

粗糙脉孢霉酸性蛋白酶基因的克隆与鉴定*

邱重晏^{1,2} 王正祥^{1**}(工业生物技术教育部重点实验室和江南大学生物工程学院 无锡 214036)¹(重庆工学院生物工程学院 重庆 400050)²

摘要:以粗糙脉孢霉 CICIM F00021 染色体 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到粗糙脉孢霉酸性蛋白酶结构基因。对其序列进行了测定和分析,表明扩增得到的片段为酸性蛋白酶基因。将扩增出的酸性蛋白酶基因克隆入酵母表达载体中获得重组质粒 pPIC9K-*ap*。将其转化入毕赤氏酵母获得重组菌 NA₃。重组酸性蛋白酶在 pH 4.0 和 45°C 下表现出最高活性。

关键词:粗糙脉孢霉,酸性蛋白酶,克隆,序列分析,表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0091-04

Cloning and Identification of a Gene Encoding an Acidic Protease
from *Neurospora crassa**QIU Chong-Yan^{1,2} WANG Zheng-Xiang^{1**}(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of
Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)¹(School of Biotechnology, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050)²

Abstract: A gene encoding a putative acidic protease was isolated from *Neurospora crassa* chromosomal DNA. The nucleic acid sequencing and analysis indicated the amplified fragment was an acidic protease gene (*ap*). Purified PCR product was subcloned into a yeast expression vector, yielding recombinant pPIC9K-*ap*. The recombinant NA₃ was constructed by transforming pPIC9K-*ap* into *Pichia pastoris* KM71. The recombinant acidic protease produced by *P. pastoris* performed the highest activity at pH 4.0 and 45°C.

Key words: *Neurospora crassa*, Acidic protease, Cloning, Sequence analysis, Expression

酸性蛋白酶是适合在酸性条件下 (pH 1.9 ~ 4.0) 分解蛋白质的一类蛋白水解酶,在其活性位点有两个天冬氨酸。其代表性特征是将两个疏水氨基酸打断,通过内切和外切作用将蛋白质水解为小肽和氨基酸^[1],是食品、饲料、酿造、毛皮与皮革、胶原纤维等工业重要用酶^[2]。在酒精发酵中应用酸性蛋白酶,有利于原料中蛋白质的水解,增加醪液中酵母可吸收性氮,促进酵母繁殖,提高酒精发酵速率,提高原料出酒率^[3]。在国外,毛霉属,根霉属,曲霉属,酵母属都有相关酸性蛋白酶基因被克隆及测序的报道^[4~7]。Shimuta 等利用转基因技术将 *Scytalidium lignicolum* 中的酸性蛋白酶基因导入到酵母中,获得分泌该种酸性蛋白酶的酵母突变体酿酒酵母 AH22,所产酸性蛋白酶最适 pH 为 2.3,在 pH 2.0 ~ 5.0 之间稳定^[7]。

对粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) OR74A 基因组序列进行分析,发现有一酸性蛋白酶基因同源序列。为此,本文报道粗糙脉孢霉 CICIM F00021 酸性蛋白酶结构基因的

* 新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET04-9704)

** 通讯作者 Tel: +86-510-5879781, E-mail: zzwang@sytu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-07, 修回日期: 2005-12-16

克隆及其在真核表达系统中的表达。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 (CICIM B00376), 毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) KM71 (CICIM Y00657) 从 Invitrogen 公司购置并保藏。粗糙脉孢霉 (*N. crassa*) CICIM F0021 由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心提供 (<http://cicim-cu.sytu.edu.cn>)。克隆载体 pUC18 由本研究室保藏, 酵母表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.2 培养基和培养条件

