

研究报告

腺苷酸脱氨酶在乳酸克鲁维酵母中构建表达

许强^{1,2} 张梁^{1,2*} 李由然^{1,2} 李赢^{1,2} 顾正华^{1,2} 丁重阳^{1,2} 石贵阳^{1,2}

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】实现鼠灰链霉菌来源经密码子优化后的腺苷酸脱氨酶基因在乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis* GG799)中组成型表达。【方法】以鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)来源的腺苷酸脱氨酶(AMP)基因经密码子优化后作为模板,设计特异性引物,PCR扩增AMP脱氨酶基因*opt-AMPD*,以pKLAC1为载体构建重组表达质粒pKLAC1-*opt-AMPD*,经Sac II线性化后电转化法转入*K. lactis* GG799,筛选得到重组菌株,测定酶活,经His TrapTM HP纯化后得到AMP脱氨酶,并优化重组菌的发酵培养基。【结果】对AMP脱氨酶基因进行了密码子优化后,构建了重组*K. lactis* GG799/pKLAC1-*opt-AMPD*,实现组成型表达,密码子优化后AMP脱氨酶酶活提高到586±50 U/mL。SDS-PAGE结果显示,纯化后的AMP脱氨酶为单一条带,蛋白大小约为60 kD。优化的发酵培养基为(g/L):葡萄糖40、蛋白胨20、酵母粉15、NaCl 8、KCl 10、MgSO₄ 2, 30 °C、200 r/min发酵120 h,酶活达到2100±60 U/mL。【结论】实现了密码子优化后的腺苷酸脱氨酶基因在乳酸克鲁维酵母GG799内的组成型表达,为实现腺苷酸脱氨酶的重组高效表达和发酵生产进行了有益探索。

关键词: 乳酸克鲁维酵母, 腺苷酸脱氨酶, 重组表达, 发酵优化

Expression of adenosine monophosphate deaminase in *Kluyveromyces lactis*

XU Qiang^{1,2} ZHANG Liang^{1,2*} LI You-Ran^{1,2} LI Ying^{1,2} GU Zheng-Hua^{1,2}
DING Zhong-Yang^{1,2} SHI Gui-Yang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory of Food Fermentation Process and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] We constructed a recombinant *Kluyveromyces lactis* GG799 strain to constitutively produce adenosine monophosphate (AMP) deaminase. [Methods] The codons of AMP deaminase gene derived from *Streptomyces murinus* were optimized and used as template. We designed primers and amplified the *opt-AMPD* gene. The *opt-AMPD* gene was cloned into the

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100905)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

Received: January 04, 2016; Accepted: April 06, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863计划) (No. 2011AA100905)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-04; 接受日期: 2016-04-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

expression plasmid pKLAC1. The recombinant expression plasmid was linearized by *Sac* II and transformed into *K. lactis* GG799 by electrotransformation. We determined the AMP deaminase activity of positive transformants. The AMP deaminase was purified by His TrapTM HP and we preliminary optimized the fermentation medium of *K. lactis* GG799. **[Results]** The codons of *AMPD* gene were optimized and a recombinant *K. lactis* GG799/pKLAC1-*opt-AMPD* was constructed to constitutively produce AMP deaminase. The AMP deaminase activity reached 586±50 U/mL after optimizing codon. The purified AMP deaminase showed a single band on SDS-PAGE and the molecular weight by SDS-PAGE was about 60 kD. The preliminary optimized medium contained 40 g/L glucose, 20 g/L peptone, 15 g/L yeast extract, 8 g/L NaCl, 10 g/L KCl, 2 g/L MgSO₄. The activity of AMP deaminase reached 2 100±60 U/mL cultured in flask after 120 h at 30 °C with agitation 200 r/min. **[Conclusion]** These codons of *AMPD* gene were optimized and AMP deaminase was constitutively produced in the *K. lactis* GG799. It is a valuable exploration about high efficiency recombinant expression and production of AMP deaminase.

Keywords: *Kluyveromyces lactis*, AMP deaminase, Recombinant expression, Fermentation optimization

腺苷酸脱氨酶(AMP deaminase, EC3.5.4.6)是一种氨基水解酶,在一定条件下,能够不可逆地将腺苷酸嘌呤碱基上的氨基脱去,生成 IMP 和 NH₃^[1],是构成嘌呤核苷酸代谢循环的 3 种主要酶类之一,具有维持机体内腺苷酸能荷^[2]和机体免疫^[3]的重要作用。IMP 可用于医药行业和调味品行业, NH₃ 可用于生产细胞 H⁺ 的缓冲剂。AMP 脱氨酶是工业上非常重要的酶^[4],随着我国核苷酸工业的发展,AMP 脱氨酶在食品、医药和科研领域等方面显得越来越重要。

AMP 脱氨酶广泛存在于各种生物体内,包括人体、动物、植物及微生物等,在高等真核生物嘌呤代谢过程中起着非常重要的作用^[5],人类的代谢性肌肉病变与骨骼肌缺乏 AMP 脱氨酶有关^[6]。早期 AMP 脱氨酶主要由哺乳类动物细胞制备,例如兔子骨骼肌细胞^[7]以及人类红细胞等,但这种方法不仅产量低、来源少,而且生产成本低、工艺复杂。目前,工业上通常使用微生物固态发酵和液态发酵来制备 AMP 脱氨酶,主要是依靠青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)以及毛霉(*Mucor*)等发酵来制得 AMP 脱氨酶^[8],其中以米曲霉(*Aspergillus oryzae*)发酵最为常见。例如,叶炜等^[9]通过米曲霉液态发酵产 AMP 脱氨酶,酶活达 361.33 U/mL。普为民等^[10]筛选到一株产 AMP 脱氨酶的蜂蜜曲霉(*Aspergillus melleus*),通过紫外诱变

处理和优化后,AMP 脱氨酶活性达 1 300 U/mL。梅光明等^[11]从自然发酵乳中筛选到一株产 AMP 脱氨酶的菌株为毛霉菌属,酶活达 472.3 U/mL。刘军昌等^[12]采用米曲霉固态发酵产 AMP 脱氨酶,酶活仅达到 1 543.48 U/g 鲜曲。

目前,国内外利用基因重组技术构建重组菌表达 AMP 脱氨酶的报道较少,公开报道的主要有日本天野株式会社和中国江南大学发布的专利。近两年,方炜等^[13]用 GAP 启动子在毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)内组成型表达 AMP 脱氨酶,酶活可达到 2 230 U/mL,酶活较高,利用组成型启动子,避免了甲醇诱导带来的危害。郭自涛等^[14]通过重组枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* WB600)分泌表达 AMP 脱氨酶,酶活可达到 2 230 U/mL,酶活较高,发酵周期短,但枯草芽孢杆菌在发酵过程中分泌了大量的杂蛋白。

