

利用冰核蛋白 N 末端结构域在大肠杆菌表面 展示粘质沙雷氏菌脂肪酶

陶站华* 张搏

(广西科学院生物物理实验室 广西 南宁 530007)

摘要: 【目的】利用细胞表面工程技术将活性脂肪酶展示于大肠杆菌细胞表面并对展示脂肪酶的酶学性质进行研究。【方法】将丁香假单胞菌冰核蛋白 N 末端结构域序列与粘质沙雷氏菌脂肪酶编码基因融合, 构建成脂肪酶表面展示载体, 并转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。【结果】重组菌以终浓度 0.05 mmol/L 异丙基硫代-D-半乳糖苷(IPTG)、25 °C 条件下诱导培养, 16 h 后表面展示脂肪酶活力达到最大值 1 852 U/g 细胞干重。表面展示酶的最适 pH 为 9.0, 最适反应温度为 40 °C, 表面展示酶热稳定性较游离酶有较大提高, 在 40 °C 孵育 1 h 后仍能保持 90% 以上的酶活力。【结论】以上结果表明细菌表面展示技术为脂肪酶固定提供了一个很有前景的替代方法。

关键词: 表面展示, 脂肪酶, 粘质沙雷氏菌, 大肠杆菌

Display of *Serratia marcesens* lipase on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein

TAO Zhan-Hua* ZHANG Bo

(Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: [Objective] We constructed an *Escherichia coli* strain displaying an active lipase on the cell surface by cell surface engineering and characterized the displayed lipase. **[Methods]** *Escherichia coli* surface display vector of lipase was constructed by fusing sequence encoding the N-terminal domain of ice nucleation protein with *Serratia marcesens* lipase gene, and the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31060128); 广西自然科学基金项目(No. 桂科自 0991078)

*通讯作者: Tel: 86-771-2503995; 信箱: taozhanhua@hotmail.com

收稿日期: 2011-09-10; 接受日期: 2011-11-22

recombinant vector was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). **[Results]** The highest lipase activity was observed when the recombinant cells were induced with 0.05 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) and cultured at 25 °C for 16 h. Optimal pH and optimal temperature for cell surface-displayed lipase was 9.0 and 40 °C, respectively. The thermal stability of surface-displayed lipase was improved compared with that of free lipase, and the residual activity was above 90 percent of initial activity after incubated at 40 °C for 1 h. **[Conclusion]** The above results suggest that the bacterial surface display technology offers a promising alternative approach for immobilization of lipases.

Keywords: Surface display, Lipase, *Serratia marcesens*, *Escherichia coli*

细菌表面展示技术是将外源多肽或蛋白质与某些锚定基序融合, 融合蛋白在锚定基序引导下表达并固定于宿主菌细胞表面, 并保持原有的构象和生物学功能。细菌表面展示技术已在多个领域得到广泛应用, 如开发活疫苗^[1]、构建和筛选蛋白文库^[2]、全细胞生物转化或生物催化^[3], 以及环境修复^[4]等。目前已开发出多种锚定基序适用于不同的展示系统, 如在革兰氏阴性菌展示系统中, 可以选用外膜蛋白^[5]、脂蛋白^[6]、某些分泌蛋白^[7]作为锚定基序; 在革兰氏阳性菌展示系统中可以利用葡萄球菌蛋白质 A 作为锚定基序^[8]; 而对于古细菌, 则可以选用 S-层蛋白作锚定基序^[9]。冰核蛋白(Ice nucleation protein, INP)是丁香假单胞菌的外膜蛋白, 包括 N 末端、C 末端和中央重复区共 3 个结构域, 研究表明 INP 全长序列、N 末端和 C 末端结构域的嵌合体以及单独的 N 末端结构域都可以作为有效的锚定基序用于革兰氏阴性菌展示系统。与其他锚定基序相比, INP 的优势在于它能稳定地在宿主细胞表面表达而不影响细胞膜的完整性, 此外基于 INP 的展示系统能展示较高分子量的外源蛋白, 如该系统曾成功展示分子量高达 60 kD^[10]、77 kD^[11]以及 90 kD^[12]的外源蛋白。

