

基于密码子优化的蛋白酶 K 在毕赤酵母中的表达及分离纯化

孙风敏¹ 韩焱² 李文利^{1*}

(1. 大连理工大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

(2. 大连市疾病预防控制中心 辽宁 大连 116021)

摘要:【目的】提高蛋白酶 K 在毕赤酵母中的表达产量，建立分离纯化方法。【方法】首先对蛋白酶 K 密码子进行优化，将其导入毕赤酵母 GS115 中实现分泌表达。然后对甲醇浓度、发酵温度和 pH 等表达条件进行优化，再对硫酸铵沉淀、亲和层析等纯化工艺进行比对分析。【结果】蛋白酶 K 密码子优化后实现了在毕赤酵母中的高效表达。在甲醇量 0.75%、温度 25 °C 和 pH 7.0 条件下进行发酵罐培养，蛋白酶 K 表达量达到 2.2 g/L。采用 Ni-NTA 亲和柱对发酵液进行纯化可以得到较好的纯化效果。【结论】密码子优化后的蛋白酶 K 在毕赤酵母中高效表达并可以利用 Ni-NTA 亲和柱进行有效分离纯化。

关键词: 蛋白酶 K, 密码子优化, 表达条件优化, 分离纯化

Expression and purification of codon optimized proteinase K in *Pichia pastoris*

SUN Feng-Min¹ HAN Yan² LI Wen-Li^{1*}

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University and Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

(2. Dalian Center for Disease Control and Prevention, Dalian, Liaoning 116021, China)

Abstract: [Objective] In order to improve the production of proteinase K and setup purification method. [Methods] We first optimized the codons of proteinase K gene and transferred it into *Pichia pastoris* (GS115) to realize secretory expression. And culture conditions including methanol concentration, temperature and pH were investigated. The purification methods, such as ammonium sulfate precipitation, affinity chromatography, were further optimized. [Results] Through the optimization of codons of proteinase K gene and cultural conditions, we obtained high-level expression of proteinase K. The results showed optimal fermentation condition was supplement of methanol 0.75%, fermentation temperature 25 °C and pH 7.0. The yield of proteinase K was 2.2 g per liter under the optimized fermentation condition. The efficient purification way is Ni-NTA affinity chromatograph after comparing with the other methods. [Conclusion] The results showed that proteinase K can be expressed at high level expression in *P. pastoris* and can be efficient purified with Ni-NTA affinity chromatograph.

Keywords: Proteinase K, Codon optimization, Fermentation condition optimization, Purification

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31201879)

*通讯作者: ✉: biolwl@dlut.edu.cn

收稿日期: 2014-03-04; 接受日期: 2014-04-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-21

蛋白酶 K 是由林伯氏白色念球菌(*Tritirachium album* Limber)分泌的一种重要的丝氨酸蛋白酶^[1],对天然蛋白质有较强的降解能力。蛋白酶 K 在生化实验中应用比较广泛。例如,在核酸提取中,它可以除去核酸中的 DNA 酶和 RNA 酶^[2-3];在原位杂交中,蛋白酶 K 具有降解包围靶 DNA 蛋白质的作用,可以用来处理杂交前的样本^[4],提高检测的敏感性。在生物检测方面,蛋白酶 K 可以用来检测脑组织中的致病性朊病毒^[5]。另外,蛋白酶 K 对污水中病毒的灭活能力明显高于工业蛋白酶^[6],在污水处理方面具有广阔的发展前景。

蛋白酶 K 由 279 个氨基酸构成,含有 2 个二硫键及 1 个自由的半胱氨酸,因此蛋白酶 K 在高温和极端 pH 环境中仍有较高的稳定性。蛋白酶 K 含有 2 个 Ca^{2+} 结合位点,这 2 个 Ca^{2+} 结合位点也增加了蛋白酶 K 的热稳定性及催化活性^[7]。蛋白酶 K 含有丝氨酸蛋白酶类所具有的典型催化三联体 Asp39-His69-Ser224 特征^[8],并且蛋白酶 K 的多肽链序列和三维空间结构与枯草杆菌蛋白酶有着高度的同源性^[9],所以蛋白酶 K 也被归为枯草杆菌蛋白酶类家族。通过 X 射线衍射技术分析,发现蛋白酶 K 三级结构呈球状^[10],其内部结构是刚性的,比较稳定,而外部则是由多种环状结构构成,尤其在底物结合区。这种结构可以呈现出相当多的构象变化,有助于底物结合及催化,使得蛋白酶 K 比其他的枯草杆菌蛋白酶具有更广的底物特异性。

现在商业化供应的蛋白酶 K 主要由林伯氏白色念球菌分泌获得,这种菌体生长缓慢,难以高密度培养,蛋白酶 K 的产量较低,目前工业生产的蛋白酶 K 的产率为 0.3–0.5 g/L 发酵液。另外,林伯氏白色念球菌还会分泌其他的蛋白酶^[11],增加了下游分离纯化的难度。为了提高蛋白酶 K 的表达量,很多科研学者对改变蛋白酶 K 宿主菌做了多次尝试。Gunkel F. A. 等^[12]将蛋白酶 K 转入大肠杆菌体内,实现了蛋白酶 K 的胞内表达,然而表达量极低。Muelle R. 等^[13]构建了 pPICZαA-proteinaseK 及 pPIC9K-proteinaseK 表达载体,转入毕赤酵母体内,实现了蛋白酶 K 的分泌表达,证明了蛋白酶 K 可以在酵母体内表达。

