

洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶的基因改造及其在毕赤酵母中组成型和诱导型的表达

贾彬, 刘文山, 杨江科, 叶才伟, 徐莉, 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】克隆洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 脂肪酶基因, 实现其在毕赤酵母中快速、安全和稳定性的大量表达。【方法】首先设计引物扩增 *B. cepacia* 脂肪酶基因, 然后应用生物信息学方法分析 *B. cepacia* 和毕赤酵母整体密码子使用情况、脂肪酶基因信号肽及密码子偏好性。在此基础上, 运用 overlap PCR 对脂肪酶基因中低使用频率密码子进行改造并同时降低基因的 G + C 含量, 获得优化的脂肪酶基因。再分别把原始和优化的脂肪酶基因导入载体 pGAPZ α 和 pPIC9K 中, 获得组成型表达载体 pGAPlipW、pGAPlipO 和诱导型表达载体 pPIClipW、pPIClipO。分别将所得 4 种载体转入 GS115 中, 得到一系列工程菌。经发酵和 NTA 树脂纯化后, 对脂肪酶的酶学性质进行了初步研究。【结果】4 种工程菌的脂肪酶活力分别为 pPIClipW 37.8 U/mL, pPIClipO 129.5 U/mL, pGAPlipW 40.2 U/mL 和 pGAPlipO 184.3 U/mL。改造后脂肪酶活力比原始脂肪酶提高了 4.6 倍。酶学性质研究表明, 脂肪酶在 60°C 时活力最高, 在 40°C - 65°C 范围内非常稳定; 脂肪酶最适 pH 值为 9.0, 在 pH 6.0 - pH10.0 范围均表现很好的稳定性。【结论】通过 overlap PCR 改造后的脂肪酶显著提高了其在毕赤酵母中的表达效率, 且 GAP 启动子比 AOX1 启动子更适合于 *B. cepacia* 脂肪酶的表达。大量表达的重组脂肪酶的性质与野生脂肪酶的性质相同, 符合生产要求。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌; 脂肪酶; overlap PCR; GAP 启动子; AOX1 启动子

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1194-08

脂肪酶 (Lipase, EC3. 1. 1. 3) 因其能催化酯类进行多种反应而在食品加工、油脂加工和精细化工等领域有诸多应用^[1], 其中利用其催化酯交换反应而运用于生产生物柴油则最受关注, 已成为解决目前石化能源危机最有潜力的方法之一^[2]。在众多来源的脂肪酶中, 洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶 (*Burkholderia cepacia* Lipase) 因其反应活性强、热稳定性高、醇耐受性强和油源选择性广等优点成为生产生物柴油的理想脂肪酶, 市场前景广阔。本实验室筛选的 *B. cepacia* G63 脂肪酶在这些方面的性能

尤为突出, 非常适合生物柴油生产, 具有重要经济价值^[3], 采用该脂肪酶已成功催化乌桕油等油脂生产生物柴油^[4]。但原始菌株产酶不稳定、发酵工艺复杂, 更重要的是 *B. cepacia* 作为条件致病菌对环境和人类都有潜在危害, 极大限制了它的大规模化生产。因此, 如何快速、安全和稳定地获得大量脂肪酶成为本研究的重点。

毕赤酵母是目前广泛使用的蛋白质表达系统之一。它具有生长速度快, 启动子强, 分泌蛋白易纯化和能进行高密度发酵等优点^[5], 已有多种脂肪酶在

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703, 2009AA03Z232); 教育部新世纪人才基金 (NCET 07 0336); 湖北省自然科学基金 (2008CDB359, 2009CDA046)

* 通信作者。Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; Email: yanyunjun@tom.com

作者简介: 贾彬 (1981 -), 男, 河南人, 博士研究生, 从事微生物脂肪酶分子生物学研究。E-mail: jiasanlin@gmail.com

收稿日期: 2010-02-09; **修回日期:** 2010-04-07

毕赤酵母中成功实现了活性表达^[6-7]。研究表明,脂肪酶在毕赤酵母中表达主要受目的启动子强弱、基因 G + C 含量和密码子偏好性等因素的影响^[8]。醇氧化酶 1 启动子(AOX1)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)启动子分别是毕赤酵母中最常见的诱导型和组成型启动子。AOX1 启动子以甲醇为诱导物,诱导后能获得较高量的重组蛋白,而 GAP 启动子发酵条件简单,发酵周期短^[9],但哪一种更适合脂肪酶的表达目前尚无定论。此外,*B. cepacia* 脂肪酶基因 G + C 含量高且含多个非毕赤酵母常用密码子。因此,目前还未见有关于 *B. cepacia* 脂肪酶在毕赤酵母中表达的报道。

