

雅致放射毛霉羧肽酶 Y 的基因克隆、表达与酶学性质研究

纪海兵, 刘中美, 郭军玲, 周哲敏

(江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 本研究从雅致放射毛霉中克隆、表达和纯化羧肽酶 Y(CPY), 体外激活后检测其酶学性质。本文筛选并鉴定了一株腐乳发酵菌株, 命名为雅致放射毛霉 PEP001 (*Actinomucor elegans* PEP001)。以相近种族来源的真菌羧肽酶 Y 保守序列设计简并引物调取部分目的基因序列, 利用末端扩增技术(RACE)分别获得 3'与 5'端基因全长, 克隆获得羧肽酶 Y 基因, 全长为 1557 bp, 编码 518 aa。将其酶原(proCPY)在大肠杆菌 Rosetta 中重组表达, 产物为包涵体; 在毕赤酵母 GS115 中成功分泌表达 proCPY, 产量为 151.20±10.20 mg/L。通过体外激活与纯化, 获得电泳纯的成熟羧肽酶 Y。成熟羧肽酶 Y 最适 pH 为 6.0, 最适温度为 45 °C, 在 40 °C 下有较高稳定性, 在 60 °C 下很快失活, 在 pH 4.0~7.0 下都有较高的稳定性。本文中雅致放射毛霉 PEP001 羧肽酶 Y 为首次报道, 为进一步研究其应用打下一定基础。

关键词: 雅致放射毛霉; 羧肽酶 Y; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2017)1-81-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.013

Cloning, Expression, and Characterization of Carboxypeptidase Y from *Actinomucor elegans* PEP001

Ji Hai-bing, Liu Zhong-mei, Guo Jun-ling, Zhou Zhe-min

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: (CPY) was isolated and purified from *Actinomucor elegans* PEP001 after *in vitro* activation, and was then cloned and characterized. A strain of fermenting fungi, screened and identified from fermented bean curd, was named *Actinomucor elegans* PEP001. A partial length of the CPY gene was cloned using degenerate primers, which were designed based on conserved sequence of homologous fungal CPY, and the end sequence of 5' and 3' were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full length of the cloned CPY gene was 1557 bp, encoding 518 amino acids. The recombinant proCPY was expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) as inclusion bodies, and the proCPY was successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115 as well, with a yield of 151.20±10.20 mg/L. Pure mature CPY was obtained using SDS-PAGE after *in vitro* activation. The optimal reaction pH and temperature of mature CPY was found to be 6.0 and 45 °C, respectively. Mature CPY had high stability at 40 °C, but was inactivated at 60 °C. It was found to be stable at pH 4.0~7.0. Carboxypeptidase Y from *A. elegans* PEP001 was for the first time successfully cloned, expressed, and characterized. The results of this study lay the foundation for future research.

Key words: *Actinomucor elegans*; carboxypeptidase Y; enzymatic properties

羧肽酶(carboxypeptidase)是一类可水解肽链 C 末端氨基酸残基的蛋白酶, 广泛的存在于细菌, 真菌, 植物与动物中, 主要分为丝氨酸羧肽酶、金属羧肽酶和半胱氨酸羧肽酶。羧肽酶 Y(CPY, EC 3.4.16.5)是丝氨酸类蛋白酶, 其活性中心由丝氨酸、天门冬氨酸和

收稿日期: 2016-01-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31400078); 江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究项目(BY2014023-21)

作者简介: 纪海兵(1991-), 男, 硕士研究生, 发酵工程

通讯作者: 周哲敏(1969-), 男, 教授, 研究方向: 生物酶学、发酵工程

组氨酸(Ser-Asp-His)组成。CPY 具有很宽的底物谱, 可以水解任何的羧基末端氨基酸, 特别是对大部分其他羧肽酶来说难以水解的脯氨酸等残基, 因此它可以应用于多肽的测序和质谱分析^[1]。目前已被报道的 CPY 主要来源于酿酒酵母、毕赤酵母与裂殖酵母等, 其中酿酒酵母来源的 CPY 被研究的最为清楚^[2]。有研究表明酿酒酵母来源的 CPY 在大肠杆菌中以 proCPY 形式表达形成包涵体, 经复性及体外激活后有天然酶 25% 的活性^[3]; 在毕赤酵母 GS115 中以 proCPY 形式分泌表达, 表达量为 605 mg/L, 体外激活后纯酶酶活

