



改造大肠杆菌卟啉代谢途径对重组过氧化物酶活性的影响

黄莘, 丁涛, 黄非, 白林含*

四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都 610065

摘要:【目的】原核表达某些需辅因子的外源蛋白时往往酶活偏低, 为提高酶活和减少外加辅因子的成本, 我们尝试在大肠杆菌中表达外源过氧化氢-过氧化物酶的同时提高大肠杆菌中与该酶辅因子相关的合成代谢。【方法】本研究克隆了中度嗜盐菌 *Halomonas elongata* DSM2581 的过氧化氢-过氧化物酶 CAT-POD (catalase-peroxidase) 编码基因 *katG* 的 ORF, 构建原核表达载体 pET28a-*katG*, 实现了 CAT-POD 在大肠杆菌中的重组表达。由于 CAT-POD 活性依赖其活性中心血红素, 而血卟啉是血红素的骨架, 通过构建原核表达载体 pUC19-tac-hemA, 将编码 5-氨基乙酰丙酸合成酶的 *hemA* 基因在大肠杆菌中过量表达, 提高卟啉的含量, 从而提高重组蛋白 CAT-POD 的酶活。【结果】最终的 CAT 酶活达到了 377 U/mL, 为对照组的 7.5 倍。【结论】本研究为工业生产高活性 CAT-POD 提供了有效的方案, 也为体外重组表达含辅因子的蛋白提供可借鉴的思路。

关键词: 中度嗜盐菌, 过氧化物酶 CAT-POD, 原核表达, 卟啉代谢

为大量表达目的蛋白, 将外源基因导入生物反应器中表达, 是现在理想的方法。目前投入生产使用的表达系统中有大肠杆菌表达系统、链霉菌表达系统、枯草芽孢杆菌表达系统、酵母表达系统、昆虫细胞表达系统和哺乳动物细胞表达系统等^[1]。

大肠杆菌等原核表达系统, 投入使用最早, 也最为成熟, 它们生长快、培养简单、基因背景和表达特征清楚、外源蛋白表达量高、价格低廉, 有着不可替代的优越性, 也存在着转录后加工机制不完善导致表达产物活性低等不足。在近年来

的研究报道中显示共表达分子伴侣或辅助酶等基因来提升目的蛋白的活性是一条可行的策略。Jia 等^[2]在大肠杆菌中表达类人类胶原蛋白(HLC, human-like collagen)时, 共表达了 GroEL 团(也称 HSP60, heat shock protein 60), 一方面促进 HLC 正确折叠, 另一方面还增加了 HLC 的转录水平, 从而提升了 32.4%可溶性 HLC 的产量; Wu 等^[3]表达脂肪酶 LipA 时, 共表达分子伴侣 LipB 辅助其重折叠, 将脂肪酶 LipA 的活性由 1300 U/L 提升到 8500 U/L; 本实验室也在表达脂肪酶 LipA 时,

基金项目: 国家自然科学基金(30970043)

*通信作者。Tel: +86-28-85410036; Fax: +86-28-85460487; E-mail: bailinhan@scu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-07; 修回日期: 2017-12-30; 网络出版日期: 2018-01-24

共表达分子伴侣 LipB 获得了更高的可溶性及酶活^[4]；在表达人类铜锌超氧化物歧化酶(hSOD1, human Cu/Zn superoxide dismutase)时,其活性中心铜离子是其异源表达活性的瓶颈, Eiamphungporn 等^[5]通过共表达转铜伴侣蛋白(hCCS, human copper chaperone)增加了 hSOD 13 倍的酶活; Fan 等^[6]共表达分别编码肉碱脱水酶和肉碱脱水酶因子合成酶的基因 *caiB* 和 *caiE*, 提升肉碱脱水酶的活性 2.3 倍。

过氧化物酶 POD (peroxidases, EC number 1.11.1.x)在各种生物中广泛存在,它是一类以过氧化物为底物,催化过氧化物发生氧化反应的一大酶类,主要功能是消除体内自由基伤害。POD 种类繁多,在生产和生活中的应用非常广泛。*Halomonas elongate* 中所属的 Class I 过氧化物酶超家族中具有双官能团的过氧化氢-过氧化物酶 CAT-POD,不仅有着极强的过氧化氢酶活性^[7],还有着广泛的过氧化物酶活性^[8-9]。本研究将其编码基因 *katG* 克隆,并在大肠杆菌中重组表达。

