C4ST-1 在大肠杆菌中的可溶性表达

李 青[1]，周正雄[1]，堵国成[1,2]，李江华[*1,2]，康 振[1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：软骨素-4-O-硫酸转移酶-1（Chondroitin-4-O-sulfotransferase-1，C4ST-1，EC 2.8.2.5）催化软骨素 N-乙酰半乳糖胺（N-Acetylgalactosamine，GalNAc）4 号位羟基硫酸化生成硫酸软骨素 A（chondroitin sulfate A，CSA）。C4ST-1 含 3 对二硫键，在 *Escherichia coli* 细胞质内二硫键难以正确形成，故在 *E. coli* 中表达时主要以包涵体形式存在。为提高胞内可溶性蛋白质的表达水平，共表达了催化二硫键从头形成的巯基氧化酶（Erv1p）或/和促进二硫键正确折叠的二硫键异构酶（DsbC）。结果表明共表达 DsbC 可使 C4ST-1 融合蛋白的胞内可溶性表达水平显著提高，但 C4ST-1 和 Erv1p 共表达对胞内可溶性蛋白质的表达影响相对较小。C4ST-1 和 Erv1p 或 C4ST-1 和 DsbC 共表达菌株的酶活分别为原始菌株的 1.30 和 2.33 倍，活力达到（12.32±0.76）U/L 和（21.99±0.42）U/L。挑取同时共表达 C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 的菌株进行摇瓶水平和 3 L 发酵罐放大培养，酶活分别达到（29.12±0.66）U/L 和 49.97 U/L。本研究为 C4ST-1 的大规模应用奠定了一定的基础。

关键词：软骨素-4-O-硫酸转移酶-1；硫氧还蛋白还原酶；巯基氧化酶；二硫键异构酶；可溶性表达

中图分类号：O 629.12　**文章编号：**1673-1689(2020)06-0068-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.06.010

Soluble Expression of C4ST-1 in *Escherichia coli*

LI Qing[1]，*ZHOU Zhengxiong*[1]，*DU Guocheng*[1,2]，*LI Jianghua*[*1,2]，*KANG Zhen*[1,2]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Chondroitin-4-O-sulfotransferase-1 (C4ST-1, EC 2.8.2.5) catalyzes the sulfation of 4-OH of GalNAc to generate chondroitin sulfate A (CSA). C4ST-1 contains three pairs of disulfide bonds and is hard to correctly fold into active form. As a result, C4ST-1 mainly exists as inclusion bodies in *E. coli*. To increase the soluble expression, the effects of co-expression of thiol oxidase (Erv1p) and C4ST-1 or C4ST-1 and disulfide isomerase (DsbC) were investigated. The results showed that co-expression of DsbC significantly increased the expression level of intracellular soluble protein

收稿日期：2018-10-10

基金项目：国家自然基金面上项目（31670092）；江南大学自主科研计划重点项目（JUSRP51707A）；国家轻工技术与工程一流学科自主课题项目（LITE2018-16）。

* **通信作者：**李江华（1966—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶技术发酵过程优化与控制方面研究。E-mail：lijianghua@jiangnan.edu.cn

while no significant effect was observed for co-expression of Erv1p. Co-expression of C4ST-1 and Erv1p, or C4ST-1 and DsbC increased the enzyme activities to (12.32±0.76) U/L and (21.99±0.42) U/L, which were 1.30 and 2.33 times of that of the original strain, respectively. Then, C4ST-1, Erv1p and DsbC were co-expressed and the enzyme activities in shake flask and 3 L fermenter were improved to (29.12±0.66) U/L and 49.97 U/L, respectively. The present study provides a solid foundation for further applications.

Keywords: chondroitin-4-O-sulfotransferase-1, thioredoxin reductase, sulfhydryl oxidase, disulfide isomerase, soluble expression

硫酸软骨素(chondroitin sulfate,CS)是一类由葡萄糖醛酸和 GalNAc 交替组成,并在 GalNAc 不同位点硫酸化的线性阴离子多糖[1]。CS 为防治关节病[2-3]和修复受损的中枢神经系统[4-5]的最佳药物,同时广泛地应用于食品领域[6]。CS 根据其硫酸化位点不同可分为 CSA、硫酸软骨素 C(chondroitin sulfate C,CSC)等[7-8]。目前,CSA 主要从气管、鲨鱼软骨[9]等动物软骨组织中提取得到。但由于动物组织中提取的硫酸软骨素存在过硫酸化、产品难以保证一致性、可能携带潜在致病因子等因素[10]限制了 CSA 的进一步应用。作者在前期研究中提出两步法得到 CSA。首先,以 *Bacillus subtilis* 为宿主发酵生产软骨素[11];然后以 *Pichia pastoris* 发酵生产的 C4ST-1 催化软骨素形成结构单一的 CSA[12]。

