

生物工程

裂殖壶菌脂肪酶基因克隆及底物特异性研究

麻梅梅^{1,2}, 张涛^{1,2}, 刘睿杰^{1,2}, 常明^{1,2}, 金青哲^{1,2}, 王兴国^{1,2}

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:裂殖壶菌甘油三酯合成和水解的过程中, 脂肪酶起着重要的作用。根据同源性分析结果, 筛选得到裂殖壶菌脂肪酶基因 *STGL2*。以 cDNA 为模板获得 *STGL2* 脂肪酶基因, 将其连接到 pPIC9K 载体上, 得到重组质粒 pPIC9K - *STGL2*, 并在毕赤酵母中表达; 系统分析了重组脂肪酶 (Stgl2p) 的底物特异性。结果表明: *STGL2* 脂肪酶基因在毕赤酵母中成功表达; 裂殖壶菌脂肪酶 Stgl2p 的最适底物为对硝基苯酚月桂酸酯 (*p*-NPL), 其最适 pH 为 7.5, 最适反应温度为 35 °C。综上所述, 脂肪酶 Stgl2p 在裂殖壶菌细胞内对甘油三酯中长碳链脂肪酸的水解起着重要的作用。

关键词:裂殖壶菌; 脂肪酶基因; 毕赤酵母; 底物特异性

中图分类号: Q812; Q819

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)10-0129-05

Gene cloning of lipase from *Schizochytrium* sp. and substrate specificity analysisMA Meimei^{1,2}, ZHANG Tao^{1,2}, LIU Ruijie^{1,2}, CHANG Ming^{1,2},
JIN Qingzhe^{1,2}, WANG Xingguo^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Lipases play an important role in the synthesis and hydrolysis of triglycerides in *Schizochytrium* sp. According to the results of homology analysis, lipase gene *STGL2* from *Schizochytrium* sp. was screened out. The lipase gene *STGL2* was obtained with cDNA as a template, then it was inserted into the expression vector pPIC9K to obtain recombinant plasmid pPIC9K - *STGL2* and transformed into *Pichia pastoris* SMD1168. The substrate specificity of recombinant lipase (Stgl2p) was analyzed systematically. The results showed that the lipase gene *STGL2* was successfully expressed in *Pichia pastoris*. The optimal substrate for lipase Stgl2p was *p*-nitrophenol laurate (C_{12}), and the optimal pH and temperature were 7.5 and 35 °C respectively. In conclusion, lipase of Stgl2p played an important role in the hydrolysis of medium-long chain fatty acids in triglyceride in *Schizochytrium* sp.

Key words: *Schizochytrium* sp.; lipase gene; *Pichia pastoris*; substrate specificity

脂肪酶 (Lipase, E. C. 3.1.1.3, 三酰基甘油酰水解酶) 属于 α/β 水解酶家族, 是一类可在油水界面上催化天然油脂底物水解或合成的生物催化剂, 是具有活性中心 -G-X-S-X-G- 区的保守五肽序列^[1-2], 在油脂加工、精细化工、纺织、制药、食品工业、皮革、洗涤剂等多个领域得到广泛应用^[3]。

裂殖壶菌 (*Schizochytrium*) 是一种单细胞异养微

藻, 由于胞内可积累高安全性、高纯度的油脂, 被认为是目前工业化生产二十二碳六烯酸 (DHA) 最理想菌株之一^[4-5]。目前关于裂殖壶菌的研究主要集中在高产菌株的筛选、发酵条件的优化和诱变育种 3 个方面, 对其胞内脂质代谢的调控机制还不了解, 这阻碍了裂殖壶菌生产 DHA 的进一步发展^[6-7]。Chang 等^[8] 研究结果表明, 裂殖壶菌发酵后期脂肪酸合成酶 (FAS) 产物 ($C_{12} \sim C_{18}$) 会被优先水解, 从而促使聚酮合成酶 (PKS) 产物 ($C_{20} \sim C_{22}$) 在胞内得到有效富集。上述现象可能涉及裂殖壶菌胞内的特异性脂肪酶参与。为探究裂殖壶菌脂肪酶基因的特

