

E83V 对扩展青霉脂肪酶最适作用温度的影响*

陈国仁 林琳**

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要: 利用重叠延伸 PCR 法对扩展青霉碱性脂肪酶 (PEL) 基因作了体外定点突变, 获得了最适作用温度有所提高的突变体。含突变基因的重组质粒 pPIC3.5K-lip-E83V 在 *Pichia pastoris* GS115 中表达。对突变体表达产物 PEL-E83V-GS 与野生型表达产物 PEL-GS 作了比较: 前者最适作用温度为 45℃, 比野生型提高了 5℃; 其热稳定性基本不变; 突变体在 37℃ 下的表达量为 188 U/mL, 约为野生型的 80%。最适作用温度的提高可能是由于 83 位亲水性的 Glu 用疏水性的 Val 取代, 增加了脂肪酶表面的疏水作用, 使其在高温下更适于与底物的结合。

关键词: 扩展青霉碱性脂肪酶, 定点突变, 最适作用温度

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0085-05

Improvement of the Optimum Temperature of *Penicillium expansum* Lipase by Site-directed Mutagenesis*

CHEN Guo-Ren LIN Lin**

(Bioengineering College of Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

Abstract: In order to improve the optimum temperature of lipases, The *Penicillium expansum* lipase (PEL) gene was mutated by site-directed mutagenesis using overlap extension PCR technique. The recombinant plasmid pPIC3.5K-lip-E83V containing mutant gene was expressed in *Pichia pastoris* GS115. The comparison experiments of the mutant PEL-E83V-GS with the wild-type PEL-GS showed that: the optimum temperature of the mutant (45℃) was higher by 5℃ than that of the wild type. The thermostability of the mutant was similar to the wild type. The enzymatic activity of the mutant was 188 U/mL at 37℃, which was 80% that of the wild type at the same conditions. The hydrophobic interaction may be enhanced in the surface region by the hydrophilic amino acid, Glu substituted with the hydrophobic amino acid, Val, and be responsible for the improvement of optimum temperature.

Key words: *Penicillium expansum* lipase, Site-directed mutagenesis, Optimum temperature

扩展青霉 PF898 是由出发菌株经多代诱变育种而获得的碱性脂肪酶高产菌株, 可在碱性条件下分解三酰甘油产生脂肪酸及甘油^[1,2]。其在洗涤剂添加剂、皮革毛皮绢纺脱脂、生物制药等工业上有着广泛的应用。目前扩展青霉碱性脂肪酶 (PEL) 已实现了工业化生产, 近年来本课题组完成了 PEL 基因 cDNA 序列^[3] 和基因组 DNA 序列^[4] 的克隆, 并实现了在真核细胞毕赤酵母中的高效表达^[5]。但该酶为中温酶, 最适作用温度为 37℃ ~ 40℃, 在一些需要高温的工业应用上受到限制。本课题组采用蛋白质工程方

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270033)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30270033)

福建省自然科学基金重点项目资助 (No. B0120001)

** 联系人 Tel: 0591-3531613, E-mail: linlin@fjnu.edu.cn, benbo_00@yahoo.com

收稿日期: 2004-05-08, 修回日期: 2004-06-18

法对 PEL 进行改造,以期提高 PEL 的最适作用温度。通过分子结构模拟,设计将 Glu83 改变为 Val。本文报道了突变体 Glu83Val 的构建以及对其酶学性质的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *Pichia pastoris* GS115、*E. coli* TG1、pBluescript II SK、pPIC3.5 K 由上海细胞生物化学研究所吴祥甫研究员、袁中一研究员提供,PCR 模板由本课题组构建。

1.1.2 酶与试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、低熔点琼脂糖为 TaKaRa 公司产品。PCR 所用试剂为上海生物工程技术服务有限公司产品。其它化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 培养基: LB、YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 均按“Invitrogen 公司操作手册”推荐方法配制。橄榄油检验板为含 1.0% 底物的琼脂板。

1.1.4 引物 A: 5'-TTACGTAATGTTGTTCAACTACCAATC -3'; B: 5'-CTCAGCT CA GATAGCCAC -3'; C: 5'-CGAGAGCACAGGAGTGATGA -3; D: 5'-CACTCCT GT-GCTCTCGGGC-3'。

