

# 基于 T7 表达系统的洋葱伯克霍尔德菌 G63 脂肪酶同源高效表达

贾彬, 杨江科, 闫云君

华中科技大学生命科学与技术学院 分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074

**摘要:** 为实现对洋葱伯克霍尔德脂肪酶的可控高效表达, 将目前被广泛使用的 T7 重组蛋白高效表达系统移植到洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)G63 中进行脂肪酶同源表达。首先采用 PCR 从大肠杆菌 BL21(DE3)中得到 T7 RNA 聚合酶基因(T7 RNAP)并将其克隆到致死质粒 pJQ200SK 上, 然后在 T7 RNAP 前后各加入 500 bp 用于同源重组的片段, 再通过三亲本杂交把 T7 RNAP 整合到 *B. cepacia* 基因组上, 使 T7 RNAP 受到脂肪酶基因(*lipA*)启动子调控。接着把 *lipA* 和它的伴侣基因 *lipB* 单独或全部克隆到载体 pUCPCM 和 pBBR22b 上, 构建出 pBBR22b*lipA*B、pBBR22b*lipA*、pUCPCM*lipA*B、pUCPCM*lipA*、pUCPCMΔ*lipA**lipB*、pUCPCMΔ*lipA*、pUCPCMΔ*lipB* 七种表达质粒, 通过电转化将上述表达质粒转化到含 T7 RNAP 的 *B. cepacia* 宿主菌中, 最终得到一系列脂肪酶基因工程菌。通过摇瓶诱导发酵发现含表达质粒 pUCPCM*lipA*B 的工程菌脂肪酶酶活最高, 达到 607 U/mg, 与野生菌相比酶活力提高 2.8 倍, 并且除含 pUCPCMΔ*lipB* 的工程菌外, 其它工程菌的脂肪酶酶活均有不同程度提高。野生菌与工程菌 pUCPCM*lipA*B 的发酵液经硫酸铵沉淀, Sephadex G-75 凝胶过滤纯化后, 比酶活分别为 29 984 U/mg 和 30 875 U/mg。以上结果表明, 构建的基于 T7 表达系统的 *B. cepacia* 脂肪酶基因工程能有效提高脂肪酶的表达量, 同时说明分泌信号 *PeiB* 和增强转录的核糖体接合位点对脂肪酶的表达有促进作用。

**关键词:** T7 RNA 聚合酶表达系统, 同源表达, 三亲本杂交, 洋葱伯克霍尔德菌 G63

## Homologous expression of *Burkholderia cepacia* G63 lipase gene based on T7 RNA polymerase expression system

Bin Jia, Jiangke Yang, and Yunjun Yan

Key Laboratory of Molecular Biophysics of Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

**Abstract:** In order to realize over-expression of *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) lipase, we introduced the widely used T7 RNA polymerase expression system into *B. cepacia* G63 to over-express the lipase gene. By using PCR technique, we amplified the T7 RNA polymerase gene (T7 RNAP) from the BL21 (*DE3*) and cloned it into the suicide plasmid pJQ200SK. After that, we flanked T7 RNAP with two 500 bp homologous fragments and integrated it into the genomes of *B. cepacia* by tri-parental mating, so that T7 RNAP was under-controlled by lipase gene (*lipA*) promoter. Then, we cloned the *lipA* and its partner gene *lipB* into the vector

**Received:** September 17, 2008; **Accepted:** November 28, 2008

**Supported by:** the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-07-0336).

**Corresponding author:** Yunjun Yan. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

国家“863”计划项目(Nos. 2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703), 教育部新世纪优秀人才基金(No. NCET-07-0336)资助。

pUCPCM and pBBR22b both or separately. Therefore, we got 7 expression plasmids pBBR22b lipAB, pBBR22b lipA, pUCPCM lipAB, pUCPCM lipA, pUCPCM $\Delta$  lipAlipB, pUCPCM $\Delta$  lipA, pUCPCM $\Delta$  lipB, and then electroporated them into *B. cepacia* containing T7 RNA. After shake flask culture, we found *B. cepacia* containing pUCPCM lipAB produced the most quantity of lipase, and lipase activity was up to 607.2 U/mg, 2.8-folds higher than that of the wild strain. Moreover, lipase activities of all engineering strains except the one containing pUCPCM $\Delta$  lipB were enhanced to some extent. The specific activities of wild type *B. cepacia* and *B. cepacia* containing pUCPCM lipAB were respectively 29 984 U/mg and 30 875 U/mg after ammonium sulfate precipitation and gel filtration chromatography. The T7 RNA polymerase expression system could effectively enhanced lipase expression in *B. cepacia*, and secretion signal *PelB* and ribosome-binding site may promote lipase expression in engineering strain.