由于该酶以血红素为活性中心,而卟啉是组成血红素的骨架。大肠杆菌虽然本身具有卟啉的合成途径^[10],但卟啉产量不能满足过表达外源蛋白的翻译后修饰的需要,造成酶活性低下。本研究拟同时表达 5-氨基乙酰丙酸(ALA, 5-aminolevulinic acid)合成酶^[11],通过积累卟啉的前体 ALA 来增加卟啉的产量,从而提高重组蛋白 CAT-POD 的酶活。免除后添加辅因子,为工业生产重组 CAT-POD 降低成本,也为体外重组表达含辅基的蛋白提供可借鉴的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 菌株 *Halomonas elongata*

DSM2581 来自浙江大学嗜极微生物研究所,沙门氏菌 *Salmonella enterica* subsp. 由四川大学王红宁教授提供, *E. coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3)和质粒 pET28-a、pUC-19 由实验室保藏。

1.1.2 培养基: 嗜盐菌培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 75, KCl 5, pH 调至 8.0; LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 5。培养基中氨苄青霉素的终浓度为 100 ng/mL,卡那霉素的终浓度为 50 ng/mL。

1.1.3 试剂: EX Taq DNA Polymerase, T4 DNA 连接酶,限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司;氨苄青霉素,卡那霉素, IPTG, ABTS 等试剂购自奥克生物公司;

1.1.4 引物: 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 1。测序由擎科生物完成。

1.2 表达载体 pET28a-*katG* 的构建及验证

提取 *Halomonas elongata* 的基因组 DNA,利用引物 HE-*katG*-F (含 *Xho* I 位点)和 HE-*katG*-R (含 *Sac* I 位点)扩增出 *katG* 片段,用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 酶切并连接到相同酶切处理的 pET-28a 上,转化大肠杆菌 *E. coli* JM109,在含有 50 ng/mL 卡那霉素的培养基上培养过夜,挑取阳性单克隆,抽提质粒进行测序验证,确保其没有错配,得到重组质粒 pET28a-*katG*, *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切验证阳性克隆子。

1.3 转化及诱导表达

将获得的重组质粒 pET28a-*katG* 转化至 CaCl₂ 处理后的感受态细胞 *E. coli* BL21 中,得到重组菌 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*),在含有 50 ng/mL 卡那霉素的培养基上培养过夜,挑取单菌落在 37 °C LB 液体培养基中培养过夜后,加入 IPTG 至 0.5 mol/L, 30 °C 诱导表达 8 h。

表 1. 实验所用到的引物
Table 1. Primers in the experiment

Primers	Sequence (5'→3')	Function
HE-katG-F	<u>CTCGAGTCAGGCGAGATCGAAGCG</u> (<i>Xho</i> I)	<i>katG</i> clone and verification
HE-katG-R	<u>GAGCTCATGGGCGAACAACAGAATTCC</u> (<i>Sac</i> I)	<i>katG</i> clone and verification
M13 F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	<i>hemA</i> verification
M13 R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	<i>hemA</i> verification
hemA F	ATGACCAAGAAGCTTTTAGCACTCGGTATCAAC	<i>hemA</i> clone
hemA R	AAATCTAGACTACTCCAGCCCGAGGCTGTGCGCAGA	<i>hemA</i> clone
Tac over I	CTGAGAATTCGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG	Overlap PCR
Tac over II	CTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATA CGAGCCGATGA	Overlap PCR
Tac over III	ATTTACACACAGGAAACAGAATACTATGACCAAGAAGCTTTTAG	Overlap PCR

1.4 表达载体 pUC19-tac-hemA 的构建及验证

提取 *Salmonella enterica* subsp. 的基因组 DNA, 利用引物 hemA F 和 hemA R 扩增出 hemA 片段; 使用 Tac over I、Tac over II、Tac over III 和 hemA R 为引物, 进行 overlamp PCR, 添加 tac 启动子(trp 启动子和 lac 启动子杂合组成), 连接 tac 启动子到 hemA 序列的上游。用 T4 连接酶连接到 T 载体上, 转化至大肠杆菌 *E. coli* JM109, 在含有 100 ng/mL 氨苄青霉素的培养基上培养过夜, 挑取阳性单克隆, 抽提质粒进行测序验证, 确保其没有错配, 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切处理重组的 T 载体并连接到相同酶切处理的 pUC19 上, 最终得到重组质粒 pUC19-tac-hemA, *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切验证阳性克隆子。