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一类在水溶液中催化甘油三酯或其他脂肪酸酯水解, 在有机溶剂中催化酯类合成的酶, 脂肪酶催化的反应具有很高的底

物特异性和区域选择性。粘质沙雷氏菌脂肪酶是一种重要的工业用脂肪酶, 对一些有机溶剂具有耐受性, 可以应用于手性化合物的不对称合成, 如在化学-酶法制备地尔硫卓生产工艺中用于拆分消旋体反式-4-甲氧苯基缩水甘油酸甲酯得到 (2R_3S)-4-甲氧苯基缩水甘油酸甲酯这一关键中间体, 具有广泛的工业应用前景和开发潜力。该酶在实际应用中通常是采用物理或化学方法将酶固定在适当的载体上, 然而固定过程可能造成酶活性损失或天然性质的改变。本研究利用 INP 的 N 末端结构域作为锚定基序将粘质沙雷氏菌脂肪酶展示于大肠杆菌细胞表面, 并对展示酶的酶学性质进行了初步研究, 为粘质沙雷氏菌脂肪酶的固定探索出一种基于细胞表面工程的生物学方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 (DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司, pET30a 载体为 Novagen 公司产品, 表达游离粘质沙雷氏菌脂肪酶的载体 pET-LipA^[13]由本实验室保存。

1.1.2 工具酶和主要试剂: 限制性内切核酸酶 *Nde* I、*Bam*H I、*Hind* III 和 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司, PrimerSTAR DNA

聚合酶购自宝生物(大连)有限公司, DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司, 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒为 BioFlux 公司产品, 截短的 INP 编码基因及 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 其他化学试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 粘质沙雷氏菌脂肪酶表面展示载体的构建: 构建表面展示载体所用的锚定基序为丁香假单胞菌冰核蛋白 N 末端结构域(179 个氨基酸), 其全长序列编码基因 InaK 的 GenBank 登录号为 AF013159.1, 根据大肠杆菌密码子的偏好性利用 Graphical codon usage analyser 在线分析系统对其编码序列进行重新设计, 然后由上海生工生物工程有限公司进行基因合成。合成好的基因经 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切, 并与经过相同酶切的 pET30a 载体连接, 构建成的大肠杆菌表面展示载体命名为 pINP。然后以含有粘质沙雷氏菌脂肪酶基因的载体 pET-Lip 为模板, PCR 扩增获得粘质沙雷氏菌脂肪酶编码基因, 上游引物为: 5'-CGCGGATCCATGGGCATCTTTAGCTATAAGGATCTG-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点), 下游引物为: 5'-CCCAAGCTTTTAGGCCAACACACCTGATC-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点), PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 与经过相同酶切的 pINP 载体连接, 得到粘质沙雷氏菌脂肪酶表面展示载体, 命名为 pINP-Lip。构建好的质粒经酶切和测序验证以保证编码框正确。

1.2.2 表面展示酶的诱导表达: 重组载体 pINP-Lip 转化于大肠杆菌 BL21(DE3)中用于表达分析, 并以含有表达游离脂肪酶的 pET-Lip 载体的菌株作为对照。具体操作如下: 从平板上挑取单菌落接种于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 °C 过夜振荡培养, 然后将培养物以

2%的比例转接于 250 mL 含有 50 mL LB 培养基的摇瓶, 37 °C、180 r/min 振荡培养至菌体密度 OD_{600} 达到 0.6 时, 加入终浓度为 2 mmol/L $CaCl_2$ 以及终浓度为 0.05 或 0.5 mmol/L 异丙基硫代-D-半乳糖苷(IPTG), 于温度为 25 °C 或 30 °C、摇床转速 180 r/min 条件下诱导培养 24 h, 每隔 4 h 取 2 mL 菌液, 离心, 菌体沉淀用无菌水洗涤 2 次后真空冻干, 称量干重后用适当体积的 Tris-HCl 缓冲液重悬, 发酵上清液及菌体重悬液于 4 °C 保存以备酶活力分析。

