

## 来源于 *Escherichia coli* 的高比活植酸酶基因的高效表达

罗会颖<sup>1</sup> 姚 斌<sup>1\*</sup> 袁铁铮<sup>1</sup> 王亚茹<sup>1</sup> 史秀云<sup>1</sup> 伍宁丰<sup>2</sup> 范云六<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘 要** 高效表达高比活植酸酶是进一步提高植酸酶发酵效价、降低植酸酶生产成本的一个有效途径。对源于 *Escherichia coli* 的高比活植酸酶基因 *appA* 按照毕赤酵母(*Pichia pastoris*)密码子的偏爱进行了密码子优化改造。该改造后的基因 *appA-m* 按正确的阅读框架融合到毕赤酵母表达载体 pPIC9 上的  $\alpha$ -因子信号肽编码序列 3'端, 通过电击转化得到重组转化子。对重组毕赤酵母的 Southern blotting 分析证实植酸酶基因已整合到酵母基因组中, 并确定了整合基因的拷贝数。Northern blotting 分析证实植酸酶基因得到了正常转录。SDS-PAGE 分析和表达产物的研究表明, 植酸酶得到了高效分泌表达, 在 5L 发酵罐中植酸酶蛋白表达量达到 2.5mg/mL 发酵液, 酶活性(发酵效价)达到  $7.5 \times 10^6$  IU/mL 发酵液以上, 大大高于目前报道的各种植酸酶基因工程菌株的发酵效价。

**关键词** 高比活植酸酶, 基因改造, 毕赤酵母, 高效表达

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0078-07

植酸酶(肌醇六磷酸酶)是能够将植酸(肌醇六磷酸)分解为肌醇和无机磷的一类酶的总称。植酸是谷物、豆类及油料等作物中磷的主要贮存形式, 占总磷量的 18%~88%<sup>[1]</sup>。单胃动物和人缺少分解植酸的酶而不能利用该种形式的磷, 为了满足动物正常的生长、代谢需要, 必须在动物的饲料中添加无机磷, 这不仅造成了磷源的浪费, 而且植酸磷随动物的粪便排出体外造成环境的磷污染。植酸还是一种抗营养因子, 它能和一些金属离子和蛋白质螯合形成不溶性的复合物从而影响了畜禽对这些物质的吸收利用<sup>[2]</sup>。在畜禽日粮中添加植酸酶能有效提高植酸磷的利用率、降低磷污染并消除植酸的抗营养作用, 其饲喂效果已得到了广泛的验证<sup>[3-4]</sup>。

植酸酶广泛存在于动物、植物和微生物中, 目前实际应用的植酸酶均来源于微生物。由于植酸酶在天然菌株中的产量很低, 目前用于植酸酶生产的菌株均为单位表达量已较天然菌株大幅度提高的基因工程菌, 植酸酶蛋白表达量一般都在 mg/mL 以上<sup>[5]</sup>, 最高的已达到 5mg/mL 以上<sup>[6]</sup>, 按现有的条件, 在此基础上进一步大幅度提高其蛋白表达量的空间已经不大, 实现高比活植酸酶的高效表达, 可在其

蛋白表达量相当的情况下大幅度地提高其发酵效价, 是进一步降低植酸酶生产成本的最有效的途径。

来源于 *E. coli* 的植酸酶<sup>[7]</sup>比活性为  $3.1 \times 10^6$  IU/mg, 是目前发现的比活性最高的植酸酶, 但目前工业生产并广泛应用的曲霉来源植酸酶<sup>[8]</sup>高出 30 倍。本文报道此植酸酶编码基因的改造和在重组毕赤酵母中的高效分泌表达, 重组菌株可望用于植酸酶生产, 从而进一步大幅度降低植酸酶的生产成本。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**大肠杆菌 JM109 菌株、质粒 pUC19、酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115(*His<sup>-</sup> Mut<sup>+</sup>*)、质粒 pPIC9 均为本实验室保存。

**1.1.2 工具酶和生化试剂:**限制性内切酶购自 Gibco 和大连宝生物工程公司, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, T4 多核苷酸激酶、脱糖基化酶 Endoglycosidase H(Endo H)为 Biolabs 公司产品, 蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品; 植酸钠(肌醇六磷酸

