

大豆 *GmCAT4* 基因在毕氏酵母中的表达和功能鉴定

陈金峰, 韩艳霞, 焦 婵

(开封大学 化学工程学院, 河南 开封 475004)

摘要: 利用生物信息学分析了大豆 *GmCAT4* 蛋白的结构, 其目的蛋白编码 492 个氨基酸, 分子量为 56.7 kD, 等电点约为 6.80, 同时预测了蛋白质的二级和高级结构。利用双酶切的方法从克隆载体 pMD19-T-*GmCAT4* 上双酶切下目的基因的 cDNA, 然后将其和表达载体 pPIC9K 进行连接, 构建重组载体 pPIC9K-*GmCAT4*, 经电击转化入毕氏酵母, PCR 证实了 *GmCAT4* 基因已整合进酵母基因组。目的蛋白经甲醇诱导后, 在上清和细胞内均有表达, 发酵液上清粗酶活性为 $124.3 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导后的酵母对 NaCl 和 H_2O_2 表现出一定的抗性。

关键词: 大豆; 过氧化氢酶基因; 毕氏酵母; 表达

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0315

Expression in *Pichia pastoris* and Functional Identification of Soybean *GmCAT4* Gene

CHEN Jin-feng, HAN Yan-xia, JIAO Chan

(Chemical Engineering College of Kaifeng University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Bioinformatics analysis were conducted on the structure of soybean *GmCAT4* protein, which encoded 492 amino acids. The molecular weight of the enzyme was 56.7 kD, and the pI was 6.80, the secondary and tertiary structures of the protein were predicted. After digested by both enzymes from pMD19-T-*GmCAT4*, the target gene was inserted into expression vector pPIC9K, and the yeast strain *Pichia pastoris* was transformed by electrophoration with pPIC9K-*GmCAT4*. It was confirmed that soybean *GmCAT4* gene was integrated into the yeast genome by PCR. After 96 h induction by methanol, the proteins in supernatant and cell lysates were measured by SDS-PAGE, and the activity of the crude liquid enzyme from the supernatant reached $124.3 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$. The transgene yeast strengthened its ability of salt and hydrogen peroxide tolerance.

Key words: Soybean; Catalase gene; *Pichia pastoris*; Expression

过氧化氢酶(catalase, CAT)是需氧生物体内的保护酶,和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)一起能够清除过氧化氢(H_2O_2)。大部分过氧化氢酶结构中都存在着铁卟啉辅基,辅基中铁原子氧化还原态之间的可逆变化能够催化电子发生转移,使 H_2O_2 分解为水和氧气,防止细胞遭受氧化损伤。同时过氧化氢酶作为信号分子 H_2O_2 的关键控制酶,使 H_2O_2 处于动态平衡中,影响植物的生理功能和生长发育^[1]。与动物,特别是哺乳动物单个过氧化氢酶不同,植物过氧化氢酶一般有多个,例如拟南芥 CAT1-3、玉米 Cat1-3、烟草 Cat1-3、南瓜 cat1-3、水稻 CatA-C 都属于过氧化氢酶,但他们表达的情况不尽相同,一类过氧化氢酶在光合组织中表达强烈,二类过氧化氢酶在维管组织中表达,三类过氧化氢酶在叶子中表达微弱,但在种子和花等生殖器官中明显表达^[2]。大豆作为重要的油料作物,存在着 CAT1/2-5 四种过氧化氢酶,它们的基因序列也已经被发现,但其具体功能还不是很

清楚。酵母既具有原核生物易于培养、容易操作等特点,又具有真核生物的蛋白翻译后加工折叠等作用,而且其信号传导途径和转录应答模式与植物类似,所以利用酵母细胞研究植物基因的方法可为揭示植物基因功能提供借鉴。本试验对大豆的 *GmCAT4* 编码区进行克隆并完成其在酵母中的表达和功能鉴定,旨在为进一步研究大豆过氧化氢酶的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 DH5 α 大肠杆菌菌株、毕氏酵母 GS115 菌株及 pPIC9K 质粒由本试验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自 Takara 公司。胰蛋白胨、酵母提取物来自 Qxoid 公司,核酸标准分子量、蛋白质标准分子量为 MBI 公司产品,其余试剂为国产分析纯。

