

抗辐射不动杆菌碱性脂肪酶基因在毕赤酵母中的表达

韩双艳, 赵小兰, 林小琼, 郑穗平, 林影

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 本研究将来自抗辐射不动杆菌 CMC-1 的碱性脂肪酶基因去掉信号肽, 经密码子优化及全基因合成后克隆到 pPICZαA 载体, 构建了重组质粒 pPICZαA-ARL, 质粒线性化后转化毕赤酵母 X33, 筛选得到分泌表达碱性脂肪酶的重组毕赤酵母 X33/pPICZαA-ARL。摇瓶发酵液上清酶活最高达 65 U/mL, 初步研究了该脂肪酶的酶学性质, 其最适作用温度为 50 °C, 最适 pH 为 9.0, 最适底物是对硝基苯酚辛酸酯。

关键词: 抗辐射不动杆菌 CMC-1; 碱性脂肪酶; 密码子优化; 毕赤酵母; 分泌表达

文章编号: 1673-9078(2013)7-1477-1481

High-level Expression of an Alkaline Lipase Gene from *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 in *Pichia pastoris*

HAN Shuang-yan, ZHAO Xiao-lan, LIN Xiao-qiong, ZHENG Sui-ping, LIN Ying

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Lipase is one of the most important industrial enzymes applied widely in food, textile, papermaking and pharmaceutical industries. The alkaline lipase gene from *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 was synthesized with its own signal peptide removed followed by codon optimization, and then cloned into the secreted expression vector pPICZαA. The constructed plasmid was named as pPICZαA-ARL. The recombinant plasmid was used to transform into the *Pichia pastoris* X33. One of the best transformants harboring ARL integrated into the *P. pastoris* genomic DNA was cultured in shake flask. The maximum activity of the culture supernatant was 65 U/mL. The properties of the recombinant lipase was partial characterized. The results showed that the recombinant lipase had an optimal activity at 50 °C and pH 9.0 and the optimum substrate of recombinant ARL was 4-nitrophenyl caprylate, which seemed a little difference from the wild one.

Key words: *Acinetobacter radioresistens* CMC-1; alkaline lipase; codon optimization; *Pichia pastoris*; secreted expression

脂肪酶 (Lipase EC 3.1.1.3) 是重要的工业酶制剂品种之一。碱性脂肪酶是在碱性条件下在水和不溶底物界面将脂肪催化水解为甘油、脂肪酸, 同时也能催化酯合成和酯交换反应, 具有反应高效、条件温和、无毒副作用等优点, 广泛应用于纺织、造纸、制药、环保业、食品工业、皮革、洗涤剂等多个领域^[1]。

抗辐射不动杆菌 CMC-1 (*Acinetobacter radioresistens* CMC-1) 生长在偏碱性条件, 因此所产的脂肪酶在碱性条件具有较好的活性, 对中长链脂肪酸酯有较好的选择性, 并且对甘油三酯具有 1,3-位特异性, 工业应用性很强^[2]。野生菌在没有油或者酸性条件下生长缓慢且脂肪酶产量极低^[3], 摇瓶发酵上清

最大仅 3~4 U/mL^[2]。优化后发酵主要以正十六烷或橄榄油为碳源, 产酶效率仍偏低, 采用控制 pH 在发酵罐中分批培养上清最大酶活也只有 120 U/mL^[4], 严重限制了 ARL 的应用, 采用基因工程手段提高 ARL 产量是目前亟需解决的问题。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 已被广泛用来高效表达多种蛋白, 利用 AOX 强效启动子, 可以以甲醇为唯一碳源大量表达外源蛋白, 实现高密度发酵, 且酵母培养、转化、高密度发酵等操作接近原核生物, 远较真核系统简单, 非常适合大规模工业化生产^[5-6]。

