

甲酸脱氢酶基因在大肠杆菌 Rosetta 中的高效表达*

徐 炯, 贾红华, 何冰芳, 韦 萍

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 江苏 南京, 210009)

摘 要 甲酸脱氢酶是氧化还原酶辅酶 NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 再生循环体系中的关键酶。实验中, 用 PCR 方法扩增了假丝酵母 *Candida boidinii* 中甲酸脱氢酶基因(*fdh*), 分别构建了诱导型表达载体 pUC-*fdh* 和 pET-*fdh*, 以 *E. coli* Rosetta 为表达宿主, 获得了能够高效表达甲酸脱氢酶的重组菌。经诱导后重组菌 Rosetta/pET-*fdh* 的 FDH 比酶活为 0.399 U/mg(蛋白), Rosetta/pUC-*fdh* 的 FDH 比酶活为 0.163 U/mg(蛋白)。经 SDS-PAGE 分析, Rosetta/pET-*fdh* 和 Rosetta/pUC-*fdh* 表达的 FDH 蛋白分别占菌体可溶性总蛋白的 17% 和 10%, 实现了 *fdh* 基因在 Rosetta 中的高效表达。研究中所构建的重组菌为氧化还原反应中的辅酶再生奠定了良好的基础。

关键词 辅酶再生, 甲酸脱氢酶, 甲酸脱氢酶基因, 高效表达

氧化还原反应是工业过程和生物体中最普遍的反应, 氧化还原酶催化的反应一般都需要辅酶, 而这些辅酶价格昂贵, 因此在生物催化产业中氧化还原体系普遍存在辅酶再生问题^[1]。在所有氧化还原酶所需辅酶中, NAD(P)⁺-NAD(P)H 体系占 80% 左右。人们已从电化学法、光化学法等多角度来开发辅酶再生技术, 酶法再生 NAD(P)H 依然是首选方法, 并有成功工业化的报道。德国 Degussa 公司使用甲酸脱氢酶进行辅酶 NAD⁺-NADH 的循环, 由亮氨酸脱氢酶(LeuDH)合成 L-叔亮氨酸, 该反应的转化率达 74%^[2]。美国施贵宝公司在利用白地霉脱氢酶不对称还原 4-氯-3-羧基丁酸甲酯合成(s)-4-氯-3-羟基丁酸甲酯的规模化生产中, 使用葡萄糖脱氢酶进行辅酶 NADP⁺-NADPH 的循环, 该反应的产率为 95%^[2,3]。

甲酸脱氢酶(NAD-dependent formate dehydrogenase, EC1.2.1.2, 简称 FDH)广泛存在于甲醇利用型的细菌及酵母中, 是 NAD⁺-NADH 辅酶循环中研究最多的酶^[4]。随着基因工程技术的发展, 已有多种不同来源的甲酸脱氢酶基因(formate dehydrogenase gene, 简称 *fdh*)在原核生物中被克隆表达。1986 年以来, Anthony^[5], Allen^[6], Susana^[7]等先后报道了关于 *fdh* 表达方面的研究情况。

本研究克隆了假丝酵母 *Candida boidinii* 中的甲酸脱氢酶基因, 构建了重组质粒 pET-*fdh* 和 pUC-

fdh, 转化入大肠杆菌 Rosetta 中进行表达, 获得了甲酸脱氢酶高产菌株, 为构建出有工业应用潜力的良好的辅酶再生体系奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 质粒与菌株

质粒 pUC19, pET22b 均由本实验室保存; 大肠杆菌 Rosetta(DE3)由南京工业大学基因工程研究室保存。含假丝酵母(*Candida boidinii*)甲酸脱氢酶 cDNA 序列(*fdh*, 含有 1095 bp, 编码 365 个氨基酸)的质粒 T-*fdh*, 由清华大学曹竹安教授惠赠。

