

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :321 - 329; 4 March 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140260

灰盖鬼伞过氧化物酶功能表达及部分酶学特性

董冰雪¹, 牛秋红¹, 张伟², 耿三春¹, 李鹏¹, 远万里¹, 贡一峰¹, 梁珂维¹

南阳师范学院,¹ 生命科学与技术学院,² 校医院, 河南 南阳 473061

摘要:【目的】旨在用毕赤酵母高效表达灰盖鬼伞过氧化物酶。【方法】借助 DNAworks 3.1 软件设计、优化引物, 用自己构建的基因合成、定点突变平台合成了毕赤酵母密码子偏好性的灰盖鬼伞过氧化物酶基因, 测序后构建在表达载体 pPICZ α A 上, 整合于巴斯德毕赤酵母 GS115 染色体, 来自酿酒酵母的 α 因子作为信号肽序列指导重组蛋白的分泌表达。从 82 个 PCR 检测为阳性的酵母转化子中筛选出 6 株高 Zeocin 抗性的菌进行表达, 选表达酶活性最高的作为实验菌株命名为 CIP/GS115。【结果】以 ABTS 为底物时, CIP/GS115 在甲醇诱导第 4 天酶活最高达到 487.5 U/mL, 是目前摇瓶培养诱导表达灰盖鬼伞过氧化物酶活性最高报道。纯化后的酶最适反应温度为 25℃, 45℃ 酶反应速度是最适温度时的 61.5%, 在低于 40℃ 时比较稳定, 超过 45℃ 稳定性迅速下降。最适反应 pH 为 5.0, 在 pH 4.5 - 6.5 之间比较稳定。以不同的底物研究纯酶底物特异性发现最适底物的顺序是: ABTS > 愈创木酚 > 2,6-二甲氧苯酚 > 2,4-二氯苯酚 > 苯酚。【结论】灰盖鬼伞过氧化物酶在毕赤酵母中的高效分泌表达和高的特殊活性为该酶在废水处理、染料脱色等方面的工业化应用奠定了一定基础。

关键词: 灰盖鬼伞过氧化物酶, 基因合成, 毕赤酵母表达

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209(2015)03-0321-09

过氧化物酶 (EC 1.11.1.7) 广泛存在于动物、植物和微生物体内, 是一类以铁卟啉为辅基、过氧化氢为电子受体的氧化还原酶, 可氧化多种有机和无机分子, 在免疫检测、生物传感器、工业废水处理方面有着重要的应用前景^[1-2]。过氧化物酶家族中研究最多、应用范围最广的是植物来源的辣根过氧化物酶 (*horseradish peroxidase* HRP), 但是, HRP 的生产受到地域和气候的限制, 产量低、周期长, 使其在工业上的应用受到限制。由墨汁鬼伞菌分泌的灰盖鬼伞过氧化物酶 (*Coprinus cinereus* Peroxidase CIP) 一经报道就引起了人们的极大关注。该酶最先由

Shinmen 分离纯化出来^[3], 含 343 个氨基酸, 尽管 CIP 和 HRP 的同源性不超过 10% - 16%, 酶学特性和底物广谱性却非常相似^[4]。研究发现它可以参与清除废水中的酚类物质^[5-8], 降解苯类物质^[9-10], 催化染料脱色^[11], 可用作清洁剂^[12]、生物传感器^[13] 等, 在纸浆造纸工业中也极具应用潜力, 是一种有望代替 HRP 成为有广阔应用前景的工业用酶。

实现 CIP 工业化应用的前提是获得高活性、成本低廉的酶。由墨汁鬼伞直接发酵表达 CIP 周期相对较长、产量较低, 限制了其工业化应用, 这就需要

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31300669); 河南省科技厅科技攻关项目 (112102210385, 142102210479); 南阳师范学院高层次人才科研启动项目 (zx20110007); 河南省教育厅科学技术重点研究项目 (13A18081, 14B180003)

作者简介: 董冰雪 (1977 -), 女, 博士, 讲师, 研究方向为基因工程。E-mail: dongbingxue2004@163.com

收稿日期: 2014-05-17; **修回日期:** 2014-09-26

有一个经济、高效的表达系统。迄今为止, CIP 已经在大肠杆菌^[14]、曲霉^[15]、酵母^[16-17]中得到异源表达。用大肠杆菌表达只能得到无活性的包含体, 曲霉表达则存在周期长、酶活低的特点, 和墨汁鬼伞直接表达相比提高不大, 用酿酒酵母表达还可能出现过度糖基化影响活性, 这些都限制了 CIP 的工业化应用。毕赤酵母表达系统具有生长周期短、遗传操作方便、能够进行真核修饰(二硫键形成、糖基化、蛋白加工)而且可以进行高密度发酵, 目的蛋白易纯化等特点^[18], 近年来毕赤酵母成为蛋白异源表达的优选系统。毕赤酵母表达外源基因时高 A + T 含量经常导致转录提前终止; 偏好性密码子的使用程度和基因表达水平成正比。因此, 在毕赤酵母中直接表达 CIP 的 cDNA 经常由于密码子问题导致表达量偏低、不适合工业化应用。密码子的最优化及 A、T 含量调整可能是解决表达量的一种办法。

本实验借助 DNAworks 3.1 软件设计、优化引物, 用自己构建的基因合成及定点突变平台合成了毕赤酵母密码子偏好性的灰盖鬼伞过氧化物酶基因, 连接在毕赤酵母表达载体 pPICZ α A 上, 整合于毕赤酵母 GS115 染色体。来自酿酒酵母的 α 因子作为信号肽序列指导蛋白分泌表达, 选高活性的转化子作实验菌成功地分泌表达了灰盖鬼伞过氧化物酶。通过优化密码子、从高 Zeocin 抗性转化子中筛选表达酶活性最高的作工程菌、调整诱导初始细胞密度和向培养基中添加不同添加剂等几种措施大大提高了酶的产量。使用毕赤酵母表达 CIP 发酵周期短、表达量大、活性高、生产成本低, 为该酶的工业化应用奠定了一定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 由中山大学陆勇军教授惠赠, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B 由本实验室保存; 本实验所用质粒 pPICZ α A、pUC19 由本实验室保存。