为 305 U/mg^[4]。

雅致放射毛霉 (*Actinomucor elegans*) 是腐乳发酵生产的主要菌种之一, 拥有非常丰富的胞外蛋白酶系, 在发酵过程中主要作用为分泌蛋白酶水解豆腐胚内的大豆蛋白。腐乳发酵生产过程中常常会产生白色晶体 (白点) 而影响其外观质量, 从而降低消费者的购买欲望。研究表明白色晶体的形成主要是因为游离 L-Tyr 浓度过高而产生的结晶, 这是因为外肽酶过度水解大豆多肽末端, 产生大量游离 Tyr 造成的^[5], 而 CPY 具有水解多肽末端氨基酸的特性, 因此推测雅致放射毛霉发酵液中含有高活力的羧肽酶 Y。大豆蛋白的苦味主要和其多肽 C 末端的 Phe 和 Tyr 残基数量有关^[6], 雅致放射毛霉中羧肽酶可以对大豆蛋白水解物进行脱苦^[7], 可能是因为雅致放射毛霉的 CPY 水解多肽 C 末端 Tyr 残基。

羧肽酶 Y 因其可以切割多肽 C 末端任意氨基酸的

水解特性而被广泛应用, 而不同来源的羧肽酶 Y 的酶学性质并不相同。本实验室从雅致放射毛霉菌 PEP001 (*A. elegans* PEP001) 中成功克隆出 CPY 基因全长, 并将其编码基因在 Rosetta 和 GS115 中进行重组表达。酶原经过体外激活和纯化, 测定了成熟 CPY 的基本酶学性质, 为对其进行更深入的研究提供前提条件。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

1.1.1 菌株与质粒

Actinomucor elegans PEP001 由本实验室分离、鉴定与保存; *Escherichia coli* Rosetta(DE3)、*Escherichia coli* JM109 和质粒载体 pET-22b(+) 购自 Novagen 公司; 表达宿主 *Pichia pastoris* GS115 与质粒 pPIC9K 均购自美国 Invitrogen 公司。

表 1 PCR 引物及其序列

Table 1 PCR primers and sequences

| 引物 | 碱基序列(5'→3') | 作用 |
|------------|--|---------------------|
| CPY part-F | CTGTGGCTGAACGGTGGNCCNGGNTG | 克隆 CPY 部分序列 |
| CPY part-R | CAGGGGATCGGTCARNCCRTTNC | |
| GSP1 | GATTACGCCAAGCTTATGACTCCACCAATGGCAGGAATG | 5'-RACE 特异性引物 |
| GSP2 | GATTACGCCAAGCTTGTAAATCTCATGGTACCGGTGGTGC | 3'-RACE 特异性引物 |
| CPY-F | GGAATTCCATATGCCACTTTATTTTCACTTGCCA (下划线下为 <i>Bam</i> H I 位点) | 克隆 CPY 基因全长 |
| CPY-R | CGGGATCCCTTAGTTGAGTTCACCACGAACCCAT (下划线下为 <i>Nde</i> I 位点) | |
| pEproCPY-F | GGAATTCCATATGGAACCAGCCATGTTTCAGCAGCA (下划线下为 <i>Bam</i> H I 位点) | 克隆在大肠中表达的 proCPY 基因 |
| pEproCPY-R | CGGGATCCGAGTTGAGTTCACCACGAACCCATT (下划线下为 <i>Nde</i> I 位点) | |
| pPproCPY-F | GGAATTCGAACCAGCCATGTTTCAGCAGCA (下划线下为 <i>Eco</i> R I 位点) | 克隆在酵母中表达的 proCPY 基因 |
| pPproCPY-R | TAAACTATGCGGCCGCCTAATGATGATGATGATGATGGTTGAG (单下划线下为 <i>Not</i> I 位点, 双下划线下为 6 个 HIS 标签) | |

1.1.2 试剂与仪器

N-苄氧羰酰基-L-苯丙胺酰-L-酪氨酸 (N-CBZ-Phe-Tyr) 购自上海 Peptides International 公司; 牛胰蛋白酶与大豆来源胰蛋白酶抑制剂购自美国 Sigma 公司; *Bam*H I、*Nde*I、*Eco*R I、*Not*I、*Sac*I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 RNA 提取试剂盒等均购自日本宝生物工程有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 胶回收试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; SMARTer™ RACE

cDNA Amplification Kit 试剂盒购自美国 Clontech 公司; 超滤管购自美国 Millipore 公司; AKTA 蛋白纯化系统、His Trap FF crude, 1 mL 镍柱为通用电气医疗器械集团产品; 其他试剂均为分析纯及常见生化试剂。