十二钠)购自 Sigma 公司。其它化学试剂为国产分析纯。酵母培养基 BMGY、BMMY、RDB、MD、MM 等配方见 Invitrogen 公司操作手册。

## 1.2 方法

**1.2.1 *appA* 基因的改造及人工合成** :根据编码 *Escherichia coli* 植酸酶成熟蛋白的基因序列<sup>[9]</sup>,按照毕赤酵母密码子的偏爱性<sup>[10]</sup>,在不改变其氨基酸序列的前提下进行序列改造,同时在序列中避免富含 AT 序列( ATTTA、AATAA、AATTAA 等)的出现。并按所用克隆载体的多克隆位点设计、添加合适的限制性内切酶位点,将全基因分为 A(161bp)、B(287bp)、C(325bp)、D(225bp)、E(235bp) 5 个部分,再将每个部分分为长度不超过 60 个核苷酸的单链核苷酸片段进行人工合成。

**1.2.2 合成片段的拼接及重组表达载体的构建** :将同一部分内的单链核苷酸片段退火后再分别将各部分克隆于转移载体 pUC19 上,并按一定的顺序进行拼接。拼接好的全基因 *appA-m* 通过 *EcoR* I / *Not* I 位点克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9 上,得到重组载体 pPIC9-*appA-m*。DNA 的重组操作主要依据 Sambrook 手册<sup>[11]</sup>进行。

**1.2.3 酵母的电击转化及筛选** :将重组载体 pPIC9-*appA-m* 用 *Bgl* II 酶切使之线性化,电击转化毕赤酵母。挑取阳性转化子。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

**1.2.4 重组酵母的诱导表达** :重组酵母在 5mL BMGY 培养基中于 30℃ 摇床培养 48h,离心收集菌体,加入 1mL BMMY 甲醇诱导培养基悬浮菌体,继续在 30℃ 下诱导培养 48h,取样检测各菌株上清液中的植酸酶活性,从中筛选出表达植酸酶的转化子。

酶活性单位定义为:在一定条件下,每分钟释放出 1nmol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位 (IU)。

酶活性测定方法参见文献[6],酶测定体系 pH 值为 4.5。

**1.2.5 表达产物植酸酶的 SDS-PAGE 分析及脱糖基化处理** :取在摇床诱导表达 48h 后的培养液,离心取 8μL 上清液进行 SDS-PAGE 分析。

取 9μL 上清液进行脱糖基化处理,建立如下反应体系:9μL 上清液加 1μL 10 × Glycoprotein 变性缓冲液,100℃ 反应 10min 后加 1.2μL 10 × G5 缓冲液、1μL Endo H,37℃ 反应 1h。

**1.2.6 重组酵母的 Southern blotting 和 Northern blotting** :选取不同的转化子及宿主菌株 GS115 分别接种

于 BMGY 培养基中,30℃ 摇床 48h 培养后提取基因组 DNA, BMGY 培养基中 30℃ 摇床培养 48h,离心收集菌体后, BMMY 中 30℃ 诱导培养 48h,提取酵母总 RNA。用植酸酶基因 *Xba*I / *Pst* I 酶切回收片段 (+50 ~ +785bp) 为探针分别进行 Southern blotting 和 Northern blotting 分析。

**1.2.7 发酵罐水平植酸酶的表达** :重组酵母在 5L 发酵罐( BIostat B5 型)中进行发酵。重组酵母的发酵为高细胞密度补料发酵,发酵过程分为菌株培养阶段、碳源喂阶段和诱导表达阶段,具体方法见 Invitrogen 操作手册。在诱导过程中每 12h 取样 1 次测定表达的植酸酶的积累量并进行表达蛋白的 SDS-PAGE。

## 1.2.8 表达植酸酶酶学性质的测定

毕赤酵母表达的植酸酶纯化方法如下:首先进行脱盐处理,再经分子筛 Superdex-75-HR-10/30 纯化。分步收集洗脱峰,每管 1mL,选取酶活性最高的一管作为表达植酸酶酶学性质研究的样品。

经纯化的植酸酶在不同 pH 及不同温度条件下进行酶促反应以测定其最适 pH 和最适温度。将酶液在不同 pH 值的缓冲液中于 37℃ 下处理 1h 及在不同温度( 60℃、70℃、80℃ )下分别处理 30min,在 37℃、pH 4.5 的条件下分别测定酶活性以测定酶的 pH 稳定性和酶的热稳定性。