粗糙脉孢霉的培养使用 PDA 培养基 [20% (v/v) 土豆浸出汁, 20 g/L 葡萄糖]; 培养温度为 30℃。大肠杆菌的培养采用 LB 培养基, 必要时补加终浓度为 80 μg/mL 的氨苄青霉素。毕赤氏酵母采用 YNB、YPD、MD、YNBG、BMGY 或 BMMY 培养基于 32℃ 下进行培养 (培养基组成参照 *Pichia* Expression Kit 配置及使用)。

1.3 粗糙脉孢霉染色体 DNA 的提取

采用石英砂研磨法快速提取粗糙脉孢霉 CICIM F0021 染色体 DNA^[8]。

1.4 粗糙脉孢霉酸性蛋白酶结构基因的克隆

粗糙脉孢霉酸性蛋白酶基因的克隆, 采用如下序列的引物:

Nc-Ap1: ACATGAATTCATGTCTTCGATTCTTTGTCAAGATGAAGAC;

Nc-Ap2: GTGAGAATTCTCACAACCCCAAAACCACG。

下划线部分为人工引入的 *Eco*RI 酶切位点。通过引物 Nc-Ap1 去除编码产物的信号肽序列及其 5' 端的内含子序列。

以粗糙脉孢霉 CICIM F0021 染色体 DNA 为模板, 以 Nc-Ap1, Nc-Ap2 为引物, 以常规方法进行 PCR。PCR 产物经纯化和 *Eco*RI 酶切后克隆入 pUC18 中, 进行序列测定。

1.5 其他分子克隆和操作

按文献 [9] 方法进行。

1.6 酵母转化

用电转化方法进行, 按文献 [10] 方法,

1.7 酸性蛋白酶酶活测定

采用 Folin 试剂法。发酵上清液在两支平行试管中, 取经 40℃ 预热 2 min 的酶液 1.0 mL, 加入经预热的 pH 3.0 的 1% 酪蛋白溶液 1 mL, 于 40℃ 下恒温反应 10 min, 立即加 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液 2 mL 以终止反应。取出静置 10 min 后过滤, 取 1.0 mL 滤液, 加入 0.4 mol/L 碳酸钠溶液 5 mL, 再加福林试剂 1 mL, 于 40℃ 水浴中显色 20 min 取出, 冷却后在 680 nm 处测定吸光度。1 个酶活力单位 (U) 定义为在上述条件下 1 分钟水解酪蛋白生成 1 μmol L-酪氨酸的酶量。

1.8 重组酶性质的确定

1.8.1 最适 pH: pH 缓冲液: 用 0.1 mol/L 乳酸和 0.2 mol/L 乳酸钠配制 pH 2.5 ~ 7.0 的缓冲液, 测定酶活。酶活测定方法同 1.7。计算相对酶活确定最适 pH。

1.8.2 最适温度: 将重组酶液分别在 25℃、35℃、45℃、55℃、65℃、75℃ 温度下测定酶活。酶活测定方法同 1.7。计算相对酶活确定最适温度。

2 结果与讨论

2.1 粗糙脉孢霉酸性蛋白酶基因的分析 and 比对

以真菌酸性蛋白酶的氨基酸序列搜索粗糙脉孢霉 OR74A 基因组, 发现开放读框 NCU00338.1 与真菌酸性蛋白酶有较高相似性, 可能为一酸性蛋白酶。此一读框编码一个分子量为 41, 671D, 由 394 个氨基酸残基组成的蛋白质。氨基酸序列比对发现此一蛋白质序列与来源于米曲霉 RIB40 的一种酸性蛋白酶具有 48% 的同源性 (图 1)。