1.1.3 培养基

根据 Invitrogen 公司 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 说明书准备 LB 培养基、YPD 培养基、MD 培养基、BMGY 培养基与 BMMY 培养基; 2×YT 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 胰蛋白胨 10, 氯化钠 5, 1.0×10⁵ Pa

灭菌 20 min。

1.1.4 引物

所用引物都由上海生工生物工程有限公司合成, 具体信息见上表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 简并引物设计

根据 *Lichtheimia corymbifera* CPY (GenBank 登录号: CDH51290.1), *Candida tropicalis* CPY (GenBank 登录号: XP_002550839.1), *Mucor ambiguous* CPY (GenBank 登录号: GAN06907.1), *Rhizopus microspores* CPY (GenBank 登录号: CEG70790.1) 氨基酸序列对比的保守区 (N 端氨基酸保守序列为 LWLNGGPGC, C 端氨基酸保守序列为 GESYAGHYI), 利用 CODEHOP 设计简并引物^[8]。

1.2.2 RNA 与 cDNA 制备

按 1% 接种量将孢子液 (1.0×10^7 个/mL) 接入到 100 mL YPD 液体培养基中, 在 28 °C, 200 r/min 下培养 3 d 收集菌丝体提取完整 RNA, 用 Takara 植物 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书制备 cDNA。

1.2.3 羧肽酶 Y 部分基因序列克隆与末端序列快速扩增

以 cDNA 为模板, CPY part-F 和 CPY part-R 为引物扩增 CPY 基因部分序列。用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并纯化回收用于测序。由部分基因序列设计引物 GSP1 与 GSP2, 利用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 对 CPY 末端序列进行获得, 并测序, 获得基因全长信息。

1.2.4 羧肽酶 Y 基因全长克隆

以 cDNA 为模板, CPY-F 与 CPY-R 为引物克隆 CPY 基因全长。扩增完成后以琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。PCR 扩增得到的 CPY 基因产物用 *Bam*H I 和 *Nde* I 限制性内切酶双酶切后连接到用同样限制性内切酶酶切的质粒载体 pET-22b(+) 上, 构建的质粒 pET-22b(+)-*cpy* 转化到 *Escherichia coli* JM109 中, 在含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基平板上挑选阳性重组子, 测序验证。

1.2.5 序列分析

采用 ExPasy 中 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>) 预测羧肽酶 Y 的蛋白质分子量以及等电点。采用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质信号肽以及剪切位点, 为目的蛋白高效表达提供一定基础条件。

1.2.6 表达载体构建

以 pET-22b(+)-*cpy* 为模板, pEproCPY-F 和 pEproCPY-R 为引物扩增编码 proCPY 的基因。PCR 扩增得到的基因产物连接到质粒载体 pET-22b(+) 上, 构建的质粒 pET-22b(+)-*procpy* 转化到 *Escherichia coli* JM109 中, 在含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基平板上挑选阳性重组子, 测序验证; 以 pET-22b(+)-*cpy* 为模板, pPproCPY-F、pPproCPY-R 为引物扩增编码 proCPY 的基因。PCR 扩增得到的基因连接到质粒载体 pPIC9K 上, 构建的质粒 pPIC9K-*procpy* 转化到 *Escherichia coli* JM109 中, 在含有氨苄青霉素抗性的 LB 固体培养基平板上挑选阳性重组子, 测序验证。

1.2.7 酵母转化与高拷贝筛选

将质粒 pPIC9K-*procpy* 用 *Sac* I 线性化, 采用文中电转化法^[9]。转化子在 MD 平板上筛选, 挑选阳性重组子并用 MD 与 MM 平板鉴定转化子是否为 Mut⁺ 基因型。通过含 G418 浓度分别为 0.25、0.5、0.75、2.0、3.0 和 4.0 mg/mL 的 YPD 平板筛选高拷贝转化子。

1.2.8 重组 proCPY 诱导表达

将重组质粒 pET-22b(+)-*procpy* 转化到 *Escherichia coli* Rosetta(DE3) 中, 挑选单菌落至 5 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h 后, 取 1 mL 培养物至 100 mL 含 50 mg/L 氨苄青霉素的 2×YT 培养基中, 在 37 °C、200 r/min 培养至菌体的 OD₆₀₀ 为 0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 20 °C 诱导 12 h 后离心收集菌体; 挑选的毕赤酵母转化子单菌落至 100 mL BMGY 中, 30 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约 20 左右, 6000 r/min 离心 5 min 收集菌体转入 100 mL BMMY 中。30 °C、200 r/min 下每隔 24 h 加入 1% 的甲醇进行诱导, 诱导 144 h, 离心收集发酵上清。

