

# 黑曲霉脂肪酶:基因克隆、表达及体外复性\*

舒正玉 杨江科 徐 莉 闫云君\*\*

(华中科技大学生命科学技术学院 武汉 430074)

**摘要** 根据黑曲霉 F044 脂肪酶 N-端氨基酸序列,运用生物信息学方法,找到与黑曲霉脂肪酶基因同源的候选基因 A84689。根据该基因序列,设计引物直接 PCR 扩增得到黑曲霉脂肪酶全长基因 *anl*。*anl* 全长 1 044bp,含 3 个内含子,编码 297 个氨基酸(含信号肽 27 个氨基酸),与其它脂肪酶基因没有明显同源性。将编码成熟脂肪酶的 *anl* 连接到 pET28a 载体上得到重组表达质粒,转化大肠杆菌 BL21(De3),诱导表达并纯化出目的蛋白。通过大量稀释和 DEAE Sepharose Fast Flow 层析相结合的方法,变性后的纯化蛋白在体外实现再折叠复性。

**关键词** 黑曲霉,脂肪酶,基因克隆,大肠杆菌,大量表达,包涵体,复性

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0443-04

## *Aspergillus niger* F044 Lipase: Gene Cloning, Overexpression and *in vitro* Refolding\*

SHU Zheng-Yu YANG Jiang-Ke XU Li YAN Yun-Jun\*\*

(College of Life Science & Technology, Huazhong Science & Technology University, Wuhan 430074)

**Abstract** From the N-terminal amino acid sequence of the *Aspergillus niger* F044 lipase, a potential homologous gene A84689 to the *anl* (the gene encoding the *Aspergillus niger* lipase) was found by means of bioinformatics. Based on the nucleotide sequence of the A84689, primers were designed to amplify *anl*. Nucleotide sequencing of the genomic *anl* gene revealed an open reading frame of 1 044 nucleotides, containing three introns (54, 45 and 51 nucleotides). The deduced amino acid sequence of the *anl* gene corresponds to 297 amino acid residues including a signal sequence of 27 amino acid residues. The cloned cDNA coding for mature *Anl* (the protein of the *Aspergillus niger* lipase) was overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (De3), and the recombinant *Anl* was purified. The denatured recombinant *Anl* by 8mol/L urea was refolded *in vitro* by dilution and DEAE Sepharose Fast Flow chromatography.

**Key words** *Aspergillus niger*, Lipase, Gene cloning, *Escherichia coli*, Over-expression Inclusion, Refolding

微生物脂肪酶作为一种重要的生物催化剂,广泛应用于食品加工、精细化工、生物柴油、杀虫剂、去污剂、以及生物修复等诸多领域<sup>[1]</sup>。黑曲霉脂肪酶因其具有良好的生物安全性,催化水解(或合成)三酰甘油酯具有 1-、3-位选择性,最适底物脂肪酸碳链长度为 C<sub>6</sub>~C<sub>12</sub> 等特点,一直是传统食品加工中的重要食品添加剂<sup>[2]</sup>。本文以脂肪酶高产菌株黑曲霉 F044(*Aspergillus niger* F044)为出发菌株,直接 PCR 扩增出编码脂肪酶蛋白(*Anl*)的基因 *anl*,利用大肠杆菌表达系统实现高效表达,并在体外实现包含体蛋白的再折叠复活。结果报道如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黑曲霉 F044 由本实验室从土壤中分离并鉴定<sup>[3]</sup>; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(De3)和 pET28a 质粒由本实验室保存;限制性内切酶、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 和 3'-Full RACE Core Set 试剂盒均购自宝生物;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;引物由上海生工合成;Ni-NTA agarose 购自 QIAGEN 公司;DEAE-Sepharose Fast Flow 购自北京鼎国。

### 1.2 基因组 DNA 抽提和 cDNA 合成

黑曲霉 F044 基因组 DNA 的提取按照文献[4]

\* 国家 863 计划项目基金(No. 2003AA214061)

