

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9723

計畫名稱：改善重組果糖轉移酵素在大腸菌之表達

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

執行期間：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

計畫主持人：江建民

計畫參與人員：姚怡杏、謝宜祐、謝智宇、陳韋仁

執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系

中華民國 98 年 2 月 26 日



摘要

果糖轉移酵素是生技產業上生產果寡糖的常用酵素，屬於糖苷鍵水解酶第32家族，是真菌及植物在生理上的重要酵素。在這個報告中，我們成功地在大腸菌中表達了這個酵素。如果以野生型的基因全段，在20°C時也無法表達出水溶性的果糖轉移酵素，而在N端加上麥芽糖結合蛋白或是結合伴，則可以有效表達出融合的果糖轉移酵素。而共表達大腸菌的主要協助蛋白折疊的分子伴侶，並無法提高果糖轉移酵素的水溶性表達量。利用較合適的培養基及利用乳糖誘導，更可提高水溶性表達的量。有麥芽糖結合蛋白或是結合伴融合的果糖轉移酵素皆被純化並檢測其活性，結果顯示其活性並不受融合伴的影響。這個結果，使得我們能夠更進一步研究這個酵素的結構與功能的關聯。

前言

麴菌(實驗室在研究的菌株)的果糖轉移酵素主要是參與轉移反應，它將蔗糖中果糖與葡萄糖之糖苷鍵切斷，然後轉移果糖到另一個蔗糖分子上形成蔗果三糖，或是轉移到蔗果三糖上形成蔗果四糖，或是轉移到蔗果四糖上形成蔗果五糖。它的基因全長1965個核苷酸，基於胺基酸序列的比對，它被歸類在糖苷水解酶家族32之中 [Henrissat, B. and Davies, G., 1997]。這個家族主要包括植物的果糖轉移酵素 [Ritsema and Smeeekens, 2003]，及微生物的β-果糖糖苷鍵水解酵素等 [Hidaka, et al., 1988; Su, et al., 1990; Rehm, et al., 1998; Heyer and Wendenburg, 2001]。

過去真核生物GH32家族的基因異源表達多在酵母菌，例如歐洲植物菊苣的聚果糖水解酶 [Verhaest, et al., 2005; Le Roy, et al., 2007]、阿拉伯芥的細胞壁型蔗糖水解酶 [De coninck, et al., 2005]、綠竹的蔗糖水解酶 [Hsieh, et al., 2006]、硬葉藍刺的果糖轉移酶等 [Van den Ende, et al., 2006]，但是在大腸菌中成功表達的很少，僅有麴菌屬的聚果糖水解酶 [Heyer and Wendenburg, 2001]，及實驗室所表達的麴菌果糖轉移酵素。很顯然地，在大腸菌中表達GH32家族並不容易。

利用大腸菌來表達外源蛋白，已是經常使用的方法 [Terpe, 2006]，Novagen公司開發的pET系統，就經常被使用。但是大腸菌胞內的表達，卻經常會有低溶解度或是大量的胞涵體產生，我們欲表達的麴菌果糖轉移酵素，就有這個情形。這可能的原因一般認為是異源蛋白的胺基酸序列的本質，使得其折疊速率較慢，也許在欲表達的蛋白在折疊時需要分子伴侶來協助，或者異源蛋白本身的水溶性就較低。一般會先用降低表達時的溫度(即降低表達的速率)及降低誘導劑來改善(降低同時表達出的量)；再者，共表達協助折疊的分子伴侶；或是在培養基中加入sorbitol, sucrose或raffinose等助溶分子；或是利用親水性的融合伴(fusion partner)形成融合蛋白來協助。但這些方式並非絕對能改善大量胞涵體的情況 [Baneyx, and Mujacic, 2004; Sorensen, and Mortensen, 2005]，視每一個分子的特性而定。

