转化宿主菌

将含有合成基因的重组菌 *E. coli* DH5 α /pET28b/GabD4 接入含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基于 37 $^{\circ}$ C 培养, 提取质粒并热击转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)。

1.2.2 重组菌的诱导表达

将重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28b/GabD4 接入含 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 活化培养, 并重新接种至上述培养基, 培养 OD_{600} 至 0.6 ~ 0.8, 添加 1 mmol/L IPTG, 于 28 $^{\circ}$ C 诱导 10 h, 收集菌体备用。

1.2.3 GabD4 的酶活测定

参考文献^[12] 并做修改, 体系包括 1 mmol/L DTT、2 mmol/L 乙醛、2 mmol/L NAD⁺ 和适量的酶液, 用 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)补至 1 mL。于 37 $^{\circ}$ C, 用 SpectraMax M5 酶标仪在 340 nm 处测定吸光值变化。酶活定义: 反应体系中, 1 min 生成 1 μ mol NADH($\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)所需要的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

1.2.4 重组酶的分离纯化

将离心收集的菌体用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)重悬, 超声破碎, 离心取上清液。采用镍柱进行纯化: 用 Buffer A(低浓度咪唑)冲洗至紫外基线平衡; 上样; 用 Buffer A 和 Buffer B(高浓度咪唑)的混合液线性洗脱; 280 nm 出峰, 收集蛋白。将上述蛋白置于透析袋(截留分子量 14 kDa)中, 用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)透析 36 h, 每 6 h 换液, 获得的酶液进行后续研究。

1.2.5 重组 GabD4 的性质分析

最适反应温度: 分别在不同反应温度下测定 GabD4 酶活, 其他同 1.2.3。

热稳定性: 将酶液分别保温在不同温度下, 每隔 30 min 取样测残余酶活。

最适反应 pH: 分别在不同 pH 条件下测定 GabD4 酶活, 其他同 1.2.3。

pH 稳定性: 将酶液分别保温在不同 pH 条件下, 每隔 30 min 取样测残余酶活。

金属离子的影响: 反应体系中分别添加 2 mmol/L 的金属离子, 测定 GabD4 酶活, 其他同 1.2.3。

底物特异性: 在反应体系中分别加入 2 mmol/L 不同底物, 测定 GabD4 酶活, 其他同 1.2.3。

酶促反应动力学: 改变酶反应体系中乙醛的浓度, 测定 GabD4 酶活; 选取 2 ~ 10 mmol/L 乙醛浓度绘制动力学曲线, 根据双倒数作图法, 求出 K_m 和 V_{max} 。

1.2.6 其他检测分析方法

SDS-PAGE 电泳检测方法参照文献^[13]; 利用 RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)分析 mRNA 二级结构。

2 结果

2.1 人工合成醛脱氢酶基因

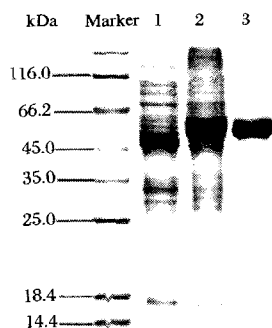
针对特定表达系统, 合成的基因通常需要优化密码子偏好性, 以提高翻译的效率和准确度^[14]。本研究以 *C. necator* succinate-semialdehyde dehydrogenase GabD4(GenBank 登录号 CAJ96839.1)的氨基酸序列为模板, 按 *E. coli* 密码子偏好性合成 1446 bp 包括 6 × His-tag 的 *gabd4* 基因(GenBank 登录号 KU215384)。经 Blast 比对, 合成与野生型 *gabd4* 基因的碱基同源率为 81% (合成基因的 6 × His 未计算在内); 合成基因 G + C 含量从未经密码子优化的 67.4% 降至 55.7%; 优化前后基因的 mRNA 二级结构自由能从 -678.2 降低至 -536.2 kcal/mol。

2.2 GabD4 的表达与纯化

GabD4 所用的表达载体 pET28b 受 T7 启动子调控, 在 IPTG 的诱导下, 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28b/GabD4 能够表达目的基因^[15]。在 28 $^{\circ}$ C、1 mmol/L IPTG 条件下诱导 10 h, 菌体破碎上清液的 SDS-PAGE 见图 1。与不添加 IPTG 的对照(泳道 1)相比, 重组菌经 IPTG 诱导(泳道 2), 在 45 ~ 66.2 kDa 之间表达了大量可溶异源蛋白, 与 GabD4 的预测分子量 52.5 kDa 基本一致。经酶活检测, 泳道 2 的酶活为 10.3 U/mL, 表明重组酶正确表达。

GabD4 的 6 × His 标签能与镍离子螯合, 将蛋白保留在金属亲和介质上, 经咪唑洗脱达到纯化的效果^[16]。按方法 1.2.4 进行纯化, 纯化酶的 SDS-PAGE