收稿日期:2013-12-03

基金项目:河南省教育厅科技研究重点项目(12B180015)。

第一作者简介:陈金峰(1977-),男,硕士,副教授,主要从事生物化学与分子生物学的教学及研究。E-mail: cjfchengssman@163.com。

1.1.3 主要培养基 10 × YNB (13.4% 酵母氮源):溶解 13.4 g YNB 于 100 mL 水中,过滤除菌,加热至 YNB 完全溶解,存于 4℃。500 × 生物素 (0.02%):溶解 20 mg 生物素于 100 mL 水中,过滤除菌,放于 4℃。100 × H (0.4% 组氨酸):溶解 400 mg L-组氨酸于 100 mL 水中,低于 50℃ 加热以促溶解,过滤除菌。10 × M (5% 甲醇):混合 5 mL 甲醇与 95 mL 水,过滤除菌。YPD 培养基:1% 酵母提取物,2% 胰蛋白胨,2% 葡萄糖。MM 固体培养基:1.34% YNB,0.000 04% 生物素,0.05% 甲醇,1.5% 琼脂;MD 固体培养基:1.34% YNB,0.000 04% 生物素,2% 葡萄糖,1.5% 琼脂。培养基 BMGY:酵母提取物 1%, 蛋白胨 2%, YNB 1.34%, 生物素 0.000 04%, 甘油 0.5%, (pH6.0) 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液。诱导表达培养基 BMMY:除以 0.5% 的甲醇代替甘油,其余成分与 BMGY 相同。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建 将本实验室构建的 pMD19-T-*GmCAT4* 载体和 pPIC9K 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切处理,然后用 T4DNA 连接酶 16℃ 连接 3 h,产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,通过 Kan⁺ (50 mg·L⁻¹) 抗性筛选阳性克隆,提取质粒,经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切验证后,送北京三博志远有限公司测序,得到正向插入的重组质粒 pPIC9K-*GmCAT4*。

1.2.2 酵母细胞的转化和筛选 制备酵母 GS115 的感受态细胞,并把 pPIC9K-*GmCAT4* 用 *Sal* I 酶切线性化的载体转化酵母 GS115,将纯化回收的线性载体和 80 μL 感受态细胞在电转杯中混匀,在电压 1 500 V、电阻 400 Ω、电容 25 μF、脉冲时间 10 ms 的条件下进行电穿孔。转化完成后涂布在 MD 培养基平板,在 30℃ 条件下培养直至转化子出现,用牙签挑取转化子,点种于 MM 板上,选取在 MD 上正常生长,在 MM 平板上生长快速或缓慢的转化子为阳性克隆子进行表达菌株的培养和诱导表达。

1.2.3 酵母转化子 PCR 检测 根据 GenBank 中大豆过氧化氢基因 *GmCAT4* 的 cDNA 序列 (Photozome 基因号为 Glyma04g01920,利用软件 Primer Premier 5.0 设计合成引物,在引物的 5' 端加入 *EcoR* I 酶切位点,3' 端加入 *Not* I 酶切位点,引物序列分别为:

P1:GAATTCATGGATCCCTACAAGCACCGG;

P2:GCGGCCGCTTAAATATTTGGCCTCGTG;

(划线处为限制性内切酶的酶切位点),以含有重组载体 pPIC9K-*GmCAT4* 的 GS115 酵母菌煮沸上清液为模板,用 *Taq* 酶进行 PCR 扩增,PCR 反应体系如下:10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTP (2.5

mmol·L⁻¹ mix) 2 μL, P1 引物 0.5 μL, P2 引物 0.5 μL,模板 1 μL;*Taq* DNA polymerase (5 U·μL⁻¹) 0.5 μL; ddH₂O 13 μL; 反应程序为 94℃/5 min, 94℃/40 s, 55℃/40 s, 72℃/2 min, 25 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 反应结束后,取 PCR 反应产物进行电泳分析。