**Keywords:** T7 RNA polymerase expression system, homologous expression, tri-parental mating, *Burkholderia cepacia* G63

脂肪酶(EC3.1.1.3, 甘油三酯酯水解酶)是一种自然界广泛存在的 $\alpha/\beta$ 水解酶。它能催化长链甘油三酯进行酯水解、酯交换、酯合成等反应而被广泛应用于食品和油脂加工、饲料、精细化工、生物能源、生物防治等领域<sup>[1]</sup>,具有重要的经济价值,市场前景广阔。洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)又名洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*),是Burkholder于1949年发现的一类革兰氏阴性菌<sup>[2]</sup>。*B. cepacia*脂肪酶具有稳定性高、反应活性强、催化反应类型多、对映体选择能力强等优点格外引人注目<sup>[3]</sup>。

国外对*B. cepacia*脂肪酶的研究比较早。Jørgensen等<sup>[4]</sup>首先克隆了*B. cepacia*脂肪酶基因并指出该脂肪酶基因需要一个伴侣基因的帮助才能实现正确折叠。Petra等<sup>[5]</sup>的研究发现*B. cepacia*脂肪酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达成无活性的包涵体形式。后来的研究还发现,*B. cepacia*脂肪酶的分泌与折叠还与细胞内Dsb复合体等多种蛋白质相关<sup>[6]</sup>。国内,Yang JK等<sup>[7]</sup>利用脂肪酶自身的启动子成功地实现了*B. cepacia*脂肪酶同源表达,但还存在产酶过程不可控、表达不稳定等技术问题。

基于T7 RNA聚合酶(T7 RNAP)及其强启动子之间识别的特异性和转录的高效性而建立起来的表达系统,为目前在大肠杆菌中表达外源基因的最强大表达系统之一。在体内T7 RNAP几乎能完整地转录在T7启动子下游的所有DNA序列,转录效率极高<sup>[8]</sup>。因此,在*B. cepacia*中利用T7 RNAP表达系统对脂肪酶基因进行高效的转录和翻译可能会很好地解决上述问题。

本实验以同源重组的方法将T7 RNA聚合酶基因整合到*B. cepacia*基因组中并受脂肪酶基因自身启动子的调控,成功将*E. coli*T7表达系统移植到

*B. cepacia*中,实现了*B. cepacia*脂肪酶的高效表达和严谨调控。该系统的建立为洋葱伯克霍尔德脂肪酶工业化生产奠定了良好基础,同时也为利用洋葱伯克霍尔德表达重组蛋白做了探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、培养基及其培养条件

菌株:*B. cepacia* G63为本实验室从油污土壤中筛选得到。*E. coli* DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)为本实验室保存的菌种。*B. cepacia*在常规培养基LB中30 $^{\circ}$ C培养,根据需要分别加入相应的抗生素。无特别说明*E. coli*均在37 $^{\circ}$ C培养。抗生素使用浓度如下:氨苄青霉素,100  $\mu$ g/mL;甲氧苄氨嘧啶,30  $\mu$ g/mL;氯霉素,30  $\mu$ g/mL;壮观霉素,100  $\mu$ g/mL;庆大霉素,50  $\mu$ g/mL。

质粒:pRK2073和pBBR1Tp购自ATCC公司,pRK2013含tra基因作为三亲杂交的辅助质粒(壮观霉素抗性)。pJQ200sk由加拿大卡尔加里大学Michael F. Hynes教授惠赠,在*B. cepacia*中为自杀质粒(庆大霉素抗性)。pUCPSK由澳大利亚昆士兰大学的Ke-Lin Ru教授惠赠,含T7启动子穿梭质粒(氨苄青霉素抗性)。pBBR22b由德国杜塞尔多夫大学的Susanne Wilhelm教授惠赠,含T7启动子,穿梭质粒(氯霉素抗性)。pUCPSK、pBBR1TppBBR22b均可以在*B. cepacia*中稳定遗传。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

总DNA提取纯化试剂盒购自天根公司;DNA限制性内切酶、DNA连接试剂盒、Taq DNA聚合酶、T载体试剂盒、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)和dNTP均购自TaKaRa公司;凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒购自OMEGA公司;Sephadex G-75购自

Amersham 公司; 5 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、甲氧苄氨嘧啶购自 Sigma 公司; 胰蛋白胨、酵母抽提物购自 Oxoid 公司, 其他试剂为国产分析纯; 实验中所用引物由上海生物工程公司合成。离心机为德国 Eppendorf 5415D 型高速离心机, PCR 仪为德国 Eppendorf 公司, 电转化仪为德国 Eppendorf Multiporator 型。

## 1.2 基因克隆与质粒构建

### 1.2.1 PCR 扩增引物设计

根据 NCBI 公布 DNA 序列分别设计引物, 具体见表 1。

### 1.2.2 自杀质粒构建

使用总 DNA 提取纯化试剂盒提取纯化 BL21(DE3)和 *B. cepacia*G63 总 DNA。以 BL21(DE3)总 DNA 为模板, T7 poly5 和 T7 poly3 为引物扩增 T7 RNA 聚合酶结构基因(T7 RNAP)。扩增条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 3 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 DNA 凝胶纯化试剂盒纯化后与 pMDI8-T 载体进行连接, 连接产物转化 DH5 $\alpha$ 得到质粒 pMDT7。具体方法参照分子克隆实验指南<sup>[9]</sup>。

以 *B. cepacia* 总 DNA 为模板, 分别用 UP5 和 UP3、Down5 和 Down3 作为引物扩增。扩增条件:

