

## 植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因结构延伸突变改善酶的热稳定性

# Improving Thermostability of *Aspergillus niger* Phytase by Elongation Mutation

陈 惠<sup>1</sup> 王红宁<sup>2\*</sup> 杨婉身<sup>1</sup> 赵海霞<sup>2</sup> 吴 琦<sup>1</sup> 单 志<sup>1</sup>

CHEN Hui<sup>1</sup> ,WANG Hong-Ning<sup>2\*</sup> ,YANG Wan-Shen<sup>1</sup> ,ZHAO Hai-Xia<sup>2</sup> ,WU Qi<sup>1</sup> and SHAN Zhi<sup>1</sup>

1 四川农业大学生命科学院 雅安 625014

2 四川农业大学动物科技学院 雅安 625014

1 College of Life & Science , Sichuan Agriculture University , Ya 'an , Sichuan 625014

2 College of Animal Science & Technology , Sichuan Agriculture University , Ya 'an , Sichuan 625014

**摘 要** 将来源于黑曲霉 N25 的植酸酶基因 *phyA<sup>m</sup>* 重组于大肠杆菌表达载体 pET-30I( + ),以重组表达载体 pET30b-F*phyA<sup>m</sup>* 为模板经 PCR 扩增获得结构延伸突变植酸酶基因 *phyA<sup>e</sup>*(在植酸酶基因 C 端增加了来源于 pET-30b-F*phyA<sup>m</sup>* 载体上 13 氨基酸残基)。含突变基因的重组表达载体 pPIC9k-*phyA<sup>e</sup>* 在 GS115 酵母中表达。纯化的突变酶 PP-NP<sup>e</sup> 与野生型酶 PP-NP<sup>m</sup>-8 相比: PP-NP<sup>e</sup> 的最适反应温度上升了 3℃ ,75℃ 处理 10min 热稳定性提高 21% ,比活力略有提高。最适反应 pH 为 5.6 ,有效 pH 范围 pH4.6 到 pH6.6。比未突变酶扩大了 0.4 单位。

**关键词** 植酸酶 ,延伸突变 ,毕赤酵母 ,热稳定性 ,最适反应 pH

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0983-05

**Abstract** The phytase gene *phyA<sup>m</sup>* from *Aspergillus niger* N25 was recombined into *E. coli* expression vector pET-30I( + ). Recombined at expression vectors pET30b-F*phyA<sup>m</sup>* was served as a template to amplify phytase gene , and the PCR product named elongation mutation gene *phyA<sup>e</sup>* was expanded with a 13 amino acid sequence from pET-30b-F*phyA<sup>m</sup>* vector at C-terminal of phytase gene *phyA<sup>m</sup>* . Furthermore , *phyA<sup>e</sup>* gene was recombined into expression vector pPIC9k and expressed in *Pichia pastoris* . The comparison experiment of mutant phytase PP-NP<sup>e</sup> with wild-type phytase PP-NP<sup>m</sup>-8 showed that : the optimum temperature of PP-NP<sup>e</sup> was increased by 3℃ , and its thermostability was increased by 21% when it was exposed to 10min at 75℃ . Its effective reaction pH range with catalysis efficiency above 70% was pH4.6 ~ pH6.6 , and wider 0.4 pH value than that of wild-type phytase .

**Key words** phytase , *phyA* gene , elongation mutation , *Pichia pastoris* , thermostability

植酸酶可将植物性饲料中植酸及其盐分解为肌醇和磷酸 ,增加可利用磷的含量 ,降低植酸对矿物质和蛋白质的亲和力和解除植酸的抗营养作用 ,从而增加动物对蛋白质和某些金属离子的吸收能力。作为一种单胃动物的饲料添加剂 ,它的饲喂效果已在世界范围内得到了确证。由于植酸酶热

不稳定性不能完全满足饲料加工、贮藏、使用的要求 ,限制了植酸酶在饲料中的推广和应用。

随着基因工程与蛋白质工程技术的发展 ,采用计算机辅助设计 ,定点突变 ,结构延伸突变 ,杂合酶及分子定向进化等方法 ,可获得理化性质改善的酶<sup>[1]</sup>。酶结构延伸突变是进化

Received :May 16 , 2005 ; Accepted : July 12 , 2005 .

This work was supported by the project of National Scientific and Technological Program under the 10<sup>th</sup> Five-year Plan( No.2002BA514A-12) .