1.2.3 脂肪酶活力测定: 酶活力测定采用 p-NPP 法, 参照 Tang 等^[14]的方法稍作修改进行。A 液: 16.5 mmol/L 对硝基苯酚棕榈酸酯(p-NPP)的异丙醇溶液。B 液: 含有 0.4% Triton X-100 和 0.1% 阿拉伯树胶的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0), 4 °C 保存备用。测定前, 将相应的 A 液与 B 液以 1:9 (V/V)比例混和。测定表面展示酶时, 取 100 μ L 菌体重悬液加入 900 μ L 上述混合液中(空白对照管在混合液中加入 100 μ L Tris-HCl 缓冲液); 测定游离酶时, 取 100 μ L 粗酶提取液加入上述混合液中(空白对照管中加入 100 μ L 灭活的粗酶提取液)。于 40 °C 反应 10 min, 立即加入 1 mL 无水乙醇将酶灭活, 离心取上清液, 于可见光 (410 nm)下读取光吸收值。在此条件下, 对硝基苯酚的摩尔消光系数为 1.46×10^5 cm²/mol, 酶活(U)单位定义为每分钟分解 p-NPP 产生 1 μ mol 对硝基苯酚(黄色)所需的酶量定义为 1 个酶活单位, 表面展示脂肪酶的活力以 U/g 细胞干重表示, 游离脂肪酶的活力以 U/mL 表示。

1.2.4 表面展示酶与游离酶最适 pH 值测定: 于 40 °C 下, 在 pH 5.0–10.0 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中测定酶活力。

1.2.5 表面展示酶与游离酶的最适反应温度测定: 在 pH 9.0 条件下, 分别在 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C 和 60 °C 测

定酶活力。

1.2.6 表面展示酶与游离酶的热稳定性测定: 将表面展示脂肪酶和游离脂肪酶在 40 °C 孵育, 每隔 0.5 h 取孵育液在最适反应条件下测定其残余酶活力, 以未经热处理的初始酶活力作为 100%, 热处理不同时间的酶活力与初始酶活力的比值作为相对酶活力。

2 结果

2.1 粘质沙雷氏菌脂肪酶表面展示载体的构建

将人工合成的 537 bp 编码冰核蛋白 N 末端结构域的 DNA 序列插入 pET30a 载体的 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 得到大肠杆菌表面展示载体 pINP, 如图 1A 所示。再以载体 pET-Lip 为模板, 扩增得到 1.8 kb 粘质沙雷氏菌脂肪酶编码基因, 将其插入 pINP 载体 INP 编码基因 3'端得到脂肪酶表面展示载体 pINP-Lip, 如图 1B 所示。对构建的载体 pINP-Lip 进行酶切验证, 酶切片段电泳结果如图 2 所示, 重组质粒用 *Nde* I 和 *Hind* III 双

酶切后分别在 2.4 kb 处和 5.2 kb 处各有一条条带, 用 *Nde* I 单酶切后在 7.5 kb 处有单一条带, 酶切验证结果与预期一致。对酶切验证后的序列进行测序, 结果表明编码框与实验设计一致。

2.2 表面展示酶的诱导表达

携带游离脂肪酶表达载体 pET-Lip 和表面展示脂肪酶表达载体 pINP-Lip 的工程菌以 IPTG 诱导表达 24 h, 每隔 4 h 取发酵液上清液和菌体沉淀检测酶活。结果发现, 含有载体 pET-Lip 工程菌的发酵上清液和菌体沉淀, 含有载体 pINP-Lip 工程菌的发酵上清液均检测不到脂肪酶活性, 而含有载体 pINP-Lip 工程菌的菌体沉淀, 随着诱导时间延长, 脂肪酶活力逐渐升高。图 3 比较了不同诱导剂浓度和不同诱导温度对表面展示脂肪酶活力的影响, 在 IPTG 终浓度为 0.05 mmol/L、温度为 25 °C 条件下展示酶活力最高, 16 h 后酶活力达到最大值 1 852 U/g 细胞干重, 而在较高的诱导剂浓度(0.5 mmol/L IPTG)和较高的诱导温度(30 °C)下, 表面展示酶活力均大大降低。

