

生物育种与工艺优化

耐热羧肽酶 *Taq* 基因在毕赤酵母中的表达

余先红^{1,2,3}, 汪晓娟^{1,2,3}, 钟星⁴, 唐微^{1,2,3}, 翟超^{1,3}, 陈晚苹^{1,3}, 马立新^{1,2,3}

- 1 湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062
- 2 湖北省工业生物技术重点实验室, 湖北 武汉 430062
- 3 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430062
- 4 湖北大学知行学院生物工程系, 湖北 武汉 430011

余先红, 汪晓娟, 钟星, 等. 耐热羧肽酶 *Taq* 基因在毕赤酵母中的表达. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1792-1796.
Yu XH, Wang XJ, Zhong X, et al. Expression of the thermostable carboxypeptidase *Taq* gene in *Pichia pastoris* GS115. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1792-1796.

摘要: 为了获取表达羧肽酶 *Taq* 毕赤酵母工程菌, 通过密码子优化, 依据毕赤酵母密码子偏爱性, 在体外合成了栖热水生菌的耐热羧肽酶 *Taq* 基因。将该基因克隆到毕赤酵母表达载体 pHBM905A 上并引入 6×His 标签, 构建了重组质粒 pHBM905A-*Cpase Taq*。将该重组质粒转化毕赤酵母 GS115, 经 1% 甲醇诱导表达 72 h, 酶产量达 0.1 mg/mL。对纯化的重组酶进行酶活性分析表明在 75 °C, pH 为 7.5 时, 该酶比酶活性为 80 U/mg。本研究首次证明了羧肽酶 *Taq* 能在毕赤酵母中有效分泌表达, 可以被大量制备, 进而为多肽水解为氨基酸奠定工业基础。

关键词: 羧肽酶 *Taq*, 密码子优化, 毕赤酵母, 纯化

Expression of the thermostable carboxypeptidase *Taq* gene in *Pichia pastoris* GS115

Xianhong Yu^{1,2,3}, Xiaojuan Wang^{1,2,3}, Xing Zhong⁴, Wei Tang^{1,2,3}, Chao Zhai^{1,3},
Wanping Chen^{1,3}, and Lixin Ma^{1,2,3}

- 1 Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China
- 2 Hubei Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Wuhan 430062, Hubei, China
- 3 Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Wuhan 430062, Hubei, China
- 4 Department of Bioengineering, College of Zhixing, Hubei University, Wuhan 430011, Hubei, China

Abstract: To express recombinant carboxypeptidase from *Thermus aquaticus* (*Cpase Taq*) in *Pichia pastoris*, the open reading frame coding thermostable *Cpase Taq* was optimized based on the preference of *P. pastoris* codon usage and

Received: February 27, 2014; **Accepted:** May 26, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB910801), Nature Science Fund for Creative Research Groups of Hubei Province of China (No. 2012FFA034), Foundation for High and New Technology Industrial Innovative Research Groups of the Wuhan Science and Technology Bureau's Department (No. 2014070504020239), Sunrising Project of the Science and Technology Bureau of Wuhan (No. 201271031392).

Corresponding author: Lixin Ma. Tel: +86-27-50865628; Fax: +86-27-88666349; E-mail: malixing@hubu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB910801), 湖北省自然科学基金创新群体项目 (No. 2012FFA034), 武汉市高新技术产业科技创新团队计划 (No. 2014070504020239), 武汉市科技局青年科技晨光计划 (No. 201271031392) 资助。

网络出版时间: 2014-07-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140120.html>

synthesized *in vitro*. The novel gene was cloned into *P. pastoris* expression vector pHBM905A and the sequence coding 6×His tag was fused with the ORF of *Cpase Taq* gene. The recombinant plasmid was named pHBM905A-*Cpase Taq* and transformed into *P. pastoris* GS115. Transformants were induced with 1% methanol for 72 h until the enzyme yield reached 0.1 mg/ml. The enzyme was purified and its enzymatic properties were analyzed. The results showed that the specific enzyme activity reached maximum at 75 °C and pH 7.5, which was about 80 U/mg. It was the first report about the secretory expression of *Cpase Taq* in *P. pastoris* GS115. Because of its large-scale preparation, this enzyme may be applied in industrial hydrolysis of peptides into amino acids in the future.

