

研究报告

蜡样芽孢杆菌胶原酶基因 *colR75E* 在毕赤酵母中的重组表达

张真 李晔 张西轩 胡双艳 阮海华*

(天津市食品生物技术重点实验室 天津商业大学生物技术与食品科学学院 天津 300134)

摘要:【目的】利用毕赤酵母真核表达系统表达蜡样芽孢杆菌胶原酶 *ColR75E*, 寻找一种安全、稳定的方式体外制备具有高活性的胶原酶。【方法】以蜡样芽孢杆菌 *R75E* 基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 法扩增胶原酶 *colR75E* 基因, 构建 pPICZαA/*colR75E* 重组质粒, 将该质粒线性化后电转化至毕赤酵母 X-33 菌株, 诱导其表达并对表达条件进行优化。将表达后的酵母发酵液上清通过硫酸铵沉淀、脱盐处理及亲和层析纯化步骤获得高纯度重组 *ColR75E* 胶原酶。利用胶原酶活力测定、SDS-PAGE 电泳、胶原酶谱、I 型胶原蛋白及不同底物蛋白降解产物电泳等方法对重组胶原酶 *ColR75E* 的活性及底物特异性进行分析。【结果】毕赤酵母中最佳表达重组胶原酶 *ColR75E* 的条件为 pH 6.0, 甲醇终浓度为 2.5%, 诱导时间 72 h, 诱导后的蛋白经 SDS-PAGE、胶原酶谱以及 I 型胶原蛋白降解产物电泳分析发现, 毕赤酵母中表达的重组胶原酶分子量符合预期, 蛋白纯度超过 95%, 具有较好的胶原蛋白水解活性并测得其比活力为 4.977 U/mg。该酶对 I 型胶原蛋白表现出较好的专一性, 但是对牛血清白蛋白、酪蛋白及溶菌酶蛋白没有水解活性。【结论】利用毕赤酵母真核表达系统能够获得高活性的蜡样芽孢杆菌胶原酶 *ColR75E*, 为该胶原酶广泛应用于医疗、食品等工业领域奠定了理论和方法基础。

关键词: 蜡样芽孢杆菌, 胶原酶, 毕赤酵母, I 型胶原蛋白

Recombinant expression of *Bacillus cereus* collagenase *colR75E* in *Pichia pastoris*

ZHANG Zhen LI Ye ZHANG Xi-Xuan HU Shuang-Yan RUAN Hai-Hua*

(Tianjin Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China)

Abstract: [Objective] In order to find a safe and stable method to produce collagenase *in vitro*, we expressed the *Bacillus cereus* collagenase *colR75E* in *Pichia pastoris*. [Methods] With the *Bacillus cereus* genomic DNA as template, we successfully amplified the collagenase *colR75E* DNA fragment by PCR and cloned it into pPICZαA plasmid. The pPICZαA/*colR75E* recombinant plasmid was

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31540066, 81101220); Tianjin Young Backbone Talents Supporting Project; Tianjin Innovation Team Building Project (No. TD12-5049)

*Corresponding author: Tel: 86-22-26686254; E-mail: ruanhaihua@tjcu.edu.cn

Received: May 03, 2016; Accepted: June 03, 2016; Published online (www.cnki.net): June 28, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31540066, 81101220); 天津市中青年骨干创新人才支持计划项目; 天津市创新团队建设项目(No. TD12-5049)

*通讯作者: Tel: 86-22-26686254; E-mail: ruanhaihua@tjcu.edu.cn

收稿日期: 2016-05-03; 接受日期: 2016-06-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-28

lineared with *Sac* I, and then the lineared plasmid was transformed into *Pichia pastoris* X-33 competent cell in order to integrate the inducible AOX1 promoter controlled *colR75E* fragment into *Pichia pastoris* X-33 genomic DNA. The successfully integrated *Pichia pastoris* X-33 strains was cultured and induced by methanol addition. To acquire the highest production, the optimized conditions for ColR75E collagenase expression in *Pichia pastoris* X-33 were investigated here. After induction, we purified recombinant ColR75E collagenase in supernatant sequentially by ammonium sulfate precipitation, desalting and affinity capture. Finally, the recombinant collagenase ColR75E was analyzed by catalytic activity assay, SDS-PAGE, zymography, type I collagen proteolysis and substrate specificity assay. **[Results]** The highest level of collagenase ColR75E induction was gained under pH 6.0 for 72 hours incubation by 2.5% methanol. As expected, the molecular weight of the recombinant collagenase is nearly 110 kD to ColR75E. The results of zymography and type I collagen degradation analysis uncovered that the recombinant collagenase ColR75E had an excellent collagen proteolysis activity. Its specific activity after purification reached to nearly 4.977 U/mg under standard conditions. The recombinant collagenase ColR75E exhibited specific proteolysis to type I collagen, but not to BSA, Casein or Lysozyme. **[Conclusion]** *Pichia* eukaryotic expression system is suitable for the expression of *Bacillus cereus* collagenase ColR75E, which supplied a good basement both for its subsequent theoretic research and industrial exploitation.

Keywords: *Bacillus cereus*, Collagenase, *Pichia pastoris*, Type I collagen

胶原酶(Collagenase)指的是在生理 pH 与温度条件下特异性降解胶原纤维的一类蛋白酶^[1-2]。目前已知的胶原酶按照来源可分为微生物胶原酶和动物胶原酶两大类,主要应用于食品与饲料的加工、化妆品以及药物的合成与加工领域。其中,微生物胶原酶以底物范围广、酶切位点多、生产成本低等优点得到了更加广泛的应用^[3]。例如,在食品工艺中微生物胶原酶可作为肉类嫩化剂^[4];在医疗中微生物胶原酶可作为骨质增生类疾病的治疗药物等^[5]。目前,溶组织梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticum*)产的胶原酶 G (Collagenase G, ColG)应用最广泛,研究背景最清楚^[6]。但这些胶原酶产品多为梭状芽孢杆菌培养物直接冻干而得,其成分复杂、纯度普遍较低,限制了胶原酶产品的应用范围。因此,获得高纯度的胶原酶将具有重要的理论及工业应用价值。