1.1.2 培养基及主要溶液: 低盐 LB (0.5% 酵母提取物, 1% 蛋白胨, 0.5% NaCl, pH 7.5) 用于培养含 pPICZ α A 系列质粒的大肠杆菌; 其它大肠杆菌的培养使用常规 LB 培养基; YPD 培养基 (1% 酵母提取物, 2% 葡萄糖, 2% 蛋白胨) 用于毕赤酵母扩增;

YPDS 培养基 (YPD 培养基添加 1 mol/L 山梨醇) 用于酵母转化; BMGY 培养基 (1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 1.34% YNB, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6.0), 4×10^{-5} % 生物素, 1% 甘油) 和 BMMY 培养基 (0.5% 甲醇代替甘油, 其它成分同 BMGY) 用于酵母表达。NPI-10 Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑)、NPI-20 Buffer (咪唑 20 mmol/L, 其余同 NPI-10) 和 NPI-500 Buffer (咪唑 500 mmol/L, 其余同 NPI-10) 用于蛋白纯化。

1.1.3 试剂: 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ABTS)、2,6-二甲氧苯酚 (2,6-Dimethoxyphenol 2,6-DMP)、愈创木酚 (guaiacol)、苯酚和 2,4-二氯苯酚 (2,4-Dichlorophenol 2,4-DCP) 购自 Sigma 公司; 蛋白胨和酵母抽提物购自 Oxid 公司; 化学试剂均为分析纯, 购自上海生工; Zeocin 抗生素购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶购自 Toyobo 公司; Prime-STAR HS DNA 聚合酶和连接酶购自 TaKaRa 公司, DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Ugene 公司; 蛋白纯化离心柱 Ni-NTA Spin Columns 购自 Qiagen 公司; EndoH 购自 New England Biolab 公司。

1.2 灰盖鬼伞过氧化物酶表达载体的构建

借助 DNAworks 3.1 软件设计、优化 40 bp 长的基因拼装引物, 两端加上 *Sac* II 和 *Eco*R I 酶切位点; 毕赤酵母密码子偏好性的 CIP 基因由实验室构建的基因合成及定点突变平台合成^[19], 克隆于载体 pUC19 上测序。用 *Sac* II 和 *Eco*R I 从测序结果正确的重组 pUC19 质粒切下 CIP 基因, 连接到用同样酶处理的 pPICZ α A 上, 形成的新质粒命名为 pPICZ α A-Cip 质粒, 转化大肠杆菌 DH10B, 在含有 25 mg/L Zeocin 的低盐 LB 平板上筛选转化子, 并通过 *Sac* II、*Eco*R I 双酶切和 PCR 对重组质粒进行检测。

1.3 毕赤酵母转化及转化子的筛选

提取 pPICZ α A-Cip 质粒用 *Sac* I 进行线性化处理并回收, 根据毕赤酵母使用操作册制做感受态细胞; 向 100 μ L 感受态细胞中加入 5-10 μ g 线性化 DNA 混匀, 转入电击杯, 冰上孵育 5 min, 设置电压 1800 V, 使用 eppendorf 公司的电穿孔仪转化毕赤酵母 GS115; 加入 1 mol/L 的山梨醇 30 $^{\circ}$ C 静止孵育 1 h, 涂布在含有 100 mg/L Zeocin 的 YPDS 平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2-3 d。挑取转化子用载体 pPICZ α A

上的一对引物 (AOX5: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'; AOX3: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') 和 CIP 基因上最外侧的一对引物 (CIP1: 5'-GCCAATTCGCTGTTTGCCAGAT-3'; CIP52: 5'-TCCCCGCGGAGCAGGTCCATCAA-3') 做巢式 PCR 检测 CIP 基因在毕赤酵母染色体上的整合, 随机挑选 82 个 PCR 阳性的菌落用灭菌牙签点在含有 1000 mg/L Zeocin 的 YPD 平板上进行高抗筛选。将从高抗平板上筛到的 6 个克隆进行小量表达, 选出产酶活性最高的克隆定名为 CIP/GS115, 用作后面的实验菌株。

1.4 重组 CIP 在毕赤酵母中表达条件的优化

平行接种 CIP/GS115 单菌落至多个含有 5 mL BMGY 培养基的 20 mL 小瓶子内, 30°C 摇床培养 24 h; 将 5 mL 培养液转入含有 150 mL BMGY 培养基的 500 mL 三角瓶扩大培养, 4 层纱布封口, 30°C 摇床培养过夜至 OD_{600} 达到 2-6; 离心收集菌体重悬于含 20 mL BMMY 培养基的 150 mL 三角瓶中, 使 OD_{600} 分别为: 1、5、10、20、30 和 40, 每种分成等量的 2 份, 其中一份按文献报道在诱导初加入 0.8% 的丙氨酸^[20]、0.5 g/L 的氯化血红素^[21], 另一份仅使用 BMMY, 2 层纱布封口, 29°C 摇床培养, 每隔 24 h 加甲醇至终浓度 0.5% 保持诱导, 每个实验 3 个重复。