收稿日期: 2018-01-10; 修回日期: 2018-05-29

作者简介: 麻梅梅 (1992), 女, 在读硕士, 研究方向为微生物油脂 (E-mail) 1624964390@qq.com。

通信作者: 常明, 副教授 (E-mail) changming@aliyun.com。

质,本文通过基因序列分析,筛选了1个脂肪酶基因,对其进行了克隆和表达,系统分析了其酶学性质,以期在分子水平阐释裂殖壶菌发酵后期脂质迁移的分子机制,进一步发掘裂殖壶菌脂肪酶潜在工业应用价值。

本课题组前期初步筛选了裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S31 胞内若干可能的脂肪酶编码基因^[9]。本文根据脂肪酶基因序列同源性分析,确定了以 *STGL2* 作为研究对象,利用反转录得到了 *Schizochytrium* sp. S31 脂肪酶基因的 cDNA 片段,以 cDNA 为模板经 PCR 克隆扩增得到目的基因,并构建重组质粒 pPIC9K - *STGL2*,电转法转入毕赤酵母得到重组酵母转化子,实现了裂殖壶菌脂肪酶的外源性表达。最后,本文研究了重组脂肪酶 Stgl2p 的酶学性质,确定了其底物特异性。为解释裂殖壶菌在发酵后期脂质返耗的分子机制提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、毕赤酵母 *Pichia pastoris* SMD1168,江南大学国家工程实验室;表达载体 pPIC9K,美国 Invitrogen 公司;裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S31,美国标准菌种收藏中心;高保真 Pfu 酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I、质粒提取试剂盒,上海生工公司;RNAiso,宝生物(大连)有限公司;FastQuant RT Kit (with gD-Nase),天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Green Supermix,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;不同碳链长度的对硝基苯酚酯,美国 Sigma 公司;其他常规试剂,国药集团;引物,苏州泓迅生物科技有限公司。

大肠杆菌, LB 培养基培养;酵母转化子, YPD 和罗丹明 B 培养基筛选;酵母, BMGY 和 BMMY 培养。实验用培养基参照 Invitrogen 公司酵母表达手册。

Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机,德国艾本德股份公司;电穿孔仪,美国 Bio - Rad 公司;T100PCR 扩增仪、电泳仪、GelDoxXR + 凝胶成像仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 裂殖壶菌 cDNA 的制备

裂殖壶菌 RNA 的提取:将 0.2 g 的菌丝体加入到预冷的研钵中研磨,移入已灭 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,按照 Total RNA 提取试剂盒方法提取。第一链 cDNA (反转录反应)按照 FastQuant RT Kit (with gDNase)试剂盒说明书进行,得到的 cDNA 于

-80 °C 保存。

1.2.2 裂殖壶菌脂肪酶基因克隆

根据裂殖壶菌脂肪酶基因序列设计引物上游引物:5' - CAGCGAATTCATGGACCGCGATGCCGAC-CCCCAGT - 3' 和下游引物:5' - TAATTCGCGGC-CGCTCAATTTTCGACAGCGTCATCA - 3',以裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. S31 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min 后,分别于 94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 1 min,共 33 个循环,最后在 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经凝胶电泳鉴定正确后纯化回收存于 -20 °C 备用。

1.2.3 重组质粒 pPIC9K - *STGL2* 的构建

将 pPIC9K 质粒和目的基因 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切,纯化后用 T₄ DNA 连接酶连接酶切产物,置于 16 °C 过夜,然后用 CaCl₂ 转化法转入 *E. coli* DH5 α ,在含 25 μ g/mL Zeocin 的 LB 培养基平板上涂板,37 °C 培养 20 h。挑取过夜培养后的阳性转化子提取质粒,进行双酶切及 *EcoR* I 单酶切鉴定。将阳性质粒送苏州泓迅生物科技有限公司测序。

1.2.4 毕赤酵母的转化和转化子的筛选

1.2.4.1 毕赤酵母的转化

将构建成功的重组质粒 pPIC9K - *STGL2* 和 pPIC9K 用限制性内切酶 *Sal* I 单酶切线性化,用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,用电转化法转化到 *Pichia pastoris* SMD1168。重组转化子的筛选鉴定及诱导表达参照 Invitrogen 公司的 Multi - Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册进行。

1.2.4.2 转化子的筛选

将电转后的酵母吸到 1.5 mL 离心管,冰上放置 15 min。将离心管放到 30 °C 培养箱中孵育 1 h 后涂布于 MD 平板,30 °C 培养 48 h 后挑取 MD 平板上的转化子进行菌落 PCR 验证,将阳性转化子用罗丹明 B 平板进行初筛^[10]。参照橄榄油乳化法^[11],以中长碳链甘油三酯(MCT)为底物,在 pH 7.5、37 °C 条件下反应 12 h,用高效液相色谱(HPLC)进行定性检测。