酶的比活单位的定义为每毫克酶蛋白所表现出的酶活性单位( IU )。通过考马斯亮蓝法测定样品酶液中的蛋白含量,同时测得其植酸酶酶活性,由此得到酶的比活性。

用不同浓度的植酸钠为底物,在 pH 4.5、37℃ 条件下反应 10min 测定酶活性,计算出酶的  $K_m$  值及  $V_{max}$ 。

酶促反应体系中加入终浓度为 1mmol/L 的不同的金属离子及化学试剂,在 37℃、pH 4.5 条件下测定酶活性,研究其对酶活性的影响。

取 0.5mL 纯化后的植酸酶酶液,分别加入 0.5mL 胃蛋白酶( pH 2.0, 0.1mg/mL )和胰蛋白酶( pH 7.0, 0.1mg/mL ),37℃ 保温,不同时间取样,37℃、pH 4.5 条件下测定酶活性。

## 2 结 果

### 2.1 *appA* 基因的设计改造

*appA* 基因去掉 N-端 66bp 的信号肽编码序列后,全长 1233bp。按毕赤酵母密码子偏向,在不改变氨基酸序列的前提下进行改造,共改变了 262 个

碱基,涉及 229 个密码子,G + C 含量由原来的 53.7%变为 49.1%,密码子第 3 位碱基的 G + C 含量由原来的 54.8%变为 48.4%,基本符合毕赤酵母 G + C 的含量特征<sup>[10]</sup>。在基因的 5'端添加 *EcoR* I 位点,3'端添加 *Not* I 和 *Hind* III 位点,以便于基因克隆到转移载体 pUC19 及表达载体 pPIC9 上。合成基因各部分分别克隆于载体 pUC19 上,再进一步拼接得到完整的改造全基因 *appA-m*,重组质粒命名为 pUC19-*appA-m*。*appA-m* 基因经序列测定后证实该基因与设计的序列一致。

## 2.2 重组酵母表达载体的构建

经改造的 *appA* 基因 *appA-m* 通过 *EcoR* I 和 *Not* I 位点以正确的阅读框架与酵母表达载体 pPIC9 的  $\alpha$ -因子信号肽序列的 3'端融合,得到重组表达载体 pPIC9-*appA-m*(图 1)。通过酶切鉴定证实重组质粒的构建是正确的。

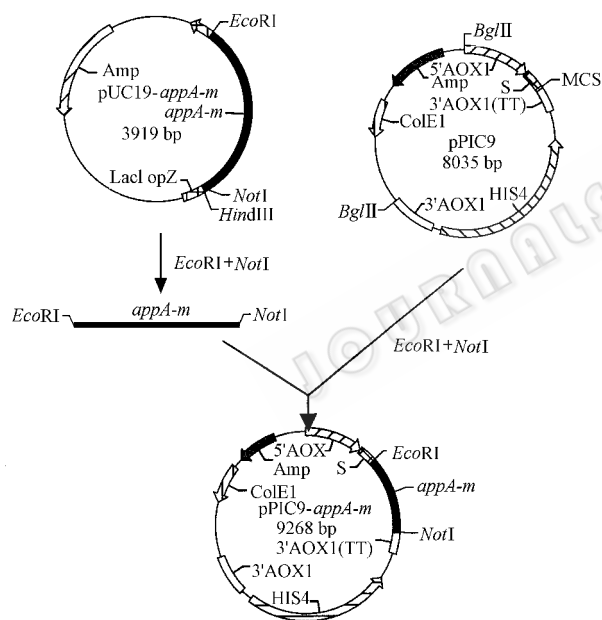


图 1 重组酵母表达载体 pPIC9-*appA-m* 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pPIC9-*appA-m*

## 2.3 重组酵母的获得与筛选

重组载体上带有 *His4* 基因及乙醇氧化酶基因(*AOX1*)的 5'与 3'同源序列区,经 *Bgl* II 线性化电击转化受体菌 GS115(*His*<sup>-</sup> *Mut*<sup>+</sup>)后,只有 *His4* 基因整合到酵母染色体上的重组酵母才能在不加 *His* 的培养基 RDB 上正常生长,从而通过这一标记筛选到 *His*<sup>+</sup> 转化子。外源基因同源重组到酵母染色体上会破坏受体菌的乙醇氧化酶基因 *AOX1*,而使转化子不能利用甲醇为碳源而正常生长,这样重组子(*Mut*<sup>s</sup>)在以甲醇为唯一碳源的 MM 培养基上就会生

长缓慢或不生长,通过该标记进一步筛选到 *His*<sup>+</sup> *Mut*<sup>s</sup> 转化子。

重组转化子经甲醇诱导 48h 后,测定诱导培养基中植酸酶的活性,从 96 个转化子中筛选到 5 株高效表达植酸酶基因的重组子 *P. pastoris* pPIC9-*appA-m* 5、20、34、70、74,每株在摇床水平表达植酸酶酶活性均达  $1.0 \times 10^6$  IU/mL 以上。