通过基因重组技术,将微生物来源的 AMP 脱氨酶基因在特定的宿主内表达,从而使 AMP 脱氨酶高效表达,有效改善以往发酵过程中存在的问题,具有十分重要的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:文中所用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 引物:采用 Oligo7 设计 PCR 特异性引物,由金唯智公司合成,见表 2。

表 1 文章中所涉及到的菌株和质粒		
Table 1 The mainly strains and plasmids used in this study		
菌株和质粒	相关特性和用途	来源
Strain/Plasmid	Characters/Applications	Sources
<i>E. coli</i> JM109	用于克隆 <i>opt-AMPD</i> 基因; 保藏载体	本研究中心保藏
<i>opt-AMPD</i>	密码子优化后的 AMP 脱氨酶基因	金斯瑞合成
<i>K. lactis</i> GG799	表达宿主	本研究中心保藏
pMD19-T vector	克隆载体; Amp ^r	购于 TaKaRa 公司
pKLAC1	表达载体; 保藏于 <i>E. coli</i> JM109; Amp ^r	本研究中心保藏
pKLAC1- <i>opt-AMPD</i>	<i>LAC4</i> 启动子	本研究构建
<i>K. lactis</i> GG799/pKLAC1	带有空质粒的重组菌	本研究构建
<i>K. lactis</i> GG799/pKLAC1- <i>AMPD</i>	带有 <i>AMPD</i> 基因的重组菌	本研究中心构建
<i>K. lactis</i> GG799/pKLAC1- <i>opt-AMPD</i>	带有 <i>opt-AMPD</i> 基因的重组菌	本研究构建

注: Amp^r: 氨苄霉素抗性.
Note: Amp^r: Ampicillin resistance.

表 2 文中所用到的引物		
Table 2 Primers used in this study		
引物	序列	酶切位点
Primers	Sequence (5'→3')	Restriction sites
AMPD-F-His	CCGCTCGAGGCTCCACCACTAGACAAGCA	<i>Xho</i> I
AMPD-R-His	CGGGGTACCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCTTGCATGTGCTCTTCAAA	<i>Kpn</i> I
P1	TACCGACGTATATCAAGCCCA	
P2	ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC	
P3	CAGTGATTACATGCATATTGT	

注: 下划线部分为酶切位点.
Note: The underlined are restriction site.

1.1.3 培养基: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 用于大肠杆菌的培养。YPD 培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 用于 *K. lactis* 的培养。YCB 培养基(g/L): 酵母基础碳源 YCB 11.7, pH 7.0 的 KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液 30 mL (终浓度 30 mmol/L), 琼脂粉 15 g, 灭菌后加入乙酰胺至终浓度为 5 mmol/L, 用于 *K. lactis* 重组子的筛选。

1.1.4 主要试剂和仪器: 限制性内切酶, 加拿大 Fermentas 公司; Yeast Extract、Tryptone、5'-腺苷酸(5'-AMP), 美国 Sigma 公司; 质粒小量提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、胶回收试剂盒, *Pfu* PCR Master Mix, 杭州宝赛生物技术有限公司; UV-Vis Spectrophotometer Q500, 美国 Quawell 公

司; Bio-Rad 525BR 蛋白电泳仪、Bio-Rad S1000 PCR 仪、Chemi Doc 凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 AMP 脱氨酶基因密码子优化: 由于不同宿主间密码子的使用频率和偏好性存在差异, 这是导致基因在异源宿主内不能高效表达的主要原因。鼠灰链霉菌来源的 AMP 脱氨酶基因编码氨基酸的密码子在 *K. lactis* GG799 内使用频率很低, 根据 *K. lactis* GG799 密码子的偏好性和 G+C 含量的要求, 使用 GeneOptimizer 软件对 AMP 脱氨酶基因的核苷酸序列进行密码子优化, 将优化好的基因序列 *opt-AMPD* 送南金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2.2 AMP 脱氨酶基因的克隆: 以密码子优化后的 AMP 脱氨酶基因 *opt-AMPD* 为模板, 采用

Oligo7 设计引物(AMPD-F-His、AMPD-R-His), 扩增 *opt-AMPD*, PCR 扩增体系为: 模板 2 μ L, $2\times Pfu$ PCR master mix 50 μ L, 25 mmol/L 引物各 2 μ L, 灭菌的 ddH₂O 44 μ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物纯化后琼脂糖凝胶电泳分析, 将 PCR 产物与 pMD19-T 载体相连, 转化 *E. coli* JM109, 筛选阳性转化子送上海生工公司测序。

1.2.3 重组表达载体 pKLAC1-*opt-AMPD* 和 pKLAC1-*AMPD* 的构建: 提取阳性克隆转化子 pMD19-T-*opt-AMPD*, 用 *Xho* I-*Kpn* I 酶切 pMD19-T-*opt-AMPD* 和 pKLAC1 载体, 胶回收 *opt-AMPD* 基因和 pKLAC1 载体。将 *opt-AMPD* 与 pKLAC1 按照体积比 4:1 加入 10 μ L 体系, 用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h, 转化 *E. coli* JM109, 涂布 Amp 抗性平板, 挑转化子, 提取质粒, 经 *Xho* I-*Kpn* I 酶切验证, 表达载体 pKLAC1-*opt-AMPD* 的构建过程如图 1 所示。

密码子优化前 AMP 脱氨酶基因为 *AMPD*, 重组菌 *K. lactis* GG799/pKLAC1-*AMPD* 的构建方法与重组菌 *K. lactis* GG799/pKLAC1-*opt-AMPD* 的构建方法相同。

1.2.4 重组 *K. lactis* GG799 转化子的筛选与多拷贝验证: 提取重组质粒 pKLAC1-*opt-AMPD*, 经 *Sac*

II 线性化后电转 *K. lactis* GG799, 涂布 YCB 平板, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 4 d, 挑选转化子在 YCB 平板上划线, 挑选单菌落接种于 YPD 培养基, 提取 *K. lactis* GG799 转化子的染色体, 以染色体为模板, 分别利用整合引物 P1 和 P2、P2 和 P3 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系: 100 ng/ μ L 模板 1 μ L, $2\times Pfu$ PCR master mix 25 μ L, 25 mmol/L 引物各 1 μ L, 灭菌的 ddH₂O 22 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 80 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.5 分光光度计法测定 AMP 脱氨酶活力^[15]: 准确称取 13.9 mg 5'-腺苷酸溶于 1 mL 0.08 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液中作为原始底物, 然后用 0.1 mol/L pH 6.0 的琥珀酸-NaOH 稀释 400 倍得到终浓度为 0.1×10^{-3} mol/L 的反应底物。移取 3 mL 反应底物于试管中 60 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 加入 100 μ L 预稀释的 AMP 脱氨酶液立即计时, 将反应底物与酶液混匀, 反应 15 min 后, 加入 3 mL、10%高氯酸溶液终止反应。对照实验方法: 移取 3 mL 反应底物于试管中 60 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后, 放入冰中加入 3 mL 10%高氯酸溶液, 加入 100 μ L 预稀释的 AMP 脱氨酶混匀, 以去离子水为参比, 用石英比色皿测定吸光值。