本文首先采用生物信息学方法分析了 *B. cepacia*

脂肪酶基因的组成及其密码子与毕赤酵母密码子使用频率的差异,并在此基础上挑选 9 个在毕赤酵母中低使用频率的氨基酸进行密码子改造。然后分别使用 AOX1 和 GAP 启动子对改造后的脂肪酶基因进行表达,实现了脂肪酶基因在毕赤酵母中的大量表达,并对重组脂肪酶的酶学性质进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所使用的菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所使用的菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the study

Strain/plasmid	Description	Origin
<i>Burkholderia cepacia</i>	wild type strain	Screening from soil ^[3]
<i>Escherichia coli</i> DH5 α		Laboratory store
GS115	Host strain for lipase expression	Purchase from Invitrogen
pPIC9K	AOX1 promoter, α signal sequence and Amp/Kan resistance	Purchase from Invitrogen
pGAPZ α	GAP promoter, α signal sequence, His - tag, zeocin resistance	Purchase from Invitrogen

1.1.2 主要试剂和仪器: 实验中所用的限制性内切酶和 pMD18-T simple vector 购自 TaKaRa 公司;质粒提取和胶回收试剂盒购自 Omega 公司;Pfu 高保真聚合酶, 普遍 Taq 聚合酶和低分子量蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司;Zeocin 抗生素购自 Invitrogen 公司;细菌总 DNA 提取试剂盒购自天根公司;NTA 树脂购自博彩公司;胰蛋白胨、酵母抽提物购自 Oxoid 公司,其他试剂均为国产分析纯;实验中所用的引物均由上海生物工程公司合成。离心机为德国 Eppendorf 5415D 型高速离心机,PCR 仪为德国 Eppendorf 公司 53333 型,电穿孔仪为 biao-rad 公司 gene pluser xcell electroporation system。

1.1.3 培养基和菌株生长条件: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶 (*Burkholderia cepacia* Lipase) 都生长于 LB 培养基,培养温度分别为 37 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C,如有需要加入适当抗生素。YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基均按照毕赤酵母表达手册配制。Amp 和 Zeocin 的使用浓度均为 100 mg/mL。

1.2 脂肪酶基因的克隆

使用细菌基因组 DNA 提取纯化试剂盒制备 *B. cepacia* 基因组 DNA,再以基因组 DNA 为模板, lipA5 (5' \rightarrow 3'): AGCCAAATCGATGCGTTCAG 和 lipA3 (5' \rightarrow 3'): TTACACGCCGCGAGCT 做引物扩增脂

肪酶基因的编码序列。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min,56 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。由于 PCR 使用 Pfu 聚合酶进行,扩增结束后需用普通 Taq 聚合酶加 A,加 A 的方法为:取 45 μ L PCR 产物,加入 4 μ L dATP 和 1 μ L Taq 酶 (2.5 U/mL),72 $^{\circ}$ C 温浴 30 min。加 A 后的体系经纯化后连入 pMD18-T simple vector,转化 DH5 α ,获得 pMD-Lip。经筛选后挑阳性克隆子送公司进行序列测定。

1.3 脂肪酶基因的生物信息学分析

1.3.1 信号肽预测: 用 SignalP3.0 软件在线分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 脂肪酶蛋白质序列。预测参数选择为:革兰氏阴性菌,神经网络和隐马可夫模型同时预测,标准输出。

1.3.2 密码子统计及偏好性分析: 用 GCUA2.0 软件在线分析 (<http://gcu.a.schoedl.de/>) 洋葱伯克霍尔德菌和毕赤酵母密码子使用情况以及脂肪酶基因的密码子偏好性。使用 each codon vs. usage table 模式统计 2 种菌密码子使用频率差异;使用 each triplet position vs. usage table 分析脂肪酶基因密码子偏好性。均选择 pdf 格式输出结果。

1.4 脂肪酶基因的改造

根据生物信息学分析的结果,采用重叠 PCR (Overlap PCR) 在不改变氨基酸序列的前提下,对在

毕赤酵母中低使用频率的密码子进行改造。使用表 2 中的引物,按照图 1 的流程进行脂肪酶基因改造。PCR 扩增使用 Pfu 高保真聚合酶,首先以质粒 pMD-Lip 为模板,分别使用引物 F11/R64、F64/R98、F118/R216 和 F283/R299/311 扩增,获得片段 1、2、3、4。然后以片段 1 和 2 为模板,F1/R98 为引物扩增获得片段 5,片段 4 为模板,F270/R315 为引物扩

增获得片段 6。接着用片段 5 做模板,F1/R118 做引物扩增获得片段 7。最后再以片段 7、3 和 6 做模板,F11/R315 为引物扩增,获得整个优化的脂肪酶基因。通过 taq 酶加 A 后将优化后的脂肪酶基因克隆入 T 载体,经筛选后获得阳性转化子 pMD-LipO,送公司测序。