Keywords: carboxypeptidase *Taq*, codon optimization, *Pichia pastoris*, purification

羧肽酶是一种作用于小肽羧基端的外切肽酶,可以从小肽的羧基端逐个释放出游离氨基酸,广泛存在于哺乳动物^[1]、植物^[2]、真菌^[3]及细菌^[4]中。羧肽酶 *Taq* 来源于栖热水生菌 YT-1,是一种金属羧肽酶,理论分子量大小为 58.8 kDa,其结合 Zn²⁺的活性中心由 5 个氨基酸组成^[5]。该羧肽酶几乎能降解所有的氨基酸残基,但不能作用倒数第 2 位为脯氨酸的肽链。

国内羧肽酶相关的研究主要是集中在羧肽酶 A 和 B,探索胰岛素的体外加工^[6],对于具有广泛底物特异性的羧肽酶,国内少有文献报道。国外对羧肽酶的研究比较广泛:如从啤酒酵母中提取的羧肽酶 Y,但只是应用在小肽和蛋白质的羧基端序列分析^[7];动物源羧肽酶用于小肽脱苦实验^[8]等。

羧肽酶 *Taq* 从被发现至今,其相关文献极少。该酶仅有在大肠杆菌中表达的报道,经过繁琐的细胞破碎和蛋白纯化后,目的蛋白占总蛋白的 1.7%^[4]。然而为了实现该酶的分泌表达,使其便于提取,以增强实用性,为多肽水解为氨基酸奠定工业基础,选用毕赤酵母作为该酶的表达宿主。本研究全合成了羧肽酶 *Taq* 的基因,并将其克隆到宿主毕赤酵母 GS115 中,实现了其分泌表达。研究表明重组组氨酸标签融合羧肽酶与天然羧肽酶的酶活特性存在一定差别,其最适酶反应温度为 75 °C,最适 pH 为 7.5。

1 材料与方 法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 XL10-Gold 购于 Stratagen 公司。毕赤酵母 GS115 购于 Invitrogen 公司。毕赤酵母表

达载体 pHBM905A 由本实验室构建^[9]。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Not* I、*Cpo* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Sal* I, Solution I 连接套装及 DNA 分子量标准均购于 TaKaRa 公司;质粒抽提和琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Axygen 公司;蛋白分子量标准购于 Fermentas 公司;dNTPs Mix 购自捷瑞公司;*Pfu* 高保真聚合酶购自东洋纺公司;所用 PAGE 纯引物在上海桑尼生物工程公司合成;二肽 N-苄氧羰基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 (Z-Phe-Leu) 为武汉 Bioyears 公司合成;其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 *Cpase Taq* 基因体外合成及表达载体 pHBM905A-*Cpase Taq* 的构建

通过 NCBI 查询到该基因对应的氨基酸序列 (GenBank Accession No. P42663.2),其下游额外添加 6×His 标签,总共 517 个氨基酸,利用 DNAWorks3.2^[10] 依据密码子优化设计需要的引物 (未列出),采用两步合成全基因的方法^[11]合成上述基因。载体 pHBM905A 以 *Not* I、*Cpo* I 双酶切,目的基因经 T4 DNA 聚合酶处理后与载体连接^[9],阳性克隆由上海桑尼生物工程公司测序并进行序列分析。

1.4 质粒 pHBM905A-*Cpase Taq* 转化毕赤酵母 GS115

测序正确的重组质粒和空载体 pHBM905A 分别经 *Sal* I 线性化,溶液回收后各得 10 μg DNA。将线性化的质粒分别电转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞,涂布 MD 平板,培养 60 h 后利用菌落

PCR 鉴定阳性克隆，实验以转化空载体 pHBM905A 的酵母菌作为负对照。

1.5 毕赤酵母重组子诱导表达

诱导表达方法参照 Invitrogen 毕赤酵母操作手册。

1.6 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析方法参照 Bio-Rad 实验手册。

1.7 羧肽酶 *Taq* 纯化

将诱导 72 h 后的培养基 5 000 r/min 离心 10 min，粗酶液经截留分子量为 30 kDa 超滤膜超滤处理，并用 50 mmol/L Tris-HCl (100 μ mol/L Zn^{2+} , pH 7.2) 洗涤粗酶液，继续超滤以除掉粗酶液中的培养基。亲和层析柱用 50 mmol/L PBS (10 mmol/L 咪唑, pH 7.2) 洗涤 10 个柱体积，缓慢加入超滤后的酶液。酶液和层析柱在 4 $^{\circ}$ C 孵育 90 min，弃去未结合上清，层析柱用 50 mmol/L PBS (20 mmol/L 咪唑, pH 7.2) 洗涤 20 个柱体积。目的蛋白以 50 mmol/L PBS (50、100、150、200、250、300、350 和 400 mmol/L 咪唑, pH 7.2) 分别洗脱。