1.5 重组 CIP 活性检测

酶活性测定用 ABTS 法^[22]: 向含有 0.5 mmol/L ABTS 的缓冲液 (pH 5.0) 中加入适量的酶液, 25°C 保温数分钟, 再加入 0.1 mmol/L H_2O_2 起始反应。利用 Bio-rad EXL 800 酶标仪测量 405 nm 光吸收值的增加, 根据比尔定律 ($A = \epsilon bc$) 计算反应体系内生成的蓝绿色 ABTS 阳离子的量。以一分钟内氧化 1 μ mol ABTS 至蓝绿色阳性离子所需要的酶量定义为一个酶活单位 (U) ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$)。每毫升酶液中酶活计算公式: $A \times$ 反应体系 \times 酶液稀释倍数 \times 酶液的体积⁻¹ \times 光程长⁻¹ $\times \epsilon^{-1}$ 。

1.6 重组 CIP 的纯化、分子量及酶浓度测定

按照优化后的方案诱导蛋白, 收集发酵 96 h 的培养物 8 mL, 10000 $\times g$ 离心取上清, 装入透析袋, 用 PEG-6000 浓缩至 1.5 mL。使用 Qiagen 公司的 Ni-NTA Spin column, 参照蛋白纯化试剂盒说明书进行蛋白纯化。SDS-PAGE 凝胶电泳检测酶的纯度、估算分子量。以 NPI-500 Buffer 为空白参照, 用 Thermo scientific manodrop 2000 微量紫外分光光度

计 280 nm 下测定酶蛋白的浓度 ($\epsilon = 1.597 \times 10^4 L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$)。

1.7 重组 CIP 去糖基化

纯化后蛋白的去糖基化参照 New England Biolab 公司 EndoH 使用说明书进行操作。

1.8 重组 CIP 酶学特性研究

1.8.1 pH 对酶反应的影响: 使用 Mellvaine' s citrate-phosphate (pH 2-2.5) 和 Britton Robinson Buffer (pH 3.0-9.0) 作为缓冲液, 200 μ L 反应体系含 44.7 ng (0.003 μ L) 纯化的重组 CIP, 参照方法 1.5 测量酶活。随后的 pH 稳定性则是把酶在不同 pH 相应 Buffer 内 4°C 保温 2 h, 再调 pH 到最适, 25°C 测剩余酶活性。每个反应至少 3 个重复。

1.8.2 温度对酶反应的影响: 温度设置 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60°C 共 11 个温度梯度, 以 0.1 mol/L NaAC (pH 5.0) 为缓冲液, 其它条件同最适 pH 测定。温度稳定性检测, 先把酶分别置于 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60°C 保温 2 h, 冰上冷却, 再按最适条件测剩余酶活。每个反应至少 3 个重复。

1.8.3 酶学动力学参数的测定: 为了找出酶的底物特异性, 选择不同浓度的 ABTS、2,6-DMP、愈创木酚、苯酚和 2,4-DCP 作底物, 以 0.1 mol/L NaAC (pH 5.0) 为缓冲液, 反应温度设为 25°C, Bio-rad EXL800 酶标仪相应波长下测量吸光值的增加 (ABTS 使用 405 nm, 2,6-DMP 和愈创木酚使用 450 nm, 苯酚和 2,4-DCP 使用 500 nm), 计算出不同浓度底物时酶活性。动力学参数 (K_m 和 K_{cat}) 使用 Graphpad prime 5 软件中的米氏方程计算、拟合。最适底物用转化效率 (K_{cat}/K_m) 来确定。每个反应至少 3 个重复。

2 结果

2.1 毕赤酵母表达载体的构建、酵母转化

用限制性内切酶 Sac II 和 EcoR I 从测序结果正确的重组 pUC19 载体上切下 CIP 基因, 连接在用同样的酶处理过的 pPICZ α A 载体上, 形成重组质粒 pPICZ α A-Cip (图 1), 转化大肠杆菌。随机挑取转化子进行双酶切和 PCR 验证, 选鉴定为阳性的重组子提重组质粒, 用 Sac I 线性化重组质粒, 纯化后电击转化毕赤酵母 GS115。2-3 d 后从含 100 mg/L Zeocin 的 YPDS 平板上随机挑选转化

子,用巢式 PCR 检测 CIP 基因在毕赤酵母染色体上的整合。

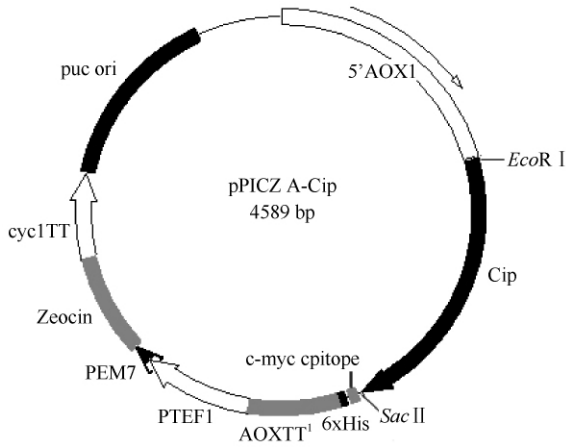


图 1. 灰盖鬼伞过氧化物酶毕赤酵母表达载体构建
Figure 1. Construction of expression vector pPICZ α A-Cip.

2.2 工程菌筛选及表达条件的优化

高抗药性筛选是获得多拷贝转化子、提高外源基因表达量的一种常用方法。为了筛选高 Zeocin 抗性的转化子,随机挑选 82 个 PCR 检测阳性的转化子于含 1000 mg/L Zeocin 的 YPD 平板上,30℃ 培养 2-3 d 后筛选出 6 个高抗克隆。将 6 个克隆进行小量表达,筛选出产酶活性最高的克隆定名为 CIP/GS115。不同物种对密码子具有一定的偏好性,为验证密码子对蛋白表达的影响,将 CIP 的 cDNA 用同样的方法整合到毕赤酵母 GS115 中,高 Zeocin 抗性筛选后从 50 个高抗克隆中挑选表达活性最高的命名为 CIPb/GS115。起始密度 OD_{600} 为 5,不添加血红素和丙氨酸条件下,同时诱导 CIP/GS115 和 CIPb/GS115 蛋白表达,二者的细胞生长速度基本一致,在第 5 天 OD_{600} 值达最高(图 2-B),随后进入稳定期并逐渐衰亡。CIP/GS115 和 CIPb/GS115 均在诱导的第 5 天达到最高酶活,和细胞生长一致,随着后期细胞衰亡,酶活逐渐下降。密码子优化后酶活达 102.9 U/mL,是优化前的 4.16 倍(图 2-A)。于是选 CIP/GS115 作为后面的实验菌株。

