

酵母表面展示分选酶底物用于分选酶活性检测

罗立新, 吴琳, 林影

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要 【目的】以 EGFP 标签检测分选酶底物 QALPETGEE 在毕赤酵母表面的表达, 然后将酵母表面展示的底物与分选酶相互作用以检测分选酶活性。【方法】以 pcDNA-myc-his-EGFP 为模板, 通过 PCR 技术将 QALPETGEE-linker-EGFP 基因连接到穿梭载体 pKFS 上, 构建 QALPETGEE-linker-EGFP 酵母表面展示载体后转化至毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中。重组菌经培养, 利用荧光显微镜检测重组酵母的荧光强度, 然后通过荧光分光光度计检测分选酶与底物相互作用后产生游离的 EGFP 荧光强度进而确定分选酶的酶活。【结果】荧光显微镜下观察到重组酵母细胞表面有绿色荧光且强度随时间增强。荧光分光光度计检测表明, 反应后上清游离的 EGFP 荧光强度由原先的 187.67 ± 2.16 增加至 273.47 ± 2.14 。【结论】这表明分选酶底物已成功展示在酵母表面, 且为分选酶的活性检测提供了高效、经济的方法。

关键词: 酵母展示技术; 分选酶; 荧光分光光度计; 底物; 活性检测

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)11-1534-06

抗生素的广泛使用过程中存在很强的选择性压力, 使得耐药性病原菌的持续加速增长严重危害人类的健康, 寻求安全有效解决病原菌耐药性问题已成为国内外生化领域的研究热点。Mazmaian^[1]首先发表了有关金黄色葡萄球菌分选酶的相关文章以后, 激起了国外很多学者在基础研究方面的兴趣, 期待它成为抗革兰氏阳性致病菌感染的靶酶^[2]。分选酶 A (SrtA) 具有膜结合巯基转肽酶催化的功能^[3], 是将一些在细胞质中合成的革兰氏阳性菌表面蛋白锚定到菌体细胞壁上的关键酶。革兰氏阳性菌的表面蛋白可促进病原菌与宿主的接触, 并有利于躲避宿主免疫系统反应。其机理是分选酶可识别表面蛋白 C-末端保守氨基酸基序 LPXTG 片段, 在苏氨酸 (T) 和甘氨酸 (G) 之间裂解, 最终将表面蛋白锚定到细胞壁的肽聚糖上。抑制分选酶的催化作用, 可阻断表面蛋白的锚定过程, 破坏致病菌感染途径, 使宿主的免疫细胞能识别而杀灭致病菌。目前国外报道

的分选酶活性测定的方法主要有纤连蛋白结合法^[4]、荧光淬灭活性检测法^[5-6]和荧光共振能量转移-HPLC 检测法 (FRET-HPLC)^[7-8], 由于上述方法都需要大量合成添加荧光标记的底物, 使其应用成本提高, 研究受到一定的限制。

近年来, 酵母表面展示系统广泛应用于酒精发酵^[9]、新药筛选^[10]、生物吸附及抗原表面展示^[11]等方面, 具有不需分离纯化、直接应用的优点。本文利用毕赤酵母表面展示系统, 以絮凝素 (FS) 为介导, 首次成功地将分选酶底物 QALPETGEE 展示在酵母细胞表面, 以 EGFP 作为标签检测其蛋白的表达, 并通过该体系测定了分选酶的酶活, 为分选酶抑制剂的筛选奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 毕赤酵母 GS115 和穿梭质粒

基金项目: 国家自然科学基金 (20776051)