1.1.2 培养基及培养条件

LB 培养基^[8], 用于细菌培养, 培养温度 37℃。抗生素使用浓度为氨苄青霉素 100 μg/mL。

1.1.3 主要试剂

异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG), 购自上海生物工程公司; LA Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI*、*NdeI*, DNA Marker、T4 DNA 连接酶、小量胶回收试剂盒, 购于宝生物(大连)生物工程有限公司(TaKaRa); 质粒提取试剂盒, 购于北京博大泰克生物基因技术有限公司; PCR 引物由宝生物(大连)生物工程有限公司合成; 其余试剂和药品均为进口或国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 *fdh* 基因的扩增

根据 Sakai 等^[9]报道的序列, 设计分别带有限制性酶切位点的 3 条引物(下划线代表酶切位点)。*fdh* F1: 5'-ATAGGATCCCATGAAGATCGTTT-

第一作者: 硕士研究生(何永芳教授为通讯作者)。

* 国家 973 项目(2003CB716004), 国家自然科学基金项目(20336010)

收稿日期: 2006-11-17, 改回日期: 2007-01-25

TAGTCTT-3' 带有 *Bam*HI 酶切位点; *fdh* F2:5'-CGCCATATGAAGATCGTTTTAGTCTTATA-3' 带有 *Nde*I 酶切位点; *fdh* R:5'-CGCGAATTCT-TATTTCTTATCGTGTTTAC-3' 带有 *Eco*RI 酶切位点。PCR 扩增条件: 95℃预变性 3 min; 再按下列参数进行循环反应, 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min 20 s, 30 个循环; 72℃延伸 5 min, 冷却至 4℃, 结束反应。采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2 表达载体的构建

以质粒 T-*fdh* 为模板, 将以 *fdh* F1 和 *fdh* R 扩增出的 *fdh* 基因用 *Bam*HI、*Eco*RI 酶切后与进行相同酶切的 pUC19 相连, 构建了重组质粒 pUC-*fdh*; 以 *fdh* F2 和 *fdh* R 扩增出的 *fdh* 用 *Nde*I 和 *Eco*RI 酶切后与经相同酶切的 pET22b 相连(去除了 pET22b 的信号肽 pB1 序列), 构建了重组质粒 pET-*fdh*。重组质粒经热休克法^[8]转化入 *E. coli* Rosetta 中。以载体所带氨苄青霉素抗性筛选阳性转化子 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh*。阳性重组子采用菌落 PCR^[10]和提取质粒双酶切进行鉴定。质粒 DNA 的分离纯化、感受态细胞的制备等参考文献^[8]及试剂盒说明书进行。

1.2.3 甲酸脱氢酶的诱导表达

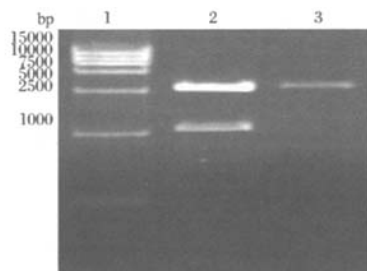
将重组子 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh* 接种至含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37℃, 180 r/min 培养过夜后, 按 1% 接种量接种至新鲜 LB 培养基中(100 μg/mL 氨苄青霉素), 37℃, 180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.9 时, 加入诱导剂 IPTG(终浓度 1 mmol/L), 30℃诱导 4 h 之后测定 FDH 活力。

1.2.4 甲酸脱氢酶酶活的测定^[7]

取经诱导的菌液离心(4℃, 5 000 r/min, 10 min), 菌泥用 pH7.5 的 10 mmol/L K_3PO_4 缓冲液(含 0.1 mol/L 巯基乙醇)重悬, 超声破碎细胞(功率 200~400 W, 超声 5 s, 间歇 5 s, 共 5 min), 离心(4℃, 11 000 r/min, 15 min), 取上清液 0.5 mL, 加入到 5 mL 反应体系中(1.67 mmol/L NAD^+ , 167 mmol/L 甲酸钠, 100 mmol/L 巯基乙醇, pH7.5 磷酸钾缓冲), 30℃水浴, 在 340 nm 处测定吸光值的上升。