把 CIP/GS115 按照方法 1.4 进行优化表达,每 24 h 取样加甲醇保持诱导。不添加添加血红素和丙氨酸时,在生长的 5-6 d 达最大细胞量,随后进入稳定期,逐渐衰亡(图 3-B);添加血红素和丙氨酸达到稳定期的时间明显缩短(图 3-A),且达到稳定期时的细胞量比较大;高密度发酵时,由于营养和溶

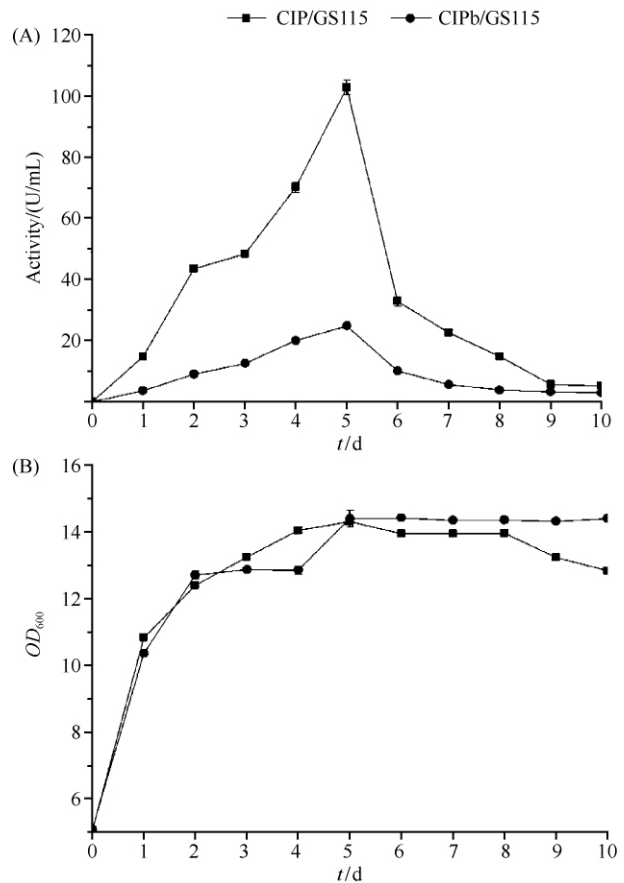


图 2. 密码子偏好性对细胞生长和重组灰盖鬼伞过氧化物酶表达的影响

Figure 2. Effect of codon bias on cell growth and expression of recombinant CIP. A: Effect of codon bias on expression of recombinant CIP; B: Effect of codon bias on cell growth; Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD.

氧量不足导致细胞生长缓慢。细胞的生长和酶的表达基本一致,达到稳定期,细胞停止生长进入衰亡,酶的表达量也随着下降,可能是细胞衰亡后释放的蛋白酶部分降解了重组 CIP 所致。以 ABTS 为底物检测酶活,不添加血红素和丙氨酸,起始密度 OD_{600} 为 10 时表达酶活最高,在诱导第 6 天达 185.8 U/mL,蛋白量 12.9 mg/mL,起始密度超过 10 OD 后随着细胞密度增加表达酶活反而下降(图 4-B)。添加血红素和丙氨酸,起始密度 OD_{600} 为 30 时表达酶活性最高,在诱导的第 4 天酶活性高达 487.5 U/mL,蛋白量为 27.9 mg/mL,以后逐渐下降,但在相当长时间内保持较高活性(图 4-A)。添加丙氨酸和血红素表达酶活明显高于直接用 BMMY 诱导,达到最高酶活时间明显缩短。

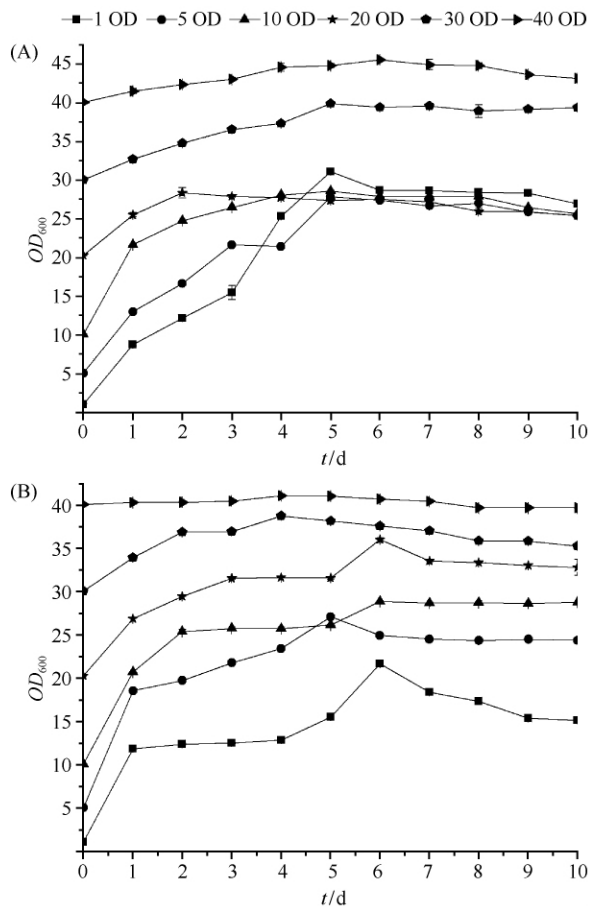


图 3. 添加剂和起始细胞密度对细胞生长的影响

Figure 3. Effect of additives and origin cell density on cell growth.