但相比于 *Pichia pastoris*,*E. coli* 具有生长速度快,培养简单,遗传背景清楚等优点,其成为重组蛋白表达的首选。但该系统缺乏蛋白质翻译后修饰系统,表达的 C4ST-1 经常错误折叠成形成包涵体[12-13]。在本课题组前期工作中,将来源于小鼠的 C4ST-1 在 *E. coli* 中成功的进行了表达,表达产物基本上都以包涵体形式存在。C4ST-1 含 3 对二硫键,在 *E. coli* 胞质还原性环境中可能会使 C4ST-1 的二硫键无法折叠或不正确折叠。近年来,人们利用硫氧还蛋白还原酶(TrxB)和谷胱甘肽还原酶(Gor)双突变工程菌株[14-17],融合氧化性硫氧还蛋白 A(TrxA)[18],或者引进二硫键从头形成体系[19]等策略,在 *E. coli* 胞质中成功实现了多种二硫键蛋白的表达。有文献报道表明 Orgami(DE3)等工程菌株不能催化二硫键的从头合成,蛋白质产率可能较低[20]。Erv1p(EC 1.8.3.2)可以催化二硫键从头形成,向 *E. coli* 细胞质引入二硫键从头形成体系,可能会大幅提高活性蛋白质的产率[20-24]。DsbC(EC 5.3.4.1)在细胞质过量表达能够促进外源蛋白质的二硫键正确配对和异构化,进而提高胞质可溶性蛋白质表达水平[25-26]。本研究通过在 *E. coli* 中共表达 Erv1p、DsbC 及 C4ST-1,以期实现胞内可溶性蛋白质产量和酶活的提高。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 宿主和质粒 菌株 *E. coli* JM109,*E. coli* BL21(DE3),*Saccharomyces cerevisiae* S288C 及质粒 pET-32a(+),pRSFDuet1 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 质粒 DNA 小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、酵母基因组提取试剂盒和细菌基因组提取试剂盒,均购自上海生工生物工程股份有限公司;DNA 标准相对分子质量片段、各种限制性内切酶、DNA 连接酶,均购于大连宝生物工程有限公司;一步法克隆试剂盒,购自 NEB 公司;SDS-PAGE 预制胶,标准相对分子质量蛋白质,购自 Thermo 公司;胰蛋白胨、酵母提取物,购自英国 OXOID 公司;对硝基硫酸苯酯(PNPS)、3′-磷酸腺苷-5′-磷酸(PAP),均购自 Sigma-Aldrich 公司;软骨素制备参照文献[11],芳基硫磺基转移酶(ASTIV,EC 2.8.2.1)制备参照文献[12],其他试剂均为国产分析纯。

DYY-6D 型琼脂糖水平电泳槽,购自北京六一生物科技有限公司;蛋白胶电泳槽,购自 Thermo 公司;VCX750 型超声破碎仪,购自美国 SONICS 公司;UV2450 型紫外可见分光光度计,购自日本岛津公司;Avanti J-26XP 低温高速冷冻离心机,购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.1.3 培养基及培养条件 LB 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物5,NaCl 10;pH 调为 7.2

(固体培养基添加 2 g/dL 琼脂粉)。

TB 培养基(g/L):胰蛋白胨 12,酵母提取物 24,甘油 6,KH_2PO_4,2.31,K_2HPO_4 12.54。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得

1)*C4ST-1* 的获得　在 NCBI 数据库检索来源于小鼠的 C4ST-1 (NP_067414) 氨基酸序列,经 TMHMM 软件预测分析 C4ST-1 的第 17-37 位氨基酸区域为跨膜区,因此第 38-352 位氨基酸所对应的基因序列(GenBank:AAI37630.1)按照 *E. coli* 密码子偏好性由南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成。

2)*Erv1p* 的获得　采用酵母基因组提取试剂盒提取 *S. cerevisiae* S288C 基因组。以 *S. cerevisiae* S288C 基因组为模板,设计引物 F1 和 R1,PCR 扩增获得 *Erv1p*(GenBank:DAA08125.1)。

3)*DsbC* 的获得　采用细菌基因组提取试剂盒提取 *E. coli* BL21 (DE3) 基因组。以 *E. coli* BL21 (DE3)基因组为模版,设计引物 F2 和 R2,PCR 扩增获得去除信号肽编码序列的 *DsbC* (GenBank:CAQ33205.1)。

