

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):228-235; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

扩展青霉脂肪酶基因克隆、密码子优化及表达

张正平, 杨江科, 徐莉*, 刘云, 闫云君*

(分子生物物理教育部重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要:【目的】克隆扩展青霉脂肪酶基因, 实现具强催化活性的脂肪酶的异源高效表达。【方法】利用 RT-PCR 扩增扩展青霉 CICC 40356 脂肪酶(PEL) cDNA 序列, 利用重叠延伸 PCR(Over-lap extension PCR) 技术对 PEL 的 10 个稀有氨基酸密码子和表达载体 pPIC9K α 信号肽的 9 个氨基酸密码子进行了优化, 获得了改造过的脂肪酶基因 PELM 和表达载体 pPIC9KM。并构建了带有脂肪酶自身信号肽的 pPIC9K-PEL1、pPIC9KM-PELM1、pPIC3.5K-PEL1、pPIC3.5K-PELM1 和不带有脂肪酶自身信号肽的 pPIC9K-PEL2、pPIC9KM-PELM2 六个重组质粒。利用对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)为底物检测工程菌脂肪酶的酶活。在此基础上, 对工程菌的酶学性质进行了研究。【结果】扩展青霉脂肪酶基因 cDNA 序列分析结果表明该序列与已报道 PEL cDNA 序列仅相差 3 个碱基, 同源性高达 99%。6 个重组工程菌在甲醇诱导下, 均表现出 pNPP 水解活性, 28℃ 诱导 100h 时酶活达到最高, 发酵上清的酶活分别为 3.65 U/mL、30.49 U/mL、90.85 U/mL、212.05 U/mL、15.29 U/mL、76.32 U/mL。SDS-PAGE 结果表明重组脂肪酶分子量均约 28 kDa。酶学性质研究表明, 重组脂肪酶 PELM 最适温度为 35℃, 最适 pH 为 9.5, 在 pH 7.0-10.0 范围内该脂肪酶均较稳定, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对其有激活作用, Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 则有抑制作用, EDTA 能使之快速失活。以不同碳链长度的对硝基苯酚酯为底物检测其底物特异性, 结果显示其对中链酯($\text{C}_8 - \text{C}_{12}$)有较强的水解能力, 最适底物为 C_8 的 pNP 酯。【结论】密码子优化后的扩展青霉脂肪酶基因在毕赤酵母中获得理想的表达, 其酶活力比未优化的野生脂肪酶的提高 2.3-2.5 倍, 表明定点突变对其基因本身更改特有稀有密码子是实现 PEL 功能蛋白的异源高效表达的有效策略之一。

关键词: 扩展青霉脂肪酶; 基因克隆; 密码子优化; 表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0228-08

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3), 全称为三酰甘油水解酶(triacylglycerol acylhydrolase), 是一类广泛作用底物的界面酶, 用于甘油酯及水不溶性酯类水解、醇解、酯化、酯交换及合成等^[1-2]。其中, 碱性脂肪酶可以在碱性条件下水解脂肪, 有助于除去脂肪污垢, 提高洗涤剂去污能力、降低表面活性剂和三聚磷酸钠的用量, 使洗涤剂朝着低磷或无磷的方向发展, 具有巨大的商业价值, 引起了的国内外学者的广泛关注^[3-5]。扩展青霉脂肪酶属于中温碱性脂肪

酶, 在洗涤剂工业、皮革脱脂、生物能源及生物制药等领域有着广泛的应用, 且已实现工业化生产^[6-9]。其早期研究集中在菌种选育、酶学性质及发酵工艺等方面^[10-12]。2001 年, 我国学者林琳等首次报道了 PEL 的基因及其编码区 cDNA 的全长序列, 并进行了初步的异源表达探索^[13-14]。研究表明, 外源蛋白的高效表达与信号肽、目的基因和宿主菌密码子偏好性等密切相关, 采用宿主偏爱的密码子, 减少或避免使用稀有密码子是提高异源表达量的有效措施

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA020203, 2007AA05Z417, 2009AA03Z232); 武汉市攻关项目(200720422138)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: xuli1881@yahoo.cn, yanyunjun@tom.com

作者简介: 张正平(1984-), 男, 湖北人, 硕士研究生, 从事微生物脂肪酶分子生物学方面的研究。E-mail: zhengping_zhang@yahoo.cn

收稿日期: 2009-06-24; **修回日期:** 2009-09-14

之一^[15-17]。

本研究从扩展青霉 CICC 40356 中克隆了脂肪酶基因, 并对该基因中使用频率低的 10 个氨基酸密码子及表达载体 pPIC9K 信号肽中 9 个氨基酸密码子进行了优化, 实现其在毕赤酵母中的高效表达, 同时还研究了重组脂肪酶的最佳诱导时间、最适温度、最适 pH、底物特异性等酶学性质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒: 扩展青霉 (*Penicillium expansum*) CICC 40356 购自工业微生物菌种管理中心; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , pMD18T 购自 TaKaRa 公司; 巴士德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115, 载体 pPIC9K 和 pPIC3.5K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 实验所用的 *Bam*H I、*Eco*R I、*Not* I、*Sal* I、T4 连接酶和 pMD18T 克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 Omega 公司; cDNA 合成试剂盒, *Taq* DNA 聚合酶购自 Ferments; 不同碳链长度的对硝基苯酚酯 (C_4 、 C_8 、 C_{12} 、 C_{16}) 和罗丹明 B 购自 Sigma; RNA Trizol 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司;