\* Corresponding author. Tel 86-835-2882353 ; E-mail :whongning@163.com

国家“十五”重点科技攻关子课题( No. 2002BA514A-12 )

蛋白质工程研究的一种新方法,通过在酶蛋白的 C 末端增加一段肽段来扩展蛋白质一级结构,从而改变酶蛋白高级结构,以达到改善酶理化性质的目的<sup>[2]</sup>。大肠杆菌表达载体 pET-30I(+) 的特点之一:在表达蛋白 C 端带有组氨酸标签 His-Tag 序列,该序列中 13 个氨基酸残基 Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His6 经序列预测, Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu 易形成螺旋结构,螺旋结构的刚性将增加酶蛋白的热稳定性,另外 His6 是极性氨基酸,倘若在分子的表面,不仅能增强酶蛋白的溶解性,同时增加酶分子表面电荷的相互作用,形成盐键以提高酶蛋白的热稳定性。基于此,本研究采用基因工程的手段将植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因的 C 末端增加一段来源于大肠杆菌表达载体 pET-30I(+) 的 13 氨基酸残基肽链,实现植酸酶的结构延伸,提高酶的耐热性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌 JM109,毕赤酵母 GS115、GS115 Ablumin、GS115β-gal 大肠杆菌表达载体 pET-30I(+)、酵母表达载体 pPIC9K 为本实验室保存;含有黑曲霉 N25 植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因的 pUC18-*phyA<sup>m</sup>*,本实验室构建;pUC18-T 载体购自北京赛百胜生物工程有限公司。

1.1.2 试剂与仪器:限制酶、T4 DNA 连接酶、dNTP 购自宝生物工程(大连)有限公司,IPTG、X-gal 购自北京赛百胜生物工程有限公司,Taq plus DNA 聚合酶购自上海生物工程有限公司,DNA 纯化试剂盒购自华舜生物公司,植酸钠购自美国 Sigma 公司。UVP 凝胶成像仪,HH.S11-2 型电热恒温水浴锅(温度可调,精度为 ±0.1℃)。

1.1.3 培养基:

LB 液体培养基:1% 蛋白胨、0.5% 酵母抽提物、1% NaCl, pH7.0。

MD 培养基:1.34% YNB、4 × 10<sup>-5</sup> 生物素、2% 葡萄糖。

MM 培养基:1.34% YNB、4 × 10<sup>-5</sup> 生物素、0.5% 甲醇。

BMGY 和 BMMY 培养基:1% 酵母抽提物、2% 蛋白胨、100mmol/L 磷酸钾缓冲液、1.34% YNB、4 × 10<sup>-5</sup> 生物素、1% 甘油(BMGY)或 0.5% 甲醇(BMMY)。

1.2 方法

1.2.1 植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因的 pET-30I(+) 融合表达载体的构建:根据 PUC18-*phyA<sup>m</sup>* 序列<sup>[3]</sup>及 pET-30I(+) 载体酶切位点序列,设计出下面的植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因表达片段的 PCR 引物,在上游引物 5' 端引入一个 *Nde* I 位点和 *Eco*R I,在下游引物 5' 端引入一个 *Hind* III 位点。表达产物 C 端将融合表达 pET-30I(+) 载体质粒上的 13 氨基酸残基 Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His6。

上游引物 5'-GT [CATATG] [GAATTC] ctggcagtcctccgcctc-3'

*Nde* I *Eco*R I

下游引物 5'-CT [AAGCTT] agcaaaacactccgcc-3'

*Hind* III

以 PUC18-*phyA<sup>m</sup>* 质粒为模板,加入引物、dNTP 等,最后加

入 DNA 聚合酶,按下列参数进行 PCR:94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 5min,30 个循环后,增加延伸 10min。PCR 扩增产物经 DNA 回收试剂盒纯化后,与 pUC18-T 载体进行连接反应。按《分子克隆实验指南》的方法,采用氯化钙法制备大肠杆菌 JM109 感受态细胞,进行连接产物转化、阳性克隆菌株筛选及其电泳鉴定<sup>[4]</sup>,获得含有 pUC18-*phyA<sup>m</sup>* 阳性菌株。然后将 pUC18-*phyA<sup>m</sup>* 和 pET-30I(+) 质粒 DNA 分别用 *Nde* I / *Hind* III 双酶切,电泳胶回收,连接,转化大肠杆菌 JM109,筛选获得 pET30b-F*phyA<sup>m</sup>* 阳性转化子。