1.2.2 重组载体的构建

1)pET-32a(+)-*C4ST-1* 的构建　设计引物 F3 和 R3 将质粒 pET-32a(+)线性化。设计与线性化质粒 pET-32a(+)含有同源臂的引物 F4 和 R4,以合成的 *C4ST-1* 为模板,PCR 扩增得到 *C4ST-1* 产物。将两步所得产物进行同源重组,转化 *E. coli* JM109 感受态,挑取转化子测序,测序正确即获得重组质粒 pET-32a(+)-*C4ST-1*,见图 1。

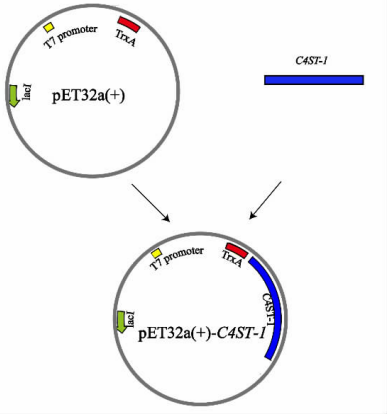


图 1　质粒 pET32a(+)-*C4ST-1* 构建过程

Fig. 1　Schematic of the construction of plasid pET32a(+)-*C4ST-1*

2)pRSFDuet1-*Erv1p* 的构建　设计引物 F5 和 R5 将质粒 pRSFDuet1 线性化。将 PCR 扩增获得的 *Erv1p* 片段与线性化质粒 pRSFDuet1 进行同源重组,转化 *E. coli* JM109 感受态,挑取转化子,测序正确则重组质粒 pRSFDuet1-*Erv1p* 构建成功,构建过程见图 2(a)。

3)pRSFDuet1-*DsbC* 的构建　设计引物 F6 和 R6 将质粒 pRSFDuet1 线性化。将 PCR 扩增获得的 *DsbC* 与线性化质粒 pRSFDuet1 进行同源重组,转化 *E. coli* JM109 感受态,挑取转化子,测序正确则重组质粒 pRSFDuet1-*DsbC* 构建成功,构建过程见图 2(b)。

4)pRSFDuet1-*Erv1p*-*DsbC* 的构建　利用引物 F7 和 R5 将质粒 pRSFDuet1-*DsbC* 线性化。用引物 F1 和 R7 进行 PCR 扩增得到 *Erv1p* 与线性化载体 pRSFDuet1-*DsbC* 进行同源重组。转化 *E. coli* JM109 感受态,挑取转化子测序,测序正确获得重组质粒 pRSFDuet1-*Erv1p*-*DsbC*,构建过程见图 2(c)。本文中所用引物均列于表 1 中。

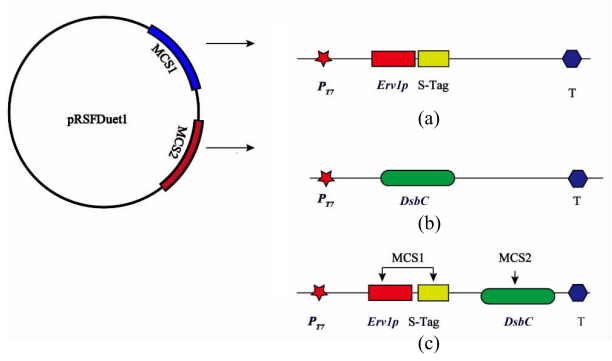


图 2　表达载体 pRSFDuet1-*Erv1p*、pRSFDuet1-*DsbC*、pRSFDuet1-*Erv1p*-*DsbC* 的构建

Fig. 2　Construction of pRSFDuet1-*Erv1p*, pRSFDuet1-*DsbC* and pRSFDuet1-*Erv1p*-*DsbC*

1.2.3 重组载体的转化与诱导表达

挑取测序正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3),挑取单菌落接种于装有 3 mL LB 液体培养基 (含有 50 μg/mL 氨苄青霉素或卡那霉素)的 12 mL 摇菌管中,37 ℃、220 r/min 过夜培养。种子液按体积分数 2%接种量转接至含 50 mL TB (含有 50 μg/mL 氨苄青霉素或卡那霉素)的 250 mL 三角瓶中,37 ℃、220 r/min 培养至 OD_{600} 0.6~0.8 左右,添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,25 ℃诱导表达 16 h,收集菌体。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