1.2.4 菌株的诱导表达 接种菌株于 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中,于 28℃, 250 r·min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ = 2~6 (16~18 h), 5 000 r·min⁻¹ 离心收集菌体,用 BMMY 重悬菌体,使 OD₆₀₀ = 1.0 左右。将上步所得的菌液置于 500 mL 的摇瓶中,放置于 28℃, 250 r·min⁻¹ 的摇床上继续生长,每隔 24 h 向培养基中添加无水甲醇至终浓度为 0.5%, 诱导培养 96 h 后取样分析。

1.2.5 目的蛋白的 SDS-PAGE 分析 取经 TCA 浓缩的上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析;细胞内蛋白分析可以先用缓冲液洗一下诱导表达后的细胞,然后加入 200 μL 蜗牛酶 (0.5 g·L⁻¹), 37℃ 水浴 30 min,最后煮沸破壁进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 目的蛋白活性分析 取 96 h 诱导表达后的上清,采用钼酸铵比色法测定过氧化氢酶的活性,过氧化氢酶活性单位定义为:37℃, pH7.0 时,每分钟分解 1 μmol H₂O₂ 所需的酶量。抗性分析采用诱导表达后的菌株用无菌水重悬,调整 OD₆₀₀ = 1.0, 然后以 1:50 的比例转接到含 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 或 0.01 mol·L⁻¹ H₂O₂ 的 YPD 的培养基中培养,每隔 24 h 进行菌液浓度的测定。

2 结果与分析

2.1 目的蛋白的结构分析

大豆过氧化氢酶高度保守。利用 DNAMAN 软件对大豆的 4 个过氧化氢酶氨基酸序列相似性进行比对 (图 1),结果显示 *GmCAT4* 和 *GmCAT5* 的同源性高达 99%, *GmCAT1/2* 和 *GmCAT3* 的同源性达 98.4%, *GmCAT1/2* 和 *GmCAT5* 同源性差异较大,为 86.2%。4 个蛋白 C 端 484~486 位 S(H/R/K)L 氨基酸序列为过氧化物酶体的靶向信号 (peroxisomal targeting signal, PTS1),在序列上游 480~482 位置处存在 QKI 氨基酸序列,可能与 PTS1 的受体蛋白结合有关。通过生物信息学分析, *GmCAT4* 基因编码 492 个氨基酸,表达分子质量约为 56.7 kD 的蛋白质,该蛋白质的等电点约为 6.80,二级结构分析表明, *GmCAT4* 含有 28.86% α 螺旋, 16.87% β 片层, 8.74% β-转角, 45.53% 无规则卷曲;利用 SMART 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

