



酿酒酵母表达和纯化功能性的铁载体合成蛋白 PchE

陈璐, 王嘉良, 梁晶丹, 邓子新, 汪志军*

上海交通大学生命科学技术学院微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

摘要:【目的】利用酿酒酵母表达系统,通过乙醇脱氢酶启动子异源表达细菌源的铁载体合成蛋白 PchE,并与来源于枯草芽孢杆菌的泛酰化酶 Sfp 同宿主共表达,探索真核表达体系表达具有生化活性的细菌源蛋白。【方法】从大肠杆菌 BAP 1 染色体上扩增 *sfp* 基因,将 *pchE* 基因及串联的 *pchE* 与 *sfp* 基因分别构建到酵母-大肠杆菌穿梭质粒 pXW55 中,各自转化酿酒酵母 BJ5464-*npgA* 表达,经过亲和层析和离子交换层析纯化蛋白,利用 HPLC 检测细菌源与酵母源表达的 PchE 在体外重构生化反应中的催化活性。【结果】利用酿酒酵母表达系统可以获得高纯度的原核蛋白 PchE。真菌源的泛酰化基因 NpgA 和细菌源的 Sfp,均可泛酰化修饰 PchE,合成中间产物 HPT-Cys。【结论】在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BJ5464-*npgA* 表达系统中,首次证明真菌源的泛酰化基因 NpgA 和细菌源的 Sfp,均可泛酰化修饰细菌源的非核糖体肽合酶。比较酵母和细菌宿主的目标蛋白表达,证明酵母表达的巨大蛋白 PchE 的纯度更高,非特异性条带减少,推测酵母宿主可能更适合表达纯化功能性的巨型蛋白质。

关键词: 铁载体合成蛋白 PchE, 酿酒酵母, 异源表达与纯化, 生化活性, PPTase

重组蛋白是通过基因重组技术获得的具有一定活性和功能的蛋白质,近年来重组蛋白在药物挖掘领域中发挥越来越重要的作用^[1]。获得重组蛋白可以通过体内和体外两种途径,目前常用的体外表达体系包括:原核表达体系,如大肠杆菌(*Escherichia coli*);以及真核表达体系,如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、昆虫细胞和哺乳动物细胞等。

大肠杆菌凭借遗传操作简单、繁殖时间短和

培养成本低的优势,通常作为重组蛋白表达的首选宿主,用于表达原核及一些真核来源的蛋白质^[2]。然而,由于原核宿主往往缺乏成熟的翻译后修饰体系,很多情况下,外源蛋白容易形成胞内聚集体,丧失酶活性,缺少正确折叠构象^[3];尤其对于一些大分子量的巨型蛋白^[4],难以在大肠杆菌中实现高效、稳定表达。障碍蛋白表达的主要因素可能是原核表达体系中转录和翻译元件少,分子伴侣不足,蛋白溶解度低,或外源蛋白存在潜

基金项目:国家重点研发计划(2018YFA0900700, 2019YFA0905400)

*通信作者。E-mail: wangzhijun@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-03-03; 修回日期: 2021-04-21; 网络出版日期: 2021-09-28

在毒性等。

酵母细胞作为真核表达体系, 在异源表达巨型蛋白方面具备多重优势^[5]。首先, 酵母细胞含有线粒体、内质网等细胞器, 利于表达有生物活性的外源蛋白; 其次, 酵母细胞具有丰富的翻译后修饰酶, 蛋白更易折叠形成天然构象; 此外, 酵母表达体系无内毒素, 无需添加抗生素, 环境胁迫小; 相比于昆虫和哺乳动物细胞, 酵母细胞能实现高密度发酵, 更适应工业化生产条件。酵母-大肠杆菌穿梭质粒 pXW55 是实现聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 和非核糖体肽合酶 (nonribosomal peptide, NRPS) 异源表达的有力工具^[6]。pXW55 在外源基因插入位点的上下游分别携带乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase) ADH2 启动子和终止子, 在葡萄糖耗尽时, 通过乙醇起始转录并诱导巨型蛋白的过表达。同时, 载体带有 *ura3* 基因, 可作为营养缺陷型筛选标记。此外, pXW55 还携带来自大肠杆菌的复制起点、 β -内酰胺酶基因以及氨基青霉素抗性基因, 可以在大肠杆菌中进行遗传操作。

铁离子作为多种酶的辅因子, 是多数生物不可或缺的^[7]。铁载体是微生物在缺铁环境中合成的一种小分子化合物, 能够高度亲和地螯合宿主内不可溶的 Fe^{3+} 并运输到细胞内, 是病原菌对抗和侵染宿主的重要手段^[8]。铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是一种机会致病菌, 它能合成两种重要的铁载体, 铜绿菌素 (pyochelin)^[9] 和荧光嗜铁素 (pyoverdine)^[10]。两者是铜绿假单胞菌高致病性的重要因素^[11], 有研究表明铁载体的缺失会显著影响毒株的生长和毒力^[12]。铁载体 Pyochelin 是由 1 分子水杨酸和 2 分子半胱氨酸合成的双杂环结构, 相关生物合成途径由 Walsh 等