作者简介: 罗立新 (1966 -), 男, 广东兴宁人, 博士, 教授, 主要从事微生物制药和生物化工方面的研究。Tel/Fax: +86-20-39380628; E-mail:

bitxluo@scut.edu.cn

收稿日期: 2009-06-16; 修回日期: 2009-08-21

pKFS 为华南理工大学林影教授惠赠; *Escherichia coli* Top10 购自 Invitrogen 公司; *Escherichia coli* BL21 (DE3) 为本实验室保存; 表达载体 pTRX/*srtA* 为本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂和仪器 限制性内切酶 *EcoR* I、*Mlu* I、*Xho* I、*Kpn* I、*Sca* I、T4 DNA 连接酶、DL2000 和 DL1 5000DNA Maker 以及 *Ex Taq* DNA 聚合酶、质粒小量提取试剂盒等购自 TakaRa 宝生物工程(大连)有限公司, 胶回收试剂盒购自 Promega 生物有限公司。

1.1.3 培养基及培养条件: 大肠杆菌用 LB 培养基, 37℃ 振荡培养。毕赤酵母用 YPD 或 BMGY、BMMY 培养基, 30℃ 静置培养。氨苄青霉素购自北京普博欣生物有限公司, 作用浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 台式高速冷冻离心机(Eppendorf, Centerifuge 5804R 型), PCR 仪(Eppendorf, Mastertycler 型), 凝胶成像分析仪(Bio-Rad, Universal Hood II 型), 超微量紫外/可见光光度计(NavoVue)。

1.2 表面展示载体 pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 的构建

根据文献^[12-13]报道的与 EGFP 融合的 linker 的长度和特点, 以 pcDNA-myc-his-EGFP 为模板, 设计上游引物 P1: 5'-CCCACGCGTATGCAAGCTTTGCCT-GAAACTGGTGAAGAAGGAGGAATTGGAATTGCTC-3', 下划线为 *Mlu* I 位点, 将分选酶的底物 QALPETGEE 基因设计在上游引物内; 下游引物 P2: 5'-CGCGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3', 下划线为 *EcoR* I 位点。扩增参数如下: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 cycles, 最后延伸 10 min。将 PCR 产物切胶回收纯化, 用 *EcoR* I + *Mlu* I 同时酶切 PCR 纯化产物和 pKFS 载体, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收, 以 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 构建载体 pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP, 转化 *E. coli* Top10 感受态, 提取质粒 DNA, 双酶切鉴定, 测序。

1.3 QALPETGEE-linker-EGFP 整合至毕赤酵母基因组

用 *Sac* I 酶切 pKFS、pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP, 使其线性化后, 用氯化锂法转化, 将基因整合至酵母基因组, 重组酵母命名为 GS115/pKFS、GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP, 其中重组酵母 GS115/pKFS 作为阴性对照, 转化子铺到 MD 板上, 30℃ 培养 48 h。MD 平板上出现的转化子接种于 YPD 液体培养基中过夜培养, 按 Invitrogen 操作指南

提取酵母基因组 DNA 作为模板, 利用 QALPETGEE-linker-EGFP 基因序列的 PCR 引物进行酵母基因组 PCR 鉴定, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.1 重组转化子的摇瓶培养及诱导表达

将重组酵母转化子 GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 和对照菌 GS115/pKFS 接种于 50 mL BMGY 培养基中, 30℃, 200 r/min 振荡培养 16~20 h 至 $OD_{600} = 2 \sim 6$ 。离心收集菌体, 再将其悬浮于 BMMY 培养基中, 稀释至 OD_{600} 为 1, 继续振荡培养, 每隔 24 h 向 BMMY 培养基中补加甲醇至终浓度为 0.5% 进行诱导表达, 取 10 μL 发酵液在荧光显微镜下观察表达量。

1.3.2 分选酶的诱导表达

重组表达载体 pTRX-*srtA* 分别转化到感受态大肠杆菌宿主菌 BL21(DE3) 中。将阳性菌落过夜培养物按 1% 比例接种到含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素(Amp) 的 LB 培养基中, 37℃, 200 r/min 培养至 OD_{600} 约 0.6, 取 2 mL 培养物做未诱导对照, 剩余培养液添加 IPTG 至 1 mmol/L, 继续培养约 6~8 h, 离心收集菌体, SDS-PAGE 检测表达情况。