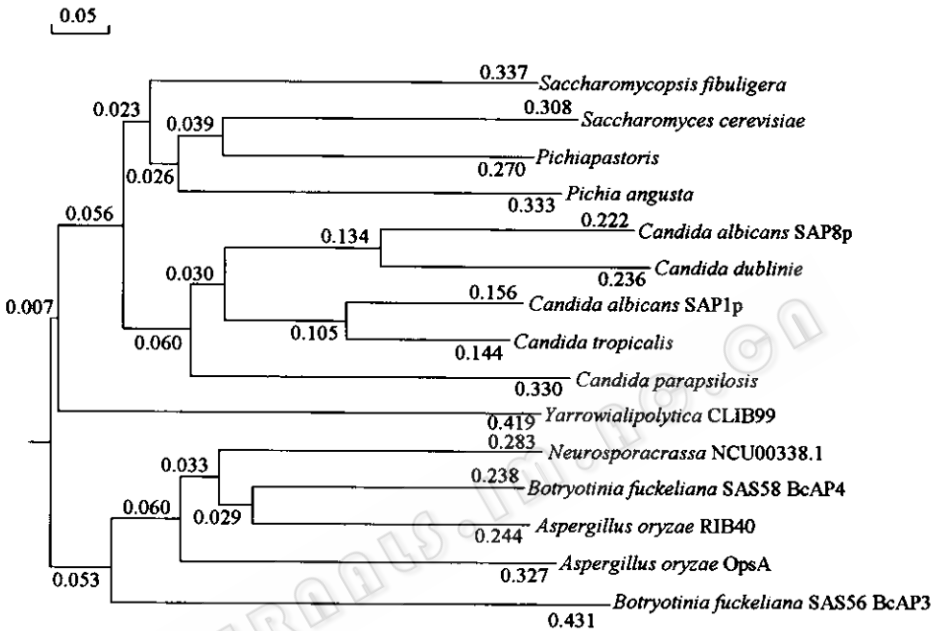


图 1 真菌酸性蛋白酶的系统发育树

2.2 粗糙脉孢霉酸性蛋白酶结构基因的克隆

用研磨法快速提得粗糙脉孢霉染色体 DNA, 以此为模板扩增获得一条特异性条带, 大小为 1.2 kb 左右 (图 2)。

将 PCR 扩增获得的酸性蛋白酶基因 (ap) 用 *Eco*RI 酶切并克隆入 pUC18, 获得重组质粒 pUC18-ap, 用 Sanger 双脱氧法进行序列测定。

将测得的序列及推衍得到的多肽序列进行分析, 该蛋白与粗糙脉孢霉 OR74A 基因组的 NCU00338.1 的同源性为 99.75%。其差异仅见于第 361 位氨基酸残基由 OR74A 菌株的 Glu 变成了 CICIM F0021 菌株的 Gly。

2.3 重组质粒 pPIC9K-ap 和重组菌的构建

将扩增获得的酸性蛋白酶基因 *Eco*RI 酶切与用相同酶切并去磷酸化的表达载体 pPIC9K 连接, 获得正向重组质粒 pPIC9K-ap。在 *Eco*RI 位点插入 ap 后, 用 *Kpn*I 酶切验证 pPIC9K-ap 正向重组质粒 (图 3)。根据 ap 和 pPIC9K 的序列分析重组质粒酶切后正向在 1.7kb 处有

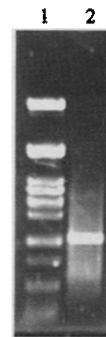


图 2 *N. crassa* CICIM F0021 酸性蛋白酶基因的扩增
1 DNA/Pst I 分子量标准, 2 PCR 扩增的 *N. crassa* CICIM F0021 酸性蛋白酶基因

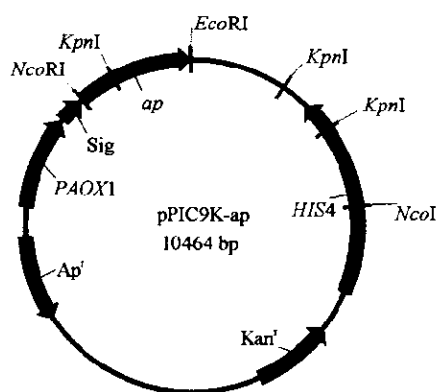


图3 构建的重组质粒 pPIC9K-ap

带, 反向则在 1.3kb 处有带。

将 pPIC9K-ap 转化 *P. pastoris* KM71 后, 得到 5 个整合重组质粒, 并用 PCR 进行验证。PCR 结果为 NA₃, NA₄, NA₅ 菌扩增得到 1.2kb 左右的条带, 说明 ap 已成功整合到 KM71 中。