引物	序列 (5′-3′)
F1	GCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGATGAAAGCAATAGATAAAATGAC
R1	CAAATTTCGCAGCAGCGGTTTCTTTTTATTCGTCCCAGCCGTCCTTC
F2	AGTATAAGAAGGAGATATACATATGGATGACGCGGCAATTCAACAAACG
R2	GGTGGCAGCAGCCTAGGTTAATTATTTACCGCTGGTCATTTTTTGGTG
F3	GATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGCATCCAGTTATGAGAAGAAACCC
R3	TCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAATCCAATTTCAAATAATTAGGAAC
F4	TAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAG
R4	CTTGTCGTCGTCGTCGGTACCCAGATCTG
F5	AAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCC
R5	CGCAAGCTTGTCGACCTGCAGGCGCGCCGAGCT
F6	TAATTAACCTAGGCTGCTGCC
R6	CATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAACT
F7	TAATGCTTAAGTCGAACAGAAAG
R7	ACTTTCTGTTCGACTTAAGCATTACGAGTCCATGTGCTGGCGTTC

注:表中标注下划线部分为同源臂序列

1.2.4 重组载体胞内粗酶液制备及其 SDS-PAGE 检测

1) 粗酶液制备 发酵结束后,将诱导表达产物于 4 ℃、7 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。用 pH 7.0 的 20 mmol/L Tris-HCl 将菌体洗涤 2 次,稀释至 OD_{600} 2.0~3.0,在冰上超声破碎(功率 300 W,工作4 s,间歇 6 s,10 min)。4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,分别收集上清液与沉淀。所得上清液即为粗酶液,沉淀用与上清液同体积的 pH 7.0 的 20 mmol/L Tris-HCl 重悬,备用。

2) SDS-PAGE 检测 取 30 μL 待检测样品,加入 10 μL 的 4×上样缓冲液混匀,于 72 ℃变性 10 min。取 20 μL 变性样上样,120 V 开始电泳,当溴酚蓝指示剂迁移到距底部 1~2 cm 处停止电泳。电泳结束后,取出胶块,使用质量分数 0.1%的考马斯亮蓝 R250 染色液染色 30 min 后纯水脱色,至背景颜色较浅,凝胶成像分析仪拍照备用。

1.2.5 C4ST-1 的酶活性测定

参照本课题组前期工作[12],向 1 mL 20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.0)反应缓冲体系中添加 50 mmol/L PNPS,0.5 mmol/L PAP,2 mg ASST IV ,100 mg 软骨素,粗酶液 2 mg,于 37 ℃反应 2 h。以不加底物或将粗酶液加热失活作为阴性对照,沸水浴 100 ℃、5 min 终止反应。酶活力单位的定义为:在最适反应条件(37 ℃,pH 7.0)下,1 h 内催化生成 1 μmol/L PNP 所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增和重组载体的构建

2.1.1 pET-32a (+)-*C4ST-1* 的构建

以合成的 *C4ST-1* 为模板,引物 F3 和 R3 进行 PCR 扩增,扩增得到大约 900 bp 的片段,见图 3(a)。采用 DNA 纯化回收试剂盒对单一凝胶片段进行回收,回收后的 *C4ST-1* 片段与用引物 F4 和 R4 扩增得到的线性质粒 pET-32a (+)(图略) 同源重组,转化 *E. coli* JM109,挑取转化子交由上海生工生物工程有限公司测序,测序结果正确,重组载体 pET-32a (+)-*C4ST-1* 构建成功。

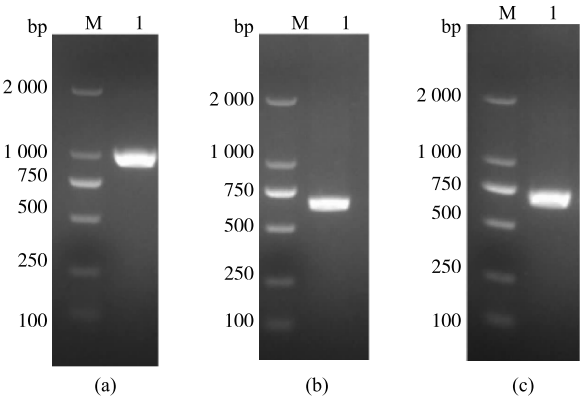
2.1.2 pRSFDuet1-*Erv1p* 的构建

以 *S. cerevisiae* S288C 基因组为模板,引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增获得约 570 bp 的 *Erv1p* 片段,见图 3(b)。将回收的 *Erv1p* 片段和用引物 F5 和 R5 进行 PCR 扩增得到的线性化载体 pRSFDuet1(图略)进行同源重组,转化 *E. coli* JM109,挑取转化子测序,测序结果显示正确,重组载体 pRSFDuet1-*Erv1p* 构建成功。