1.2.5 裂殖菌重组脂肪酶基因的表达、纯化和酶学性质分析

1.2.5.1 重组酵母菌的诱导表达

重组酵母菌的诱导表达参考 Koffel 等^[12]的方法。将重组转化子和对照菌(pPIC9K 转化的 *Pichia pastoris* SMD1168 菌株)接种于 20 mL BMGY 培养基中,250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 达到 2 ~ 6 (20 ~ 24 h)。3 000 g 离心 5 min 收集菌体,再将其重悬浮于

BMMY 培养基中,稀释至 OD_{600} 约为 1.0,继续振荡培养,每隔 12 h 加 0.5% 甲醇(终浓度)进行诱导表达,将发酵液 13 000 r/min,离心 15 min 取上清液,获得粗酶液,同时测定粗酶液的酶活,确定最佳发酵时间。采用对硝基苯酚法测定脂肪酶活性^[13],以对硝基苯酚月桂酸酯(p -NPL)为底物,在试验条件下反应 10 min,用酶标仪测吸光度,根据标准曲线计算酶活。酶活力定义为试验条件下,每分钟分解底物产生 1 μ mol 对硝基苯酚定义为一个酶活单位。

1.2.5.2 重组脂肪酶分离纯化

重组脂肪酶的纯化参照报道的方法进行^[14]。将粗酶液用截留相对分子质量为 10 kDa 的半透膜进行浓缩,随后加入终浓度为 500 nmol/L 的 NaCl。将上述酶液加到用 50 nmol/L 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液平衡的 HisTrapTM Fast Flow Ni 亲和层析柱纯化,经过透析袋脱盐,超滤管浓缩后经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证^[15]。

1.2.5.3 重组脂肪酶的活性分析

为确定温度和 pH 对重组脂肪酶活性的影响,取 1.2.5.2 中 250 μ L 纯化的酶液,以 p -NPL 为底物,分别测定在 pH 7.5、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 中,重组脂肪酶在不同温度条件下(25、30、35、40、45、50、55 $^{\circ}$ C)的酶活。定义最适温度下酶活为 100%,计算其他温度条件下的相对酶活。在 0.05 mol/L Tris-HCl、35 $^{\circ}$ C 条件下,分别测定不同缓冲液体系中脂肪酶的活性。定义最适 pH 下的酶活为 100%,计算其他 pH 条件下的相对酶活力^[16]。pH 设定为 5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0,缓冲体系分别为:pH 5~7 为柠檬酸-磷酸钠缓冲液,pH 7.5~9 为 Tris-HCl。

1.2.5.4 重组脂肪酶的底物特异性分析

为测定重组脂肪酶对不同碳链长脂肪酸的偏好性,以对硝基苯酚丁酸酯(C_4 , p -NPB)、对硝基苯酚辛酸酯(C_8 , p -NPC)、对硝基苯酚月桂酸酯(C_{12} , p -NPL)、对硝基苯酚豆蔻酸酯(C_{14} , p -NPM)、对硝基苯酚棕榈酸酯(C_{16} , p -NPP)、对硝基苯酚硬脂酸酯(C_{18} , p -NPS)为底物,在 pH 7.5、35 $^{\circ}$ C 条件下反应 10 min,用酶标仪在 405 nm 测吸光度,根据标准曲线计算酶活。以测定酶活最高时的底物酶活为 100%,计算其他底物的相对酶活。

2 结果与讨论

2.1 裂殖壶菌脂肪酶基因序列分析及克隆

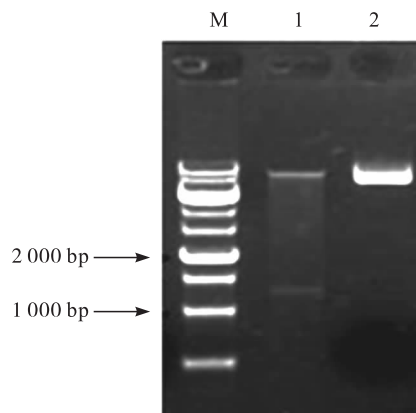
通过基因序列以及氨基酸同源性分析,从裂殖壶菌基因组中初步筛选了 1 个脂肪酶 Stgl2p,该脂肪酶基因含有脂肪酶活性中心-G-D-S-S-