表 2 用于脂肪酶基因改造的引物

Table 2 Primers used in the lipase gene modification

Primer	Sequence(5'→3')	Length
F11	ACCGCGCCCGCCGACGACTATGCGACGACG AG ATATCCG	39
R64	agcagctgttc CCTCT CCCGTTC	24
F64	cgaacagctgctGGCTTACGTGAAG	25
R98	gagatcgggcgc ACG GCCGACATAT TCT CGACGT	36
R118	TCT ATGCGCGGTGCCGATCGTCGTCACCGACGCGACgagatcgggcgcg	49
R118	tcggcacgcgc ataga GGCTCCGAGTTC	29
R261	agcccgcttcTCGCCCCGAAC TCT GTTGATCATC	36
F270	gaacgacgggctCGTGTGCGAAATGCAGCGCGCTGTacgggtgctgtg	46
F283	acggctgtg AGC ACG AG ATAACAAGTG	28
R299/311	cgttctgacACCGCGACCGGGTCTTCCGCATACGCGC TCT CACGCC	48
R315	TTACACGCCCGCGAGCTTCAG TCT GTTCGCATGcgttctgac	43

Bases in the bold stand for optimized codons and lowercase letters stand for overlapped sequence.

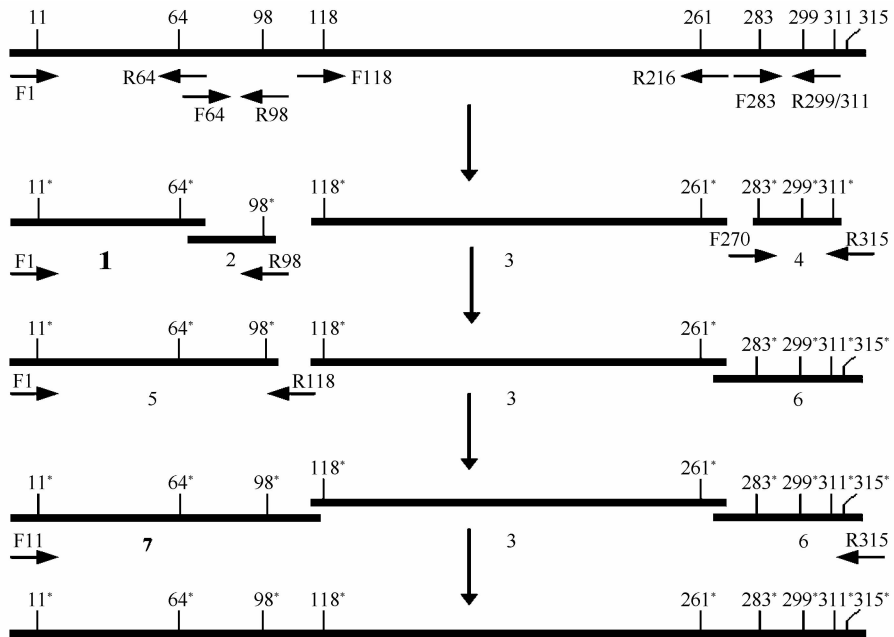


图 1 脂肪酶基因改造过程

Fig. 1 The procedure of lipase gene modification (* in the picture stands for optimized codon).

1.5 毕赤酵母表达载体的构建

1.5.1 诱导型表达载体:使用 pPIC9K 做骨架进行诱导型表达载体构建。以质粒 pMD-Lip 做模板,9KF (5' → 3'): GAATTCATCATCACCATCACC ATATCGAAGGTAGAACC**CGCCCGCCG**ACGACTAT 和 9kR (5' → 3'): CAGCCTAGGTTACACGCC

GCGAGCTTC 做引物(下划线部分代表内切酶识别位点),扩增原始脂肪酶基因。扩增条件为:94℃ 4 min;94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环;72℃ 10 min。扩增产物用 Taq 酶加 A 后,连入 T 载体。然后用 EcoRI 和 A_{vr}II 从 T 载体上将含脂肪酶基因的片段切下,并最终克隆到 pPIC9K 载

体上相应的酶切位点之间,获得表达质粒 pPIClipW。质粒 pPIClipO 的构建流程基本与 pPIClipW 相同。首先以 pMD-lipO 为模板,9KF/9kR 为引物扩增优化过的脂肪酶基因,然后把基因连入 T 载体,再用 *EcoRI* 和 *AVRII* 酶切将脂肪酶基因克隆至 pPIC9K 上。

1.5.2 组成型表达载体:使用 pGAPZ α 做骨架进行组成型表达载体构建。以质粒 pMD-Lip 做模板, GAPF (5' \rightarrow 3') CTTGAATTCACCGCTCCTGCGG ACCACTAT 和 GAPR (5' \rightarrow 3'): TGCTCTAGACC AACTCCAGCCAGCTTCAGTCTG 做引物(下划线部分代表内切酶识别位点),扩增原始脂肪酶基因。扩增条件同上,扩增产物加 A 后连入 T 载体。然后从 T 载体上用 *EcoRI* 和 *XbaI* 把脂肪酶基因切下,再用 T4 DNA 连接酶把它和同样经 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切的 pGAPZ α 载体连接,经转化和筛选后获得表达质粒 pGAPlipW。质粒 pGAPlipO 的构建方法除了把 PCR 模板改为质粒 pMD-lipO 外,其它与 pGAPlipW 的构建完全相同。