本实验通过构建抗辐射不动杆菌脂肪酶基因表达载体, 并将其转化到适合工业化生产的巴斯德毕赤酵母 X33 中进行分泌表达, 实现了抗辐射不动杆菌脂肪酶在毕赤酵母中的分泌表达, 并初步研究了重组脂肪酶的酶学性质, 为抗辐射不动杆菌脂肪酶的工业化生产进行了有益探索, 为其在食品、洗涤、造纸工业

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 国家 863 计划专题 (2012AA022205)

作者简介: 韩双艳 (1976-), 女, 副教授, 研究方向为发酵工程

通讯作者: 林影 (1962-), 女, 教授, 研究方向为发酵工程

的进一步应用和开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

Pichia pastoris X33及表达载体pPICZaA购自Invitrogen公司;菌株 *E.coli* Top10F由华南理工大学微生物科学与工程学院微生物酶学实验室保存。

1.1.2 培养基

LB培养基: 1%胰蛋白胨, 0.5%酵母抽提物, 1% NaCl(低盐时为0.5%), 根据需要添加zeocin使终浓度为25 mg/mL。培养基YPD(根据需要加zeocin使终浓度为100 mg/mL)、MM、BMGY、BMMY参考“Invitrogen公司操作手册”。

1.1.3 工具酶与试剂

Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA Marker和限制性内切酶购自TaKaRa公司,生物素和蛋白质分子量标准购自美津生物公司,酵母氮源YNB(Yeast Nitrogen Base)、蛋白胨均购自Difco公司;酵母抽提物购自Oxford公司;其他试剂均为市售国产分析纯。质粒提取试剂盒(Plasmid Miniprep Kit)购自Biomiga公司。胶回收试剂盒,PCR纯化试剂盒为Quiagen产品,购自基因公司。

1.2 方法

1.2.1 基因优化及全合成

根据genbank中已报道的抗辐射不动杆菌CMC-1脂肪酶(ARL)基因序列(GI: 33337620)^[7]经过信号肽预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析后去掉信号肽,使用OptimumGene™进行CAI值优化,GC含量优化,重复序列优化、mRNA二级结构优化等,由南京金斯瑞公司合成。

1.2.2 PCR引物设计

根据优化后的基因序列设计引物克隆抗辐射不动杆菌CMC-1脂肪酶基因AR。上游引物ARL-Forward含EcoRI酶切位点(下划线示出)及保护碱基: 5'CGGAATTCTGTAATGACGACCACGACGA 3';下游引物ARL-Reverse含NotI酶切位点(下划线标出)及保护碱基: 5'ATTAAATAGCGGCCGCTGAATTGGCATAAGACT 3'。引物合成由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 ARL的克隆

以质粒pUC57-ARL为模板,ARL-Forward和ARL-Reverse为引物建立25 μL PCR反应扩增ARL。反应条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 共30个循环;第30个循环72℃延

伸7 min, PCR产物经1%凝胶电泳鉴定正确后经柱纯化存于-20℃备用。

1.2.4 重组质粒pPICZaA-ARL的构建

pPICZaA质粒和PCR产物分别用限制性内切酶EcoRI和NotI进行双酶切,切胶纯化回收后,用T4 DNA ligase 16℃过夜连接酶切产物,然后用CaCl₂转化法转入*E.coli* Top10™感受态,在含25 μg/mL zeocin的LB培养基平板上涂板,过夜培养。挑取阳性转化子过夜培养后提取质粒,用限制性内切酶EcoRI和NotI进行双酶切鉴定。鉴定正确后,委托上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.5 转化毕赤酵母及转化子的筛选

重组质粒使用SacI限制性内切酶进行线性化后使用LiCl法转化到毕赤酵母X33,取转化产物涂布于含100 μg/mL的zeocin YPD平板上,30℃培养2~3 d,挑取转化子进行菌落PCR鉴定。再将PCR鉴定的阳性转化子点在含三丁酸甘油酯的MM乳化板上。