配制不同浓度的 NADH 标准溶液(0~0.2 mmol/L)在 340 nm 处测定吸光值, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y(NADH \text{ 浓度}) = 0.20215x(\text{吸光值}) - 0.00204$, $R = 0.99971$, 根据方程计算 FDH 酶活。

酶活定义为每分钟生成 1 μmol NADH 所需要的酶量为 1 个酶活单位 U。

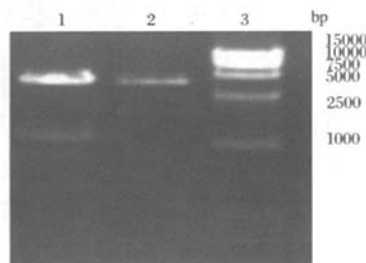


1—Marker DL15 000, 2—pUC-*fdh*/BamHI+EcoRI

图1 重组质粒 pUC-*fdh* 的双酶切电泳图

1.2.5 SDS-PAGE 检测表达产物

取诱导后的菌液超声破碎后, 离心取上清液进行 SDS-PAGE 分析。采用 4% 的浓缩胶, 12.5% 的分离胶, 电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[11], 以牛血清白蛋白 BSA 为标准品。



1—pET-*fdh*/NdeI+EcoRI, 2—pET22b/NdeI+EcoRI, 3—Marker DL15 000

图2 重组质粒 pUC-*fdh* 的双酶切电泳图

2 结果与讨论

2.1 甲酸脱氢酶基因 *fdh* 克隆与表达载体的构建

按照方法 1.2.1 扩增 *fdh* 基因, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测在 1 100 bp 左右有一明显条带, 与已报道的 *fdh* 序列大小一致^[9]。

扩增出的 *fdh* 基因片段经测序后发现与 Sakai 等^[9]报道的序列有 3 个碱基不同, 氨基酸序列有 2 处不同, 分别是 Asp-9-Gly 与 Met-308-Thr, 这可能是因为来源于不同菌株的假丝酵母所致。这 2 个氨基酸位于酶的非活性部位^[12,13], 推测不会影响甲酸脱氢酶的活性而进行后续克隆与表达。

PCR 产物纯化后经限制性内切酶双酶切后, 与经同样内切酶酶切的载体连接得到 pUC-*fdh* 与

pET-*fdh*, 连接液转化到大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞, 得到重组子 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh*。提取重组子质粒分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI; *Nde*I 和 *Eco*RI 进行双酶切鉴定。图 1 和图 2 显示 pUC-*fdh* 和 pET-*fdh* 在 1 100 bp 左右比空载体多出一条带, 与插入的外源基因 *fdh* 大小一致, 表明外源基因已成功地插入到载体中。

2.2 *fdh* 在 *E. coli* Rosetta 中的诱导表达

重组子 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh* 经诱导表达之后的甲酸脱氢酶酶活见图 3。加入诱导剂 IPTG 诱导后重组菌 Rosetta/pUC-*fdh* 的比活力为 0.163 U/mg(蛋白), Rosetta/pET-*fdh* 的比活力为 0.339 U/mg(蛋白), 而空宿主或未经诱导的重组子基本不存在甲酸脱氢酶酶活。Rosetta/pET-*fdh* 的甲酸脱氢酶比酶活比 Rosetta/pUC-*fdh* 高 1 倍。在 Rosetta/pUC-*fdh* 中有较高的本底表达(-IPTG), 但诱导后酶活并不高。而 Rosetta/pET-*fdh* 中的本底表达低, 诱导后能产生大量的 FDH 酶活, 该现象在 SDS-PAGE 电泳图中也能看出, 表明在 Rosetta 中表达 *fdh* 时载体 pET 体系显著优于 pUC 体系。Susana 等^[7]将 *C. boidinii* 中甲酸脱氢酶 cDNA 序列 *fdh1* 克隆至质粒 pSBF2 上, 转化入 *E. coli* BSI 中, 所得重组菌 FDH 比酶活为 0.284 U/mg 蛋白。本研究中 Rosetta/pET-*fdh* 比报道的 BSI/pSBF2 表达的甲酸脱氢酶酶活高出约 20%。不同的质粒载体对于 *fdh* 基因表达的影响可能是由于启动子不同造成的, pET 采用 T7 强启动子, 表达效率高。同时 pUC 质粒的拷贝数较高, 本底表达高导致质粒不稳定可能反而影响表达, 在表达过程中也有可能形成了包涵体, 导致酶活较低。