## 2.4 表达植酸酶的 SDS-PAGE 分析及脱糖基化

通过 SDS-PAGE 鉴定植酸酶蛋白的表达(图 2),从 SDS-PAGE 电泳上可看到毕赤酵母表达的植酸酶有 3 条大小不同的蛋白条带,其表观分子量分别为 50kD、52kD 和 54kD 左右,均比从氨基酸序列推断出的理论分子量(约 45kD)大。分析该植酸酶的氨基酸序列,发现有三处潜在糖基化位点,所以有可能是因糖基化造成分子量偏大,而不同程度的糖基化造成表达蛋白分子量的差异。

将表达外源蛋白进行脱糖基化处理后,三条大小不同的蛋白带变为一条分子量约 45kD 的蛋白带,与 *appA-m* 基因产物的理论分子量相当(图 3)。对毕赤酵母表达的 3 种不同分子量的蛋白 N-端进行序列测定,结果表明该 3 种不同分子量蛋白 N 端序列相同,且除 N 端丢失了一个氨基酸 Q 外,其它与原植酸酶氨基酸序列完全一致。这些结果证实毕赤酵母表达的植酸酶为糖蛋白,三条蛋白带均为植酸酶蛋白,其分子量差异是由于糖基化程度不同造成的。

## 2.5 重组酵母的 Southern blotting 和 Northern blotting 分析

取不同转化子及宿主菌 GS115 总 DNA 5 $\mu$ g 分别进行 *EcoR* I / *Pst* I、*EcoR* I、*Xho* I 完全酶解,电泳后进行 Southern blotting 分析,以重组载体 pUC19-*appA-m* 经 *EcoR* I / *Not* I 双酶切的全基因回收片段为阳性对照。*EcoR* I / *Pst* I 可切下长约 780bp 部分基因,结果(图 4a)表明,不同重组子 DNA 经 *EcoR* I / *Pst* I 双酶切后,在约 800bp 处均有一特异杂交带,证明 *appA-m* 基因已整合到了酵母基因组中。用基因内仅有一个切点的 *EcoR* I 及表达盒内仅有一个切点的 *Xho* I 分别进行酶切后,外源基因整合到酵母基因组中不同位点会出现分子量不同的杂交带,结果表明(图 4b、4c),所检测的重组酵母中植酸酶基因均为单拷贝整合,各重组酵母中特异性杂交带分子量不尽相同,说明整合位点可能不完全精确一致。

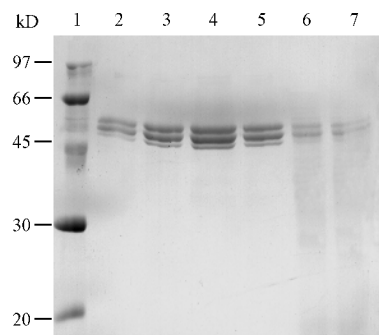


图 2 摇床水平上表达植酸酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed phytase in shake flask culture

1 : standard protein molecular weight ; 2 ~ 7 : expressed phytase by recombinants *P. pastoris* pPIC9-*appA-m* 4 34 74 20 11 and 40 respectively

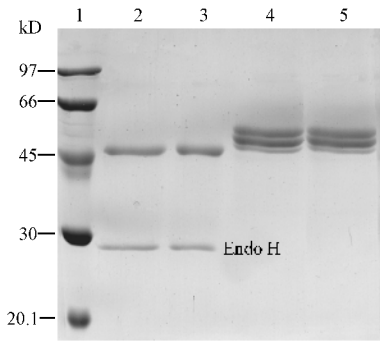


图 3 表达植酸酶脱糖基化前后的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expressed phytase deglycosylated by Endo H

1 : standard protein molecular weight ; 2 3 : expressed phytase deglycosylated by Endo H ; 4 5 : expressed phytase with 3 bands of glycosylation( Mr = 50 52 and 54kD )