1.2.9 重组 proCPY 激活与纯化

将收集的发酵上清, 用 30 ku 孔径的超滤管将发酵上清蛋白浓缩溶于 100 mM Tris/HCl (pH 7.5) 中。用适量 trypsin 在 37 °C 下处理 1 h 后, 加入胰蛋白酶抑制剂, 可以获得较高活性的重组蛋白 CPY。激活后的蛋白溶液, 用 30 ku 孔径的超滤管将缓冲液更换为结合缓冲液 (20 mM 磷酸钠, 500 mM 氯化钠, 20 mM 咪唑, pH 7.4), 浓缩并除去部分杂蛋白。用 His Trap FF crude, 1 mL 镍柱对粗酶液进行纯化, 用含 150 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 进行 SDS-PAGE 鉴定。纯化的酶经超滤脱盐后用于酶学性质研究。

1.2.10 酶活性的测定

取 5 μL 激活纯化的 CPY 加入到 1 mL、2 mmol/L N-CBZ-Phe-Tyr 中, 在 37 °C 与 pH 6.0 下反应 10 min, 反应所得产物 L-Tyr 用 HPLC 进行检测。色谱柱为

DIKMAC18 (5 μm, 4.6×250 mm); 流动相 A 为含 55 mmol/L 醋酸钠的水, 流动相 B 为含 55 mmol/L 醋酸钠体积比 1:2:2 的水、甲醇与乙腈的混合物, pH 都为 7.2, 线性洗脱梯度 B 的体积百分比为 40%~70%, 洗脱 15 min。紫外检测波长 338 nm, 柱温 40 °C。所测得的产物峰面积换算为标准产物浓度, 从而计算酶活。酶活定义: 在 25 °C、pH 6.0 磷酸钠缓冲液下, 每分钟转化 N-CBZ-Phe-Tyr 生成 1 μmol/L-Tyr 所需的酶量为 1 U。

1.2.11 野生菌中羧肽酶 Y 酶活检测

按 1%接种量将孢子液 (1.0×10⁷ 个/mL) 接入到 100 mL YPD 液体培养基中, 在 28 °C、200 r/min 下培养 3 d, 收集发酵液浓缩后, 检测酶活, 检测方法与酶活定义同 1.2.10。

1.2.12 蛋白浓度的测定

采用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2.13 酶学性质研究

在 20~60 °C 下, 将 CPY 加到含 2 mmol/L N-CBZ-Phe-Tyr 的 pH 6.0、50 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液中反应 10 min, 检测 CPY 在不同温度下的酶活, 设定最高酶活为 100%, 以相对酶活为纵坐标, 做出温度与相对酶活曲线, 确定 CPY 最适反应温度; 将在 40、50 和 60 °C 下温浴 0、20、40、60 和 120 min 的 CPY, 分别加入含 2 mmol/L N-CBZ-Phe-Tyr 的 pH 6.0、50 mmol/L 磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液中反应 10 min, 检测酶活。设定最高酶活为 100%, 以相对酶活为纵坐标, 做出时间与相对酶活曲线, 确定 CPY 温度稳定性; 检测 CPY 在 pH 4.0~8.0 下的酶活。设定最高酶活为 100%, 以相对酶活为纵坐标, 做出 pH 与相对酶活曲线, 确定 CPY 最适反应 pH; CPY 在 pH 4.0~8.0 缓冲液中, 4 °C 下放置 12 h 后测残留的酶活。分别以各 pH 值下放置 0 h 的酶活为最高酶活 100%, 以相对酶活为纵坐标, 做出 pH 与相对酶活曲线。所需不同 pH 缓冲液如下: 50 mmol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.0~6.0); 50 mmol/L 的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液(pH 6.0~7.0); 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0~8.0)。

1.2.14 数据统计分析

实验数据均来自 3 次以上独立实验, 结果以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。数据分析使用 SPSS.17.0 软件, 采用 Origin 8.0 作图, p<0.05 表示显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 A. elegans PEP001 菌株鉴定与酶活性检测