1.2.2 延伸突变植酸酶 *phyA<sup>e</sup>* 基因酵母表达载体 pPIC9k-*phyA<sup>e</sup>* 的构建:为获得 C 端融合 pET-30b-F*phyA<sup>m</sup>* 载体上 13 氨基酸残基的植酸酶基因 *phyA<sup>e</sup>*(延伸突变植酸酶),根据载体 pPIC9k 酶切位点序列,设计出如下 PCR 引物,在上游引物 5' 端引入一个 *Nde* I 位点和 *Eco*R I,在下游引物 5' 端引入一个 *Not* I 位点:

上游引物 5'-GT [CATATG] [GAATTC] ctggcagtcctccgcctc-3'

*Nde* I *Eco*R I

下游引物 5'-CT [GCGGCCGC] ctagtgggtggtggtggt-3'

*Not* I

以 pET30b-F*phyA<sup>m</sup>* 质粒为模板,加入引物、dNTP 等,最后加入 DNA 聚合酶,按下列参数进行 PCR:94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 5,30 个循环后,最后一次 72℃ 延伸 10min。

植酸酶 *phyA<sup>e</sup>* 基因 PCR 产物的 pUC18-T 载体克隆,参照 1.2.1 获得 pUC18-*phyA<sup>e</sup>* 阳性转化子,并进行插入片段的序列测定。pUC18-*phyA<sup>e</sup>* 和 pPIC9k 质粒分别用 *Eco*R I / *Not* I 双酶切,电泳胶回收,连接,转化大肠杆菌 JM109,筛选获得 pPIC9k-*phyA<sup>e</sup>* 阳性转化子。

1.2.3 重组酵母表达载体 pPIC9k-*phyA<sup>e</sup>* 的电击转化及转化子的筛选:pPIC9k-*phyA<sup>e</sup>* 质粒经 *Bsp*E I 线性化后电击转化 GS115 通过 MD(葡萄糖最低限度培养基)和 MM(甲醇最低限度培养基)平板筛选甲醇利用快型转化子,获得阳性菌落<sup>[5]</sup>。

1.2.4 延伸突变重组酵母表达及纯化:将筛选到的甲醇利用快型转化子接种于 10mL BMGY 培养中,30℃ 培养 20h,按 1% 的接种量接种于 100mL BMGY 中。培养 18h 后,室温静置 4h,倾去培养液,加入 100mL 诱导培养基 BMMY(4% 甲醇诱导),30℃ 继续诱导培养 38h。4℃ 离心,上清液用 60% 的预冷乙醇沉淀 5h,冷冻离心弃上清,用 0.02mol/L HAc-NaAc 缓冲液溶解沉淀得粗酶蛋白,再经过亲和树脂层析,洗脱液为 Tris-HCl 300mmol/L NaCl,150mmol/L 咪唑,pH7.0。纯化植酸酶经 SDS-PAGE<sup>[6]</sup>鉴定。酶活测定见文献<sup>[7]</sup>。

1.2.5 延伸突变植酸酶最适反应温度的测定:以植酸钠为底物,加酶样品于 pH4.6,0.01mol/L HAc-NaAc 缓冲液中,在 37℃,40℃,45℃,50℃,55℃,57℃,59℃,60℃,61℃,63℃,65℃,70℃,75℃,80℃,85℃,90℃ 反应 30min 后,测酶活。以相对活力为纵坐标,温度为横坐标作图,求出酶的最适反应温度。植酸酶性质的测定均采用纯酶,重复测定 3 次。