酶活定义: 在上述条件下每分钟吸光值改变 0.001, 定义为酶的 1 个活力单位。计算公式如下: 酶活(U/mL)=($\Delta A_{265}\times K\times 10$)/(0.001 $\times T$)。

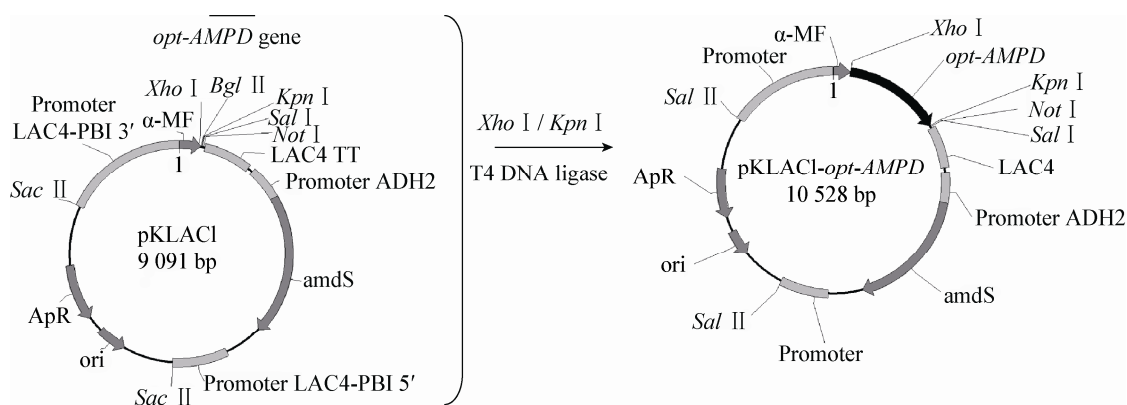


图 1 表达载体 pKLAC1-*opt-AMPD* 的构建

Figure 1 Construction of expression vector pKLAC1-*opt-AMPD*

ΔA_{265} 为反应液与对照组吸光度的差值; K 为酶液的稀释倍数; T 为反应时间, min。

相对酶活: 每组实验测定的酶活相对于对照组的比值为相对酶活力。

1.2.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析: 将重组菌 *K. lactis* GG799/pKLAC1-*opt-AMPD* 和 *K. lactis* GG799/pKLAC1 分别接种于 50 mL YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 将发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 发酵上清经过 His TrapTM HP 纯化后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.7 生物量及酶活性的测定: 生物量以菌体的干重表示, 将不同时间的发酵液于 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后, 用无菌水悬浮洗涤菌体 2 次, 菌体冻干至恒重, 称重。

将重组菌 *K. lactis*/pKLAC1-*AMPD* 和 *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 分别接种于 YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 测发酵液上清的 AMP 脱氨酶的酶活性。

1.2.8 摇瓶发酵的初步优化: (1) 不同碳源及碳源的添加量对重组菌产酶的影响。分别以 2%甘油、葡萄糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、玉米粉、可溶性淀粉、麸皮、马铃薯淀粉和糊精为碳源, 3%蛋白胨+酵母粉(2:1)为氮源。培养条件: 初始 pH 7.0, 种龄 44 h, 接种量为 2%, 装液量 50 mL/250 mL, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

分别以 0.5%–5.0%的葡萄糖为碳源, 3.0%蛋白胨+酵母粉(2:1)为氮源配制培养基, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

(2) 不同氮源及氮源的添加量对重组菌产酶的影响。以 2%的葡萄糖作为碳源, 分别以 3%蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉、酵母膏、牛肉膏、玉米浆、豆粕粉、棉籽粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 为单一氮源及蛋白胨+酵母膏(2:1)、蛋白胨+酵母粉(2:1)、蛋白胨+牛肉膏(2:1)、胰蛋白胨+酵母粉(2:1)、胰蛋白胨+酵母膏(2:1)为氮源, 在一定条件下进行摇瓶发酵 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

以 2%–6%的蛋白胨+酵母粉(2:1)为氮源配制培

培养基, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

(3) 不同无机盐及无机盐的添加量对重组菌产酶的影响。以 2%的葡萄糖作为碳源, 以 4%的蛋白胨+酵母粉(2:1)作为氮源, 分别向培养基中添加 2 g/L 的 NaCl 、 KCl 、 CaCl_2 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、柠檬酸钠、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 以不添加无机盐的培养基为对照, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

在优化好的碳氮源基础上, 分别添加不同浓度的 NaCl 及 KCl 配制培养基, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

(4) 不同金属离子及金属离子的添加量对重组菌产酶的影响。以 2%的葡萄糖作为碳源, 以 4%的蛋白胨+酵母粉(2:1)作为氮源, NaCl 浓度 12 g/L、 KCl 浓度 10 g/L, 分别向培养基中加入 0.5 g/L 的 FeCl_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 以不添加其他金属离子的培养基为对照, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

在优化好的碳氮源及无机盐的基础上, 向其中加入不同浓度的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 配培养基, 30 °C、200 r/min 培养 120 h, 对发酵液生物量和酶活进行测定。