本实验室从腐乳中筛选出一株生产菌株, 由上海生工生物工程公司进行 ITS 菌种鉴定。鉴定结果表明该菌株为 *Actinomucor elegans*, 命名为 *Actinomucor elegans* PEP001, ITS 区部分序列见图 1。将菌株 *A. elegans* PEP001 发酵上清与底物 N-CBZ-Phe-Tyr 进行催化反应, 通过 HPLC 检测到目标产物 L-Tyr, 推测 *A. elegans* PEP001 胞外酶系中有羧肽酶 Y。

```

1 CCGTAGGTGAACCTCGGGAAGGATCATTAAATAAACTTGAGGGGAACTGGGCTTACGGI
61 GCTTGGTTTTCTCTTATTTTTACCGTGAACGTCTTATAGCATGGCGCTAGTAGAGAT
121 GCCTGAGCCGCCATACGGGGTAGCGGCACAGGATGATTTAATCGAAGCCATGGTCAAG
181 CCGACTTTTTTTCAGCTTGGTACCCCAAAATTAATTCTACCAATGAATTCAGTAT
241 TAATATTGTAACATGGGCTCGCTGAAAGGTGGCCTATAAAACAACCTTTAAACAACGGATC
301 TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAAGTGCATAACTAGTGTGAATTGCATA
361 TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCATCTTGCACCTGCTGGTATCCAGCAGGTACG
421 CCTGTTTCAGTATCAGAAACAACCTCTCCCTTAAGATTTTTTTTAAAGGGGACATTGAG
481 GGTATCTGGCTTAGAAGTAAATCTCTAGCCCGAGACGCTTTAATGACTAAAGGCCTG
541 CAAGCCAAAGTTGATTGCGCTGAACTTTTTCTTAATTTCAAGCGAAAGCTCTTGGCGAA
601 CTAGAACCTTATATTGCTTGGGGGCTCCCAAGAAACAATCAACAACCTTGATCTGTA
661 AATCAGGTGGGATTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGA
    
```

图 1 ITS 区部分序列

Fig.1 Sequence of ITS

2.2 A. elegans PEP001 中羧肽酶 Y 基因获取和

氨基酸序列分析

| | |
|---|-----|
| ScCPY MKAFTSLLCGLSTLLAKAISLRPLGLDKDQVLLQAAEKFGLDLDLHLLKELDSNVLD | 60 |
| AeCPY ---MPTLFS---LAKVAVVASCVFGLGYAEPAMFQQG-----AIADFGK | 40 |
| CS L A S LG Q | |
| ScCPY AWAQIEHLPVQVMSLETSTKPKFPEAIKTKKDWDFVVKNDAIENYQVRNKKDKPKILG | 120 |
| AeCPY AWDNVQHVVHDAADKVVHSATD-KFKQILSHGADLTITTFHAPSQVALRY--KRPTLC- | 95 |
| CS AW H VHSATD KFK D A Y LR K P | |
| ScCPY IDPNVTQYTGVLDEVEDKHHFFWTFESRNDPAKDPVILWLNWGGPSSLTGLFFELGSPS | 180 |
| AeCPY -DPVVKQISGYLDVQ-KDKHFFWTFESRDKPKEDPVVWLNWGGPSSLTGLFMELGPC | 153 |
| CS DP V Q GYLDV DKHFFW FESR P DPV LWLNWGGPSSLTGLF ELGP | |
| ScCPY SIG-PDLKPIGNPYSWNSNATVFLDQPVNVGFSYSGSSVNSNTVAAGKDVYNLEFFFK | 239 |
| AeCPY TVNKEGKNTINKYSWNDKANIIFLDQPLNVGYSH-GSSGASNTDAAAQDVYAFQLQFFK | 212 |
| CS IN YSWN A IFLDQP NVG S GS NNT AA DVY FL LFF | |
| ScCPY QFPEYVNGKQDFHIAGESYAGHYIPVFAEILSHKDRVFN-----LTSVL | 284 |
| AeCPY EFPQVAD--LDFHISGESYAGHYIPAGVGNVNNKGLKQSMELLKKKHTLSKIKLSLL | 270 |
| CS FP Y DFHI GESYAGHYIP I F | |
| ScCPY IGNGLDPLTQYNYEPMACGEGGEPVLPSEECSAMEDSLERCLGLIESQYDSQVSWSC | 344 |
| AeCPY IGNGLDPLVQYKYAEMACNNSYGVLDKATCDVMEAGFPACARLIKNCYESKNVFSFC | 329 |
| CS IGNGLDPL QY YY MAC PVL C ME C LI CY S V SC | |
| ScCPY VPATTYCNAQLAPYQRTGRNVYDIRKCEGGNLCYPTLQDIDDYLNQDYVKEAVGAEVD | 404 |
| AeCPY LPAAMCKNKDQIQPYQQTGMNPDVREKCKGGNLCYDILESQYKYLNIPAVKKEVGAETD | 389 |
| CA PA CN Q PYQ TG N YD R C GGNLCY L YLN VV V GAE D | |
| ScCPY HVESCNFIDNRNFI FAGDWMKPYHTAVTDI LNQDI PII VYAGDKDFICNWI GNKAWTDVI | 464 |
| AeCPY KYESCNMQINFRFQAGDWMRPVVEVPKLLLEDIKILYAGDADFCINWIGNKAWTIEL | 449 |
| CS YESCN IN F AGDWM PY V LL D IL YAGD DFCINW CNKAWT L | |
| ScCPY PWKYDEEFASQKVRNWTASTTDEVAAGEVSKYK--HFTYLRVFNWGHMVPDPENALSMV | 522 |
| AeCPY PWSGHEEFSSANDTEWHSSELLGKQAGELRKTEDFAFLRVFGAGHMVPPYDQESGLDML | 509 |
| CS PW EEF S W AGE F LRVF GHMVP D PE L M | |
| ScCPY NEWIHGGFSL | 532 |
| AeCPY QQWVRCENL- | 518 |
| CS W G | |