Nagano 等^[7]在 2000 年建立了一种利用四步柱层析法从枯草芽孢杆菌 FS-2 (*Bacillus subtilis* FS-2)中纯化胶原酶的方法,但这种方法工艺复杂,且最终得到的胶原酶比活力只有 0.71 U/mg,比活力偏低。本实验室在前期研究中筛选到一株产胶原酶的蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* R75E,克隆到编

码该胶原酶蛋白的基因 *colR75E* (GenBank 登录号: KP987200)^[8],序列全长 2 898 bp,其与胶原酶 ColG 具有 69%的一致性,同属于 I 型胶原酶^[8-9],因其具有良好的温度及酸碱稳定性而具有很强的工业应用价值^[9]。李晔等^[10]建立了从该菌中获得高纯度胶原酶 ColR75E 的方法,虽然该方法较 Nagano 等^[7]的方法简化了步骤,但依旧需要采用柱层析的方法,其配套的层析设备复杂而昂贵^[11],不适合大规模工业生产;张西轩等^[9]将 ColR75E 在大肠杆菌中表达并获得比活力较高的胶原酶产品。但是,利用大肠杆菌原核表达系统制备外源蛋白的过程中存在毒力蛋白、内毒素等对人体健康存在威胁的物质;同时,表达所得的外源蛋白易形成包涵体,不仅给后续的纯化带来困难,还会造成胶原酶的失活,限制了大肠杆菌所产胶原酶在食品以及药品领域的应用。基于此,本文采用巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统表达生产胶原酶 ColR75E,该表达系统具有继代稳定、可以高密度发酵、在发酵过程中无毒素分泌、自身分泌的杂蛋白少、外源蛋白表达量高以及分泌型表达等优点,而且有利于产物的纯化,非常适宜扩大为工业规模^[12-15]。为获得能够直接应用于食品工业

等领域的无毒性胶原酶 ColR75E 的生产提供材料基础与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 蜡样芽孢杆菌 R75E (*Bacillus cereus* R75E)由本实验室分离、鉴定并保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC), 保藏编号为 CGMCC 8614。感受态大肠杆菌 Trans10 及毕赤酵母 X-33 菌株均购自美国 Promega 公司; 原核表达载体 pET28a 及真核表达载体 pPICZαA 均购自德国 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 博来霉素(Zeocin), 美国 Invitrogen 公司; KOD DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Dpn* I 等, 大连 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、酵母基因组提取试剂盒、DNA marker, 天根生化科技(北京)有限公司; 蛋白预染 Marker, 立陶宛 Fermentas 公司; 牛跟腱来源的 I 型胶原蛋白、牛血清白蛋白, 美国 Sigma-Aldrich 公司。

PCR 仪、电转化仪, 美国伯乐公司; 超净工作台、生化培养箱, 哈尔滨东联电子; 紫外分光光度仪, 日本岛津公司。

引物合成以及 DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成。LB、YPD、BMGY、BMMY 培养基均按照美国 Invitrogen 公司操作手册推荐方法自行配制。其中, BMGY 培养基: 1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸钾(pH 6.0), 1.34%无氨基酵母氮源, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 1%甘油; BMMY 培养基: 将 BMGY 培养基中 1%甘油替换为 1%无水甲醇。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 *colR75E* 基因: 用 SignalP 4.0 Server 软件分析 *colR75E* 胶原酶基因(GenBank 登录号: KP987200)的 DNA 全序列, 去除 *colR75E* 基因 N 端信号肽序列(1–30 位氨基酸), 设计 *colR75E-Xho* I-F 和 *colR75E-Not* I-R 引物对, 序列见表 1。其中下划线所示部分为 *Xho* I 和 *Not* I 的酶切位点, 上

表 1 本实验中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'→3')
<i>colR75E-Xho</i> I-F	CGCCTCGAG AAAAGA GAAGAAAAAG TACCGTATAACGTG
<i>colR75E-Not</i> I-R	CGCGCGGCCGCTCATTTTACTGACAA TTCGTATGTTCC
1267-F	GTAAAGGCACAGTATCACCG
2013-R	TCATAGGCAACGTATCACTA

游引物中斜体的 ~~AAAAGA~~ 为 pPICZα 系列载体 α 分泌因子的 KEX2 切割位点。以蜡样芽孢杆菌 R75E 的 gDNA 为模板进行 PCR 扩增, 50 μL PCR 扩增体系: 5 μL 10×Buffer, 100 ng 模板 DNA, 终浓度 0.2 mmol/L 的 dNTPs, 终浓度 0.2 mmol/L 的上下游引物, 2.5 U DNA 聚合酶, 最后加入去离子水补充至 50 μL。扩增条件: 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 68 °C 3 min, 共 30 个循环。PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 酵母表达载体的构建: 利用 DNA 片段回收试剂盒回收 PCR 产物, 用 *Xho* I 和 *Not* I 对 PCR 产物和 pPICZαA 质粒分别进行双酶切, 连接, 转化至大肠杆菌 Trans10 感受态细胞中, 用 LB 平板(内含 Zeocin, 25 mg/L)进行转化子筛选。挑取转化子至 LB 液体培养基中(内含 Zeocin, 25 mg/L), 37 °C 培养 16 h, 提取质粒 DNA, 并用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 筛选 pPICZαA/*colR75E* 重组质粒。将酶切验证后的质粒进行测序验证。

1.2.3 重组质粒的电转化: (1) 制备毕赤酵母 X-33 的感受态细胞: 将活化后的毕赤酵母 X-33 菌株接种到 20 mL YPD 培养基中, 在 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 1.3–1.5 之间。于 4 °C、1 500 r/min 离心 20 min 收集菌体, 依次用 10 mL 预冷的无菌水和 2 mL 预冷的山梨醇(1 mol/L)溶液洗涤菌体, 将所得菌体悬浮于 200 μL 预冷的山梨醇(1 mol/L)溶液中, 即为电转化感受态酵母细胞。(2) 重组质粒的电转化: 用限制性内切酶 *Sac* I 对重组载体 pPICZαA/*colR75E* 进行线性化处理, 取 2 μL 线性化质粒与 98 μL 感受态细胞悬液混匀, 转入预冷的