1.6 酵母的转化及筛选

通过电转化方法分别把 pPIClipW、pPIClipO、pGAPlipW 和 pGAPlipO 4 种表达质粒导入毕赤酵母菌株 GSS115 中,电转化的具体方法参考文献^[10]。其中诱导型表达载体 pPIClipW 和 pPIClipO 均使用内切酶 *StuI* 进行线性化,电转化后涂布 MD 平板,28 $^{\circ}$ C 培养 3-4 d 后挑选转化子进行 PCR 验证,然后把阳性转化子挑于含罗丹明 B 的活性检测平板上,每隔 12 h 加 0.5 mL 甲醇,28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后观察水解圈;组成型表达载体 pGAPlipW 和 pGAPlipO 均使用内切酶 *AVrII* 进行线性化,电转化后涂布于含 zeocin 的 YPD 平板,28 $^{\circ}$ C 培养 4-5 d 后挑选转化子进行 PCR 验证。然后把阳性转化子挑于活性检测平板上 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后观察水解圈。

1.7 毕赤酵母表达菌的发酵及脂肪酶活力测定

挑选活性检测平板上水解圈大的菌落进行摇瓶发酵。诱导型表达菌株的发酵方法参考文献^[10],把表达菌株先接种于 BMGY 培养基中,28 $^{\circ}$ C 过夜培养,然后离心收集菌体并用 BMGY 培养基将菌体稀释至 OD_{600} 为 1 左右,继续在 28 $^{\circ}$ C 培养 72 h,其间每隔 12 h 补加甲醇,保证甲醇终浓度始终在 0.5% (V:V) 左右。组成型表达菌株的发酵方法为:先把表达菌株在含 YPD 的 PA 瓶中活化,接着把菌液重新接种于含新鲜 YPD 培养基的摇瓶中,并使摇瓶菌液 OD_{600} 在 1 左右,然后继续在 28 $^{\circ}$ C 培养 72 h。发酵结束后离心取发酵上清进行酶活力测定,细胞用

超声波破碎后同样离心取上清进行酶活力测定。

酶活测定采用 pNPP 光吸收法测定,参考文献^[11]。脂肪酶活力单位(U)定义为:温度为 45 $^{\circ}$ C, pH 为 8.5 时,每毫升酶液每分钟水解对硝基苯酚酯产生 1 微摩尔对硝基苯酚所用的酶量。

1.8 脂肪酶的纯化

采用镍柱亲和层析法纯化脂肪酶,按照 NTA 树脂说明书进行实验。具体方法为:先用 5 mL NTA 树脂填充层析柱,再用 50 mL NTA-0 (Tris-HCl (pH7.9) 20 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 甘油 10% (V:V)) 冲洗柱子。然后把含脂肪酶的溶液加入层析柱中,控制流速在 30 mL/h 左右,同时收集流出液。接着用 50 mL NTA-0 洗柱一次后,再用 NTA-100 (Tris-HCl (pH7.9) 20 mmol/L, NaCl 0.5 mol/L, 甘油 10% (V:V), 咪唑 100 mmol/L) 洗脱脂肪酶,流速控制在 30 mL/h 左右,收集洗脱液并测定洗脱液中蛋白质含量。

1.9 重组脂肪酶酶学性质研究

1.9.1 最适反应温度及热稳定性:取纯化脂肪酶分别在 40 $^{\circ}$ C - 80 $^{\circ}$ C 的范围内,每隔 10 $^{\circ}$ C 测定一次脂肪酶水解活力。每个温度 3 个平行,酶活取其均值。热稳定性测定时,把脂肪酶在不同温度下温浴 4 h 后再测定酶活力。

1.9.2 最适 pH 及稳定性:测定纯化后脂肪酶在 pH5.0 - 11.0 时的水解活力。其中 pH8.0 - 9.0 采用 Tris-HCl 缓冲液,pH4.0 - 8.0 使用柠檬酸钠缓冲液,pH9.0 - 11.0 使用甘氨酸-NaOH 缓冲液。每个 pH 3 个平行,酶活取其均值。pH 稳定性测定时,把脂肪酶不同 pH 下温浴 24 h 后再测定脂肪酶活力。

1.10 脂肪酶动力学参数测定

取 0.5 mL 纯化的脂肪酶,在 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 溶液中,45 $^{\circ}$ C 的反应条件下测定脂肪酶水解不同浓度 pNPP 时水解产生 pNP 的量。再利用双倒数作图法求出 *B. cepacia* 脂肪酶水解 pNPP 的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。