1.2.6 转化子摇瓶发酵及酶活测定

将筛得的重组转化子和对照菌(空载体pPICZaA转化的X33)接种于20 mL BMGY培养基中,30℃,200 r/min振荡培养16~20 h至OD 2-6。离心收集菌体,将其悬浮于20 mL BMMY培养基中,稀释至OD至0.8-1.0,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2.0%进行诱导表达,同时测定重组菌的生长曲线,并取1 mL发酵液4℃离心5 min,保留上清液。采用对硝基苯酚法测定脂肪酶活性,以取上清液以对硝基苯酚辛酸酯(4-nitrophenyl caprylate, pNPC)作为底物,在pH 8.0 45℃条件下反应5 min,用酶标仪测吸光度,根据标准曲线计算酶活。酶活定义:在45℃,pH 8.0条件下,每分钟分解底物产生1 μmol对硝基苯酚为一个酶活单位。

1.2.7 表达产物的SDS-PAGE分析及糖基化

重组转化子连续诱导培养96 h,取发酵上清液和经糖苷酶F处理过的样品分别取20 μL上样,进行12% SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R250染色,分析重组蛋白分子量。SDS-PAGE电泳方法参照文献8,糖苷酶F处理方法见参考文献9。

1.2.8 重组脂肪酶的部分表征

为确定温度和pH对酶活的影响,将浓缩20倍的发酵液按照材料和方法“1.2.6”,以对硝基苯酚辛酸酯(p-nitrophenyl caprylate, pNPC)为底物,分别测定不同温度(30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃)及不同pH(pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0、pH 10.0、pH 11.0)的酶活^[10];在pH 8.0,45℃,分别以C4(4-Nitrophenyl butyrate, pNPB)、C8(4-nitrophenyl

caprylate, pNPC)、C12 (p-nitrophenyl laurate, pNPL)、C16 (4-Nitrophenyl palmitate, pNPP) 为底物测定酶活来确定 ARL 对不同链长底物的偏好性。

2 结果与分析

2.1 基因优化结果

CAI 值即密码子适应指数, 该值越高, 说明宿主菌对该基因有较高的密码子偏好性, 以及较高的表达水平^[11]。去除本身信号肽的 ARL 基因经过 OptimumGene™ 优化后结果如表 1。CAI 值由 0.68 提高到 0.83, GC 含量调整不大 (40~60%为宜), 避免了 5 个顺式作用元件 Poly A (AATAAA)。

表 1 ARL 基因优化结果

Table 1 Optimization result of ARL

Optimization Parameters	native gene	Optimized gene
CAI	0.68	0.83
GC content	44.88%	42.95%
Poly A (AATAAA)	1	0
Destabilizing (ATTTA)	4	0

2.2 ARL 的克隆及重组质粒 pPICZαA-ARL 的构建

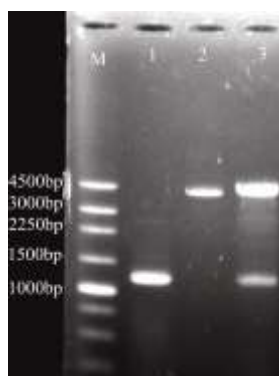


图 1 重组质粒 pPICZαA-ARL 鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pPICZαA-ARL

注: M: 250 bp DNA marker; 1: ARL PCR 产物; 2: pPICZαA 经 EcoRI and Not I 双酶切; 3: pPICZαA-ARL 经 EcoRI and Not I 酶切。

由 signalP 预测 pro-ARL 的信号肽剪切位点在 19~20 个氨基酸之间, 概率 0.999。本研究中采用 pPICZαA 本身携带的去掉 α 信号肽引导 ARL 表达, 因此去掉在全合成基因时去除了其上游编码自身信号肽的 19 个氨基酸对应的 DNA 序列, 拟只表达成熟肽。