其中引物 A、B 为 3' 和 5' 端引物,引物 C、D 为突变引物,下划线表示突变位点。以上引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 定点突变:利用重叠延伸 PCR 方法进行定点突变:(1)模板的左右片段 PCR 扩增:用引物 A、C 和 B、D 分别进行左侧和右侧 PCR 反应,条件:100 μ L 反应体系中含 $10 \times$ pfu buffer, 200 μ mol/L dNTPs, 引物 A 和 D 各 100 pmol, 1 μ g 模板 DNA, 3 U pfu DNA 聚合酶。PCR 反应的程序:95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环;最后 1 次退火后,72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min;(2)全长基因的 PCR 扩增:上述的左右侧片段用低熔点胶回收后互为模板,其它条件同(1)。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 50 s, 37 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 5 个循环;然后加入引物 A 和 B, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 25 个循环;最后 1 次退火后,72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min;(3)突变基因经低熔点回收后与经限制性内切酶 *EcoRV* 线性化的 pBluescript II SK 质粒连接,转化 *E. coli* TG1 感受态细胞;(4)重组质粒经蓝白斑筛选,小量制备,用于 DNA 序列测定,确定突变克隆。

1.2.2 DNA 序列测定:DNA 序列由上海生物工程技术服务有限公司测定。

1.2.3 重组表达质粒 pPIC3.5K-lip-E83V 的构建及其在 *Pichia pastoris* GS115 中的表达:参见文献 [5]。

1.2.4 酶活力测定:以橄榄油为底物,采用 NaOH 滴定法^[6]。

1.2.5 酶最适作用温度测定:以橄榄油为底物,在 30 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C 范围内每隔 5 $^{\circ}$ C 反应 10 min,测定 PEL-GS、PEL-E83V-GS 酶活力,以相对活力对温度作图,求出酶的最适作用温度。

1.2.6 酶热稳定性测定:将野生型和突变体的发酵上清液在 30 $^{\circ}$ C ~ 45 $^{\circ}$ C 范围内,水浴保温 30 min 后,迅速将反应体系转入 0 $^{\circ}$ C 冰浴中放置 30 min,在最适作用温度条件下,测定酶的相对活力。以未经过热处理,直接加底物于最适作用温度条件下所测得的酶

活力为 100%，将经过不同温度热处理后所测得的酶活力折合为相对剩余酶活力，对温度作图。相对剩余酶活力为 50% 所对应的温度为酶的 T_m 值。

2 结果分析

2.1 lip-E83V 突变基因的获得

第 1 轮左右侧 PCR 反应分别得到大小约 330 bp 和 550 bp 的片段 (图 1a)，以第 1 轮 PCR 回收产物互为模板进行第 2 轮 PCR，得到约 880 bp 含突变位点的全长基因片段 (图 1b)。

2.2 E83V 突变体的鉴定

重组质粒 pSK-lip-E83V 经蓝白斑筛选后，分别用限制内切酶 *Xho*I、*Sna*BI/*Eco*RI 和 *Hind*III 进行酶切鉴定 (图 2)，酶切正确的重组质粒进一步 DNA 测序后表明 PEL 基因的 E83V 突变体构建成功。

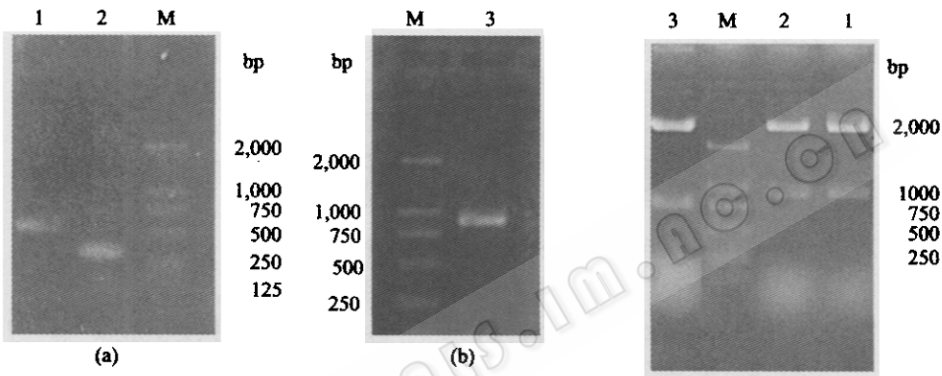


图 1 突变基因 lip-E83V PCR 扩增的电泳图谱

- 1, 2 突变基因 lip-E83V 的左侧和右侧 PCR 扩增片段,
- 3 突变基因 lip-E83V 的全长 PCR 扩增片段,
- M DNA 的标准分子量