1.5 转化及诱导表达

离心重组菌 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*), 使用 CaCl₂ 溶液在 4 °C 下处理重组菌 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*) 48 h, 加入重组质粒 pUC19-tac-hemA 混匀热激, 重组质粒转化至 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*) 中, 在含有 100 ng/mL 氨苄青霉素和 50 ng/mL 卡那霉素的培养基上培养过夜, 挑取阳性单克隆, 得到重组菌 *E. coli* BL21 (*katG*-

hemA), 挑取单菌落在 37 °C LB 液体培养基中培养过夜后, 加入 IPTG 至 0.5 mol/L, 30 °C 诱导表达 8 h。

1.6 粗酶活性的测定^[12-13]

重组菌株 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*) 和 *E. coli* BL21 (*katG*-*hemA*) 经过 IPTG 30 °C 诱导 12 h 后, 对菌液进行超声破碎离心获取上清。

CAT 酶活测定: 按照公式(1)进行。反应体系 3 mL, 1.9 mL 水+1.0 mL 过氧化氢+0.1 mL 酶液, 分别在反应 30、60、90、120 s 时加入 1 mL 钼酸铵+1 mL NaCl, 测量 OD₄₀₅ 下的吸光度。

CAT 酶活=($\Delta OD/\Delta t \times OD_i$) \times 底物浓度 公式(1)

其中 ΔOD 为通过趋势线计算出的单位时间内吸光度的变化值。

POD 酶活测定: 按照公式(2)进行。反应体系 3 mL, 1.9 mL 水+0.1 mL 酶液+1.0 mL 稀释后的 ABTS+, 其中 ABTS+ 由 ABTS 溶液和 K₂S₂O₈ 在常温下避光反应生成。体系中的酶会还原 ABTS+, 随着反应的进行 OD₄₁₆ 下分光值变化。

POD 酶活= $10^6 \times V_{\text{总}} \times \Delta OD / (\epsilon \times V_{\text{酶}} \times \Delta t)$ 公式(2)

式中 ϵ 为 ABTS 吸光系数为 36000 L/(mol·cm), $V_{\text{总}}$ 代表漆酶酶活测定反应体体系的中体积, $V_{\text{酶}}$ 代

表反应添加的酶液体积, $V_{\text{总}}=3 \text{ mL}$ (1.9 mL 水+0.1 mL 酶液+1.0 mL 稀释后的 ABTS), $\Delta t = 20 \text{ s}$ 。

2 结果和分析

2.1 pET28a-*katG* 表达载体的构建

以 *Halomonas elongata* 的基因组为模板, 用引物 HE-*katG*-F、HE-*katG*-R 扩增获得目的基因 *katG* 的 ORF, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳在 2200 bp 左右有清晰条带, 与预测大小一致(图

1-A), 经测序验证无错配碱基; 将获得的 *katG* 片段连接到 pET-28a 上得到重组质粒 pET28a-*katG*, 经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切验证, 结果如图 1-B, 可见一个 5000 bp 和一个 2200 bp 左右的片段, 上方为 pET28a, 下方为 *katG*; 再将重组质粒 pET28a-*katG* 使用引物 HE-*katG*-F 和 HE-*katG*-R 进行 PCR 验证, 结果如图 1-C, 2200 bp 处有清晰条带。通过双酶切和 PCR 验证确定表达质粒 pET28a-*katG* 构建成功。