按方法“1.2.3” PCR 扩增 ARL, 取 5 μL PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在约 1200 bp 处有一条明显的特异性扩增带 (图 1), 同拟克隆的 ARL 片段大小 (1203 bp) 相符。按方法“1.2.3”所述构建

重组质粒 pPICZαA-ARL 并获得大肠杆菌阳性转化子, 提取重组质粒并经双酶切鉴定 (图 1), 表明 ARL 已正确克隆进表达载体。重组质粒同时送上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果显示插入的基因片段全长 1203 bp, 与拟克隆的 ARL 序列一致, 且读码框正确。

2.3 酵母转化子的筛选和鉴定

在 YPD 板上随机挑取转化子, 用 AOX 通用引物进行 PCR, 鉴定重组毕赤酵母为 Mut⁺型 (图未示出)。重组酵母转化子用点接到三丁酸甘油酯乳化平板上, 培养 2~3 d 后, 观察水解圈大小, 结果发现重组酵母菌 X33/pPICZαA-ARL 周围产生明显水解圈, 阴性对照菌 X33/pPICZαA 在乳化平板上无水解圈形成, 如图 2 所示。

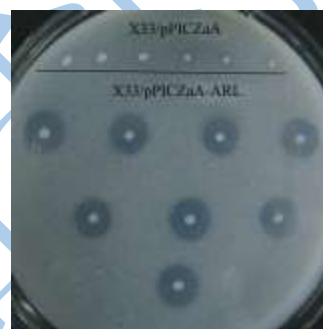


图 2 MM 乳化板筛选转化子

Fig.2 Screening of recombinant *Pichia pastoris* X33/ARL

2.4 重组酵母摇瓶发酵

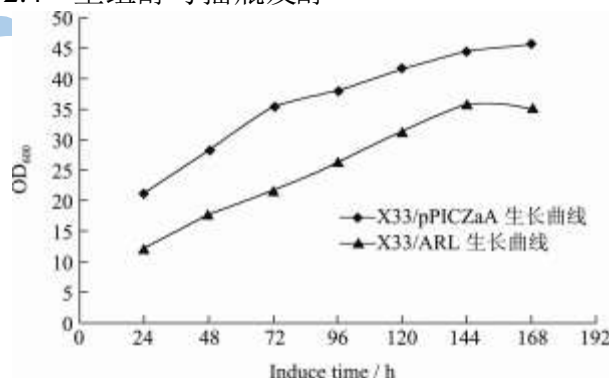


图 3 重组菌 X33/pPICZαA-ARL 及对照菌 X33/pPICZαA 摇瓶发酵

Fig.3 OD₆₀₀ of recombinant *Pichia pastoris* X33/ARL (X33/pPICZαA as control)

重组菌 X33/pPICZαA-ARL 及对照菌 X33/pPICZαA 在 BMMY 培养基中的生长情况如图 3。从图上看, 重组菌 X33/ARL 生长对照菌, 可能是由于外源基因的插入和表达形成了代谢负担。同时, 观察了重组菌发酵产酶过程 (图 4), 发酵上清中脂肪酶活力逐渐增加, 甲醇诱导 120 h 达到最大值 65 U/mL, 比野生菌摇瓶发酵 (3~4 U/mL) 提高约 16 倍