0.2 cm 电转杯中,冰上放置 5 min 后设置电压为 1.5 kV,电击 5.4 ms。电击结束后,迅速向杯内加入 1 mL 预冷的山梨醇(1 mol/L),混匀后转入离心管中,30 °C 孵育 1 h,取 200 μ L 涂布于 YPD (内含 Zeocin, 100 mg/L)平板上,30 °C 倒置培养 2 d 至出现白色转化子。

1.2.4 胶原酶 ColR75E 在毕赤酵母中的异源表达: (1) 阳性克隆的鉴定:待转化的 YPD 平板上长出菌落后,用灭菌牙签在 YPD 平板上挑取若干个酵母单菌落,分别接种至 YPD (含 Zeocin, 100 mg/L)液体培养基中,在 30 °C、200 r/min 培养约 24 h 后,室温 12 000 r/min 离心 3 min 分离酵母菌体,提取酵母基因组 gDNA。选择 *colR75E* 基因内部引物 1267-F 和 2013-R (表 1),以酵母基因组 gDNA 为模板,按照 1.2.1 的条件进行 PCR 扩增以鉴定重组子。(2) 重组酵母的诱导表达:将 PCR 鉴定成功的菌株,从相对应的 YPD 平板上挑出,接种于 5 mL YPD 液体培养基中(内含 Zeocin, 100 mg/L),30 °C、200 r/min 培养过夜。将过夜培养物按照 1% (体积比)的接种量接种于 20 mL BMGY 培养基中,30 °C、200 r/min 培养 16–20 h 直至 OD_{600} 为 2.0–6.0 之间。室温下 6 000 r/min 离心 5 min 收集酵母菌体,然后用 BMMY 培养基重悬菌体至 OD_{600} 为 1.0 左右。继续于 28 °C、200 r/min 诱导培养,其中每隔 24 h 加 100% 甲醇至终浓度为 1%,72 h 后将甲醇诱导后的酵母菌液取 50 mL 以 5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为胶原酶液。

1.2.5 诱导表达条件优化:将重组酵母菌转入培养基中诱导培养后,为提高胶原酶的表达量,分析诱导时间、甲醇浓度与 pH 3 个因素对菌株产酶的影响,通过 1.2.8 中的方法测定粗酶液中胶原酶的活力,优化诱导表达条件。

(1) 诱导时间对重组胶原酶表达的影响:重组酵母菌转入 BMMY (pH 6.0)诱导培养后,每 24 h 追加终浓度 1% 甲醇(体积比),分别于诱导 12、24、36、48、60、72、96 h 后,各取 1 mL 样品,室温 12 000 r/min 离心 3 min 收集表达上清,测定胶原酶

活力。

(2) 甲醇浓度对重组胶原酶表达的影响:重组酵母菌诱导 24 h 后,按 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的终浓度追加甲醇(体积比),于 72 h 后室温 12 000 r/min 离心 3 min 收集表达上清,测定胶原酶活力。

(3) pH 对重组胶原酶表达的影响:用 H_3PO_4 或 KOH 调节磷酸盐缓冲液的 pH,将 BMMY 培养液的 pH 分别调节为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0。重组酵母菌在不同 pH 的 BMMY 培养液中表达 72 h 后,室温 12 000 r/min 离心 3 min 收集表达上清,测定胶原酶活力。

1.2.6 重组胶原酶蛋白的纯化:利用优化后的诱导条件进行胶原酶的诱导表达,将所得胶原酶液中加入硫酸铵粉末至饱和度为 80%,在 0 °C 条件下沉淀过夜,次日 12 000 r/min 离心 20 min 后用 20 mmol/L PBS (含 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, pH 7.4)缓冲液重悬细胞沉淀,在冰水浴中超声破碎,12 000 r/min 离心 30 min 后取上清,脱盐处理后进行 His 标签亲和层析 Ni-NTA 纯化,以备测定纯化后的胶原酶的活力。

1.2.7 重组胶原酶 SDS-PAGE 检测及胶原酶谱检测:将得到的胶原酶液分别采用 SDS-PAGE 电泳及胶原酶谱法检测目标胶原酶蛋白^[16]。其中胶原酶谱法是在明胶酶谱法的基础上改进的,即在聚丙烯酰胺凝胶中加入 0.1% 的 I 型胶原蛋白,电泳结束后,含有目标胶原酶的凝胶经过复性、染色、脱色,目标胶原酶呈现负染条带^[17]。

1.2.8 胶原酶的活力测定:胶原酶活力测定采用通用的 Mandl 测定方法^[18]。该方法中将 1 个活力单位(U)定义为:每毫升胶原酶与牛跟腱来源的 I 型胶原蛋白在 37 °C、pH 7.4 的条件下反应,在 5 h 内每生成 1 mol 游离氨基酸即对应 1 个活力单位(1 U)。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准品。

1.2.9 重组胶原酶底物特异性研究:为了分析重组胶原酶对 I 型胶原蛋白的降解作用,采用胃蛋

白酶提取法提取草鱼鱼鳞中的 I 型胶原蛋白^[19], 按照 40:1 的体积比将提取得到的 I 型胶原蛋白溶液 (1 g/L) 与 ColR75E 酶液 (62.14 mg/L) 混合, 置于 37 °C 条件下进行反应, 并在不同的时间点取样。将取得的样品进行浓度为 10% 的 SDS-PAGE 电泳检测, 观察草鱼鱼鳞 I 型胶原蛋白的降解情况。

在此基础上进行重组胶原酶底物特异性分析, 在 37 °C 条件下将纯化后的胶原酶分别与胶原蛋白、酪蛋白、牛血清蛋白和溶菌酶进行反应, 同时设置阴性对照, 待反应结束后取样进行 SDS-PAGE 电泳检测底物蛋白的降解情况。

2 结果与分析

2.1 毕赤酵母表达载体的构建

以蜡样芽孢杆菌 R75E 基因组 gDNA 为模板, 经 PCR 扩增得到分子量为 2 800 bp 左右的 DNA 片段, 如图 1A 所示, 该片段大小与预期的 *colR75E* 基因片段 (2 831 bp) 相吻合, 表明 PCR 扩增成功。将该 PCR 片段酶切连接后获得转化子, 挑取转化子提取质粒并进行酶切鉴定。结果如图 1B 所示:

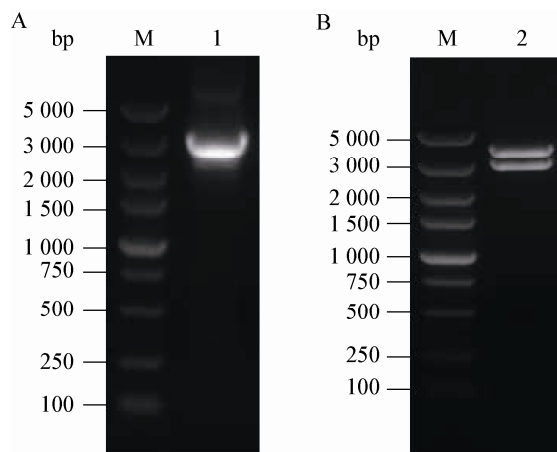


图1 *colR75E* 基因 PCR 扩增产物电泳图(A)及重组质粒 pPICZαA/*colR75E* 双酶切鉴定图(B)

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *Bacillus cereus colR75E* PCR products (A) and recombinant pPICZαA/*colR75E* plasmid cut with *Xho*I and *Not*I (B)

注: M: DNA 分子量标准; 1: PCR 产物; 2: 重组质粒双酶切产物。

Note: M: DNA marker; 1: PCR products; 2: Products of recombinant pPICZαA/*colR75E* plasmid cut with *Xho*I and *Not*I.

转化子质粒经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切后得到两条条带, 一条为 pPICZαA 质粒片段, 其分子量为 3.6 kb; 另一条与目的基因 *colR75E* 片段大小 (2 831 bp) 相符, 获得阳性重组质粒 pPICZαA/*colR75E*。将该质粒进行测序验证后显示 *colR75E* 基因序列正确。

2.2 重组质粒片段整合至毕赤酵母基因组

用 *Sac*I 对获得的重组质粒 pPICZαA/*colR75E* 进行线性化处理, 电转化至毕赤酵母 X-33 感受态细胞, 用含 100 mg/L Zeocin 的 YPD 培养基筛选阳性转化子。随机挑取 6 个阳性转化子提取基因组 gDNA。分别以 gDNA 作为模板, 利用 *colR75E* 特异性引物 1267-F 和 2013-R (表 1) 进行 PCR 鉴定。若重组质粒 pPICZαA/*colR75E* 整合至酵母基因组上, 理论上应该扩增出分子量大小约为 750 bp 的 DNA 片段; 若整合失败, 则无法扩增出 750 bp 的 DNA 片段。从图 2 结果可以看出, 挑取的 6 个阳性转化子均扩增出约 750 bp 的片段, 与预期的片段大小相符。表明线性化的 pPICZαA/*colR75E* 整合至毕赤酵母 X-33 菌株的基因组中。

2.3 重组胶原酶的诱导表达及条件优化

2.3.1 重组胶原酶的诱导表达: 按照 1.2.4 中的方法将重组胶原酶在毕赤酵母中进行诱导表达, 收集酵母菌培养液上清进行胶原酶蛋白以及胶原酶凝胶酶谱分析。结果如图 3A 所示, 将培养液上清进行 SDS-PAGE 电泳分析后发现, 与未加甲醇诱导

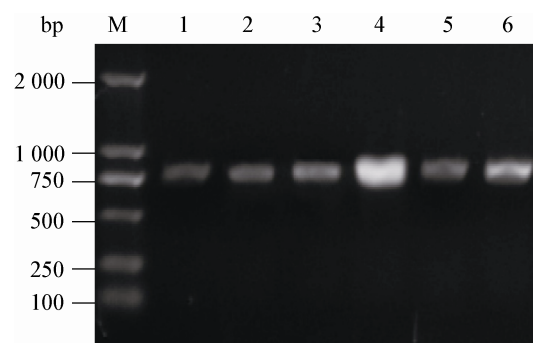


图2 线性化 pPICZαA/*colR75E* 质粒片段整合至毕赤酵母 X-33 基因组的 PCR 鉴定

Figure 2 PCR identification of linear pPICZαA/*colR75E* integration into *Pichia pastoris* X-33 genomic DNA

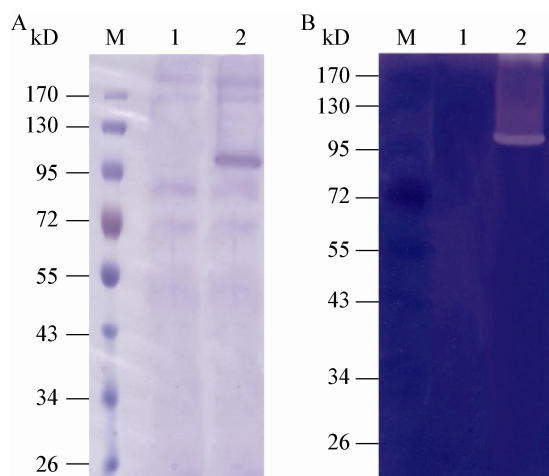


图3 重组胶原酶 ColR75E 表达的 SDS-PAGE (A)以及胶原酶谱(B)分析

Figure 3 Determination of expressed ColR75E collagenase by SDS-PAGE (A) and zymography (B)

注：M：蛋白质分子量标准；1：未经甲醇诱导的酶液；2：经甲醇诱导的酶液。

Note: M: Protein marker; 1: Precipitated protein from supernatant of *Pichia pastoris* X-33 fermentation without induction by methanol; 2: ColR75E collagenase containing precipitated protein from supernatant of *Pichia pastoris* X-33 induced by methanol.