G-区的保守五肽序列。通过脂肪酶 Stgl2p 与酿酒酵母脂肪酶的氨基酸序列对比结果表明:STGL2 与已经报道的酿酒酵母 Tgl3p、Tgl4p、Tgl5p 的氨基酸序列分别有 21%、24% 和 19% 的相似性,不同物种之间脂肪酶编码产物同源性极低,该脂肪酶没有被研究开发。这些性质预示着该酶可能具有特殊的性质。

以 RNA 为模板,经过反转录和 PCR 扩增,获得约为 1 300 bp 大小的条带。构建克隆载体,DNA 测序表明目的基因插入成功。扩增产物与原始序列对比表明:克隆得到的 STGL2 基因大小 1 290 bp,不含内含子,编码 430 个氨基酸,编码一个相对分子质量为 47.7 kDa 大小的蛋白。

2.2 重组质粒 pPIC9K-STGL2 的构建

用限制性内切酶 EcoR I 和 Not I 分别对质粒 pPIC9K 和 PCR 产物进行双酶切,回收约 9.3 kb 的 pPIC9K 质粒和 1.3 kb 目的基因片段。产物纯化后进行连接,随后转化到 DH5 α 感受态细胞中。提取重组质粒,分别用 EcoR I 和 Not I 双酶切以及 EcoR I 单酶切后进行琼脂糖凝胶电泳分析,得到条带为 1 300 bp 大小片段,电泳结果显示正确(见图 1),测序结果表明插入基因全长为 1 290 bp,与拟克隆的 STGL2 序列一致。以上试验结果表明:表达载体 pPIC9K-STGL2 构建成功。



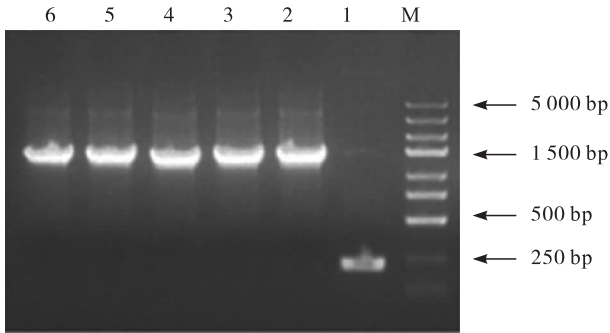
注: M. DNA Marker; 1. EcoR I 和 Not I 双酶切产物; 2. EcoR I 单酶切产物。

图 1 重组质粒 pPIC9K-STGL2 酶切验证

2.3 毕赤酵母的转化以及阳性克隆筛选

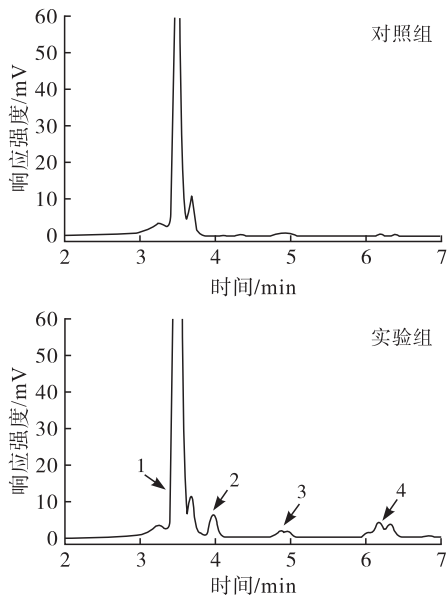
重组质粒 pPIC9K-STGL2 经 Sal I 线性化后经纯化试剂盒纯化,电转染到 *Pichia pastoris* SMD1168,电转条件为电压 2 000 V、电阻 400 Ω 、脉冲时间 10 ms。涂布于 MD 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 48 h。使用 pPIC9K 通用引物 pGAPZ α -seqR/F 进行菌落 PCR 验证(见图 2),结果与预期相符。将阳性克隆用罗丹明 B 平板进行初筛,选取了活性较高的菌

株。以 MCT 为底物,参照 1.2.4.2 通过高效液相色谱进行定性检测。试验结果如图 3 所示。由图 3 可看出,重组脂肪酶催化反应一定时间后,有脂肪酸生成,表明该重组脂肪酶具有脂肪酶活性。作为下一步摇瓶培养的出发菌种。