[2], 达到野生菌分批发酵(120 U/mL)的二分之一[4]。提示在毕赤酵母中表达 ARL 比有比野生菌培养发酵有明显优势。

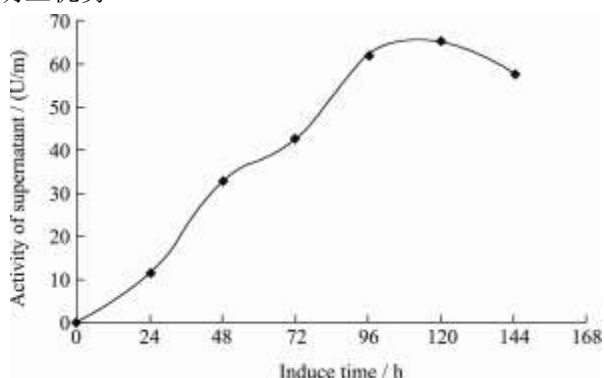


图4 重组酵母 X33/ARL 产酶曲线

Fig.4 Supernatant activity of recombinant *Pichia pastoris* X33/ARL

2.5 SDS-PAGE 分析表达产物

重组酵母 X-33/pPICZaA-ARL 发酵上清液及其糖苷酶 F 处理过的样品经 SDS-PAGE 和 WESTERN BLOT 分析, 如图 5 所示。经糖苷酶 F 处理过后, ARL 分子量有所减小, 接近野生菌所产脂肪酶 (43 kDa) [2], 显示 ARL 在毕赤酵母中表达分泌过程中, 蛋白被 N 糖基化修饰。

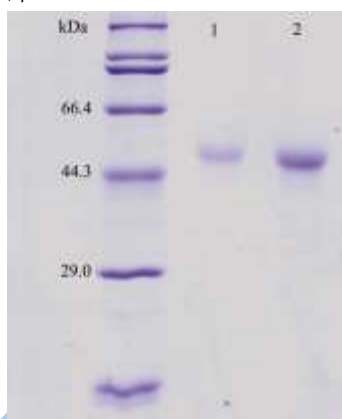


图5 重组 ARL 的糖基化分析

Fig.5 Glycosylation analysis of recombinant ARL by SDS-PAGE

注: M: 蛋白 Markers, 1: GS115/ARL 甲醇诱导 96 发酵上清, 2: 上清经 PNGase F 处理。

2.6 重组 ARL 的酶学性质

根据方法和材料“1.2.8”, 测定温度和 pH 对酶活的影响, 结果如图 6。重组 ARL 最适温度为 50 °C, 比野生株所产脂肪酶最适温度 40 °C 高[2], 这可能源于毕赤酵母对脂肪酶的糖基化等高级修饰使酶更耐热。重组 ARL 在 40~55 °C 能保持 80% 以上酶活, 在 60 °C 及以上酶活显著降低, 60 °C 时酶活仅为最大酶活的 50%。陈淑珍等也报道了抗辐射不动杆菌 CMC-1 野生

菌所产脂肪酶在 60 °C 保温 5 min 时酶活即丧失 40% [3], 说明 ARL 在 60 °C 不稳定。同时, 重组 ARL 最适 pH 在 9.0, 比野生型 10.0 低[2]。