A: BMMY supplemented with 0.8% alanine and 0.5g/L hemin;

B: BMMY without additives; Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ±1 SD.

2.3 重组 CIP 的纯化、分子量及酶浓度的测定

用 Qiagen 公司的 Ni-NTA Spin column 亲和层析柱纯化蛋白, 得到 1.2 mL (851.8 U/mL) 纯酶, 回收率为 41.5%。SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝染色结果显示纯化后得到了单一条带, 大小在 43 kDa 左右, 软件推测蛋白的大小为 35.6 kDa, 用糖苷酶 EndoH 切割后大小为 36 kDa 左右 (图 5), 符合软件计算, 故推测是酵母表达引起的低度糖基化。纯化后的酶用 Thermo scientific manodrop 2000 测得浓度为 14.916 mg/mL。

2.4 酶学特性的研究

2.4.1 pH 对酶活性的影响: 测最适反应 pH 时, 以最适 pH 下的酶活为 100%, 计算其它 pH 下的相对酶活。重组 CIP 的最适反应 pH 为 5.0, pH < 5.0 时随 pH 的增大, 酶反应活性迅速增大, pH 超过 5.0

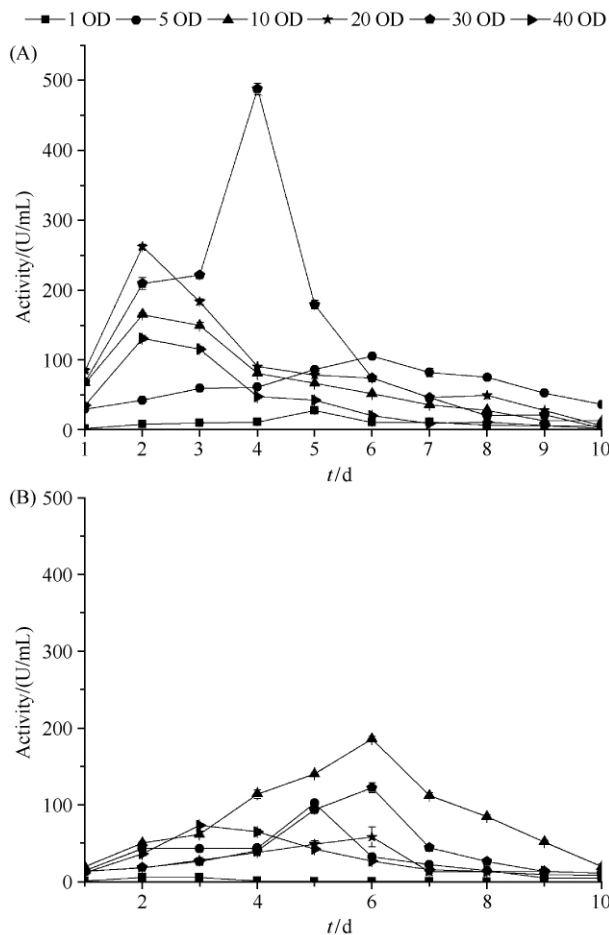


图 4. 添加剂和起始细胞密度对重组灰盖鬼伞过氧化物酶表达活性的影响

Figure 4. Effect of additives and origin cell density on expression of recombinant CIP. A: BMMY supplemented with 0.8% alanine and 0.5g/L hemin; B: BMMY without additives. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ±1 SD.

活性下降。测 pH 稳定性时则以未处理的对照为 100%, 最适条件下测各处理的剩余酶活。酶活的 pH 稳定性分析显示, 重组 CIP 在 pH4.5 - 6.5 之间比较稳定, pH5 最稳定, 预处理 2 h 酶活几乎不受影响 (图 6)。在近中性 pH 下仍然比较稳定, 推测其比较适合工业应用。

2.4.2 温度对酶活性的影响: 测酶的最适反应温度时, 以最适反应温度时的酶活性作为 100%, 计算其它温度下的相对酶活。以 ABTS 为底物, 酶的最适反应温度为 25°C, 低于 25°C, 随温度升高酶活性迅速升高; 超过 25°C 酶反应活性缓慢下降, 45°C 时酶活性仍有最适反应温度时的 61.5%。测温度稳定性则以未处理的酶作对照, 活性定为 100%, 计算各

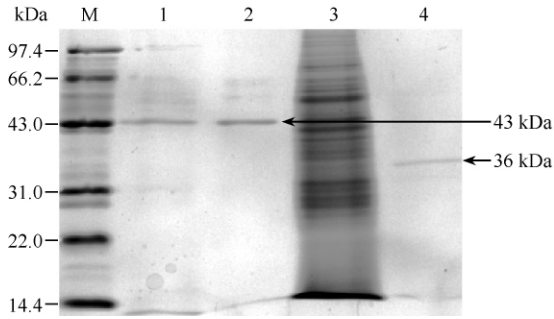


图 5. 纯化后重组灰盖鬼伞过氧化物酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of purified recombinant CIP. M: standard protein molecular mass markers, lane 1 - 2: recombinant CIP purified by Ni-NTA Spin column, lane 3: crud CIP from supernatant, lane 4: CIP digested with EndoH.