2 结果

2.1 脂肪酶的生物信息学分析

利用 *B. cepacia* 基因组 DNA 扩增脂肪酶编码区全长序列,经测序分析后表明,脂肪酶编码区全长为 1092 bp,编码 364 个氨基酸,与本实验登录号为 DQ075249 的脂肪酶序列同源性为 100%。

SingnalP3.0 预测结果表明脂肪酶有 99% 的几

率存在信号,信号肽最可能的切割位点在第 40 和 41 个氨基酸(AMA-AT)间。根据脂肪酶在毕赤酵母中的表达经验和后续优化实验的方便,直接选择不含信号肽的成熟脂肪酶基因开展后续载体构建和基因表达。GCUA2.0 软件对 *B. cepacia* 和毕赤酵母密码子使用情况的部分统计结果见图 2-A。图中白色代表 *B. cepacia*,而黑色代表毕赤酵母,结果表明两者之间的平均差异为 48.69%,某些密码子,特别

是 C、G 组成的密码子(GCG 和 CGC 等)使用情况相差很大。脂肪酶基因按照毕赤酵母密码子偏好性分析后的部分结果见图 2-B。其中密码子使用频率低于 15 的用白色表示,整个脂肪酶中共有 9 个低于 10 的密码子,它们分别为脂肪酶第 11、64、98、118、216、283、299、311 和 315 个氨基酸残基。因此,后续实验在不改变氨基酸残基的情况下对它们的密码子进行改造。

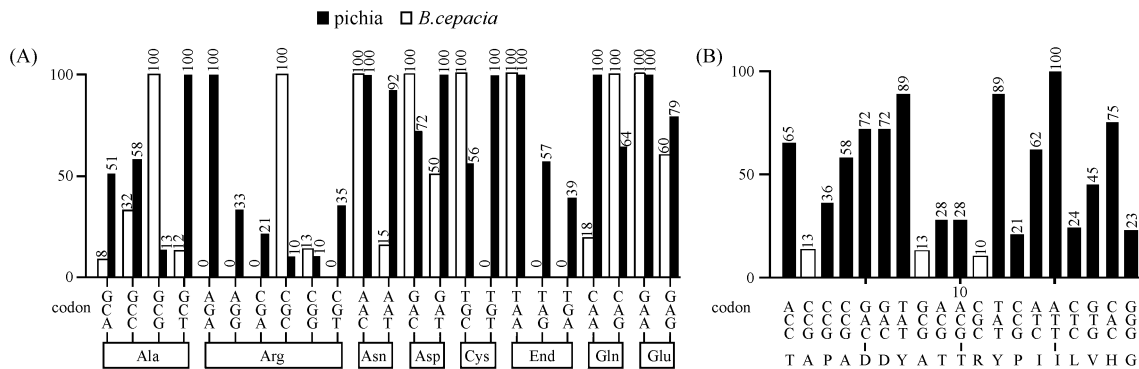


图 2 洋葱伯克霍尔德和毕赤酵母密码子使用频率比较

Fig. 2 The comparison of codon usage between *B. cepacia* and *Pichia*.

2.2 脂肪酶基因的改造

使用表 2 中引物按照图 1 的步骤进行脂肪酶基因优化。首轮 PCR 后获得大小分别为 206 bp、124 bp、469 bp 和 107 bp 的片段 1、2、3 和 4。第二轮 PCR 分别以 1、2 混合物和 4 为模板获得 330 bp 的片段 5 和 175 bp 的片段 6。以片段 5 为模板再次扩增后获得 354 bp 的片段 7。最后再通过 PCR 把片段 7、3 和 6 拼接在一起获得 969 bp 的完整脂肪酶基因。经琼脂糖电泳分析后,所有扩增片段大小与目的片段大小一致,拼接后的完整脂肪酶基因经测序后表明所有目标位点均已成功改造。

2.3 脂肪酶表达工程菌的构建

分别把原始脂肪酶和优化脂肪酶基因克隆入载体 pPIC9K 中,构建诱导型重组质粒 pPIClipW 和 pPIClipO。同样,分别把两种脂肪酶基因克隆入载体 pGAPZα 中,构建组成型重组质粒 pGAPlipW 和 pGAPlipO。4 种重组质粒分别转化 DH5α,挑选转化子,提取质粒并对其进行酶切验证。酶切后 4 种质粒小片段都在 1 kb 左右,与脂肪酶基因大小一致。说明重组质粒构建成功。测序结果也表明,4 种质粒的读码框均正确融合,符合基因表达的要求。