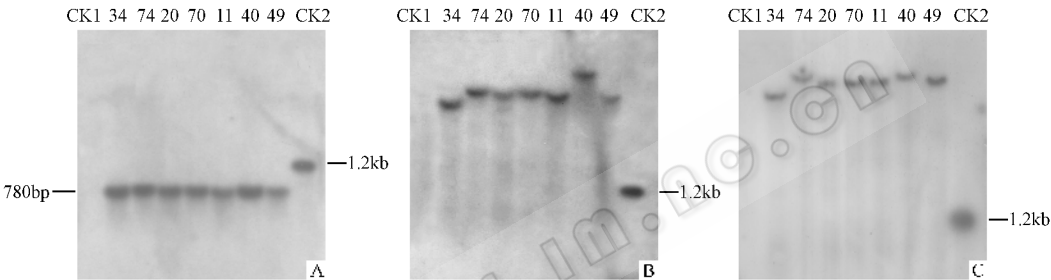


图 4 重组酵母的 Southern blotting 分析

Fig.4 Southern blotting analysis of recombinant *P. pastoris*

CK1 host *P. pastoris* GS115 ; 34 74 20 70 11 40 49 different recombinants *P. pastoris* pPIC9-*appA-m* from pUC19-*appA-m*. A :chromosome DNA digested with *EcoRI* / *PstI* , and all recombinants but CK1 showing a 780bp specific hybridization band , CK2 showing a 1.2kb specific hybridization band ;B :chromosome DNA digested with *EcoRI* , and all recombinants but CK1 showing a specific hybridization band , CK2 showing a 1.2kb specific band ; C :chromosome DNA digested with *XhoI* , and all recombinants but CK1 showing a specific hybridization band , CK2 showing a 1.2kb specific hybridization band

取 5 $\mu$ g 酵母的总 RNA 进行 Northern blotting 分析 ,结果表明( 图 5 ) ,重组酵母中植酸酶基因得到了转录 ,转录的 mRNA 量在高表达重组子和低表达重组子中没有显著差异 ,但各重组酵母中杂交带分子量有些有微略的差异 ,原因在进一步研究之中。

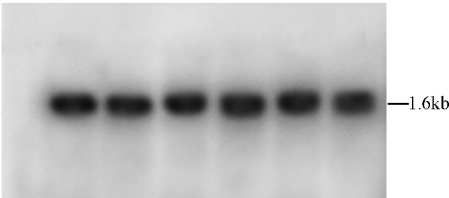


图 5 重组酵母的 Northern blotting 分析

Fig.5 Northern blotting analysis of recombinant *P. pastoris* All recombinants *P. pastoris* pPIC9-*appA-m* 34 ,74 ,20 ,70 ,11 ,40 but host strain GS115 showing an about 1.6kb specific hybridization band

## 2.6 发酵罐水平植酸酶的表达

选择摇床水平表达量高的毕赤酵母重组菌株 *P. pastoris* pPIC9-*appA-m* 74 进行 5L 发酵罐发酵研究。在诱导之前的菌体生长阶段发酵上清中检测不到植酸酶活性。随着甲醇的诱导 ,上清液中植酸酶酶活力显著增加 ,酶蛋白不断积累( 图 6 )。经甲醇诱导 120h 后表达量达到 2.5mg/mL ,植酸酶活性( 发酵效价 )达  $7.5 \times 10^6$  IU/mL 以上( 图 7 )。从 5L 罐中连续 5 批次的发酵试验( 图 7 )来看 ,其 5 批次的酶积累曲线基本一致 ,说明重组酵母具有很好的表达稳定性。

## 2.7 表达产物植酸酶 AppA 的酶学性质测定

表达的植酸酶经纯化后 ,在 SDS-PAGE 上未观察到有杂蛋白带 ,用纯化后的植酸酶进行各种酶学性质研究。实验结果表明 ,该重组植酸酶 AppA 的

比活性为  $3.19 \times 10^6$  IU/mg,  $K_m = 0.55$  mmol/L,  $V_{max} = 3.934 \times 10^6$  IU( mg·min )。最适 pH 为 4.5, 在 pH 2 ~ 10 之间酶活性均能维持在 80% 以上, 具有很好的 pH 稳定性。最适反应温度为 60℃, 在 60℃ 下保温 30min, 剩余酶活性为 40%, 70℃ 和 80℃ 下保温 30min, 剩余酶活性降为 15%。在酶促反应体系中加入不同的化学试剂分别测定酶活性, 结果表明,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  和 EDTA 对 AppA 有轻微的激活作用, 金属离子  $Zn^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  和  $Fe^{3+}$  对 AppA 的酶促反应均有不同程度的抑制作用, 而 SDS 完全抑制了其植酸酶活性。植酸酶 AppA 用胃蛋白酶处理 120min 后, 酶活性提高了 17%; 用胰蛋白酶处理 120min 后, 剩余 32.8% 的酶活性(图 8)。说明植酸酶 AppA 具有非常好的抗胃蛋白酶水解能力和部分抗胰蛋白酶水解的能力。