剂的样品相比较，经 1% 甲醇诱导后有一条显著表达的蛋白，分子量约为 110 kD。经计算，该蛋白的分子量与预期的胶原酶分子量相符；与此同时，利用胶原酶谱法检测了该蛋白的 I 型胶原蛋白降解活性。结果发现，在相同分子量的部位呈现一条明显的负染条带(图 3B)。表明 SDS-PAGE 电泳中检测到的分子量接近 110 kD 的蛋白即为毕赤酵母 X-33 经甲醇诱导后分泌表达的胶原酶。

2.3.2 重组胶原酶诱导表达条件的优化：选取诱导时间、甲醇浓度和 pH 3 个因素进行条件优化，结果如下：(1) 诱导时间：如图 4A 所示，诱导的前 40 h，胶原酶的活力呈线性增加；随着诱导表达时间的继续延长，虽然活力增加的幅度略有下降，但整体酶活力仍呈逐渐上升的趋势，直至 72 h 达到最大。由此表明：重组酵母表达胶原酶的最佳诱导时间为 72 h。(2) 甲醇浓度：如图 4B 所示，重组酵母菌诱导过程每 24 h 补加一

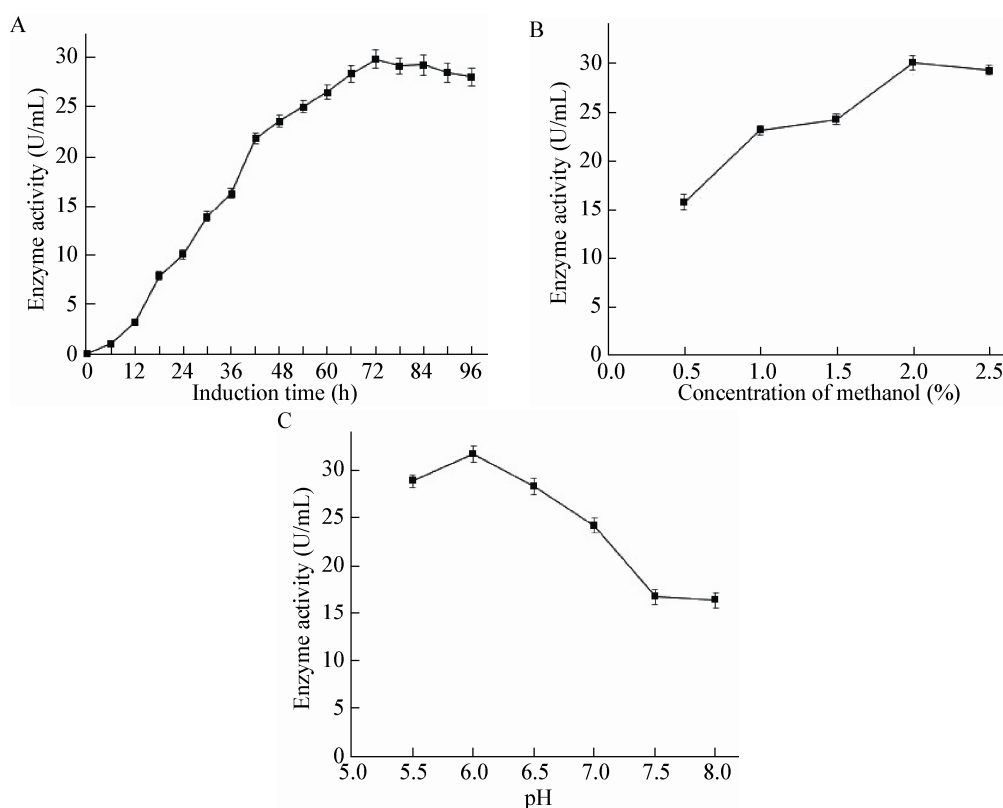


图4 诱导时间(A)、甲醇浓度(B)和 pH (C)对重组胶原酶 ColR75E 表达的影响

Figure 4 Effects of induction time (A), methanol concentration (B) and pH (C) on the expression of recombinant ColR75E in *Pichia pastoris* X-33

表 2 $L_9(3^4)$ 优化重组酵母表达胶原酶条件的试验结果
Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal test of fermentation conditions for collagenase production from *Pichia pastoris* X-33

试验号 Number	A 诱导时间 A Induced time (h)	B 甲醇浓度 B Concentration of methanol (%)	C pH	D 空列 D Vacant column	酶活力 Enzyme activity (U/mL)
1	1(58)	1(1.5)	1(5.5)	1	16.04
2	1	2(2.0)	2(6.0)	2	17.71
3	1	3(2.5)	3(6.5)	3	15.21
4	2(72)	1	2	3	28.87
5	2	2	3	1	20.53
6	2	3	1	2	24.76
7	3(96)	1	3	2	18.86
8	3	2	1	3	22.20
9	3	3	2	1	25.15
K_1	16.32	21.26	21.00	20.57	$T=252.42$
K_2	24.72	20.14	23.91	20.44	
K_3	22.07	21.71	18.20	22.09	
R	8.40	1.56	5.71	1.65	

定终浓度的甲醇，随着甲醇终浓度的提高，所得粗酶液活力平缓上升，在终浓度为 2% 时达到最大值，随后缓慢下降。由此表明：重组酵母表达胶原酶的最佳甲醇终浓度为 2%。(3) pH：如图 4C 所示，pH 在 5.5–6.0 时，胶原酶活力呈上升趋势；此后，随着 pH 值的增大粗酶液活力逐渐下降。由此表明：重组酵母表达胶原酶的最佳 pH 为 6.0。

表达条件的正交试验：采用 $L_9(3^4)$ 正交试验研究诱导条件对重组酵母产胶原酶的影响，具体试验设计及结果见表 2。

由表 2 可知，各因素影响重组酵母表达胶原酶的主次顺序为：A>C>B。其最佳诱导条件为 $A_2B_3C_2$ ，即诱导时间为 72 h，甲醇终浓度为 2.5%，pH 值为 6.0，按该条件重复发酵后所得粗酶液的活力值提高至 29.79 U/mL，优化效果显著。

2.4 重组胶原酶蛋白的纯化及检测

将最优条件下诱导的毕赤酵母重组胶原酶按照 1.2.6 方法分离纯化后进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 5A 所示：凝胶上可观察到高纯度的 ColR75E 胶原酶蛋白条带，表明含有 His 标签的重组 ColR75E 胶原酶蛋白纯化成功。进一步对得到的重组胶原酶进行胶原酶谱检测，结果如图 5B 所示，