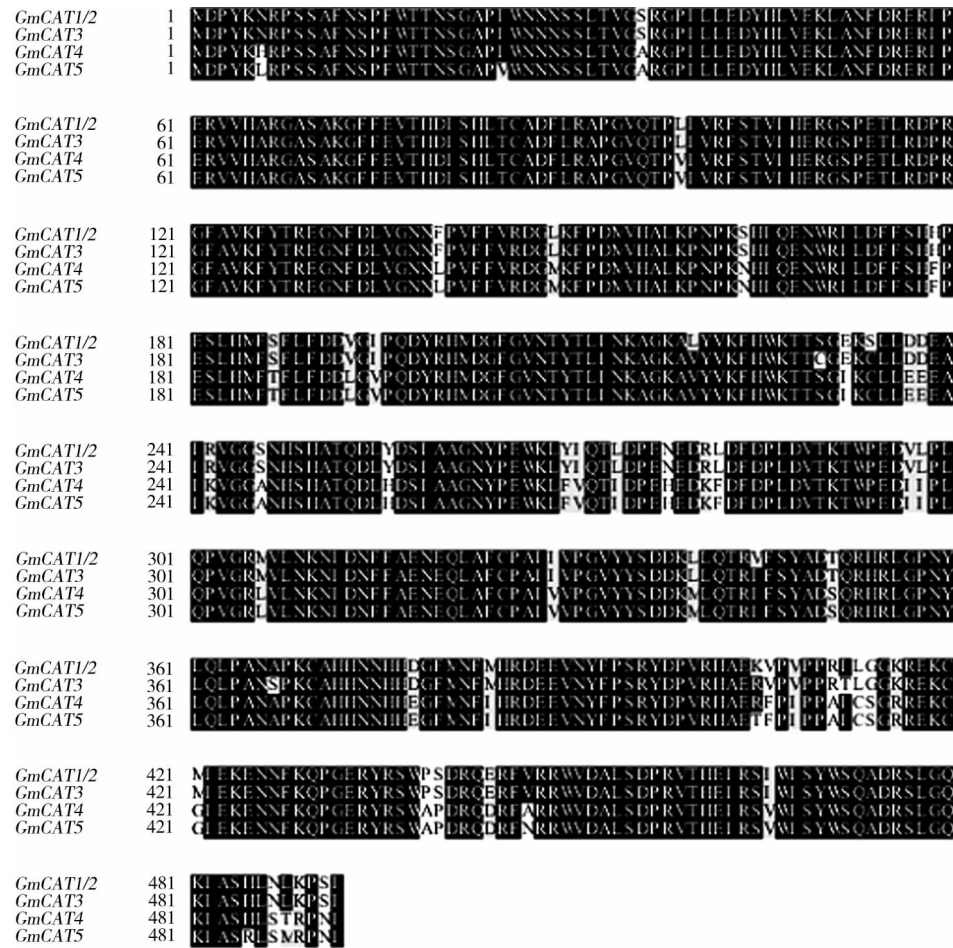


图 1 大豆过氧化氢酶家族氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of amino acid sequence from soybean catalase family

对 *GmCAT4* 进行结构域分析,结果表明其蛋白序列包含了 384 个氨基酸的过氧化氢酶结构域和 C 端 69 个氨基酸的过氧化氢酶相关免疫反应结构域;通过 SWISS-MODEL 在线软件,预测它的三维结构,从图 2 可以看出,该蛋白理论高级结构包含的片段和二级结构的预测基本一致,从而验证了结构预测的正确性。

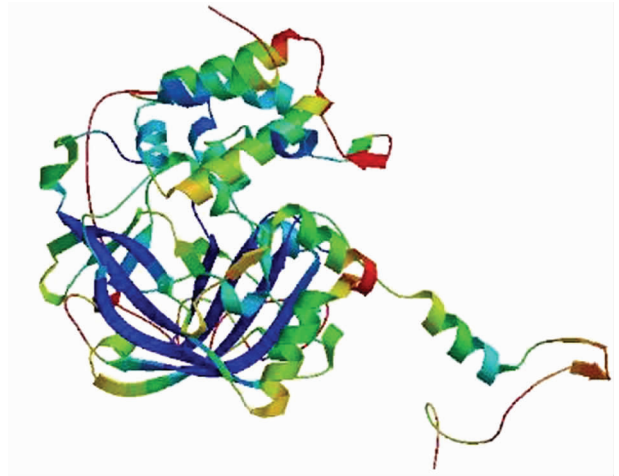
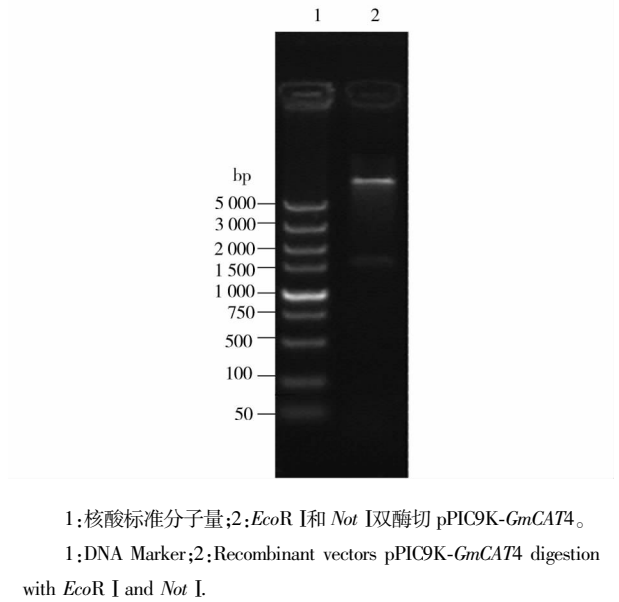