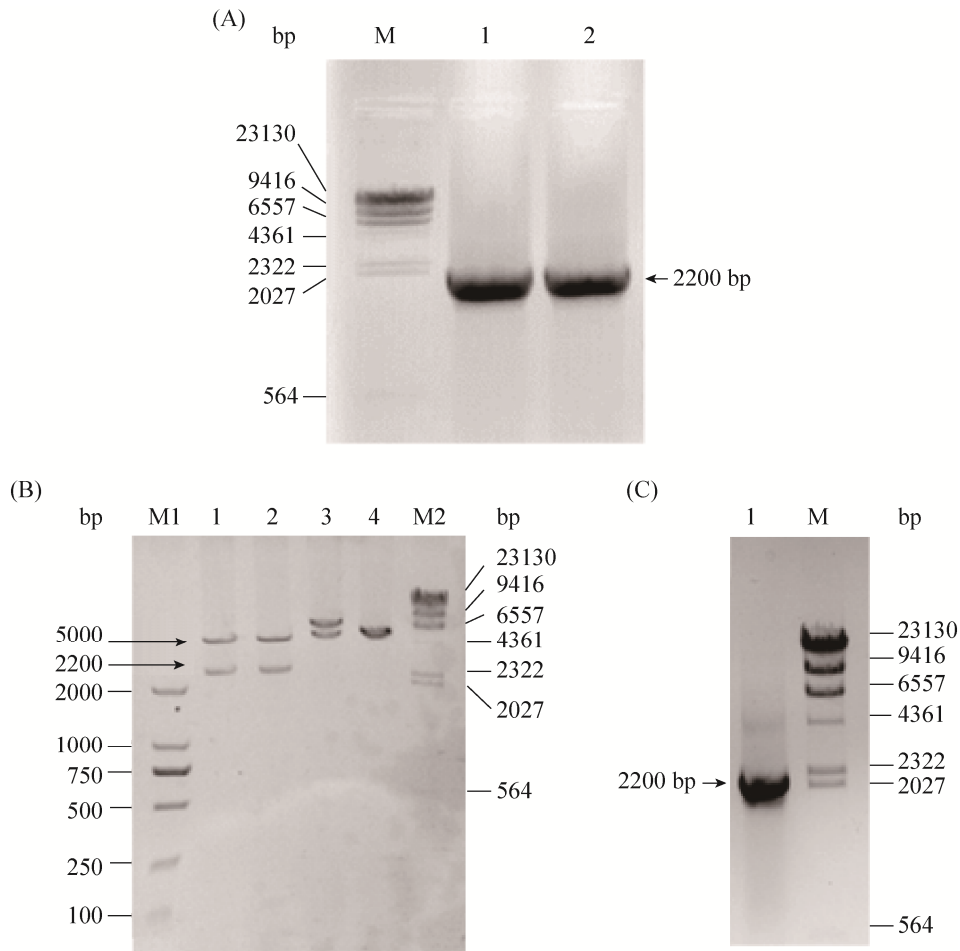


图 1. pET28a-*katG* 表达载体构建与验证

Figure 1. Construction and identification of pET28a-*katG* expression vectors. A: *katG* PCR result, M: λ -*Hind* III; lanes 1, 2 is product of *katG* PCR. B: enzyme digestion of pET28a-*katG* by *Sac* I and *Xho* I, M1: DL2000; M2: λ -*Hind* III; lanes 1–4: enzyme digestion results; lanes 1, 2: positive clones; lanes 3, 4: false positive. C: PCR identification of pET28a-*katG*, M: λ -*Hind* III; lane 1: positive clone.

2.2 katG 重组蛋白表达

重组菌株 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*) 经过 IPTG 30 °C 诱导 8 h, 超声破碎收集胞内蛋白, SDS-PAGE 分析。如图 2, 在上清液得到 95 kDa 左右大小的目的蛋白, 说明成功将 *Halomonas elongata* DSM2581 中 *katG* 基因引入大肠杆菌 BL21 中, 同时为可溶表达。

2.3 表达载体 pUC19-tac-hemA 的构建

以 *Salmonella enterica* subsp. 基因组 DNA 为模板, hemA F 和 hemA R 为正反向引物, 进行 PCR 扩增, 得到单一 1200 bp 左右的目的片段, 测序验证为 hemA 的 ORF 序列 1194 bp, 如图 3-A。胶回收后备用, 进行下一步重叠 PCR。

以 hemA PCR 产物为模板, Tac over I、Tac

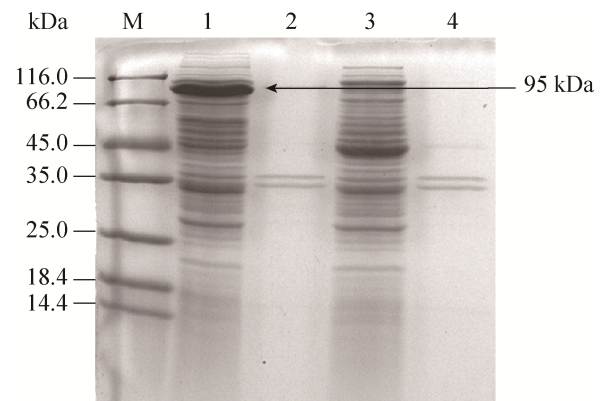


图 2. *katG* 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Figure 2. The SDS-PAGE of *katG* recombinant protein. M: protein maker; lane 1, 2: the supernatant and precipitation of recombinant *E. coli* respectively after IPTG induction; lane 3, 4: the supernatant and precipitation of recombinant *E. coli* respectively without IPTG induction respectively.