图 2 重组质粒的酶切鉴定图谱

- 1 重组质粒 *Sna*BI/*Eco*RI,
- 2 重组质粒 *Xho*I 酶切,
- 3 重组质粒 *Hind*III 酶切,
- M DNA 标准分子量

2.3 PEL-E83V-GS 的酶学性质研究

2.3.1 SDS-PAGE 分析: 重组表达质粒经 *Sal*I 酶线性化后，电转化 *Pichia pastoris* GS115。经 MM 板筛选的重组酵母进行摇瓶发酵，72 h 后 PEL-E83V-GS 和 PEL-GS 的发酵上清进行 SDS-PAGE 电泳，分别得到均一的条带，PEL-E83V-GS 表达蛋白分子量约为 28 kD，与 PEL-GS 一致 (图 3)，表明突变基因 lip-E83V 在酵母中得到正确表达和修饰。进一步灰度分析表明，PEL-E83V-GS 和 PEL-GS 各占 *Pichia pastoris* GS115 分泌表达总蛋白的 95% 以上，表明 PEL-E83V-GS 和 PEL-GS 的发酵上清无须经过纯化便可进行下一步的酶学性质研究。

2.3.2 酶活力: PEL-E83V 和 PEL 发酵液经 $10,000 \times g$ 离心 5 min，上清点橄榄油检验板，室温放置，橄榄油检验板上能够形成清晰的透明圈 (图 4)，从图 4 可以看出突变体 PEL-E83V-GS 形成的透明圈小于野生型 PEL-GS，表明突变体的发酵酶活有所下降。用 NaOH 滴定法测定酶活力的大小也证实了这一点，在 37 °C 的条件下，突变体的酶活为 188 U/mL，约为野生型 (236 U/mL) 的 80%。

2.3.3 最适作用温度: 由图 5 可知，野生型 PEL-GS 和突变体 PEL-E83V-GS 的最适反

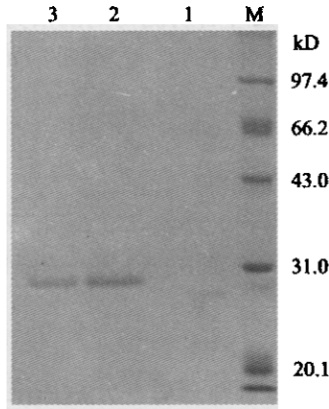


图3 野生型和突变体表达产物的 SDS-PAGE 分析
1 阴性对照 (空质粒), 2 PEL-GS 发酵上清液, 3 PEL-E83V-GS 发酵上清, M 标准分子量蛋白

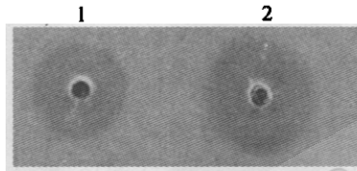


图4 野生型和突变体表达产物的橄榄油检验板鉴定
1 PEL-E83V-GS 发酵上清, 2 PEL-GS 发酵上清液

应温度分别为 40℃ 和 45℃, 显然, 突变体 PEL-E83V-GS 的最适作用温度比野生型提高了 5℃。

2.3.4 热稳定性: 由图 6 可知, PEL-E83V-GS 和 PEL-GS 在 30℃ 和 35℃ 处理 30 min 酶活基本不变, 在 45℃ 处理 30 min 则检测不到任何酶活。其中 PEL-E83V-GS 在 37℃ 和 40℃ 处理 30 min, 残留酶活分别为 41.8% 和 2.1%, 稍微低于 PEL-GS 的 52.3% 和 3.0%。说明突变酶的热稳定性并没有明显的变化。