揭示^[13-14]。它的合成基因簇包括 *pchEF* 和 *pchDCBA*, 其中 *pchE* 基因编码的 PchE 蛋白是 pyochelin 合成的关键延伸模块。PchE 的编码基因长 4.4 kb, 蛋白单体大小 160 kDa, 负责催化水杨酸和第一个半胱氨酸的环化, 形成羟苯基噻唑-半胱氨酸 (hydroxyphenyl-thiazolanyl-cysteine, HPT-Cys)。PchE 属于 NRPS, 在结构上包括芳香基载体蛋白 (aryl carrier protein, ArCP)、环化结构域 (heterocyclization domain, Cy)、腺苷化结构域 (adenylation domain, A)、表异构酶结构域 (epimerase domain, E) 和肽酰基载体蛋白 (peptidyl carrier protein, PCP)。目前开展的研究中, PchE 蛋白表达宿主通常为大肠杆菌和铜绿假单胞菌, 均在原核表达系统中实现^[15-17], 使用真核宿主高效表达 PchE 尚未见报道。

在 Pyochelin 的生物合成途径中 (图 1), PchD 和 PchE 共同参与 HPT-Cys 的合成。PchD 的 A1 结构域负责活化底物水杨酸, 并连接到 PchE ArCP 结构域的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺 (4'-phosphopantetheine, PPant) 手臂上。PchE 的 A2 结构域负责活化底物 L-半胱氨酸, 并连接到 PCP 的 PPant 手臂上, Cy1 结构域催化水杨酸和半胱氨酸发生环化, E 结构域催化 L-半胱氨酸的异构化, 最后硫解释放 HPT-Cys^[14,18]。

磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (phosphopantetheinyl transferase, PPTase) 用于激活 PKS 和 NRPS 的载体蛋白结构域, 在蛋白翻译后修饰中不可或缺。PPTase 将载体蛋白的保守丝氨酸位点与来源于辅酶 A 的 PPant 手臂共价连接, 使其从无活性的 *holo*-载体蛋白转变为 *apo*-载体蛋白, 进而启动 PKS 和 NRPS 合成^[19]。细菌源的 PPTase Sfp 蛋白最早由 Grossman 等在枯草

芽孢杆菌中发现并鉴定^[20]，它的编码基因长 675 bp，对应蛋白分子量为 26 kDa，由 225 个氨基酸组成^[21]。在大肠杆菌中，Sfp 能高效表达，表现出广泛的催化活性和较好的修饰底物宽泛性^[19]。真菌源的 NpgA 蛋白是在构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中发现的一种 PPTase^[22]，能激活初级和次级代谢。有研究表明，在酿酒酵母的赖氨酸合成途径中，Lys5 蛋白执行 PPTase 的功能，而当 *lys5* 突变后，回补 *sfp* 和 *npgA* 基因可以在酵母细胞中发挥替代作用^[23]。

本研究以铁载体合成蛋白 PchE 为研究对象，首次在真核表达体系酿酒酵母细胞中实现了 PchE 的异源表达，优化了巨型蛋白表达不完整的情况，蛋白纯度显著提高，并通过重构体外生化反应体系验证了 PchE 的功能活性，表明真核宿主在巨型蛋白表达上更具优势。此外，实验证明真菌源的 PPTase NpgA 具有较好的底物宽泛性，可以在酵母宿主中对原核蛋白 PchE 进行泛酰化修饰。而当共表达细菌源的 PPTase Sfp 蛋白后，PchE 催化活性没有明显变化，两者可能并非协同发挥作用。