图 2 *GmCAT4* 的三维结构

Fig. 2 3-D structure of *GmCAT4*

2.2 表达载体的构建

从本实验室构建的 *pmd19-t-gmcat4* 克隆载体上,利用 *EcoRI*和 *NotI*双酶切的方法获得 *GmCAT4* 的 cDNA



1:核酸标准分子量;2:*EcoRI*和 *NotI* 双酶切 pPIC9K-*GmCAT4*。

1:DNA Marker;2:Recombinant vectors pPIC9K-*GmCAT4* digestion with *EcoRI* and *NotI*.

图 3 重组载体的酶切验证

Fig. 3 Identification of recombinant expression vectors by restriction enzyme digestion

片段,进行琼脂糖凝胶电泳法回收片段大小为 1 500 bp 左右的核酸片段,连入表达载体 pPIC9K,经过连接转化和提取质粒等步骤,获得重组载体 pPIC9K-*GmCAT4*,此载体用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,获得大小约为 1 500 bp 左右的片段,

如图 3 中泳道 2 酶切下的片段所示,为了进一步确定目的片段的正确性,对获得的表达载体进行序列测定(图 4),把测序的结果进行两端拼接,并和 NCBI 网站上公布的序列进行比对,结果发现重组载体所连接的目的片段就是 *GmCAT4* 的 cDNA 片段。

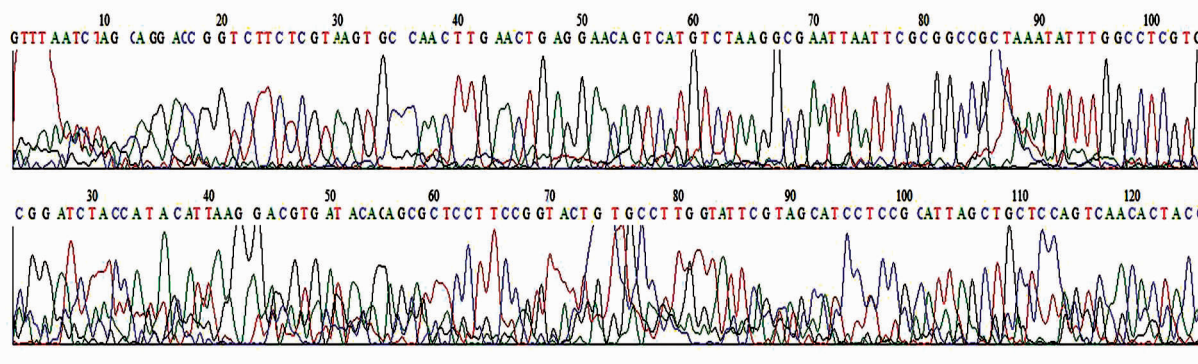


图 4 *GmCAT4* 的 5'和 3'末端的部分测序结果

Fig. 4 The sequence analysis of part of the *GmCAT4* 5' and 3'