酵母表达系统是一种重要的异源表达技术,它具有原核表达所不具备的多种优势,如分泌表达便于分离纯化、能够进行蛋白翻译后的加工修饰、表达量较高等特点。酵母表达系统的表达量受多种因素的影响^[14],如生长温度、pH、甲醇浓度、诱导时间等。在高密度发酵过程中,目标产物的表达量还和溶氧、甲醇流加方式等条件有关。除此之外,由于毕赤酵母对密码子的偏爱性,目的基因的密码子序列对产物的表达量也有很大影响。大量研究表明,密码子优化对提高产物表达量有明显的作用^[15-18]。因此,如果想提高产物的产量,不但要优化表达条件,还需要对密码子进行优化。

本实验根据毕赤酵母偏爱的密码子,对蛋白酶 K 基因进行了优化,将目的基因中的密码子转变成毕赤酵母偏爱的密码子,并在蛋白酶 K 基因的 3' 端加上了 6 个组氨酸标签。另外,本研究对蛋白酶 K 表达条件、分离纯化方法进行了优化。实验尝试了 3 种分离纯化方法,通过比较这 3 种纯化方法的酶收率及比活,确定最佳的纯化条件。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

白色念球菌、大肠杆菌 DH5α、毕赤酵母菌株 GS115、pPIC9K 质粒均由本实验室保存;限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I 购自大连 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、Ni-NTA His Bind Resin、透析袋、G418 抗生素均购自上海生工公司;YPD、BMGY、BMMY 和 MD 培养基均按 Invitrogen 公司的毕赤酵母菌实验操作手册配制。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白酶 K 密码子优化: 参照 GenBank 中蛋白酶 K 基因序列(GenBank: DD031272.1),利用密码子优化软件(<http://gcu.schoedl.de/>)分析,发现蛋白酶 K 基因中有多处是毕赤酵母的稀有密码子,利用密码子优化软件(<http://www.jcat.de/>)对蛋白酶 K 基因进行密码子优化,在不改变氨基酸序列的前提下,获得编码蛋白酶 K 的基因序列。在序列的 5' 端加上 *EcoR* I 酶切位点,3' 端加上 6 个组氨酸标签后再加 *Not* I 酶切位点。然后将优化构建的基因

序列送上海生工公司合成。合成的基因连到 PUC57 T-载体上。

1.2.2 酵母表达载体的构建:用 *EcoR* I/*Not* I 分别双酶切 PUC57-ProK 质粒及 pPIC9K 质粒。用 1% 琼脂凝胶电泳检测,回收目的片段,与酶切后的 pPIC9K 载体连接,经酶切鉴定获得 pPIC9K-proK 表达载体。

1.2.3 毕赤酵母的转化:pPIC9K-proK 表达载体经 *Sal* I 限制性内切酶线性化后,用电转化法将其转入毕赤酵母 GS115 中,电击参数为 1 500 V、250 Ω 、25 μ F。电转结束后,30 $^{\circ}$ C 静置孵育 5–7 h,涂到 MD 板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d,直到长出转化子。

1.2.4 高拷贝转化子的筛选及 PCR 鉴定:目的基因拷贝数的增加有助于提高蛋白的表达量,为了得到高拷贝的转化子,需要进行大量筛选。随机挑取 200 个 MD 板上生长的转化子,接种到不含抗生素的 YPD 平板上培养。将这些转化子依次点种在含不同浓度 G418 (0.75、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 g/L) 的 YPD 培养板上,30 $^{\circ}$ C 培养 3–4 d。选取在 5 g/L G418 浓度的平板上长出来的菌落做 PCR 鉴定。引物使用 pPIC9K 载体的通用引物,上游引物 5'AOX-F: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'; 下游引物 3'AOX-R: 5'-GGCAAATGGCATTCTGACAT-3'。扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.5 实时定量 PCR 测定外源基因拷贝数:根据 Abad S. 等^[19]测定毕赤酵母外源基因拷贝数的方法,采用实时定量 PCR 技术对阳性转化子拷贝数进行相对定量^[20]。以蛋白酶 K 基因为目标基因,以管家基因 ACT1 基因为内参基因。利用 Primer Express 2.0 设计蛋白酶 K 基因及 ACT1 基因的引物,以 10 倍稀释的 pPIC9K-PROK 质粒及 T-ACT1 质粒(10^3 – 10^7 拷贝/ μ L)为模板进行定量 PCR 扩增,构建蛋白酶 K 及 ACT1 的校正曲线。提取转基因酵母基因组(设 3 组平行实验),以提取的基因组为模板对蛋白酶 K 基因及内参基因进行定量 PCR。根据待测试样基因及内参基因的 C_t 值及校正曲线计算出待测试样基因及内参基因的拷贝

数,目的基因拷贝数=待测基因试样拷贝数/内参基因拷贝数。

1.2.6 蛋白酶 K 的诱导表达:将经过定量 PCR 鉴定拷贝数为 5 的阳性转化子接种于 50 mL YPD 液体培养基(200 mL 摇瓶)中,在 28–30 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下,振荡培养至 OD_{600} 为 3.0 左右时,再按 1% 接种于 50 mL BMGY 培养基中(250 mL 摇瓶),28–30 $^{\circ}$ C、200 r/min,继续振荡培养直至 OD_{600} 为 2–6,取出摇瓶静置 10 h 左右,待酵母沉于摇瓶底部后,在无菌条件下将培养基倒出,加入 100 mL BMMY 液体培养基(500 mL 摇瓶),28–30 $^{\circ}$ C、200 r/min 继续振荡培养,每 24 h 补加 0.5% 甲醇。

