

适用于高通量筛选的脂肪酶表达系统

金城

(《微生物学通报》编委会 北京 100101)

突变库容量和高通量筛选方法是影响酶分子定向进化的两个决定因素, 虽然巴斯德毕赤酵母 pPIC9K 表达系统已被广泛使用^[1], 但由于外源基因可通过单插入整合入基因组, 产生多拷贝突变基因, 从而干扰后续重组子的筛选; 另一方面, pPIC9K 表达系统需要甲醇诱导, 需要每日补加甲醇来诱导表达外源蛋白, 既繁琐又容易染菌, 影响表达酶的高通量筛选。因此, 巴斯德毕赤酵母在分子定向进化方面的应用受到限制。

尽管来源于真菌华根霉的脂肪酶基因 *proRCL* 已在毕赤酵母中实现了克隆与高效表达^[2], 但由于该表达系统在定向进化研究中的局限性, 限制了对重组脂肪酶的定向进化研究。本期介绍了朱珊珊、徐岩等发表的论文“毕赤酵母组成型表达脂肪酶及其高通量筛选方法”^[3], 作者通过在诱导型载体 pPIC9K 中插入 GAP 启动子, 利用同源双交换将单拷贝外源基因整合到酵母基因组中, 并且不需甲醇诱导, 可在橄榄油罗丹明 B 平板相上进行高通量的筛选单拷贝高酶活重组子, 在毕赤酵母建立了单拷贝高酶活重组子高通量筛选方法, 可在 3 d 时间内高通量地筛选组成型表达脂肪酶的毕赤酵母单拷贝重组子, 为后续的定向进化提供了简便高效的筛选方法。

由于橄榄油罗丹明 B 平板检测脂肪酶酶活的灵敏度不够高, 还需要后期挑选出变色圈较大的重组子进行更精确的发酵培养, 确定实际的酶活大小情况, 因而在一定程度上限制了高通量筛选的速度, 但对于其它真核生物来源的酶, 用该系统进行定向进化研究是具有明显优势的。

关键词: 脂肪酶, 高通量筛选

参 考 文 献

- [1] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. Journal of Molecular Recognition, 2005, 18(2): 119-138.
- [2] Yu XY, Wang LL, Xu Y. *Rhizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties[J]. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2009, 57(1/4): 304-311.
- [3] Mouches C, Bové JM, Albisetti J. Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in southwestern France[J]. Annals of Microbiology, 1984, 135A(1): 151-155.
- [4] 朱珊珊, 喻晓蔚, 徐岩. 毕赤酵母组成型表达脂肪酶及其高通量筛选方法[J]. 微生物学通报, 2012, 39(6): 873-881.

Expression of lipase for high-throughput screen

JIN Cheng

(The Editorial Board of Microbiology China, Beijing 100101, China)

Keywords: Lipase, High-throughput screen