注:M. DNA Marker;1. 空载菌株菌落 PCR;2~6. 阳性克隆菌株菌落 PCR。

图 2 阳性克隆菌落 PCR 验证



注:1. 甘三酯;2. 脂肪酸;3. 1,2-甘二酯;4. 1,3-甘二酯。

图 3 脂肪酶活性的高效液相色谱图

2.4 重组酵母诱导表达及脂肪酶活性测定

将 1.2.5.1 粗酶液冷冻干燥,测定酶活,结果见图 4。由图 4 可以看出,重组酵母菌分泌的脂肪酶活性随发酵时间延长而增加,诱导发酵 84 h 后,发酵液中酶活达到最大。这是由于随着发酵时间的延

长,菌体密度不断增加,发酵液中的重组酶蛋白含量逐渐增加,酶活逐渐升高。当发酵时间超过 84 h 后,培养基中碳源和氮源的消耗殆尽,菌体密度达到最大,重组酶蛋白分泌减少,部分重组脂肪酶被分解,脂肪酶活性降低。

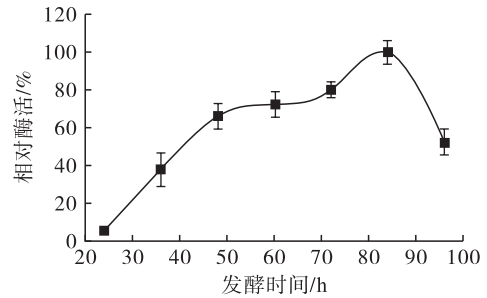
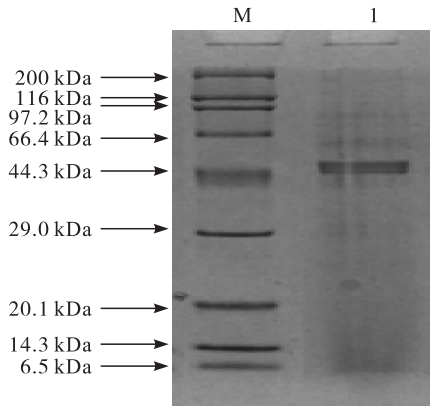


图 4 发酵时间对重组脂肪酶活性的影响

2.5 重组脂肪酶的 SDS-PAGE 分析

重组酵母 SMD1168/pPIC9K-STGL2 发酵上清液按照 1.2.5.2 的方法纯化后,最终收率为 10.2%。样品经 SDS-PAGE 分析,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出,SDS-PAGE 电泳后,在约 47.7 kDa 的位置有蛋白条带,与目的蛋白条带大小相符。



注:M. 蛋白 Marker;1. 纯化后的重组脂肪酶。

图 5 重组脂肪酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

2.6 重组脂肪酶的酶学性质

2.6.1 重组脂肪酶的最适 pH

不同来源的脂肪酶具有不同的最适反应条件,根据 1.2.5.3,测定不同 pH 和不同温度对酶活的影响,结果如图 6 所示。

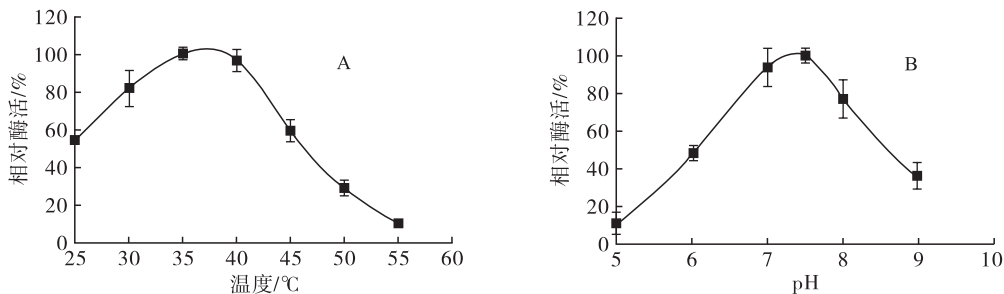


图 6 温度和 pH 对重组脂肪酶酶活的影响

由图6(A)可以看出,在pH 7.5条件下,25~35℃,重组脂肪酶的活性逐渐上升;温度高于35℃后脂肪酶活性逐渐下降,结果表明重组脂肪酶最适反应温度35℃。由图6(B)可以看出,在35℃条件下,pH在5~7.5之间,随着pH的升高,重组脂肪酶的活性逐渐升高,当pH大于7.5时,脂肪酶活性急剧下降,说明重组脂肪酶的最适pH为7.5。