95°C 预变性 3 min; 94°C 0.5 min, 55°C 0.5 min, 72°C 0.5 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 2 种 PCR 产物分别经凝胶纯化后用 *Pst* I 酶切, 用 T4 DNA 连接酶将 2 种酶切产物 4°C 连接过夜。最后以连接产物为模板, UP5 和 Down3 为引物进行扩增, 扩增条件: 95°C 预变性 4 min; 94°C 0.5 min, 54°C 0.5 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。将 1 kb 的 PCR 产物纯化后与 pMD18-T 载体进行连接并转化, 得到质粒 pMDUD。

以质粒 pBBR1TP 为模板, Tp5 和 Tp3 为引物扩增甲氧苄氨嘧啶抗性基因, 扩增条件同上。将 PCR 产物纯化后用 *Bgl* II 酶切, 把酶切后的 PCR 产物与经 *Bgl* II 酶切的 pJQ200sk 质粒进行连接, 连接产物转化后经甲氧苄氨嘧啶抗性平板筛选后得到具有甲氧苄氨嘧啶抗性的质粒 pJQTP。

用 *Not* I/*Xho* I 同时酶切质粒 pMDUD, 切胶回收 1 kb 的 UD 片段, 将该片段与同样经 *Not* I/*Xho* I 酶切的质粒 pJQTP 连接, 转化后得到 pJQTPUD。将 pJQTPUD 用 *Pst* I 酶切, 酶切后用 CIAP 去磷酸化。用 *Pst* I 酶切 pMDT7 后切胶回收 2.7 kb 的 T7 RNAP, 并将它与去磷酸化的 pJQTPUD 连接, 转化后得到质粒 pJQTPUDT7, 最后取 T7 RNAP 正向插入的作为自杀质粒 pJQTPUDT7+。

表 1 PCR 实验引物

Table 1 Primers used for PCR

Primers	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Restriction site
T7 poly5	CTTCTGCAGATGAACACGATTAACATCGCT	30	<i>Pst</i> I
T7poly3	CTTCTGCAGTTACGCGAACGCGAAGTCCGA	30	<i>Pst</i> I
UP5	CTTGCGGCCGCAGCATCGCTACGCGCTGAAC	31	<i>Not</i> I
UP3	CTTCTGCAGGCATGTTCTCCTGATTATTG	29	<i>Pst</i> I
Down5	CTTCTGCAGAGATGTTGCTCGATGGTG	27	<i>Pst</i> I
Down3	CTTCTCGAGGTGATCTACGTCGGCAGTCT	29	<i>Xho</i> I
Cmr5	CTTAGTACTTTGGCGAAAATGAGACGT	27	<i>Sca</i> I
Cmr3	CTTAGTACTTTAATGAATCGGCCAACG	27	<i>Sca</i> I
Tp5	CTTAGATCTCACGAACCCAGTTGACATAAG	30	<i>Bgl</i> II
Tp3	CTTAGATCTTTAGGCCACACGTTCAAG	27	<i>Bgl</i> II
SacAB-sencea	CGAGAGCTCAGCCAAATCGATGCGTTCCAG	30	<i>Sac</i> I
AB-ANTI	CTTAAGCTTACGCGGCGACACCCGGGTCA	29	<i>Hind</i> III
lifA70senceATG	TATTCTAGAATGCCGCCGTCGCTCGCCGGTTCC	33	<i>Xba</i> I
lipAsignalATG	TATCTGCAGATGACCGCGCCCGCCGACACTAT	33	<i>Pst</i> I
AF42709	CTTAAGCTTTTACACGCCCGCGAGCT	26	<i>Hind</i> III

The black fonts indicate for restriction site.

### 1.2.3 表达质粒的构建

以 pBBR22b 为模板, Cm5 和 Cm3 作为引物扩增氯霉素抗性基因。扩增条件: 95°C 预变性 4 min; 94°C 0.5 min, 53°C 0.5 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经凝胶纯化后用 *Sca* I 酶切, 酶切产物与经 *Sca* I 酶切的质粒 pUCP200sk 连接, 连接产物转化后经氯霉素抗性筛选得到具氯霉素抗性的质粒 pUCPCM。

以 *B. cepacia* 总 DNA 为模板, SacAB-sencea 和 AB-ANTI 为引物扩增脂肪酶及其伴侣基因。为使脂肪酶基因 *lipA* 能够正确与表达质粒融合, 利用本对引物扩增的产物包括脂肪酶基因 *lipA*(不含 ATG)和完整的脂肪酶伴侣基因 *lipB*。把 2.3 kb 的 PCR 产物纯化后克隆入 PMD18-T 载体后得到重组质粒 PMDlipAB, 重组质粒 pMD-lipAB 经 *Sac* I/*Hind* III 酶切, 切胶回收 2.3 kb 的 *lipAB* 并与经 *Sac* I/*Hind* III 酶切的质粒 pBBR22b 连接, 转化 DH5 $\alpha$  得到表达质粒 pBBR22lipAB。同样的方法, 以 *B. cepacia* 总 DNA 为模板, 用 SacAB-sencea 和 AF42709 为引物扩增 *lipA*。PCR 产物克隆入 PMD18-T 得到 PMDlipA, PMDlipA 经 *Sac* I/*Hind* III 酶切后最终与 pBBR22b 连接并转化得到表达质粒 pBBR22lipA。