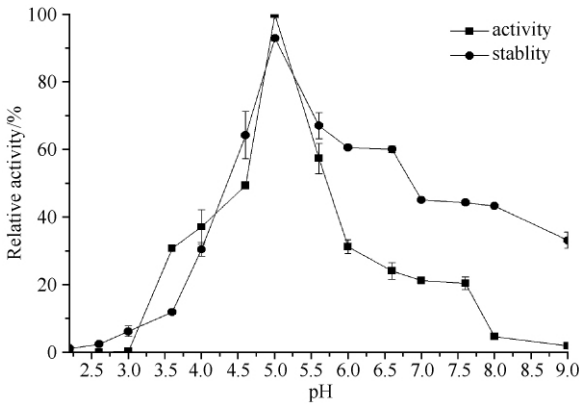


图 6. pH 对灰盖鬼伞过氧化物酶活性和稳定性的影响

Figure 6. Effect of pH on activity (squares) and stability (circles) of recombinant CIP. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD.

表 1. 不同底物下重组灰盖鬼伞过氧化物酶动力学参数和特殊酶活

Table 1. kinetic parameters and specific activity of recombinant CIP using different substrate

Substrate	$K_m / (\mu\text{mol/L})$	$K_{cat} / (\text{S}^{-1})$	$K_{cat} / K_m (\text{LS}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1})$	Activity / (U/mg)
ABTS	62.80 ± 7.771	17.190 ± 0.314	0.274	16.537
2,6-DMP	711.00 ± 9.403	0.122 ± 0.006	1.718×10^{-4}	8.891×10^{-2}
Guaiacol	150.200 ± 3.047	0.200 ± 0.005	0.001	0.227
Phenol	240.200 ± 5.090	0.003 ± 0.001	1.249×10^{-5}	3.562×10^{-3}
2,4-DCP	1494.000 ± 128.400	0.054 ± 0.0001	3.614×10^{-5}	4.827×10^{-2}

3 讨论

不同物种对遗传密码子具有一定的偏好性,酵母表达非自身基因时某些稀有密码子的出现可能会

温度处理后最适条件下的剩余酶活。结果显示,重组 CIP 稳定性超过 15°C 开始下降, 40°C 预处理 2 h 仅有 65% 左右的活性,超过 40°C 稳定性急剧下降(图 7),重组 CIP 在 $20 - 40^\circ\text{C}$ 活性比较高且稳定。

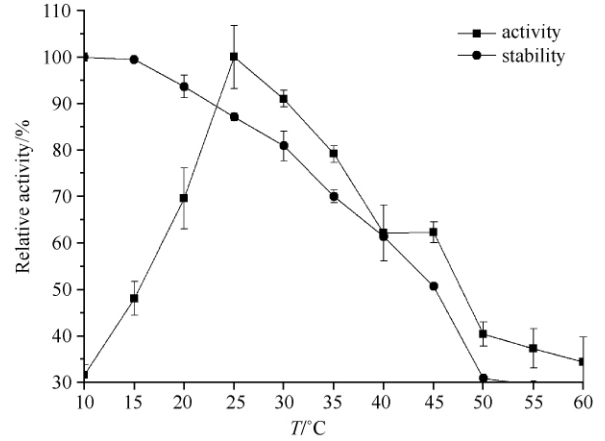


图 7. 温度对重组灰盖鬼伞过氧化物酶活性和酶稳定性的影响

Figure 7. Effect of temperature on activity (squares) and stability (circles) of recombinant CIP. Data points are the average of triplicate measurements, error bars represent ± 1 SD.

2.4.3 酶学动力学参数:酶的特异性一般用催化效率(K_{cat}/K_m)来衡量。为了研究重组 CIP 的酶动力学参数,我们分别以不同浓度的 ABTS、2,6-DMP、愈创木酚,苯酚和 2,4-二氯苯酚为底物,用 H_2O_2 启动反应,测量反应初始速度,用 Graphpad prime 5 软件中的米氏方程拟合计算出 K_m 值和 K_{cat} 值,算出转化效率(表 1),从表中可以看出重组 CIP 的最适底物的顺序为:ABTS > 愈创木酚 > 2,6-DMP > 2,4-DCP > 苯酚。

限制细胞中氨酰 tRNA 对氨基酸的正常转运导致翻译提前终止,大量实验证明,以酵母为宿主异源表达蛋白时密码子优化可以显著提高蛋白产量^[23],我们的实验同样验证了这一点。天然的蛋白由于限制性酶切位点、A + T 含量和密码子等问题不一定总是适

合异源表达。对于已知基因采用基因合成的方法更快速、简便, 密码子的最优化能为蛋白的成功翻译和翻译后加工提供良好基础。

CIP 是糖基化蛋白, 翻译后需要进行糖基化加工。毕赤酵母一般能产生 8-14 个较为均一而更短的甘露糖型寡糖链, 使蛋白更稳定, 有利于蛋白的折叠^[18], 所以我们选择了毕赤酵母表来表达高活性的 CIP。高抗转化子筛选是提高蛋白表达常用的一种方法, 从高抗转化子中筛选酶活性最高的作工程菌为蛋白的高效表达提供了可能。酶辅基不足是蛋白表达量低的一个重要因素, 研究表明向培养基中添加血红素可以极大提高过氧化物酶的蛋白表达量^[24]。为了增加 CIP 的表达量, 我们采取了一系列措施。密码子最优化后以酿酒酵母的 α 因子作为信号肽序列分泌表达, 调整起始细胞密度发酵, 向培养基中添加 0.8% 丙氨酸以缓冲酵母产酸导致的 pH 迅速下降^[20], 添加 0.5 g/L 高铁血红素^[21] 以增加 CIP 合成所需的酶辅基。实验证明, 血红素的添加增加了重组 CIP 的表达量, 使重组 CIP 在总蛋白中的比例增大。初始细胞的密度也是影响蛋白表达的一个重要因素。一定范围内随着初始细胞密度增大, 蛋白表达量增大, 达到一定程度后可能是营养和溶氧量相对缺乏, 表达量反而下降。墨汁鬼伞发酵表达 CIP 用摇瓶培养易受剪切力影响, 产量在 15-25 U/mL^[25], 为了降低剪切力, Sakurai 等用转盘塔 (rotating disk contactor RDC) 批量表达 CIP 活性最高可达 50 U/mL^[26]; 曲霉表达 CIP 与亲本表达相比提高不多; 酿酒酵母表达 CIP 产量在 12 U/mL^[14]; Kim 等使用 AOX1 启动子在 Mut⁺ 型甲醇毕赤酵母 X-33 表达 CIP, 摇瓶培养最高达 200 U/mL^[27]; 通过一系列措施我们的 CIP 在表达的第 4 天达到最高酶活 487.5 U/mL, 比同源表达提高 19.5-32.5 倍, 比酿酒酵母表达提高了 40.6 倍, 表达量是 Kim 等用甲醇毕赤酵母 X-33 的 2.44 倍。推测酶表达量高的主要原因是把 CIP 改成毕赤酵母密码子偏好性使得其在酵母中表达后的翻译、翻译后加工、分泌等过程能够顺利完成, 添加剂给酶合成提供了合适的 pH 和足量的辅基, 从而大幅度增加了表达量。