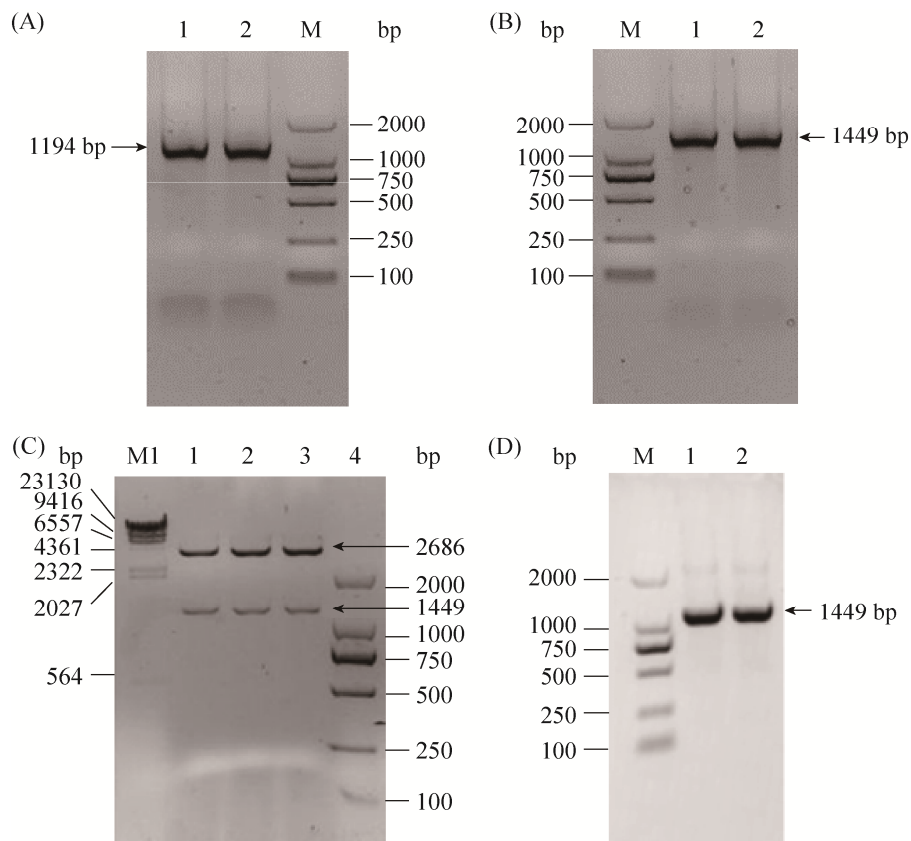


图 3. pUC19-tac-hemA 表达载体构建与验证

Figure 3. Construction and identification of pUC19-tac-hemA expression vectors. A: hemA PCR result, lane M: DL2000; lanes 1, 2: hemA. B: hemA overlamp PCR result, lane M: DL2000; lanes 1, 2: tac-hemA. C: enzyme digestion of pUC19-tac-hemA by *Xba* I and *EcoR* I, M1: λ -Hind III; M2: DL2000; lanes 1–3: enzyme digestion positive results. D: PCR identification of pUC19-tac-hemA, M: DL2000; lanes 1, 2: positive clones.

over II、Tac over III和 hemA R 为引物,进行重叠 PCR,如图 3-B,获得了比 hemA 片段增加了约 250 bp 的片段,经测序验证,255 bp 的 tac 启动子成功加在 hemA 基因前,得到 tac-hemA 片段,可以用于下一步实验。

将 tac-hemA 片段连接到载体 pUC19 上,得到 pUC19-tac-hemA,将连接后质粒转化到 BL21(DE3)中。提取阳性克隆子质粒,经 *Xba* I、*Eco*R I 双酶切验证,结果如图 3-C,泳道 1-3 为 pUC19-tac-hemA 的酶切结果,可以看到大小约为 2600 bp 和 1400 bp 的片段,分别为 pUC19 和 tac-hemA。

使用引物 M13 F 和 M13 R 对 pUC19-tac-hemA 进行 PCR 验证,得到结果如图 3-D,可以看到泳道 1 和 2 均有 1400 bp 左右的片段,为 tac-hemA 的大小。

2.4 双质粒转化株的验证

以双抗筛选后的阳性菌株为模板,进行双重 PCR,分别验证 *katG* 和 *hemA* 是否均存在于双质粒菌株中。从图 4-A 泳道 2 中可以看出,双抗筛选后的单菌,通过 PCR 能够同时得到大于 2000 bp