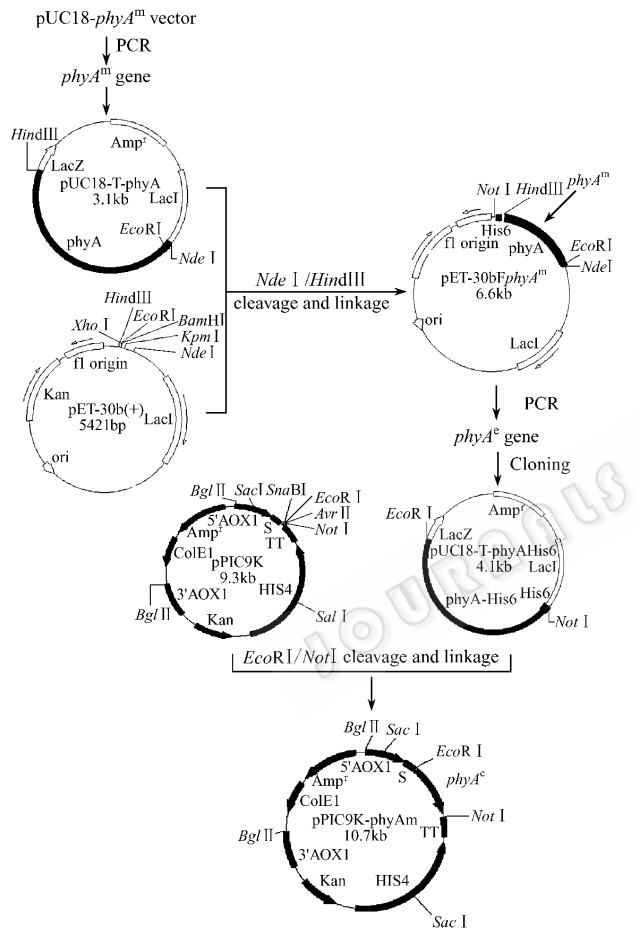
1.2.6 延伸突变植酸酶热稳定性测定:加酶样品于 pH4.6,

0.02mol/L HAc-NaAc 缓冲液中,分别置于 37℃ ,75℃ ,85℃ , 95℃水浴 10min ,于 37℃以植酸钠为底物反应 30min 后,测定酶活。

1.2.7 延伸突变植酸酶最适 pH 测定 :加酶样品于不同 pH 值的底物缓冲液于 37℃反应 30min 后 ,分别在 pH1.7 ,pH 2 , pH 2.6 ,pH 3.6 ,pH 4.6 ,pH 5.6 ,pH 6.2 ,pH 6.6 ,pH 7.1 ,pH 7.5 ,pH 8.1 下测定酶活。

1.2.8 酶动力学测定 :以植酸钠为底物 ,在 pH4.6 ,0.02mol/L HAc-NaAc 缓冲液中,测定 37℃时的产物磷的生成量 ,按 Lineweaver-Burk 法作图 ,求出酶的表现  $K_m$  , $V_{max}$ 。

延伸突变技术路线见下图 :



2 结果

2.1 植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因的 pET-30b(+) 融合表达载体的构建  
经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物长约 1.4kb ,*Nde* I + *Hind*III 双酶切后 ,重组子中释放出 1.4kb DNA 片段 ,表明 *phyA<sup>m</sup>* 已正确插入到了 pET-30b(+)表达载体中。

2.2 延伸突变植酸酶 *phyA<sup>c</sup>* 基因 pPIC9k 表达片段的 PCR 及克隆

经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小为 1.4 kb ,并获得该植酸酶表达片段在 pUC18-T 载体中的阳性克隆。测序结果表明 ,插入片段的序列符合预期延伸突变设计。

2.3 植酸酶 *phyA<sup>c</sup>* 基因酵母表达载体 pPIC9k-*phyA<sup>c</sup>* 的构建  
经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小为 1.4 kb ,并正确

插入到 pPIC9k 表达载体中。表达植酸酶的 C 末端增加了来源于表达载体 pET-30b(+) 序列的 13 个氨基酸残基。

2.4 重组酵母表达载体 pPIC9k-*phyA<sup>c</sup>* 的电击转化及转化子的筛选

线性化的 pPIC9k-*phyA<sup>c</sup>* 质粒电击转化受体酵母 GS115 ,产生单交换引起目的基因插入 ,整合位点在宿主染色体的 HIS4 区 ,并未破坏 AOX1 基因 ,因而在 MD、MM 培养基上生长均正常的为阳性转化子 ,即 Mut<sup>+</sup> 型转化子。经酶活测定鉴定 ,获得阳性转化子 PP-NP<sup>c</sup>。

2.5 延伸突变重组酵母表达及纯化

突变基因 *phyA<sup>c</sup>* 在毕赤酵母中得到表达 ,表达产物经分离纯化后 ,SDS-PAGE 表明已获得均一的酶蛋白(如图 1)。其分子量为 70.2kD ,与未突变植酸酶(PP-NP<sup>m</sup>-8)一致<sup>[3]</sup>。