2.1.3 pRSFDuet1-*DsbC* 的构建

以 *E. coli* BL21(DE3)基因组为模版,设计引物F2 和 R2,PCR 扩增获得去除信号肽的约 600 bp 的*DsbC* 片段,见图 3(c)。将回收的 *DsbC* 片段与引物 F6 和 R6 进行 PCR 扩增得到的线性化载体 pRSFDuet1(图略)进行同源重组,转化 *E. coli* JM109 菌株,挑取转化子测序,测

序结果显示正确，重组载体 pRSFDuet1-*DsbC* 构建成功。



DNA marker；(a)1：*C4ST-1* PCR 产物；(b) 1：*Erv1p* PCR 产物；(c) 1：*DsbC* PCR 产物

图 3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 3 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

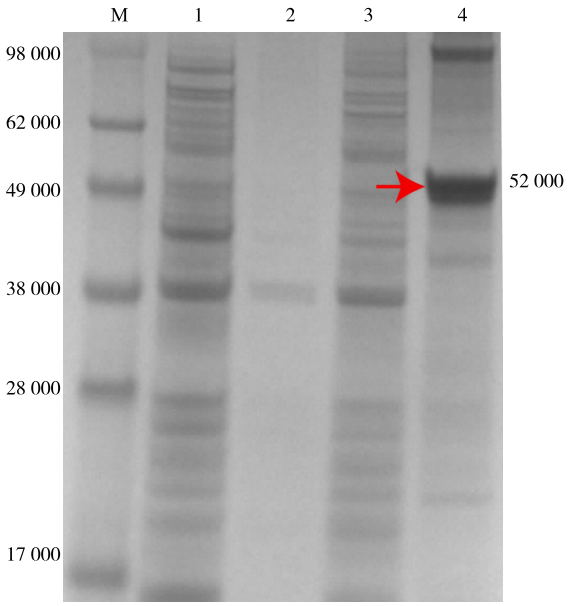
2.1.4 pRSFDuet1-*Erv1p*-*DsbC* 的构建 设计引物 F7 和 R5 PCR 扩增得到线性化载体 pRSFDuet1-*DsbC*（图略）。用引物 F1 和 R7 进行 PCR 扩增得到的 *Erv1p* 片段（图略）与线性化载体 pRSFDuet1-*DsbC* 同源重组，转化 *E. coli* JM109 菌株，挑取转化子测序，测序结果显示正确。

2.2 C4ST-1 在 *E. coli* 胞质表达的 SDS-PAGE 分析

将测序正确的重组质粒 pET-32a（+）-*C4ST-1* 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，获得命名为 *E. coli* BL21(DE3)- pET-32a(+)-*C4ST-1* 的宿主菌。以转化空质粒 pET-32a(+)为对照。挑取重组菌单菌落进行摇瓶水平发酵，发酵结束后对其胞内上清液及胞内沉淀进行 SDS-PAGE 检测分析。结果如图 4 所示，与对照相比，重组菌在沉淀的 5.2×10⁴ 处有一明显条带，上清中未观察到明显条带。即 C4ST-1 在 *E. coli* 胞质中主要以包涵体的形式存在。

2.3 共表达 DsbC 对 C4ST-1 的影响

以重组菌 *E. coli* BL21（DE3）- pET-32a（+）-*C4ST-1* 为出发菌株制备感受态细胞。将重组质粒 pRSFDuet1-*DsbC* 通过热击的方法转化至上述感受态细胞中，以转化空质粒 pRSFDuet1 为对照。重组菌经过摇瓶发酵，超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 5。DsbC 重组蛋白在 *E. coli* 中成功的



蛋白质 marker；1：对照上清液；2：对照沉淀；3：C4ST-1 重组菌上清液；4：C4ST-1 重组菌沉淀

图 4 C4ST-1 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE result of expression product of C4ST-1

进行了表达，其中DsbC(M_r=2.6×10⁴)以胞内可溶形式表达(泳道 3 蓝色箭头所示)。C4ST-1 重组蛋白单独表达时主要以包涵体形式存在(泳道 2)，可溶部分未见明显条带（泳道 1）；共表达 DsbC 导致 C4ST-1 重组蛋白大部分以可溶形式存在（第 3 泳道)，小部分以包涵体形式存在(第 4 泳道)。将各重组菌株进行摇瓶发酵，菌体超声破碎后所得上清液进行酶活测定，结果见图 6。对照菌株的酶活为(9.42±0.29) U/L，DsbC 和 C4ST-1 共表达菌株的酶活为(21.99±0.42) U/L，是对照菌株的 2.33 倍。