1.3.3 分选酶与酵母表面展示底物的相互作用

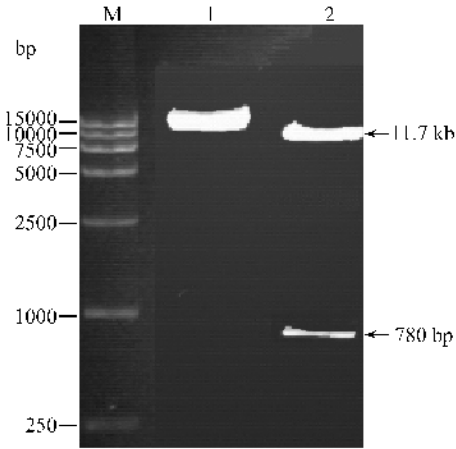
将诱导表达分选酶的菌体进行离心破碎, 取上清液 400 μL 与 100 μL 甲醇诱导表达 168 h 后的表面展示底物的酵母(PBS 反复洗涤离心酵母二次后, 与分选酶相互作用), 37℃ 培养 1 h。设同样的反应体系但不加分选酶做阴性对照, 即用 PBS 取代诱导表达的分选酶菌体经离心、破碎得到的上清液补足 400 μL 。利用荧光分光光度计重复检测 3 次。

2 结果

2.1 表面展示载体 pKFS/QALPETGEE-linker-EGFP 的构建

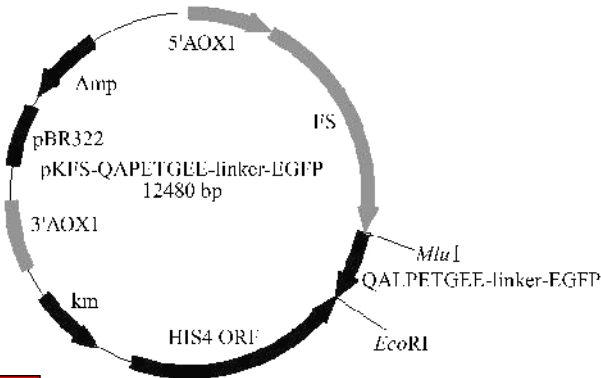
以 pcDNA/myc-his-EGFP 为模板, 用引物 P1、P2 扩增出 QALPETGEE-linker-EGFP 基因。所扩增出的条带与预期的 780 bp 左右大小一致。将 QALPETGEE-linker-EGFP 基因插入到穿梭质粒 pKFS 多克隆位点 *Mlu* I 及 *EcoR* I 处。已构建的载体 pKFS/QALPETGEE-linker-EGFP 经 *Mlu* I 和 *EcoR* I 双酶切, 1% 凝胶电泳鉴定, 分别在 11.7 kb 和 780 bp 附近出现两条明显的带, 见图 1 所示。与预期结果一致, 初步可以认为 QALPETGEE-linker-EGFP 基因已经克隆到 pKFS 中。经测序得知, 插入表达质粒的目的基因序列与设计一致, 与 GenBank 中的序列比对, 核苷酸序列一致性达到 100%, 蛋白质翻译密

码无误,表明成功构建了载体 KFS/QALPETGEE-linker-EGFP,其载体质粒图见 2 所示。



1 *EcoR* I 和 *Mlu* I 双酶切 pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 鉴定图

Fig. 1 Restriction map of pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP digested with *EcoR* I and *Mlu* I. M, 15000kb DNA Marker; 1, pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP digested with *EcoR* I. 2, pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP digested with *EcoR* I and *Mlu* I.