(5) 正交实验。通过以上 5 种培养基成分的探究, 为了选择一个最佳的培养基组合, 进行了 5 因素 4 水平的正交实验。

2 结果与分析

2.1 密码子的优化

在氨基酸序列不变的前提下, AMP 脱氨酶基因共替换了 493 个碱基, G+C 含量由原来的 72.33%降低至 42.34%, 密码子的适应指数(CAI)由原来的 0.39 升高到 0.87, 当 CAI>0.8 时, 基因的表达水平较高, 优化后的基因序列 *opt-AMPD* 通过人工合成的方法获得, 优化后的基因序列和氨基酸序列如图 2 所示。

```

1  GCTCCACCACCTAGACAAGCAACCGCAGCAGAAGCAAGACAGATGCATATTTGAGATCCGTGAAAGATAGACCAGCAGCATTGAGAGCTTTCTTTAGACAATTACCAAAAGTGGAGAT
121  A P P P R Q A T A A E A R T D A Y L R S V K D R P A A L R A F F R Q L P K G G D
41  TTGCATAATCATTTATCTGGTGTCTGTCAACTGATTATTTGATAGAATTAGCTGCAGAAGATGGTTTGTGTTATGATGCAACCATGACTGCTGTTCATCTCCTTGTGGTCCAGGAACA
41  L H N H L S G A V S T D Y L I E L A A E D G L C I D A T M T A V P S P C G P G T
241  AGACCTGCTGCAGATGCTAGAACCGATAGAGCATTCCATGATGCTATTGTTAGAGCATGGTCAATGCAAGATTTTCACTGATGAAAACGGTCAATGATCTTTCTTTGATCTTTGGGA
81  R P A A D A R T D R A F H D A I V R A W S M Q D F P P D E N G H D H F F D T F G
361  AAGTTTGGAGAAGTGACATGGAGACATAGAGGTAATTTAGCACAAAGTCGCTGATACCGTTGTGGCTAACCAACCAATCTTACTTAGAAACAATGGTGACCCAGCTTCAGATGGAGCA
121  K F G E V T W R H R G K L L A Q V A D T V V A N N Q S Y L E T M V T P A S D G A
481  AAACAATTGGCTGATCAAGTCGGTTGGGATGCAGATTGACAGCTTTACATAGAAAATTGGCTGCAGGTGGAATTTGGATAAGTTAGTTGTCAGATGCTAGAAAGGAAGCTGATGATGGT
161  K Q L A D Q V G W D A D L T A L H R K L A A G G K L D K L V A D A R K E A D D G
601  GATGCAGAATTCAGAGCTACCGAACATTGTGGAAGCTGCAAGGCTAGAACAGATGTTGGTTGACAGTCAGATGGATTAGTCAAGCTTCCAGAGGTTCTTCACTGTTAGAGTGTTCACC
201  D A E F R A T E H C G T A K A R P A C G L T V R W I S Q A S R G S S P V R V F T
721  CAATTGGATTGGGTATGAGATTAGCAGAAGTGATTCTAGATTGTGCTGTAAATTTGGTCCAAACCAAGATTGGGATAGTTCCTTGGAAAACCTACTCATTGCAATGAGAATGGTC
241  Q L D L G M R L A E V D S R F V A V N L V Q P E D W D S S L E N Y S L Q M R M V
841  GGTATTAAAGAACCGTATACCCAAAGGCACATGTTACTTTCATGCTGGTGAATTTGTGCCAGGATTTGGTAAAGCTGAAGCTTTGAAGTTCCATATCGCAGAGCTGTTGATGTGGCA
281  G Y L R T V Y P K A H V T L H A G E L W P G L V K P E A L K F H I A E A V D V A
961  CATCTCAAGAGTTGGTCATGAGTCGATTGTTGATACATGAAGATAATTGGCAAGAACTGCTAGAACATGGTGCAGACAAATGCGAGTAGAAGCTCCATCTCTTCAACGCACAA
1081  ATATTAGTGTAAAGGAGCTGAACATCCTTTCACTACATACAGAAATACGGAGTACCGAGTCTGATTGGCTACTGATGATCTGGTGTAGTAGAATAGATATCTCCCATGAATACCAA
361  I L G V K G A E H P F T T Y R R Y G V P V L A T D D P G V S R I A V E A P F S S N A Q
1201  TAAGCTGACGATACATATGTTTGGGATACCCAGAAATTGAAGGATTAGCAAGAGCTAGTTTGAATATGCAATCTTACCTGGTCTTCTTGGCAAGGAAATCCACAGCACAAGGT
401  Y A A A T Y G L G Y P E L K D L A R A S L Q Y A F L P G A S L W Q G N P T A Q G
1321  TACCATCTGTTGAGCTTGTAGAGCTGAAAGACCGAGTCAACCTGTTTCATTGAGTGCATGTAGAAGATTGTTAGTGTAGTGAAGAGCTAGATTGGAATGGAGACAAGAAGCAGCA
441  Y H P V A A C R A E R P G Q P V H S V A C R R L L D G S A R A R L E W R Q E A A
1441  TTGCGAGCATTTGAAAGACCATGCAAGAGGATAA
481  F A A F E R A H A R G *

```

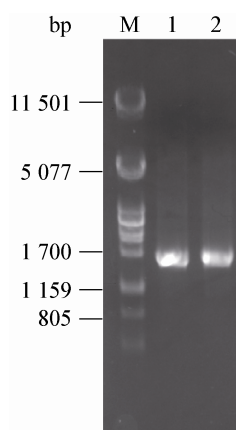
图2 优化后的 AMP 脱氨酶基因序列

Figure 2 The *opt-AMPD* gene sequence of optimized codons

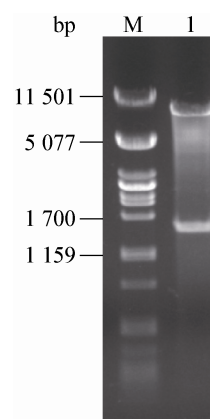
2.2 产 AMP 脱氨酶重组菌 *K. lactis* GG799 构建与表达

2.2.1 *opt-AMP* 脱氨酶的克隆与分析: *opt-AMP* 脱氨酶基因的扩增片段如图 3 所示, 在 1 159–1 700 bp 有单一条扩增片段, 与目的片段大小(1 476 bp)一致。

2.2.2 重组表达质粒 pKLAC1-*opt-AMPD* 的构建: 提取构建的质粒, 经 *Xho* I 和 *Kpn* I 双酶切验证, 如图 4 所示, pKLAC1 的大小为 9 046 bp, 目的基因的大小为 1 476 bp, 结果表明 *opt-AMPD* 已成功插入载体 pKLAC1 中。

图3 *opt-AMPD* 基因的 PCR 结果Figure 3 The PCR product of *opt-AMPD* gene

Note: M: Marker; 1, 2: *opt-AMPD* gene PCR product.

图4 重组载体 pKLAC1-*opt-AMPD* 酶切验证Figure 4 The enzymatic digestion of pKLAC1-*opt-AMPD*

Note: M: Marker; 1: Recombinant plasmid pKLAC1-*opt-AMPD* digested by *Xho* I and *Kpn* I.