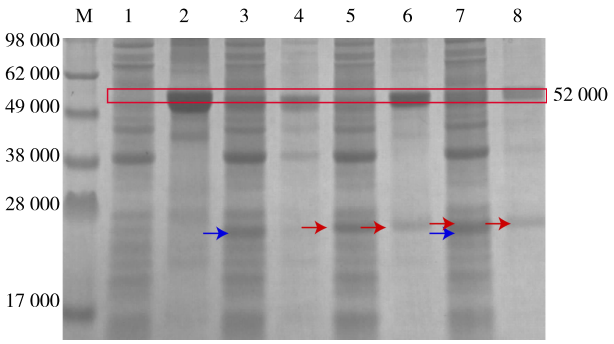
2.4 共表达 Erv1p 对 C4ST-1 的影响

C4ST-1 和 Erv1p 共表达菌株的转化过程同 2.3，将此菌株通过摇瓶发酵，超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析，结果见图 5。Erv1p 在 *E. coli* 中成功的进行了表达，Erv1p(M_r=2.63×10⁴)以胞内可溶(泳道 5 红色箭头所示)和不溶的 2 种形式存在(泳道 6 红色箭头所示)。共表达 Erv1p 也能导致 C4ST-1 融合蛋白部分以可溶形式存在(第 5 泳道)，但大部分仍以包涵体形式存在(第 6 泳道)。即 C4ST-1 与 Erv1p 共表达可在一定程度上促进 C4ST-1 的可溶性表达，但其对 C4ST-1 的可溶性表达影响相对较小。这可能因为 Erv1p 为直接从酵母基因组中扩增得到，

含有大量 *E. coli* 稀有密码子,在 *E. coli* 中可溶性表达的量较少,故对 C4ST-1 的促进作用有限。可根据 *E. coli* 密码子偏好性将 Erv1p 进行全基因合成,或以含有 *E. coli* 稀有密码子的 Rosetta(DE3)为宿主进行表达。将 C4ST-1 和 Erv1p 共表达菌株进行酶活测定,结果见图 6。Erv1p 和 C4ST-1 共表达菌株的酶活达到(12.32±0.76) U/L,是对照菌株的 1.30 倍。

2.5 共表达 Erv1p 和 DsbC 对 C4ST-1 的影响

C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 共表达菌株的转化过程同 2.3,将此菌株通过摇瓶发酵,超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 5。Erv1p 和 DsbC 重组蛋白均在 *E. coli* 中成功的进行了表达,其中 Erv1p (M_r=2.63×10^4)以胞内可溶(泳道 7 红色箭头所示)和不溶(泳道 8 红色箭头所示)的 2 种形式存在;DsbC(M_r=2.6×10^4)以胞内可溶形式表达(泳道 7 蓝色箭头所示)。同时共表达 C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 导致 C4ST-1 重组蛋白部分大部分以可溶形式存在(第 7 泳道),但沉淀仍见部分包涵体蛋白质条带(第 8 泳道)。将此重组菌株进行摇瓶发酵,菌体超声破碎后所得上清液进行酶活测定,结果见图 6。C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 共表达菌株的酶活比对照菌株增加 2.09 倍,酶活最高可达(29.12±0.66) U/L。



蓝色箭头为 DsbC 重组蛋白,红色箭头为 Erv1p 重组蛋白;M:蛋白质 marker;1:对照上清液;2:对照沉淀;3:C4ST-1 与 DsbC 共表达菌株上清液;4:C4ST-1 与 DsbC 共表达菌株沉淀;5:C4ST-1 与 Erv1p 共表达菌株上清液;6:C4ST-1 与 Erv1p 共表达菌株沉淀;7:C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 共表达菌株上清液;8:C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 共表达菌株沉淀