电转化后诱导型工程菌先利用组氨酸缺陷型进行筛选,然后再用脂肪酶活性检测平板筛选,最终从

110 个转化子中挑出水解圈最大的菌进行后续实验。组成型工程菌则先利用 Zeocin 抗性进行筛选,然后再用脂肪酶活性检测平板筛选,最终从 90 个转化子中挑出水解圈最大的菌进行后续实验。接着再分别以挑选的工程菌基因组 DNA 为模板,9KF/9KR 和 GAPF/GAPR 为引物,对脂肪酶基因进行 PCR 验证,结果都成功扩增出一条与预期大小一致的特异性 DNA 条带,表明工程菌构建正确,脂肪酶基因已成功整合到酵母基因组中。

2.4 脂肪酶的发酵及纯化

工程菌经 72 h 发酵后,离心取上清进行酶活力测定和 SDS-PAGE 分析。3 mL 发酵上清经 100% TCA 沉淀后跑蛋白胶,结果见图 3-A。发酵上清中脂肪酶的水解活力测定结果见表 3。从表中可以看出,原始脂肪酶在诱导型和组成型工程菌中表达量都非常低,而改造后脂肪酶在这两种工程菌中的表达量都得到大大提高,其中诱导型工程菌改造后脂肪酶较原始脂肪酶活力提高了 3.4 倍,组成型工程菌改造后脂肪酶较原始脂肪酶活力提高了 4.6 倍。此外,改造后脂肪酶的组成型表达酶活力明显高于诱导型表达酶活力,且组成型表达菌株发酵过程简单,说明 GAP 启动子具有优越性。由此,本优化策略成功地提高了 *B. cepacia* 脂肪酶在毕赤酵母中的表达量,实现了脂肪酶的高效表达。

表3 不同毕赤酵母工程菌的发酵酶活

Strains transformed with plasmid	Lipase activities of culture supernatant (U/mL)
pPIClipW	37.8 ± 2.3
pPIClipO	129.5 ± 5.2
pGAPlipW	40.2 ± 2.1
pGAPlipO	184.3 ± 9.6

组成型表达载体 pGAPZα 本身含有 His-tag, 可以通过镍柱进行亲和层析纯化。用 NTA 树脂纯化脂肪酶活力最高的 pGAPlipO 发酵上清和细胞裂解液上清。取 NTA-100 洗脱液进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 3-B。经镍柱纯化后, 发酵上清在 45–35 kDa 左右有一条清晰条带, 经糖苷内切酶 Endo H_f 酶切后条带位置基本不变且与脂肪酶实际大小 37.2 kDa 相一致。表明采用 His-tag 成功纯化了 *B. cepacia* 脂肪酶。经测定后纯化脂肪酶的蛋白质含量为 0.28 mg/mL, 比活力为 973.4 U/mg。

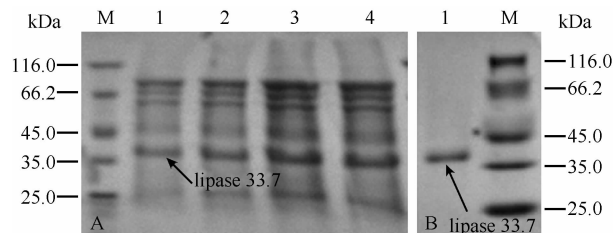


图3 脂肪酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of lipase. A: culture supernatant. 1: pPIClipW; 2: pGAPlipW; 3: pPIClipO; 4: pGAPlipO. B: NTA resin purified lipase.

2.5 脂肪酶酶学性质和动力学参数的研究

取经镍柱纯化的 pGAPlipO 发酵上清分别对其最适温度、最适 pH、温度稳定性和 pH 稳定性进行了研究。脂肪酶温度和热稳定性的测定结果如下: 脂肪酶在 60°C 时活力最高。在 40°C–65°C 范围内, 脂肪酶的热稳定性均非常好, 温浴 4 h 后脂肪酶保留 80% 以上活力。但超过 70°C 时酶失活速度加快, 80°C 温浴 4 h 后酶活力基本丧失; 脂肪酶最适 pH 和 pH 稳定的测定结果为: 脂肪酶最适 pH 值为 9.0, 且在 pH 6.0–10.0 的范围均表现出很好的稳定性。以上结果表明, 采用毕赤酵母表达的脂肪酶酶学性质与野生脂肪酶的性质相同, 获得的脂肪酶符合工业生产的要求。

分别测定脂肪酶在 pNPP 浓度 0.5 mmol/L 至 10 mmol/L 范围内的反应速率, 然后以初始底物浓度的倒数做横坐标, 对应的反应速率倒数做纵坐标画双倒数图 4。由图可知脂肪酶最大反应速率为

21.8 μmol/min·mg, K_m 值为 31.7 mmol/L。

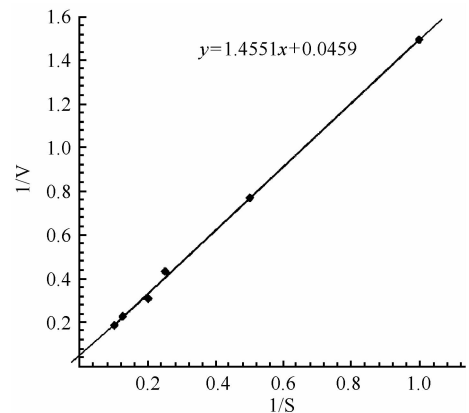


图4 洋葱假单胞菌脂肪酶水解 pNPP 的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of *B. cepacia* lipase.