图 2 酿酒酵母 CPY 与雅致放射毛霉 CPY 氨基酸序列比对

Fig.2 Sequence alignment of ScCPY and AeCPY

注: ScCPY, 酿酒酵母羧肽酶 Y; AeCPY, 雅致放射毛霉羧肽酶 Y; CS, 保守序列; *, 重要保守位点。

A. elegans PEP001 来源的羧肽酶 Y (AeCPY) 的基因全长 1557 bp, 编码 518 aa。利用 NCBI 中 BLASTp 对氨基酸序列分析, 其与 PRC1 (GenBank 登陆号为 NM_001182806.1) 编码的酿酒酵母来源的 CPY (ScCPY) 的同源性为 50%, 氨基酸序列比对结果如图 2 所示。ScCPY 由 20 aa 的信号肽与 512 aa 的酶原

(proCPY) 构成, 其中 proCPY 包含 91 aa 的前导肽和 421 aa 的成熟酶^[2]。在酿酒酵母中, 前导肽有助于 proCPY 转运进液泡, 并且在 proCPY 变为生熟 CPY 时可以起到分子内伴侣作用, 帮助其正确的折叠形成有活性的酶^[10-12]。

酿酒酵母 proCPY 在液泡中被蛋白酶 A 与蛋白酶 B 激活生成生熟酶^[10], 在体外可以被蛋白酶 K 与胰蛋白酶激活^[3]。如图 2 所示, 符号 (▼) 标记的位置 (111 与 112 位之间) 即为前导肽与成熟酶切割位点。在 ScCPY 的前导肽切割位点前, AeCPY 有与其非常重要的氨基酸保守位点 (图 2* 表示位点), 因此推测 AeCPY 的前导肽切割位点与 ScCPY 类似。SignalP 预测结构表明 AeCPY 蛋白 N 端含有 23 个氨基酸的 N 端信号肽序列, 最优剪切位点位于第 23 和第 24 位氨基酸之间。根据信号肽预测结果, 设计引物扩增编码 proCPY 的基因。Expasy 中的 ProtParam 预测 proCPY 的理论分子量与等电点分别为 58.8 ku 与 5.5。

2.3 重组羧肽酶 Y 酶原在 *E. coli* Rosetta(DE3) 中表达

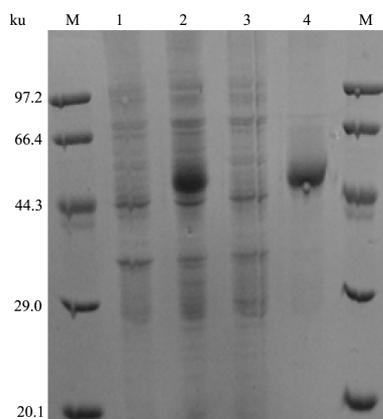


图 3 重组 proCPY 在大肠杆菌中表达产物 SDS-PAGE 分析图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of expression of recombinant proCPY in *E. coli* Rosetta

注: M, 标准蛋白; 1, *E.coli* Rosetta; 2, 重组菌全细胞; 3, 重组菌破碎上清; 4, 重组菌破碎沉淀。

Escherichia coli Rosetta(DE3)/pET-22b(+)-procpy 重组菌株经诱导表达的 SDS-PAGE 结果 (图 3) 显示 proCPY 表达量较高, 但几乎全部都是包涵体。这与之前报导的利用大肠杆菌表达酿酒酵母 proCPY 的结果相类似^[3]。大肠杆菌表达系统中缺乏对真核细胞的基因的转录后修饰, 可能是导致包涵体形成的主要原因。