图 5 共表达 Erv1p 和 DsbC 对 C4ST-1 表达的影响

Fig. 5 Effect of co-expression of Erv1p and DsbC on C4ST-1

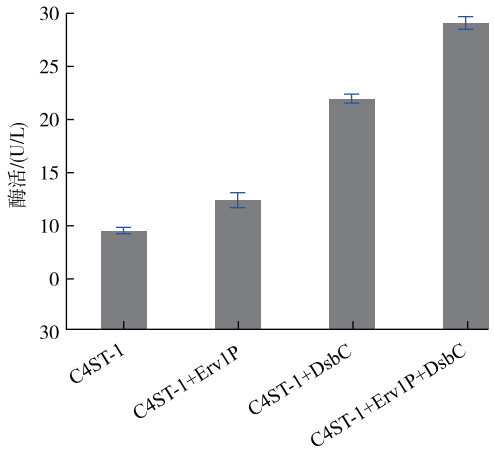


图 6 共表达 Erv1p 和 DsbC 对 C4ST-1 酶活的影响

Fig. 6 Effect of co-expression of Erv1p and DsbC on C4ST-1 enzyme activity

2.6 C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 共表达菌株 3 L 罐培养

为考察同时共表达 C4ST-1、Erv1p 和 DsbC 的菌株能否进一步工业化应用,将此菌株进行 3 L 罐发酵培养。发酵过程控制转速 250 r/min、溶氧水平在体积分数 20%~30%、pH 7.0(流加氨水)左右、起始温度37 ℃,加入 IPTG 后温度降低至 25 ℃。将保藏在甘油管的菌种接于 LB 固体斜面培养基上进行活化,37 ℃培养过夜。挑取斜面菌种接入 LB 液体培养基,37 ℃培养 10 h 左右。将种子液以体积分数为 4%的接种量转接至装有 1 L TB 培养基的 3 L 发酵罐中,定时取样测定 OD_{600} 和酶活,结果见图 7。当菌体生长 2 h 左右进入对数生长期,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。当 IPTG 诱导至 10 h 左右菌体生长进入稳定期,其酶活达到 49.97 U/L。继续延长培养时间,菌体生长不明显且酶活有所下降,故10 h 左右为菌体的最佳产酶时间,为进一步的工业化应用提供技术支持。

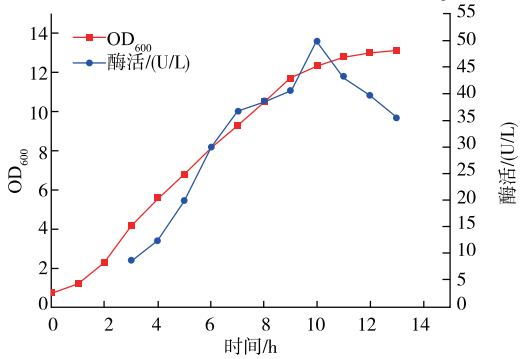


图 7 3 L 发酵罐酶活变化曲线

Fig. 7 Variation curve of enzyme activity under the fermentation condition

3 结 语

本研究中成功的在 *E. coli* 中表达了老鼠来源的 C4ST-1，但表达产物基本上以包涵体的形式存在，限制了其大规模应用。C4ST-1 含 7 个不连续的半胱氨酸残基，当蛋白质含有 2 个以上的非连续二硫键时，其错误配对的几率增大，异常的二硫化物需要异构化才能使蛋白质达到天然构象[27]。为获得高可溶性表达和高活性的 C4ST-1 重组蛋白，本研究中共表达了参与二硫键从头形成的 Erv1p 和促进二硫键正确配对和异构化的 DsbC。结果表明 DsbC 和 Erv1p 对 C4ST-1 的可溶性表达量和酶活均有一定程度的提高。将 C4ST-1、DsbC 和 Erv1p 同时共表达的菌株进行 3 L 发酵罐放大培养，10 h 左右酶活达到 49.97 U/L，是原始菌株摇瓶的 5.30 倍，对 C4ST-1 的广泛应用奠定了一定的基础。但本研究中对活性蛋白质的产生条件只进行了初步探索，重组蛋白仍有一大部分以包涵体的形式存在。为进一步提高其可溶性表达量和酶活，一方面可以通过以胞质呈现氧化性环境的 shuffle 菌株[28-30]为宿主进行表达，另一方面可通过优化培养基、培养条件、构建不同的融合表达系统等进行尝试表达。

参考文献：

[1] SCHIRALDI C, CIMINI D, DE ROSA M. Production of chondroitin sulfate and chondroitin[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2010, 87(4): 1209-1220.

[2] CLEGG D O, REDA D J, HARRIS C L, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis[J]. **New England Journal of Medicine**, 2006, 354(8): 795-808.

[3] UEBELHART D, MALAISE M, MARCOLONGO R, et al. Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: a one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo[J]. **Osteoarthritis & Cartilage**, 2004, 12(4): 269-276.

[4] GALTREY C M, FAWCETT J W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system[J]. **Brain Research Reviews**, 2007, 54(1): 1-18.

[5] MEYERPUTTLITZ B, JUNKER E, MARGOLIS R U, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan[J]. **Journal of Comparative Neurology**, 2015, 366(1): 44-54.

[6] RESTAINO O F, FINAMORE R, STELLAVATO A, et al. European chondroitin sulfate and glucosamine food supplements: a systematic quality and quantity assessment compared to pharmaceuticals[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2019, 222: 114984.

[7] MENDE M, BEDNAREK C, WAWRYSZYN M, et al. Chemical synthesis of glycosaminoglycans[J]. **Chemical Reviews**, 2016, 116(14): 8193-8255.