以 *B. cepacia* 总 DNA 为模板, 用 lip $\Delta$ signalATG 和 AB-ANTI 作为引物, PCR 扩增产物  $\Delta$ lipAlipB 为去掉信号肽的脂肪酶基因和完整的脂肪酶伴侣基因, PCR 产物纯化后与 PMD18-T 载体连接得到重组质粒 PMD- $\Delta$ lipAlipB, PMD- $\Delta$ lipAlipB 经 *Pst* I/*Hind* III 酶切回收 2 kb 左右的片段, 回收片段与经 *Pst* I/*Hind* III 酶切的 pUCPCM 连接, 转化后得到表达质粒 pUCPCM $\Delta$ lipAlipB。采用同样的方法, 用 lip $\Delta$ signalATG 和 AF42709 作为引物扩增, 经过 *Pst* I/*Hind* III 酶切、连接、转化后得到表达质粒 pUCPCM $\Delta$ lipA; 用 lip $\Delta$ 70senceATG 和 AB-ANTI 作为引物, 经过 *Xba* I/*Hind* III 酶切, 连接, 转化后得到表达质粒 pUCPCM $\Delta$ lipB。

用 *Xba* I/*Hind* III 酶切质粒 pBBR22lipAB, 切胶回收 2.3 kb 的 *lipAB* 并与经 *Xba* I/*Hind* III 酶切的质粒 pUCPCM 连接, 连接产物转化后得到表达质粒 pUCPCMlipAB。同样的方法, 用 *Xba* I/*Hind* III 酶切质粒 pBBR22lipA 后经连接, 转化后得到表达质粒 pUCPCMlipA。本研究构建的所有质粒见表 2。

表 2 表达质粒

Table 2 Expression plasmids

Plasmid	Characteristics
pBBR22lipAB	pBBR22b:: 2.3-kb fragment carrying lipA and lipB
pBBR22lipA	pBBR22b:: 1.1-kb fragment carrying lipA
pUCPCMlipAB	pUCPCM::2.3-kb fragment carrying lipA and lipB
pUCPCMlipA	pUCPCM::1.1-kb fragment carrying lipA
pUCPCM $\Delta$ lipAlipB	pUCPCM::2.1-kb fragment carrying $\Delta$ lipA and lipB
pUCPCM $\Delta$ lipA	pUCPCM::970 bp fragment carrying $\Delta$ lipA
pUCPCM $\Delta$ lipB	pUCPCM::850 bp fragment carrying $\Delta$ lipB

### 1.3 基因工程菌的构建

含自杀质粒 pJQTPUDT7+ 的 DH5 $\alpha$  作为供体菌, 含质粒 pRK2073 的 DH5 $\alpha$  作为辅助菌, *B. cepacia* 作为受体菌, 采用三亲本杂交的方法, 把自杀质粒 pJQTPUDT7+ 接合转移到 *B. cepacia* 中, 经抗性筛选后得到 T7 RNAP 整合到 *B. cepacia* 基因组的同源重组菌。三亲本杂交的方法如下<sup>[10]</sup>: 取活化的 3 种菌接种于新培养基中, 培养至 OD<sub>600</sub>=0.6。各取 2 mL 菌液, 离心, 收集菌体, 以 0.9% NaCl 溶液冲洗 2 次后用 200  $\mu$ L 0.9% NaCl 重悬。然后取 100  $\mu$ L 辅助菌悬液和 100  $\mu$ L 供体菌混匀, 25°C 温浴 30 min 后再与 200  $\mu$ L 受体菌悬液混匀, 调整体积后点在预先温好的 LB 固体培养基上。28°C 培养 1 d 后将平板上的菌体刮下, 重悬于 0.9% NaCl 溶液, 梯度稀释涂布于含氨苄青霉素和甲氧苄氨嘧啶的双抗 PMM 固体培养基上(氨苄青霉素用来排除 DH5 $\alpha$ , 甲氧苄氨嘧啶用来排除 *B. cepacia*), 28°C 培养至有菌落长出。挑取转化子, 经培养后抽提总 DNA, 对 T7 RNAP 进行 PCR 验证。

采用电转化的方法把表达质粒导入 *B. cepacia* 同源重组菌中。电转化方法: 取 1 mL 过夜培养的 *B. cepacia* 菌液接种于 50 mL LB(去掉 NaCl)培养基, 30°C 培养至 OD<sub>600</sub>=0.8 后离心收集菌体。用电转液(1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>+1 mmol/L HEPES+300 mmol/L 蔗糖)清洗菌体 2 次, 然后将菌体重悬在 0.8 mL 冰冷的电转液中, 放置于冰上。取 5  $\mu$ L 表达质粒(1  $\mu$ g)与 100  $\mu$ L 冰冷的 *B. cepacia* 菌悬液混匀, 然后将混合物转移至 0.2 mm 的电转化杯中, 置于冰上 5 min 后进行电击(2400 V, 5  $\mu$ s)。电击后立即添加 1 mL 电转液, 在 30°C 温浴 2 h 后取 100  $\mu$ L 细胞涂布于氯霉素抗性的平板上 28°C 培养至有菌落长出。