为了研究毕赤酵母表达的重组 CIP 的酶学特性, 我们对纯化后的蛋白进行了包括温度、pH 等因素对酶影响的研究, 并用 Graphpad prime5 软件计算了重组 CIP 的动力学参数, 发现重组 CIP 最适底物

顺序: ABTS > 2,6-DMP > 愈创木酚 > 2,4-DCP > 苯酚。Shinmen 等研究 CIP 时以苯酚作底物, 最适反应 pH 为 6.0; 在苯酚、2,4-二氯苯酚、2,4-二溴苯酚、2,4,6-三氯苯酚、儿茶酚、4-羟基苯甲酸钠、N,N-二甲基苯胺和 N,N-二乙基苯胺 8 种底物中, 2,4-二氯苯酚反应后颜色最深, 测出酶活是苯酚的 9.36 倍。我们早期的实验发现苯酚为底物时最适反应 pH 为 6.0, 同 Shinmen 的结果相同。从动力学参数表可以算出, 2,4-二氯苯酚为底物酶活是苯酚为底物时的 13.55 倍, 高于 Shinmen 原始报道; 在 ABTS、2,6-DMP、愈创木酚、2,4-DCP 和苯酚 5 种底物中 ABTS 灵敏度最高、同重组 CIP 亲和力最强, 测出酶活是苯酚为底物时的 4642.61 倍。以 ABTS 为底物时, 最适反应 pH 为 5.0, 和何威震用大肠杆菌表达的 CIP 以 ABTS 为底物时最适反应 pH^[28] 相同。CIP 在毕赤酵母中高效分泌表达, 在较宽的 pH 范围内稳定, 高活性的温度范围宽, 使它有望替代 HRP 在污水处理、生物传感器、染料脱色等工业上得到应用, 具有较广阔的应用前景和潜力。我们在改变密码子偏好性的基础上调整细胞初始密度、添加不同的物质诱导, 大幅度提高了酶的产量, 缩短了酶的生产周期, 降低了生产成本, 为 CIP 的工业化应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Lokman BC, Joosten V, Hovenkamp J, Gouka RJ, Verrips CT, van den Hondela CAMJJ. Efficient production of *Arthromyces ramosus* peroxidase by *Aspergillus awamori*. *Journal of Biotechnology*, 2003, 103 (2): 183-190.
- [2] Di Cerbo P, Welinder KG, Schiødt CB. Kinetic evidence for surface residues influencing the active site of *Coprinus cinereus* peroxidase: analysis of the pH dependence of G154E, P90H and P90H-G154E substrate entrance mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, 1544 (1-2): 18-27.
- [3] Shinmen Y, Asami S, Amachi T, Shimizu S, Yamada H. Crystallization and characterization of an extracellular fungal peroxidase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50: 247-249.
- [4] Kjalke M, Andersen MB, Schneider P, Christensen B, Schüle M, Welinder KG. Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1992 1120 (3) : 248–256.
- [5] Ikehata K, Buchanan ID, Pickard MA, Smith DW. Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (16) : 1758–1770.
- [6] Pezzotti F, Okrasa K, Therisod M. Oxidation of chlorophenols catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase with in situ production of hydrogen peroxide. *Biotechnology Progress*, 2004, 20 (6) : 1868–1871.
- [7] Sakurai A, Toyoda S, Sakakibara M. Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnology Letters*, 2001, 23 (12) : 995–998.
- [8] Sarkhanpour R, Tavakoli O, Sarrafzadeh MH, Kariminia HR. The comparison of *Coprinus cinereus* peroxidase enzyme and TiO₂ catalyst for phenol removal. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2013, 48 (3) : 300–307.
- [9] Patapas J, Al-Ansari MM, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Removal of dinitrotoluenes from water via reduction with iron and peroxidase-catalyzed oxidative polymerization: a comparison between *Arthromyces ramosus* peroxidase and soybean peroxidase. *Chemosphere*, 2007, 67 (8) : 1485–1491.
- [10] Rūta IG, Juozas K. Effects of rhamnolipid biosurfactant JBR425 and synthetic surfactant surfynol1465 on the peroxidase-catalyzed oxidation of 2-naphthol. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2013, 25 (7) : 1431–1440.
- [11] Dong B, Zhang L, Geng S, Liu W, Zhan H, Gong Y, Li P, Yuan W. Optimization of degradation of congo red by mutant *Coprinus cinereus* peroxidase using response surface methodology. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 2 (8) : 421–428. (in Chinese)
董冰雪, 张磊, 耿三春, 李运会, 刘伟, 詹慧莹, 贡一峰, 李鹏, 远万里. 突变灰盖伞全过氧化物酶降解刚果红的响应面法优化分析. *环境工程学报*, 2014, 2 (8) : 421–428.
- [12] Fágúin CÓ. Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33 (2–3) : 137–149.
- [13] Savizi IS, Kariminia HR, Ghadiri M, Roosta Azad R. Amperometric sulfide detection using *Coprinus cinereus* peroxidase immobilized on screen printed electrode in an enzyme inhibition based biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 35 (1) : 297–301.
- [14] 王俊能. 大肠杆菌表现 *Coprinus cinereus* 过氧化氢酶素之特性研究. 国立交通大学学位论文, 2008.
- [15] Schiøt CB, Veitch NC, Welinder KG. Roles of distal arginine in activity and stability of *Coprinus cinereus* peroxidase elucidated by kinetic and NMR analysis of the Arg51Gln, -Asn, -Leu, and -Lys mutants. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, 101 : 336–347.
- [16] Cherry JR, Lamsa MH, Schneider P, Vind J, Svendsen A, Jones A, Pedersen AH. Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, 1999 17 (4) : 379–384.
- [17] Kim SJ, Lee JA, Kim YH, Song BK. Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19 (9) : 966–971.
- [18] YU Z, Ma Q, Zhao L, Zhang R. Strategies for optimization expression of heterologous protein in *Pichia. Pastori*. *Microbiology China*, 2010, 37 (7) : 1035–1042. (in Chinese)
余占桥, 马青山, 赵龙妹, 张日俊. 毕赤酵母优化表达外源蛋白策略. *微生物学通报*, 2010, 37 (7) : 1035–1042.
- [19] Dong BX, Mao RQ, Li BJ, Liu QY, Xu PL, Li G. An improved method of gene synthesis based on DNA works software and overlap extension PCR. *Molecular Biotechnology*, 2007, 37 (3) : 195–200.
- [20] Soden DM, O’Callaghan J, Dobson AD. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajorcaju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, 2002, 148 (Pt 12) : 4003–4014.
- [21] Gu LN, Lajoie C, Kelly C. Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 2003, 19 (5) : 1403–1409.
- [22] Joosten V, Roelofs FS, van den Dries N, Goosen T, Theo Verrips C, van den Hondel CAMJJ, Christien Lokman B. Christien Lokman B. Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: Llama variable heavy chain antibody fragment (VHH) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP). *Journal of Biotechnology*, 2005, 120 (4) : 347–359.
- [23] Li ZX, Hong GQ, Wu ZH, Hu B, Xu J, Li L. Optimization of the expression of hepatitis B virus e gene in *Pichia pastoris* and immunological characterization of the product. *Journal of Biotechnology*, 2008, 138 (1–2) : 1–8.
- [24] Conesa A, Jeenes D, Archer DB, van den Hondel