预染蛋白 Marker 购自天根公司; DNA Marker 购自东盛生物; 引物由上海生工合成; 核酸测序由上海 Invitrogen 公司完成; 其他化学试剂均为国产分析纯。PCR 仪 53333 (Eppendorf AG 22331 Hamburg), 电泳仪 DYY-5 (北京市六一仪器厂), 凝胶成像系统 GeL Logic 200 (Eastman Kodak Company USA)

1.1.3 引物: 根据已报道的 *Penicillium* 属脂肪酶基因序列, 利用软件 Primer 5 设计引物对 PH1/PA1 和 PH2/PA2 扩增脂肪酶基因; 设计引物 PH3/PA2 扩增其成熟肽的编码序列 (表 1)。引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

1.1.4 培养基: LB、YPD、MD、MM、BMGY、BMMY, 脂肪酶活性检测平板均按 Invitrogen 公司操作手册推荐方法配制。

1.2 PEL 基因的克隆

用 RNA Trizol 提取试剂盒提取 *P. expansum* 总 RNA 后, 再用 cDNA 反转录试剂盒得到的 cDNA 为模板; 以 PH1 和 PA1 为引物扩增 PEL 基因的编码区 (表 1)。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆子, 并送上海 Invitrogen 测定序列。

表 1 扩增全长脂肪酶基因和其成熟肽序列的相关引物

Table 1 Primers used for amplification of complete and mature lipase gene

Primer	Sequence (5'→3')	Size /bp	Restriction sites
PH1	GATATGGTTGTTCAACTACC	20	
PA1	CTCAGCTCAGATAGCCACAAC	21	
PH2	CTGAATTCATGTTGTTCAACTACCAATC	28	<i>Eco</i> R I
PA2	CTGCGGCCGCTCAGCTCAGATAGCCACAAC	30	<i>Not</i> I
PH3	CTGAATTCGAACCTATT TT GGAGTC	25	<i>Eco</i> R I

1.3 密码子优化

利用软件 (<ftp://guca.schoedi.de>) 计算密码子使用频率和密码子第三位上碱基含量, 扩展青霉脂肪酶基因中有多数是毕赤酵母的稀有密码子; 利用 DNAssist 分析软件进行 DNA 和蛋白质序列的比较分析, 在不改变其氨基酸残基的前提下, 设计 4 对引物 (表 2), 采用重叠延伸 PCR^[18] 方法优化 PEL 中的 10 个稀有氨基酸密码子。

利用相同策略, 以含突变碱基的 3 对寡核苷酸序列为引物 (表 2) 将表达载体 pPIC9K 的 α 信号肽 9 个稀有氨基酸密码子替换为毕赤酵母的偏爱密码子, 具体优化策略见图 1 和图 2, 以期提高目的蛋白在毕赤酵母中的表达水平。

1.4 重组质粒的构建

1.4.1 质粒 pPIC9KM 的构建: *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pMD18T- α M 和 pPIC9K, 胶回收纯化, T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选出信号肽已优化的 pPIC9KM 阳性克隆子。

1.4.2 重组质粒的构建: 以 PH2/PA2 (表 1) 为引物, 以含有目的基因的 pMD18T 载体为模板, PCR 扩增含有信号肽的 PEL1; 以含有目的基因的 pMD18T 载体为模板, 以 PH3/PA2 (表 1) 为引物扩增不含信号肽序列 PEL2, 胶回收纯化 PCR 产物后, 纯化后分别连接到用相同限制性内切酶消化的载体 pPIC9K, pPIC9KM, pPIC3.5K 上, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选抗氨苄青霉素克隆子, PCR 和酶切鉴

定,送阳性克隆上海英骏公司测序。PCR 反应条件 30 个循环;72℃ 10 min。
为:94℃ 5 min;94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1 min,

表 2 优化用引物

Table 2 Mutagenic primers used for the multiple site-directed mutagenesis of the codons of mature lipase gene and α signal peptide in the vector pPIC9K

	Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction sites
Mutagenic primers used for optimization of the PEL	P1	CTGAATTCATGTTGTTCAACTACCAATCCT TTGCTGG TG	38	<i>EcoR</i> I
	F1	GTAGTAGAACCTCTCATGATGAC AGCG ATG	30	
	P2	CATCGCTGTCATCATGAGAG GGTTCT ACTAC	30	
	F2	GTACTT AGCAATCAA AGCCTTG	22	
	P3	CAAGGCT TTGATTGCTA AGTAC	22	
	F3	CCAGCCTG AGCAGTACCAA AGTCAGCCCAAGCTTGG	36	
	P4	CTTTGGTACT GCTCAGGCTG TACCTTCAACCGTGGA	37	
	F4	CTGCGGCCGCTCAGCTCAGATAGCCACAAC	30	<i>Not</i> I
Mutagenic primers used for optimization of α signal peptide in the vector pPIC9K	P5	GAAGGATCCAAACGATGAGATTTTC	24	<i>Bam</i> H I
	F5	CAGCT GGAA ATTTGTGCAGTTTC	22	
	P6	GAA ACTGC ACAAAT CCAG CTG	22	
	F6	CAACAAACCG TTAT TTGTGC	20	
	P7	GCACAAATAAC GGTTT GTTC	20	
	F7	AGGGAATTCTACGTAAGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCCAAAGAG ACAC CTTC	51	
	P8	CAGAT TTGGAAGGT GATTTTCG	21	
	F8	CGAATTCACCTTCCAAATCTG	21	<i>EcoR</i> I

* The optimized-codons, which will not result in amino acid substitutions, are in boldface. The introduced restriction sites are underlined.

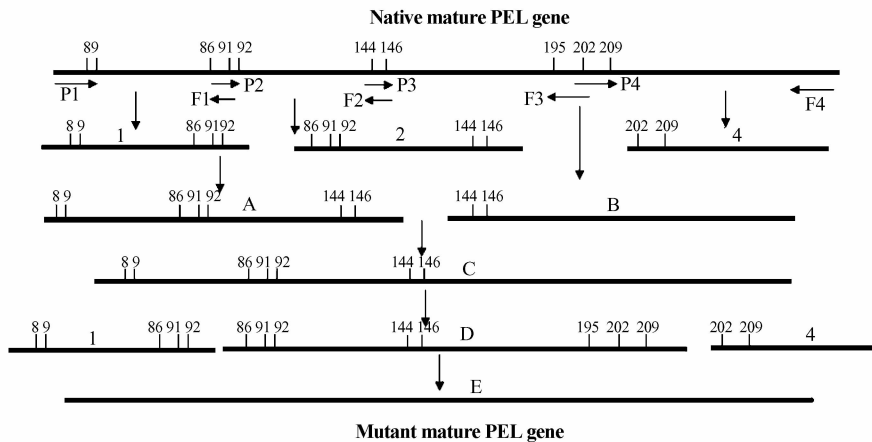


图 1 扩展青霉成熟脂肪酶基因密码子优化策略

Fig. 1 The strategy for the codons of mature lipase gene optimized by overlap extension PCR in the *Penicillium expansum*.

1.5 酵母的转化及筛选

Sal I 线性化上述构建成功的重组质粒,电转化至宿主菌 *P. pastoris* GS115 中,涂布于 MD 平板,28℃ 培养 2~3 d;再将 MM 平板长势好的转化子分别转至 G418-YPD 以及罗丹明 B 活性检测平板上,28℃ 培养 3~4 d,每隔 24 h 添加甲醇诱导;经过 G418 抗性和活性平板透明圈筛选,挑取高抗性和水解圈较大的转化子,PCR 鉴定质粒是否导入。选择最佳转化子进行诱导表达。

1.6 脂肪酶活性检测

1.6.1 脂肪酶酶活的平板检测:将重组毕赤酵母及

空载体转化子接种到脂肪酶活性功能检测罗丹明 B 平板上,28℃ 下培养 3~4 d,每隔 24 h 添加 0.5 mL 甲醇诱导,紫外下观察荧光水解圈。

1.6.2 酵母菌的诱导表达:挑取在检验板上有透明圈较大的菌落,接种至 BMGY 培养基中,28℃ 震荡培养 16~20h 至 $OD_{600} = 2-6$,离心收集菌体,用 BMMY 培养基重新悬起菌体至 $OD_{600} \approx 1$,28℃ 200 r/min 震荡培养,每隔 24 h 加甲醇,使终浓度达 0.5% 进行诱导表达。分别在 24、48、72、96、120 及 144h 取样测定脂肪酶活力,每个时间点测 3 次,确定最佳诱导时间。

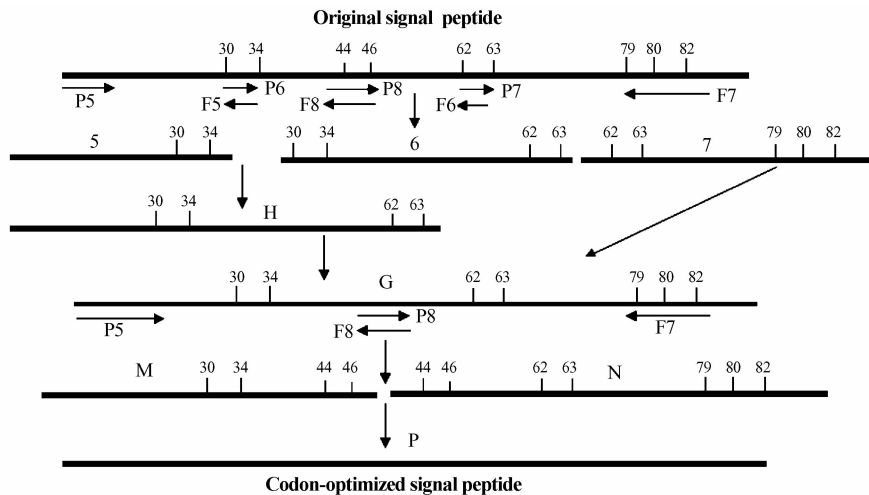
图 2 α 信号肽密码子优化的过程

Fig. 2 The codons of α -signal peptide of vector pPIC9K optimized by overlap extension PCR.

