

# mdlA 基因在毕赤酵母中的高效表达及表达产物性质研究\*

李琦<sup>1</sup> 王雅琴<sup>1\*\*</sup> 谭天伟<sup>2</sup> 王子镐<sup>1</sup>

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)<sup>1</sup> (北京市生物加工过程重点实验室 北京 100029)<sup>2</sup>

**摘要:** 将编码甘油单-二酰酯脂肪酶 (MDGL) 的基因 *mdlA* 插入到分泌表达质粒 pPIC9K 中, 通过电激将线性化的重组质粒整合到毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中, 筛选出 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 表型菌株, 进一步用 G418 筛选获得高拷贝转化子, 并用 PCR 方法鉴定。诱导培养后, SDS-PAGE 表明 MDGL 在毕赤酵母中得到有效表达。表达产物在温度 40℃, pH7.5 具有最高活性, 其发酵液酶活可达到 325U/mL, 以橄榄油为底物时没有检测到活性。表达产物与甘油三酰酯脂肪酶共同作用时产生的脂肪酸量比甘油三酰酯脂肪酶单独作用提高了 93.5%。

**关键词:** 甘油单-二酰酯脂肪酶, 毕赤酵母, 表达

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0018-06

## High Expression of *mdlA* Gene in *Pichia pastoris* and Study of Properties of the Recombinant Lipase\*

LI Qi<sup>1</sup> WANG Ya-Qin<sup>1\*\*</sup> TAN Tian-Wei<sup>2</sup> WANG Zi-Hao<sup>1</sup>

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)<sup>1</sup>

(Beijing Key Laboratory of Bioprocess, Beijing 100029)<sup>2</sup>

**Abstract:** The mono- and diacylglycerol lipase (MDGL) -encoding gene (*mdlA*) was inserted into methanol-inducible expression vector pPIC9K. The linearized recombinant plasmid was transformed into chromosome of *Pichia pastoris* GS115 strain by electroporation. Some high-copy transformants (His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>) were picked up by G-418 and conformed by PCR. SDS-PAGE analysis indicated efficient expression of recombinant MDGL. Some enzymatic properties of the recombinant MDGL were also determined. The activity of the recombinant MDGL was up to 325U/mL under the optimal conditions and no activity was detected towards olive oil. The amount of fatty acid produced by the catalysis of recombinant MDGL and triacylglycerol lipase had a increase of 93.5% over triacylglycerol lipase lonely.

**Key words:** Mono- and diacylglycerol lipase, *Pichia pastoris*, Expression

脂肪酶 (lipase, EC 3. 1. 1. 3) 即甘油三酰酯水解酶 (triacylglycerol hydrolase), 能水解甘油三酰酯生成甘油二酰酯, 甘油单酰酯, 甘油和脂肪酸。一类特殊的脂肪酶, 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。Yamaguchi 等利用卡门柏青霉 U-150 (*Penicillium camembetii* U-150) 得到的甘油单-二酰酯脂肪酶 MDGL<sup>[1]</sup> 就具有这种性质。根据 MDGL 的这种特性, 可以用其催化水解反应的逆反应——酯化或转酯化反应生产在工业上具有较高应用价值的甘油单酰酯 (单甘酯)。本课题以徐家立等从 242 株青霉菌属菌株中筛选到的卡门柏青霉-PG3<sup>[2]</sup> 为出发菌株, 扩增出了 MDGL

\* 北京市生物加工过程重点实验室开放项目 (No. SYS100100421)

\*\* 通讯作者 Tel: 86-10-64451781, E-mail: yaqinw@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2005-03-17, 修回日期: 2005-04-25

基因 *mdlA*, 利用毕赤酵母表达系统对 MDGL 进行了高效表达, 并研究了该脂肪酶与甘油三酰酯脂肪酶共同作用时, 对脂肪水解程度的影响。在国内对这种脂肪酶分子水平上的研究尚未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Pichia pastoris* GS115 及表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 生物素、G418 购自华美公司; 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、逆转录第一链 cDNA 合成试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司; 以无纺布为载体的固定化假丝酵母脂肪酶由本实验室自制; 卡门柏青霉-PG3 为脂肪酶基因的来源菌株, 由中国科学院微生物研究所徐家立教授惠赠; 培养基 YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 按“Invitrogen 公司操作手册”推荐方法配制。