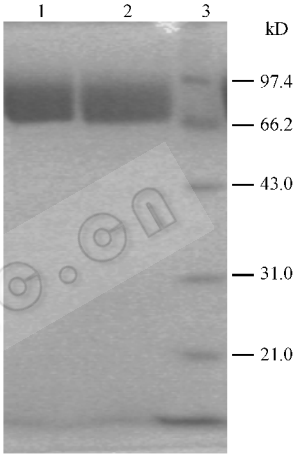


图 1 纯化植酸酶 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of phytase purified

1 PP-NP<sup>c</sup>( mutant phytase ) ;2 :PP-NP<sup>m</sup>-8( wild-type phytase ) ;3 :protein standard .

2.6 突变酶的酶学性质

2.6.1 最适反应温度 :突变酶液与 pH4.6 ,0.02mol/L HAc-NaAc 底物缓冲液在不同的温度下反应 30min ,测定酶活 ,结果如图 2。由图 2 中可知突变酶 PP-NP<sup>c</sup> 的最适反应温度为 63℃。比未突变植酸酶 PP-NP<sup>m</sup>-8 上升了 3℃。

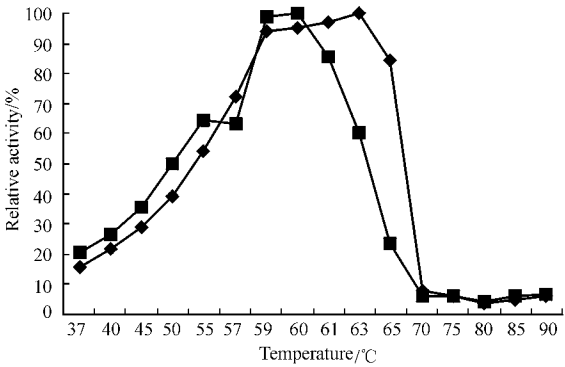


图 2 反应温度对植酸酶活性的影响

Fig. 2 The curve of optimum temperature for catalytic reaction of wide-type phytase and its mutants

■ PP-NP<sup>m</sup>-8 ( wild-type phytase ) ;◆ PP-NP<sup>c</sup> ( mutant phytase ) .



3 讨论

3.1 结构延伸突变对酶热稳定性的影响

李弘剑<sup>[2]</sup>利用结构延伸突变的方法,在嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶 I 及其取代突变酶 88(25)的 C 末端连接了 12 个氨基酸的随机肽链,结果非常有效地提高了嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶 I 及其取代突变酶 88(25)的热稳定性。吴琦<sup>[8]</sup>(2004)等将芽孢杆菌植酸酶 *phyC* 基因在大肠杆菌中融合表达,其表达植酸酶 C 末端增加了来源于表达载体序列的 13 个氨基酸残基。融合表达植酸酶,其最适反应温度高达 75℃,比出发菌株植酸酶的高 15℃,比非融合表达植酸酶的高 25℃;其耐热性也显著提高,90℃ 处理 10min 后的残留酶活性为 37℃ 时的 75.7%。本研究将黑曲霉植酸酶 *phyA<sup>m</sup>* 基因构建在 pET-30L(+)载体质粒上,通过特定引物设计,PCR 扩增,获得含有 pET-30L(+)载体质粒上的 13 氨基酸残基延伸突变植酸酶基因 *phyA<sup>e</sup>*。并实现 *phyA<sup>e</sup>* 基因在毕赤酵母中有效表达。表达突变植酸酶最适反应温度为 63℃。比未突变植酸酶上升了 3℃。其耐热性也显著提高,突变酶在 75℃ 水浴处理 10min 后,残留酶活性达到 78%,比未突变植酸酶热稳定性提高 21%。由于突变植酸酶 C 末端增加了来源于表达载体序列的 13 个氨基酸残基 Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His6。经 3D-pssm 蛋白质数据服务器的蛋白质二级结构预测分析表明,由于这 13 个氨基酸残基的加入,不仅使原有酶蛋白的 C 末端增加了一个含有 6 个氨基酸残基的  $\alpha$ -螺旋和一个由 4 个 His 组成的无规卷曲,且引起酶分子内部  $\alpha$ -螺旋比例的提高。一方面,  $\alpha$ -螺旋在酶分子中产生螺旋偶极相互作用,有利于在三维结构上增加蛋白质的刚性,另一方面, C 末端 6 个带正电荷 His 残基的加入,可为蛋白质提供额外的盐键作用。上述两种结构都有助于防止蛋白质分子热运动所导致的肽链伸展,从而增加蛋白质的热稳定性<sup>[8,10]</sup>。