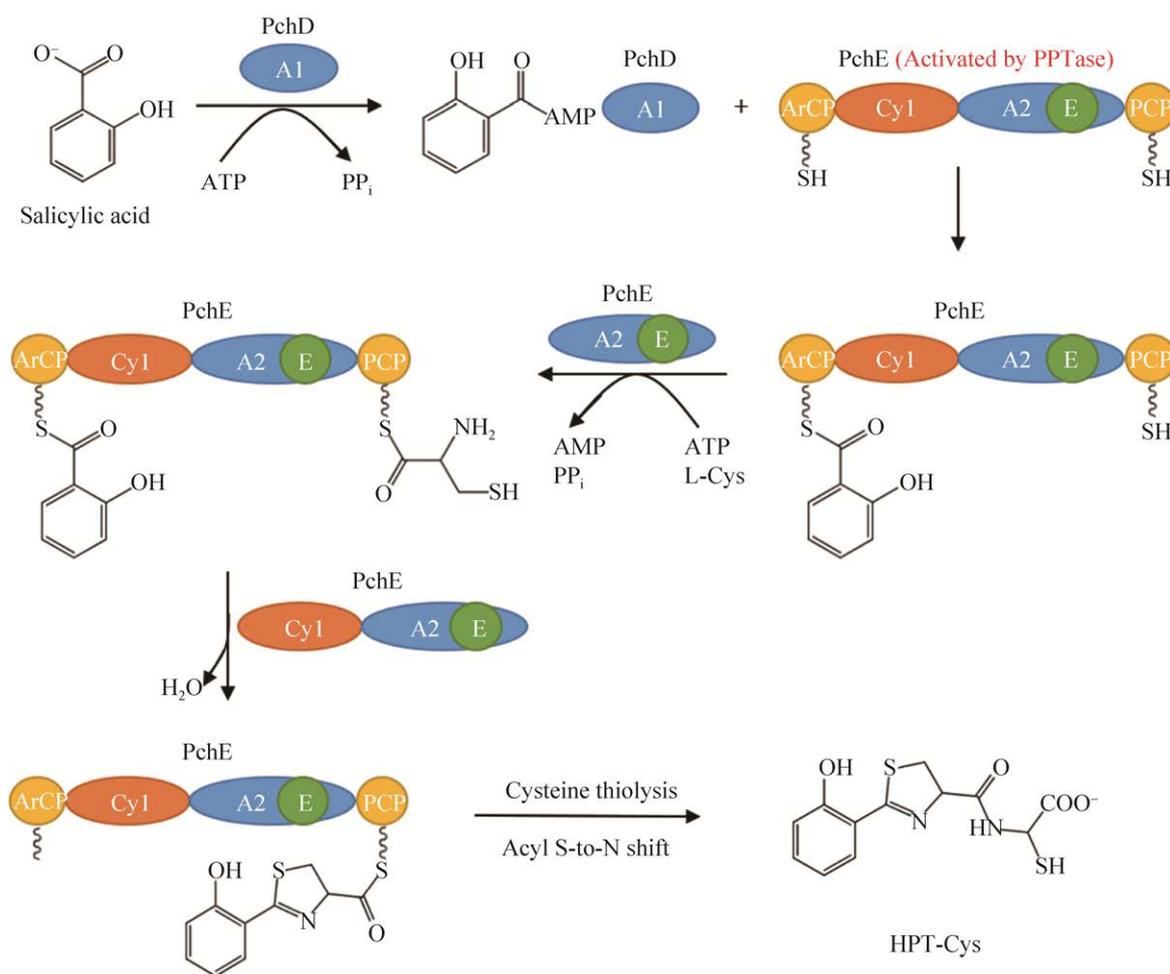


图 1. PchD 与 PchE 合成 HPT-Cys 的生化途径

Figure 1. Biosynthesis pathway of HPT-Cys catalyzed by PchD and PchE.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 实验所用质粒 pXW55-cH、pET28a-*pchE*-cH 和 pXW55-*pchE*-cH, 菌株大肠杆菌 DH10B、BAP 1(BL21 菌株整合 *sfp* 基因)和酿酒酵母 BJ5464-*npgA* 为上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保存。PchD 蛋白表达纯化参照先前研究^[14]。

1.1.2 培养基: LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 纯水定容至 1 L, 调节 pH 值 7.0–7.4; LA 培养基(g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 1.5%–2% 琼脂, 纯水定容至 1 L, 调节 pH 值 7.0–7.4; YPD (yeast extract peptone dextrose) 液体培养基(g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 纯水定容至 950 mL 灭菌备用; 母液 D-葡萄糖单独 115 °C 灭菌, 使用时补加终浓度 2% 的 D-葡萄糖; UDM (uracil dropout media) 固体培养基(g/L): 酪蛋白水解物 5, 无氨基酵母氮源 6.7, D-葡萄糖 20, 腺嘌呤半硫酸盐 0.2, 色氨酸 0.2, 琼脂 20。酪蛋白水解物灭菌备用, 其他单独配制母液过滤除菌。UDM 平板用于质粒 pXW55 转化酵母的营养缺陷型筛选。UDM 液体培养基不添加琼脂。

1.1.3 试剂: 蛋白胨、胰蛋白胨、酵母提取物购自 OXOID, 琼脂购自海燕, 乙酸乙酯、乙腈、甲酸、三乙胺、L-半胱氨酸购自 Sigma, ATP、辅酶 A、水杨酸、NADPH、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自生工生物, SAM 购自 HARVEYBIO, 酵母转化试剂盒购自 ZYMO RESEARCH, Quick-Fusion 无缝克隆试剂盒购自 Biotool, *Xho* I 限制性内切酶购自 Thermo, 葡萄

糖、氯化钠、盐酸等常规试剂购自国药。蛋白纯化使用的 Ni-NTA 树脂、阴离子交换层析柱 Mono Q 和体积排阻色谱柱 Superdex 200 10/300 均购自 GE。

1.2 大肠杆菌总 DNA 提取

在 LB 培养基中 37 °C 过夜培养大肠杆菌 BAP 1, 取 1.5 mL 菌液收集到离心管中, 12000 r/min 离心 2 min, 弃上清。加入 365 μ L Tris-EDTA 溶液重悬菌体, 再加入 10 μ L 50 mg/mL 溶菌酶, 置于 37 °C 水浴锅内温浴 30 min。反应后加入 100 μ L 10% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶液, 继续 37 °C 水浴直至溶液澄清。往裂解后的溶液中加入 0.8 倍体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 溶液, 并充分摇晃混合均匀, 12000 r/min 离心 15 min, 小心移取上层部分到新离心管中, 再加入 0.8 倍体积的氯仿并充分混匀, 12000 r/min 离心 15 min, 保留上清。加入等体积 75% 乙醇充分混匀后 12000 r/min 离心 10 min。弃上清, 离心管自然干燥后加入 40 μ L TE 溶液溶解 DNA, 并电泳检验 DNA 质量。

1.3 重组质粒构建

将 PCR 扩增得到的载体与片段胶回收后, 用 Quick-Fusion 无缝克隆试剂盒进行连接。本实验所用引物详见表 1。在 PCR 引物设计时, 将酶连载体和片段的引物末端各设计 18 bp 的同源序列, 反应时在离心管中加入如下酶连体系: 载体 20 ng, 片段 60 ng, Fusion Enzyme 1 μ L, 5 \times Fusion Buffer 2 μ L, 补加 dd H₂O 至 10 μ L。将反应体系在 37 °C 水浴锅中孵育 30 min, 即可用于大肠杆菌转化。

表 1 引物名称与序列
Table 1. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
Sfp-18P1-38-SP	TCGTAATACCATATGGCTATGAAGATTTACGGAATTTA
Sfp-18P1-38-AP	TTTAAATTAGTGATGGTGTATAAAAAGCTCTTCGTACG
V-XW55-3H-SP	CACCATCACTAATTTAAATGA
V-XW55-2aa-AP	AGCCATATGGTATTACGATA
ADH2p-Ter-SP	GGAGCTCGGATCCATTTAGC
ADH2p-Ter-AP	CAGTGAATTCGAGCTCGGTA
V-XWgeneP1-S	GCCAAGCTCGAAATTAACCCTCA
V-XWgeneP1-A	GGCATGCAAGCTTGGCGTAA

