

卡门柏青霉-PG3 脂肪酶基因的克隆、表达及活性分析

李琦¹ 王雅琴^{1*} 谭天伟^{1,2} 邱俊康¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 1000029; 2. 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要:以卡门柏青霉-PG3 为出发菌株,提取其总 RNA,应用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增出 860bp 左右的片段,核苷酸序列分析表明其与甘油单-双酰酯脂肪酶(MDGL)基因(mdIA)一致。将此基因克隆到原核表达载体 pET-28a 中,转化大肠杆菌 BL21(DE3),经诱导后,重组的脂肪酶(rMDGL)在宿主菌中得到表达,表达量可达菌体总蛋白量的 45.2%。重组蛋白包涵体溶解、复性后用 Ni^{2+} 组氨酸结合树脂螯合层析柱纯化,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示为单一区带,其相对分子质量为 41 000。以橄榄油为底物时没有检测到酶活性,以单硬脂酸甘油酯为底物时酶活性达到 225 nmol/s。该基因在原核系统中表达仍具有酶活性,说明 MDGL 的糖基化对其生物学活性并不是必不可少的。

关键词:卡门柏青霉-PG3; 甘油单-双酰酯脂肪酶; 基因表达

中图分类号: TQ033; Q786

引言

脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3),其天然底物为长链脂肪酸酯(如各种油脂等),在异相系统(油、水界面)或有机相中起作用。Yamaguchi 等利用卡门柏青霉 U-150(*Penicillium camembetlii* U-150)得到了甘油单-双酰酯脂肪酶(MDGL),MDGL 具有底物选择性,仅作用于甘油单酰酯和甘油二酰酯,对甘油三酰酯不起催化作用^[1],可以利用酯化或转酯化反应来生产具有较高工业价值的甘油单酰酯(简称单甘酯),在合适的反应条件下,脂肪酸的转化率可达到 97.3%,产生的单甘酯占到体系的 74%(质量分数)^[2]。作者以徐家立等从 242 株青霉属菌株中筛选出的脂肪酶产生菌卡门柏青霉-PG3^[3]为出发菌株,参考 MDGL 成熟肽基因序列^[4]设计引物,克隆了 MDGL 基因 mdIA,并在大肠杆菌中进行表达,研究该基因在原核系统中表达的催化活性,为进一步生产和利用此脂肪酶创造条件。国内尚未见有关这种具有底物特异性的脂肪酶在分子生物学水平的研究报道。

收稿日期: 2005-03-16

基金项目: 北京市生物加工过程重点实验室开放项目(SYS100100421)

第一作者: 男,1978 年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: yaqinw@mail.buct.edu.cn

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 克隆宿主菌大肠杆菌 DH5,表达宿主菌大肠杆菌 BL21(DE3),均为本实验室保存;卡门柏青霉-PG3 为脂肪酶基因的来源菌株,由中科院微生物所徐家立教授惠赠。pMD18-T 质粒,购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;大肠杆菌表达质粒 pET-28a,购自 Novagen 公司。

1.1.2 化学试剂及试剂盒 各种限制性内切酶购自 Promega 公司;Ex Taq DNA 聚合酶、DNA marker 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物工程有限公司;逆转录第一链 cDNA 合成试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,去离子甲酰胺购自上海生工;焦碳酸二乙酯(DEPC)、卡那霉素为 Amresco 公司产品;异丙基-D-半乳糖苷(IPTG)为 Merck 公司产品;5-溴-4-氢-3-吲哚-D-半乳糖苷(X-gal)为 BBI 公司产品;其它主要的生化试剂为进口产品或国产分析纯产品。

1.1.3 PCR 引物 参照编码 MDGL 基因 mdIA (Accession number: D90315) 序列,采用引物设计软件 Primer Premier 辅助设计。上游引物 Mdlp1: 5'-CGGGA TCCGA TGTTCGACCA GCGAACT-3', 含 BamH 酶切位点;下游引物 Mdlp2: 5'-CCGAAGCTTTTAAACCTCTTGAATGGCA-3', 含 Hind 酶切位点,用于扩增 MDGL 成熟肽完整的

cDNA。

1.1.4 培养基 卡门柏青霉培养基质量浓度(g/L): 蛋白胨 20, 蔗糖 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, K_2HPO_4 1, 橄榄油 5。

Luria-Bertani(LB)培养基质量浓度(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10。