1.8 去糖基化处理

羧肽酶的去糖基化实验参照 NEB 公司操作说明。

1.9 羧肽酶 *Taq* 酶活力测定及酶活力单位定义

酶活测定参照 Doi 等的方法^[12]，酶活测定以 Z-Phe-Leu 为底物，用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)，70 $^{\circ}$ C 反应 15 min，茚三酮作为显色剂，测定复合物在 505 nm 处的光吸收值。配制不同浓度的亮氨酸标准溶液，绘制亮氨酸标准曲线。酶活单位定义：每 1 min 水解生成 1 μ mol 亮氨酸所需的酶量作为一个酶活力单位 (U)。

2 结果

2.1 表达载体 pHBM905A-*Cpase Taq* 的构建

表达载体 pHBM905A 经 *Not* I、*Cpo* I 双酶切，通过两步法合成基因，将回收的基因片段 (图 1A) 连接到载体 pHBM905A 上，并转化至大肠杆菌 XL10-Gold，转化子以基因专一性引物进行菌落

PCR 初筛，初筛质粒再经 *Eco*R I、*Bam*H I 酶切，琼脂糖凝胶电泳显示出酶切后释放出大小 3 000 bp 左右的 DNA 片段带，与预期大小 (3 050 bp) 相符合，上述重组子 (图 1B) 经上海桑尼生物工程公司测序，测序结果完全正确。

2.2 毕赤酵母重组子鉴定及羧肽酶 *Taq* 诱导表达

将鉴定正确的重组子摇瓶培养，每隔 24 h 添加 1% 的甲醇作为诱导物，并同时取样。取 40 μ L 粗酶液上清，加入 8 μ L 6 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min，通过 SDS-PAGE 检测表达。结果显示重组羧肽酶蛋白分子量与理论值 (58.8 kDa) 相符 (图 2)。通过蛋白质定量分析表明，诱导 72 h 后总蛋白量可达到最大值 0.1 mg/mL，酶活力测定显示酵母发酵上清的酶活性为 11.6 U/mg，从第 72 h 开始，总蛋白开始出现部分降解。

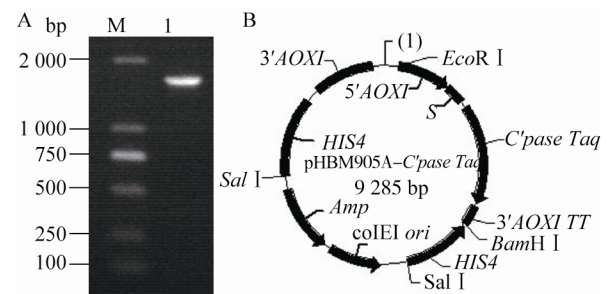


图 1 *Cpase Taq* 基因合成的结果

Fig. 1 Result of *Cpase Taq* gene synthesis. (A) The synthesis of *Cpase Taq* gene. M: DNA marker DL2000; 1: *Cpase Taq* gene. (B) The profile of the recombinant plasmid.

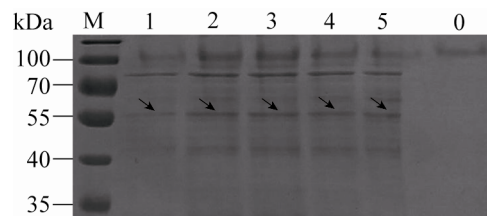


图 2 不同诱导时间重组羧肽酶的表达情况

Fig. 2 SDS-PAGE (4%–12%) analysis of recombinant *Cpase Taq* expression in different induction time. M: protein marker; 1–5: expression of recombinant *Cpase Taq* from the first day to the fifth day, respectively; 0: GS115 (pHBM905A) control.