和 1400 bp 左右的条带,经测序验证为别为 *katG* 基因和 *hemA* 基因,说明成功筛选到双质粒阳性重组菌株 *E. coli* BL21 (katG-hemA)。

卟啉由于其共振结构,在溶液中显红棕色,重组菌株 *E. coli* BL21 (katG-hemA)中可以看到明显的显色。如图 4-B 所示,重组菌株 *E. coli* BL21 (katG-hemA)在 IPTG 过夜诱导后,积累卟啉,溶液呈红棕色(图 4-B),而试管 1 (图 4-B)是普通的加入 IPTG 的大肠杆菌,试管 3 (图 4-B)则是未加入 IPTG 的重组菌株 *E. coli* BL21 (katG-hemA),都未显现出红棕色,说明 *hemA* 在大肠杆菌中成功异源表达,同时具有一定的酶活性。

2.5 酶活的测定

重组菌株 *E. coli* BL21 (pET28a-*katG*)和 *E. coli* BL21 (katG-hemA)经过 IPTG 30 °C 诱导 8 h 后,对菌液进行超声破碎离心获取上清。在含有过氧化氢和 ABTS+的体系中反应来分别测量其 CAT 和 POD 酶活。CAT 酶活反应中吸光度测定结果见表 2,POD 酶活反应中吸光度测定结果见表 3。

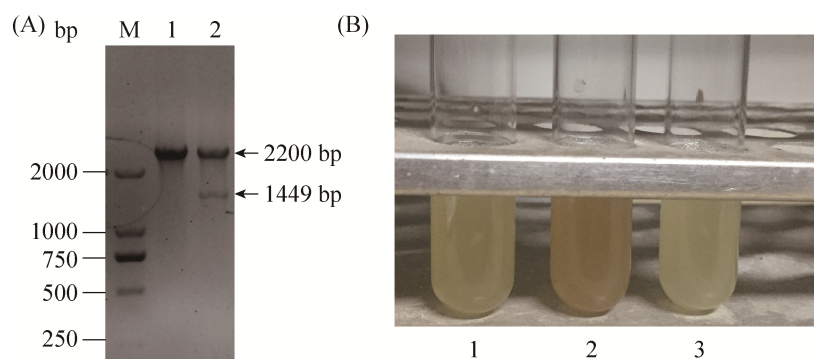


图 4. 双质粒转化株的验证

Figure 4. Identification of *E. coli* BL21 (katG-hemA). A: PCR identification of *E. coli* BL21(katG-hemA), M: DL2000; lane 1: *E. coli* BL21(pET28a-*katG*) control; lane 2: *E. coli* BL21(katG-hemA). B: expression of *hemA* in *Escherichia coli*, tube 1: *E. coli* that after IPTG induction; tube 2: the recombinant strain *E. coli* BL21(katG-hemA) after IPTG induction overnight; tube 3: the recombinant strain *E. coli* BL21(katG-hemA) without IPTG induction.

表 2. CAT 酶活测定的吸光度结果

Table 2. The absorbency result of catalase activity (OD_{405}) ($D \leq \pm 0.005$)

t/s	Control	pET28a	pET28a-katG	katG-hemA
30	0.41852	0.44703	0.13429	0.13677
60	0.40733	0.40616	0.06672	0.07280
90	0.39512	0.37438	0.05868	0.01791
120	0.38610	0.35340	0.01805	0.01637

表 3. POD 酶活测定的吸光度结果

Table 3. The absorbency result of peroxidase activity (OD_{416}) ($D \leq \pm 0.005$)

t/s	Control	pET28a	pET28a-katG	katG-hemA
30	0.16024	0.12310	0.17466	0.15188
60	0.11998	0.08986	0.14312	0.12739
90	0.11010	0.07361	0.11760	0.10720
120	0.07939	0.05023	0.10715	0.09747
150	0.07399	0.03741	0.09978	0.08740
180	0.06062	0.03659	0.08417	0.07753

经过酶活计算公式计算, 空载菌、*E. coli* BL21 (pET28a-katG)和 *E. coli* BL21 (katG-hemA)的 CAT 酶活大小分别为 50.5、164.0、377.0 U/mL, POD 酶活大小分别为 43、44、58 U/mL。

