

P197E 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的影响

刘燕雅 黄平 司圣乾 陈彦 林琳*

(福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350108)

摘要: 为提高脂肪酶的热稳定性, 作者利用重叠延伸 PCR 对扩展青霉脂肪酶(PEL)基因进行了体外定点突变, 构建了 P197E (即将第 197 位的脯氨酸突变为谷氨酸)与随机突变体 ep8 叠加突变的重组质粒 pPIC3.5K-ep8-P197E。将该质粒电转化至毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 中, 进行异源表达。与野生型酶和单点突变酶 PEL-ep8 的酶学性质比较, 结果表明: 叠加突变体 PEL-ep8-P197E 在 40°C 温育处理 30 min 后, 残余酶活分别比野生型 PEL 和随机突变体 PEL-ep8 提高了 42.13%和 37.3%。叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的 T_m 值为 41.51°C, 比野生型酶 PEL 提高了 2.81°C, 比随机突变体脂肪酶 PEL-ep8 提高了 2.25°C。通过对脂肪酶 PEL 的叠加突变, 提高了该酶的热稳定性, 并为结构与功能的进一步研究提供了材料。

关键词: 扩展青霉脂肪酶, 叠加突变, 热稳定性

Improving of the Thermostability of *Penicillium expansum* Lipase by Creating Mutation P197E

LIU Yan-Ya HUANG Ping SI Sheng-Qian CHEN Yan LIN Lin*

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: In order to improve the thermostability of *Penicillium expansum* lipase (PEL), a mutation P197E was created by site-directed mutagenesis. The mutation is generated by overlap extension PCR using the cDNA of a single site mutant lipase ep8 as the template and two special primers that corresponding to mutation P197E. Recombinant vector pPIC3.5K-ep8-P197E which contain double-mutant genes was constructed and electroporated into *Pichia pasteris* GS115. The recombinant transformant was selected and grow in the methanol containing media for expressing double-mutant lipase, PEL-ep8-P197E. Thermostability analysis reveals that the residual activity of the double-mutant are 42.13% and 37.3% greater than that of the wild type PEL and PEL-ep8 after incubated at 40°C for 30 min. The T_m of the double-mutant lipase is 41.51°C, 2.81°C higher than PEL and 2.25°C higher than PEL-ep8.

Keywords: *Penicillium expansum* lipase, Mutagenesis, Thermostability

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30270033); 福建省自然科学基金重点资助项目(No. BOI20001); 福建省自然科学基金资助项目(No. C0410009); 福建省科技平台建设计划项目(No. 2006H0085)

* 通讯作者: Tel: 86-591-22868209; Fax: 86-591-22868209; 信箱: benbo_00@yahoo.com

收稿日期: 2009-07-29; 接受日期: 2009-11-17

扩展青霉(*Penicillium expansum*) FP898 是从我国土壤中分离纯化的脂肪酶产生菌经多代诱变育种而获得的脂肪酶高产菌株, 该脂肪酶可在碱性条件下分解三酰甘油产生脂肪酸及甘油^[1-2], 目前扩展青霉脂肪酶(PEL)已经实现了工业化生产。近年来本课题组完成了 PEL cDNA 序列和基因组 DNA 序列的克隆^[3-4], 并实现了在真核细胞毕赤酵母中的高效表达^[5]。该脂肪酶为中温酶, 最适 pH 为 9.4, 适于在皮革、皮毛脱脂、鱼片脱脂、纸浆脱脂脱墨等工业中应用, 但其热稳定性差, 45°C 保温 30 min 酶活丧失殆尽, 大大地限制了该脂肪酶在工业中的广泛应用, 因此提高该酶的热稳定性至关重要。作者利用基因工程手段, 在扩展青霉脂肪酶随机突变体 ep8 (含一个氨基酸的突变)的基础上, 引入 P197E 突变点, 构建了叠加突变体, 并研究了该突变体的热稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *Pichia pastoris* GS115、*E. coli* DH5 α 、pPIC3.5K、ep8 模板等由本课题组保藏。