2.3 羧肽酶 *Taq* 的纯化及活性测定

洗脱成分经 SDS-PAGE 检测显示 300 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱效果最好 (图 3)。粗酶液超滤后的酶活性为 59.4 U/mg, 亲和层析纯化完的酶活性为 77.6 U/mg (图 4)。经软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测该蛋白不含潜在的糖基化位点, 通过 Endo H (29 kDa) 去糖基化处理该酶, 也表明该蛋白没有被明显地糖基化 (图 5)。

2.4 酶学性质分析

酶活测定显示, 在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 中, 最适作用温度为 75 °C (图 6A), 在 50 mmol/L 不同 pH 的反应缓冲液中: 柠檬酸缓冲液 (pH 4.5–6.0)、Tris-HCl (pH 6.5–8.5)、硼酸盐缓冲液 (pH 9.0–10.5), 其最适作用 pH 为 7.5 (图 6B)。

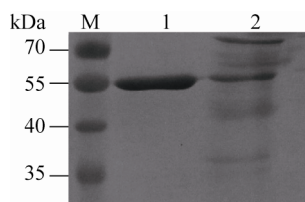


图 3 目的蛋白的纯化

Fig. 3 Purification of interest protein. M: protein marker; 1: the purification step of Ni^{2+} affinity chromatography; 2: the purification step of ultrafiltration.

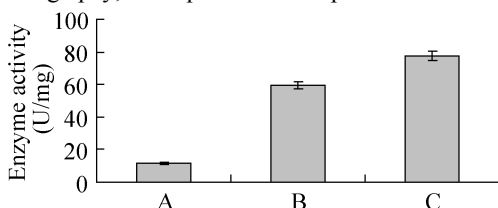


图 4 不同纯化步骤的酶活力

Fig. 4 Enzyme activities of different purification steps. A: enzyme activity of culture supernatant; B: enzyme activity by ultrafiltration; C: Enzyme activity by affinity chromatography.

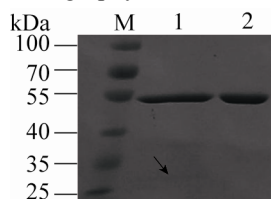


图 5 羧肽酶 *Taq* 去糖基化

Fig. 5 Deglycosylation of Cpase *Taq*. M: protein marker; 1: cpase *Taq* coped with Endo H; 2: cpase *Taq* control without Endo H.

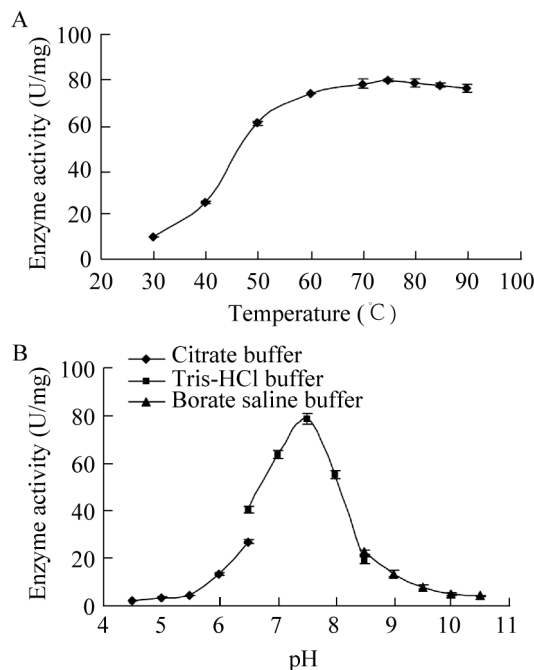


图 6 温度 (A) 和 pH (B) 对重组酶活性的影响

Fig. 6 Effects of temperature (A) and pH (B) on activity of the recombinant enzyme.

3 讨论

动物来源的羧肽酶基因经常带有前肽编码序列^[13-14], 异源表达都以酶原的形式存在, 应用的前提是体外激活^[1], 这种非特异性激活往往不能赋予酶完整的活性^[15], 给应用带来障碍。国外羧肽酶 *Taq* 之前仅有在大肠杆菌中表达的报道, 纯化极其繁琐, 工业应用前景不强。