### 1.2 方法

**1.2.1 MDGL 基因 *mdlA* 的克隆:** 卡门柏青霉-PG3 菌体 RNA 的提取及逆转录合成 cDNA 第一链的操作参照上海生工公司相关试剂盒用户手册。参考编码 MDGL 的基因序列 (*mdlA*, Accession number: D90315) 设计引物, 上游引物 Mdlp1: 5' - GACCTACG-TAGATGTTTCG ACCAGCGAACT -3', 含 *Sna*BI 酶切位点; 下游引物 Mdlp2: 5' -ATT-GCGGCCGCTTAAAC CCTCTTGAATGGCA-3', 含 *Not*I 酶切位点。以第一链 cDNA 为模板, Mdlp1 和 Mdlp2 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 cDNA 模板 2 $\mu$ L; 10 $\times$  buffer 5 $\mu$ L; 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ L; 2.5mmol/L dNTP 4 $\mu$ L; 20 $\mu$ mol/L 上下游引物各 2 $\mu$ L; Taq DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ L, 加超纯水至总体积为 50 $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 30 个循环; 第 30 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。将 PCR 产物回收, 与 pMD18-T 载体连接构建 pMD/*mdlA* 重组质粒, 委托北京三博远志公司测定核苷酸序列。

**1.2.2 表达质粒的构建:** 将 pMD/*mdlA* 质粒用 *Sna*BI 和 *Not*I 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 pPIC9K 质粒连接, 构建 pPIC9K/*mdlA* 表达质粒。质粒抽提、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应、细菌转化及重组质粒的酶切鉴定均按 Sambrook<sup>[3]</sup>方法进行。

**1.2.3 酵母细胞的转化及 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 转化子的筛选:** 用 *Sal* I 切割 pPIC9K/*mdlA*, 使之线性化, 电穿孔法转化毕赤酵母 GS115, 转化物涂布于 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2d。将 MD 平板上生长的转化菌落分别接种到 MM 和 MD 平板上的相应位置, 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d, 根据菌落在 MM 平板上的生长情况, 鉴定转化子的表型。一般地, 在 MM 平板上生长正常的转化子是 Mut<sup>+</sup> 型, 而在 MM 平板上生长较弱的转化子是 Mut<sup>-</sup> 型。

**1.2.4 高拷贝转化子的筛选:** 将获得的 His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> 转化子分别在含 G418 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL 的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5d, 以筛选多拷贝的阳性转化子。由于 pPIC9K 载体含有一个卡那霉素的抗性基因, 它能使酵母细胞对氨基糖苷 G418 产生抗性, 如果转入的外源基因拷贝数越多, 转染的酵母菌耐受 G418 的浓度就越高<sup>[4]</sup>。挑取 G418 平板上生长良好的阳性菌落, 按 Invitrogen 操作指南提取的酵母基因组 DNA 为反应模板, 以目的基因两端序列为引物, 用 PCR 方法进行鉴定。

**1.2.5 MDGL 的诱导表达:** 挑取一阳性克隆接种于 BMGY 培养液中, 30 °C 振荡培养 16 ~ 20h 至  $OD_{600}$  为 2 ~ 6, 离心收集菌体, 加 BMMY 培养基稀释至  $OD_{600}$  为 1。每隔 24 h 补加甲醇, 使其终浓度为 0.5 %。

**1.2.6 表达产物的鉴定:** (1) 酶活力的测定: 将发酵液离心后的上清液作 SDS-PAGE 分析, 并测定脂肪酶活力。酶活力的测定采用 p-NPL 法<sup>[5]</sup>, 底物对硝基苯月桂酸酯溶解于含 triton X-100 的缓冲溶液中, 在脂肪酶的催化作用下分解, 生成月桂酸与对硝基苯酚, 在  $\lambda = 410 \text{ nm}$  光波下测定对硝基苯酚的产生量, 并换算出酶活。1 酶活单位定义为每分钟分解  $1 \mu\text{mol}$  对硝基苯月桂酸酯所需的酶量。(2) 表达产物对甘油三酯活性的鉴定: 以橄榄油为底物, 用 NaOH 滴定法测定酶活性<sup>[6]</sup>。