2.4 重组羧肽酶 Y 酶原在 *P. pastoris* GS115 中表达、激活与纯化

Pichia pastoris GS115/pPIC9K-procpy 重组菌株分泌表达 proCPY, 用 trypsin 激活。图 4 SDS-PAGE 显示 *P. pastoris* GS115/pPIC9K-procpy 重组菌株成功的分泌表达了 proCPY, 分子量约为 60 ku, 激活后的成熟酶分子量约为 50 ku 与预测结果基本吻合。体外激活实验结果显示雅致放射毛霉 proCPY 可以被 trypsin 激活, 这与酿酒酵母羧肽酶 Y 相似, 推测两者在野生菌中的成熟机制可能相似。在 37 °C 和 pH 6.0 条件下, 以 N-CBZ-Phe-Tyr 为底物, 测得纯化后的 CPY 酶活为 157.20±1.80 U/mg ($p<0.01$)。

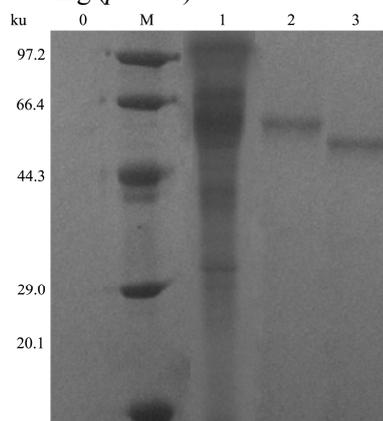


图 4 重组酵母菌的分泌表达与纯化结果

Fig.4 SDS-PAGE patterns expression and purification of the protein in *P. pastoris* GS115

注: M, 标准蛋白; 0, 携带 pPIC9K 的 *P.pastoris* GS115 发酵上清; 1, 重组菌发酵上清; 2, proCPY; 3, CPY。

雅致放射毛霉 proCPY 在 *P. Pastoris* GS115 中的表达量为 151.20±10.20 mg/L ($p>0.05$), 酿酒酵母 proCPY 在 *P. Pastoris* GS115 中表达量可达到 605 mg/L^[4], 与其相比而言表达量较低。蛋白酶缺失菌株有利于表达外源重组蛋白酶^[13], 同时信号肽序列也会对重组 proCPY 的胞外分泌有一定的影响^[14], 通过上述两个方面的研究可能会进一步提高雅致放射毛霉 proCPY 的胞外分泌量。

2.5 重组羧肽酶 Y 的酶学性质研究

2.5.1 羧肽酶 Y 最适反应温度

最适反应温度实验结果 (图 5) 显示羧肽酶 Y 在 40~50 °C 都有较高的活性 ($p<0.01$), 其中最适反应温度为 45 °C ($p<0.05$)。

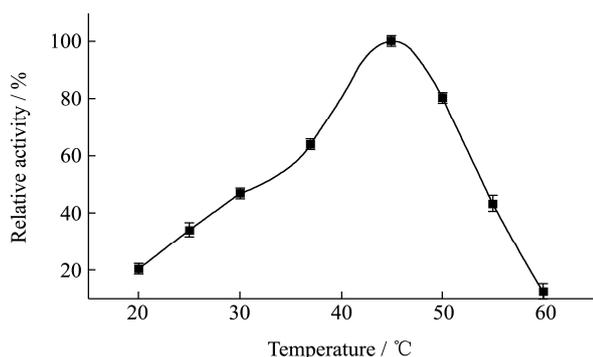


图5 温度对羧肽酶Y酶活的影响

Fig.5 Effect of temperature on the enzymatic activity of CPY

2.5.2 羧肽酶Y的温度稳定性

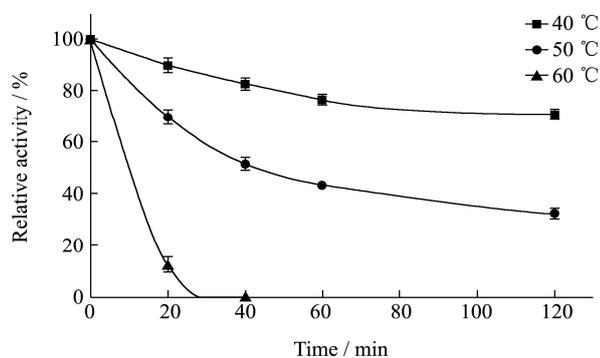


图6 羧肽酶Y热稳定性

Fig.6 Effect of temperature on the thermal stability of CPY

实验结果(图6)表明羧肽酶Y在40 °C下保温120 min仍有较高的约70%的酶活性($p < 0.01$);当温度大于50 °C时,稳定性明显降低($p < 0.05$);温度为60 °C时,迅速失活($p < 0.05$)。