1.4 大肠杆菌转化

转化时将大肠杆菌 DH10B 感受态细胞与 5 μ L 酶连体系混合, 冰上静置 30 min 后, 42 $^{\circ}$ C 热击 1 min, 再加入 1 mL LB 培养基于 37 $^{\circ}$ C 摇床预培养 40 min, 吸取适量菌液涂布氨苄青霉素抗性 LB 平板, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养约 16 h, 观察到大小合适的菌落。挑取单克隆转化子, 提取质粒并进行琼脂糖凝胶电泳, 选取大小正确的质粒进行测序验证, 得到阳性克隆。

1.5 酵母细胞转化

按照 ZYMO RESEARCH 酵母转化试剂盒(货号 T2001)方法, 培养酿酒酵母细胞到对数生长期, 离心后弃上清, 用试剂盒内的 EZ 1 溶液清洗菌体, 再用 EZ 2 溶液重悬并分装酵母感受态细胞。转化时吸取方法 1.5 中测序正确的重组质粒 DNA 0.2–1.0 μ g (体积小于 5 μ L), 与 50 μ L 感受态细胞混合, 再加入 500 μ L EZ 3 溶液并小心混匀, 于 28 $^{\circ}$ C 静置孵育 2 h, 最后将溶液全部涂布到 UDM 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d, 直至出现大小合适的酵母菌落。转化筛选到的转化子进行测序验证。

1.6 重组蛋白诱导表达

大肠杆菌诱导表达: 将冻存的 pET28a-*pchE*-cH/BAP 1 菌液划单克隆, 接种于 10 mL 带有卡

那霉素抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养作为种子液。接种时按 1% 接种量, 转接 1 L 带有卡那霉素抗性的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养约 3 h 至对数生长期, 将培养基降温至 16 $^{\circ}$ C, 加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG, 继续 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 24 h, 4500 r/min 离心 15 min 收集菌体, 并将菌体转移到 50 mL 离心管中, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

酵母细胞诱导表达: 分别挑取 pXW55-*pchE*-cH/BJ5464-*npaA* 和 pXW55-*pchE*-cH-*sfp*/BJ5464-*npaA* 的酵母细胞单克隆, 接种于 20 mL UDM 液体培养基中(用 10 层纱布封口), 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 48 h 作为种子液。按 2% 接种量, 将种子液转接至 1 L YPD 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 72 h。4500 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并将菌体转移到 50 mL 离心管中, -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.7 蛋白纯化

用缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L 氯化钠, 40 mmol/L 咪唑, pH 8.0)重悬菌体, 细胞破碎机高压破碎, 其中大肠杆菌 8.0 \times 10⁴ Pa 破碎 3 min, 酵母细胞 1.2 \times 10⁵ Pa 破碎 5 min。破碎后菌液 12000 r/min 离心 1 h, 保留上清液, 由于酵母细胞破碎离心后上清液不完全澄清, 在亲和层析前先使用 0.45 μ m 滤膜过滤。使用 Ni-NTA 作为第一步亲和层析, 将上清液与 2 mL Ni-NTA 树

脂混合, 4 °C 孵育 2 h, 然后用 5 个床体积含 500 mmol/L 氯化钠的高盐缓冲液清洗, 再加 5 个床体积含 50 mmol/L 氯化钠的低盐缓冲液平衡盐浓度, 最终洗脱液的咪唑浓度为 400 mmol/L。

分别收集亲和层析洗脱的蛋白质, 全部上样 Mono Q 离子交换层析柱进行纯化和浓缩, 其中 A 相为 50 mmol/L Tris-HCl; B 相为 50 mmol/L Tris-HCl、1000 mmol/L 氯化钠, 设定程序为 5 个柱体积的 10% B, 5 个柱体积的 10%–20% B, 20 个柱体积的 20%–40% B, 5 个柱体积的 40%–100% B, 5 个柱体积的 100%–10% B。根据出峰位置和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果, 收集对应的浓缩后蛋白, 加终浓度 10% 甘油, –80 °C 冻存备用。

1.8 体外生化活性验证

体外生化反应体系为 200 μL, 具体体系成分见表 2。将除了蛋白外所有组分在冰上充分混合后, 测定 pH 值在 7.6 左右, 再往体系中加入蛋白 PchD、PchE, 置于 25 °C 水浴 2.5 h, 加入 20 μL 1 mol/L 盐酸使酶失活终止反应。用 1 mL 乙酸乙酯萃取反应体系后离心取上清, 37 °C 真空旋干, 加 40 μL 10% 乙腈溶解干片, 用于高效液相色谱(HPLC)测定。HPLC 流动相 A 组分为 2.3 μmol/L

甲酸和 1.44 μmol/L 三乙胺的水溶液, B 组分为 2.3 μmol/L 甲酸和 1.44 μmol/L 三乙胺的乙腈溶液, 设定流速为 0.8 mL/min, 设定最大吸收波长 254 nm, 使用 C₁₈ 反相柱对产物进行分离和分析。