常使用的分子伴侶為TF、DnaJ DnaK GrpE、GroEL GroES系統 [Baneyx, and Mujacic, 2004]。我們發現Takara公司有另外一組大腸菌的分子伴侶系統，構築於



pBAD 輽體內，剛好可以與 pET 系統共同使用。

一般，在大腸菌常使用來增加水溶性的親水性融合伴有一：麥芽糖結合蛋白、麩胱苷肽轉移酶、硫氧還原蛋白、NusA 蛋白、雙硫鍵異構酶 DsbC 等 [Esposito, and Chatterjee, 2006]。另外，PotD 及 Crr 也被報導能有效將原先以胞涵體表達的蛋白以水溶性的融合蛋白方式表達 [Han et al., 2007]。這些都是可以利用的。

另外，還可能是目的蛋白基因之密碼子在大腸菌的使用頻率問題。大腸菌較少使用的密碼子如 AGG, AGA, CGG, 及 CGA (code for Arg), CUA (for Leu), AUA (for ILE), CCC (for Pro) 及 GGA (for Gly)，如果核酸序列中有這些連續在一起就可能會造成問題，一個解決的方法是將這些大腸菌少使用的序列利用基因工程換掉，另一個方法是補充 t-RNA 也可以改善，一個例子是選擇 Rosetta (DE3) 菌株 (Novagen 公司產品)。我們所欲表達的麴菌果糖轉移酵素的基因序列，雖然有出現若干這些密碼子，但是並沒有連續的情形出現 (至少間隔 6 個胺基酸以上)。

對於誘導劑的使用，有些報導指出，在培養大腸菌至較高量時(例如 OD600 到 5 以上)再加入誘導劑，比表達量(即表達量/g 菌)仍舊維持在高量。而也可在含低量葡萄糖的甘油培養基，以乳糖誘導，更可以調節到不需加入 IPTG，當葡萄糖消耗至低量時，乳糖也可誘發表，這稱作自發誘導，在生產上較簡易，不須檢測何時要加入誘導劑 [Studier, 2005]。若是利用同樣的方法，在大腸菌高量培養時，也能有約略相同的比表達量，則較高 OD 值的培養會有較高的表達產率。

我們過去已測試了改善培養基，使得在搖瓶培養時大腸菌的量能夠增加以提高產率，一般以 LB 培養基之搖瓶培養，其 OD600 大約可達 7；而我們在 LB 中加入了磷酸緩衝液維持 pH 在約 7，並加入適量鐵離子，就可以使得 OD600 值達到 12 左右，達到了搖瓶方式的高量培養。我們將應用已建立的培養基系統，來測試不同的誘導時間及以自發誘導是否可以提高產率。

在這個計畫中，我們將透過以上共表達分子伴侶、以提高水溶性的融合伴融合蛋白表達、及表達到細胞間質來改善重組麴菌果糖轉移酵素在大腸菌中的表達狀況，並且，我也將利用已建立的搖瓶高量培養基來培養以提高生產。

材料與方法

基因重組與表達

基因選殖轉殖及操作方法主要參考 The Molecular Cloning 一書 [Sambrook, and Russell, 2001] 及 Current Protocols in Molecular Biology 一書 [Ausubel et al. eds, 2005]。構築好的果糖轉移酵素表達載體有三種，分別為野生型、麥芽糖結合蛋白融合型、及結合伴融合型。經定序確認後轉殖到表達宿主 BL21(DE3) 進行培養與表達。

而含分子伴侶的共表達載體為 pTf16 (含有 Tf 因子)、pKJE7 (含有 dnaK, dnaJ, grpE)、及 pGro7 (含有 Gro-EL, Gro-ES)，都是以 pBAD 啟動子，含有氯黴素抗性基因可作為篩選。

對於高量培養之自動誘導方式，培養以搖瓶進行。培養時初始含約 0.05% 的



葡萄糖，而乳糖的量可以調在 0.001%~0.005% 之間測試 [Studier, 2005]。培養時隨時間採樣檢測表達狀況。

酵素活性檢測：

HPLC 檢測：對於寡糖的檢測參考 Su 和 Sheu 的方法 [Su and Sheu, 1993]。果寡糖樣品來自市售台糖果寡糖、自行反應生產之果寡糖。HPLC 使用 5-NH₂-MS 管柱 (Nacalai Tesque, Japan)，移動相以 乙腈/水 (80/20, v/v)，管柱溫度設於 40°C，偵檢器採用 RI 偵檢器 (Hitachi, Japan)，於 Hitachi HPLC 機器進行。