### 1.4 产酶发酵及脂肪酶酶活的测定

发酵培养基为: 0.5%糊精, 1.5%蛋白胨, 0.18%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.07%  $MgSO_4$ , 0.14%尿素, 2%橄榄油乳化液, 起始 pH 8.4。发酵条件: 250 mL 锥形瓶装液量为 30 mL, 摇床转速 200 r/min, 培养温度 30°C, 接种量为种子液: 发酵液=1: 50。

脂肪酶活的测定采用以橄榄油为反应底物的 NaOH 电位滴定法<sup>[11]</sup>。脂肪酶水解活力单位(U) 定义为在 45°C、pH 9.0 的条件下, 每分钟水解橄榄油产生 1  $\mu\text{mol}$  游离脂肪酸所需的酶量。蛋白质含量采用 Bradford 法测定。

### 1.5 脂肪酶的初步纯化

采用硫酸铵沉淀、凝胶过滤层析的方法对发酵获得的脂肪酶进行初步纯化。在冰浴条件下将预先冰冷的饱和硫酸铵溶液缓慢加入 50 mL 发酵液上清中, 边加硫酸铵边用磁力搅拌器搅拌, 直至硫酸铵终浓度为 60%, 4°C 静置过夜后离心收集沉淀。将沉淀溶解于 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 4°C 透析 6~8 h 后置于高浓度 PEG20000 溶液中浓缩至 1 mL 左右。

凝胶过滤层析: Sephadex G-75(1.6 cm  $\times$  60 cm) 凝胶柱先用 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液平衡。取 500  $\mu\text{L}$  透析浓缩液沿层析柱管壁缓慢加入后用 250 mL 缓冲溶液洗脱, 流速为 0.5 mL/min。用部分收集器收集洗脱液, 每管大约 5 mL。洗脱完后, 从每管中取 20  $\mu\text{L}$ , 用脂肪酶活性平板检测, 将有脂肪酶活性的洗脱液集中在一起。

## 2 结果

### 2.1 *B. cepacia* 自杀质粒和表达质粒的构建

以 BL21(DE3)总 DNA 为模板扩增 2.7 kb 的 T7 RNA 聚合酶结构基因如图 1A。由图可见, 扩增结果与预期结果一致, 克隆入 T 载体后经测序也证明 T7 RNAP 正确。以 *B. cepacia* 总 DNA 为模板, 分别扩增 lipA 前 500 bp 的片段 UP 和 lipB 后 500 bp 的片段 Down。2 个片段经 *Pst* I 酶切, T4 DNA 连接酶连接后作为模板再次扩增, 得到 UP 在前 Down 在后中间为 *Pst* I 酶切位点的 1 kb 片段 U-D, 由图 1B 可见 PCR 结果与预期结果一致, 克隆入 T 载体后经测序后也验证正确。

质粒 pJQ200sk 被广泛应用与革兰氏阴性菌中<sup>[12]</sup>, 质粒基本信息如图 2。

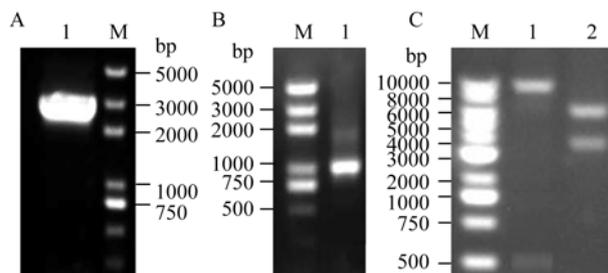


图 1 T7 RNAP、U-D 片段 PCR 及质粒 pJQTPUDT7 $\pm$  酶切验证

Fig. 1 T7 RNA polymerase, U-D fragment PCR and digestion of plasmid pJQTPUDT7 $\pm$ . (A) 1: T7 RNAP PCR; M: marker. (B) 1: U-D fragment PCR; M: marker. (C) 1: pJQTPUDT7-/Not I/Xho I; 2: pJQTPUDT7+/Not I/Xho I; M: marker.