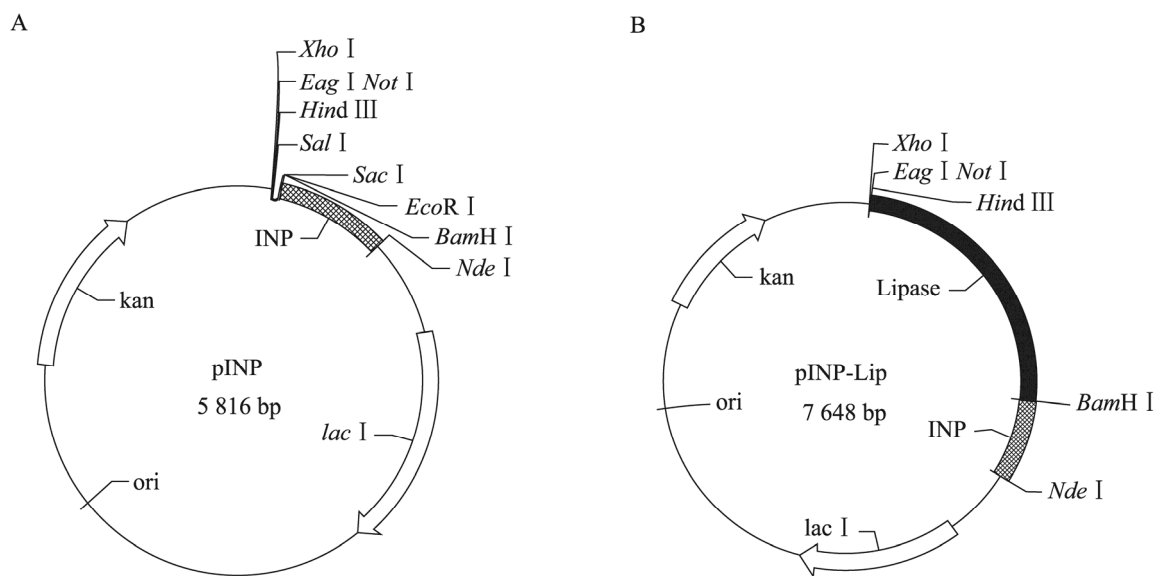


图 1 表面展示载体的构建方案

Fig. 1 Schematic representation of surface display plasmids

注: A: pINP 载体; B: pINP-Lip 载体。

Note: A: Plasmid of pINP; B: Plasmid of pINP-Lip.

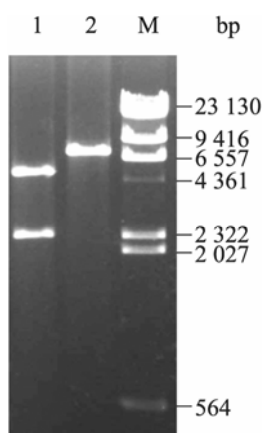


图2 重组质粒 pINP-Lip 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease identification of recombinant plasmid pINP-Lip

注: 1: *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切验证; 2: *Nde* I 单酶切验证; M: 分子量标准.

Note: 1: pINP-Lip digested by *Nde* I and *Hind* III; 2: pINP-Lip digested by *Nde* I; 3: DNA marker.

2.3 pH 值对表面展示酶活力的影响

表面展示酶与游离酶的酶活力-pH 变化曲线

相似, 如图 4 所示, 表面展示脂肪酶与游离脂肪酶都是在碱性条件下显示较高酶活力, 其最适 pH 均为 9.0。

2.4 反应温度对表面展示酶活力的影响

在 25 °C–60 °C 范围内对表面展示脂肪酶和游离脂肪酶进行活力测定, 结果如图 5 所示, 表面展示脂肪酶与游离脂肪酶的最适反应温度均为 40 °C。

2.5 表面展示脂肪酶的热稳定性

表面展示脂肪酶与游离脂肪酶的热稳定性比较如图 6 所示, 表面展示脂肪酶在 40 °C 孵育 1 h 后, 仍然保持 90% 以上的酶活力, 孵育 4 h 后酶活力约为初始活力的 60%; 而游离脂肪酶 40 °C 处理 1 h 后残余酶活力即降至初始酶活力的 50%, 4 h 后残余酶活力还不到初始酶活力的 10%, 以上结果表明表面展示大大提高了粘质沙雷氏菌脂肪酶的热稳定性。