结果见图 1(泳道 3)。



Marker-蛋白分子质量标准;1 - 未诱导的对照组;2 - gabD4 的诱导可溶表达;3 - 纯化的 GabD4

图 1 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28b/GabD4 的可溶表达与 GabD4 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of soluble induction expression of *E. coli* BL21(DE3)/pET28b/GabD4 and purification of GabD4

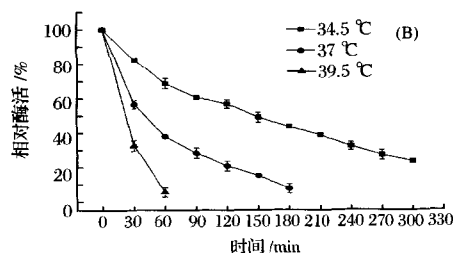
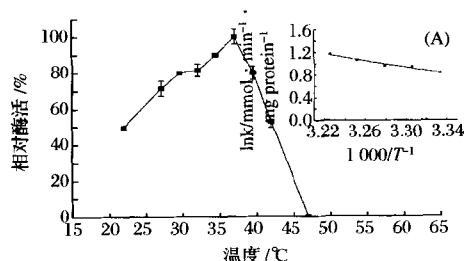


图 2 温度对重组 GabD4 酶活的影响(插图为测活化能)(A)和 GabD4 的热稳定性(B)

Fig. 2 Effect of temperature on the activity (A) and thermostability (B) of GabD4. (The insert in Fig 2(A) was Arrhenius plot)

性最好。经计算,34.5 °C 时 GabD4 的酶半衰期($t_{1/2}$)为 150 min,优于 37 °C 的 52.9 min 和 39.5 °C 的 14.3 min。

2.3.2 最适 pH 和 pH 稳定性

不同 pH 可以改变酶活性中心氨基酸基团的解离程度,从而影响酶对底物的催化效率^[18]。重组 GabD4 最适 pH 的考察结果见图 3(A)。在 pH 4.0 ~ 6.0 的柠檬酸盐缓冲液、pH 6.0 ~ 8.0 的磷酸盐缓冲液和 pH 8.0 ~ 10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中,测得 GabD4 的最适 pH 分别为 pH 4.5、7.5、9.0,说明缓冲液成分和 pH 值对酶活影响较大,该结果与 Chu 等^[11]报道的最适 pH 为 8.0 不同。还发现,GabD4 对酸性环境较敏感,该条件下的酶活明显低于在中性或碱性条件下的酶活。继续考察 GabD4 在 pH 7.5 ~ 9.0 的热稳定性,结果见图 3(B)。尽管在 pH 7.5 和 8.0 的磷酸盐缓冲液、pH 8.5 和 9.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中,GabD4 的酶活数值相近,但其热稳定

2.3 重组酶的酶学性质

2.3.1 最适温度和温度稳定性

温度对酶反应有重要影响,过高或过低的温度都不利于酶促反应的进行^[17]。GabD4 最适反应温度的考察结果见图 2(A),当反应温度从 24 °C 升高至 37 °C,酶活也随之升高,在 37 °C 达到最大值;继续升高反应温度至 47 °C,酶活迅速下降。因此,确定 GabD4 的最适反应温度是 37 °C,与 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 等微生物的生长、发酵温度相同。将 27、29.5、32、34.5、37 °C 换算成热力学温度(T),以 $1000/T$ 为横坐标,以各温度的 $\ln k$ (k 是酶反应速率)为纵坐标做图(图 2 插图),根据阿利纽斯方程式 $\ln k = -Ea/RT + \ln A$,计算 GabD4 的活化能为 2.93 ± 0.33 kcal/mol。随后,考察 GabD4 在 34.5、37、39.5 °C 下的热稳定性,如图 2(B)所示, GabD4 在 34.5 °C 下的热稳定

性有所不同,经计算,在 pH 7.5、8.0、8.5、9.0,酶的 $t_{1/2}$ 分别为 36.1、33.2、54、18.3 min。

2.3.3 金属离子对 GabD4 酶活性的影响

如图 4 所示,以不加金属离子的酶反应作为对照, Cu^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 对 GabD4 酶活力有激活作用,其中 Cu^{2+} 影响最大,是对照组的 1.25 倍,发酵过程中,可以在不影响菌体生长和产物提取的情况下,添加适量 Cu^{2+} 以提高 GabD4 酶活力;其他离子均对 GabD4 酶活力无影响或有抑制作用。