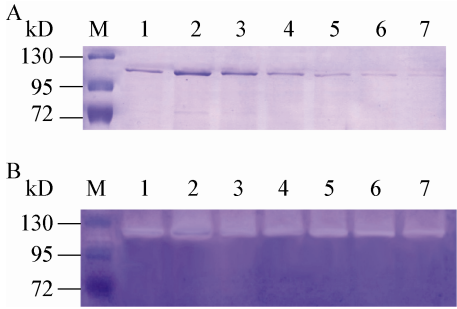


图 5 毕赤酵母重组 ColR75E 胶原酶纯化后的 SDS-PAGE 电泳(A)以及胶原酶谱检测结果(B)
Figure 5 Analysis of SDS-PAGE (A) and collagen zymography (B) of purified recombinant ColR75E collagenase in *Pichia pastoris* X-33

可在含有 I 型胶原蛋白的凝胶上观察到由于重组胶原酶对底物的降解而产生的透明的负染条带(泳道 1–7)，表明经 Ni-NTA 镍柱纯化得到的蛋白确为重组 ColR75E 胶原蛋白酶。将所得重组蛋白集中在一起进行透析去除洗脱液中的咪唑等盐类，用所得的纯化产物测定胶原酶活力，其比活力高达 4.977 U/mg，与纯化前的 1.037 U/mg 相比，比活力提高了近 4.8 倍。

2.5 重组 ColR75E 胶原酶对 I 型胶原蛋白的降解作用及底物特异性研究

利用草鱼鱼鳞 I 型胶原蛋白作为底物，通过

SDS-PAGE 电泳检测酵母菌重组 ColR75E 胶原酶的降解能力。结果如图 6A 所示,泳道 1 为草鱼鱼鳞 I 型胶原蛋白对照,在该泳道中可以清晰地观察到 I 型胶原蛋白 3 种肽链: $\alpha 1$ 链(分子量为 126 kD)、 $\alpha 2$ 链(分子量为 116 kD)以及一条高分子量的 β 链(α 链的二聚体);泳道 2-6 分别为重组 ColR75E 胶原酶与草鱼鱼鳞 I 型胶原蛋白反应 2、4、6、8、10 h 后的降解产物。结果表明随着反应时间的逐渐增加,草鱼鱼鳞 I 型胶原蛋白的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β 链均逐渐减少,而分子量较小的水解肽段的比例逐渐增加;当反应进行至 10 h 时, I 型胶原蛋白中的 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β 链几乎完全被降解,而且肽段也被进一步水解为分子量更小、难于在该胶上显示的肽段。研究表明,从酵母菌中诱导表达的重组 ColR75E 胶原酶能够将将从鱼鳞中提取的具有天然构象的 I 型胶原纤维完全降解为短链肽段。

进一步以胶原蛋白、酪蛋白、牛血清蛋白和溶菌酶作底物,对纯化后的胶原酶进行底物特异性研究,结果如图 6B 所示,胶原蛋白与胶原酶反应 10 h 后几乎完全被降解,而胶原酶对其他 3 种蛋白均未发生明显的降解作用,与不加胶原酶的对照组相比基本无明显变化,表明重组胶原酶对于

胶原蛋白有特异性降解作用;同时,也表明通过硫酸铵沉淀、脱盐以及亲和层析后,获得的重组胶原酶纯度高,没有其他蛋白酶的污染。

3 结论与讨论

在本研究的前期工作中证实,胶原酶 ColR75E 与目前应用最为广泛的溶组织梭状芽孢杆菌胶原酶 ColG 编码基因有 69% 的相似性^[6,8],表现出优良的 pH 稳定性和热稳定性,具有很强的工业应用价值^[9],因此,胶原酶 ColR75E 可以用来开发新型胶原酶产品。在此背景之下,我们首次尝试采用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统来表达胶原酶 ColR75E,并对表达条件进行优化,得出重组酵母在 pH 6.0 的条件下,每 24 h 添加甲醇至终浓度为 2.5%,诱导 72 h 可获得胶原酶 ColR75E 的高效表达。

进一步通过 SDS-PAGE 和胶原酶谱分析发现毕赤酵母分泌表达的胶原酶纯度高、生物活性高,利用硫酸铵沉淀及亲和层析得到了高纯度的蛋白,其比活力可达到 4.977 U/mg。与市场上商品化的梭状芽孢杆菌 I 型胶原酶标准品(Sigma 公司,货号:c0130)的 0.417 U/mg 的比活力值高出 11.9 倍。比活力提高的原因主要是梭状芽孢杆菌 I 型胶原

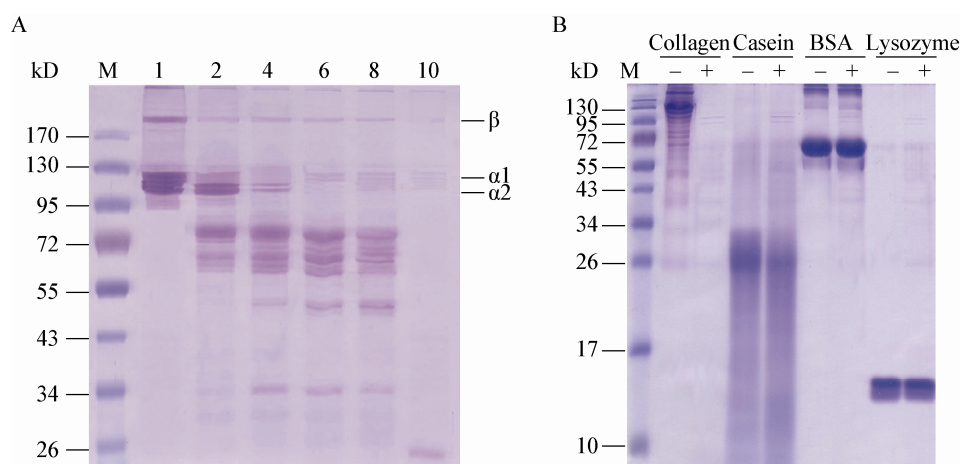


图 6 重组胶原酶 ColR75E 对草鱼鱼鳞中 I 型胶原蛋白水解的时间进程检测(A)及底物特异性分析(B)
 Figure 6 Hydrolysis phase of type I collagen extracted from grass carp by recombinant collagenase ColR75E with incubation time (A) and analysis of substrate specificity of recombinant collagenase ColR75E (B)