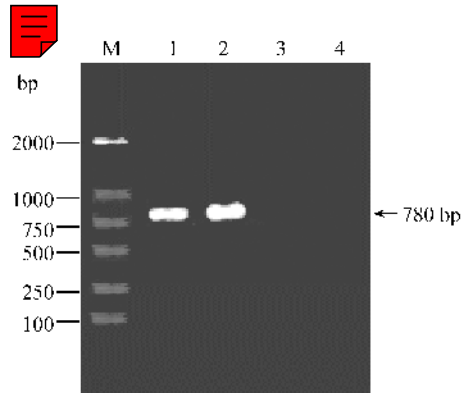
2 表达载体 pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 质粒图

Fig. 2 Expression plasmid of pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP. Amp and Km: Ampicillin resistance gene and Kanamycinresistance gene; 5'AOX1: the alcohol oxidase 1 promoter; HIS4 ORF: encoding the gene of HIS; FS: encoding the gene of the flocculation functional domain of Flo1p (a lectin-like cell-wall protein).

2.2 QALPETGEE-linker-EGFP 整合至毕赤酵母基因组

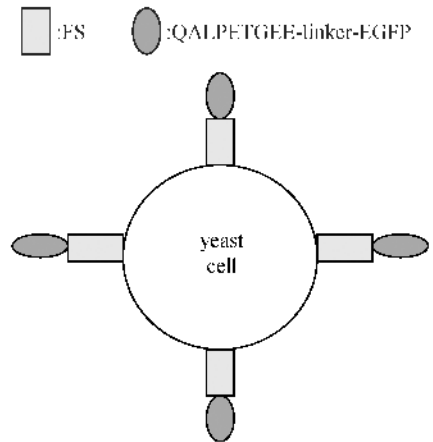
毕赤酵母 GS115 为组氨酸(His)营养缺陷型菌株。穿梭载体 pKFS 和表面展示载体 pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 均带有 His 基因,只有当这两种载体整合至酵母 GS115 中以后,重组酵母才能在 MD 培养基上生长。挑取 MD 平板上生长的转化子 GS115/ pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 和阴性对照菌 GS115/pKFS,经培养后提取基因组。以重组酵母基因组为模板,用 QALPETGEE-linker-EGFP 特异

性引物进行 PCR 扩增。经电泳检测 PCR 的鉴定结果,如图 3 所示,泳道 1 和 2 在 780 bp 左右有明显的条带,而泳道 3 和 4 在 780 bp 附近没有条带。这表明重组酵母 GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 基因组中已经含有 QALPETGEE-linker-EGFP 基因。因此,重组酵母可进一步用于 QALPETGEE-linker-EGFP 基因的诱导表达,表面展示 QALPETGEE-linker-EGFP 的酵母模型如图 4 所示。



3 重组酵母转化子鉴定图

Fig. 3 Detection of recombinant yeast transformant. M: DL-2000 DNA Marker; Lane1-2: GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP as template; Lane3-4: GS115/pKFS as control.



4 酵母表面展示的 QALPETGEE-linker-EGFP

Fig. 4 Yeast surface display of QALPETGEE-linker-EGFP.

2.3 QALPETGEE-linker-EGFP 基因在毕赤酵母中的表达

添加甲醇对重组酵母 GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 和对照菌进行诱导表达培养。EGFP 为绿色荧光蛋白,可以在波长为 488 nm 的激光下被激发,在 513 nm 波长处有吸收峰。每隔 24 h 取样检测酵母表面 EGFP 标签的荧光强度,结果如图 5 所示,这表明:诱导表达的阴性对照 GS115/pKFS 几乎没有荧光产生,而 GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP

则被标记上了荧光,48 h 后在细胞表面出现较微弱的荧光。由于 EGFP 是能持续发荧光的蛋白,则随

着时间增长而 EGFP 的表达量不断增加,荧光强度不断增强。

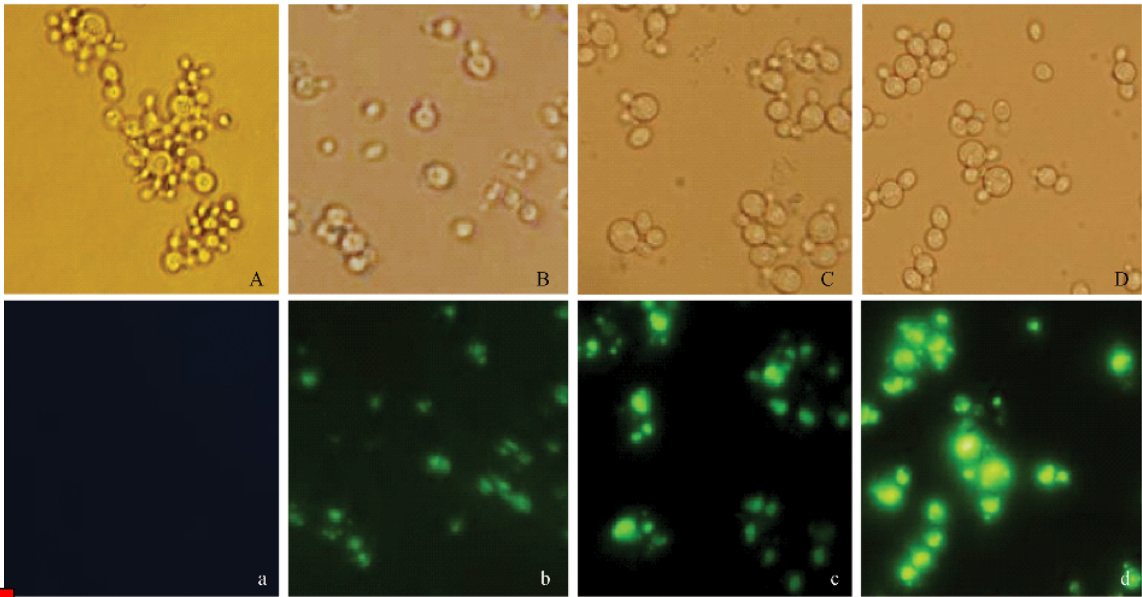


图 5 EGFP 荧光蛋白标记重组酵母显微镜

Fig.5 Microscopy observation of EGFP labeled recombinant cells. A ,B ,C ,D : phase contrast micrographs ; a ,b ,c ,d :fluorence micrographs. A ,a :GS115/pKFS as control ; B ,b : after 48h 's GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP ; C ,c : after 96h's GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP ; D ,d : after 144 h's GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP .

2.4 分选酶与底物的相互作用

经诱导表达的分选酶在苏氨酸和甘氨酸之间裂解酵母表面展示的底物,使锚定在细胞壁表面的 EGFP 脱落,变成了游离的 EGFP 蛋白溶于反应上清。反应 1h 后,将反应液离心,除去菌体,取反应上清液用荧光分光光度计测量 EGFP 的荧光强度,结果如图 6 所示,表明诱导表达的分选酶与酵母表面展示的底物相互作用产生的游离的 EGFP 蛋白,重复 3 次测量,得到阴性对对照的的荧光强度值分别

为 189.9、185.6、187.5,则 $SD_{\text{阴性对照}}$ 为 2.16,而与分选酶相互作用的荧光强度分别为 273.0、275.8、271.6,则 $SD_{\text{分选酶}}$ 为 2.14。其阴性对照的荧光强度比较高是因为该酵母经过 168 h 的发酵,在酵母表面锚定了大量的 EGFP 蛋白,在离心的过程中,由于受到较大的离心力与 EGFP 蛋白之间的相互作用力,会出现比较明显的自动脱落现象^[14]。