3.2 结构延伸突变对酶反应 pH 的影响

要使植酸酶能在畜禽体内产生有效的催化作用,就必须使酶与畜禽的生理条件相适应。不同的动物消化道的 pH 值不同,即使是一种动物在消化道的不同部位 pH 值也不同。因此要求饲用酶对 pH 值有较大的适应范围。Andrea Tomschy 等<sup>[9]</sup>(2002)通过定点突变改变真菌和同序概念(consensus concept)植酸酶的 pH 活性范围,结果产生第 2 个最适 pH 在 2.8~3.4。另外,在同序概念植酸酶和 *A. fumigatus* 中 K68A 单点突变,以及在 *A. fumigatus* 植酸酶进行 S140Y, D141G 双突变,以植酸为底物将降低最适 pH 值 0.5~1.0 单位。吴琦(2004)等将芽孢杆菌植酸酶 *phyC* 基因在大肠杆菌中融合表达,表达植酸酶有效催化 pH 范围扩大 1.5 单位。本研究中,结构延伸突变植酸酶基因 *phyA<sup>e</sup>* 在毕赤酵母中表达产物最适反应 pH5.6,有效催化 pH 范围向中性扩大到 pH6.6,比未突变酶扩大了 0.4 单位。可能由于该延伸 13 氨基酸片段改变酶分子表面电荷的相互作用,使得其反应 pH 范围有所增

加<sup>[9]</sup>。真菌来源的酸性植酸酶催化反应的有效作用 pH 范围在 2.5~5.5 之间,适用于 pH 值呈酸性的单胃动物,但不适用于消化道呈中性的鲤科鱼类,以及在单胃动物中 pH 值接近中性的肠道中表现酶活力。而结构延伸突变植酸酶的有效作用 pH 向中性扩大,对该酶在肠道发挥催化作用以及在消化道呈中性的鲤科鱼类中应用具有积极意义。

另外,结构延伸突变对植酸酶的比活力几乎没有影响,动力学研究表明,突变酶对植酸钠的亲合性增强,但其  $K_{cat}$  值并未得到提高,说明酶与底物的结合不是植酸酶水解植酸产磷的限速步骤。突变植酸酶热稳定性的提高,酶促反应 pH 范围的扩大,将有利于植酸酶的工业化生产。

本研究用结构延伸的方法提高真菌植酸酶的热稳定性及扩大酶作用有效 pH 范围在国内外还未见报道。突变植酸酶热稳定性的提高,酶促反应 pH 范围的扩大,将有利于植酸酶的工业化生产及应用。

REFERENCES(参考文献)

[1] Chen H(陈惠),Wang HN(王红宁),Wu Q(吴琦). Research and progress on feed phytase reform by protein engineering. *Microbiology*(微生物学通报), 2004, **31**(3):106-110

[2] Li HJ(李弘剑),Zhang Y(张毅),Tom oaki Matsuura *et al.* Primary studies on the improvement of enzyme thermostability by elongation mutation of catalase I. *Chinese Biochemical Journal*(生物化学杂志), 1997, **13**(4):371-377

[3] Chen H(陈惠),Zhao HX(赵海霞),Wang HN(王红宁) *et al.* Increasing expression level of phytase gene(*phyA*) in *Pichia pastoris* by changing pare cordons. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2005, **21**(2):171-175

[4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed(分子克隆实验指南,第二版). Beijing: Science Press, 1998

[5] Multi-Copy *Pichia* Expression Kit. Invitrogen Corporation, 1998.

[6] Zhang LX(张龙翔), Zhang TF(张庭芳) Li LY(李令媛). *A Laboratory Manual about Biochemistry*: High Education Press, 1982

[7] Zhao G(赵赣), Chen XL(陈鑫磊),Chen H(陈惠) *et al.* *A Laboratory Manual about Biochemistry* (生物化学实验指导). Nanchang: Jiangxi Science and Technology Press(江西科技出版社), 2000 pp. 60-62.

[8] Wu Q(吴琦),Wang HN(王红宁), Zou LK(邹立扣) *et al.* Expression of phytase *phyC* from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* and its effect on enzymatic thermostability. *High Technology Letters* (高技术通讯) 2004, **14**(5):23-27

[9] Tomschy A, Brugger R, Lehmann M. Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4):1907-1913

[10] Lehmann M, Pasamontes L, Lassen SF. The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1543**:408-415