**1.2.7 重组脂肪酶酶学性质测定:** 在不同 pH 值与温度条件下, 测定发酵液离心后上清液中的脂肪酶活力, 并绘制 pH 曲线与温度曲线。

**1.2.8 重组脂肪酶对甘油三酯脂肪酶水解脂肪的影响:** 采用改进的 NaOH 滴定法, 反应液组成为: 橄榄油乳化液 5mL; 0.04mol/L 磷酸缓冲液 4 mL; 固定化假丝酵母脂肪酶 0.02g; 稀释 20 倍的重组酵母发酵上清液 1mL。将以上反应物加入到 100 mL 的三角瓶中, 37°C 水浴作用 10min, 用 15mL 95% 乙醇溶液终止反应。酚酞作指示剂, 用 0.05mol/L NaOH 溶液滴定产生的脂肪酸。设空白对照为反应中只加入固定化酶水解脂肪, 发酵上清液在用乙醇终止反应后加入。改变反应的 pH 值, 比较重组脂肪酶参加反应前后体系释放的脂肪酸量, 确定水解程度的差异。

## 2 结果

### 2.1 *mdlA* 的克隆

按方法“1.2.1”克隆 MDGL 基因 *mdlA*, 取  $10 \mu\text{L}$  PCR 产物进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果如图 1。从图中可以看出, 扩增出的片段大小约为 860bp。序列测定结果显示目的片段全长 861bp, 与已知序列比对, 确定除去酶切位点后的片段为 *mdlA* 基因。

### 2.2 含 *mdlA* 基因的重组表达载体的构建

*Sna*BI/*Not*I 酶切 pMD/*mdlA* 质粒, 将得到的含有 *mdlA* 基因的片段与同样经过 *Sna*BI/*Not*I 酶切的 pPIC9K 质粒连接, 构建重组酵母表达载体 pPIC9K/*mdlA* (图 2)。

### 2.3 重组酵母的获得与鉴定

通过电激法将经 *Sal*I 单酶切线性化的 pPIC9K/*mdlA* 转化入毕赤酵母 GS115, 转化物涂布 MD 平板。GS115 为组氨酸缺陷型, 只有 pPIC9K 整合到染色体上的酵母重组子才能在不含组氨酸的 MD 培养基上生长。本研究获得了 1,000 多个克隆, 挑选其中 40 个克隆进行表型鉴定, 其中 27 个为  $\text{His}^+ \text{Mut}^+$  转化子。

挑选在 3.0 mg/mL G418 平板上生长良好的酵母转化子进行 PCR 鉴定, 分析表明 90% 以上的转化子染色体中整合入了 *mdlA* 基因。

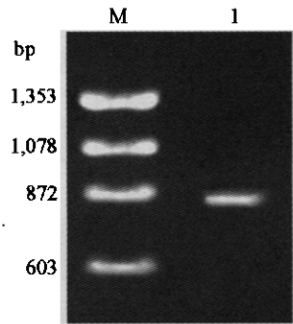


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳  
M DNA marker, 1 PCR 扩增产物