1.2 实验过程与结果

1.2.1 卡门柏青霉总 RNA 提取 将培养 72 h 的卡门柏青霉-PG3 培养液抽滤, 收集菌丝体, 用无菌水洗涤菌体数次, 在液氮中将菌体碾磨成粉末, 将 100 mg 粉末转移到 1.5 mL 离心管中, 加 0.5 mL Trizol, 剩余操作参见 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒说明书。

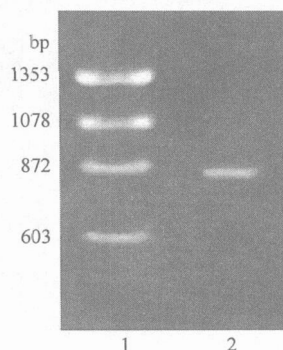
提取的总 RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 可见明显的 28S, 18S 和 5S 条带, 而且 28S 条带的亮度大约是 18S 条带的 2 倍, 说明所提取的总 RNA 无明显降解。对 RNA 样品进行紫外吸收检测, 吸光度 $A_{260}/A_{280} = 0.355/0.180 = 1.972$, 说明 RNA 纯度较高。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 参照逆转录第一链 cDNA 合成试剂盒说明, 2 μg 总 RNA 和 0.5 μg Oligo(dT)18 溶于 12 μL 无 RNA 酶超纯水中, 70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min 后置于冰浴, 加入 5 \times 反应缓冲液 4 μL , RNA 酶抑制剂 1 μL , dNTP 混合物 (10 mmol/L) 2 μL , 短暂离心后 42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min, 加入 1 μL 逆转录酶, 42 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 60 min, 然后 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min 结束反应。

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增 以合成的第一链 cDNA 为模板, Mdlp1 和 Mdlp2 为引物, 用 Ex Taq 酶在 MJ Research 公司的 PTC-150 PCR 系统中进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 cDNA 模板 2 μL ; 10 \times 反应缓冲液 5 μL ; 25 mmol/L MgCl_2 3 μL ; 2.5 mmol/L dNTP 4 μL ; 20 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 2 μL ; Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , 加超纯水至总体积为 50 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 12 min, 共 30 个循环; 第 30 个循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 20 μL PCR 产物进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果如图 1。从图 1 可以看出, 扩增出的片段大小约为 860 bp。

1.2.4 PCR 产物的克隆与核苷酸序列测定、分析 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD18-T 载体连接构建 pMD-mdlA 质粒, 转化 DH5 感受态细胞, 涂布于含

IPTG 和 X-Gal 的氨苄青霉素 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 挑选白斑经质粒酶切鉴定正确后, 委托北京三博远志公司测定核苷酸序列。



1 - DNA marker; 2 - PCR 产物

图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

序列测定结果显示目的片段全长 857 bp, 在 GeneBank 中进行 Blast 分析, 与已知序列比对, 确定除去酶切位点后的片段为 mdlA 基因。

1.2.5 重组质粒在大肠杆菌中的表达 将 pMD-mdlA 质粒用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 电泳检测后回收目的片段, 与经过相同内切酶双酶切的 pET-28a 质粒连接, 构建重组表达质粒 pET-mdlA (图 2)。

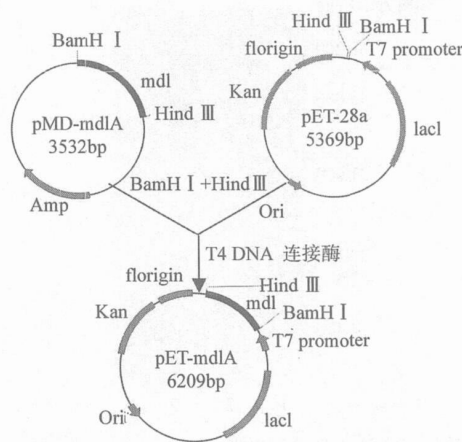
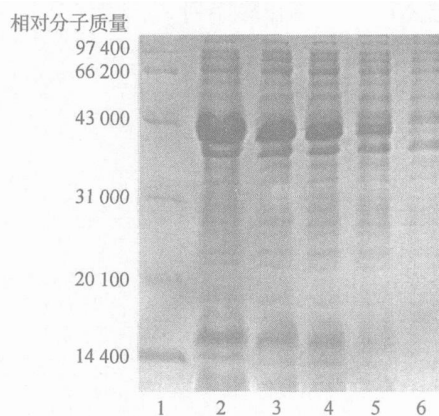