2 结果和分析

2.1 *pchE* 与 *sfp* 基因串联酵母表达载体构建

从大肠杆菌 BAP 1 总 DNA 中扩增 *sfp* 基因, 并克隆到酵母-大肠杆菌穿梭质粒 pXW55-cH 的 ADH2 启动子下, 经测序验证得到阳性克隆 pXW55-*sfp*, 并以此为 PCR 模板, 获得载体骨架 V-XW55-*sfp* (图 2-A, 泳道 1)。从团队已构建质粒 pXW55-*pchE*-cH 上扩增带有启动子和终止子的目的基因序列 F-*pchE*-cH, *pchE* 基因 C 端带有 6×His 标签 (图 2-A, 泳道 2), 与载体骨架无缝酶连后得到重组质粒, DNA 片段大小为 12.2 kb (图 2-B)。转化大肠杆菌 DH10B 后挑取重组子提取质粒, 并用 *Xho* I 酶切验证, 将酶切得到的片段长度与预计的酶切结果相符 (图 2-C) 且测序结果正确的质粒命名为 pXW55-*pchEcH*-*sfp*。*pchE* 基因与 *sfp* 基因分别带有独立的酵母乙醇脱氢酶启动子和终止子, 可以在酿酒酵母中进行稳定的复制和表达。

表 2. PchD 与 PchE 体外生化反应体系成分

Table 2. *In vitro* biochemical reaction system of PchD and PchE

Components	Final concentration	Stock concentration/(mmol/L)	Added volume/(μL)
Tris-HCl (pH 8.2)	75 mmol/L	1000	15
MgCl ₂	10 mmol/L	200	10
ATP (Present)	5 mmol/L	100	10
CoA	0.1 mmol/L	100	0.2
Salicylic acid	1 mmol/L	100	2
L-Cysteine (Present)	5 mmol/L	100	10
NADPH	1 mmol/L	50	4
SAM	1 mmol/L	50	4
PchD	2.8 μmol/L	Calculated according to actual protein concentration	
PchE	1.4 μmol/L		
H ₂ O	Add to 200 μL		

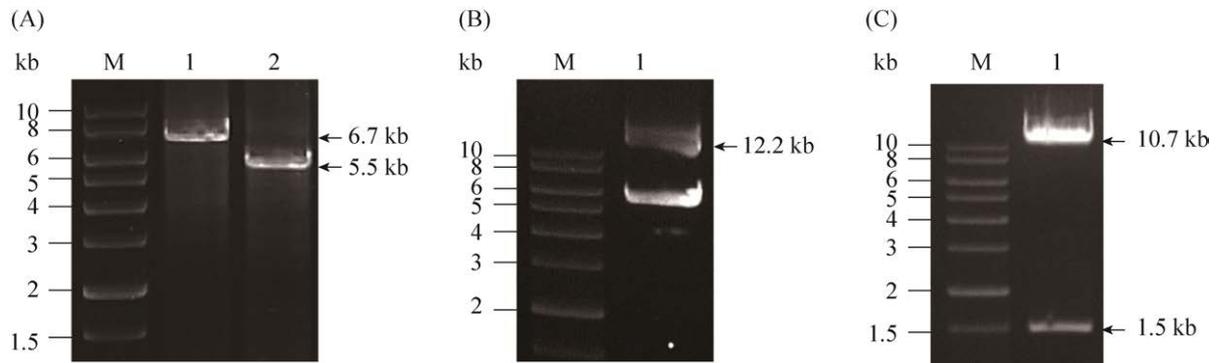


图 2. 重组质粒 pXW55-*pchEch-sfp* 克隆构建及酶切验证

Figure 2. Plasmid construction and verification of pXW55-*pchEch-sfp*. A: Agarose electrophoresis of DNA segments amplified by PCR. Lane 1: The vector segment V-XW-*sfp*; lane 2: The fragment F-*pchE*-cH. B: Agarose electrophoresis of the recombinant plasmid pXW55-*pchEch-sfp*. C: Verification of the recombinant plasmid by restriction enzyme *Xho* I.

2.2 大肠杆菌 *sfp* 宿主表达纯化 PchE 与活性分析

用 His-Tag 纯化大肠杆菌宿主表达的 PchE 蛋白, SDS-PAGE 结果显示(图 3-A, 泳道 2), PchE 蛋白大小为 160 kDa, 洗脱液中蛋白浓度较高,

但目的条带下方存在许多非特异性条带, 蛋白纯度差。初步推测杂带是由于单步骤纯化效率不高造成的杂蛋白污染, 进而将亲和层析洗脱的 PchE 蛋白穿过阴离子交换色谱柱 Mono Q 和体积排阻