1.6.3 脂肪酶酶活的定量测定:脂肪酶催化活性采用 pNPP 比色法^[19]测定。酶活单位定义为:在反应条件下,每毫升酶液每分钟催化底物释放出 1 μmol 的对硝基苯酚,定义为一个脂肪酶活力单位(U)。

1.7 酶学性质检测

1.7.1 最适温度:测定不同温度(20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 和 50 $^{\circ}\text{C}$)下的 pNP 水解酶活,确定脂肪酶的最适温度。每个温度测 3 次,酶活取平均值。

1.7.2 最适 pH:测定不同 pH (pH5.0 - 6.0 的 NaAc-Hac 缓冲液, pH6.0 - 6.5 的 His-HCl 缓冲液, pH 7.0 - 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液及 pH 9.0 - 11.0 的 Gly-NaOH 缓冲液)下的 pNP 水解酶活,确定脂肪酶的最适 pH。每个 pH 测 3 次,酶活取平均值。

1.7.3 金属离子对酶活的影响:分别添加终浓度为 2 mmol/L 的不同金属盐离子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Zn^{2+}) 及 EDTA 到脂肪酶酶溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1h 时,在最适温度和最适 pH 条件下,测定 PEL 脂肪酶的水解活力,研究金属离子对其酶活的影响,酶活取 3 个平行数据的平均值。

1.7.4 底物链长特异性:配制 10 mmol/L 的不同碳链长度的对硝基苯酚酯 (C_2 、 C_4 、 C_8 、 C_{10} 、 C_{12} 、 C_{14} 、 C_{16}) 的乙醇溶液,加入 4 倍体积的无水乙醇和 95 倍体积的 pH8.5 的 Tris-HCl 缓冲液作为底物,加入脂肪酶 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 再测定 OD_{410} 。通过不同底物的水解酶活力,确定脂肪酶的链长偏好性。不同底物的酶活测 3 次,取其平均值。

2 结果

2.1 扩展青霉碱性脂肪酶基因 cDNA 克隆

利用 Invitrogen 的 Trizol 提取试剂,从扩展青霉菌丝体中提取总 RNA,琼脂糖电泳结果表明,18 S

和 28 S 核糖体的条带清晰,亮度比值约 1: 2,说明抽提过程中 RNA 无明显降解,符合反转录要求。以其为模板, Oligo(dT)12 - 18 为引物,反转录合成 cDNA 第一链。再以所得 cDNA 作为模板,以特异性引物 PH1 和 PA1 克隆扩展青霉成熟脂肪酶基因,扩增产物约 900 bp。

序列分析表明所克隆的 PEL 的 cDNA 长 858 bp,编码 286 个氨基酸残基,其中包含编码 20 个氨基酸残基的信号肽,与 GenBank 中已报道的 PEL 基因序列的同源性为 99%。

2.2 密码子优化及载体构建

分别以克隆于载体 pMD18-T 上的 PEL cDNA 和 pPIC9K 的 α 信号肽为模板,以含突变碱基的寡核苷酸序列为引物进行优化,分别获得编号为 1(289 bp), 2(188 bp), 4(256 bp), B(453 bp), 以及 5(120 bp), 6(108 bp), 7(110 bp) 的片段;凝胶回收全部片段 DNA 后,再将 PEL 中间片段(1、2、4 和 B)1: 1 混合稀释 20 倍后为模板,得到 A(482 bp)和 C(858 bp), α 信号肽中间优化片段 5、6 及 7 混合稀释为底物模板,扩增得到 G(314 bp), H(228 bp), M(159 bp), N(176 bp) 等片段。再以同样 PCR 策略,获得完整的、改造好的带有自身信号肽的 PELM1(E1 片段,858 bp),不带有自身信号肽的 PELM2(E2 片段,798 bp) 及改造好的 α 信号肽 α M(P 片段,314 bp)。

电泳结果显示,拼接获得的片段大小与预测结果相同。将密码子改造成功带有自身信号肽的扩展青霉脂肪酶基因 PELM1(E1),不带有自身信号肽的成熟肽编码序列 PELM2(E2) 及 pPIC9K 的 α 信号肽 α M(P) 纯化与 pMD18-T 载体连接,测序验证表明基因优化成功,实现了正确突变。