TLC 檢測：方法參考 Su 等人及 Hirayama 等人的方法 [Hirayama, et al., 1989; Su, et al., 1990]，以 Silica 60 F254 板 (Merck) 進行，展開液為丙酮/水 (87/13, v/v)，展開二次，再以 甲醇/硫酸/水 (3/6/1, v/v/v) 來呈色。或採用 Urea-phosphoric 方法或是 diphenylamine-aniline-phosphoric acid 試劑呈色特定糖類。

酵素活性的檢測：以 pH 值 6.0 的緩衝溶液 100mM，於 55°C 下進行反應，反應速率及反應終端產物以 HPLC 鑑定及定量檢測。

重組酵素的純化

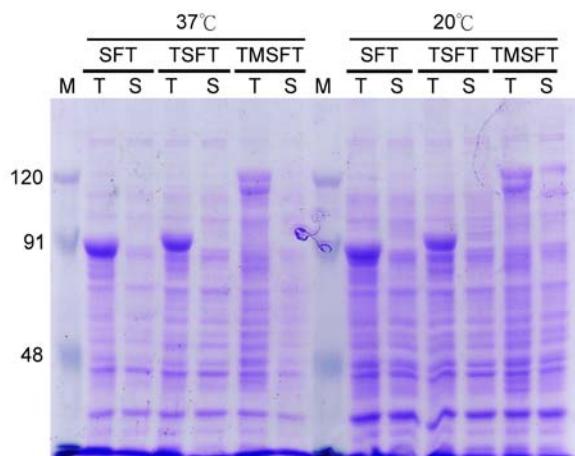
對於重組酵素，在載體構築時，已於 C 端有 6xHis 的融合伴，成功表達出有活性的重組蛋白質後，經細胞破碎，可利用 Ni-NTA 親和性層析，純化在 FPLC 快速純化系統上進行，參考 FPLC 的使用手冊。

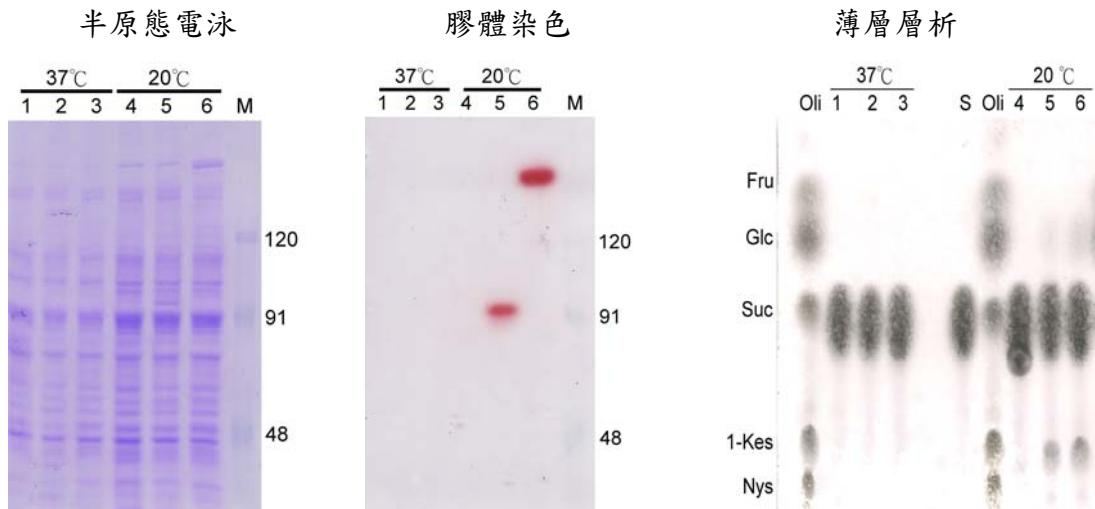
蛋白質電泳及定量：

蛋白質的電泳 SDS Polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE) 及蛋白質染色參考 Laemmli 的方法 [Laemmli, 1970]，而蛋白質的定量以 Commasiae 法，參考 Bio-Rad 公司的操作手冊。