\*\* 通讯作者 Tel: 027-87792214, E-mail: yanyunjun@tom.com

收稿日期: 2006-07-10, 修回日期: 2006-09-12

进行 ;RNA 的提取按照 TRIzol 试剂说明书操作 ;  
cDNA 的合成按照 3'-Full RACE Core Set 试剂盒说明书进行。

### 1.3 脂肪酶全长 *anl* 的克隆

根据 A84689 的核苷酸序列设计引物 F1 5' ATGTTCTCTGGACGGTTTGGAGTG3' 和 R1 5' TTATAGCAGGCACTCGGAAATC 3' ,分别以黑曲霉 F044 基因组 DNA 和 cDNA 为模板 ,94℃ 5min ;94℃ 1min ;56℃ 1min ;72℃ 1min ;30 circles ;72℃ 5min PCR 扩增全长 *anl*。PCR 扩增产物与 pMD18-T 载体连接 转化大肠杆菌 DH5α。阳性转化子验证后交北京华大测序。

### 1.4 pET28a-*anl* 表达载体的构建和诱导表达

根据 A84689 核苷酸序列设计引物 F2 5' CA GCTAGCAGTGTCTCGACTTCCACGTTGGAT3' 和 R2 5' CA GAATTC TTATAGCAGGCACTCGGAAATC 3' ,以 cDNA 为模板 ,PCR 扩增不含信号肽编码序列的 *anl*。用 *Nhe* I 和 *Eco* R I 酶切 PCR 产物和 pET28a 载体 纯化后用 T4DNA 连接酶连接。将测序验证酶连正确的重组质粒和 pET28a 分别转化大肠杆菌 BL21 (De3)。重组大肠杆菌的诱导表达参照 Novagen 公司的 pET 表达系统操作手册进行。

### 1.5 表达产物的分离纯化

参照 QIAexpressionist™ 操作手册。

### 1.6 包含体蛋白的复活

向纯化蛋白质溶液中加入适量 DDT 溶液至终浓度为 10mmol/L ,室温过夜处理。将上述变性蛋白质溶液用复性缓冲溶液( pH7.5 50 mmol/L Tris-HCl , 10% 甘油 ,1% 甘氨酸 ,2mmol/L 还原型谷胱甘肽/ 1mmol/L 氧化型谷胱甘肽 )稀释 100 倍 ,蛋白质终浓度小于 50μg /mL。4℃封口复性 12h ,然后开口复性 12h。上述蛋白质复性溶液再用 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析洗脱 ,收集含蛋白质的洗脱液。取部分洗脱液用 50mmol/L pH7.5 Tris-HCl ,10mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液透析过夜。

### 1.7 脂肪酶活性的定性检测

脂肪酶活性定性检测方法参照文献 [5]。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物设计的依据

分离纯化后的黑曲霉 F044 脂肪酶 N-端氨基酸

序列为 S(E,H)-V-S-T-S-T-L-D-E-L-Q-L<sup>[3]</sup> ,与 NCBI 蛋白质数据库 CAB69341( 一未命名蛋白 )N-端氨基酸序列相同。该序列同时还具有丝状真菌脂肪酶氧阴离子洞( oxyanion hole )区和活性中心-G-X-S-X-G-区的保守序列<sup>[6]</sup>( 表 1 ) ,初步确定 CAB69341 即为脂肪酶。而产生该蛋白质的出发菌株 *Aspergillus tubingensis* 与 *Aspergillus niger* 在分类学上高度同源。基于上述特点 ,利用编码 CAB69341 蛋白质的基因序列( A84689 )设计引物 F1/R1 和 F2/R2 直接 PCR 扩增编码黑曲霉 F044 脂肪酶的全长 *anl* 和成熟 *anl* ,理论上应该可行。

表 1 部分丝状真菌氧阴离子洞区和活性中心区的保守序列

真菌名称	登录号	阴离子氧区域	活性位点区域
<i>Aspergillus tubingensis</i> UNP	CAB69341	VVAFRG	GHSLGG
<i>Penicillium cyclopium</i> MDGL	AAF99710	VLAFRG	GHSLGA
<i>Aspergillus flavus</i>	AAO17921	VVAFRG	GHSLGA
<i>Aspergillus oryzae</i> MDGL	BAA12912	VVAFRG	GHSLGA
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AAO17920	VVAFRG	GHSLGA
<i>Rhizomucor miehei</i>	P19515	YIVFRG	GHSLGG
<i>Rhizopus delemar</i>	AAQ70194	YLVFRG	GHSLGG
<i>Rhizopus niveus</i>	BAA31548	YLVFRG	GHSLGG
<i>Rhizopus oryzae</i>	AAF32408	YLVFRG	GHSLGG
<i>Penicillium allii</i>	AAP59844	VLTFRG	GHSLGG
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	O59952	VLSFRG	GHSLGG