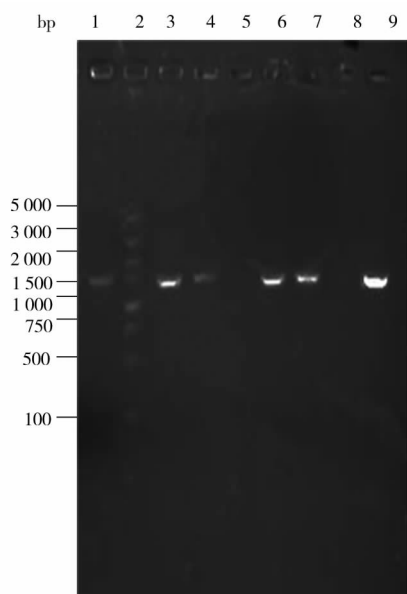
2.3 酵母转化子的 PCR 检测

把 pPIC9K-*GmCAT4* 用 *Sal* I 酶切线性化的载体转化酵母 GS115,经过 MM 和 MD 培养基上筛选,均能长出菌落,最终获得 102 个 His⁺ Mut⁺ 转化子,进一步通过 G418 筛选获得高拷贝克隆。用 PCR 方法鉴定重组菌株,即提取重组菌株新鲜的染色体 DNA 为模板,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。挑取的 6 个菌落中均扩增出预期大小的目标条带,而携带空载体的 GS115 对照菌无特异条带出现(图 5),证

明初步筛选到重组的阳性转化子,表明 *GmCAT4* 基因已经成功转入并整合到酵母基因组中。

2.4 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

选取阳性 GS115-pPIC9K-*GmCAT4* 重组菌株,经 96 h 诱导后收集发酵液体上清,通过浓缩后进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析,同时用 GS115-pPIC9K 空载转化子表达产物作对照。结果显示:与对照相比,其中 4 个菌株的发酵培养上清液中均检测到分



1,2,3,4,6,7,9:酵母转化子;2:核酸标准分子量;5,8:对照。

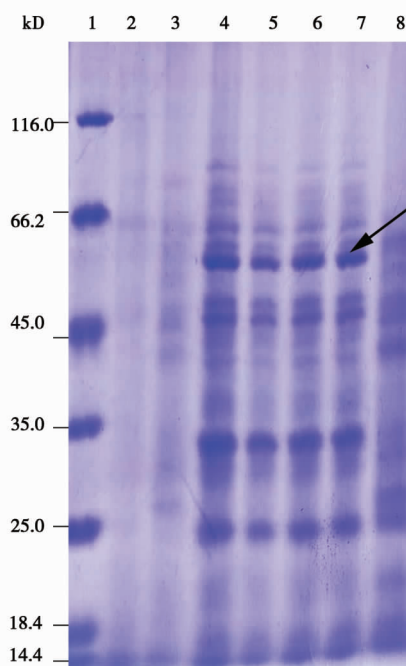
1,2,3,4,6,7,9: yeast transformant;2: DNA Marker;5,8: Control.

图 5 pPIC9K-*GmCAT4* 酵母

转化子的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of pPIC9K-*GmCAT4*

yeast transformant by PCR



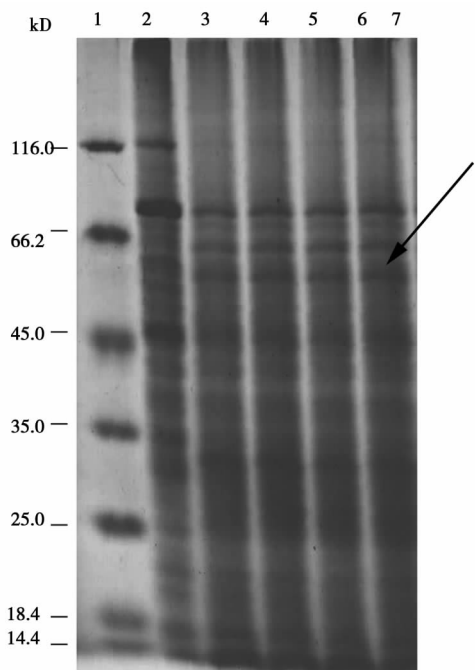
1: 蛋白质标准分子量;2~7: pPIC9K-*GmCAT4*;8: pPIC9K