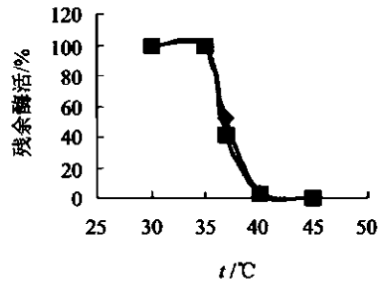
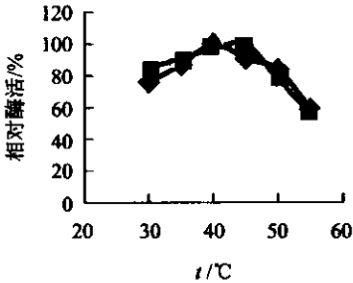


图5 野生型和突变体表达产物的最适作用温度

图6 野生型和突变体表达产物的热稳定性

◆ PEL-GS, ■ PEL-E83V-GS

◆ PEL-GS, ■ PEL-E83V-GS

3 讨论

蛋白质空间结构的理性设计是蛋白质工程研究的一个重要领域。我们在对 PEL 与其他同源性较高的脂肪酶 RML 和 HLL 进行同源性比较的基础上, 进行了三维结构的计算机模拟 (PHD 结构预测), 对 PEL 结构上可能影响最适作用温度和热稳定性的位点

进行了研究。发现亲水性的氨基酸 Glu83 位于酶分子表面的一段无规则卷曲折叠处,且远离酶的活性中心 (Ser132-Asp188-His241)。如将之用疏水性较强的氨基酸 Val 替换后,可增加酶分子的表面疏水性,从而增强酶分子的疏水性包装效率^[7,8],同时又不影响底物与活性中心的结合作用。实验结果表明:突变 PEL-E83V-GS 的酶活为野生型的 80%,热稳定性无明显改变,而其最适作用温度提高了 5℃。最适作用温度的提高可能是由于点突变后增加了 PEL 酶分子表面的疏水作用,使其在高温下更适于与底物的结合。获得最适作用温度提高的突变体在工业应用是很有意义的,在有些工业应用上,如从低廉的植物油生产具有很高价值的油需通过酯交换反应,这个反应需要在高于植物油的熔点温度下进行的,换句话说,这个反应的关键并不是脂肪酶在高温处理下有较高的残留酶活,而是其有较高的作用温度^[7]。

我们获得的突变体最适作用温度提高了 5℃,但其热稳定性并没有明显的提高。蛋白质的热稳定性是其所有共价和非共价结合力的一个综合效应,影响因素较多,包括疏水作用,盐键及氢键、共价键的稳定,增加包装效率,降低构象变化,降低去折叠熵值以及 α -螺旋、环等二级结构的稳定^[9,10]。通常情况下,只通过一二个氨基酸的点突变难以大幅度提高酶的热稳定性^[10]。因而近几年来,随机突变和 DNA 改组等方法已大量用于提高酶的热稳定性。目前我们正在利用多点突变和定向进化的方法对 PEL 进行改造,以期获得最适作用温度和热稳定性有明显改善的突变体。

参 考 文 献

- [1] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, 8: 109~110.
- [2] 郑毅, 黄建忠, 施巧琴, 等. 工业微生物, 1996, 26 (3): 15~18.
- [3] 林琳, 谢必锋, 杨冠珍, 等. 中国生物化学与分子生物学学报, 2002, 18 (1): 32~37.
- [4] 林琳, 谢必锋, 杨冠珍, 等. 中国生物化学与分子生物学学报, 2003, 19: 12~14.
- [5] 袁彩, 林琳, 施巧琴, 等. 生物工程学报, 2003, 19: 231~235.
- [6] Beisson F, Tiss A, River C, et al. Eur J Lipid Technol, 2002, 2: 133~153.
- [7] Kohno M, Enatsu M, Funatsu J, et al. J Biotechnol, 2001, 87: 203~210.
- [8] Pack S P, Yoo Y J. J Mol Catal B-Enzym, 2003, 26: 257~264.
- [9] 朱国萍, 滕脉坤, 王玉珍. 生物工程进展, 2000, 20: 48~50.
- [10] Watanabe K, Suzuki Y. J Mol Catal B-Enzym, 1998, 4: 167~180.