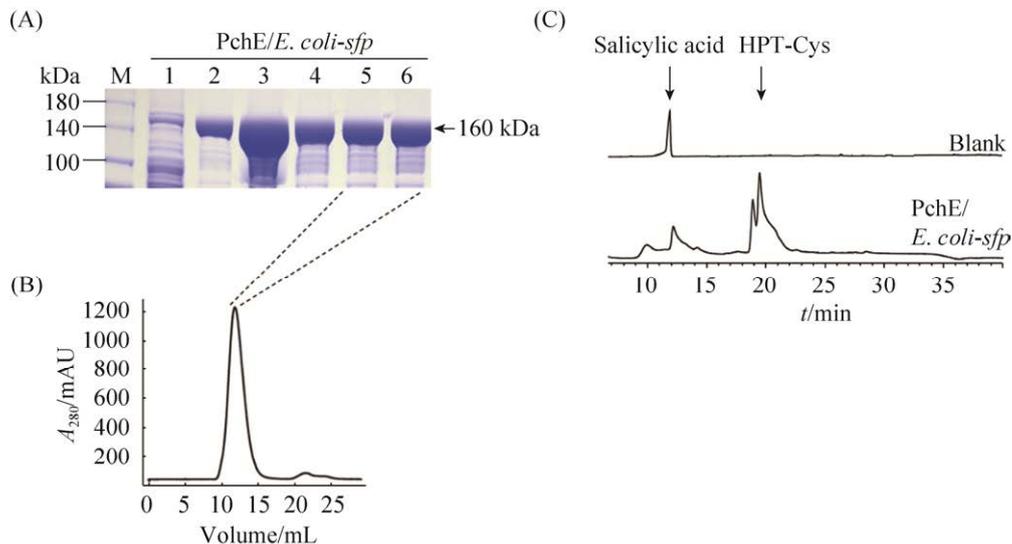


图 3. 大肠杆菌表达 PchE 蛋白的纯化与活性验证

Figure 3. The purification and activity identification of PchE expressed by *E. coli-sfp*. A: SDS-PAGE of PchE purification at each step. Lane 1: Flowthrough of Ni-NTA affinity chromatography; lane 2: Elution of Ni-NTA affinity chromatography; lane 3, 4: Elution of Mono Q; lane 5, 6: Elution of size exclusion chromatography. B: Size exclusion chromatography of PchE with Superdex 200 10/300 column. C: *In vitro* biochemical identification of PchE using HPLC.

色谱柱 Superdex 200, 希望进一步提纯蛋白。然而, 离子交换层析只对 PchE 进行了浓缩, 并没有改善非特异性条带的现象(图 3-A, 泳道 3 和 4)。体积排阻色谱图表明(图 3-B), PchE 蛋白出峰位置约在 11 mL 处, 呈现较好的单一对称峰形, 而对应出峰体积洗脱液电泳结果却显示, 杂带依然未被消除(图 3-A, 泳道 5 和 6)。经过三步纯化策略均无法优化获得高纯度 PchE 蛋白, 并且出现的杂带尺寸与目的蛋白大小接近, 且条带大小有序递减, 因此推测可能是由于 PchE 在大肠杆菌中表达不完整导致的断带现象, 或者是 PchE 折叠不充分导致蛋白疏水结构域暴露, 与其他杂蛋白粘连, 所以无法通过多步纯化步骤去除。

在整合泛酰化酶 Sfp 的大肠杆菌中表达的 PchE, 证明可以被翻译后修饰, 获得了有活性的蛋白, 并在体外生化反应中催化水杨酸和半胱氨酸的环化脱水, 生成中间产物 HPT-Cys (图 3-C)。然而在 HPT-Cys 左侧存在另一个小峰, 认为是受蛋白纯度和活性影响, 生成了其他副产物。

2.3 酿酒酵母 BJ5464-*npgA* 表达纯化 PchE 与活性分析

将质粒 pXW55-*pchE*-cH 转化到酿酒酵母

BJ5464-*npgA* 中进行异源表达, 并进行 Ni-NTA 亲和纯化。SDS-PAGE 结果显示, 酵母宿主表达的 PchE 蛋白并未出现上述非特异性条带(图 4-A, 泳道 4), 仅经过一步纯化, 蛋白纯度明显提高。通过离子交换层析后, PchE 蛋白被浓缩, 蛋白纯度很高(图 4-A, 泳道 5)。观察到酵母宿主表达的 PchE 蛋白纯度明显优于大肠杆菌宿主, 推测是由于酵母细胞中转录和翻译系统更加成熟, 能够帮助蛋白完整表达, 同时酵母细胞具有丰富的酶协助翻译后蛋白的正确加工、修饰和折叠, 从而形成正确的结构构象, 在一定程度上有利于蛋白纯化。

基于已经报道的研究, 泛酰化酶 NpgA 具有修饰底物宽泛性, 通过激活 NRPSs 参与赖氨酸、青霉素和铁载体的合成^[24-25]。在体外重构生化体系中加入酿酒酵母-*npgA* 表达的 PchE 蛋白, 能够检测到产物 HPT-Cys 的生成(图 4-B), 并且对比大肠杆菌表达的 PchE, 产物峰左侧的小峰消失, 峰形更锐, 推测酵母表达的 PchE 可能在催化中更具有专一性。在前人研究中, NpgA 主要用于修饰真核蛋白, 本实验表明在酵母宿主中, NpgA 可以催化原核蛋白 PchE 的泛酰化, 得到功能性 PchE, 证明 NpgA 具有修饰底物的宽泛性。

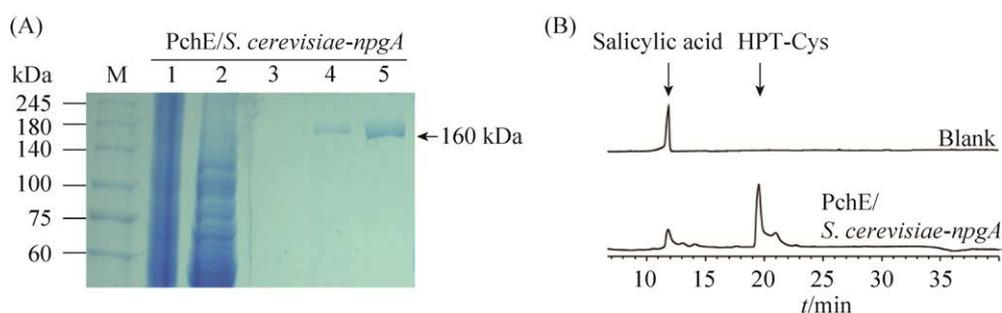


图 4. 酿酒酵母-*npgA* 表达 PchE 蛋白的纯化与活性验证

Figure 4. The purification and activity identification of PchE expressed by *S. cerevisiae-npgA*. A: SDS-PAGE of PchE purification at each step. Lane 1: Total protein; lane 2: Supernatant; lane 3: Wash of Ni-NTA; lane 4: Elution of Ni-NTA; lane 5: Elution of Mono Q. B: *In vitro* biochemical identification of PchE using HPLC.