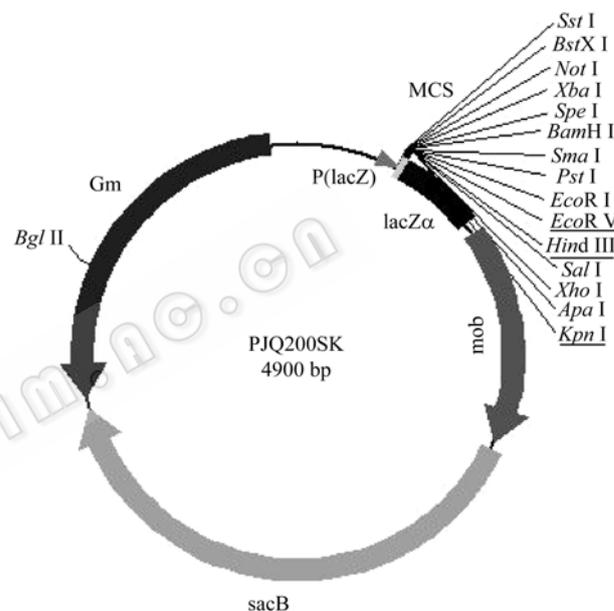


图 2 质粒 pJQ200sk 图谱

Fig. 2 Map of Vector pJQ200sk. The features of pMS402 include Gentamycin resistant gene, lacZ $\alpha$  fragment which allows white&blue selection, mob gene which allows the mobilization of the constructs into most Gram-negative bacteria, sacB gene encoding *Bacillus subtilis* levansucrase which is lethal to many Gram-negative bacteria in the presence of sucrose.

首先把该质粒改造为甲氧苄氨嘧啶抗性, 然后通过 *Not* I/*Xho* I 把 U-D 克隆插入, 接着通过 *Pst* I 把 T7 RNAP 克隆入 UP 和 Down 之间。因为 T7 RNAP 是单酶切克隆, 所以它在自杀质粒中的方向有正反 2 种, 需通过 *Not* I/*Nde* I 双酶切进行方向判断, 切出 3 kb 条带的质粒为 T7 RNAP 正向插入, 切下 500 bp 的为反向插入。酶切结果如图 1C 并对 pJQTPUDT7+ 测序, 结果证明自杀质粒的构建是正确的。

质粒 pBBR22b<sup>[13]</sup>和 pUCP<sup>[14]</sup>都含 T7 启动子, 前

者还拥有增强转录的核糖体结合位点和 *pelB* 分泌信号, 与前者相比, 后者的拷贝数更高, 质粒更小。以 *B. cepacia* 总 DNA 作模板, SacAB-sencea 和 AB-ANTI 作引物扩增 *lipAB*、用 SacAB-sencea 和 AF42709 为引物扩增 *lipA*、用 *lipΔsignalATG* 和 AB-ANTI 作为引物扩增  $\Delta lipAlipB$ 、用 *lipΔsignalATG* 和 AF42709 作为引物扩增  $\Delta lipA$ 、用 *lipΔsignalATG* 和 AF42709 作为引物扩增  $\Delta lipB$ 。通过 *Sac I/Hind III* 双酶切把 *lipAB* 克隆到 pBBR22b 中得到表达质粒 pBBR22lipAB, 然后用 *Xba I/Hind III* 把 pBBR22b 上的核糖体结合位点、*PelB* 分泌信号与 *lipAB* 一起克隆到 pUCPCM 上得到表达质粒 pUCPCMlipAB, 采用同样的方法构建表达质粒 pUCPCMlipA。而  $\Delta lipAlipB$ 、 $\Delta lipA$ 、 $\Delta lipB$  则是直接克隆到 pUCPCM 上得到相应的表达质粒。所有表达质粒的酶切验证见图 3。说明所有表达质粒构建正确。

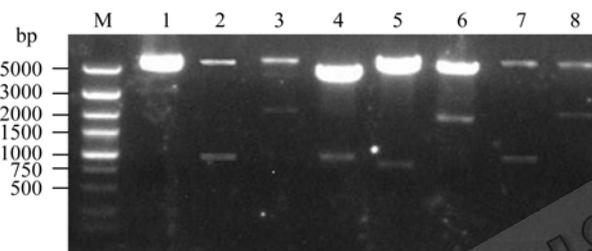


图 3 表达质粒酶切验证

Fig. 3 Digestion of expression plasmids. M: marker; 1: pBBR22b; 2: pBBR22lipA/*Xba I/Hind III*; 3: pBBR22lipAB/*Xba I/Hind III*; 4: pUCPCM  $\Delta lipA$ /*Pst I/Hind III*; 5: pUCPCM $\Delta lipB$ /*Xba I/Hind III*; 6: pUCPCM $\Delta lipAlipB$ /*Xba I/Hind III*; 7: pUCPCMlipA/*Xba I/Hind III*; 8: pUCPCMlipAB/*Xba I/Hind III*.

## 2.2 *B. cepacia* 工程菌的构建及其发酵评价

采用三亲本杂交把自杀质粒 pJQTPUDT7+转入

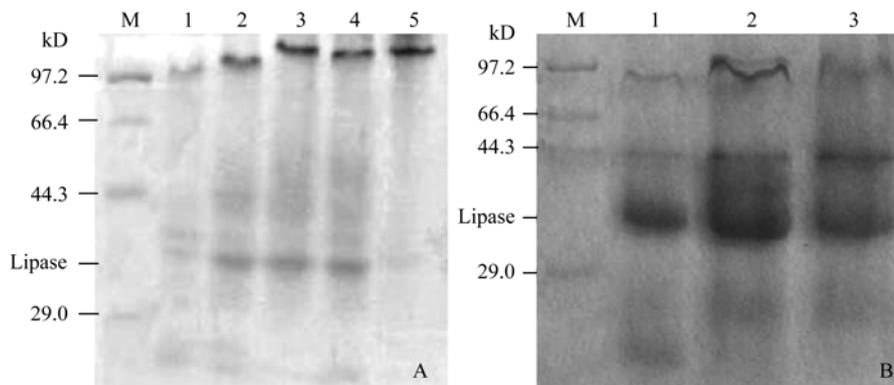


图 4 *B. cepacia* 发酵液上清 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of *B. cepacia* supernatant. (A) M: marker; 1: wild strain; 2: pUCPCM $\Delta lipA$ ; 3: pBBR22lipA; 4: pUCPCMlipA; 5: pUCPCM $\Delta lipB$ . (B) 1: pBBR22lipAB; 2: pUCPCMlipAB; 3: pUCPCM $\Delta lipAlipB$ .