### 2.2 脂肪酶全长基因 *anl* 的克隆

以基因组 DNA 和 cDNA 为模板 ,F1/R1 为引物 ,PCR 扩增结果见图 1。扩增产物测序结果表明 :*anl* 基因全长 1044bp ,含三个内含子( 54 ,45 和 51bp ) ,cDNA 全长 894bp ,编码 297 个氨基酸。该基因序列已提交 NCBI 数据库 GenBank ,登录号为 DQ647700。NCBI 核酸数据库 Blast 检索 ,未找到与 *anl* 基因有明显同源的其他脂肪酶基因序列 ,因此 *anl* 基因是一个全新的基因。根据 *anl* 基因序列概念性翻译出的氨基酸序列分别与 *Aspergillus flavus* , *Thermomyces lanuginosus* , *Penicillium allii* 的脂肪酶氨基酸序列有 40%、50%和 40%的同源性。

### 2.3 重组 pET28a-*anl* 表达载体的构建

以 cDNA 为模板 ,F2/R2 为引物 PCR 扩增的成熟脂肪酶基因应为 813bp。酶切鉴定表明目的基因

已经克隆到 pET28a 载体中(图 2)。

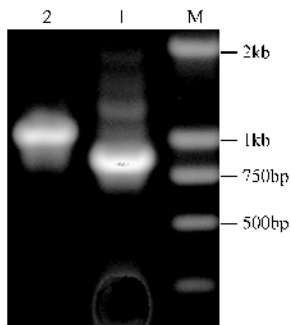


图 1 基因组 DNA 和 cDNA PCR 扩增产物

1 PCR product with the template of cDNA, 2 PCR product with the template of the genomic DNA

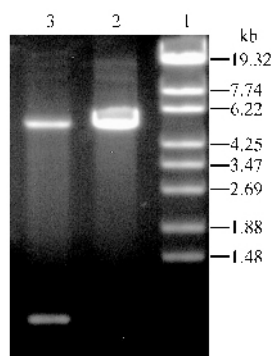


图 2 pET28a 及 pET28a-anl 双酶切电泳图

1 Marker, 2 pET28a digested with *Nhe* I 和 *Eco*R I, 3 pET28a-anl digested with *Nhe* I 和 *Eco*R I

## 2.4 脂肪酶基因 *anl* 在 *E. coli* BL21(De3) 体内的大量表达及表达产物的纯化

携带有 pET28a 载体和携带有重组 pET28a-*anl* 载体的 *E. coli* BL21(De3) 经 IPTG 诱导表达后, 细胞裂解上清液、沉淀物(溶于 8mol/L 尿素中) SDS-PAGE 电泳结果如图 3。在 30kD 附近有一明显增强的蛋白质条带(lane4), 表明 *anl* 基因在大肠杆菌中得到了大量表达。纯化后的重组 Anl(lane5) 略小于原始菌株产生的脂肪酶蛋白质<sup>[3]</sup>, 可能是原始菌株对其产生的脂肪酶有一定的糖基化等侧链修饰作用<sup>[7]</sup>。

## 2.5 重组脂肪酶包含体的复活

橄榄油-罗丹明 B 脂肪酶定性检测结果表明, 复性后的 Anl 蛋白质不论是否用  $\text{CaCl}_2$  溶液透析, 与橄榄油、罗丹明 B 作用后, 在紫外线下均能呈现桔红色荧光(图 4)。说明表达的 Anl 蛋白即是脂肪酶, 且脂肪酶复性过程中无需  $\text{Ca}^{2+}$  的参与。