1: Protein standard Marker;2~7: pPIC9K-*GmCAT4*;8: pPIC9K

图 6 培养液上清的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the

culture supernatant



1: 蛋白质标准分子量; 2: pPIC9K; 3 ~ 7: pPIC9K-*GmCAT4*。
1: Protein standar Marker; 2: pPIC9K; 3-7: pPIC9K-*GmCAT4*。

图 7 胞内蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the
yease cell lysates

泌表达的 57 kD 左右的外源蛋白, 分子质量与推导的氨基酸序列的大小一致(图 6)。同时对表达目的蛋白的阳性菌进行胞内蛋白进行分析, 发现 4 个菌株在胞内均表达了目的蛋白, 说明阳性菌不但能进行分泌表达, 同时也进行了胞内表达(图 7)。

2.5 表达蛋白的活性和抗性分析

用 BMMY 培养基诱导培养重组菌 96 h 后, 离心取上清, 进行酶活性的测定, 结果对照菌 GS115-pPIC9K 的培养液体上清未检测出酶的活性, 而重组菌 GS115-pPIC9K-*GmCAT4* 的上清具有明显的过氧化氢酶的活性, 最高粗酶活性为 124.3 kU·L⁻¹。为了进一步研究大豆 *GmCAT4* 的表达对酵母耐盐和 H₂O₂ 胁迫的影响, 挑取对照菌和重组菌单菌落分别接入 BMMY 液体培养基中诱导培养, 然后转接到含 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 和 0.01 mol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 的 YPD 的培养基中培养。从表 1 可以看出, NaCl 和 H₂O₂ 胁迫均抑制各酵母生长, 经过 48 和 72 h 的盐胁迫, 重组菌生长的速度要明显好于对照菌, 菌增殖数目分别为后者的 2.2 和 2.97 倍, 96 h 后两者差别缩小。而在遭受 H₂O₂ 胁迫时, 重组菌在 48 h 时的增殖数目是对照菌的 2.3 倍, 之后两者趋于一致。

表 1 不同处理方法对毕氏酵母生长 (OD₆₀₀) 的影响

Table 1 The effect of different treatment methods on the growth of *P. pastoris*

处理时间 Treatment time/h	菌株 Strain	对照 Control	NaCl (1.0 mol·L ⁻¹)	H ₂ O ₂ (0.01 mol·L ⁻¹)
24	A	0.490	0.076	0.230
	B	0.494	0.081	0.232
48	A	12.480	0.167	0.290
	B	12.510	0.366	0.667
72	A	12.720	2.760	12.230
	B	12.870	8.210	12.290
96	A	12.850	9.760	12.610
	B	13.000	11.500	12.750

A: GS115-pPIC9K; B: GS115-pPIC9K-*GmCAT4*。

3 讨 论

目前已知的过氧化氢酶按结构划分为单功能 CAT (Mon-functional catalase 或 Typical catalase)、双功能 CAT (Catalase-peroxidase) 和锰 CAT (Mn-cata-

lasee), 其中单功能的 CAT 的分子量为 50 ~ 70 kDa, 具有 4 个相同亚基的结构, 每个亚基含有一个血红素辅基。从结构分析可以看出, 大豆的过氧化氢酶 *GmCAT4* 分子量为 57 kD, 包含有多级结构, 应属于单功能的过氧化氢酶。具有复杂结构的蛋白质, 往

往存在着翻译后修饰加工,因此在原核细胞中表达出的活性往往不高,但真核细胞酵母表达系统避免了这些不足,大豆过氧化氢酶基因分子量较大,在原核生物中表达活性势必会受限制,但在酵母中成功地实现了分泌表达,粗酶的活性较为理想,这些都为酶的提纯分析和功能鉴定提供了物质基础。