3 讨论

由于反应条件的限制, 自然界中大部分酶在工业生产中并不能很好地发挥其活性, 而极端微生物胞内的酶可以在极端的物理化学条件下保持酶活性。研究极端微生物的酶并进行原核表达生产, 可以为工业生产提供大量的适宜反应条件的极端酶, 例如, 用于 PCR 反应的耐高温 DNA 聚合酶、洗涤剂中添加的耐碱蛋白酶^[14]和碱性纤维酶^[15], 以及嗜盐菌中的胞外木聚糖酶^[16]。同时, 在极端环境下, 生物体所受到胁迫在体内常以氧自由基 ROS 的形式表示出来, 极端微生物的降解 ROS 的抗氧化酶系值得我们研究。

从酶活的结果来看, 吡啉的过表达提升了 katG 的酶活, 尤其大大提升了其 CAT 酶活。平行测定空载菌、*E. coli* BL21 (pET28a-katG)和 *E. coli* BL21 (katG-hemA)粗酶液的 CAT 和 POD 活性, CAT 酶活大小分别为 50.5、164.0、377.0 U/mL, POD 酶活大小分别为 43、44、58 U/mL。可见, 重组菌的 CAT 酶活由对照组的 3.3 倍提升到了 7.5 倍。而 POD 酶活虽有提升, 但并不明显。由于 katG 是一种拥有 POD 结构的过氧化氢酶, 主要显示其 CAT 活性, 其天然的 POD 底物也仍存疑, 所以这里并没有使用常见的愈创木酚法来测量其 POD 酶活, 而是选择了 ABTS 法来测粗酶液总的氧化还原能力, 通过和空载菌的对比来获得 POD 酶活的变化。所以探索 katG 的天然底物以得到更显著的 POD 酶活测量方法, 扩宽目的蛋白 katG 的应用范围, 是未来需要研究的内容。

对比近年对过氧化氢-过氧化物酶 katG 的研究, 一般都是关于其还原机制和酶结构的研究, 关于异源表达的报道几乎没有。在大肠杆菌野生菌株中, katG 的 CAT 酶活约为 50 U/mL^[17], 与本文对空载菌 CAT 粗酶活的检测结果相近; 在结核杆菌中, katG 的 CAT 酶活约为 66.8 U/mL^[18], 远小于本文在大肠杆菌中表达的 katG 酶活; 而目前工业上过氧化氢酶的主要来源牛肝过氧化氢酶的酶活约为 45.4–77.4 U/mL^[19], 而本文异源表达蛋白的 CAT 酶活结果分别为 164 U/mL 和 377 U/mL, 远高于其他常见菌株和工业用牛肝过氧化氢酶, 可见异源表达嗜盐菌 *Halomonas elongata* 的 CAT-POD 酶 katG 在工业上的应用前景是值得期待的。

血红素的主要结构是一个带三价铁的吡啉环, 是超氧化物歧化酶 SOD、肌红蛋白和绝大多数过氧

化物酶 POD、过氧化氢酶 CAT 的活性中心。CAT 还会基于血卟啉活性中心形成 MYW (Met-Tyr-Trp) 结构, 对其过氧化氢酶活性有提升作用^[20]。过量表达 katG 目的蛋白使得宿主正常代谢的血红素相对不足, 影响酶活。为了弥补这一辅助因子的缺失, 我们额外表达一个可以提高卟啉的合成蛋白, 从而提高了 POD-CAT 的活性。在本文中, 所使用的卟啉的代谢途径的改造可以推广到表达 POD、SOD、CAT、肌红蛋白等各类需要卟啉作为活性中心的外源蛋白上。