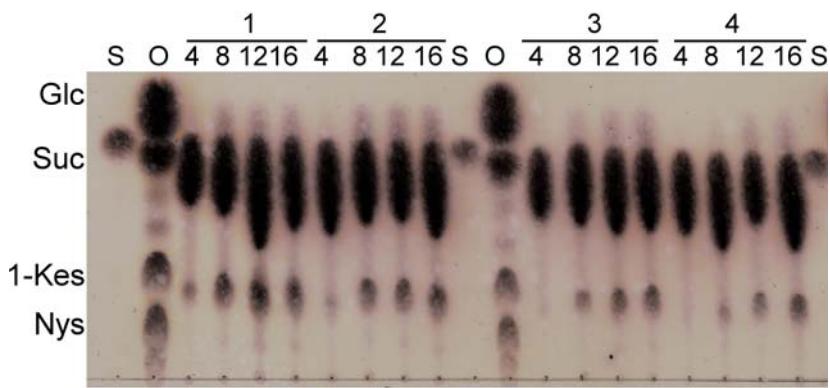
結果與討論

在本計畫中，我們構築了三個載體，分別是野生型、結合伴融合型、及麥芽糖結合蛋白融合型。在 37°C 時皆無法以水溶性表達，但在 20°C 時，就可以水溶性表達。這可由膠片上活性染色及薄層層析的活性檢測得知。





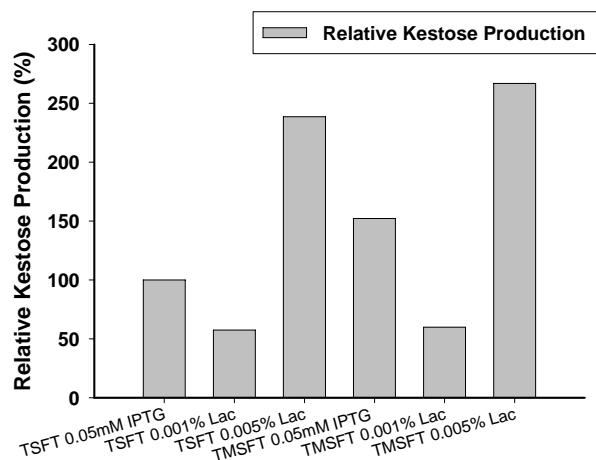
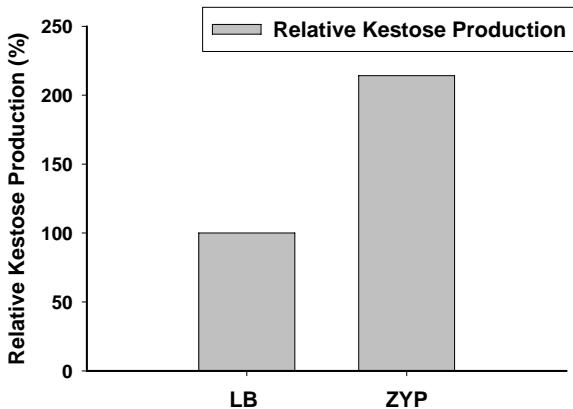
利用共表達大腸菌的各種協助折疊的分子伴侶，結果顯示並無法改善表達情形，果糖轉移酵素主要還是以胞涵體型式表達，並沒有有效以水溶性表達。這可由薄層層析活性檢測看出。



接著，我們利用改變培養基的方式，同時利用 HPLC 檢測所表達的果糖轉移酵素的反應，結果顯示，利用改變的培養基，以結合伴融合蛋白而言，活性可以提高至 2 倍。而以乳糖誘導的結果，相對於以一般的 LB 誘導，更可以提高至約 5 倍。另外，麥芽糖結合蛋白融合蛋白的表達皆較結合伴融合蛋白的表達要好一些。經由純化的結果，顯示活性的增加是因為以水溶性表達的融合蛋白的量增加，而兩種融合蛋白之間的活性，並不受融合伴件有明顯影響。