1.1.2 酶与试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。PCR 所用试剂及 UNIQ-10 胶回收试剂盒为上海生工生物工程技术服务有限公司(以下简称上海生工)产品。其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 培养基: LB、YPD、MD、MGY、MMY、YPOM 均按《Invitrogen 公司操作手册》推荐方法配制或加以改良, 检验板为含 2%不同底物的琼脂培养基平板。

1.1.4 寡聚核苷酸引物: 参照毕赤酵母密码子表并根据目的基因的 DNA 序列和突变位点处氨基酸的密码子设计了 2 对引物, 引物 A: 5'-ATAAGCTTGA TATACGTAATG-3' (下划线部分为 *SnaB* I 位点), 引物 B: 5'-TGCAGGAATTCGATCTCA-3' (下划线部分为 *EcoR* I 位点), 引物 C: 5'-CTCGAGCGAACTTGT TAACT-3', 引物 D: 5'-ACAAGTTCGCTCGAGTCA-3' (下划线为突变位点, 即将 DNA 序列的第 670-672 位的 CCG 突变为 GAA)。以上引物由上海生工公司合成。

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) 第 1 轮基因片段的扩增: 以含有单个突变点的扩展青霉脂肪酶基因 ep8 为模板, 用引物 A、D 和 B、C 分别进行左侧和右侧 PCR 扩增, PCR 反应条件: 100 μ L 反应体系中含 10 \times Pfu buffer、200 μ mol/L dNTPs、引物各 100 pmol、100 ng 模板 DNA、3 U Pfu DNA 聚合酶。PCR 反应程序: 95°C 2 min; 94°C 50 s, 48°C 45 s, 72°C 1 min, 10 个循环; 94°C 50 s, 51°C 45 s, 72°C 1 min, 20 个循环; 72°C 10 min。(2) 第 2 轮全长基因的扩增: 上述的左右侧片段用 UNIQ-10 胶回收试剂盒回收后互为模板, 以 A、B 为引物。PCR 反应程序: 95°C 2 min; 94°C 50 s, 37°C 45 s, 72°C 90 s, 5 个循环; 94°C 50 s, 53°C 45 s, 72°C 90 s, 25 个循环; 72°C 10 min。获得全长叠加突变体基因。

1.2.2 重组表达质粒的构建及表达: 全长基因用 UNIQ-10 胶回收试剂盒回收, 经 *EcoR* I 酶切处理后与经 *SnaB* I/*EcoR* I 酶切的线性化载体 pPIC3.5K 连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定筛选出正确构建的重组质粒 pPIC3.5K-ep8-P197E, 并送交上海生工公司进行 DNA 测序, 进一步确定突变克隆。碱裂解法制备获得大量 pPIC3.5K-ep8-P197E 质粒后, 经 *Sal* I 线性化后, 用 Bio-Rad 电穿孔仪电击转化至宿主毕赤酵母 GS115, 将转化物涂布到 MD 板, 待长出单菌落后, 转接至 YPOM 板, 挑选透明圈大的转化子, 接种至 MGY 培养基, 28°C 培养至 OD_{600} 为 2-6 后离心收集菌体, 接种到 MMY 摇瓶发酵(控制起始 OD_{600} 为 1), 每隔 24 h 取样并添加 1.5%甲醇诱导表达 120 h, 收集菌液, 离心, 获得的发酵上清液直接用于酶学性质的测定。

1.2.3 酶底物特异性的研究: 通过平板透明圈法研究了突变体脂肪酶对三丁酸甘油酯、三辛酸甘油酯、三月桂酸甘油酯、三油酸甘油酯、大豆油、橄榄油的水解特异性, 分别配制 pH 为 9.4 的各种底物的乳化液, 然后以乳化液含量为 2%配制各种不同底物的检验板。

1.2.4 脂肪酶最适作用温度的测定: 以橄榄油为底物, 在 25°C-55°C 范围内设定一系列梯度, 通过 NaOH 滴定法, 测定突变体与野生型 120 h 发酵上清的酶活, 以相对活力对温度做图, 获得酶的最适作用温度。