3 讨论

近年来分选酶抑制剂的筛选研究进展缓慢,究其原因主要是因为目前常用的 3 种筛选方法尚不完善。纤连蛋白结合法存在有缺失突变株难以获得、精确性较差等缺点,荧光淬灭活性检测法精确性高、操作简单,但需合成荧光标记多肽底物,成本较高; FRET-HPLC 较荧光淬灭活性检测法精确性更高,但依然存在检测成本较高的问题。而酵母表面展示体系可对表面蛋白进行高通量检测鉴定筛选。酿酒酵母表面展示体系是酵母表面展示系统中最广泛使用的表面展示体系之一,日本京都大学植田充美教授在酵母表面展示高活性的酶^[15]用于改善环境^[16]。而毕赤酵母表面展示体系,也是一种广泛研究的酵母表面展示体系,具有培养密度极高^[17-18]、诱导表达

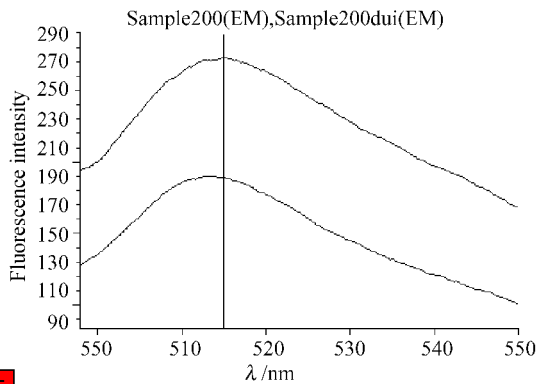


图 6 分选酶活性检测

Fig. 6 Sortase transpeptidation activity assays. Black(below): The interaction of PBS and sortase substrate display on yeast ; Blue(above): The interaction of sortase and its substrate display on yeast .

性强、稳定性较高^[14]等优点。本研究利用酵母表面展示技术,EGFP 标签添加到穿梭载体 pKFS 中,利用 FS 将分选酶底物展示在毕赤酵母细胞表面,这为获得分选酶的底物提供了便捷。然后检测表面的 EGFP 标签的展示,确保展示目的基因成功后,通过荧光的变化检测分选酶的活性,具有成本低廉、操作容易和精确度高等优点。

以 pcDNA-myc-his-EGFP 为模板,将分选酶的底物 QALPETGEE 基因设计在上游引物内,扩增出 QALPETGEE-linker-EGFP 基因,并成功克隆至大肠杆菌-毕赤酵母穿梭表达质粒 pKFS 中。在氯化锂的作用下,整合到毕赤酵母染色体中,QALPETGEE-linker-EGFP 蛋白在甲醇诱导下表达。通过荧光显微镜检测 EGFP 标签的表达,分析得到的结果是 EGFP 能在酵母细胞 GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 表面正确表达,并且随着发酵时间的增长,发荧光细胞的数目增多和荧光强度增大。然后将展示在酵母表面的底物与分选酶相互作用,以检测分选酶的活性,相对于阴性对照,分选酶与 GS115/pKFS-QALPETGEE-linker-EGFP 相互作用后的上清中存在有较多游离的 EGFP,荧光强度值增加了 84.1。以上结果表明分选酶底物 QALPETGEE-linker-EGFP 已经成功地展示在酵母细胞表面,而后进行分选酶的检测,结果表明分选酶可以有效地催化底物的苏氨酸(T)和甘氨酸(G)之间的裂解,这为下一步进行分选酶抑制剂的筛选提供了可能。