图 2 重组质粒 pET-mdlA 的构建

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pET-mdlA 将 pET-mdlA 转化入大肠杆菌 BL-21 (DE3) 中, 转化菌在含有卡那霉素的 LB 培养液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 以 1% 接种量转接于 10 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至吸光度 $A_{600} = 0.8$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 30 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养 3 h。

诱导表达前后每隔 30 min 取样, 经 SDS-PAGE

电泳(分离胶质量分数 12 %)对表达产物进行分析(图 3)表明,IPTG 诱导 30,60,120,180 min 后,重组

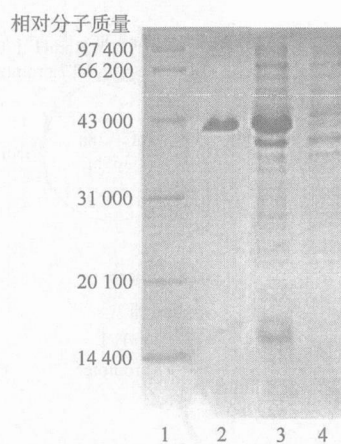


1 - 低相对分子质量蛋白标准;2~5 - IPTG 分别诱导 180,120,60,30 min 时大肠杆菌表达的蛋白质;6 - 大肠杆菌不经诱导所表达的蛋白质

图 3 重组菌经诱导后表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of expressed products after induction by SDS-PAGE

酶蛋白 rMDGL 均有表达,对电泳结果扫描显示,在 180 min 时表达量最大,达到细菌总蛋白的 45.2 %。表达的目的蛋白主要以包涵体的形式存在,如图 4 所示,菌体破碎离心后,目的蛋白基本上全部沉淀。



1 - 低相对分子质量蛋白标准;2 - 复性纯化后的重组蛋白质 rMDGL;3 - 未经纯化的表达蛋白质;4 - 大肠杆菌诱导表达后经超声波破碎离心的上清液

图 4 目的蛋白纯化前后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of purified rMDGL by SDS-PAGE

rMDGL 的相对分子质量为 41 000,其中包含了利用该载体表达在重组蛋白 N 端附加的 34 个氨基酸的相对分子质量,附加的氨基酸中含有 6 个组氨酸的标记蛋白(Histidine-tagged)。因为原核表达系统表达的蛋白不经过糖基化等翻译后加工过程,所以测

得的相对分子质量与 MDGL 去糖基化后相对分子质量为 37 000^[5]是相符的。

1.2.6 重组蛋白质的复性与纯化 将转化菌扩大培养到 200 mL LB 培养基中,诱导表达一定时间后,离心收集菌体后用磷酸缓冲液(PBS)悬浮,加溶菌酶至质量浓度为 1 mg/mL,搅拌 30 min 后在冰浴中超声破碎,离心收集包涵体(4 12 000 g,20 min),将沉淀在含 2 mol/L 尿素的缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0;1 mmol/L EDTA)中洗涤,然后溶解在 2 mL 变性液(8 mol/L 尿素;50 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0;1 mmol/L EDTA;100 mmol/L NaCl;50 mmol/L β -巯基乙醇)中,4 放置过夜后稀释 20 倍,加入还原型谷胱甘肽(2 mmol/L)和氧化型谷胱甘肽((0.5 mmol/L)于 4 复性 24 h。最后用镍离子亲和层析纯化带有组氨酸标记的重组蛋白 rMDGL。

1.2.7 酶活性的测定 分别以单硬脂酸甘油酯和橄榄油为底物,用 NaOH 滴定法对纯化后的重组蛋白 rMDGL 测定酶活性^[1]。以单硬脂酸甘油酯为底物酶活性最高可达到 225 nmol/s;以橄榄油为底物没有检测到活性,因为橄榄油的主要成分是甘油三油酸酯,这与文献报道的 MDGL 对甘油三酯不起催化作用^[1]的性质相符。