3 讨论

洋葱伯克霍尔德菌又名洋葱假单胞菌, 整个假单胞菌属和伯克霍尔德属脂肪酶由于其催化反应种类多, 反应活性强等优点受到研究者的普遍关注^[12], 但该类微生物基因组 G + C 含量特别高, 且多数脂肪酶需要分子伴侣辅助折叠, 造成该类微生物的脂肪酶在毕赤酵母中表达量低, 目前只有少数假单胞菌属脂肪酶实现了在毕赤酵母中的活性表达^[13–14]。已有研究表明, 密码子优化策略是提高脂肪酶在毕赤酵母中表达量的有效策略之一, 王海燕等使用毕赤酵母密码子对荧光假单胞菌脂肪酶基因进行改造, 经酵母表达后脂肪酶活力提高了 2 倍^[15]。本文采用 overlap PCR 对 *B. cepacia* 脂肪酶基因进行改造, 一方面降低了整个基因的 G + C 含量, 另一方面替换了毕赤酵母中低使用频率的密码子。外源基因 G + C 含量对表达效果有明显影响, 例如脂肪酶分子伴侣基因就由于过高 G + C 含量而无法在 *E. coli* 中表达^[16], 同样, 脂肪酶基因过高的 G + C 含量也会影响 mRNA 的表达量。优化 G + C 含量后转录的 mRNA 量会相应提高, 从而导致脂肪酶表达量的提高; 低频率密码子被改造后也能在翻译水平上提高脂肪酶的表达量, 因而我们认为改造后脂肪酶活力的 4.6 倍提高是由于上述两个因素共同作用的结果。

本文首次成功实现了 *B. cepacia* 脂肪酶在毕赤酵母中的活性表达, 进一步证明了密码子优化策略的有效性。更重要的是, *B. cepacia* 作为人体和植物的条件致病菌, 对 CF (cystic fibrosis) 和 CGD

(chronic granulomatous disease) 等病人有非常高的致死率^[17], 使利用 *B. cepacia* 进行大规模发酵生产脂肪酶受到了极大的限制, 而本文首次实现了该脂肪酶在毕赤酵母的活性表达, 为大量、安全获得该脂肪酶奠定了基础。

此外, 本文还对比较了 AOX1 和 GAP 两种启动子对脂肪酶表达的影响。AOX1 启动子受甲醇的强烈诱导, 在甲醇的诱导下外源蛋白的表达量可达到或超过细胞可溶性蛋白总量的 30%。但它受葡萄糖和甘油等碳源的代谢阻遏, 因此发酵通常分成两个阶段进行, 延长了发酵工序, 增加污染的几率, 且发酵过程中过量的甲醇对脂肪酶和菌株本身都有一定的毒害作用, 同时还存在安全隐患。GAP 启动子为组成型表达, 不受碳源抑制, 因此不改变碳源就能连续表达外源基因, 发酵过程相对简单, 更加适合大规模发酵。但两种启动子效率的高低目前尚无定论, 虽然 Delroisse^[18], Waterham^[19] 等报道 GAP 的效率高于 AOX1, 但是 Sears^[20], Vassileva^[21] 等报道 GAP 的效率低于 AOX1, 而 Boer^[21] 等发现虽然 AOX1 启动子表达的蛋白量多, 但有部分蛋白质折叠错误。我们推测启动子的效率与表达蛋白的性质有关。AOX1 的转录效率强于 GAP, 当使用它表达折叠过程复杂的蛋白质时, 不少蛋白均以错误折叠的形式存在, 导致了 AOX1 效率下降。而 *B. cepacia* 脂肪酶就属于折叠过程复杂的蛋白质, 且本实验结果也表明 GAP 启动子的效率高于 AOX1 启动子, 在一定程度上证实了我们上述推论。

本研究中脂肪酶的表达量还有提升的空间, 因为 *B. cepacia* 脂肪酶的折叠需要分子伴侣的辅助, 研究已证实分子伴侣和脂肪酶在 *E. coli* 中共表达能显著提高脂肪酶的活力和表达量。但分子伴侣同样存在密码子偏好性和 G + C 含量高的问题, 而且其 N 端 G + C 含量超过 90%。为此, 本实验室已经开展分子伴侣全基因合成以及脂肪酶基因共表达等方面的研究工作。

参考文献

[1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and -Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235-251.

[2] Nelson L, Foglia T, Marmor W. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, 73(9): 1191-1195.

[3] Yang J, Guo D, Yan Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain

alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 45(3-4): 91-96.