2.6.2 重组脂肪酶的底物特异性

按1.2.5.4进行重组脂肪酶的底物特异性分析,结果如图7所示。由图7可以看出,重组脂肪酶Stgl2p对不同的对硝基苯酚的选择性差异较大,重组脂肪酶对中长碳链(C₈、C₁₂)有较好的作用,最适底物为对硝基苯酚月桂酸酯(*p*-NPL),酶活为10.90 U/mL,其次为对硝基苯酚辛酸酯(*p*-NPC)。当碳链长度大于12时,重组脂肪酶活性显著降低。与C₄、C₁₄、C₁₆、C₁₈相比,脂肪酶Stgl2p对C₁₂的酶活力高出3~4倍。

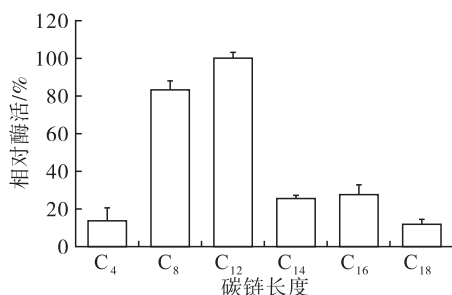


图7 重组脂肪酶的底物特异性

3 结论

本文通过同源性分析,筛选了裂殖壶菌中的1个脂肪酶基因STGL2。通过反转录法获得cDNA,并成功在毕赤酵母中表达。通过活性平板及液相定性证明重组脂肪酶Stgl2p有脂肪酶活性,对硝基苯酚法确定了最佳发酵时间为84 h,最适反应温度为35℃,最适pH为7.5,重组脂肪酶的最适底物为对硝基苯酚月桂酸酯(*p*-NPL),重组脂肪酶对不同碳链长度的活性由高到低依次是C₁₂、C₈、C₁₆、C₁₄、C₄、C₁₈。上述结果表明重组脂肪酶在裂殖壶菌细胞内对甘油三酯中长碳链脂肪酸的水解起着重要的作用,为解释裂殖壶菌在发酵后期脂质返耗的分子机制提供了参考依据。

参考文献:

[1] JAEGER K E, REETZ M T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(9): 396-403.
[2] SALIHU A, ALAM M Z. Solvent tolerant lipases: a review [J]. Process Biochem, 2015, 50(1): 86-96.

[3] HASAN F, SHAH A A, HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme Microbial Technol, 2006, 39(2): 235-251.
[4] 常桂芳. 甘油为碳源裂殖壶菌产DHA代谢机理及规模化高密度发酵调控的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2013.
[5] AMO F, LDG M, CARVALHO J C. Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3[J]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37(5): 656-671.
[6] LIN J, CAI X, TANG M. Preparation and evaluation of the chelating nanocomposite fabricated with marine algae *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate and calcium[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(44): 9704-9714.
[7] 王澍, 吕小义, 张静雯, 等. 不同碳氮源浓度和培养温度对裂殖壶菌产DHA的影响[J]. 中国油脂, 2015, 40(10): 74-77.
[8] CHANG G, LUO Z, GU S. Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochytrium* sp. S31 cultured on glycerol[J]. Bioresour Technol, 2013, 142(8): 255-260.
[9] 娄菲. 裂殖壶菌关键脂肪酶基因的转录和表达研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2017.
[10] HIOL A, JONZO M D, RUGANI N. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit [J]. Enzyme Microbiol Technol, 2000, 26(6): 421-430.
[11] 舒正玉. 黑曲霉脂肪酶的酶学性质、基因克隆与表达及结构预测[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
[12] KOFFEL R, TIWARI R L, SCHNEITER R. The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for sterol ester hydrolysis [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(5): 1655-1668.
[13] GUPTA N, RATHI P, GUPTA R. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases[J]. Analyt Biochem, 2002, 311(1): 98-99.
[14] BURKERT J M F, RODRIGUES M I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design [J]. Bioresour Technol, 2004, 91(1): 77-84.
[15] WANG J R, LI Y Y, LIU D. Gene cloning, high-level expression, and characterization of an alkaline and thermostable lipase from *Trichosporon coremiforme* V3[J]. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(6): 845-855.
[16] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.