过氧化氢酶活性与 H_2O_2 浓度直接相关,能有效清除植物活性氧。过氧化氢酶活性的降低,会导致 H_2O_2 瞬时聚集,引起受 H_2O_2 调节的 *HSP*、*APX*、*GPXH* 基因表达的改变^[3],而在与钙调蛋白结合后活性增加,导致 H_2O_2 水平的快速下降^[4]。转过氧化氢酶基因的植物在胁迫方面表现出一些另人满意的表型,转入大肠杆菌 *KatE* 基因的油菜能提高对霜霉病和白粉病的抗性^[5],本文转入大豆 *GmCAT4* 基因的酵母细胞经过诱导表达,增强了对 H_2O_2 和盐胁迫的抗性,这也与在烟草和黄麻中转入大肠杆菌 *KatE* 基因后增强了这些植物的抗盐性^[6-7] 相一致,同样 *KatE* 基因在马铃薯中超表达后,马铃薯叶中叶绿素含量增加,对盐胁迫的抗性增强^[8]。同时研究发现过氧化氢酶可以和许多信号因子发生相互作用,能与 *AtNDK1* 相互作用,增强对除草剂和外源 H_2O_2 的抗性^[9],*ATCAT2* 和 *ATCAT3* 可以和盐胁迫相关因子 *SOS2* (salt overly sensitive) 作用^[10],而 *ATCAT1* 可被 H_2O_2 或 *ABA* 强烈诱导,可能与 *MAPK* 级联反应 (mitogen-activated kinase cascade) 有关^[11]。这些研究都说明了过氧化氢酶在植物抗性方面存在着特殊作用,同时暗示着这种复杂机制中的信号分子间存在着交谈。

参考文献

- [1] CHEN H G, Afyant M, HUANG G J, et al. Characterization of a leaf-type catalase in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. L.) [J]. Botanical Studies, 2011, 52: 417-426.
- [2] Mhamdi A, Noctor G, Baker A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians [J]. Archives Biochemistry Biophysics, 2012, 525 (2): 181-94.
- [3] Laure M, Thomas R, Beat B F, et al. Down-regulation of catalase activity allows transient accumulation of a hydrogen peroxide signal in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant, Cell and Environment, 2013, 36, 1204-1213.
- [4] Yang T, Poovaiah B W. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99 (6): 4097-102.
- [5] Mohamed El-Awady, Reda E A, Moghaieb, et al. Transgenic canola plants over-expressing bacterial catalase exhibit enhanced resistance to *Peronospora parasitica* and *Erysiphe polygoni* [J]. Arab Journal of Biotechnology, 2008, 11 (1): 71-84.
- [6] Al-Taweel K, Iwaki T, Yabuta Y, et al. A bacterial transgene for catalase protects translation of d1 protein during exposure of salt-stressed tobacco leaves to strong light [J]. Plant Physiology, 2007, 145 (1): 258-65.
- [7] Islam M, S, azam M S, Sharmin S S, et al. Improved salt tolerance of jute plants expressing the *katE* gene from *Escherichia coli* [J]. Turkish Journal of Biology, 2013, 37: 206-211.
- [8] Mahmoud M, Taoufik B, Youssef H, et al. Insight into the role of catalases in salt stress in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2009, 13 (3): 373-379.
- [9] Fukamatsu Y, Yabe N, Hasunuma K. *Arabidopsis* NDK1 is a component of ROS signaling by interacting with three catalases [J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44 (10): 982-989.
- [10] Verslues P E, Batelli G, Grillo S, et al. Interaction of *SOS2* with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H_2O_2 signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Cell Biology, 2007, 27 (22): 7771-7780.
- [11] Xing Y, Jia W, Zhang J. *AtMCK1* mediates ABA-induced *CAT1* expression and H_2O_2 production via *AtMPK6*-coupled signaling in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2008, 54 (3): 440-451.