1.2.7 蛋白酶 K 酶活测定:根据王辉等^[21]蛋白酶活性测定方法,用偶氮酪蛋白(Azocasein)作为底物测定蛋白酶活性。其原理为,在酶的作用下偶氮酪蛋白会释放发光团,通过分光光度法,在 345 nm 处可以定量测定蛋白酶的活性。过程如下:

(1) 标准曲线的制作。用蒸馏水将成品蛋白酶 K 酶粉配制成 20 U/mL 的标准酶液,按表 1 加入。

加入各种成分后,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 静置 2 h。向 0–10 组中依次加入 100 μ L 三氯乙酸(TCA),混匀后室温静置 30 min。其中对照组是先向酶液中加入 100 μ L TCA,混匀后,静置 10 min,然后再加入底物。12 000 r/min 离心 10 min,取上清,用酶标仪在 345 nm 处测定吸光值。

(2) 发酵液酶活测定。实验组将 50 μ L 2% 偶氮酪蛋白溶液和 20 μ L 稀释 10 倍的发酵液上清混匀,37 $^{\circ}$ C 保温 2 h。加入 100 μ L 三氯乙酸溶液(0.4 mol/L),混匀后静置 30 min。12 000 r/min 离心 10 min,取上清,用酶标仪在 345 nm 处测定吸光值。对照组为发酵液中先加入 100 μ L 三氯乙酸,静置 10 min 后,再加入 50 μ L 2% 偶氮酪蛋白溶液,其余操作同上。

1.2.8 SDS-PAGE 电泳:取 450 μ L 发酵液于 1.5 mL 离心管中,向发酵液中加入 1/9 体积的 100% TCA,混匀,冰浴 2 h。离心去掉上清,向沉淀中加 500 μ L 丙酮洗 1 次,风干后加少量水溶解,加适量 Loading Buffer,沸水浴 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

表 1 标准曲线的绘制
Table 1 The drawing of standard curve

序号 Serial number	蒸馏水 Distilled water (μL)	标准酶液 Standard enzyme liquid (μL)	底物 Substrate (μL)	酶活 Enzyme activity (U/mL)
0	20	0	50	0
1	18	2	50	2
2	16	4	50	4
3	14	6	50	6
4	12	8	50	8
5	10	10	50	10
6	8	12	50	12
7	6	14	50	14
8	4	16	50	16
9	2	18	50	18
10	0	20	50	20

1.2.9 摇瓶培养蛋白酶 K 表达条件的优化: 为了获得蛋白酶 K 的高效表达, 本实验对蛋白酶 K 的诱导条件进行优化。通过单因素实验, 分别对温度 (20、25、30 °C)、pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、甲醇浓度 (0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%) 进行优化, 测定酶活性, 确定最佳诱导条件。

1.2.10 发酵罐培养蛋白酶 K 的表达: 用 5 L 发酵罐进行发酵, 测定菌体生长曲线。用溶氧偶联法控制甲醇流加量, 并用气相色谱检测发酵过程中的甲醇浓度。根据摇瓶培养优化的培养条件, 发酵罐培养过程中, 菌体生长阶段温度控制在 28 °C, 诱导表达阶段温度控制在 25 °C, 整个发酵过程中 pH 控制在 7.0。上罐发酵培养基一般采用基础盐培养基 (BSM)。基础盐培养基主要成分为一些无机盐, 对酵母菌生长会有一定限制。本实验尝试采用 BMGY/BMMY 培养基进行发酵。为了降低成本, 培养基中没有添加无氨基酵母氮源 YNB (Yeast nitrogen base without amino acids), 但需向培养基中多加入一些生物素, 并用 50% 氨水和 50% 磷酸调节 pH, 氨水还可以作为酵母生长的氮源。这种培养基也得到了很好的表达效果。

发酵结束后用 BCA 法测定诱导发酵液的蛋白浓度及未诱导发酵液的蛋白浓度。蛋白酶 K 的浓度即诱导发酵液的蛋白浓度与未诱导发酵液的蛋白浓度之差。

1.2.11 蛋白酶 K 的分离纯化: 采用以下 3 种方法

进行蛋白酶 K 的分离纯化。方法 1: 取 15 mL 离心去菌体后的发酵液直接通过 Ni-NTA 亲和层析柱层析, 用含 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱 (pH 7.5), 将收集的洗脱液通过超滤除去咪唑。方法 2: 取 15 mL 离心去菌体后的发酵液先用 80% 硫酸铵沉淀后, 将沉淀溶于 0.03 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) 中, 透析过夜, 透析液为 0.03 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5), 透析结束后, 蛋白酶溶液通过 Ni-NTA 亲和层析柱层析, 用含 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱, 洗脱液通过超滤除去咪唑。方法 3: 取 15 mL 离心去菌体后的发酵液先用 40% 硫酸铵沉淀, 取上清, 再用 80% 硫酸铵沉淀, 将沉淀溶于 0.03 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 7.5) 中, 最后透析除盐。