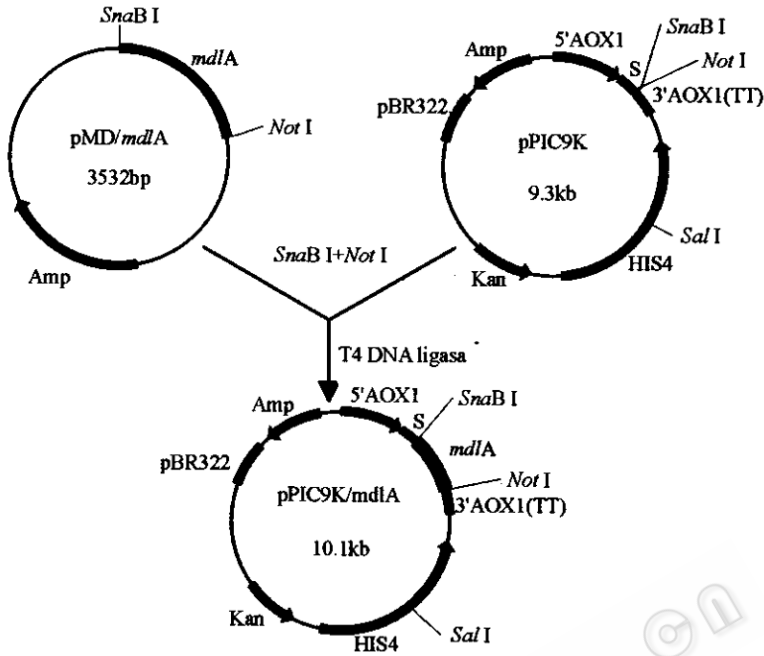


图 2 重组质粒 pPIC9K/mdIA 的构建

### 2.4 重组蛋白的表达

SDS-PAGE 分析结果表明, 重组酵母分泌了 39kD 左右的重组蛋白质进入培养液 (图 3), 与天然蛋白质大小一致<sup>[7]</sup>。而阴性对照无此条带, 说明 *mdIA* 基因在毕赤酵母 GS115 中得到了正确表达和修饰。

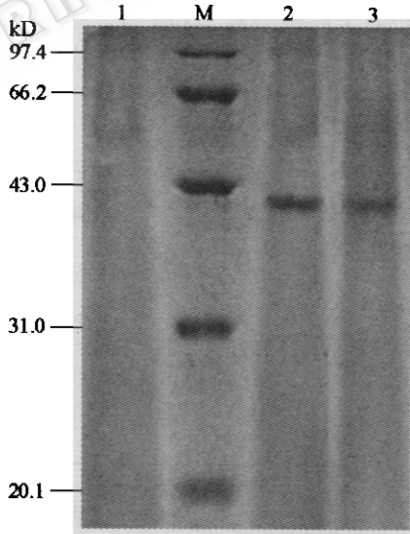


图 3 重组酵母上清的 SDS-PAGE

1 阴性对照表达的上清液, M 标准蛋白质相对分子质量, 2, 3 阳性重组子经诱导后表达的上清液

### 2.5 表达产物的生物学活性鉴定

以对硝基苯月桂酸酯为底物, 利用 p-NPL 法测定酶活性, 检验表达产物的生物学性质。如图 4 所示, 最适作用温度为 40℃, 最适作用 pH 值为 7.5。在最适作用条件

下, 重组脂肪酶酶活可达到 325U/mL。

以橄榄油为底物, NaOH 滴定法测定表达产物的酶活, 没有检测到酶活性, 因为橄榄油的主要成分是甘油三油酸酯, 这与 MDGL 对甘油三酰酯不起催化作用的性质相符。

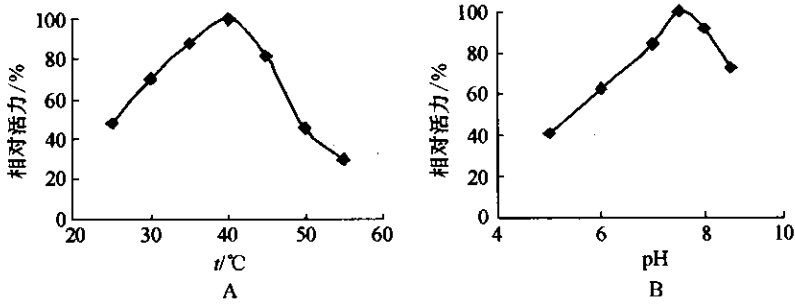


图4 温度与 pH 对重组脂肪酶活力的影响

A 温度对脂肪酶活力的影响, B pH 对脂肪酶活力的影响

### 2.6 表达产物对甘油三酰酯脂肪酶催化脂肪水解的影响

甘油三酰酯脂肪酶催化脂肪水解生成甘油二酰酯, 甘油单酰酯, 甘油和脂肪酸, MDGL 对脂肪 (甘油三酰酯) 不起催化作用, 但可以利用甘油单、二酰酯为反应底物, 继续水解生成甘油与脂肪酸。甘油单、二酰酯的减少反过来又使甘油三酰酯脂肪酶催化的反应平衡向有利于水解的方向移动, 因此, MDGL 与甘油三酰酯脂肪酶相互作用, 可以有效提高脂肪的水解程度。