2.4 酿酒酵母 BJ5464-*npaA* 共表达 PchE 与 Sfp 的纯化与活性分析

为了确保 PchE 蛋白在酵母宿主中的功能性表达, 本实验设计了 PchE 与细菌源 PPTase Sfp 的共表达质粒 pXW55-*pchEcH-sfp*。将该质粒转化酿酒酵母后, 进行蛋白表达与 Ni-NTA 亲和纯化。亲和层析和离子交换层析的 SDS-PAGE 结果都显示(图 5-A, 泳道 4 和 5), 蛋白纯度相比大肠杆菌中有显著提高, 非特异性蛋白条带消失, 再次证实了酵母宿主表达巨型蛋白的优势。而相比于未引入泛酰化酶 Sfp 的情况, 共表达条件下的 PchE 在两步纯化后得到的蛋白浓度有所提高, 推测 Sfp 也在酵母宿主中发挥了一定作用。

在验证与 Sfp 共表达的 PchE 体外活性时发现, HPLC 的结果与酵母宿主非共表达 Sfp 的情况非常类似。PchE 作为铁载体合成过程中的延伸模块, 合成了中间产物 HPT-Cys (图 5-B), 而在相同底物、酶浓度和相同反应时间的条件下, Sfp 共表达的 PchE 对于底物的催化转化率并没有明显提高, 推测在对 PchE 的泛酰化修饰作用中, NpaA 与 Sfp 并没有显著的协同效应。这一结果

也为后续将其他需要泛酰化修饰的原核蛋白单独构建到酵母宿主中表达提供了可行的方案。

3 讨论

在研究蛋白功能时, 无论真核源还是原核源的蛋白, 研究者一般首选大肠杆菌作为异源宿主进行表达, 不乏很多成功案例^[26]。然而, 很多蛋白在大肠杆菌中异源表达时出现不表达、包涵体、表达量低、无活性等问题, 往往会阻碍研究进展。所以, 人们根据研究目的不同, 尝试在更高等的宿主中实现高产、高纯度、高活性的目的蛋白表达。

前期, 本课题组在研究巨型 PKSs 和 NRPSs 时, 利用大肠杆菌作为异源表达宿主, 多个蛋白都出现了如表达不完整、易沉淀、难纯化、无功能等问题。本研究以一个巨型 NRPS 的亚基 PchE 为研究对象, 尝试在真核表达系统酿酒酵母细胞中表达 PchE, 成功获得了功能蛋白。在对比了大肠杆菌宿主和酿酒酵母宿主表达 PchE 的纯度后, 证明酿酒酵母宿主表达的 PchE 纯度明显提高, 并且消除了大肠杆菌表达产生的非特异性条带。据此推测, 高等宿主可能比低等宿主更容易完整

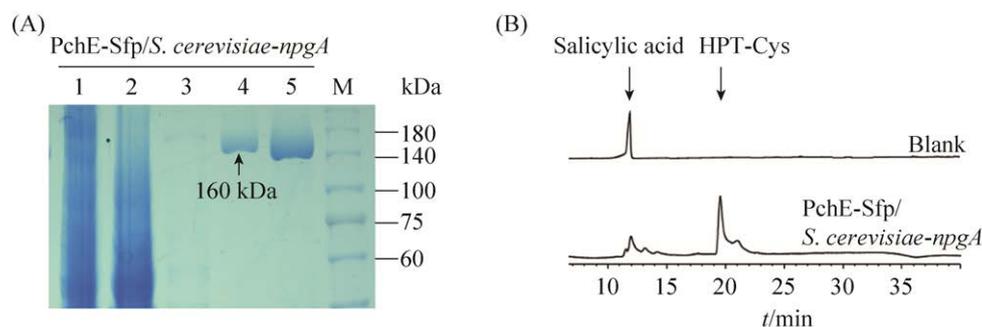


图 5. 酿酒酵母-*mpaA* 表达 PchE-Sfp 蛋白的纯化与活性验证

Figure 5. The purification and activity identification of PchE-Sfp expressed by *S. cerevisiae-mpaA*. A: SDS-PAGE of PchE purification at each step. Lane 1: Total protein; lane 2: Supernatant; lane 3: Wash of Ni-NTA; lane 4: Elution of Ni-NTA; lane 5: Elution of Mono Q. B: *In vitro* biochemical identification of PchE-Sfp using HPLC.

表达巨型蛋白, 并且具备更丰富的翻译后修饰酶, 有利于折叠形成稳定构象, 这对于后续课题组开展巨型蛋白结构研究至关重要。除此以外, 本研究选择的酿酒酵母表达质粒 pXW55 在发酵时, 不存在外源抗生素的筛选压力, 而是利用酵母自身代谢通路, 在葡萄糖消耗完成后启动乙醇发酵途径, 激活乙醇脱氢酶启动子, 诱导目的蛋白过表达。这能大大减少大肠杆菌发酵过程带来的抗生素环境胁迫, 是选择酵母表达宿主的另外一个优势。

同时, 本研究首次论证了真菌源泛酰化酶 NpgA 对原核蛋白 PchE 的泛酰化底物位点具有宽泛的识别能力, 并且修饰得到的蛋白可能具有更好的专一性。推测芽孢杆菌来源的泛酰化酶 Sfp 利用乙醇诱导型启动子 ADH2, 也可以在酿酒酵母宿主中进行有效的泛酰化修饰。但两种泛酰化酶同时存在于酵母细胞时, 究竟是协同修饰或是选择性发挥作用, 仍需要进一步探究。