酶标准品是未经过分离纯化的粗制品,而本研究中的重组胶原酶经过纯化去除了大量的杂蛋白,酶的纯度提高,进而比活力显著提高。同时,与本实验室从原核表达系统大肠杆菌中制备的重组胶原酶比活力 3.62 U/mg 相比,提高了近 37.5%。由于无论是大肠杆菌还是毕赤酵母表达系统,我们制备的重组胶原酶的蛋白纯度都超过 95%,所以导致两种表达系统中胶原酶比活力差异的原因主要是酶活力的差异,而酶活力的差异应该与蛋白质的翻译和组装有关。在酵母真核表达系统中,胶原酶 ColR75E 的诱导时间达到 72 h,蛋白的翻译和组装速度慢,更容易获得结构组装完整进而活力高的蛋白;然而大肠杆菌中表达的蛋白,由于表达速度过快可能导致部分蛋白来不及组装或者组装的不好,导致酶活力低。因此,通过比较发现,利用毕赤酵母真核表达系统获得了具有更高比活力的酶,具有更好的市场应用价值。

此外,通过测定不同浓度(0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L)下 I 型胶原酶蛋白的反应体系中重组 ColR75E 胶原酶的反应初速度,绘制出如图 7 所示的 Lineweaver-Bürk 双倒数曲线图。由图 7 可知,毕赤酵母重组 ColR75E 胶原酶对于 I 型胶原酶蛋白的最大反应速度 V_{\max} 值为 6.45 mmol/(g·min),显著高于大肠杆菌中重组胶原酶的最大反应速度 V_{\max} 值 5.71 mmol/(g·min)。米氏常数 K_m 值为 2.75 g/L,比活力值与大肠杆菌中获得的重组 ColR75E 胶原酶的 K_m 值 2.93 g/L 相仿^[9],没有显著区别。由毕赤酵母真核表达所得的 ColR75E 胶原酶具有比原核表达系统所得胶原酶更高的最大反应速度和比活力,但是具有相似的 K_m 值,表明不同表达系统改变了酶的反应速度,但是并未改变酶对底物的亲和力。底物特异性分析发现 ColR75E 仅对 I 型胶原蛋白具有水解能力,而对其他蛋白例如溶菌酶、酪蛋白、BSA 等不表现水解能力,这与报道的胶原酶特异性地水解天然胶原蛋白的三维螺旋结构相符合^[1-2]。

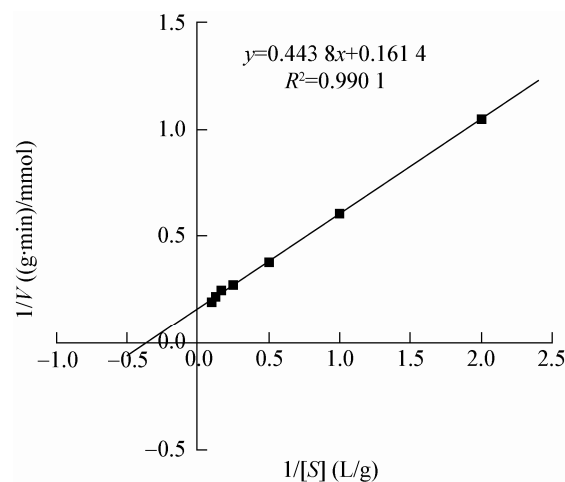


图 7 重组 ColR75E 胶原酶对于 I 型胶原蛋白底物的 Lineweaver-Bürk 双倒数曲线图

Figure 7 Lineweaver-Bürk plot of recombinant ColR75E collagenase to type I collagen substrate

采用毕赤酵母表达系统操作更加简单,且菌种易于培养、生长速度快、外源表达的蛋白纯度高,大大降低了胶原酶的生产成本^[20]。与原核表达工艺相比,毕赤酵母表达系统属于甲醇营养型表达系统^[21],酵母表达载体 pPIZαA 为含有醇氧化酶(AOX)启动子的整合载体,可通过同源重组而将外源基因整合到酵母染色体中^[22],这样的表达系统继代稳定,能够将外源蛋白分泌到细胞外,不但提高表达蛋白的活性,而且有利于产物的纯化,更加适用于大规模工业生产^[23]。

毕赤酵母对密码子的偏好性会影响到外源基因的表达水平^[24]。通过对比毕赤酵母和蜡样芽孢杆菌两种菌株对密码子的偏好比例(图 8)可知,两种微生物对密码子的偏好性有一定区别,在 *colR75E* 基因中非毕赤酵母偏好的密码子占密码子总数的比例高达 38.41%,其中有 40 个 Leu、32 个 Thr、29 个 Val 和 9 个 Ala 是由非毕赤酵母偏好密码子编码,这可能是影响毕赤酵母表达量的关键因素^[25]。因此,在后续的研究中可以尝试对 *colR75E* 进行密码子优化,使其编码序列更符合毕赤酵母的密码子偏爱性用法,从而提高 ColR75E 在毕赤酵母中的表达量。

Frequency (per thousand): <i>Bacillus cereus</i> (<i>Pichia pastoris</i>)							
UUU	24.1(32.4)	UCU	24.4(15.7)	UAU	16.0(28.3)	UGU	7.7(6.3)
UUC	20.6(13.4)	UCC	16.5(3.3)	UAC	18.1(9.4)	UGC	4.4(2.2)
UUA	15.6(48.0)	UCA	15.2(14.8)	UAA	0.8(2.4)	UGA	0.3(0.6)
UUG	31.5(10.2)	UCG	7.4(4.5)	UAG	0.5(0.6)	UGG	10.3(10.2)
CUU	15.9(17.9)	CCU	15.8(9.7)	CAU	11.8(16.1)	CGU	6.9(13.2)
CUC	7.6(4.1)	CCC	6.8(1.3)	CAC	9.1(4.7)	CGC	2.2(4.3)
CUA	10.7(10.9)	CCA	18.9(16.4)	CAA	25.4(30.9)	CGA	4.2(5.5)
CUG	14.9(3.4)	CCG	3.9(6.7)	CAG	16.3(7.3)	CGG	1.9(1.4)
AUU	31.1(49.4)	ACU	22.4(13.4)	AAU	25.1(35.0)	AGU	12.5(14.8)
AUC	19.4(12.8)	ACC	14.5(3.2)	AAC	26.7(13.3)	AGC	7.6(5.8)
AUA	11.1(17.9)	ACA	13.8(28.0)	AAA	29.9(56.6)	AGA	20.1(9.9)
AUG	18.7(26.9)	ACG	6.0(12.2)	AAG	33.8(18.7)	AGG	6.6(2.6)
GUU	26.9(25.0)	GCU	28.9(20.7)	GAU	35.7(38.2)	GGU	25.5(24.2)
GAG	14.9(5.6)	GCC	16.6(4.1)	GAC	25.9(8.8)	GGC	8.1(7.9)
GUA	9.9(29.8)	GCA	15.1(29.8)	GAA	37.4(56.0)	GGA	19.1(24.4)
GUG	12.3(10.5)	GCG	3.9(11.8)	GAG	29.0(18.4)	GGG	5.8(9.2)