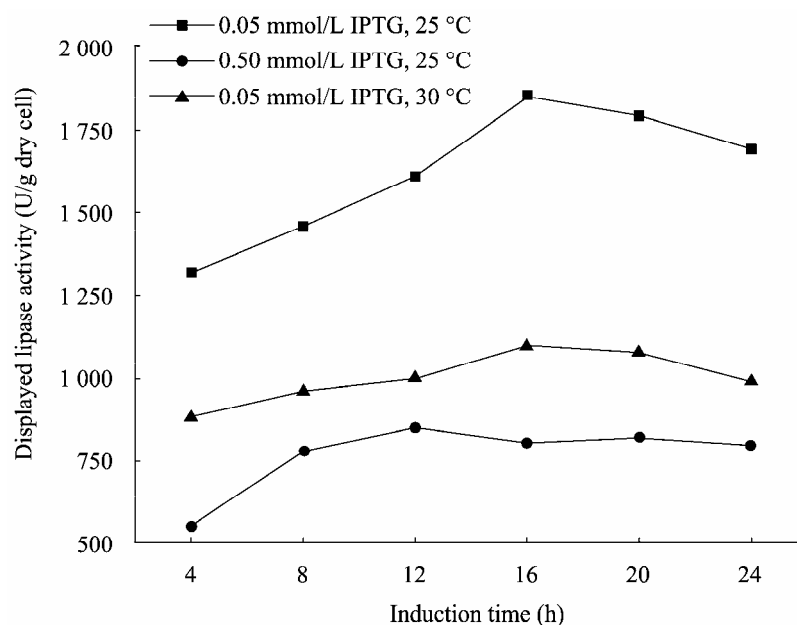


图3 表面展示脂肪酶活力与诱导时间的相关性

Fig. 3 Time course of surface-displayed lipase activity

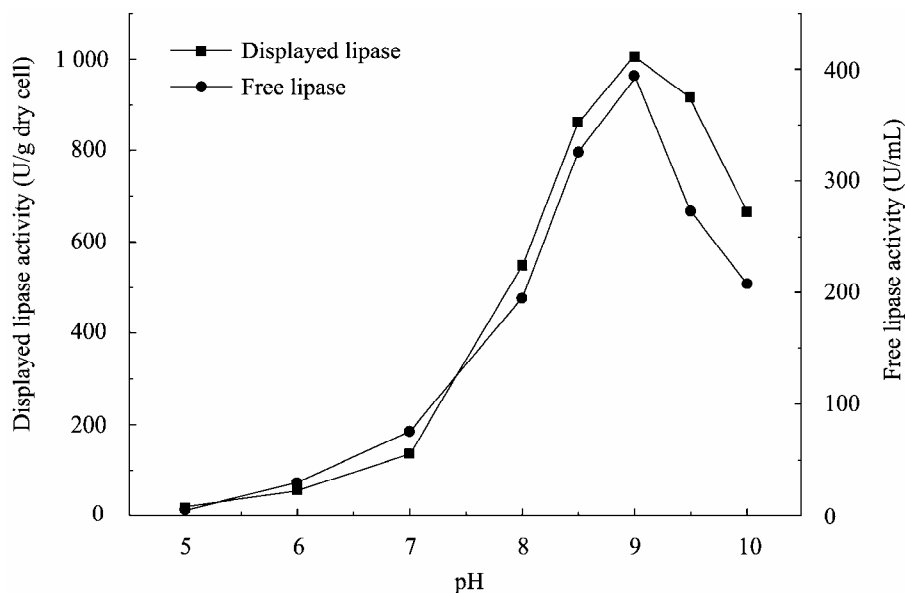


图 4 pH 对表面展示脂肪酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activity of surface-displayed lipase