参考文献

- [1] Mazmanian SK, Liu G, Hung TT, et al. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 1999, 285(5428): 760 - 763.
- [2] 罗立新,施周铭.一种抗革兰氏阳性致病菌新型靶酶——分选酶.生物化学与生物物理进展(*Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2006, 33(9): 828 - 833.
- [3] Bae T, Schneewind O. The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(9): 2910 - 2919.
- [4] Ki-Bong Oh, Mi-Na Oh, Jae-Gyu Kim, et al. Inhibition of sortase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to fibronectin via fibronectin-binding protein by sortase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70: 102 - 106.
- [5] Sam sik Kang, Jae-Gyu Kim, Tae-Hoon lee, et al. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(8): 1751 - 1755.
- [6] Anthony W. Maresso, Ruiying Wu, Justin W. Kern, et al. Activation of inhibitors by sortase triggers irreversible modification of the active site. *Journal Of Biological Chemistry*, 2007, 282(32): 23129 - 23139.
- [7] Ryan GK, Patrick D, Dewey GM. Development of a high-performance liquid chromatography assay and revision of kinetic parameters for the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA. *Analytical biochemistry*, 2004, 326: 42 - 48.
- [8] Ann A, Weidong D, Bhupesh Kapoor, et al. Development of an HPLC assay for *Staphylococcus aureus* sortase evidence for the formation of the kinetically competent acyl enzyme intermediate. *Analytical biochemistry*, 2007, 360: 14 - 22.
- [9] Yasuya Fujita, Junji Ito, Mitsuyoshi Ueda, et al. Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 1207 - 1212.
- [10] MC Kieke, BK Cho, ET Boder, et al. Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Engineering*, 1997, 110: 1303 - 1310.
- [11] Kuroda K, Shibasaki S, Ueda M, et al. Cell surface engineered yeast displaying histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57: 697 - 701.
- [12] Peng Cao, Shuangquan Zhang, Juan Zhang, et al. Construction and characterization of a bi-functional EGFP/sBAFF fusion protein. *Biochimie*, 2006, 88: 629 - 635.
- [13] Swati Sharma, Purnananda Guptasarma. Dimorphic aggregation behavior of a fusion polypeptide incorporating a stable protein domain (EGFP) with an amyloidogenic sequence (retroCspA). *FEBS Letters*, 2008, 582: 2203 - 2211.

- [14] Takanori Tanino , Hideki Fukuda , Akihiko kondo . Construction of a *Pichia pastoris* Cell-Surface Display System Using Flo1p Anchor System . *Biotechnology progress* . 2006 , 22 :989 – 993 .
- [15] Shigechi H , Uyama K , Fujita Y , et al . Enhancement of cellulase activity by clones selected from the combinational library of the cellulose-binding domain by cell surface engineering . *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* , 2002 , 17(3 – 5) :179 – 187 .
- [16] Kuroda K , Shibasaki S , Ueda M , et al . Cell surface-engineered yeast displaying a histiding oligopeptide (hexahis) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2001 , 57(5 – 6) :697 – 701 .
- [17] Cereghino JL , Cregg JM . Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . *FEMS Microbiology Reviews* , 2000 , 24 :45 – 66 .
- [18] Cregg JM , Cereghino JL , Shi J , et al . Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* . *Molecular Biotechnology* . 2000 , 16 :23 – 52 .

Sortase analysis by displaying its substrates on yeast surface

Lixin Luo* , Lin Wu , Ying Lin

(College of Veterinary Medicine , National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues , Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation , South China Agricultural University , Guangzhou 510642 , China)

Abstract [Objective] QALPETGEE sortase's substrate was anchored on the cell surface of yeast *Pichia pastoris* using EGFP to detect its expression . **[Methods]** The gene-encoding QALPETGEE-linker-EGFP was amplified by PCR by using pcDNA/myc-his-EGFP as a template , and then inserted into shuttle vector pKFS . Then , the vectors were introduced into *Pichia pastoris* GS115 . After cultivation , recombinant cells were verified with fluorescence microscopy and sortase activity was detected by fluorescence spectrophotometer from variety of free EGFP's fluorescence intensity . **[Results]** The green cells were observed by fluorescence microscopy , enhancing over time . Fluorescence spectrophotometer convinced that fluorescence intensity of free EGFP in the reaction supernatant increased from 187.67 ± 2.16 to 273.47 ± 2.14 after interaction of sortase and its substrates . **[Conclusion]** The result suggests that sortase's substrates have been displayed on yeast successfully , which could be used for sortase activity assay .

Keywords : yeast display ; sortase ; fluorescence spectrophotometer ; substrate ; activity assay

(本文责编 : 张晓丽)