总体而言, 本研究为次生代谢领域的巨型 PKSs 和 NRPSs 在酵母表达体系中实现功能性表达提供了可行且有效的方法, 也为下游进行蛋白结构和功能机理研究提供了有力支持。

参 考 文 献

- [1] Pham PV. Medical biotechnology. Omics Technologies and Bio-Engineering. Amsterdam: Elsevier, 2018: 449–469.
- [2] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 172.
- [3] Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. *Recombinant Gene Expression*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011: 329–358.
- [4] Reuven NB, Koonin EV, Rudd KE, Deutscher MP. The gene for the longest known *Escherichia coli* protein is a member of helicase superfamily II. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(19): 5393–5400.
- [5] Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 2013, 4(4): 207–211.
- [6] Cacho RA, Tang Y. Reconstitution of fungal nonribosomal peptide synthetases in yeast and *in vitro*. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016: 103–119.
- [7] Youard ZA, Wenner N, Reimann C. Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *BioMetals*, 2011, 24(3): 513–522.
- [8] Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 525–537.
- [9] Cox CD, Rinehart KL, Moore ML, Cook JC. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(7): 4256–4260.
- [10] Meyer JM, Hornsperger JM. Role of PyoverdinePf, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *Journal of General Microbiology*, 1978, 107(2): 329–331.
- [11] Braud A, Geoffroy V, Hoegy F, Mislin GL A, Schalk IJ. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(3): 419–425.
- [12] Takase H, Nitani H, Hoshino K, Otani T. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infection and Immunity*, 2000, 68(4): 1834–1839.
- [13] Reimann C, Serino L, Beyeler M, Haa D. Dihydroaeruginic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology: Reading, England*, 1998, 144(Pt 11): 3135–3148.
- [14] Quadri LEN, Keating TA, Patel HM, Walsh CT. Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: *in vitro* reconstitution of aryl-4,

- 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry*, 1999, 38(45): 14941–14954.
- [15] Patel HM, Walsh CT. *In vitro* reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry*, 2001, 40(30): 9023–9031.
- [16] Patel HM, Tao JH, Walsh CT. Epimerization of an l-cysteinyll to a d-cysteinyll residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 2003, 42(35): 10514–10527.
- [17] Cunrath O, Gasser V, Hoegy F, Reimann C, Guillon L, Schalk IJ. A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(1): 171–185.
- [18] Ronnebaum TA, Lamb AL. Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 53: 1–11.
- [19] Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Natural Product Reports*, 2014, 31(1): 61–108.
- [20] Nakano MM, Corbell N, Besson J, Zuber P. Isolation and characterization of sfp: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1992, 232(2): 313–321.
- [21] Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahiel MA, Reid R, Khosla C, Walsh CT. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology*, 1996, 3(11): 923–936.
- [22] Márquez-Fernández O, Trigos A, Ramos-Balderas JL, Viniegra-González G, Deising HB, Aguirre J. Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(4): 710–720.
- [23] Mootz HD, Schörgendorfer K, Marahiel MA. Functional characterization of 4'-phosphopantetheinyl transferase genes of bacterial and fungal origin by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* Lys5. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 213(1): 51–57.
- [24] Oberegger H, Eisendle M, Schrettl M, Graessle S, Haas H. 4'-Phosphopantetheinyl transferase-encoding npgA is essential for siderophore biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 2003, 44(4): 211–215.
- [25] Kim JM, Song HY, Choi HJ, So KK, Kim DH, Chae KS, Han DM, Jahng KY. Characterization of NpgA, a 4'-phosphopantetheinyl transferase of *Aspergillus nidulans*, and evidence of its involvement in fungal growth and formation of conidia and cleistothecia for development. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 21–31.
- [26] Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 803–822.

Heterologous expression and purification of the activated siderophore synthetase PchE in *Saccharomyces cerevisiae*

Lu Chen, Jialiang Wang, Jingdan Liang, Zixin Deng, Zhijun Wang*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Objective] Expressing the bacterial siderophore synthetase PchE under the ADH2 promoter in *Saccharomyces cerevisiae* system with the PPTase Sfp from *Bacillus subtilis*, to explore the heterologous expression of activated bacterial protein in eukaryotic system. [Methods] The *sfp* gene was amplified from *Escherichia coli* BAP 1. Both *pchE* gene and *pchE* tandem with *sfp* were cloned to the yeast-*E. coli* shuttle vector pXW55, and transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* BJ5464-*npgA* strain. After the purification steps including affinity chromatography and ion-exchange chromatography, HPLC was used to detect whether the PchE from *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* maintain catalytic activity in the biochemical reaction *in vitro*. [Results] In the *Saccharomyces cerevisiae* expression system, prokaryotic protein PchE was obtained with high purity. And no matter assisted by the bacterial or fungal PPTase, PchE can be modified and synthesize intermediate product HPT-Cys. [Conclusion] It was firstly demonstrated that both fungal gene *npgA* and bacterial gene *sfp* can modify bacterial nonribosomal peptide synthase. With the comparison of protein expression between yeast and bacterial host, the giant protein PchE expressed by yeast has higher purity and fewer nonspecific bands. This suggested that yeast host might be more suitable for expressing and purifying functional giant protein.

Keywords: siderophore synthetase PchE, *Saccharomyces cerevisiae*, heterologous expression and purification, biochemical activity, PPTase

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900700, 2019YFA0905400)

*Corresponding author. E-mail: wangzhijun@sjtu.edu.cn

Received: 3 March 2021; Revised: 21 April 2021; Published online: 28 September 2021