参 考 文 献

- [1] Anné J, Maldonado B, van Impe J, van Mellaert L, Bernaerts K. Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of Biotechnology*, 2012, 158(4): 159–167.
- [2] Jia QL, Luo YE, Fan DD, Ma P, Ma XX, Xue WJ. The different roles of chaperone teams on over-expression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, 45(6): 2843–2850.
- [3] Wu XP, You PY, Su EZ, Xu JJ, Gao B, Wei DZ. *In vivo* functional expression of a screened *P. aeruginosa* chaperone-dependent lipase in *E. coli*. *BMC Biotechnology*, 2012, 12: 58.
- [4] Bai FW, Yan W, Zhang SJ, Yu D, Bai LH. Immobilized lipase of reconstructed oil bodies and its potential application in biodiesel production. *Fuel*, 2014, 128: 340–346.
- [5] Eiamphungporn W, Yainoy S, Prachayasittikul V. Enhancement of solubility and specific activity of a Cu/Zn superoxide dismutase by co-expression with a copper chaperone in *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2016, 14(4): 243–249.
- [6] Fan LQ, Yuan QS, Wu XF. Coexpression of *caiB* and *caiE* with two plasmids in *E. coli*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2002, 34(1): 104–108.
- [7] Njuma OJ, Ndontsa EN, Goodwin DC. Catalase in peroxidase clothing: interdependent cooperation of two cofactors in the catalytic versatility of KatG. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 544: 27–39.
- [8] Jakopitsch C, Regelsberger G, Furtmüller PG, Rüker F, Peschek GA. Catalase-peroxidase from *Synechocystis* is capable of chlorination and bromination reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 287(3): 682–687.
- [9] Regelsberger G, Jakopitsch C, Engleder M, Rüker F, Peschek GA, Obinger C. Spectral and kinetic studies of the oxidation of monosubstituted phenols and anilines by recombinant *Synechocystis* catalase-peroxidase compound I. *Biochemistry*, 1999, 38(32): 10480–10488.
- [10] Li FF, Wang Y, Gong K, Wang Q, Liang QF, Qi QS. Constitutive expression of RyhB regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 350(2): 209–215.
- [11] 康振. 大肠杆菌系统改造及琥珀酸和 5-氨基乙酰丙酸合成途径的构建. 山东大学博士学位论文, 2011.
- [12] Chai XS, Hou QX, Luo Q, Zhu JY. Rapid determination of hydrogen peroxide in the wood pulp bleaching streams by a dual-wavelength spectroscopic method. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 507(2): 281–284.
- [13] Kang WY, Wang JM. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of *Forsythia suspense* leaves. *Medicinal Chemistry Research*, 2010, 19(7): 617–628.
- [14] Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, El-Badawi YB, El-Tayeb MA, Antranikian G. Detergent-, solvent- and salt-compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization. *Extremophiles*, 2015, 19(5): 961–971.
- [15] Shikata S, Saeki K, Okoshi H, Yoshimatsu T, Ozaki K, Kawai S, Ito S. Alkaline cellulases for laundry detergents: production by alkaliphilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54(1): 91–96.
- [16] Chang SY, Guo YL, Wu B, He BF. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96: 249–256.
- [17] Zhang L, Alfano JR, Becker DF. Proline metabolism increases *katG* expression and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 431–440.

- [18] Rintiswati N, Wibawa T, Asmara W, Soebono H. Effect of oxidative stress on AhpC activity and virulence in *katG* Ser315 Thr *Mycobacterium tuberculosis* mutant. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 2011, 16(2): 100–110.
- [19] Karadag H, Ozhan F. Effect of cyprodinil and fludioxonil pesticides on bovine liver catalase activity. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(1): 40–44.
- [20] Gasselhuber B, Graf MH, Jakopitsch C, Zamocky M, Nicolussi A, Furtmüller PG, Oostenbrink C, Carpena X, Obinger C. Interaction with the redox cofactor MYW and functional role of a mobile arginine in eukaryotic catalase-peroxidase. *Biochemistry*, 2016, 55(25): 3528–3541.

Effect of porphyrin metabolism pathway modification of *Escherichia coli* on recombinant catalase-peroxidase activity

Shen Huang, Tao Ding, Fei Huang, Linhan Bai*

Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] The cofactor-required prokaryotic expressions of extrinsic protein often show low activity. To improve the enzyme activity and reduce the cost of adding cofactors, we tried to express CAT-POD in *Escherichia coli* and promote the related synthetic metabolism of enzymes cofactors. [Methods] We cloned *katG*, the CAT-POD coding gene of *Halomonas elongata* DSM2581, and constructed it into the prokaryotic expression vector *pet28a-katG*, to achieve the recombinant expression of CAT-POD in *E. coli*. Additionally, CAT-POD's activity depends on its active centre, heme. And hematoporphyrin is the main structure of the heme. We cloned *hemA*, a gene coding 5-amino levulinic acid synthetase, and constructed it into the prokaryotic expression vector *pUC19-tac-hemA*. By overexpressing *hemA*, we raised the content of the porphyrin in *E. coli*, and improved the enzyme activity of recombinant protein CAT-POD. [Results] Ultimately, the CAT enzyme activity of *katG* reached 377 U/mL, 7.5 times of the control group. [Conclusion] This study provided an effective method for the industrial production of high-active CAT-POD, and a reference for the expression of protein that contains prosthetic group.

Keywords: moderately halophilic, catalase-peroxidase, prokaryotic expression, porphyrin metabolism

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970043)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85410036; Fax: +86-28-85460487; E-mail: bailinhan@scu.edu.cn

Received: 7 November 2017; Revised: 30 December 2017; Published online: 24 January 2018