1.2.5 脂肪酶热稳定性的测定: 将 PEL、PEL-ep8、PEL-ep8-P197E 在 30°C–40°C 范围内每隔 5°C、在 40°C–45°C 范围内每隔 1°C, 水浴保温 30 min 后, 测定其在最适作用下的酶活力。以未经处理条件下所测得的酶活为 100%, 将经不同温度处理后所测得的酶活折合为相对剩余酶活力, 对温度做图。相对剩余酶活力为 50% 所对应温度为酶的 T_m 值。

2 结果

2.1 P197E-ep8 基因的获得

以含有 1 个突变点的随机突变体 ep8 为模板, A、D 和 B、C 为第 1 轮 PCR 引物, A、B 为第 2 轮 PCR 引物, 采用重叠延伸 PCR 引入 P197E 点突变。第 1 轮 PCR 获得大小分别约为 670 bp 和 210 bp 的目的片段(图 1A), 第 2 轮 PCR 获得大小约为 880 bp 的引入 P197E 突变点的全长基因(图 1B)。

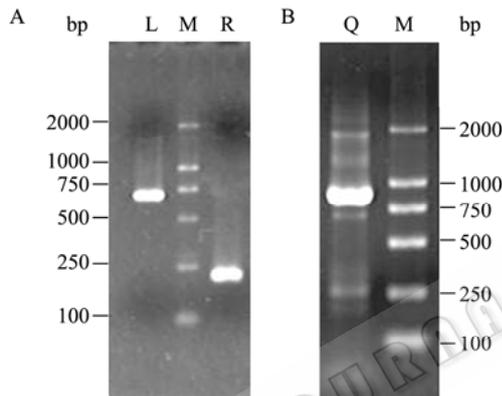


图 1 突变基因 ep8-P197E PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Electrophoresis analysis PCR fragments of ep8-P197E

注: L: ep8-P197E 左侧片段; R: ep8-P197E 右侧片段; Q: ep8-P197E 全长基因; M: DNA marker.

Note: L: Left fragment of ep8-P197E; R: Right fragment of ep8-P197E; Q: Full length of ep8-P197E; M: DNA marker.

2.2 表达载体的构建及在毕赤酵母中的表达

2.2.1 表达载体的构建: 将 PCR 扩增的全长突变基因片段与载体 pPIC3.5K 连接构建的重组质粒经 *Bam*H I/*Eco*R I、*Bam*H I/*Xho* I 两次酶切鉴定和 DNA 测序, 结果表明: 重组表达质粒确实在单点突变体 ep8 基础上引入了 P197E, 从而构建了 P197E 与 ep8 叠加突变脂肪酶表达质粒 pPIC3.5K-ep8-P197E。将该重组表达质粒电转化至毕赤酵母 GS115 中。在 YPOM 板上挑取能产生透明圈的转化子, 进行甲醇

诱导表达。

2.2.2 SDS-PAGE 分析: 将转化子在 MMY 培养基中发酵并甲醇诱导表达 120 h 后, 离心获得发酵上清并进行 SDS-PAGE 电泳, 得到均一条带, 突变体 PEL-ep8-P197E 蛋白分子量约为 28 kD, 与野生型和随机突变体一致(图 2), 表明叠加突变体基因在毕赤酵母中得到正确的表达和修饰。进一步灰度分析表明, 突变体 PEL-ep8-P197E、PEL 和 PEL-ep8 均占毕赤酵母 GS115 胞外表达总蛋白的 95% 以上。

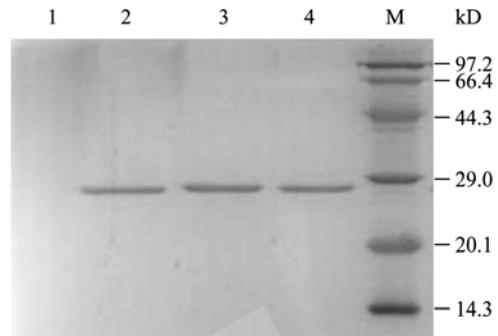


图 2 PEL-ep8-P197E 发酵上清液的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of PEL-ep8-P197E

Note: 1: GS-pPIC3.5K (Negative control); 2: PEL; 3: PEL-ep8; 4: PEL-ep8-P197E; M: Protein marker.