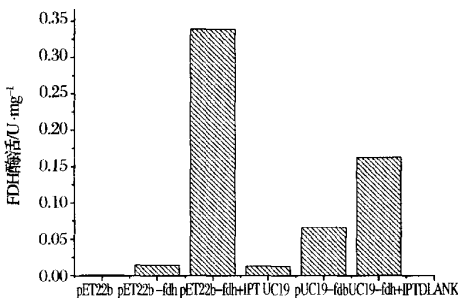
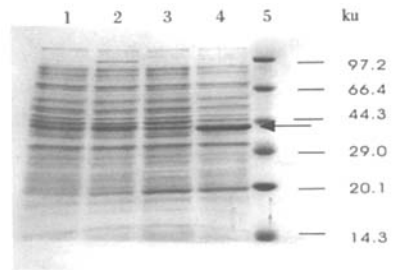


图3 两种重组菌 FDH 表达酶活比较

2.3 SDS-PAGE 检测表达产物

将诱导后的重组菌 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh* 破碎后取上清液进行 SDS-PAGE, 同时以未经诱导的重组菌作为对照, 电泳结

果见图 4。经诱导后的重组菌 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh* 在 40 ku 左右处均有一明显条带, 与甲酸脱氢酶的分子质量大小一致。经测定分析, pUC-*fdh* 表达的 FDH 占全菌可溶性蛋白的 10%, pET-*fdh* 表达的 FDH 约占全菌可溶性蛋白的 17%。pET-*fdh* 的表达量明显高于 pUC-*fdh*, 同时也高于 Allen 等人^[6]构建的重组菌的 FDH 表达量(占全菌可溶性蛋白 15%), 进一步说明 FDH 在重组菌 Rosetta/pET-*fdh* 中得到了高效的表达。



1-pUC-*fdh*, 2-pUC-*fdh*+IPTG, 3-pET-*fdh*,
4-pET-*fdh*+IPTG, 5-蛋白 Marker

图4 不同重组菌的 SDS-PAGE 电泳图谱

文中的甲酸脱氢酶基因 *fdh* 来自于假丝酵母 *C. boidinii*, 分析密码子后发现, 该基因中存在多个大肠杆菌稀有密码子。本研究曾将重组质粒转化入 *E. coli* DH5α 中, 经诱导后并未测出 FDH 酶活(结果未列出), 推测由于稀有密码子的存在影响了 FDH 蛋白的表达。Rosetta 菌株补充了四种大肠杆菌稀有密码子的 tRNA, 改善了由于密码子使用频率不同而引起的一些真核蛋白低表达问题。从测得酶活的数据分析, 采用 Rosetta 较有效地解决了稀有密码子的问题。重组菌 Rosetta/pET-*fdh* 的酶活和蛋白表达量均高于其它重组质粒, 说明采用 pET22b 作为载体能够明显提高 *fdh* 基因在大肠杆菌 Rosetta 中的表达。

3 结论与展望

将来源于真核生物假丝酵母中的甲酸脱氢酶基因 *fdh* 克隆到 pUC19 和 pET22b 载体上, 并转化到 *E. coli* Rosetta 中, 成功构建了基因工程菌 Rosetta/pUC-*fdh* 和 Rosetta/pET-*fdh*, 经 IPTG 诱导能够高效表达甲酸脱氢酶。Rosetta/pET-*fdh* 的比酶活比 Rosetta/pUC-*fdh* 约高 1 倍。经 SDS-PAGE 测定, pUC-*fdh* 表达的 FDH 占全菌总蛋白的 10%, pET-*fdh* 表达的 FDH 占全菌总蛋白的 17%。由此