2.2.3 重组菌 *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 阳性转化子的筛选及多拷贝的验证: 将筛选到的转化子, 以其染色体为模板, 利用整合引物 P1 和 P2、P2 和 P3 进行 PCR 扩增, 结果如图 5 所示。利用引物 P1 和 P2 扩增出 1.9 kb 的片段, *opt-AMPD* 成功整合进 *K. lactis* 染色体 DNA; 利用整合引物 P2 和 P3 能扩增出 2.3 kb 的片段, *opt-AMPD* 在 LAC4 位点的启动子区域发生多拷贝整合, 结果如图 6 所示。

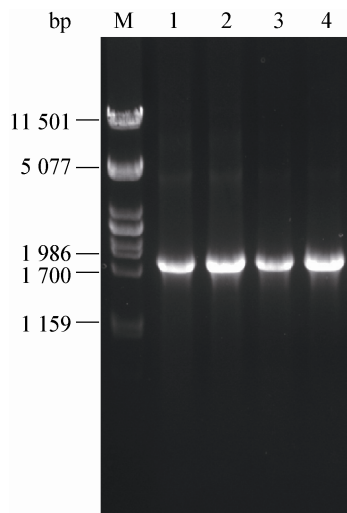


图 5 重组菌 *opt-AMPD* 基因整合验证

Figure 5 The integrated identification of recombinant *opt-AMPD* gene

注: M: Marker; 1: 以 *K. lactis*/pKLAC1 染色体为模板 PCR 结果; 2-4: 以 *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 染色体为模板引物 PCR 结果.

Note: M: Marker; 1: PCR product of *K. lactis*/pKLAC1; 2-4: PCR product of *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD*.

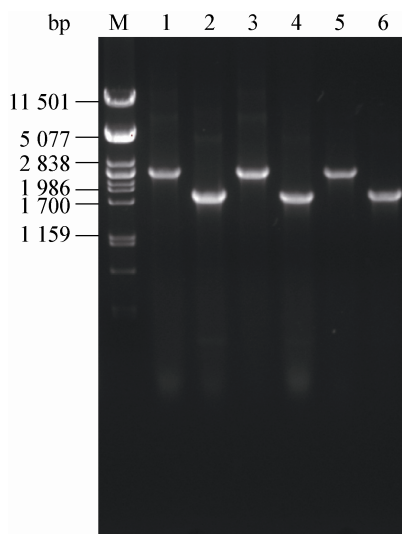


图 6 重组菌 *opt-AMPD* 基因多拷贝整合验证

Figure 6 The multiply integrated identification of recombinant *opt-AMPD* gene

注: M: Marker; 1, 3, 5: *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 以 P1 和 P2 为引物的 PCR 产物; 2, 4, 6: *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 以 P2 和 P3 为引物的 PCR 产物.

Note: M: Marker; 1, 3, 5: PCR product of *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* in P1 and P2; 2, 4, 6: PCR product of *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* in P2 and P3.

2.2.4 重组菌 *K. lactis* GG799/pKLAC1-*opt-AMPD* 表达产物的分析: 重组菌 *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 和 *K. lactis*/pKLAC1 发酵液上清经 His TrapTM HP 纯化后进行 SDS-PAGE 分析, 如图 7 所示。与重组菌 *K. lactis*/pKLAC1 相比, 重组菌 *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 经纯化后在 55 kD 和 70 kD 间有单一蛋白条带, 大小约为 60 kD, 而重组菌 *K. lactis*/pKLAC1 没有蛋白条带, *opt-AMPD* 在 *K. lactis* GG799 中得到有效的分泌表达。

2.2.5 重组菌 AMP 脱氨酶酶活测定: 对重组 AMP 脱氨酶的酶活测定结果如图 8 所示, 密码子优化前

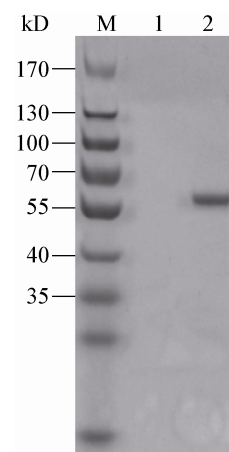


图 7 重组菌 *opt-AMPD* 的蛋白电泳图

Figure 7 SDS-PAGE analysis of *opt-AMPD* secreted by the recombinant strain

Note: M: Marker; 1: *K. lactis*/pKLAC1; 2: *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD*.

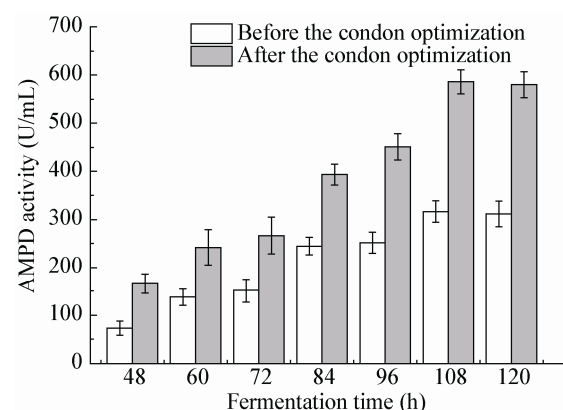


图 8 密码子优化后重组 AMP 脱氨酶酶活

Figure 8 The activity of AMP deaminase before and after Codon optimization

的 AMP 脱氨酶最高酶活为 316 ± 30 U/mL, 优化后的 AMP 脱氨酶最高酶活为 586 ± 40 U/mL, 酶活提高了 85%, AMP 脱氨酶的基因序列改变, 氨基酸序列没有发生改变, 经过密码子优化后提高了 AMP 脱氨酶在 *K. lactis* 的表达水平, 从而使酶活提高。

2.3 重组菌发酵培养基的优化

2.3.1 培养基碳源及碳源的添加量对重组菌产酶的影响:

碳源对重组菌产酶的影响如图 9 所示, 各种碳源对菌体的生长和产酶影响差异显著, 其中以甘油为碳源时, 菌体生长最好, 但是酶活不高; 以玉米粉、淀粉、糊精及麸皮为碳源时, 不利于菌体的生长和酶活性的提高。以葡萄糖、半乳糖和蔗糖为碳源时, 菌体生长和产酶较好, 其中以葡萄糖为碳源时, 酶活性最高。重组菌 *K. lactis*/pKLAC1-*opt-AMPD* 中 *opt-AMPD* 基因的表达受 LAC4 启动子的影响, 该启动子能被半乳糖和乳糖诱导, 但在缺少诱导物的条件下并不完全被抑制, 在以葡萄糖为碳源的培养基中仍可得到高效表达^[16]。因此, 选择葡萄糖作为培养基的碳源。

碳源浓度对重组菌产酶的影响如图 10 所示, 当碳源浓度较低时, 菌体量和酶产量均很低。随着碳源浓度的增加, 菌体量和产酶量逐渐增加, 但是酶的产量先升高后降低。当碳源浓度为 2% 时,

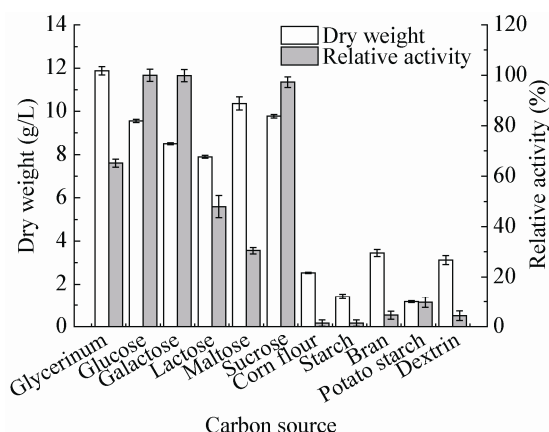


图 9 不同碳源对菌体生长和酶活的影响

Figure 9 The effect of different carbon sources on cell growth and activity of AMP deaminase