2.3 突变体 PEL-ep8-P197E 的酶学性质

2.3.1 底物特异性: 取 10 μ L 酶液点于三丁酸甘油酯、三辛酸甘油酯、三月桂酸甘油酯、三油酸甘油酯、大豆油、橄榄油等不同底物的检验板上, 室温下放置 12 h, 观察水解圈情况。结果显示: 叠加突变体 PEL-ep8-P197E 对三丁酸甘油酯、三辛酸甘油酯、三月桂酸甘油酯、三油酸甘油酯、大豆油有很好的分解能力。其中, 对十二碳以下的底物表现出比野生型 PEL 和随机突变体 PEL-ep8 更强的分解能力, 但对橄榄油的分解能力则不及野生型 PEL 和随机突变体 PEL-ep8, 结果表明叠加突变体的底物特异性发生了改变(图 3)。

2.3.2 最适作用温度: 最适作用温度测定结果表明(图 4): 野生型 PEL、随机突变体 PEL-ep8 及叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的最适作用温度均为 42°C。在最适作用温度下, 野生型 PEL、随机突变体 PEL-ep8 及叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的酶活分别为 456、644 和 592 U/mL。叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的酶活为野生型 PEL 脂肪酶的 129.8%, 为随机突变体 PEL-ep8 脂肪酶的 91.92%。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

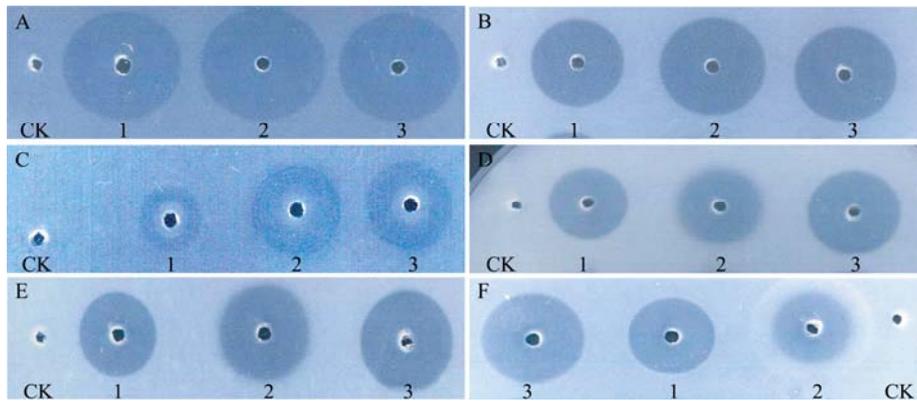


图3 PEL-ep8-P197E 的底物特异性

Fig. 3 Substrate specificity of PEL-ep8-P197E

注: CK: GS-pPIC3.5K(阴性对照); 1: PEL; 2: PEL-ep8-P197E; 3: PEL-ep8. A: 三丁酸甘油酯(C4); B: 三辛酸甘油酯(C8); C: 三月桂酸甘油酯(C12); D: 三油酸甘油酯(C18); E: 大豆油(混合碳); F: 橄榄油(混合碳).

Note: CK: GS-pPIC3.5K (Negative control); 1: PEL; 2: PEL-ep8-P197E; 3: PEL-ep8. A: Tributyrin (C4); B: Glyceryl trioctanoate (C8); C: Trilaurin (C12); D: Glycerol trioleate (C18); E: Soybean oil (Mixed carbon); F: Olive oil (Mixed carbon).