收率及比活的计算公式如下:

$$\text{收率} = \frac{\text{纯化后所得总蛋白量}}{\text{纯化前发酵液中的总蛋白量}};$$

$$\text{比活} = \frac{\text{纯化后所得总酶量}}{\text{纯化后所得蛋白量}}。$$

1.2.12 利用重组蛋白酶 K 提取基因组 DNA: 为了测定重组蛋白酶 K 的作用, 利用蛋白酶 K 提取酵母基因组。实验设 3 组: 第 1 组不加蛋白酶 K, 为对照组; 第 2 组加蛋白酶 K (购自大连宝生物); 第 3 组加重重组蛋白酶 K。每组做 3 个平行实验。酵母裂解液按照魏庄等^[22] SDS-proteinase K 提取基因组的方法配制。方法如下: 收集菌体, 向菌体中

加入 200 μL 裂解液及干净的玻璃珠(约离心管体积的 1/2), 实验组加入 10 μL 蛋白酶 K。振荡 5 min。37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min。离心取上清, 上清液用苯酚-氯仿-异戊醇抽提 2 次。12 000 r/min 离心 5 min, 向上清液中加入预冷的无水乙醇, -80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 12 000 r/min 再次离心 10 min, 弃上清, 用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次。自然干燥, 加入 60 μL TE 缓冲液。用紫外分光光度计对 DNA 纯度进行分析。

2 结果与分析

2.1 密码子的优化

在这段优化的基因序列中, 在保持氨基酸序列

不变的前提下, 共替换了 247 个碱基。改造完成后的基因序列通过人工合成的方法获得。基因序列如图 1 所示。

2.2 酵母表达载体 pPIC9K-ProK 的构建

用 *EcoR* I / *Not* I 分别双酶切 PUC57-ProK 质粒及 pPIC9K 载体。回收目的片段, 与酶切后的 pPIC9K 载体连接。连接后的 pPIC9K-ProK 质粒用 *EcoR* I / *Not* I 双酶切验证, 结果显示(图 2), 有 1 200 bp 左右的条带出现, 说明蛋白酶 K 基因连接到了 pPIC9K 载体上, 然后将 pPIC9K-ProK 质粒送华大基因测序, 测序结果说明目的基因已连接到载体上, 且序列正确。

```

1      GAATTC|GCTCCAGCTGTTGAACAAAGATCTGAAGCTGCTCCATTGATCGAAGCTAGAGGT
1      E F A P A V E Q R S E A A P L I E A R G
61     GAAATGGTTGCTAACAAAGTACATCGTTAAGTTCAAGGAAGGTTCTGCTTTGCTGCTGTTG
21     E M V A N K Y I V K F K E G S A L S A L
121    GACGCTGCTATGGAAGATCTCTGGTAAGCCAGACCACGTTTACAAGAACGTTTTCTCT
41     D A A M E K I S G K P D H V Y K N V F S
181    GGTTTCGCTGCTACTTTGGACGAAAACATGGTTAGAGTTTTGAGAGCTCACCCAGACGTT
61     G F A A T L D E N M V R V L R A H P D V
241    GAATACATCGAACAAAGACGCTGTTGTTACTATCAACGCTGCTCAAACCTAACGCTCCATGG
81     E Y I E Q D A V V T I N A A Q T N A P W
301    GGTTTGGCTAGAACTCTTCTACTTCTCCAGTACTTCTACTTACTACTACGACGAATCT
101    G L A R I S S T S P G T S T Y Y D E S
361    GCTGGTCAAGGTTCTTGTGTTTACGTTATCGACACTGGTATCGAAGCTTTCACCAAGAG
121    A G Q G S C V Y V I D T G I E A L H Q E
421    TTCGAAGGTAGAGCTCAAATGGTTAAGACTTACTACTACTTCTAGAGACGGTAACGGT
141    F E G R A Q M V K T Y Y Y S S R D G N G
481    CACGGTACTCAGTGTGCTGCTGTTGTTTCTAGAACTTACGGTGTGTTGCTAAGAAGACT
161    H G T H C A G T V G S R T Y G V A K K T
541    CAATTGTTGCGTGTAAAGGTTTTGGACGACAACGGTTCGGTCAATACTTACTATCATC
181    Q L F G V K V L D D N G S G Q Y S T I I
601    GCTGGTATGGACTTCGTTGCTTCTGACAAGAACAACAGAACTGTCCAAGGGTGTGTT
201    A G M D F V A S D K N N R N C P K G V V
661    GCTTCTTTGCTTTGGGTGGTGTACTCTTCTTCTGTTAACTCTGCTGCTGCTAGATTG
221    A S L S L G G G Y S S S V N S A A A R L
721    CAATCTTCTGGTGTATGTTGCTGTTGCTGCTGGTAACAACAACGCTGACGCTAGAAAC
241    Q S S G V M V A V A A G N N N A D A R N
781    TACTCTCCAGCTTCTGAACCACTGTTTGTACTGTTGGTGTCTTCTGACAGATACGACAGA
261    Y S P A S E P S V C T V G A S D R Y D R
841    AGATCTTCTTCTTAACCTACGGTTCGTTTTGGACATCTTCGGTCCAGGTACTGACATC
281    R S S F S N Y G S V L D I F G P G T D I
901    TTGCTACTTGGATCGGTGTTCTACTAGATCTATCTGTTACTTCTATGGCTACTCCA
301    L S T W I G G S T R S I S G T S M A T P
961    CACGTTGCTGGTTTGGCTGCTTACTTGTACTTTGGGTAAGACTACTGCTGCTTCTGCT
321    H V A G L A A Y L M T L G K T T A A S A
1 021  TGTAGATACATCGCTGACACTGCTAACAAAGGGTGAATGTTCTAACATCCCATTCCGTTACT
341    C R Y I A D T A N K G D L S N I P F G T
1 081  GTTAACTTGTGGCTTACAACAACCTACCAAGCTCACCATCACCCACATCACTAAGCGGGCC
361    V N L L A Y N N Y Q A H H H H H H * A A
1 141  GC

```

图 1 优化后的蛋白酶 K 基因序列

Figure 1 The proteinase K gene sequence of optimized condons

注: 方框内序列分别为 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点; 划线部分为 6 个组氨酸标签。

Note: Boxed sequences indicate restriction sites *EcoR* I and *Not* I; Underlined sequences show 6×His-tag.