2.4 酸性蛋白酶基因 (ap) 在 *P. pastoris* KM71 中的表达

将 NA₃, NA₄, NA₅ 3 个整合重组菌分别接于 10 mL BMGY 中, 230 r/min, 30℃, 过夜培养。离心收集菌体接于 10 mL BMMY 中, 220 r/min, 30℃ 培养。甲醇终浓度维持 0.5 %。发酵 72 h, 上清液用于酶活的测定。结果 3 个重组菌中测得 NA₃ 酶活最高, 酶活为 3 U/mL。

2.5 重组酸性蛋白酶的粗酶学性质

初步分析了重组菌 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-ap 发酵液上清中酸性蛋白酶活性与 pH、温度的关系, 结果见图 4 和图 5。结果表明, 重组酶的最适 pH 在 4.0, 最适温度在 40℃ ~ 50℃, 30℃ 时的酶活是 45℃ 时的 60 %。

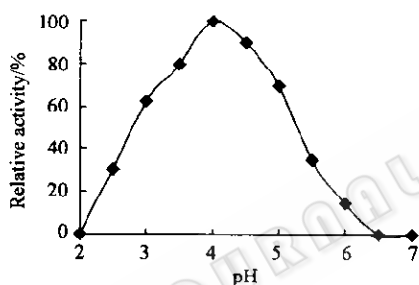


图4 重组酸性蛋白酶酶活与 pH 值的关系

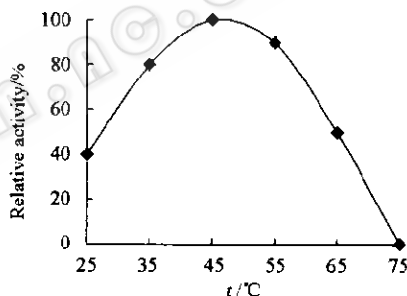


图5 重组酸性蛋白酶酶活与温度的关系

本实验成功的克隆出粗糙脉胞霉酸性蛋白酶结构基因并在毕赤氏酵母中得到分泌表达, 重组酸性蛋白酶的酶学与已报道的其他来源的酸性蛋白酶有较大的不同^[4,6]。从实验结果可以看出, 重组酶的酶学性质与酒精发酵工艺完全吻合, 显示其在酒精发酵工业中可能具有一定应用意义。为此, 我们将进一步对该酶的应用研究进行探讨。

参考文献

- [1] Oh S, Chang W, Suh J. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001, 11: 1469 ~ 1472.
- [2] 邬显章. 酶的工业生产技术. 长春: 吉林科技出版社, 1988.
- [3] 王彦荣, 孟祥春, 任连彬, 等. 酿酒, 2003, 30 (3): 16 ~ 18.
- [4] Gomi K, Arikawa K, Kamiya N, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57: 1095 ~ 1100.
- [5] Reichard U, Monod M, Ruechel R. FEMS Microbiol Lett, 1995, 130: 69 ~ 74.
- [6] Young T W, Wadeson A, Clover D J, et al. Microbiology, 1996, 142: 2913 ~ 2921.
- [7] Shimuta K, Oda-Ueda N, Washio M, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64: 1542 ~ 1546.
- [8] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 微生物学通报, 2004, 31 (4): 89 ~ 92.
- [9] 奥斯伯 J, 布伦特 R (王海林译). 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 亚当斯 A, 戈特施林 D E, 凯泽 C A 等. 酵母遗传学方法实验指南. 北京: 科学出版社, 2001.