将已优化好的扩展青霉脂肪酶全基因序列(含有自身信号肽)和成熟肽编码序列分别克隆到载体 pPIC9K, pPIC9KM 及 pPIC3.5K 中, 构建 6 个重组表达质粒(重组质粒特点见表 3), 扩增, 经 PCR、酶切及测序验证正确后, 电转化到毕赤酵母宿主菌 GS115。挑取在 MM 培养基平板上长势好的甲醇利用表型转化子, 转接于高浓度 G418 (4.0 mg/mL) 的

YPD 平板, 挑选高拷贝数的重组酵母以实现目的基因的高效表达。最后重组酵母基因组 DNA 为模板, 分别以 PH2/PA2, PH3/PA2 为引物, 采取与上述克隆目的基因相同条件进行 PCR 扩增, 每个转化子均扩增出一条与预期大小一致的特异性 DNA 条带, 说明扩展青霉脂肪酶基因均已整合到 *P. pastoris* 染色体上(图片未显示)。

表 3 重组质粒特点

Table 3 Characteristics of the different recombinant plasmids

Recombinant plasmid	α -signal peptide	Presence of signal	Lipase gene
	of vector pPIC9K	peptide of PEL	
pPIC9K-PEL1	With original α -signal	+	Native gene
pPIC9K-PEL2	With original α -signal	-	Native mature PEL gene
pPIC9KM-PELM1	With Optimized α -signal	+	Mutant PEL gene
pPIC9KM-PELM2	With Optimized α -signal	-	Mutant mature PEL gene
pPIC3.5K-PEL1	Without α -signal	+	Native gene
pPIC3.5K-PELM1	Without α -signal	+	Mutant PEL gene

2.3 毕赤酵母重组子产脂肪酶能力分析

分别选取经 PCR 验证, 已整合有扩展青霉脂肪酶基因的酵母重组工程菌的转化子及 pPIC9K 质粒转化子点接到脂肪酶活性功能检测罗丹明 B 平板上, 28°C 下培养 3-4d, 每隔 24 h 添加 0.5 ml 甲醇诱导。诱导后的转化子在脂肪酶活性功能检测平板上有明显的显色圈, 说明脂肪酶基因在 *P. pastoris* 中实现了表达并分泌到细胞外。转化子 1 和 2、3 和 4

之间比较, 可知单信号肽的表达能力比双信号肽的强; 转化子 2 和 5 之间的比较, 可以明显看出 PEL 自身信号肽对脂肪酶的分泌能力远强于表达载体的 α 信号肽; 5 和 6 之间的比较, 可知经过密码子优化的表达酶活要高于未优化的野生基因, 其中携带有 PEL 自身信号肽并经密码子优化的脂肪酶基因的酵母转化子 6 号水解油脂透明圈最明显、清晰(图 3)。

经过 G418 抗性和罗丹明 B 活性平板透明圈筛选, 挑取高抗性和水解圈较大的转化子进行摇瓶发酵。重组子的产酶能力定量分析在摇瓶发酵条件下进行。以 0.5% 甲醇诱导表达, 定期检测发酵液酶活, 结果显示各个工程菌均实现了功能性表达, pPIC9K-PEL1; pPIC9KM-PEL2; pPIC9KM-PELM1; pPIC9KM-PELM2; pPIC3.5K-PEL1; pPIC3.5K-PELM1 的 pNP 酯水解酶活分别为 3.65 U/mL, 15.29 U/mL, 30.49 U/mL,

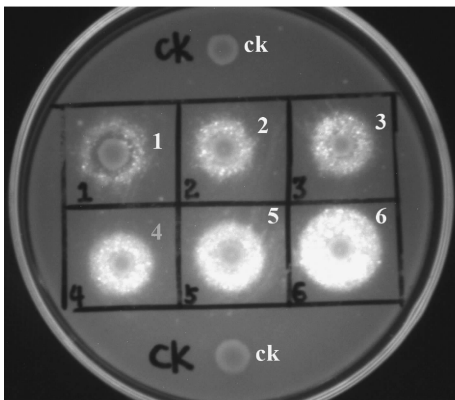


图 3 酵母重组子在罗丹明 B 平板上的脂肪酶功能活性检测

Fig. 3 The fluorescent zones produced by transformants resistance to G418 on YEPD-rhodamine B-olive oil plate when exposed by UV light.

CK, transformant containing plasmid pPIC9K as control; 1. transformant containing recombinant vector pPIC9K-PEL1; 2. transformant containing recombinant vector pPIC9KM-PEL2; 3. transformant containing recombinant vector pPIC9KM-PELM1; 4. transformant containing recombinant vector pPIC9KM-PELM2; 5. transformant containing recombinant vector pPIC3.5K-PEL1; 6. transformant containing recombinant vector pPIC3.5K-PELM1.