2.3.3 热稳定性: 将 120 h 发酵的上清液于不同温度下温育 30 min 后测定其活性, 通过酶活的残余情况来分析其热稳定性, 结果见图 5。结果表明: 野生型 PEL 的 T_m 值为 38.7°C , 随机突变体 PEL-ep8 为 39.26°C , 叠加突变体 PEL-ep8-P197E 为 41.51°C 。叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-P197E 的 T_m 值比野生型脂肪酶 PEL 提高 2.81°C , 比随机突变体 PEL-ep8 提高 2.25°C 。

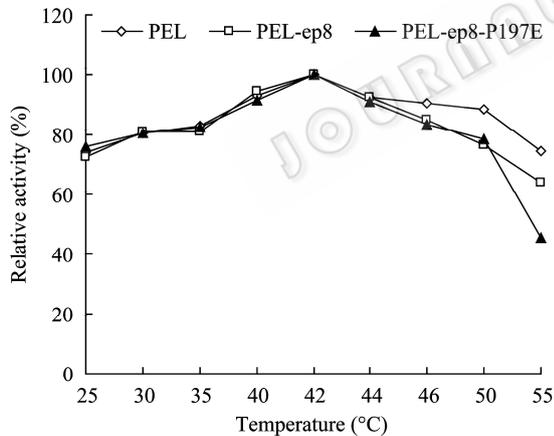


图4 PEL-ep8-P197E 的最适作用温度

Fig. 4 Optimum reaction temperature of PEL-ep8-P197E

3 小结与讨论

扩展青霉脂肪酶的稳定性一直困扰着其生产和应用, 是生产实际中亟待解决的重要问题。由于酶的稳定性是由其空间结构所决定, 本研究试图利用定点突变改变其空间结构以提高其稳定性。一些成

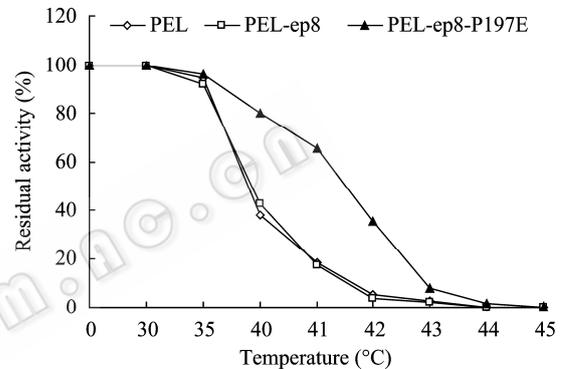


图5 PEL-ep8-P197E 的热稳定性

Fig. 5 Thermostability of PEL-ep8-P197E

功的例子显示一个氨基酸的突变就可能引起脂肪酶稳定性发生很大的变化, 如 Akeo Shinkai 等人所构建的 N163S 和 L264P 绿脓假单胞菌脂肪酶突变体的热稳定性分别提高了 1.5°C 和 3.0°C ^[6]。Patkar S. 等在 CALB (*Candida antarctica* B lipase) 的保守序列中引入 T103G 突变点后, 使其 T_d 值提高了 4°C ^[7]。Kulakova L 等人在酯酶 PsyEst (*Psychrobacter* sp. Ant300 esterase) 中引入突变点 G244P, 使其半衰期由原来的 16 min 延长至 11.6 h^[8]。嗜热脂肪酶 lipGRD (*Geobacillus* sp. RD-2 lipase) 的半衰期为 4 h, 而 Lei Wu 等构建的 lipRGD/Y224P 突变体在 65°C 温育 5 h 后仍能保留 65% 的活性^[9]。本实验室所构建的突变体 PEL-E83V 的最适作用温度比原脂肪酶提高了 5°C , PEL-ep8-K55R 比原脂肪酶提高了 2.3°C , PEL-ep8-K202A 比原脂肪酶提高了 2.63°C , PEL-ep8-K56R 比原脂肪酶提高了 1.4°C ^[10-13]。

点突变对热稳定性的贡献往往具有叠加效应^[14], 我们实验室构建的 PEL-ep8-K55R 和 PEL-ep8-K202A 是两个点突变的叠加体。为寻找更多的对脂肪酶稳定性有贡献的突变位点, 以便进行后续多个热稳定性正向突变点的叠加突变, 我们分析和比较了 PEL 的空间结构特点, 选择了 P102L、K120R、K152R、P163A、N166D、P197E 这几个点, 以 ep8 为模板进行定点突变。其中, PEL-ep8-P197E 实验结果显示, 在 40°C 下, 野生型酶和随机突变体温育 30 min 后, 残余酶活分别为 37.87% 和 42.7%, 而叠加突变体 PEL-ep8-P197E 仍保留了 80% 的活性。由此可见, 叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的热稳定性有所提高, 数据分析结果得出 PEL 的 T_m 为 38.7°C, 随机突变体 PEL-ep8 的 T_m 为 39.26°C, 而叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的 T_m 为 41.51°C, 叠加突变体的热稳定性在随机突变体有所增加的基础上进一步提高了 2.25°C。