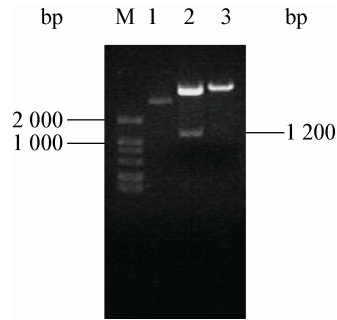


图2 重组质粒 pPIC9K-ProK 的酶切验证鉴定

Figure 2 Analysis of pPIC9K-ProK digested by *EcoR* I/*Not* I

注: M: DL2000 marker; 1: pPIC9K-ProK 质粒; 2: *EcoR* I/*Not* I 双酶切 pPIC9K-ProK 质粒; 3: *EcoR* I/*Not* I 双酶切 pPIC9K 质粒。

Note: M: DL2000 marker; 1: pPIC9K-ProK plasmid; 2: Digestion of pPIC9K-ProK plasmid by *EcoR* I and *Not* I; 3: Digestion of pPIC9K plasmid by *EcoR* I and *Not* I.

2.3 重组酵母 GS115-ProK 阳性高拷贝转化子的筛选

随机挑取 200 个 MD 板上生长的转化子(图 3), 经过含不同浓度 G418 (0.75、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 g/L)的 YPD 培养板筛选后, 在浓度为 5 g/L G418 的 YPD 板上生长出 17 个菌落。实验以 pPIC9K 空载体转化子作为对照。挑取 17 个阳性转化子及 6 个阴性转化子, 提取基因组作为模板, 用 pPIC9K 载体的通用引物(AOX-F/R)扩增, 扩增结

果见图 4, 从图 4A 中可以看出, 除 10 号没有扩增出条带外, 其他的都扩出了两条条带, 一条约 2.2 kb 的片段(菌株上的野生型 AOX1 基因), 另一条约 1 700 bp 的片段[目的基因 ProK (1 200 bp)和 Flanking AOX1 (492 bp)之和]。空载体转化子也扩增出了两条带, 一条约 2.2 kb 的片段为菌株上的野生型 AOX1 基因, 另一条约 500 bp 的片段是未插入任何序列的 Flanking AOX1 (492 bp)基因片段。若 PCR 产物有 2 条带, 一条为 AOX1 基因的 2.2 kb 条带, 另一条为目的条带, 说明 pPIC9K-ProK 质粒已经整合到毕赤酵母基因组中。

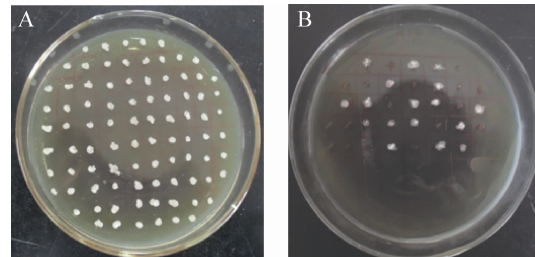


图3 G418 筛选高拷贝阳性转化子

Figure 3 Screening of high-copy positive transformants by G418

注: A: 转化子在不含 G418 的 YPD 培养基生长情况; B: 转化子在含 5 g/L G418 的 YPD 培养基的生长情况。

Note: A: The growing condition of the transformants on YPD medium without G418; B: The growing condition of transformants on YPD medium containing 5 g/L G418.

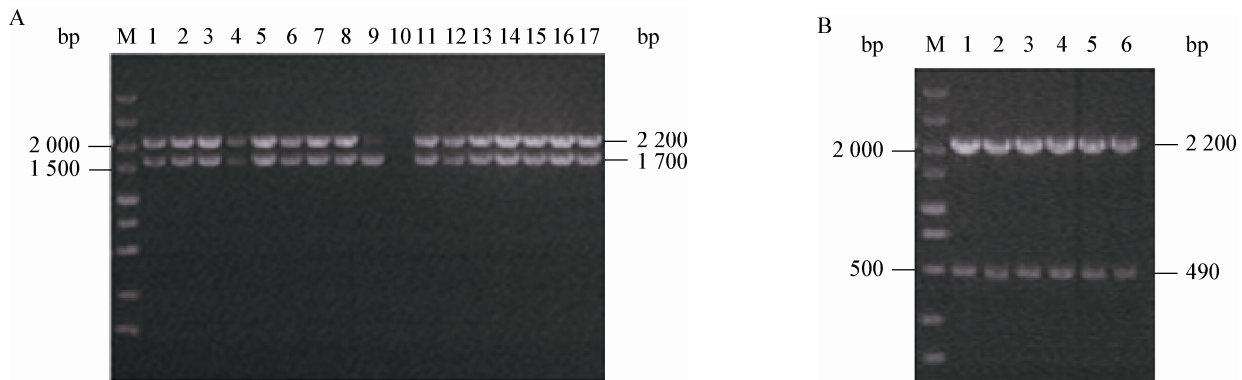


图4 转化子的 PCR 扩增分析

Figure 4 PCR amplification analysis of positive transformants and negative control

注: A: M: DL5000 marker; 1-17: pPIC9K-ProK 转化子 PCR 扩增结果. B: M: DL5000 marker; 1-6: pPIC9K 转化子 PCR 扩增结果。

Note: A: M: DL5000 marker; 1-17: PCR amplification of pPIC9K-ProK transformants. B: M: DL5000 marker; 1-6: PCR amplification of pPIC9K transformants.