[8] LI J, SU G, LIU J. Enzymatic synthesis of homogeneous chondroitin Sulfate oligosaccharides[J]. **Angewandte Chemie**, 2017, 56(39): 11784-11787.

[9] LIGNOT B, LAHOGUE V, BOURSEAU P. Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage and concentration-desalting by ultrafiltration[J]. **Journal of Biotechnology**, 2003, 103(3): 281-284.

[10] RESTAINO O F, FINAMORE R, DIANA P, et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2017, 958: 59-70.

[11] JIN P, ZHANG L P, YUAN P H, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2016, 140: 424-432.

[12] ZHOU Z X, LI Q, HUANG H, et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans[J]. **Biotechnology & Bioengineering**, 2018, 115(6): 1561-1570.

[13] HE W Q, ZHU Y Y, SHIRKE A, et al. Expression of chondroitin-4- O -sulfotransferase in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 2017, 101(18): 1-10.

[14] PRINZ W A, ASLUND F, HOLMGREN A, et al. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1997, 272(25): 15661-15667.

[15] BERKMEN M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression & Purification**, 2012, 82

(1):240-251.

[16] BOJKO M,OLCHAWAPAJOR M,TULEJA U,et al. Expression of three diadinoxanthin de-epoxidase genes of *Phaeodacylum tricornutum* in *Escherichia coli* Origami b and BL21 strain[J]. **Acta Biochimica Polonica**,2013,60(4):857-860.

[17] SAVARI M,ZARKESHESFAHANI S H. Production of recombinant human growth hormone in *Eschericia coli* strain origami and comparing freeze/ thaw and sonication methods for proteins extraction[J]. **Revista De Administracao Contemporanea**,2015,17(3):285-303.

[18] HAN T Q,MING H Y,DENG L L,et al. A novel expression vector for the improved solubility of recombinant scorpion venom in *Escherichia coli*[J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**,2016,482(1):120-125.

[19] ZHANG W Y,ZHENG W Y,MAO M W,et al. Highly efficient folding of multi-disulfide proteins in superoxidizing *Escherichia coli* cytoplasm[J]. **Biotechnology & Bioengineering**,2015,111(12):2520-2527.

[20] HATAHET F,NGUYEN V D,SALO K E,et al. Disruption of reducing pathways is not essential for efficient disulfide bond formation in the cytoplasm of *E. coli*[J]. **Microbial Cell Factories**,2010,9(1):67-75.

[21] NGUYEN V D,HATAHET F,SALO K E,et al. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of *E.coli*[J]. **Microbial Cell Factories**,2011,10(1):1- 13.

[22] VEGGIANI G,MARCO A D. Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase[J]. **Protein Expression & Purification**,2011,79(1):111-114.

[23] HOFHAUS G,LEE J E,TEWS I,et al. The N-terminal cysteine pair of yeast sulfhydryl oxidase Erv1p is essential for in vivo activity and interacts with the primary redox centre[J]. **Febs Journal**,2010,270(7):1528-1535.

[24] LEE J,HOFHAUS G,LISOWSKY T. Erv1p from Saccharomyces cerevisiae is a FAD-linked sulfhydryl oxidase[J]. **Febs Letters**,2000,477(1):62-66.

[25] ZAWADA J F,YIN G,STEINER A R,et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production--a new approach for shortening protein production development timelines[J]. **Biotechnology & Bioengineering**,2011,108(7):1570-1578.

[26] DARIUSHNEJAD H,FARAJNIA S,ZARGAMI N,et al. Dsbc chaperone mediated soluble expression of human TNF-α in *E. coli*[J]. **Minerva Biotecnologica**,2018,30(1):14-21.

[27] BERKMEN M,BOYD D,BECKWITH J. The nonconsecutive disulfide bond of *Escherichia coli* phytase (AppA) renders it dependent on the protein-disulfide isomerase,DsbC[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2005,280(12):11387-11394.

[28] JULIE L,CHRIS J,MELINDA F,et al. SHuffle,a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm[J]. **Microbial Cell Factories**,2012,11(1):56-71.

[29] TAIT A R,STRAUS S K. Overexpression and purification of U24 from human herpesvirus type-6 in *E. coli*:unconventional use of oxidizing environments with a maltose binding protein-hexahistine dual tag to enhance membrane protein yield[J]. **Microbial Cell Factories**,2011,10(1):51-72.

[30] NASIRI M,BABAIE J,AMIRI S,et al. SHuffle™ T7 strain is capable of producing high amount of recombinant human fibroblast growth factor-1(rhFGF-1) with proper physicochemical and biological properties[J]. **Journal of Biotechnology**,2017,259:30- 38.