2.5.3 羧肽酶Y最适反应pH值

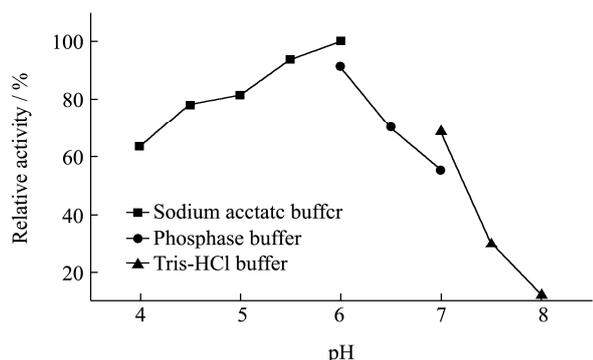


图7 pH对羧肽酶Y酶活的影响

Fig.7 Effect of pH on the enzymatic activity of CPY

从图7可知,羧肽酶Y在pH 4.0~pH 7.5都有较高的活性($p < 0.05$),其中最适反应pH值为6.0($p < 0.01$)。

2.5.4 羧肽酶Y的pH值稳定性

如图8所示,羧肽酶Y在pH 4.0~7.0下相对酶活高于80%,有较高的稳定性($p < 0.05$),其在pH 5.5左右时最稳定,酶活几乎没有变化($p < 0.01$)。而在pH 8.0

条件下,酶活下降至60%左右($p < 0.01$)。

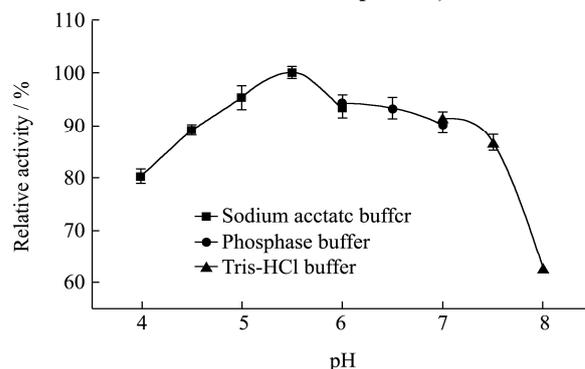


图8 pH值对羧肽酶Y稳定性的影响

Fig.8 Effect of pH on the stability of CPY

3 结论

本文通过简并引物扩增羧肽酶Y部分序列与末端快速扩增技术,成功调取了*A. elegans* PEP001中羧肽酶Y的基因,基因全长1557 bp,编码518 aa。氨基酸序列分析后,构建了重组质粒pET-22b(+)-proCPY在*Escherichia coli* Rosetta(DE3)中以包涵体形式表达proCPY与pPIC9K-proCPY在*Pichia pastoris* GS115中成功分泌表达proCPY,重组proCPY在毕赤酵母中表达量为 151.20 ± 10.20 mg/L ($p > 0.05$)。proCPY经过体外激活和纯化后,在37 °C和pH 6.0条件下,以N-CBZ-Phe-Tyr为底物,酶活为 157.20 ± 1.80 U/mg ($p < 0.01$)。

参考文献

- [1] Cool D R, Hardiman A. C-terminal sequencing of peptide hormones using carboxypeptidase Y and SELDI-TOF mass spectrometry [J]. Biotechniques, 2004, 36(1): 32-34
- [2] Wolf D H, Weiser U. Studies on a carboxypeptidase Y mutant of yeast and evidence for a second carboxypeptidase activity [J]. European Journal of Biochemistry, 1977, 73(2): 553-556
- [3] Moon S H, Jung H B, Eui S C, et al. In vitro activation of yeast pro-carboxypeptidase Y expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(21): 881-885
- [4] Yu X H, Zhai C, Zhong X, et al. High-level expression and characterization of carboxypeptidase Y from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* GS115 [J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(1):161-167
- [5] Hamberg A, Kempka M, Sjodahl J, et al. C-terminal ladder sequencing of peptides using an alternative nucleophile in carboxypeptidase Y digests [J]. Analytical Biochemistry, 2006, 357(2): 167-172

(下转第80页)