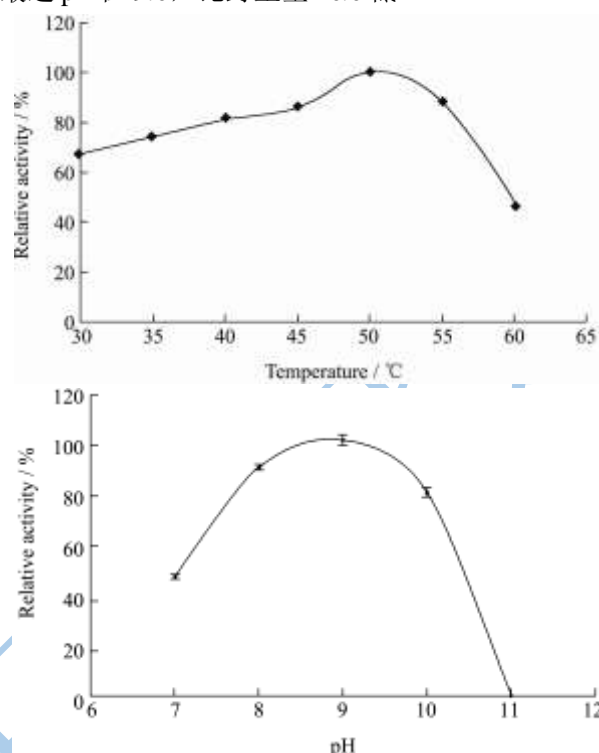


图6 温度和 pH 对酶活的影响

Fig.6 Optimal temperature and pH for recombinant ARL

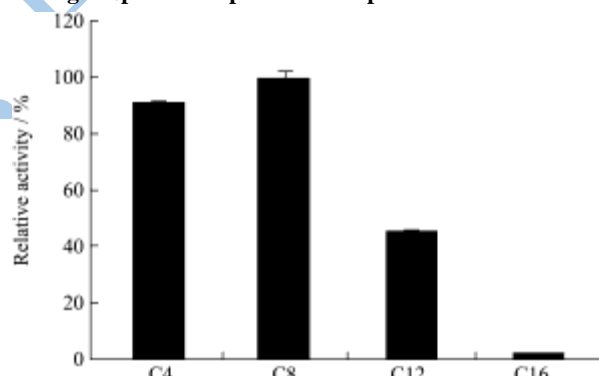


图7 重组 ARL 底物特异性

Fig.7 Substrate specificity of recombinant ARL

图 7 显示, 实验测得重组 ARL 对对硝基苯酚酯的选择性与野生型差异较大, 文献报道野生型对中长链 (C12-C18) 有较好的作用[2], 但在毕赤酵母中表达的重组 ARL 优先水解短链的对硝基苯酚酯, C8 底物最优, 对 C12 及更长链的底物作用较弱。

3 结论

本文尝试将来源于尝试用基因工程手段在毕赤酵母表达系统表达, 摇瓶条件下重组菌产 ARL 脂肪酶酶活力达到 65 U/mL, 达到了野生菌批式发酵产酶的二分之一[4]。同时, 在毕赤酵母中表达 ARL 经

过毕赤酵母糖基化等真核细胞修饰,分子量比野生型 ARL 稍大,因而在酶学性质上与野生型也稍有不同。重组 ARL 的酶最高温度为 50 °C,高出野生型 ARL 最适温度 10 °C,因而表现出更好的嗜温性。而重组 ARL 的最适 pH 9.0 虽然稍低于野生型,但仍保持了偏碱性。因此利用毕赤酵母表达系统生产重组 ARL 为 ARL 的进一步开发及工业化大规模生产提供了思路。

参考文献

- [1] Sharma R, Chisti Y, Banerjee C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* [J]. 2001, 19: 627-662
- [2] Ming Chuan Hong, Ming Chung Chang. Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. *Biotechnology Letters* [J]. 1998, 20(11): 1027-1029
- [3] Shu Jen Chen, Chu Yuan Cheng, and Teh-Liang Chen. Production of an Alkaline Lipase by *Achetobacter radioresistens*. *Journal of fermentation and bioengineering* [J]. 1998, 86(3): 308-312
- [4] You Lia Chen, Chu yuan Chenga, Teh liang Chena. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme and microbial technology* [J]. 2001, 29(4-5): 258-263
- [5] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E, et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1997, 190(1): 55-62
- [6] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(5): 527- 533
- [7] Ming Chuan Hong, Mei Li Wu, Ming Chung Chang. Cloning and complete nucleotide sequence of *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 AglyA gene encoding serine hydroxymethyltransferase. *FEMS Microbiology Letters* [J]. 1999, 170 (2): 413-418
- [8] Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [9] 林影,周新莹,韩双艳,等.重组毕赤酵母细胞壁蛋白的抽提和分析. *华南理工大学学报*[J]. 2012, 40(5): 101-106, 120
- [10] Galle Pencreac'h, Jacques C Baatti. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase :A simple test for the determination of lipase activity in organic media [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(6): 417-422
- [11] Gaspar Paulo, Oliveira Jos Lus, Frommlet Jrg, et al. EuGene: maximizing synthetic gene design for heterologous expression [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(20): 2683-2684