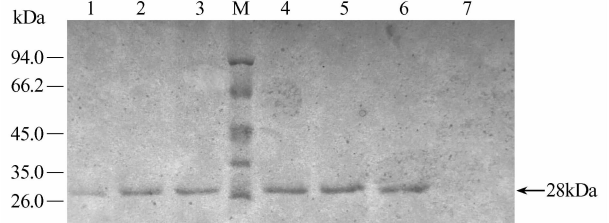


图 4 工程菌发酵液中扩展青霉脂肪酶的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of different expressed recombinant wild-type and mutant PEL in fermentation broth. 1. pPIC9K-PEL1; 2. pPIC9KM-PEL2; 3. pPIC9KM-PELM1; M. protein marker; 4. pPIC9KM-PELM2; 5. pPIC3.5K-PEL1; 6. pPIC3.5K-PELM1; 7. pPIC9K.

76.32 U/mL, 90.85 U/mL, 212.05 U/mL。当甲醇诱导表达时间为 100h 时, 带有自身信号肽并经密码子改造的重组子的发酵液酶活达 212.05 U/mL, 较未优化的野生基因重组子提高了 2.3-2.5 倍。发酵上清液中蛋白质的 SDS-PAGE 检测结果表明所有带有 PEL 基因的工程菌均表达大小约为 28 kDa 的特异蛋白, 分子量大小无明显差别 (图 4)。

2.4 最佳诱导时间

将重组酵母工程菌 pPIC3.5K-PELM1-7 接种到 BMGY 培养基中诱导表达, 分别诱导 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 后用分光光度计检测酶活, 结果显示, 甲醇诱导 100h 酶活最大 (图 5-A)。

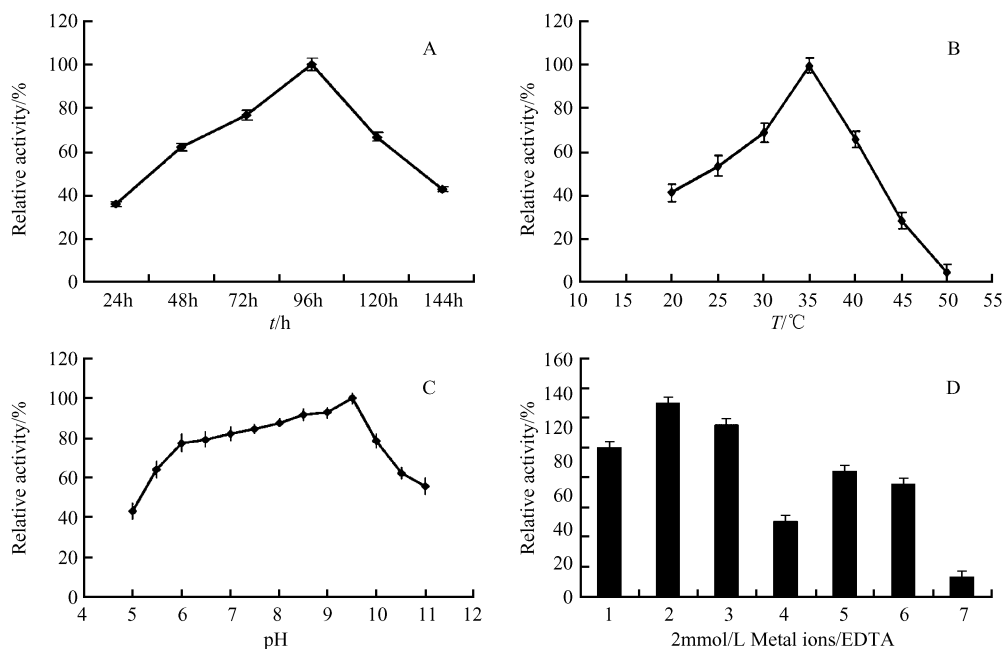


图 5 最佳诱导时间、酶的最适温度、最适 pH 及不同盐离子和 EDTA 对脂肪酶活力影响

Fig. 5 The best time for induction, the optimum temperature and pH, and effect of metal ions. A: The best time for induction; B: The optimum catalytic temperature; C: The optimum catalytic pH; D: Effect of chemicals and detergent EDTA on lipase. 1, No metal ions (Control); 2, CaCl₂; 3, MgCl₂; 4, FeCl₂; 5, ZnCl₂; 6, CuCl₂; 7, EDTA.

2.6 PEL 最适底物

分别以溶于乙腈浓度为 10 mmol/L 的 4-硝基苯乙酸酯 (C₂), 4-硝基苯丁酸酯 (C₄), 4-硝基苯辛酸酯 (C₈), 4-硝基苯葵酸酯 (C₁₂), 4-硝基苯基月桂酸酯 (C₁₂), 4-硝基苯肉豆蔻酸酯 (C₁₄), 4-硝基苯棕榈酸酯 (C₁₆) 为底物检测脂肪酶的水解酶活, 结果显示脂肪酶对中长度碳链底物有选择性, 最适作用底物为 4-硝基苯辛酸酯 (C₈) (图 6)。