2.3.4 不同底物对 GabD4 酶活性的影响

如图 5 所示,与乙醛相比,GabD4 对丙醛、丁醛、戊醛、异戊醛和苯甲醛展示了较好的底物特异性,其中,对丙醛、丁醛、戊醛的相对活力分别达到乙醛的 4.65、4.91、4.86 倍,表明 GabD4 更偏向于催化 3 ~ 5 个碳的醛底物,推断 GabD4 对 3-HPA 会有较高的催化效率。

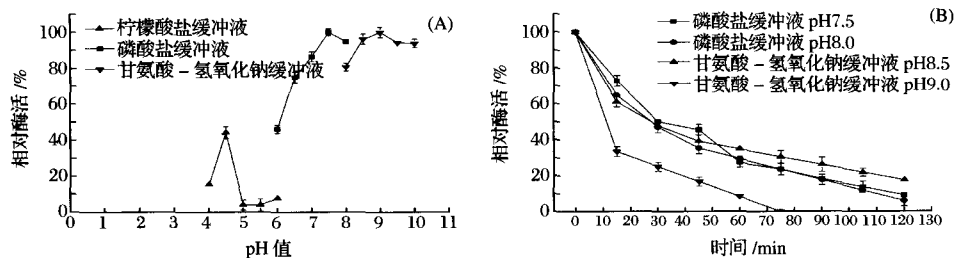


图3 pH对重组 GabD4 酶活的影响(A)和 GabD4 的 pH 稳定性(B)

Fig.3 Effect of pH on the activity (A) and pH stability (B) of GabD4

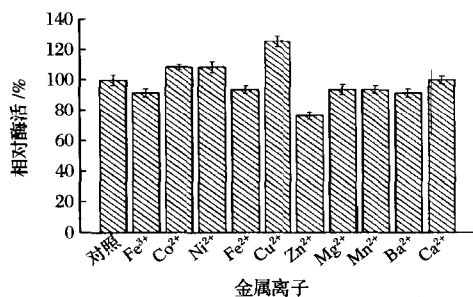


图4 金属离子对重组 GabD4 酶活的影响

Fig.4 Effect of different metal ions on the activity of recombinant GabD4

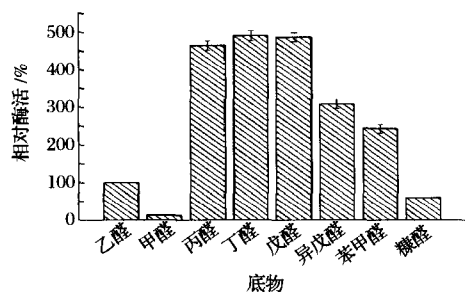


图5 不同底物对 GabD4 酶活性的影响

Fig.5 Effect of different substrates on the activity of recombinant GabD4

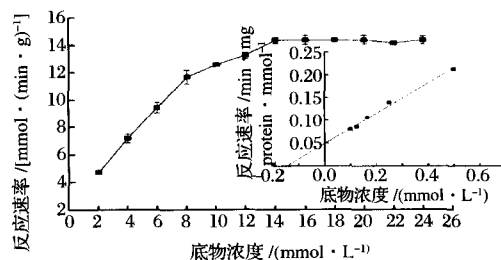


图6 不同底物浓度下的 GabD4 酶反应速率(插图为 Lineweaver-Burk 图)

Fig.6 Thereaction velocity of GabD4 varying different aldehyde concentration. The insert showed the Lineweaver-Burk plot

3 结论

本研究人工合成来自于 *Cupriavidus necator* 的琥珀酸半醛脱氢酶 GabD4 基因,在 *E. coli* 中实现异源表达,通过酶纯化,对酶学性质进行分析。GabD4 在 *E. coli* 中,通过添加 1 mmol/L IPTG,于 28 ℃ 诱导 10 h,酶活力可达 10.3 U/mL。对该重组 GabD4 的性质研究发现,酶的最适反应温度为 37 ℃,该条件下的 $t_{1/2}$ 为 52.9 min;GabD4 的最适 pH 为 7.5(磷酸盐缓冲液)或 pH 9.0(甘氨酸-氢氧化钠缓冲液),该条件下的 $t_{1/2}$ 分别为 36.1 和 18.3 min; Cu^{2+} 对酶活有促进作用;该酶对丙醛、丁醛和戊醛等底物的催化效率较高;以乙醛为底物, GabD4 的 K_m 、 V_{\max} 分别为 6.86 mmol/L 和 20.6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 。

参 考 文 献

- [1] GOKARN R R,SELIFONOVA O V,JESSEN H J,et al. 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds[P]. US,7186541. 2007-3-6.
- [2] HAAS T,MEIER M,BROSSMER C,et al. Process for the production of 3-hydroxypropionic acid or a salt thereof[P]. US,5831121. 1998-11-3.
- [3] BEHR A,BOTULINSKI A,CARDUCK F J,et al. Process