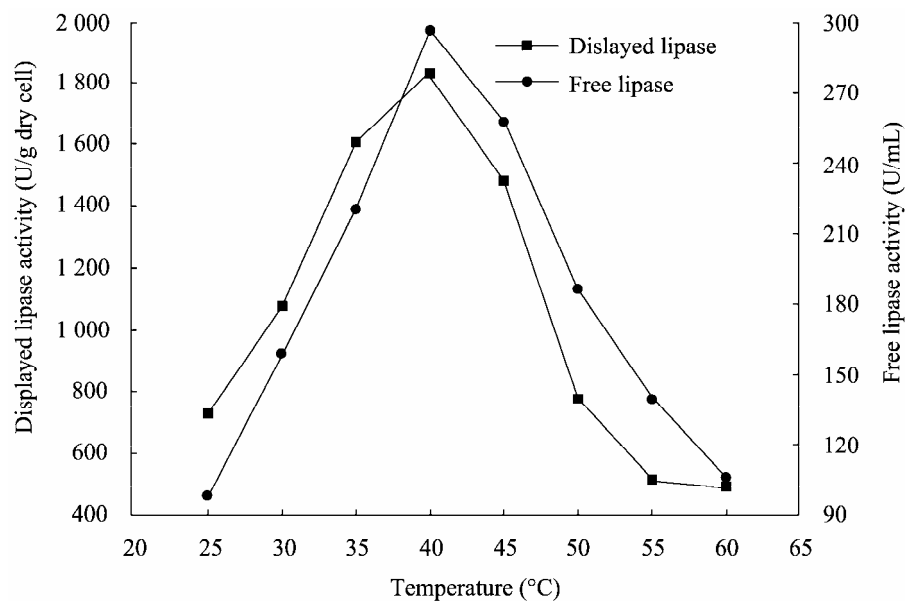


图 5 温度对表面展示脂肪酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the activity of surface-displayed lipase

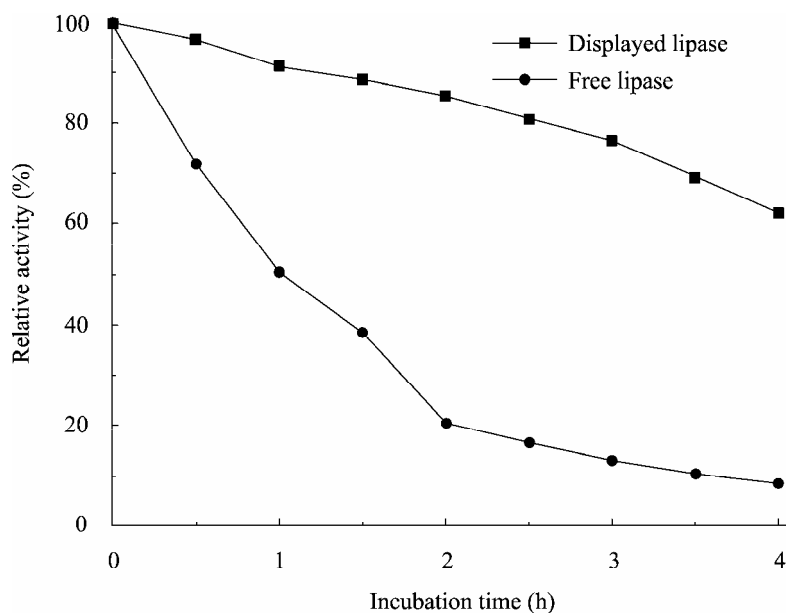


图6 表面展示脂肪酶的热稳定性

Fig. 6 Thermal stability of surface-displayed lipase

3 讨论

酶促反应一般具有很高的立体选择性和区域选择性,因此,以酶作为生物催化剂催化合成某些化合物是化工生产中的一种重要方法。酶的固定化可以提高酶的热稳定性和操作稳定性,并且固定化酶可以重复使用,从而降低酶的应用成本。迄今为止,已开发出多种酶的固定化技术,如吸附法、包埋法、共价偶联法、交联法等,然而这些物理或化学固定方法都存在成本较高,固定化操作可能使一些酶失活或天然性质发生改变等局限。本文利用微生物表面展示技术将脂肪酶固定于大肠杆菌细胞表面,细菌细胞既作为酶的生产者,又可以充当固定化酶中的载体,除了具有可反复回收利用、能提高酶的热稳定性等传统的固定化酶的共同特点外,还免去了传统的固定化方法中酶的纯化和固定化操作,进一步降低了生产成本。