重组菌的酶活性最高达到 586 U/mL, 所以发酵培养基的碳源为 2%。

2.3.2 培养基氮源及氮源的添加量对重组菌产酶的影响:

氮源对重组菌产酶的影响如图 11 所示, 氮源为无机氮和粗放有机氮时, 不利于菌体的生长

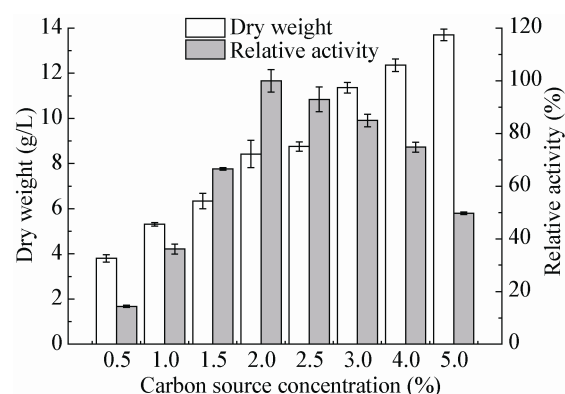


图 10 碳源浓度对重组菌生长及产酶的影响

Figure 10 The effect of carbon source concentration on cell growth and activity of AMP deaminase

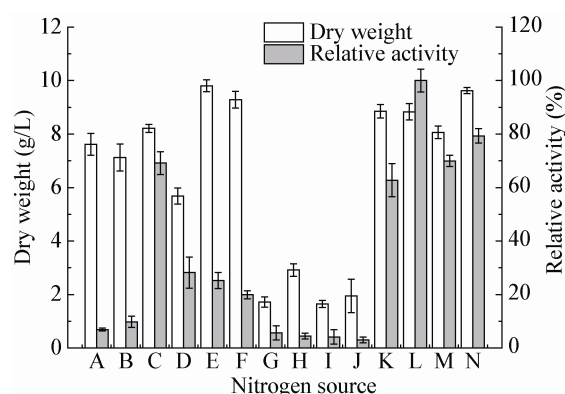


图 11 不同氮源对菌体生长和酶活的影响

Figure 11 The effect of different nitrogen sources on cell growth and activity of AMP deaminase

注: A: 牛肉膏(SCR); B: 胰蛋白胨(SCR); C: 酵母粉(OXOID); D: 蛋白胨(OXOID); E: 玉米浆; F: 酵母膏(SCR); G: 豆粕粉; H: 棉子粉; I: 硫酸铵; J: 硝酸钾; K: 蛋白胨(OXOID)+酵母膏(SCR); L: 蛋白胨(OXOID)+酵母粉(OXOID) (2:1); M: 蛋白胨(OXOID)+牛肉膏(SCR) (2:1); N: 胰蛋白胨(SCR)+酵母粉(OXOID) (2:1)。

Note: A: Beef extract (SCR); B: Tryptone (SCR); C: Yeast powder (OXOID); D: Tryptone (OXOID); E: Corn steep liquor; F: Yeast extract (SCR); G: Soybean meal; H: Cotton seed meal; I: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; J: KNO_3 ; K: Tryptone (OXOID)+Yeast extract (SCR) (2:1); L: Tryptone (OXOID)+Yeast powder (OXOID) (2:1); M: Tryptone (OXOID)+Beef extract (2:1); N: Tryptone (SCR)+Yeast powder (OXOID) (2:1).

和产酶；单一有机氮源中，酵母粉最有利于菌体的产酶，酵母粉可以提高蛋白的表达量。复合氮源条件下，以蛋白胨+酵母粉(2:1)为氮源时，酶活性最高，所以选蛋白胨+酵母粉(2:1)为发酵培养基的氮源。

如图 12 所示，随着氮源浓度的增加，对重组菌产酶有促进作用，当氮源的浓度高于 4% 时，对重组菌产酶有抑制作用，所以蛋白胨+酵母粉(2:1)的浓度为 4%，酶活达到 690 U/mL。

2.3.3 培养基无机盐及无机盐的添加量对重组菌产酶的影响：无机盐对重组菌产酶的影响如图 13 所示，无机盐中 NaCl、KCl 对菌体的产酶具有

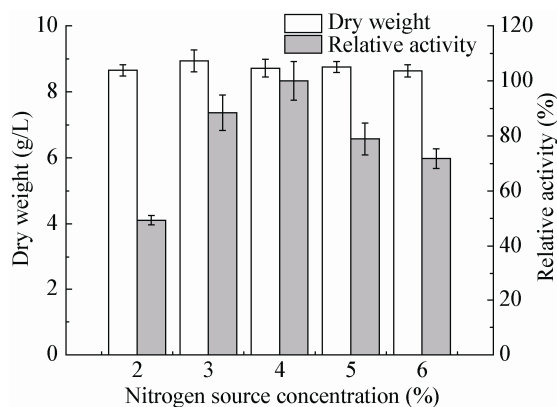


图 12 氮源浓度对重组菌生长及产酶的影响
Figure 12 The effect of nitrogen sources concentration on cell growth and activity of AMP deaminase

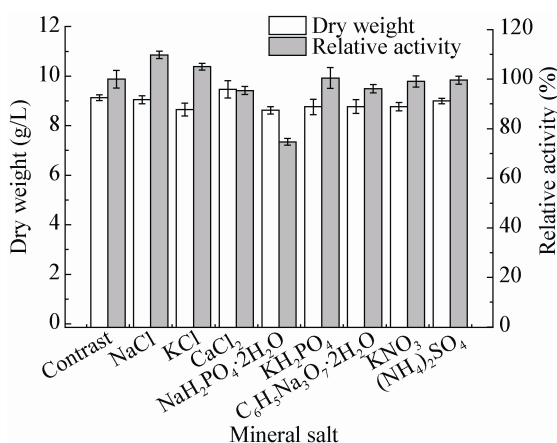


图 13 不同无机盐对菌体生长和酶活的影响
Figure 13 The effect of different mineral salt on cell growth and activity of AMP deaminase

促进作用，而此浓度的其他无机盐对产酶影响效果不显著。当 NaCl 浓度为 12 g/L 时酶活最高达 1 311 U/mL，KCl 浓度为 10 g/L 时酶活最高达到 1 104 U/mL，如图 14 和 15 所示，所以选择 NaCl 浓度 12 g/L 及 KCl 浓度 10 g/L。