2.5 最适温度、pH 及金属离子和去污剂 EDTA 对脂肪酶的影响

由图 5-B、C、D 可知, 扩展青霉脂肪酶最适温度为 35°C, 属于中温性脂肪酶。其最适 pH 为 9.5, 且 pH 作用范围较宽 (pH8.0-10.0), 稳定性较好。金属离子中, Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 能提高脂肪酶的活力, 其中 Ca²⁺ 作用最为明显, 达到 129.85%。Cu²⁺, Fe²⁺ 和 Zn²⁺ 对此脂肪酶有较强的抑制作用, 尤其是 Fe²⁺, 仅保留 50.785% 的残余酶活力; 去垢剂 EDTA 使扩展青霉脂肪酶活力迅速失活。

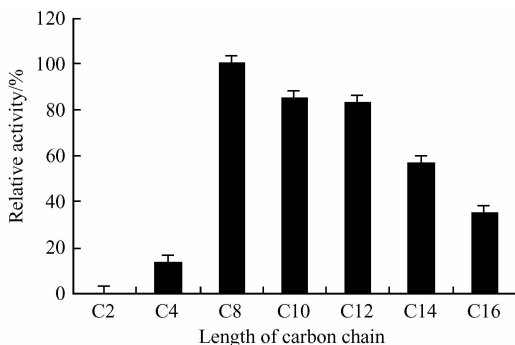


图 6 扩展青霉脂肪酶的底物特异性

Fig. 6 The substrate specificity of *P. expansum* lipase.

3 讨论

巴斯德毕赤酵母表达系统由于遗传背景清晰、安全性好,具有强有力的醇氧化酶基因(Alcohol Oxidase, AOX1)启动子,表达量高,严格调控外源蛋白的表达,因此得到了广泛应用,已成功表达了数十个外源基因^[20-22]。但巴斯德毕赤酵母存在特殊的密码子使用偏好,在所有61个密码子中有25个是毕赤酵母所偏爱的^[23-25],如果外源基因密码子偏爱性不同于宿主毕赤酵母,将导致外源蛋白表达量低或表达出没有生物学功能的外源蛋白^[26]。已有的研究表明,密码子优化是提高外源蛋白在毕赤酵母中表达量的有效策略之一^[27-29],但利用该策略实现扩展青霉脂肪酶在巴斯德毕赤酵母中高效表达还是首次报道。

本研究以毕赤酵母密码子使用频率表为依据,在不改变氨基酸的前提下对克隆到的扩展青霉脂肪酶基因及表达载体pPIC9K的 α 信号肽中低频率的密码子通过重叠延伸PCR技术改造为毕赤酵母中使用率较高的密码子,构建了6个重组表达载体,实现了PEL在毕赤酵母中的活性表达,在摇瓶发酵水平上,水解酶活为212 U/mL,比未优化的野生基因的表达酶活提高了2.3-2.5倍,若优化发酵培养基和培养条件,表达量会进一步提高。林琳等在毕赤酵母中实现了*P. expansum*脂肪酶的表达,其水解橄榄油的酶活为20 U/mL^[13]。以上结果表明密码子优化是实现外源基因高效异源表达的有效方法。在构建毕赤酵母基因工程菌时,大多采用毕赤酵母表达载体的 α 信号肽,但本研究表明脂肪酶自身信号肽更有利于表达。所以在构建毕赤酵母基因工程菌时,应综合考虑密码子使用频率和信号肽的选择等影响因素。

密码子优化所采用的定点突变技术不仅可以提高表达量,也可以用于改良酶学性质。蔡少丽等^[30]利用重叠延伸PCR对扩展青霉脂肪酶PEL基因进行体外定点突变,对该脂肪酶热稳定性的提高进行了研究,得到叠加突变脂肪酶的 T_m 比野生型增加了2.3°C,但其热稳定性还需进一步提高。本文构建的基于密码子优化的毕赤酵母表达体系为筛选酶学性质更优异的突变酶奠定了技术基础。