*B. cepacia* 中, 经过氨苄青霉素和甲氧苄氨嘧啶的双重筛选得到同源重组菌, 提取纯化重组菌的总 DNA 并以它为模板对 T7 RNAP 进行 PCR 检测, 结果表明 T7 RNAP 成功整合到 *B. cepacia* 的基因组 DNA 中。由于 PCR 扩增的 T7 RNAP 本身没有启动子而 UP500 含有脂肪酶的启动子, 因此整合的 T7 RNAP 受脂肪酶的启动子的调控。表达质粒采用电转化直接转入 *B. cepacia* 同源重组菌, 经氯霉素筛选得到抗性转化子, 对抗性转化子中提取的质粒 DNA 进行 PCR 验证, 并经橄榄油+罗丹明 B 荧光检测后获得一系列基因工程菌。先用橄榄油+罗丹明 B 对基因工程菌和原始菌的酶活进行初步判断, 然后通过碱滴定法定量分析几种工程菌间的酶活力差异。*B. cepacia* 发酵 4 h 后加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 和 50  $\mu\text{g/mL}$  的氯霉素, 继续发酵 56 h, 取发酵液上清进行 SDS-PAGE 电泳分析如图 4。

测得的发酵上清酶活和蛋白质含量及工程菌的酶活力见表 3。取工程菌 pUCPCMlipAB 和野生菌发酵液经硫酸铵沉淀, 凝胶过滤层析后测酶活力和蛋白质含量见表 4。

从表 3 可以看到除工程菌 pUCPCM $\Delta lipB$  外, 其他工程菌酶活均比野生菌有不同程度的提高, 其中工程菌 pUCPCMlipAB 的脂肪酶活力最高, 达到 607.2 U/mg, 与野生菌相比提高 2.8 倍。而工程菌 pUCPCM $\Delta lipAlipB$  与 pUCPCMlipAB 等相比缺少分泌信号 *pelB* 和核糖体结合位点, 因此酶活有所下降, pUCPCM $\Delta lipA$  也存在这个问题。表 3 中还可以看出含单独 *lipA* 的工程菌酶活均比含 *lipA*+*lipB* 的工程菌酶活低, 说明当 *lipA* 增加到一定程度时野生菌

表 3 野生菌和工程菌的酶活力比较

Table 3 Lipase activity comparison of the wild type and engineering type

Name	Total activity (U/L)	Total protein (mg/L)	Specific activity (U/mg)	Fold
<i>B. cepacia</i>	11500	53.0	216.8	1.0
pBBR22blipAB	23500	48.6	483.9	2.2
pBBR22blipA	17600	47.7	368.7	1.7
pUCPCMlipAB	28300	46.6	607.2	2.8
pUCPCMlipA	22700	49.8	455.4	2.1
pUCPCMΔlipB	19700	51.7	380.7	1.8
pUCPCMΔlipA	17000	62.5	272.0	1.3
pUCPCMΔlipB	9400	59.6	157.8	0.7

表 4 脂肪酶的纯化

Table 4 Purification of lipase

STEP	Total activity (U/L)		Total protein (mg/L)		Specific activity (U/mg)	
	<i>B. cepacia</i>	pUCPCMlipAB	<i>B. cepacia</i>	pUCPCMlipAB	<i>B. cepacia</i>	pUCPCMlipAB
Crude Enzyme solution	11500	28300	53.0	46.6	216.8	607.2
60% ammonium sulfate precipitation	9150	22730	18.6	23.4	510.5	971.4
Gel filtration chromatography	4580	9880	0.15	0.32	29984	30875

中 *lipB* 的表达产物不足以使所有表达的脂肪酶形成正确折叠而分泌胞外, 需要增加 *lipB* 的量, 而单独含 *lipA* 也能使酶活有所提高, 说明在 *lipA*: *lipB*=1:1 的情况下, *lipB* 基因表达产物的折叠能力还没有得到完全发挥。研究表明<sup>[15]</sup>, *lipB* 的表达产物分子伴侣蛋白 LIPB 由 N 端疏水区 and C 端亲水区组成, N 端疏水区把 LIPB 锚定在细胞周质空间, C 端则为活性区域, 工程菌 pUCPCMΔ*lipB* 去掉了 *lipB* 上编码 N 端疏水区域的 70 个氨基酸, 从而影响了 *lipB* 在细胞中的定位, 因此酶活也比较低。表 4 表明野生菌发酵液中含大量杂蛋白, 经纯化后脂肪酶的含量为 0.15 mg/L, 仅占发酵液总蛋白的 0.28%, 而工程菌发酵液纯化后脂肪酶的含量为 0.32 mg/L, 占发酵液总蛋白的 0.69%。纯化后工程菌 pUCPCMlipAB 脂肪酶的比活力与野生菌脂肪酶比活力相当, 由此说明工程菌 pUCPCMlipAB 有效增加了脂肪酶的表达量。