- [4] 李琴, 刘云, 闫云君. PS 脂肪酶催化乌柏梓油制备生物柴油工艺优化. 华中科技大学学报 (*Journal of Huangzhong University of Science and Technology*), 2009, 37(11): 129-132.
- [5] 李洪钊, 李亮助, 孙强明, 江宏映. 巴斯德毕赤酵母表达系统优化策略. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43(2): 288-292.
- [6] 阎金勇, 杨江科, 徐莉, 闫云君. 白地霉 Y162 脂肪酶基因克隆及其在毕赤酵母中的高效表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(2): 184-190.
- [7] 张正平, 杨江科, 徐莉, 闫云君. 扩展青霉脂肪酶基因克隆、密码子优化及表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(2): 89-97.
- [8] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(1): 45-66.
- [9] Zhang AL, Zhang TY, Luo JX, Chen SC, Guan WJ, Fu CY, Peng SQ, Li HL. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34(2): 117-122.
- [10] 黄培. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Liu W, Zhao H, Jia B, Xu L, Yan Y. Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cwp2 as an anchor protein. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(2): 255-260.
- [12] Lundell K, Kanerva LT. Enantiomers of ring-substituted 2-amino-1-phenylethanol by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Tetrahedron Asymmetry*, 1995, 6(9): 2281-2286.
- [13] Jiang ZB, Zheng YT, Luo Y, Wang G, Wang H, Ma Y, Wei D. Cloning and expression of a novel lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Molecular Biotechnology*, 2005, 31(2): 95-101.
- [14] Yang JK, Zhang B, Yan YJ. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase Gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(2): 355-365.
- [15] 王海燕. 荧光假单胞菌脂肪酶基因的克隆、改造及其在毕赤酵母中的表达. 中国农业科学院博士学位论文, 2006.
- [16] Rosenau F, Tommassen J, Jaeger KE. Lipase-specific foldases. *ChemBiochem*, 2004, 5(2): 152-161.

- [17] Coenye T, Vandamme P, Govan JR, Lipuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39: 3427-3436.
- [18] Delroisse JM, Dannau M, Gilsoul JJ, El Mejdoub T, Destain J, Portetelle D, Thonart P, Haubruge E, Vandenberg M. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2005, 42(2): 286-294.
- [19] Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 1997, 186(1): 37-44.
- [20] Sears IB, O'Connor J, Rossanese OW, Glick BS. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1998, 14(8): 783-790.
- [21] Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Biotechnology*, 2001, 88(1): 21-35.
- [22] Boer H, Teeri TT, Koivula A. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnology and bioengineering*, 2000, 69(5): 486-494.

Burkholderia cepacia lipase gene modification and its constitutive and inducible expression in *Pichia pastoris*

Bin Jia, Wenshan Liu, Jiangke Yang, Caiwei Ye, Li Xu, Yunjun Yan*

(Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: [**Objective**] To achieve fast, safe and stable expression of *Burkholderia cepacia* lipase in *Pichia pastoris*. [**Methods**] We first amplified *B. cepacia* lipase gene, and then analyzed the codon usage of *B. cepacia* and *Pichia*, lipase gene signal peptide with bioinformatics methods. On this basis, we applied the overlap PCR to modify the lipase gene and finally got the optimized gene with *Pichia* codon usage and lower G + C content. Subsequently, we cloned the optimized and wild lipase gene into vector pGAPZ α and pPIC9K, respectively. As a result, constitutive expression vector pGAPlipW, pGAPlipO and inducible expression vector pPIClipW, pPIClipO were obtained. Finally, we electroporated these expression vectors into GS115, and therefore, got a series of engineering strains. After fermentation and NTA resin purification, the enzymatic properties of lipase were studied. [**Results**] The lipase activities of pPIClipW, pPIClipO, pGAPlipW and pGAPlipO were 37.8 U/mL, 129.5 U/mL, 40.2 U/mL, and 184.3 U/mL, respectively. The optimized lipase activity increased 4.6-fold. Enzymatic properties study showed that the optimal temperature and pH was 60°C and 9.0, respectively. The lipase was rather stable at 40°C – 65°C and pH 6.0-pH10.0. [**Conclusion**] After overlap PCR modification, the lipase expression efficiency in *Pichia* was significantly increased, which indicates that the overlap PCR modification is a potential strategy for lipase overexpression. The GAP promoter is more appropriate than the AOX1 promoter for the *B. cepacia* lipase expression. Additionally, the recombinant lipase whose enzymatic properties were identical to the wild type satisfies the needs of industrial application.

Keywords: *Burkholderia cepacia*; lipase; overlap PCR; GAP promoter; AOX1 promoter

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703, 2009AA03Z232), the Program for New Century Excellent Talent in University (NCET 07 0336) and the Hubei Province Natural Science Foundation (2008CDB359, 2009CDA046)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

Received: 9 February 2010/ Revised: 7 April 2010