假丝酵母脂肪酶是一种甘油三酰酯脂肪酶, 具有较高的催化活性, 将其在无纺布上进行固定化后, 稳定性得到很大的提高, 以橄榄油为底物酶活可达到 5000U/g。按方法“1.2.8”比较表达产物参加反应前后体系释放的脂肪酸量。如图 5 所示, 在假丝酵母脂肪酶的最适作用温度 37°C 下反应, 当 pH 值为 7.5 时反应产生的脂肪酸量最多, 比假丝酵母脂肪酶单独作用时提高了 93.5%, 大大提高了水解效率。两酶共同作用时的最适 pH 值比假丝酵母脂肪酶单独作用时有一个偏移, 由 8 变为 7.5, 说明在这个条件下两酶能更好的协同作用, 达到最好的水解效率。

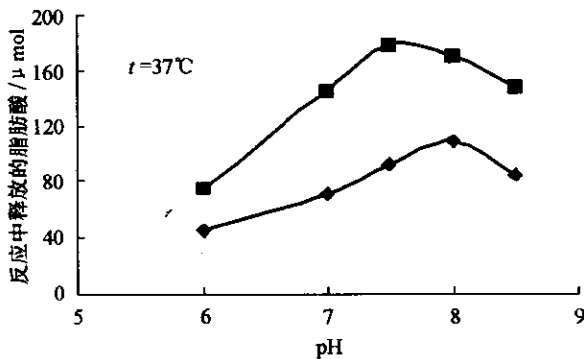


图5 在不同的 pH 下重组脂肪酶对水解的影响

● 固定化酶单独作用, ■ 两酶共同作用

### 3 讨论

巴斯德毕赤酵母表达系统是近年来发展迅速、应用广泛的一种真核表达系统。与

大肠杆菌相比,酵母是低等真核生物,除了具有细胞生长快,易于培养,遗传操作简单等原核生物的特点外,又具有真核生物表达蛋白质时能够进行正确加工,修饰,合理的空间折叠等功能,非常有利于真核基因的表达。选择合适的表达载体,巴斯德毕赤酵母能将产生的外源蛋白分泌到培养基中,不但提高表达蛋白的活性,而且有利于产物的纯化。

甘油单-二酰酯脂肪酶(MDGL)具有大多数脂肪酶所不具有的性质,它只能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。Yamaguchi等<sup>[8]</sup>用其催化甘油与油酸发生酯化反应生产单油酸甘油酯,应用分子筛除去反应中产生的水,油酸的转化率可达到97.3%,生产的单甘油酯占到体系的74%(质量百分数)。本研究将编码MDGL的*mdlA*基因插入表达载体pPIC9K中,转化毕赤酵母GS115,表达产物经SDS-PAGE分析,大小与天然蛋白质一致。表达产物在温度40℃,pH7.5时酶活最高,达到325U/mL。根据表达产物可以催化甘油单、双酰酯水解的特性,与甘油三酰酯脂肪酶一起使用时,能够有效提高甘油三酰酯的水解程度,在37℃,pH7.5时,两酶协同作用效率最高,生成的脂肪酸量比甘油三酰酯脂肪酶单独作用时提高了93.5%。

### 参 考 文 献

- [1] Yamaguchi S, Mase T. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **34**: 720 ~ 725.
- [2] 徐家立、张 军、齐祖同. *真菌学报*, 1995, **14** (2): 136 ~ 142.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Scorer C A, Clare J J, McCombie W R, *et al.* *Bio/ Technology*, 1994, **12** (2): 181 ~ 184.
- [5] Winkler U K, Stuckman M. *J Bacteriol*, 1979, 633 ~ 670.
- [6] 何耀强, 王炳武, 谭天伟. *生物工程学报*, 2004, **20** (6): 918 ~ 921.
- [7] Yamaguchi S, Takeuchi K, Mase T. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61** (5): 800 ~ 805.
- [8] Yamaguchi S, Mase T. *J Ferment Bioeng*, 1991, **72** (3): 162 ~ 167.