本实验通过密码子优化, 使羧肽酶 *Taq* 可以在毕赤酵母中有效大量地分泌表达。和传统的羧肽酶相比, 羧肽酶 *Taq* 分泌出酵母细胞外时, 以成熟的形式存在, 且具备高活性 80 U/mg。并且纯化过程只需两步操作, 就可以获得大量的高酶活羧肽酶 *Taq*, 这是大规模制备和生产羧肽酶 *Taq* 的基础。酶学性质实验发现, 组氨酸标签融合的羧肽酶 *Taq* 最适 pH 和温度与天然的酶有一定差别。天然酶的最适 pH 为 8.0, 最适温度为 80 °C, 本实验研究组氨酸标签融合重组酶的最适 pH 为 7.5 左右, 最适温度为 75 °C, 在 70 °C 以上, 该酶保持

较高活性。产生该差异的机制目前并不清楚，毕赤酵母表达的分泌蛋白往往容易发生 N-糖基化，N-糖基化往往可以改变酶的某些生物学活性^[16]，通过去 N-糖基化处理发现毕赤酵母表达的羧肽酶 *Taq* 不带有 N-糖基化，然而是否是组氨酸标签影响了羧肽酶 *Taq* 最适作用 pH 和温度仍然有待研究。

由于羧肽酶水解能力差，作用底物范围小，羧肽酶极少应用于工业生产。而本研究中的重组羧肽酶 *Taq* 具有高酶活和广泛的底物特异性等特点，有大规模应用于工业酶法水解多肽的前景，但是该酵母工程菌在小肽水解方面的工业应用值得我们更深入的探索。

REFERENCES

- [1] Kim MJ, Kim SH, Lee JH, et al. High-level secretory expression of human procarboxypeptidase B by Fed-Batch cultivation of *Pichia pastoris* and its partial characterization. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(12): 1938–1944.
- [2] Liao DI, Remington SJ. Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution: a new class of serine proteinase. *J Biol Chem*, 1990, 265(12): 6528–6531.
- [3] Mukaiyama H, Iwaki T, Idiris A, et al. Processing and maturation of carboxypeptidase Y and alkaline phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90: 203–213.
- [4] Lee SH, Minagawa E, Taguchi H, et al. Purification and characterization of a thermostable carboxypeptidase (carboxypeptidase *Taq*) from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56(11): 1839–1844.
- [5] Lee SH, Taguchi H, Yoshimura E, et al. Carboxypeptidase *Taq*, a thermostable zinc enzyme, from *Thermus aquaticus* YT-1: molecular cloning, sequencing and expression of the encoding gene in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(8): 1490–1495.
- [6] Son YJ, Kim CK, Kim YB, et al. Effects of citraconylation on enzymatic modification of human proinsulin using trypsin and carboxypeptidase B. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(4): 1064–1070.
- [7] Cool DR, Hardiman A. C-Terminal sequencing of peptide hormones using carboxypeptidase Y and SELDI-TOF mass. *Biotechniques*, 2004, 36(1): 32–34.
- [8] Komai T, Kawabata C, Tojo H, et al. Purification of serine carboxypeptidase from the hepatopancreas of Japanese common squid *Todarodes pacificus* and its application for elimination of bitterness from bitter peptides. *Fisheries Sci*, 2007, 73(2): 404–411.
- [9] Zhang GM, Hu Y, Zhuang YH, et al. Molecular cloning and heterologous expression of an alkaline xylanase from *Bacillus pumilus* HBP8 in *Pichia pastoris*. *Biocatal Biotransform*, 2006, 24(5): 371–379.
- [10] Hoover DM, Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10): e43.
- [11] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(7): e59.
- [12] Doi E, Shibata D, Matoba T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal Biochem*, 1981, 118(1): 173–184.
- [13] Wang DJ, Miao L, Chen H, et al. Expression, purification and characterization of rat procarboxypeptidase B in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2007, 23(1): 61–66 (in Chinese).
王德解, 苗林, 陈宏, 等. 鼠羧肽酶原 B 在毕赤酵母中的表达、纯化与鉴定. *生物工程学报*, 2007, 23(1): 61–66.
- [14] Tan F, Morris PW, Skidgel RA, et al. Sequencing and cloning of human prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) similarity to both serine carboxypeptidase and prolylendopeptidase families. *J Biol Chem*, 1993, 268(22): 16631–16638.
- [15] Hahm MS, Bae JH, Choi ES, et al. *In vitro* activation of yeast pro-carboxypeptidase Y expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21: 881–885.
- [16] Han M, Wang X, Ding H, et al. The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2014, 54: 32–37.

(本文责编 郝丽芳)