表明来自于 *C. boidinii* 的 *fdh* 基因在以 pET 为载体以大肠杆菌 Rosetta 为表达宿主中实现了高效表达。

重组菌 Rosetta/pET-*fdh* 为构建良好的辅酶 NADH 再生体系奠定了基础,但是由于该体系还需 IPTG 诱导,IPTG 的菌体毒性及低浓度的诱导不利于目的产物的大量获取。今后将进一步利用组成型启动子的重组质粒,如改造成非诱导体系,以适应工业化生产的需要;同时还考虑将其应用于重要的氧化还原反应,构建双酶或多酶偶联反应体系,大幅度提高辅酶循环再生的效率,以期提高该体系的工业应用价值。

参 考 文 献

- 张 翀,邢新会. 辅酶再生体系的研究进展[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 811~816
- 许建和,杨立荣,孙志浩,等. 迅速发展中的不对称生物催化技术[J]. 生物加工过程, 2005, 3(3): 1~6
- 吕陈秋,姜忠义,王姣. 烟酰型辅酶 NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 再生的研究进展[J]. 有机化学, 2004, 24 (11): 1 366~1 379
- Vladimir O P, Victor S L. NAD⁺-dependent formate dehydrogenase[J]. Biochem J, 1994, (301): 625~643
- Anthony P S, Elizabeth C O, Michael A R. Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of the Formate Dehydrogenase Genes from *Methanobacterium formicicum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(28): 12 942~12 947
- Allen S J, Holbrook J J. Isolation, sequence and overexpression of the gene encoding NAD-dependent formate dehydrogenase from the methylotrophic yeast *Candida methylolica*[J]. GENE, 1995, 162: 99~104
- Susana J, Berrios-Rivera. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase[J]. Metabolic Engineering, 2002, (4): 217~229
- 萨姆布鲁克[美]. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- Sakai Y, Murdanoto A P, Konishi T, et al. Regulation of the Formate Dehydrogenase Gene, FDH1, in the Methylotrophic Yeast *Candida boidinii* and Growth Characteristics of an FDH1-Disrupted Strain on Methanol, Methylamine, and Choline[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179 (14): 4 480~4 485
- 陈书霞,王晓武,房玉林. 单菌落 PCR 法直接快速鉴定重组克隆[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 52~56
- Bradford M. A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248~255
- Nikolaos E L, Daniel J R. Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase[J]. Biochem J, 2001, (354): 455~463
- Heike S, Stephan F, Maria R, et al. Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 1 280~1 289

Effective Expression of NAD-dependent Formate Dehydrogenase Gene in *E. coli* Rosetta

Xu Xian, Jia Honghua, He Bingfang, Wei Ping

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology Nanjing, 210009, China)

ABSTRACT Formate dehydrogenase(FDH) is the key enzyme in NAD(P)⁺-NAD(P)H coenzyme regeneration system. In this article, NAD⁺-dependent formate dehydrogenase gene(*fdh*) was amplified from genome DNA of *Candida boidinii* by PCR, and constructed recombinant plasmids pET-*fdh* and pUC-*fdh* which were then transformed into *E. coli* Rosetta respectively. The enzymatic activity of FDH in Rosetta/pET-*fdh* is 0.399 U/mg protein, while in Rosetta/pUC-*fdh* is 0.163 U/mg protein. SDS-PAGE showed that the expression of FDH in Rosetta/pET-*fdh* and Rosetta/pUC-*fdh* is 10% and 17% of all total soluble protein respectively. This study laid good foundation for the coenzyme regeneration system.

Key words coenzyme regeneration, formate dehydrogenase, *fdh*, effective expression