2.3.4 培养基金属离子及金属离子的添加量对重组菌产酶的影响：金属离子对重组菌产酶的影响如图 16 所示，Mg²⁺对重组菌的产酶具有促进作用，Mg²⁺以离子的状态激活许多酶促反应；Fe³⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺对重组菌产酶具有明显的抑制作用。Mg²⁺的浓度对重组菌产酶有一定的影响，如图 17 所示，当 Mg²⁺的浓度为 2 g/L 的时候，重组菌的酶活性最高达到 1 540 U/mL。

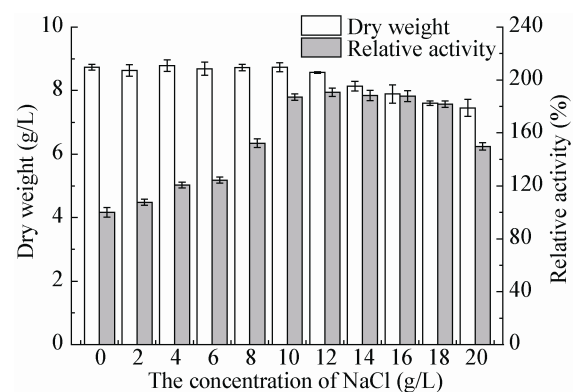


图 14 NaCl 浓度对重组菌生长及产酶的影响
Figure 14 The effect of NaCl concentration on cell growth and activity of AMP deaminase

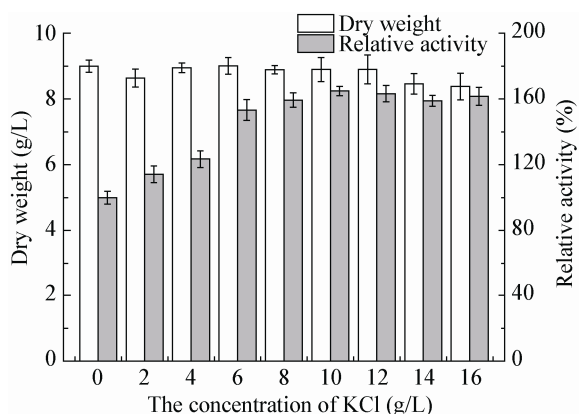


图 15 KCl 浓度对重组菌生长及产酶的影响
Figure 15 The effect of KCl concentration on cell growth and activity of AMP deaminase

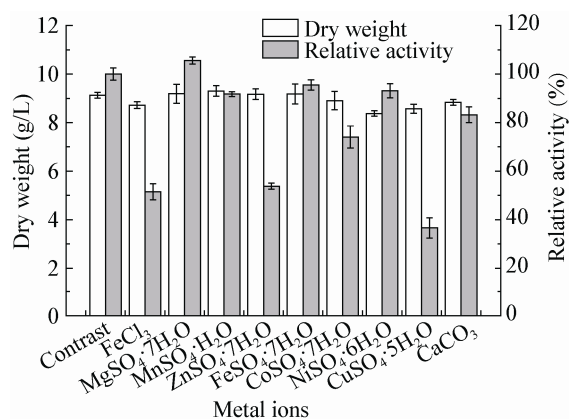
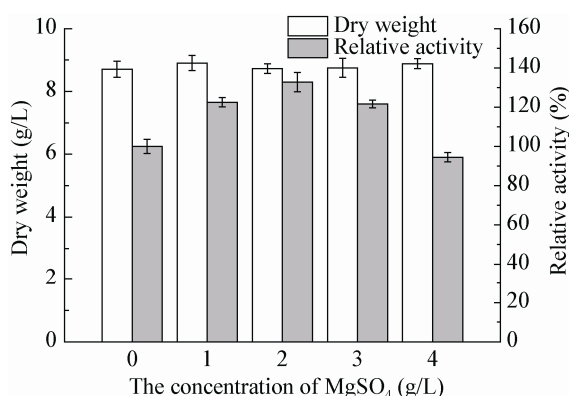


图 16 不同金属离子对菌体生长和酶活的影响

Figure 16 The effect of different metal ions on cell growth and activity of AMP deaminase

图 17 MgSO₄ 的浓度对重组菌生长及产酶的影响Figure 17 The effect of MgSO₄ concentration on cell growth and activity of AMP deaminase

2.3.5 正交实验：根据正交实验原理和发酵培养基单因素实验结果，采取 $L_{16}(5^4)$ 进行 5 因素 4 水平的正交实验，因素水平见表 3，正交实验结果见表 4。

由表 4 极差分析可知，各因素对重组菌发酵酶活的影响大小为：葡萄糖>MgSO₄>酵母粉>蛋白

胨>KCl>NaCl，得到最佳组合为 $A_3B_2C_2D_1E_3F_2$ 。

即各因素添加量葡萄糖为 40 g/L、蛋白胨为 20 g/L、酵母粉为 15 g/L、NaCl 为 8 g/L、KCl 为 10 g/L、MgSO₄ 为 2 g/L。根据正交实验所得出的最优培养基组合，对正交实验结果进行验证，重组菌酶活可达到 2100 ± 60 U/mL，比初始培养基(初始培养基酶活 586 U/mL)酶活提高了 2.6 倍。

4 讨论

目前通过固态发酵和液态发酵法生产 AMP 脱氨酶在产品纯度、酶稳定性、分离纯化等方面存在很多问题。本文针对 AMP 脱氨酶发酵存在的问题，对 AMP 脱氨酶在 *K. lactis* 组成型表达进行了研究。*K. lactis* 具有 FDA 认证的 GRAS (Generally regarded as safe) 地位，允许在多种食品和饲料中应用^[17]。*K. lactis* 生长旺盛，营养要求简单，能够利用廉价的底物进行高密度发酵和分泌大量蛋白，以及不产生内毒素和对人类安全的优点，作为异源蛋白表达的宿主优势很多^[18]。利用基因重组技术实现 AMP 脱氨酶在 *K. lactis* 的组成型表达，密码子优化提高 AMP 脱氨酶在 *K. lactis* 的表达水平，通过培养基优化，酶活可达 2100 ± 60 U/mL，酶活达到较高的水平。

目前，国内外对 AMP 脱氨酶酶学性质的研究还比较少，鼠灰链霉菌来源的 AMP 脱氨酶，最适温度为 60 °C，有良好的热稳定性，pH 稳定范围广，*K. lactis* 分泌的杂蛋白较少，重组 AMP 脱氨酶的分离纯化较容易，AMP 脱氨酶比酶活较高。在工业生产中，相对于叶炜等^[19]、刘军昌等^[15]、Morisaki 等^[5]其他来源的 AMP 脱氨酶优势较为明显。