对重组植酸酶的酶学性质研究结果表明, 其与原菌株产植酸酶的酶学性质基本一致。

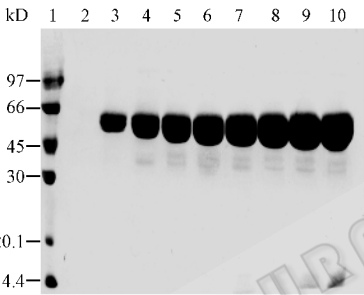


图 6 在 5 L 发酵罐中诱导不同时间表达植酸酶的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of expressed phytase in the 5L fermentor with different induction times

1 standard protein molecular weight ; 2 fermentation broth before induced by methanol ; 3 ~ 10 : fermentation broth after induced by methanol for 12h 24h 36h 48h 72h 96h 108h 120h respectively

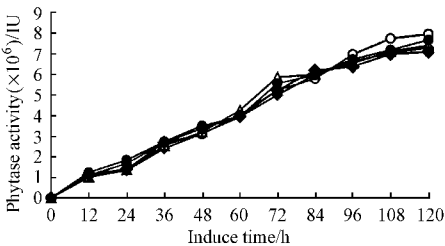


图 7 5 批次 5L 发酵罐水平植酸酶酶活性随诱导时间的积累

Fig.7 Accumulation of enzymatic activity with different induction times in 5L fermentor for five batches of fermentation

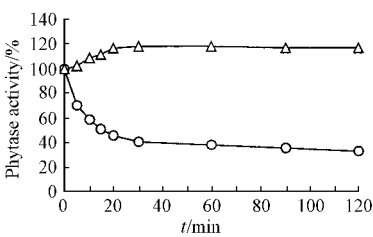


图 8 AppA 抗胰蛋白酶和胃蛋白酶活性曲线

Fig.8 Phytase activity curves of AppA resistance to trypsin and pepsin  
—○—treated by trypsin ; —△—treated by pepsin

3 讨 论

高效表达高比活植酸酶是进一步提高植酸酶发酵效价、降低生产成本的新途径。目前, 研究较多的高比活植酸酶主要有来源于瘤胃微生物 *Selenomonas ruminantium* JY35<sup>[12]</sup>、隔孢伏革菌 *Peniophora lycii*<sup>[13]</sup> 和大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 33965<sup>[7, 14]</sup> 的植酸酶, 它们的比活性比黑曲霉来源的植酸酶<sup>[5, 6]</sup> 的比活分别高近 8 倍、10 倍和 30 倍。其中来源于 *Escherichia coli* 的植酸酶是迄今所报道的比活性最高的植酸酶<sup>[7, 14]</sup>, 其 pH 范围与目前商业生产的曲霉属植酸酶相比, 更适于在动物的胃肠道内发挥作用, 且有着更好的抗蛋白酶降解能力<sup>[15]</sup>, 经毕赤酵母表达的该植酸酶的动物饲喂效果明显优于目前商业生产的曲霉来源植酸酶<sup>[16]</sup>。大肠杆菌来源的植酸酶基因已经在大肠杆菌、毕赤酵母等多种表达系统中进行了表达。在大肠杆菌中表达的植酸酶酶活性为  $6.0 \times 10^5$  IU/mL<sup>[17]</sup>, 在毕赤酵母中摇床水平上表达该植酸酶的酶活性是  $1.75 \times 10^5$  IU/mL<sup>[18]</sup>。本文将来源于大肠杆菌的植酸酶基因进行了改造, 在毕赤酵母表达系统实现了高效表达, 发酵效价可达  $7.5 \times 10^6$  IU/mL 发酵液, 是目前商业生产植酸酶发酵效价的 7 倍以上。

按照表达宿主的密码子偏爱对外源基因的密码子进行优化, 是被人们所普遍采用的一种提高外源基因表达量的方法, 其有效性已经得到了证实。如: 经过对密码子优化的人乳头瘤病毒(HPV)的 E7 基因在人和哺乳动物细胞内表达, 表达量分别比 E7 原基因提高了 20 倍和 100 倍<sup>[19]</sup>。在毕赤酵母中, 高表达基因密码子选择偏向尤为明显, 如 Ile 的密码子 ATA、Pro 的密码子 CCG、Ala 的密码子 GCG、Gly 的密码子 GGG、Arg 的密码子 CGC、CGA、CGG 等的使用频率统计数为零<sup>[12]</sup>, 外源基因中含有的这些密码子往往成为其在毕赤酵母中高效表达的瓶颈, 将外源