2 分析讨论

MDGL 在 Asn-Ala-Thr 处有一个糖基化位点。Yamaguchi 等将 mdIA 基因转化入 *Aspergillus oryzae* 中表达,得到部分糖基化的重组蛋白(相对分子质量为 38 000),酶活与天然蛋白质相仿^[5]。与真核表达系统相比,原核生物中表达的蛋白质没有经过糖基化修饰,而糖基化与否时常影响到蛋白质的生物活性。本项研究中在大肠杆菌中表达的重组蛋白具有对单甘酯的水解活性,MDGL 糖基化与否及程度大小可能并不影响其主要的生物活性。脂肪酶是否糖基化主要取决于其一级结构中是否存在糖基化识别序列(Asn-X-Ser/Thr)。在已发现的真菌脂肪酶中,大多数是糖蛋白,但也有一些不含糖基的脂肪酶,如 *Penicillium cyclopium* 的脂肪酶^[6]。有的脂肪酶还可能含有多个糖基化位点,如 *Geotrichum candidum* 的脂肪酶有 2 个糖基化位点^[7],*Candida cylindracea* 产生的一种脂肪酶则含有 3 个糖基化位点^[8],至于这些脂肪酶的糖基化程度对其活性的影响,还有待研究。

原核表达系统具有产量高、易于操作、成本廉价等优点,往往是人们首选的表达体系。本项研究表明用原核系统来表达 rMDGL 是可行的,糖基化对于 MDGL 的生物活性可能并不是必不可少的。根据 MDGL 不能催化甘油三酰酯反应的特点,可以利用水解反应的逆反应⁴/酯化或转酯化反应来生产单甘酯,因此这是一种非常有工业潜力的脂肪酶。

3 结论

(1) 用原核系统表达 mdIA 基因生产 rMDGL 是可行的,糖基化对于 MDGL 的生物活性并不是必不可少的。

(2) 利用 pET-28a 表达 mdIA 基因时附加了 34 个包含有组氨酸标记蛋白的氨基酸,重组脂肪酶 rMDGL 在大肠杆菌中表达主要以包涵体的形式存在,表达量可达菌体总蛋白量的 45.2%,纯化后 SDS-PAGE 分析其相对分子质量为 41 000。

(3) 对重组脂肪酶 rMDGL 测定酶活性,以单硬脂酸甘油酯为底物酶活性最高可达到 225 nmol/s; 以橄榄油为底物没有检测到酶活性。

参 考 文 献

- [1] Yamaguchi S, Mase T. Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *penicillium camembertii* U-150[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 34: 720 - 725.
- [2] Yamaguchi S, Mase T. High-yield synthesis of mono-glyceride by mono- and diacylglycerol lipase from *penicillium camembertii* U-150[J]. *J Fermen Bioeng*, 1991, 72 (3): 162 - 167.
- [3] 徐家立, 张军, 齐祖同. 卡门柏青霉-PG3 脂肪酶的研究[J]. *真菌学报*, 1995, 14(2): 136 - 142.
- [4] Yamaguchi S, Mase T. Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *penicillium camembertii* U-150[J]. *Gene*, 1991, 103: 61 - 67.
- [5] Yamaguchi S, Takeuchi K, Mase T. Efficient expression of mono- and diacylglycerol lipase gene from *penicillium camembertii* U-150 in *aspergillus oryzae* under the control of its own promoter[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61(5): 800 - 805.
- [6] Minchen Wu, Zhikang Qian, Peihong Jiang. Cloning of an alkaline lipase gene from *penicillium cyclopium* and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Lipids*, 2003, 38(3): 191 - 199.
- [7] Phillips A, Pretorius G. Molecular characterization of a *galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/ lipase family[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1252(2): 305 - 311.
- [8] Longhi S, Fusetti F, Grandori R, *et al.* Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1131(2): 227 - 232.

Expression of gene encoding lipase from *Penicillium camembertii*-PG3 in *E. coli* and its specific activity

LI Qi¹ WANG Ya-qin¹ TAN Tian-wei^{1,2} QIU Jun-kang¹

(1. College of Life Science and Technology; 2. Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: 860bp cDNA fragment was amplified by RT-PCR method using total RNA extracted from *Penicillium camembertii*-PG3. Analysis of nucleotide sequence of the fragment suggested that it was the same as the gene (mdIA) encoding mono- and diacylglycerol lipase (MDGL). The target gene was then inserted into the expression vector pET-28a and expressed in *E. coli* BL21 with IPTG induction. The recombinant protein (rMDGL) was highly expressed as an inclusion body and accumulated up to 45.2% of bacterial total protein. SDS-PAGE analysis showed that the relative molecular mass of rMDGL was about 41 000. No activity of the purified rMDGL was detected towards olive oil and 225 nmol/s was reached when using monostearoylglycerol as substrate. Analysis of biology activity of rMDGL suggested that glycosylation might be not essential for MDGL.

Key words: *Penicillium camembertii*-PG3; mono- and diacylglycerol lipase (MDGL); gene expression