表 3 正交实验设计表

Table 3 Table of orthogonal test design

因素	葡萄糖	蛋白胨	酵母粉	氯化钠	氯化钾	硫酸镁
Factor	Glucose (g/L)	Tryptone (g/L)	Yeast extract (g/L)	NaCl (g/L)	KCl (g/L)	MgSO ₄ (g/L)
1	20	10	10	8	6	1
2	30	20	15	10	8	2
3	40	30	20	12	10	3

表 4 正交实验结果表
Table 4 The results of orthogonal experiment

实验 Test	A 葡萄糖 Glucose	B 蛋白胨 Tryptone	C 酵母粉 Yeast extract	D 氯化钠 NaCl	E 氯化钾 KCl	F 硫酸镁 MgSO ₄	G 空列 Empty	AMPD 酶活 AMPD activity (U/mL)
1	1	1	1	1	1	1	1	1 155
2	1	2	2	2	2	2	2	1 785
3	1	3	3	3	3	3	3	890
4	2	1	1	2	2	3	3	860
5	2	2	2	3	3	1	1	2 050
6	2	3	3	1	1	2	2	1 885
7	3	1	2	1	3	2	3	2 165
8	3	2	3	2	1	3	1	1 675
9	3	3	1	3	2	1	2	1 800
10	1	1	3	3	2	2	1	1 335
11	1	2	1	1	3	3	2	1 215
12	1	3	2	2	1	1	3	1 310
13	2	1	2	3	1	3	2	1 520
14	2	2	3	1	2	1	3	1 850
15	2	3	1	2	3	2	1	1 785
16	3	1	3	2	3	1	2	2 145
17	3	2	1	3	1	2	3	1 805
18	3	3	2	1	2	3	1	1 575
k ₁	1 281.66	1 530.00	1 436.66	1 640.83	1 558.33	1 718.33	595.83	
k ₂	1 658.33	1 730.00	1 734.16	1 593.33	1 534.16	1 793.33	725.00	
k ₃	1 860.83	1 540.83	1 630.00	1 566.66	1 708.33	1 289.16	480.00	
R	579.16	200.00	297.50	74.16	174.16	504.16	245.00	

虽然利用基因重组技术构建重组菌生产 AMP 脱氨酶明显优于野生型菌株，但是离规模化生产仍有一定的距离，当粗酶液的酶活能够大于 10 000 U/mL 时具有工业生产的价值，接下来可通过发酵工艺优化来提高酶活，为 AMP 脱氨酶的规模化生产提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Marquetant R, Sabina RL, Holmes EW. Identification of a noncatalytic domain in AMP deaminase that influences binding to myosin[J]. Biochemistry, 1989, 28(22): 8744-8749

[2] Merkler DJ, Wali AS, Taylor J, et al. AMP deaminase from yeast. role in AMP degradation, large scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(35): 21422-21430

[3] Chapman AG, Atkinson DE. Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(23): 8309-8312

[4] Sato Y, Horinouchi S, Ohnishi Y. Characterization of a thermostable adenosine 5'-monophosphate deaminase gene in *Streptomyces murinus*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(1): 65-70

[5] Morisaki H, Morisaki T. AMPD genes and urate metabolism[J]. Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, 2008, 66(4): 771-777

[6] Morisaki T, Gross M, Morisaki H, et al. Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(14): 6457-6461

[7] Wilchek M, Bayer EA. Methods in Enzymology[M]. San Diego, CA: Academic, 1990

[8] Yoshimune K, Kugimiya K, Moriguchi M. Purification and characterization of a flavour-enhancing enzyme, thermostable adenosine-phosphate deaminase, from thermophilic *Aspergillus fumigatus* No.4[J]. Annals of Microbiology, 2005, 55(4): 267-272

[9] Ye W, Tian LM, Zhao J, et al. Optimization of medium components for AMP deaminase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(5): 16-20 (in Chinese)

叶炜, 田吕明, 赵劫, 等. 响应面法优化米曲霉产 AMP 脱氨酶的培养基[J]. 食品科技, 2012, 37(5): 16-20

- [10] Pu WM, Ding HS, Tao YQ. Selection of AMP-deaminase-producing strain and studies on fermentation ecology[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences), 1994, 16(2): 184-188 (in Chinese)
普为民, 丁骅孙, 陶元器. 5'-腺苷酸脱氨酶产生菌选育及发酵生态学研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1994, 16(2): 184-188
- [11] Mei GM, Guo YM, Rao SQ, et al. Screening of high-yield 5'-AMP deaminase strains from natural fermented sufu[J]. China Brewing, 2013, 32(8): 30-34 (in Chinese)
梅光明, 郭远明, 饶胜其, 等. 源于自然发酵腐乳中 5'-AMP 脱氨酶高产菌株的筛选[J]. 中国酿造, 2013, 32(8): 30-34
- [12] Liu JC, Duan ZY, Shen MS, et al. Production of AMP deaminase by solid-state fermentation[J]. Industrial Microbiology, 2002, 32(1): 36-39, 42 (in Chinese)
刘军昌, 段作营, 沈梅生, 等. 固态发酵生产腺苷酸脱氨酶[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 36-39, 42
- [13] Fang W, Zhang L, Gu ZH, et al. Constitutive expression of AMP deaminase from *Streptomyces murinus* in *Pichia pastoris* GS115 using the GAP promoter[J]. Microbiology China, 2014, 41(10): 2022-2028 (in Chinese)
方伟, 张梁, 顾正华, 等. 用 GAP 启动子在 *Pichia pastoris* GS115 中组成型表达鼠灰链霉菌腺苷酸脱氨酶[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10): 2022-2028
- [14] Guo ZT, Zhang L, Li YR, et al. Expression of adenosine deaminase in recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Food Science, 2015, 36(21): 135-139 (in Chinese)
郭自涛, 张梁, 李由然, 等. 重组枯草芽孢杆菌分泌表达腺苷酸脱氨酶[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 135-139
- [15] Liu JC, Duan ZY, Mao ZG. An improved method of determination of adenylate deaminase activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27(7): 30-33 (in Chinese)
刘军昌, 段作营, 毛忠贵. AMP 脱氨酶活性测定的一种改进方法[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(7): 30-33
- [16] Madinger CL, Sharma SS, Anton BP, et al. The effect of carbon source on the secretome of *Kluyveromyces lactis*[J]. Proteomics, 2009, 9(20): 4744-4754
- [17] van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(3): 381-392
- [18] Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 22
- [19] Ye W, Tian LM, Yao J, et al. Study on the biochemical characteristics of AMP deaminase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(1): 164-166, 179 (in Chinese)
叶伟, 田吕明, 姚鹃, 等. AMP 脱氨酶的生化性质研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 164-166, 179

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