基因按照毕赤酵母密码子偏爱改造后使其表达量大幅度提高的成功例子很多。如姚斌<sup>[6]</sup>将来源于黑曲霉的植酸酶基因进行改造,将在毕赤酵母中使用频率为零的 Arg 密码子突变为毕赤酵母高频使用的密码子,从而使其表达量比改造前提高了近 37 倍。贝锦龙等<sup>[20]</sup>根据毕赤酵母中密码子的使用情况,对来源于黑曲霉的植酸酶成熟肽编码序列进行改造,将部分在毕赤酵母中低偏爱性密码子替换为高偏爱性的密码子,也使表达植酸酶的酶活性达到了  $1.65 \times 10^5$  IU/mL 的水平。在本研究中,我们将来源于 *E. coli* 的植酸酶基因的密码子进行优化后,通过人工合成获得全基因,在毕赤酵母表达系统进行表达,其表达量为 2.5mg/mL 发酵液,是未改造基因的 2 倍(用未经优化的基因构建的重组酵母为本实验室前期工作所获得,植酸酶蛋白表达量约为 1.2mg/mL),这说明我们的改造是成功的。

我们通过电击转化法转化毕赤酵母,并对重组酵母细胞进行了分子检测。不同转化子 Southern blotting 分析的结果表明,所检测的重组酵母外源基因均为单拷贝整合,单拷贝的转化子优点是具有更好的遗传稳定性,这从我们的实验中也得到证实,在平板上传代 30 代后,各单菌落中植酸酶基因的 PCR 的阳性率为 100%,同时植酸酶的表达量也很稳定。这有利于这种重组酵母在实际生产中的应用。

在重组酵母中表达的植酸酶蛋白是分子量不同的 3 种分子,脱糖基处理及 N 端序列的测定结果表明,3 种分子量大小不同的蛋白均是植酸酶蛋白,表达的酶蛋白为糖蛋白,糖基化程度为 11% ~ 20%,不同程度的糖基化造成了其分子量的差异。我们通过对表达植酸酶的酶学性质分析发现,糖基化并没有使该植酸酶的酶学性质发生显著改变。而三种植酸酶蛋白分子之间在酶学性质上是否有细微的差异,正在进一步的研究之中。

对重组植酸酶的抗胰蛋白酶和胃蛋白酶能力的研究发现该植酸酶具有非常好的抗胃蛋白酶的能力,在胃蛋白酶作用 2h 后,酶活性没有降低,反而提高了 17%;这与 Rodriguez<sup>[15]</sup>的研究结果基本一致,在 Rodriguez 的研究中,将胃蛋白酶作用的植酸酶进行 SDS-PAGE 分析发现,植酸酶已经被水解为小的片段,推测可能有比未经蛋白酶作用的植酸酶酶活性更高的抗胃蛋白酶多肽存在。胃蛋白酶是动物消化道内主要的蛋白酶之一,该植酸酶好的抗胃蛋白酶能力使其可以在动物体内发挥更好的作用。

从重组酵母的植酸酶蛋白表达量来看,达到了 2.5mg/mL,虽然已是一个很高的水平,但从我们以往的工作<sup>[6]</sup>和毕赤酵母中分泌型蛋白表达量最高可达 14.8mg/mL 的报道<sup>[21]</sup>来看,还有一定的提高潜力,一方面可进一步进行表达元件和植酸酶基因的优化来提高表达量,另一方面也可适当提高植酸酶基因在酵母染色体上整合的拷贝数(3~4 个),在确保重组酵母遗传稳定性的条件下,使表达量进一步提高,做到低拷贝,高表达。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytases in tegumes and cereals. *Adv Food Rev*, 1982, **28**: 1-92
- [2] Yao B(姚斌), Fan YL(范云六). Molecular biology and gene engineering of phytase. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(1): 1-5
- [3] Wodzinski RJ, Ullah AHJ. Phytase. *Adv Appl Microbiol*, 1996, **42**: 263-302
- [4] Lei XG, Ku PK, Miller ER *et al.* Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phate P utilization by weaning pigs. *J Anim Sci*, 1993, **71**: 3359-3367
- [5] Van Gorcom RFM. Cloning and expression of phytase from *Aspergillus*. US Patent 5436156, 1995
- [6] Yao B(姚斌), Zhang CY(张春义), Wang JH(王建华) *et al.* High-level expression of bioactive phytase in *Pichia pastoris* yeast. *Science in China(Series C)*(中国科学 C 辑), 1998, **28**(3): 237-243
- [7] Greiner R, Konietzny U, Jany K. Purification and characterization of two phytase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **303**: 107-113
- [8] Wyss M, Brugger R, Kronenberger A *et al.* Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolases) catalytic properties. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 367-373
- [9] Dassa J, March C, Boquet PL. The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 5497-5500
- [10] Zhao X(赵翔), Huo KK(霍克克), Li YY(李育阳). Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(3): 308-311
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [12] Cheng KJ, Forsberg CW, Bae HD *et al.* Phytase of ruminal microorganism. US Patent 5939303, 1999
- [13] Ullah AH, Sethumadhavan K. PhyA gene product of *Aspergillus ficum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303**(2): 463-468