### 3 讨论

假单胞菌脂肪酶因其高稳定性和有机溶剂耐受性而备受关注, 但野生菌株由于酶产量低, 不稳定等原因难以大规模工业应用。*B. cepacia* 脂肪酶采用 GSP 分泌途径, 脂肪酶具有的 N 端信号肽, 可被 Sec 复合体所识别, 穿过内膜, 到达周质。在周质中由特异分子伴侣蛋白帮助其形成正确的折叠, 并在 Dsb

蛋白酶作用下生成一个分子内二硫键, 形成有活性的脂肪酶。随后脂肪酶通过由 12 个蛋白组成的 Xcp 复合体穿过外膜, 分泌到胞外。正是这种复杂性导致 *B. cepacia* 脂肪酶的异源高效表达难以实现, 在 *E. coli* 中的表达都是无活性的包涵体。而 Yang JK 等<sup>[7]</sup>采用同源表达的方法获得了良好结果, 为 *B. cepacia* 脂肪酶的高效表达提供一种方法。

本研究利用的Φ10 T7 启动子只被 T7 RNAP 识别, 而 T7 RNAP 只作用于 T7 启动子, 并且不需要任何其他转录因子协助, 这种独特的作用机制, 使宿主细胞不受生物种属及细胞类别的限制。T7 RNAP 与 T7 启动子间的作用高效性主要原因可能是 T7 RNA 聚合酶催化 RNA 合成的速度是 *E. coli* RNA 聚合酶的 5 倍<sup>[16]</sup>, 少量 T7 RNA 聚合酶在短时间内即可合成大量的目的 RNA, 因此将该系统应用于其他生物中时, 其高效表达特性是常规表达系统所不具备的。本实验结果也说明该系统在 *B. cepacia* 中得到了成功应用。

在实验中, 通过三亲本杂交把 T7 RNAP 整合在 *B. cepacia* 脂肪酶启动子后, 使 T7 RNAP 的表达受到脂肪酶启动子的调控, 而 T7 启动子受 T7 RNAP 的调控, 表达质粒上的脂肪酶基因又受 T7 启动子调控, 这样整个工程菌的脂肪酶就能处于同步表达状态, 增强脂肪酶的表达效果。同时为了研究不同表

达质粒和不同基因元件对脂肪酶表达的影响, 本实验构建了一系列表达载体, 结果表明高拷贝数 pUCPCM 质粒与 *peIB* 分泌信号、核糖体结合位点相结合才是最理想的表达策略, 用该策略得到了最高酶活(607.2 U/mg), 与野生菌相比酶活提高 2.8 倍, 这为 *B. cepacia* 脂肪酶的大规模发酵奠定可靠的技术基础。

## REFERENCES

- [1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipase. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **9**: 235–251.
- [2] Burkholder WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, 1950, **40**: 115–117.
- [3] Lundell K, Kanerva. Enantiomers of ring-substituted 2-amino-1-phenylethanol by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Tetrahedron Asymmetry*, 1995, **6**: 2282–2286.
- [4] Jørgensen S, Skov KW, Diderichsen B. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in a heterologous host requires two *Pseudomonas* genes. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 559–567.
- [5] Traub PC, Schmidt-Dannert C, Schmitt J, et al. Gene synthesis, expression in *E. coli*, and *in vitro* refolding of *Pseudomonas* sp. KWI 56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**: 198–204.
- [6] Frank R, Jaeger KE. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression anti mechanisms of secretion. *Biochimie*, 2000, **82**: 1023–1032.
- [7] Yang JK, Guo DY, Zhou W, et al. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *J Mol Catal, B Enzym*, 2007, **45**: 91–96.
- [8] Delarue M, Poch O, Tordo N, et al. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*, 1990, **3**(6): 461–467.
- [9] Joseph S, David WR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Huber B, Riedel K, Hentzer M, et al. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology*, 2001, **147**: 2517–2528.
- [11] Macedo GA, Park YK, Pastore GM. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Rev Microbiol*, 1997, **28**(2): 90–95.
- [12] Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 1993, **127**: 15–21.
- [13] Rosenau F, Jäger KE, Svendsen A. Enzyme Functionality: Design, Engineering and Screening. 1st ed. New York: CRC Press, 2004, 617–631.
- [14] Watson AA, Alm RA, Mattick JS. Construction of improved vectors for protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 1996, **172**: 163–164.
- [15] Frenken LG, de Groot A, Tommassen J. Role of the lipB gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol Microbiol*, 2003, **9**: 591–599.
- [16] Yin WY, Steitz TA. The mechanism of translocation and helicase activity in T7 RNA polymerase. *Cell*, 2004, **116**: 393–4041.