2.4 SDS-PAGE 电泳分析

诱导表达 144 h 后收集发酵液,离心去菌体后,取 450 μ L 上清经 100% TCA 浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果如图 5 所示,从图 5 中可以看出,pPIC9K-ProK 载体转化的酵母在 29 kD 左右有一条条带,与成品蛋白酶 K 大小相似,而 pPIC9K 空载转化的酵母没有类似的条带。并且用偶氮酪蛋白法测定的发酵液也有活性,说明蛋白酶 K 在酵母体内实现了分泌表达。

2.5 摇瓶发酵诱导条件的优化

实验对诱导时间进行了测定,并对诱导条件包括甲醇浓度、pH、温度进行了优化。结果表明,在 120 h 时,蛋白酶 K 表达量最高。在进行条件优化时,将重组酵母菌在不同诱导条件下培养,取发酵 120 h 的发酵液测定酶活。活性大小比较见图 6。从图 6 中可以看出,在 pH 为 7.0、温度为 25 $^{\circ}$ C 条件下表达量最高,而甲醇浓度对蛋白酶 K 表达量影响不大,选择甲醇浓度为 0.75% 作为诱导浓度。

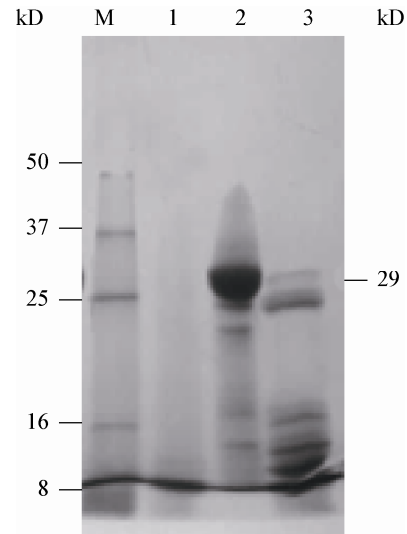


图 5 蛋白酶 K 的诱导表达

Figure 5 The SDS-PAGE analysis of proteinase K expressed by yeast

注: M: 蛋白 Marker; 1: 对照组发酵液上清; 2: 阳性转化子发酵液上清; 3: 成品蛋白酶 K (购自大连宝生物公司)。

Note: M: Protein marker; 1: Supernatant of negative control; 2: Supernatant of positive transformants; 3: Proteinase K purchased from TaKaRa biotechnology (Dalian).

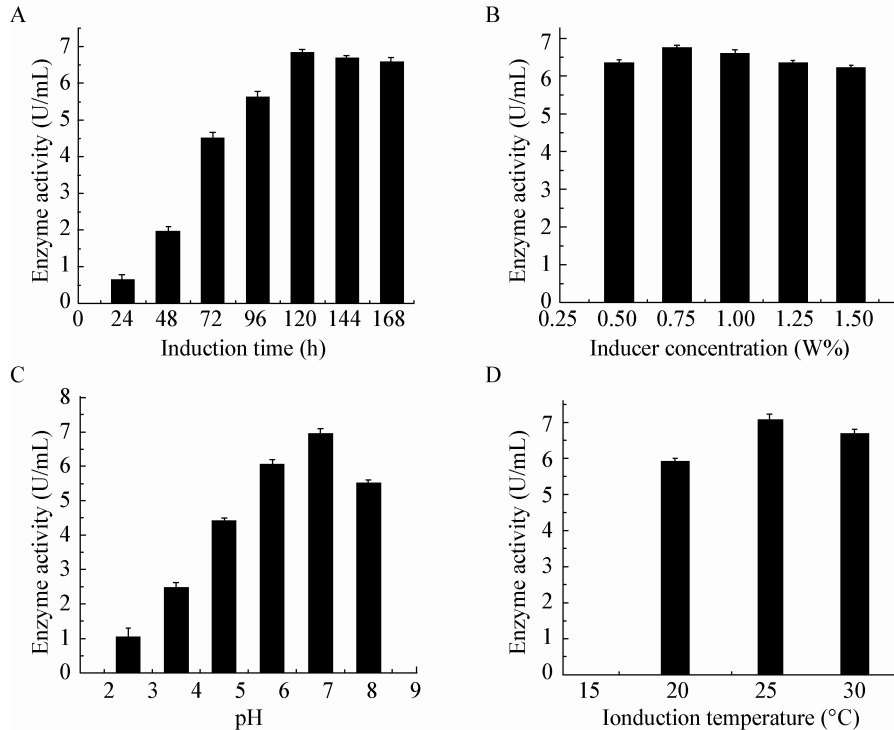


图 6 诱导时间(A)、诱导剂浓度(B)、诱导培养基 pH (C)、诱导温度(D)对蛋白酶 K 表达量的影响

Figure 6 Effect of induction time (A), inducer concentration (B), pH of medium (C) and induction temperature (D) on the expression level of proteinase K