图 8 毕赤酵母与蜡样芽孢杆菌密码子偏好性比较

Figure 8 Comparison of codon preference between *Pichia pastoris* X-33 and *Bacillus cereus*

总之，本研究利用毕赤酵母作为表达系统获得了高活性的蜡样芽孢杆菌胶原酶 ColR75E，为胶原酶在毕赤酵母中的工业化生产进一步奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Bauer R, Janowska K, Taylor K, et al. Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH[J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2015, 71(3): 565-577
- [2] Jin M, Li JW, Wang ZY. Researches on collagenase secreted by microbes[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2003, 25(1): 3-7 (in Chinese)
金敏, 李君文, 王忠彦. 微生物胶原酶研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(1): 3-7
- [3] Tokmina-Roszyk M, Tokmina-Roszyk D, Bhowmick M, et al. Development of a Förster resonance energy transfer assay for monitoring bacterial collagenase triple-helical peptidase activity[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 453: 61-69
- [4] Takagi H, Kondou M, Hisatsuka T, et al. Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(12): 2364-2368
- [5] Malaponte G, Hafsi S, Polesel J, et al. Tumor microenvironment in diffuse large B-cell lymphoma: matrix metallo proteinases activation is mediated by osteopontin overexpression[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2016, 1863(3): 483-489
- [6] Eckhard U, Schönauer E, Nüss D, et al. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2011, 18(10): 1109-1114
- [7] Nagano H, To KA. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(1): 181-183
- [8] Zhang XX, Li Y, Wang SY, et al. Identification of a collagenase produced by *Bacillus cereus* R75E isolated from human colostrum[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2015, 51(5): 511-521
- [9] Zhang XX, Li Y, Wang YH, et al. Expression, purification and enzymatic characterization of ColR75E collagenase of *Bacillus cereus* R75E[J]. China Biotechnology, 2015, 35(10): 44-52 (in Chinese)
张西轩, 李晔, 王亚航, 等. 蜡样芽孢杆菌 ColR75E 胶原酶的表达、纯化及酶学性质研究[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(10): 44-52
- [10] Li Y, Zhang XX, Cao GX, et al. Optimization of fermentation conditions for collagenase production from *Bacillus cereus* and its purification[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1419-1428 (in Chinese)
李晔, 张西轩, 曹广秀, 等. 产胶原酶的蜡样芽孢杆菌发酵条件优化及酶的分离纯化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1419-1428
- [11] Pu Y, Wang ZX. Advancement of ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography media application in protein chromatography[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6): 975-982 (in Chinese)
浦宇, 王芝祥. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 975-982
- [12] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(1): 31-39
- [13] Sugiki T, Ichikawa O, Miyazawa-Onami M, et al. Isotopic labeling of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces fragilis*[A]/Shekhtman A, Burz DS. Protein NMR Techniques[M]. New York: Humana Press, 2012, 831:

- 19-36
- [14] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. Journal of Molecular Recognition, 2005, 18(2): 119-138
- [15] Tang YJ, Yu BS. Yeast *Pichia pastoris* expression system[J]. World Notes on Antibiotics, 2002, 23(6): 246-250,271 (in Chinese)
唐元家, 余柏松. 巴斯德毕赤酵母表达系统[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2002, 23(6): 246-250,271
- [16] Sheen H. Quantitation of yeast total proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer for uniform loading[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 498: 95-97
- [17] Kocabiyik S, Erdem B. Intracellular alkaline proteases produced by thermo acidophiles: detection of protease heterogeneity by gelatin zymography and polymerase chain reaction (PCR)[J]. Bioresource Technology, 2002, 84(1): 29-33
- [18] Mandl I, MacLennan JD, Howes EL, et al. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum*[J]. Journal of Clinical Investigation, 1953, 32(12): 1323-1329
- [19] Liu DS, Liang L, Regenstien JM, et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)[J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1441-1448
- [20] Yao J, Wu ZJ, Ren J. Progress of *Pichia pastoris* expression system[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(3): 35-38 (in Chinese)
姚晶, 吴正钧, 任婧. 巴氏毕赤酵母表达系统的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 35-38
- [21] Sui SF, Chen SL. Recent advances and character of methylophilic yeast *Pichia pastoris* expression system[J]. Biotechnology Bulletin, 2004(3): 1-4 (in Chinese)
隋少飞, 陈松林. 巴氏毕赤酵母表达系统的特点及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2004(3): 1-4
- [22] Katrolija P, Yan QJ, Jia HY, et al. Molecular cloning and high-level expression of a β -galactosidase gene from *Paecilomyces aeruginus* in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 69(3/4): 112-119
- [23] Li RR, He ZQ, Bao ED, et al. Expression of the chicken antibacterial peptide fowlicidin-3 in *Pichia pastoris* and identification of biological activity[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(21): 4529-4535 (in Chinese)
李荣荣, 和祯泉, 鲍恩东, 等. 鸡源抗菌肽 Folicidin-3 在毕赤酵母中的分泌表达及其生物学活性鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4529-4535
- [24] Zhao X, Huo KK, Li YY. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(3): 308-311 (in Chinese)
赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 308-311
- [25] Ma ZH, Zhao QX, Gao X, et al. Expression of hFGF-21 with optimized codon in *P. pastoris*[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2010, 23(1): 43-46 (in Chinese)
马忠辉, 赵巧香, 高新, 等. 密码子优化的人成纤维细胞生长因子-21 在毕赤酵母中的表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(1): 43-46