从计算机模拟的结构看, Pro197 位于酶分子表面的无规卷曲处, 远离酶的活性中心 (Ser132-Asp188-His241), 且酸性氨基酸以及蛋白表面带电荷的氨基酸对蛋白的热稳定性有一定的贡献^[15], 因此用带负电荷的酸性的谷氨酸替换脯氨酸, 可能改善脂肪酶的亲水性, 增加酶分子的包装效率, 从而提高酶的热稳定性。此外, 叠加突变体 PEL-ep8-P197E 的底物特异性发生了改变, 可能是因为 P197E 位点的突变增加了脂肪酶分子表面的亲水基团, 改变了酶催化过程中对长短链底物的偏好性^[16], 而使小分子底物更易于进入到酶活性中心, 具体原因有待于其晶体结构的解析加以证实。

参 考 文 献

- [1] 施巧琴. 碱性脂肪酶的研究 I. 菌种的分离与筛选. 微生物学通报, 1981, 8(3): 109-110.
- [2] 施巧琴, 李辉. 碱性脂肪酶的研究 II. 菌种的诱变育种. 微生物学通报, 1982, 9(4): 162-164.
- [3] 林琳, 谢必锋, 吴松刚, 等. 扩展青霉 PF898 碱性脂肪酶 cDNA 的克隆及序列分析. 中国生物化学与分子生物学, 2002, 18(1): 32-37.
- [4] 林琳, 谢必锋, 吴松刚, 等. 扩展青霉 PF898 碱性脂肪酶基因组 DNA 的克隆及序列分析. 中国生物化学与分子生物学, 2003, 19(1): 12-16.
- [5] 袁彩, 林琳. 扩展青霉碱性脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达. 生物工程学报, 2003, 19(2): 231-235.
- [6] Akeo Shinkai, Akiko Hirano, Kazuo Aisaka. Substitutions of Ser for Asn-163 and Pro for Leu-264 are important for stabilization of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem*, 1996(120): 915-921.
- [7] Patkar S, Vind J, Kelstrup E, et al. Effect of mutations in *Candida antarctica* B lipase. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998(93): 95-101.
- [8] Kulakova L, Galkin A, Nakayama T, et al. Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: Gene cloning, characterization, and the effects of Gly→Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochim Biophys Acta*, 2004(1): 59-65.
- [9] Wu L, Hong Y, Sheng D, et al. Residue Tyr224 is critical for the thermostability of *Geobacillus* sp. RD-2 lipase. *Biotechnol Lett*, 2009, DOI: 10.1007/s10529-009-0121-3.
- [10] 陈国仁, 林琳. E83V 对扩展青霉脂肪酶最适作用温度的影响. 微生物学通报, 2005, 32(1): 85-89.
- [11] 蔡少丽, 林俊涵, 林琳, 等. K55R 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善. 生物工程学报, 2007, 23(4): 677-680.
- [12] 邹有土, 吴义真, 林琳, 等. K202A 突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的影响. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 52-56.
- [13] 沈麟, 施文芳, 林琳, 等. 扩展青霉脂肪酶 K56R 叠加突变对热稳定性的影响. 生物技术, 2009, 19(2): 23-26.
- [14] Wells JA. Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry*, 1990(29): 8509-8517.
- [15] 杨浩萌, 王亚茹, 姚斌, 等. N13D、S40D 点突变提高木聚糖酶 XYNB 的热稳定性. 微生物学通报, 2007, 34(3): 533-536.
- [16] Riadh Ben Salah, Ali Gargouri, Robert Verger, et al. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009(25): 1375-1384.