2.6 发酵罐培养蛋白酶 K 的表达

在菌体生长阶段, 温度设为 28 °C, pH 为 7.0, 通气为 0.9 V/(V·min), 转速为 330 r/min。上罐 16 h 左右, 溶氧 DO 突然上升, 说明发酵罐内原有的甘油已消耗尽, 补加甘油使菌体继续生长至菌体浓度不再增加。此时菌体密度 OD_{600} 吸光值为 20 左右, 停止补加甘油, 饥饿 20 min 后开始补加甲醇诱导, 甲醇的补加和 DO 偶联, 当溶氧高于 35% 时补加甲醇。利用优化的条件, 蛋白酶 K 的表达量可以达到 2.2 g/L。

2.7 蛋白酶 K 的分离纯化

利用 3 种分离纯化方法进行纯化, 这 3 种方法分别是方法 a: 将去菌体的发酵液直接通过 Ni-NTA 亲和层析柱层析。方法 b: 将去菌体的发酵液用 80% 硫酸铵沉淀后, 透析, 然后再用 Ni-NTA 亲和层析柱层析。方法 c: 将去菌体后的发酵液先经 40% 硫酸铵沉淀去杂蛋白, 再经 80% 硫酸铵沉淀, 透析。比较不同分离纯化方法所得的收率及比活, 结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出, 将去菌体后的发酵液直接利用 Ni-NTA 亲和层析柱层析, 纯化后蛋白酶 K 的得率最高, 能达到 84%, 并且酶的比活也比较高, 为 175 U/mg。由此可以看出, 可以利用这种方法直接纯化蛋白酶 K, 无需对发酵液进行其他处理。这种方法简单可行, 简化了传统方法中利用超滤-阳离子柱交换-超滤-阴离子柱交换等分离纯化步骤, 从而减少了蛋白酶在这些纯化步骤中的丢失。

将离心后的发酵液经过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后, 分别收集穿透峰、洗脱峰, 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出, 在洗

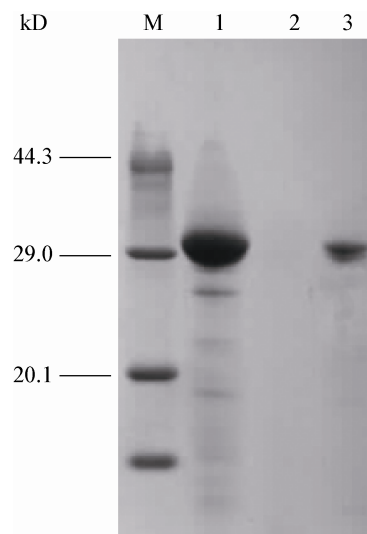


图 7 蛋白酶 K 的纯化

Figure 7 SDS-PAGE analysis of purified proteinase K

注: M: 蛋白 Marker; 1: 上清液; 2: 穿透峰; 3: 洗脱峰。

Note: M: Protein marker; 1: Supernatant; 2: The penetrate peak; 3: Elution peak.

脱液中蛋白酶 K 被洗脱出来, 流出液中没有蛋白酶 K 出现。说明表达的蛋白酶 K 可以通过亲和层析的方法纯化。

2.8 利用蛋白酶 K 提取基因组 DNA

用紫外分光光度计分别测定 DNA 样品纯度, 结果如表 3 所示, 对照组 A_{260}/A_{280} 的比值均低于 1.6, 说明 DNA 提取过程中, 蛋白质降解不彻底。而两组加蛋白酶 K 的实验中, A_{260}/A_{280} 的比值都在 1.8 左右, 说明提取的 DNA 较纯净。以上实验数据说明重组蛋白酶 K 与天然蛋白酶 K 具有相似的功能, 可以应用于实际应用中。

3 讨论

蛋白酶 K 具有较高的应用价值, 但在天然宿主菌中的表达量很低, 给蛋白酶 K 的工业应用带来一定的限制, 所以利用基因工程技术实现蛋白酶 K 的高效表达成了目前研究的重点。Gunkel 曾利用大肠杆菌作为宿主菌表达蛋白酶 K, 虽能检测到活性, 但表达量极低。酵母表达系统作为一种真核表达系统, 与原核表达系统相比, 具有很多优势, 如可以分泌表达、能够对外源蛋白进行翻译后的加工修饰、表达量高等。

表 2 不同分离纯化方法的收率及比活比较
Table 2 Comparison of yield and specific activity of different methods for purifying

方法 Methods	收率 Yield (%)	比活 Specific activity (U/mg)
a	84.0	175
b	60.5	178
c	72.3	66

表3 DNA 样品紫外吸收值
Table 3 Ultraviolet absorption of DNA specimen

方法 Methods	样品 Samples	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
不加蛋白酶 K	1	0.137	0.088	1.567
Without proteinase K	2	0.770	0.487	1.581
	3	0.527	0.349	1.510
加入成品蛋白酶 K	4	0.153	0.086	1.779
With proteinase K	5	0.421	0.233	1.807
	6	0.270	0.153	1.765
加入重组蛋白酶 K	7	0.455	0.248	1.835
With recombinant proteinase K	8	0.487	0.271	1.797
	9	0.395	0.224	1.763