2.3.5 酶促反应动力学

酶浓度约 1 mg/mL,以乙醛为底物,在 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)、37 ℃ 下考察重组 GabD4 的动力学参数,结果见图 6。当乙醛浓度为 2~14 mmol/L,酶促反应速率逐渐达到最大值;当乙醛浓度为 14~24 mmol/L,酶促反应速率基本维持最大值,说明过量的底物不会抑制酶反应。选取乙醛浓度 2~10 mmol/L 范围内测定 GabD4 的酶反应速率,绘制 Lineweaver-Burk 动力学图,经计算得到 K_m 、 V_{\max} 分别为 6.82 mmol/L 和 20.6 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 。

- for preparing alkali metal salts of 3-hydroxypropionic acid [P]. US, 5321156. 1994 - 6 - 14.
- [4] BHATTACHARYYA S K, DAS C K. Pressure effect and mechanism in the acid-catalyzed hydration of acrylic acid [J]. Journal of the American Chemical Society, 1969, 91 (24): 6 715 - 6 720.
- [5] RAJ S M, RATHNASINGH C, JO J E, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain [J]. Process Biochemistry, 2008, 43 (12): 1 440 - 1 446.
- [6] KUMAR V, ASHOK S, PARK S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid [J]. Biotechnology Advances, 2013, 31 (6): 945 - 961.
- [7] RAJ S M, RATHNASINGH C, JUNG W C, et al. Effect of process parameters on 3-hydroxypropionic acid production from glycerol using a recombinant *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84 (4): 649 - 657.
- [8] RATHNASINGH C, RAJ S M, JO J E, et al. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 104 (4): 729 - 739.
- [9] ASHOK S, RAJ S M, KO Y, et al. Effect of *puuC* overexpression and nitrate addition on glycerol metabolism and anaerobic 3-hydroxypropionic acid production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ glpK Δ dhaT [J]. Metabolic Engineering, 2013, 15: 10 - 24.
- [10] KIM K, KIM S K, PARK Y C, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by modulation of glycerol metabolism in recombinant *Escherichia coli* [J]. Bioresource Technology, 2014, 156: 170 - 175.
- [11] CHU H S, KIM Y S, LEE C M, et al. Metabolic engineering of 3-hydroxypropionic acid biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112 (2): 356 - 364.
- [12] JO J E, RAJ S M, RATHNASINGH C, et al. Cloning, expression, and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81 (1): 51 - 60.
- [13] HÉBERT E M, RAYA R R, DE GIORI G S. Use of SDS-PAGE of cell-wall proteins for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus helveticus* [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22 (12): 1 003 - 1 006.
- [14] 王侃, 刘次全, 曹槐, 等. 大肠杆菌 mRNA 编码区长度, 形成二级结构倾向与密码子偏好性的关系 [J]. 微生物学报, 2006, 46 (6): 895 - 899.
- [15] 周琴, 陈金春, 陈国强. 高效启动子在微生物生产 4-羟基丁酸中的应用 [J]. 生物工程学报, 2012, 28 (1): 48 - 55.
- [16] PORATH J, CARLSSON J, OLSSON I, et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation [J]. Nature, 1975, 258 (5 536): 598 - 599.
- [17] 张波涛, 张荣珍, 王磊, 等. 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) YX-1 耐有机溶剂葡萄糖脱氢酶的基因克隆与酶学性质 [J]. 微生物学报, 2013, 53 (6): 561 - 568.
- [18] 陈晟. 嗜热单胞菌角质酶的基因鉴定, 高效表达及分子改造 [D]. 无锡: 江南大学, 2009.

Heterologous expression, purification and enzymatic characterization of succinate-semialdehyde dehydrogenase GabD4

JIA Dong-xu^{1,2}, LIU Dong^{1,2}, ZHENG Yu-guo^{1,2*}

1 (Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

2 (Engineering Research Center of Bioconversion and Biopurification of the Ministry of Education, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT The synthesis of succinate-semialdehyde dehydrogenase GabD4 gene, its expression in *Escherichia coli* and purification were described herein. The enzymatic characterization was analyzed. The study showed that the optimal reaction temperature of GabD4 was 37 °C. The optimal reaction pH was pH 7.5 in phosphate buffer or pH 9.0 in glycine-NaOH buffer. Among several divalent metal ions, Cu²⁺ had stimulative effect on enzyme activity. Furthermore, GabD4 preferred to catalyze aldehyde substrates containing 3 ~ 5 carbon, and it had a Michaelis constant (K_m) of 6.86 mmol/L and V_{max} of 20.6 μ mol/(min · mg protein) with acetaldehyde as substrate. These results could provide more information for research on enzymatic properties of GabD4.

Key words aldehyde dehydrogenase; recombinant expression; protein purification; enzymatic properties