参考文献

- [1] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 390-397.
- [2] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 9: 235-251.
- [3] 郑毅, 施巧琴, 吴松刚. 新型洗涤剂用酶-碱性脂肪酶的研究开发碱性脂肪酶的开发和应用. *精细与专用化学品 (Fine and Specialty Chemicals)*, 2002, 15: 21-23.
- [4] Karadzic I, Masui A, Zivkovic LI, et al. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102, 102: 82-89.
- [5] Leow TC, Raja Abd Rahman RNZ, Basri M, et al. A thermo-alkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. *Extremophiles*, 2007, (11): 527-535.
- [6] 郑毅, 吴松刚, 施巧琴. 洗涤剂用酶-碱性脂肪酶的研究概况. *日用化学工业 (China Surfactant Detergent & Cosmetics)*, 2001, 1: 35-38.
- [7] Dai DZ, Xia LM. Enhanced production of *Penicillium expansum* PED-03 lipase through control of culture conditions and application of the crude enzyme in kinetic resolution of racemic allethrolone. *Biotechnology Progress*. 2005, 21: 1165-1168.
- [8] Dai DZ, Xia LM. Resolution of (R, S)-2-octanol by *Penicillium expansum* PED-03 lipase immobilized on modified ultrastable-Y molecular sieve in microaqueous media. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 1455-1460.
- [9] 李南薇, 吴虹, 宗敏华, 等. 固定化扩展青霉脂肪酶的制备及其在玉米油转酯反应中的应用. *催化学报 (Chinese Journal of Catalysis)*, 2007, 28(4): 333-338.
- [10] 施巧琴, 李辉. 碱性脂肪酶的研究 I-菌株的分离和筛选. *微生物学通报 (Microbiology)*, 1981, 8(3): 108-110.
- [11] 黄建忠, 施巧琴, 郑毅, 等. 中温碱性脂肪酶的研究 II-扩展青霉 PF868 变株产酶条件. *工业微生物 (Industrial Microbiology)*, 1995, 25(4): 10-15.
- [12] 郑毅, 黄建忠, 施巧琴, 等. 中温碱性脂肪酶的研究 III-扩展青霉 F868 变株碱性脂肪酶的纯化及其酶学性质. *工业微生物 (Industrial Microbiology)*, 1996, 26(8): 15-19.
- [13] 林琳. 扩展青霉 PF898 碱性脂肪酶基因的克隆与表达. 福建农林大学博士学位论文 (*Fujian Agriculture and Forestry University*), 2001.
- [14] Lin L, Xie BF, Yang GZ, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18(1): 32-37.
- [15] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: A review *Yeast*, 1992, 8: 423-488.
- [16] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Reviews*, 2000, 24: 45-66.
- [17] 胡世界, 罗素兰, 张吉贞, 等. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其高水平表达策略. *生物技术 (Biotechnology)*, 2007, 17(6): 78-83.
- [18] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 1989, 77(1): 51-59.
- [19] Teng Y, Xu Y. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 2007, 363: 297-299.

- [20] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 1993, 11(8):905-910.
- [21] Peng YC, Acheson NH. Production of active polyomavirus large T antigen in yeast *Pichia pastoris*. *Virus Research*, 1997, 49(1):41-47.
- [22] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 2000, 16(1):23-25.
- [23] 赵翔, 霍克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2000, 16(3):308-311.
- [24] Grantham R, Gautier C, Gouy M, et al. Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(1):49-62.
- [25] Sharp PM, Tuohy TM, Mosurski KR. Codon usage in yeast; cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(13):5125-5143.
- [26] Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ, et al. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1993, 136:111-119.
- [27] 姚斌, 张春义, 王建华. 高效表达具有生物活性植酸酶的毕赤酵母. *中国科学 C 辑 (Science in China Series C Life Sciences)*, 1998, 28(3):237-243.
- [28] 陈惠, 赵海霞, 王红宁, 等. 植酸酶基因中稀有密码子的改造提高其在毕赤酵母中的表达量. *中国生物化学与分子生物学报 (Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)*, 2005, 21(2):171-175.
- [29] Chang SW, Shieh CJ, Lee GC, et al. Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa* LIP1 gene and optimum production of recombinant LIP1 expressed in *Pichia pastoris*. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 2005, 67(2):215-224.
- [30] 蔡少丽, 林俊涵, 王彩梅, 等. K55R 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2007, 23(4):677-680.

Cloning, codon optimization and expression of mature lipase gene *Penicillium expansum*

Zhengping Zhang, Jiangke Yang, Li Xu*, Yun Liu, Yunjun Yan*

(Key Laboratory of Molecular Bio-physics, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: [**Objective**] To clone *Penicillium expansum* CICC 40356 lipase (PEL) gene cDNA and to over-express active lipase in *Pichia pastoris* GS115. [**Methods**] Primers were designed according to the nucleotide sequence of reported lipase gene from *Penicillium*. Ten rare codons of PEL and nine of the α -signal peptide were optimized by PCR. The native and codon-optimized PEL genes were respectively cloned into pPIC9K, pPIC9KM, and pPIC3.5K vectors. The properties of recombinant lipase were also determined. [**Results**] Nucleotide sequence analysis revealed that the PEL cDNA contained an 858 bp open reading frame. The deduced amino acid sequence corresponds to 286 amino acid residues, including a potential signal peptide sequence of 20 amino acid residues. The hydrolysis activity of PEL was enhanced with codon-optimization. Its optimal temperature and pH were 35°C and 9.5. It favored medium chain esters (C_8 - C_{12}) and showed the maximal activity toward C_8 acyl-chains. It could be stimulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} , but strongly inhibited by EDTA and slightly repressed by Fe^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} . [**Conclusion**] The activity of PEL was improved 2.3-2.5 folds compared to that of the wild type, suggesting that the codon optimization is an efficient measure to produce the active PEL in *P. pastoris* system.

Keywords: *Penicillium expansum* lipase; gene cloning; codon optimization; expression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA020203, 2007AA05Z417, 2009AA03Z232) and the Wuhan Projects of Science and Technology (200720422138)

* Corresponding authors. Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: xuli1881@yahoo.cn, yanyunjun@tom.com

Received: 24 June 2009 / Revised: 14 September 2009