- CAMJJ, Punt PJ. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (2) : 846-851.
- [25] Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. Extracellular peroxidase production by *Coprinus* species from ureatreated soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50 (1) : 57-60.
- [26] Sakurai A, Kawamoto S, Abarca JF, Sakakibara M. Peroxidase production by *Coprinus cinereus* using rotating disk contactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, 10 (1) : 47-53.
- [27] Kim SJ, Lee JA, Won K, Kim YH, Song BK. Functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 2009, 44 (7) : 731-735.
- [28] 何威震. 过氧化酵素 (Coprinus Cinereus peroxidase, CIP) 之制备及酵素固定化. 国立交通大学学位论文, 2002.

Expression and characterization of *Coprinus cinereus* peroxidase

Bingxue Dong^{1*}, Qihong Niu¹, Wei Zhang², Sanchun Geng¹, Peng Li¹, Wanli Yuan¹, Yifeng Gong¹, Kewei Liang¹

¹School of Life Science and Technology, ²School Infirmary, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan Province, China

Abstract: [Objective] The aim of our study is to express *Coprinus cinereus* peroxidase (CIP) in *Pichia Pastori* efficiently. [Methods] We synthesized CIP gene with *P. pastoris* codon bias by our Gene Synthesis and site-specific mutagenesis platform, using DNAWorks 3.1 program to design and optimize primers. Then, we sequenced the PCR products, inserted the correct gene into expression vector pPICZ α A and transformed the linearized pPICZ α A-Cip DNA into *P. pastoris* GS115. We integrated CIP gene into the genome of *P. pastoris*, using the α -mating factor from *Saccharomyces cerevisiae* as signal peptide to direct the secretion of the recombinant protein. To obtain transformants with high CIP activity, we checked transformants by nested PCR and stained 82 positive ones on YPD agar plate with 1000 mg/L Zeocin. Then, we got 6 transformants with high resistance to Zeocin and expressed them in small scale; the one exhibiting the highest activity was chosen as engineered strain and named CIP/GS115. [Results] We purified CIP from culture medium after induction with ethanol, the maximum activity reached 487.5 U/mL on the 4th day. The purified CIP exhibited maximal activity at pH 5.0 and 25°C with ABTS as substrate. The enzyme had 61.5% of the maximal activity at 45°C and was stable below 40°C. However, the stability was drastically reduced above 45°C. The recombinant CIP remained stable between pH 4.5 and 6.5. We studied the substrate specificity on different substrates with the purified enzyme, and the optimal substrates were in the order of ABTS > 2, 6-Dimethoxyphenol > guaiacol > 2, 4-Dichlorophenol > phenol. [Conclusion] The highly secretory expression of CIP and high special activity lay the good foundation for it's industrial applications in waste water treatment, decolouration of dyestuffs.

Keywords: *Coprinus cinereus* peroxidase (CIP), gene synthesis, expression in *Pichia pastoris*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300669), by the Key Grant of Science and Technology Department of Henan Province (112102210385, 142102210479), by the Science Foundation for the High-level Talent of Nanyang Normal University (zx20110007) and by the Scientific Research Fund of Henan Educational Committee (13A180811, 14B180003)

* Corresponding author. Tel: +86-377-63513726; E-mail: dongbingxue2004@163.com

Received: 17 May 2014/Revised: 26 September 2014