在细菌表面展示技术中,宿主细胞、锚定基

序的选择以及培养、诱导条件都影响到外源蛋白在宿主细胞表面的展示量及其原有生物活性能否得到保持。本研究中,我们选择大肠杆菌作为表面展示酶的宿主细胞,大肠杆菌是常用的异源蛋白表达系统,遗传背景清楚,外源蛋白表达量高,本研究中在大肠杆菌细胞表面展示的脂肪酶力最高可达 1 852 U/g 细胞干重。当然,如果在今后的研究中选择一些能够耐受有机溶剂、抗逆性比较强的菌株,如恶臭假单胞菌进行脂肪酶的表面展示,并且酶活力与在大肠杆菌表面展示接近,则在有机合成的应用中将会更具前景。以往的研究表明冰核蛋白 INP 能展示较大分子量的外源蛋白同时不影响宿主细胞膜的完整性^[10-12],本研究中需要展示的粘质沙雷氏菌脂肪酶分子量达到 64.8 kD,在预试验中我们探索了 2 种锚定基序 INP 和外膜蛋白 OprF,结果发现 INP 展示的脂肪酶有很高的酶活力,而以 OprF 作为锚定基序,菌体表面几乎检测不到脂肪酶活力。在诱导条件优化实验中我们发现较低的诱导剂浓度

(0.05 mmol/L IPTG)和较低的诱导温度(25 °C)更有利于粘质沙雷氏菌脂肪酶的细菌表面展示。我们推测其原因可能是在较高的 IPTG 浓度和较高的诱导温度下, INP-脂肪酶基因转录速率较高, 短时间内合成的大量 INP-脂肪酶融合蛋白堆积, 阻塞了自身向细胞壁转运的通路, 并引起细胞生长抑制; 而在较低的 IPTG 浓度和较低的诱导温度下, 融合蛋白的合成速率较低, 与蛋白的转运速率能够达成平衡, 融合蛋白可以源源不断地转运并锚定于细胞壁表面, 最终使展示酶活力较高。

参 考 文 献

- [1] Zhao Y, Liu Q, Wang XH, et al. Surface display of *Aeromonas hydrophila* gapdh in attenuated *Vibrio anguillarum* to develop a novel multivalent vector vaccine[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(5): 963–970.
- [2] Binder U, Matschiner G, Theobald I, et al. High-throughput sorting of an anticalin library via esp-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 400(4): 783–802.
- [3] Jung HC, Kwon SJ, Pan JG. Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* gm730, and its applications in whole-cell biocatalysis[J]. *BMC Biotechnology*, 2006, 6: 23–31.
- [4] Saleem M, Brim H, Hussain S, et al. Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(2): 151–161.
- [5] Mej re M, Ljung S, Bulow L. Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as ompa fusion proteins in *Escherichia coli*[J]. *Protein Engineering*, 1998, 11(6): 489–494.
- [6] Francisco JA, Campbell R, Iverson BL, et al. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(22): 10444–10448.
- [7] Jung HC, Lebeault JM, Pan JG. Surface display of *Yersinia mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(6): 576–580.
- [8] Hansson M, St hl S, Nguyen TN, et al. Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(13): 4239–4245.
- [9] Sleytr UB, S ra M. Bacterial and archaeal s-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15(1): 20–26.
- [10] Lee SY, Choi JH, Xu ZH. Microbial cell-surface display[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(1): 45–52.
- [11] Yim SK, Jung HC, Pan JG, et al. Functional expression of mammalian nadph-cytochrome p450 oxidoreductase on the cell surface of *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 49(2): 292–298.
- [12] Wu ML, Tsai CY, Chen TH. Cell surface display of chi92 on *Escherichia coli* using ice nucleation protein for improved catalytic and antifungal activity[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 256(1): 119–125.
- [13] 朱绮霞, 陈英, 张搏, 等. 粘质沙雷氏菌脂肪酶基因的克隆表达和酶学性质的研究[J]. *生物技术*, 2010, 20(5): 12–16.
- [14] Tang LH, Xia LM. Purification and partial characterization of a lipase from *Bacillus coagulans* zju318[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 125(2): 139–146.