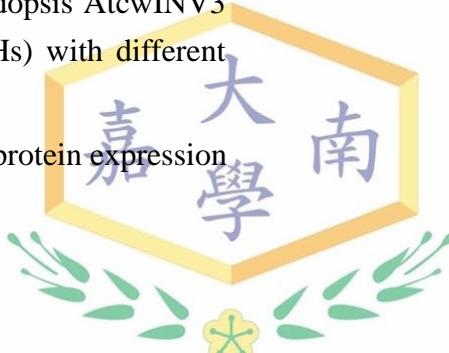
利用這個方式可以成功表達果糖轉移酵素，可以提供未來進行突變的研究。





參考資料

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2005) "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc. Westin Convention Center Pittsburg, PA, USA.
- Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004) "Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*." *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408.
- Baciu, I.-E., Jordening, H.-J., Seibel, J. and Buchholz, K. (2005) "Investigations of the transfucosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside." *J. Biotechnol.* **116**, 347-357.
- De Coninck, B., Le Roy, K., Fancis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A.M., Smith, S.M., Van Laere, A., Van den Ende, W. (2005) "Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities." *Plant Cell Environ.* **28**, 432-443.
- Esposito, D., and Chatterjee, D.K. (2006) "Enhancement of soluble protein expression



- through the use of fusion tag.” *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 353-358.
- Han, K.-Y., Seo, H.-S., Song, J.-A., Ahn, K.-Y., Park, J.-S., Lee, J. (2007) “Transport proteins PotD and Crr of *Escherichia coli*, novel fusion partners for heterologous protein expression.” *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 1536-1543.
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997) “Structure and sequence-based on amino acid sequence similarities” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
- Heyer,A.G. and Wendenburg,R. (2001) “Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544” *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (1), 363-370.
- Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. (1988) “A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611” *Agric. Biol. Chem.* **52**(5), 1181-1187.
- Hirayama, M., Sumi, N. and Hidaka, H. (1989) “Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611” *Agric. Biol. Chem.* **53**(3), 667-673.
- Hsieh, C.-W., Liu, L.-K., Yeh, S.-H., Chen, C.-F. Lin, H.-I., Sung, H.-Y. and Wang, A.-Y. (2006) “Molecular Cloning and Functional Identification of Invertase Isozymes from Green Bamboo *Bambusa oldhamii*.” *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3101-3107
- Laemmli, U.K. (1970) “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* **227**, 680-685.
- Le Roy, K., Lammens, W., Verhaest, M., De Coninck, B., Rabijns, A., Van Laere, A., and Van den Ende, W., (2007) “Unraveling the Difference between invertases and fructan exohydrolases: A single amino acid (Asp-239) substitution transforms arabidopsis cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase.” *Plant Physiol.* **145**, 616-625.
- Miot, M. and Betton, J.M. (2004) “Protein quality control in the bacterial periplasm.” *Microb. Cell Fact.* **7**, 3:4.
- Rehm, J., Willmitzer, L. and Heyer, A.G. (1998) “Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*” *J. Bacteriol.* **180** (5), 1305-1310
- Ritsema, T. and Smekens, S. (2003) “Fructans: beneficial for plants and humans” *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 223-230.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) “The Molecular Cloning” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sorensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005) “Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*.” *J. Biotechnol.* **115**,



113-128.

- Studier, F.W. (2005) "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures." *Protein Expr. Purif.* **41**, 207-234.
- Su, Y.-C. and Sheu, C.-S. (1993) "Recovery and properties of a fructooligosaccharides-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* CCRC 38011" *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC* **17(2)**, 62-69.
- Su, Y.-C., Sheu, C.-S., Chien, J.-Y. and Ma, K.-K. (1990) "Isolation and Identification of microorganisms capable of producing β -fructofuranosidase with transfructosylating activity" *Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC* **14(2)**, 114-121.
- Suzuki, Y. and Uchida, K. (1993) "Formation of b-fructosyl compounds of pyridoxine in growing culture of *Aspergillus niger*." *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 875-880.
- Terpe, K. (2006) "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211-222.
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Boogaerts D, Le Roy K, Arckens L, Van Laere A. (2006) "Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from Echinops ritro (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes." *J Exp Bot.* **57**, 775-789.
- Verhaest, M., Ende, W.V., Roy, K.L., De Ranter, C.J., Laere, A.V., Rabijns, A. (2005) "X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of Cichorium intybus" *Plant J.* (2005) **41**, 400-411.