本实验利用酵母表达系统表达蛋白酶 K,通过分析影响表达量的因素,并对这些因素进行了优化,包括蛋白酶 K 密码子序列及发酵条件等,使蛋白酶 K 的最终表达量达到 2.2 g/L 发酵液,比现有工业生产蛋白酶 K 的产量(0.3–0.5 g/L)高 4–7 倍。传统蛋白酶 K 分离纯化方法多采用超滤-阳离子柱-超滤-阴离子柱等步骤,工艺复杂,收率低。本实验在蛋白酶 K 基因 3'端加上了 6 个组氨酸标签,可以通过亲和层析的方法进行纯化。实验通过比较不同的纯化方法,发现直接将去菌体后的发酵液通过 Ni-NTA 亲和层析柱层析,可以得到较高的回收率,回收率可以达到 84%,比活可以达到 175 U/mg。这种方法简单可行,大大简化了分离纯化工艺,提高了收率及酶的纯度。本实验对蛋白酶 K 的表达及纯化方法进行了探索,为以后蛋白酶 K 的工业生产提供了依据。

另外,枯草芽孢杆菌作为一种基因工程宿主菌,对其基因操作技术也日益成熟^[23]。并且枯草芽孢杆菌本身具有分泌丝氨酸蛋白酶的能力,蛋白酶 K 作为一种丝氨酸蛋白酶,利用枯草芽孢杆菌作为宿主菌表达蛋白酶 K 也是今后的一个研究方向。通过基因改造的方法改变酶的性质,如提高酶活性、改变对环境的耐受性等也是现阶段蛋白工程研究的重点^[24],也为以后蛋白酶 K 的生产指明了方向。

参 考 文 献

- [1] Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, et al. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(1): 91-97.
- [2] 王会品, 王孝力, 杨巍, 等. 蛋白酶 K-Chelex100法提取肋软骨 DNA 技术的优化[J]. 中国法医学杂志, 2012, 27(1): 54-55.
- [3] 孔啸兰, 陈作志, 林琳, 等. 福尔马林固定鱼类标本 DNA 提取方法的优化[J]. 中国水产科学, 2012(6): 1068-1073.
- [4] 樊竑治, 彭忠禄, 谢华平, 等. 斑马鱼整体原位杂交的技术改良[J]. 激光生物学报, 2010, 19(1): 115-119.
- [5] Sajnani G, Requena JR. Prions, proteinase K and infectivity[J]. Prion, 2012, 6(5): 430-432.
- [6] 吕文洲, 杨清香, 张昱, 等. 蛋白酶对水环境中病毒的灭活作用[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 93-96.
- [7] Liu SQ, Tao Y, Meng ZH, et al. The effect of calciums on molecular motions of proteinase K[J]. Journal of Molecular Modeling, 2011, 17(2): 289-300.
- [8] Betzel C, Gourinath S, Kumar P, et al. Structure of a serine protease proteinase K from *Tritirachium album* limber at 0.98 Å resolution[J]. Biochemistry, 2001, 40(10): 3080-3088.
- [9] Chatake T, Ishikawa T, Yanagisawa Y, et al. High-resolution X-ray study of the effects of deuteration on crystal growth and the crystal structure of proteinase K[J]. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2011, 67(Part 11): 1334-1338.
- [10] Liu SQ, Meng ZH, Fu YX, et al. Insights derived from molecular dynamics simulation into the molecular motions of serine protease proteinase K[J]. Journal of Molecular Modeling, 2010, 16(1): 17-28.
- [11] Fortelius C, Markkanen P. Nutritional regulation of proteinase production in the fungus, *Tritirachium album*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000,

- 24(6): 369-373.
- [12] Gunkel FA, Gassen HG. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*[J]. European Journal of Biochemistry, 1989, 179(1): 185-194.
- [13] Mueller R, Thalhofer J, Geipel F, et al. Expression of recombinant proteinase K from *Tritirachium album* in yeast: United States, 7 368 274 B2[P]. 2008-05-6.
- [14] 陆永超, 蒋琳. 毕赤酵母高效表达策略概述[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(1): 70-76.
- [15] Yang J, Liu L. Codon optimization through a two-step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger* lip2 gene in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 63(3): 164-169.
- [16] Wu AB, Chen HD, Tang ZZ, et al. Synthesis of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene using yeast preferred codons and its expression in *Pichia pastoris*[J]. Chemico-Biological Interactions, 2008, 175(1): 403-405.
- [17] Xiong A, Yao Q, Peng R, et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 1039-1047.
- [18] 陈惠, 赵海霞, 王红宁, 等. 植酸酶基因中稀有密码子的改造提高其在毕赤酵母中的表达量[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(2): 171-175.
- [19] Abad S, Kitz K, Hörmann A, et al. Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(4): 413-420.
- [20] Li S, Sing S, Wang Z. Improved expression of *Rhizopus oryzae* α -amylase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2011, 79(1): 142-148.
- [21] 王辉, 吕加平, 迟玉杰. Azocasein 法测定嗜冷菌耐热胞外蛋白酶活性研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(7): 13-16.
- [22] 魏庄, 李惠霞, 李敏权. 4种禾谷孢囊线虫基因组 DNA 提取方法的比较和改进[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 47(6): 63-67.
- [23] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(9): 111-114.
- [24] Ji X, Lu W, Zhou H, et al. Covalently dimerized Camelidae antihuman TNF α single-domain antibodies expressed in yeast *Pichia pastoris* show superior neutralizing activity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19): 8547-8558.

~~~~~

## 编辑部公告

### 《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。