## 3 讨论

在 N-氨基酸序列已知的情况下, 常规的克隆基

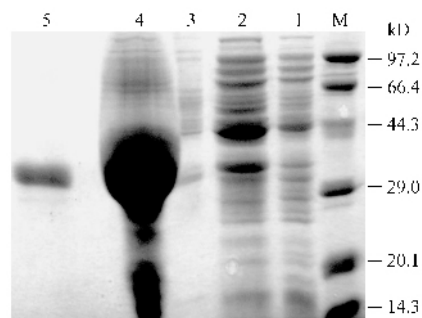


图 3 SDS-PAGE 鉴定 *anl* 在大肠杆菌中的表达

M protein marker, 1 the supernatant of the control cell lysate, 2 the supernatant of the recombinant cell lysate, 3 the pellet fraction of the control cell, 4 the pellet fraction of the recombinant cell, 5 purified Anl



图 4 罗丹明 B 琼脂平板检测脂肪酶活性

CK inclusion body proteins dissolved in 8mol/L urea, 1 the eluate from anion chromatography, 3 the eluate dialyzed against 10mmol/L  $\text{CaCl}_2$

因方法是利用杂交探针, 从 cDNA 文库中筛选克隆脂肪酶基因, 或用 RACE 的方法克隆脂肪酶基因, 但这两种方法均复杂繁琐。利用脂肪酶氧阴离子洞和-G-X-S-X-G-区域的保守氨基酸残基设计引物, 直接 PCR 扩增获得目的基因片段, 继而获得全长脂肪酶基因, 已有成功的先例<sup>[6,8]</sup>。本文正是基于脂肪酶的上述特点, 运用生物信息学方法, 分析现有的核酸数据库, 找到与黑曲霉脂肪酶同源的候选基因, 设计引物直接 PCR 扩增得到目的基因。

pET 表达系统是最有潜力的大肠杆菌表达系统, 但其表达产物常常以无活性的包涵体形式存在。本文利用大量稀释法结合 DEAE Sepharose Fast Flow 层析法高效率地使大量表达的重组 Anl 再折叠复活。实验发现尽管黑曲霉 F044 脂肪酶的水解活力高度依赖  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[3]</sup>, 但没有  $\text{Ca}^{2+}$  参与的情况下, 变性的重组 Anl 依然可以再折叠复性。分析 *anl* 核苷酸序列也没有发现某些依赖  $\text{Ca}^{2+}$  复活的脂肪酶基因所具有的独特重复序列<sup>[9,10]</sup>。

© 中国黑曲霉脂肪酶基因的克隆和包涵体的复活为

国内首次报道。本实验为进一步对黑曲霉脂肪酶结构与功能研究及大规模生产奠定了基础。

### 参考文献

- [ 1 ] Jaeger K E , Reetz M T. Trends in Biotechnology , 1998 , **16**( 9 ) : 396 ~ 403.
- [ 2 ] Fu X , Zhu X , Gao K , *et al.* Journal of the American Oil Chemists Society , 1995 , **72** : 527 ~ 531.
- [ 3 ] 舒正玉 , 杨江科 , 闫云君. 黑曲霉 F044 脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究. 生物工程学报 2007 **23**( 1 ) : 96 ~ 100.
- [ 4 ] 程 度 , 黄翔宇 , 李宝健. 菌物系统 2002 **21**( 1 ) : 137 ~ 139.

- [ 5 ] Kouker G , Jaeger K E. Applied and Environmental Microbiology , 1987 , **53**( 1 ) : 211 ~ 213.
- [ 6 ] Bell P J , Sunna A , Gibbs M D , *et al.* Microbiology , 2002 , **148** : 2283 ~ 2291.
- [ 7 ] Tombs M P , Blake G G. Biochim Biophys Acta , 1982 , **700**( 1 ) : 81 ~ 89.
- [ 8 ] Kwoun K H , Jung Y J , Choi W C , *et al.* FEMS Microbiology Letters , 2004 , **235**( 2 ) : 349 ~ 355.
- [ 9 ] Amada K , Haruki M , Imanaka T , *et al.* Biochimica et Biophysica Acta , 2000 , **1478**( 2 ) : 201 ~ 210.
- [ 10 ] Amada K , Kwon H J , Haruki M , *et al.* FEBS Letters , 2001 , **509**( 1 ) : 17 ~ 21.