- tion of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J Microbiol*, 2000, **46**: 59–71
- [ 15 ] Rodriguez E, Porres JM, Han Y *et al.* Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase ( r-PhyA ) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase ( r-AppA ) to trypsin and pepsin *in vitro*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **365**( 2 ): 262–267
- [ 16 ] Augspurger NI, Weibel DM, Lei XG *et al.* Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorous in young chicks and pigs. *J Anim Sci*, 2003, **81**( 2 ): 474–483
- [ 17 ] Miksch G, Kleist S, Friehs K *et al.* Overexpression of phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 685–694
- [ 18 ] Rodriguez E, Wood ZA, Karplus PA *et al.* Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, **382**( 1 ): 105–112
- [ 19 ] Cid-Arregui, Juarez V, Zur Hausen H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *J Virol*, 2003, **77**( 8 ): 4928–4937
- [ 20 ] Bei JI( 贝锦龙 ), Chen Z( 陈庄 ), Yang L( 杨林 ) *et al.* Overexpression of artificial synthetic gene of *Aspergillus niger* NRRL3135 phytase in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*( 生物工程学报 ) 2001, **17**( 3 ): 254–258
- [ 21 ] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* 2000, **16**( 1 ): 23–52

## Overexpression of *Escherichia coli* Phytase with High Specific Activity

LUO Hui-Ying<sup>1</sup> YAO Bin<sup>1\*</sup> YUAN Tie-Zheng<sup>1</sup> WANG Ya-Ru<sup>1</sup> SHI Xiu-Yun<sup>1</sup> WU Ning-Feng<sup>2</sup> FAN Yun-Liu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China )

<sup>2</sup>( Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China )

**Abstract** High-level expression of phytase with high specific activity is an effective way to improve phytase fermentation potency and reduce its production cost. The gene *appA* encoding *Escherichia coli* phytase AppA with high specific activity was modified and artificially synthesized according to the bias in codon choice of the high expression gene in *Pichia pastoris* without changing the amino acid sequence of the AppA. The modified gene, *appA-m*, was inserted in the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9, then introduced into the host *Pichia pastoris* by electroporation. The *Pichia pastoris* recombinants for phytase overexpression were screened by enzyme activity analysis and SDS-PAGE. The result of Southern blotting analysis of the recombinant yeast indicated that only one copy of the *appA-m* gene was integrated into the genome of *Pichia pastoris*. The result of Northern analysis of the recombinant yeast showed that the modified gene was effectively transcribed. SDS-PAGE analysis of the phytase expressed in *Pichia pastoris* revealed that the phytase was overexpressed and secreted into the medium supernatant. There are three phytase proteins with apparent molecular weight in approximately 50kD, 52kD and 54kD respectively in the media, which are larger in the size than the native phytase from *E. coli*. The results of N-terminal sequencing and deglycosylation of the expressed phytase in *Pichia pastoris* proved that the expressed phytase were glycosylated protein with different glycosylation degree. The expressed phytase *Pichia pastoris* shared similar pH and temperature optima to those of the natural phytase from *E. coli* and had highly resistant to pepsin digestion. In 5-L fermentor, after induced by 0.5% methanol for 120 h, the expression level of phytase protein was 2.5mg/mL, and the phytase activity (fermentation potency) exceeded  $7.5 \times 10^6$  IU/mL, which was the highest among those of all kinds of recombinant strains reported now.

**Key words** phytase with high specific activity, gene modification, overexpression, *Pichia pastoris*

Received: 07-14-2003

This work was supported by Grant from the State "863" High-Tech Program (No. 2001AA214041).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-68975126; Fax: 86-10-68975127; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>