

导入脂肪酶基因提高荧光假单胞菌 26-2的产酶效率*

Improving the Lipase Production of *Pseudomonas fluorescence* 26-2 through Transform Its Lipase Gene into the Originally Strain

张 搏,王青艳

ZHANG Bo, WANG Qing-yan

(广西科学院,广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 采用导入脂肪酶基因的方法对荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*) 26-2的产酶效率进行实验。实验以质粒 *ppic9k-lipA* 为模板,通过 PCR的方式在 26-2脂肪酶基因的两端引入 *Bam* H1和 *Eco*R1的酶切位点,并将该基因与大肠杆菌荧光假单胞菌穿梭质粒 *pDSK 519*连接,获得重组质粒 *pDSK 519-lipA*,再将重组质粒转入荧光假单胞菌 26-2,获得工程菌株 *P. fluorescence* 26-2-1。在相同的发酵条件下,工程菌株的发酵液酶活力比原始菌株的发酵液酶活力提高 2倍,实现了荧光假单胞菌脂肪酶基因的同源性表达。

关键词: 荧光假单胞菌 同源性表达 脂肪酶基因

中图分类号: Q814.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2009)02-0185-03

Abstract A *Pseudomonas fluorescence* lipase gene *lipA* was subcloned from *ppic9k-lipA* and inserted into vector *pDSK 519* to construct a new plasmid, *pDSK 519-lipA*, which was transformed into its original strain *P. fluorescence* 26-2. The recombinant strain 26-2-1 was confirmed by restriction digestion. Compared with wild type 26-2 in pot experiment and ferment experiment, the lipase production of 26-2-1 is 2 times more than its original strain.

Key words *P. fluorescence*, homologous expression, lipase gene

脂肪酶 (lipase EC3. 1. 1. 3) 又称三酰基甘油酰基水解酶,它不仅可水解三脂酰甘油生成二脂酰甘油和脂肪酸 (其中的二脂酰甘油可进一步被水解为一脂酰甘油、甘油和游离脂肪酸),而且能够催化水解反应的逆反应—酯化反应^[1]。来自于假单胞菌的脂肪酶比来自其它菌株的脂肪酶能更好地适应温度变化,还具有有机溶剂耐受性等优势,在有机合成、食品工业、药物制造、油脂深加工等方面应用潜力较大。从全球能源网获悉,巴西研究人员使用脂肪酶,可以将不同来源的棕榈油反酯化为生物柴油,并且其质量符合 D6751规格。

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*) 脂肪酶分子量约为 55 KDa,其活性中心的构成需要有钙离子的参与^[2]。钙离子对 1,3位碳原子上的脂键有较

大的水解活性,对 2位的脂键的水解活性则较小。由于该脂肪酶分子量较大,在大肠杆菌中表达 (PET载体) 时,又缺乏必要的分泌机制,所以容易形成不溶性的包涵体,而且在毕赤酵母中进行表达时,由于真核生物与原核生物对密码子的偏好性有所不同,因此表达效果并不理想。荧光假单胞菌脂肪酶基因 (*lipA*) 大小为 1850bp 左右,与碱性蛋白酶基因 (*AprA*), ABC exporter 的编码基因 *AprDEF*^[3] 及两个沙雷氏丝氨酸蛋白酶的类似物编码基因 (*PspA* 和 *PspB*) 顺序联在一起,总大小约 14kb。这些蛋白质编码基因共用相同的启动子和终止密码子。

本文将已经克隆到的荧光假单胞菌脂肪酶基因 (DQ789596) (1.8kb) 转入其原始菌株中,实现荧光假单胞菌脂肪酶基因的同源性表达,提高了原始菌株的脂肪酶产酶效率。

收稿日期: 2008-11-17

作者简介: 张 搏 (1981-),男,硕士,主要从事微生物分子生物学的研究。

* 广西科学院创新基金项目 (NO. 桂科院研 0701) 资助

广西科学 2009年5月 第16卷第2期

1 材料与方法

1.1 菌种

荧光假单胞菌脂肪酶 26-2取自广西科学院工业生物技术研究中心实验室,对该菌株用分子生物学的方式进行鉴定,该菌株具有氨基苄抗性。

1.2 重组质粒 *pDSK519-lipA*的构建及其转化方法

质粒 *ppic9k-lipA*是连接 1.8kb 荧光假单胞菌 26-2 脂肪酶基因的 *ppic9k* 载体。26-2 脂肪酶基因与荧光假单胞菌 *pfo-1* (AccNo CP000094.1) 脂肪酶基因的同源性为 85%。以 *ppic9k-lipA* 为模板,并设计 2 个引物:

5'-GGATCCATGGGTGTATACGACT-3' (*Bam*H1),

5'-GAATTCTCAGGCGATCACAATTCCG-3' (*Eco*R1),

通过 PCR 的方式在该基因的两端引入 *Bam*H1 和 *Eco*R1 酶切位点,连接经相同双酶切的穿梭表达质粒 *pDSK519*^[4] 片段,连接方法如图 1 所示,连接产物转化荧光假单胞菌 26-2,感受态细胞的制备及转化过程参照分子克隆大肠杆菌的电转化^[5]。挑取能在含有罗丹明 B 的 LB(kan^R) 平板上长出明显透明圈转化子,提取其质粒并酶切验证。获得的工程菌株定名为 26-2-1。

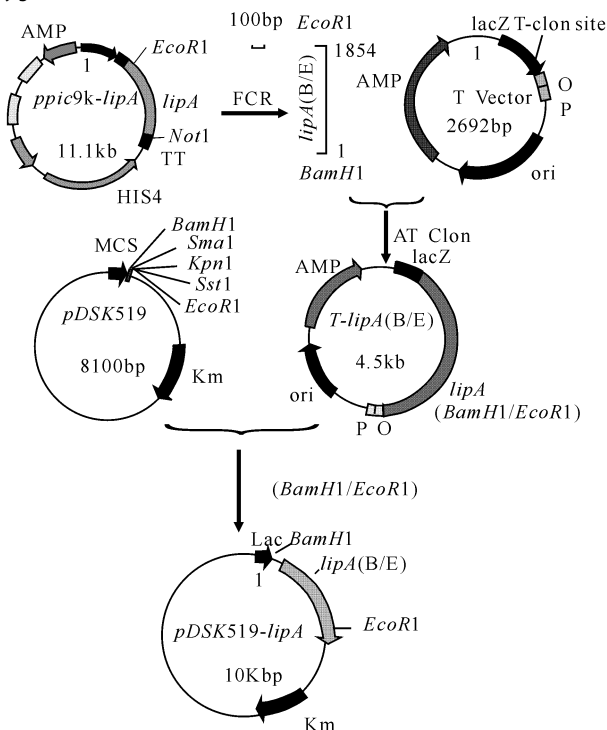


图 1 重组质粒 *pDSK519-lipA* 的构建过程

Fig. 1 Schematic representation of experimental procedures for construct recombinant plasmid *pDSK519-lipA*

1.3 荧光假单胞菌 26-2 与工程菌株 26-2-1 产酶效果比较方法

将两个菌种分别接到 LB 培养基中,37°C 培养过

夜后,按 1:5 的体积比吸取一定量的种子液到发酵产酶培养基中发酵 72h 后,测定发酵液中的脂肪酶活力。发酵条件为 30°C,摇床转速为 160rpm/min

发酵培养基 (m/v): yeast extraction 2%, 淀粉 1%, CaCl₂ 0.06%, 大豆油 0.5%。

1.4 脂肪酶活力测定方法

采用分光光度计法^[6]测定脂肪酶活力。

A 液: 16.5mmol/L 的对硝基苯棕榈酸酯 (P-NPP) 的异丙醇溶液。

B 液: 含有 0.4% 的 Triton X-100 和 0.1% 的阿拉伯树胶的 50mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.0)

测定时,将相应的 A 液与 B 液按 1:9 混和,取 100 μ l 的发酵液加入 900 μ l 混合液中,于 40°C 反应 10min 后,用可见光 (410nm) 读光吸收值。在此条件下,对硝基苯的消光系数是 $1.46 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$

酶活 (u) 定义为每分钟产生 $1 \mu\text{mol}$ P-NPP 所需的酶量定义为一个单位

2 结果与分析

2.1 *pDSK519-lipA* 的构建

从图 2 可以看出,荧光假单胞菌脂肪酶基因具有在各种脂肪酶当中高度保守的五肽模体 (GX SXG), 是其催化活性的中心。C 端具有 4 个 GGXGXSD 的序列,这些序列在采用 ABC 分泌途径 (I 型分泌机制)^[3] 的脂肪酶中比较保守。基因氨基酸序列的同源性比对结果显示,该基因与其它的荧光假单胞菌同源性较高,如 *pfo-1*,同源性为 85%。

2.2 工程菌株 26-2-1 的构建

将构建好的 *pDSK519-lipA* 电转化荧光假单胞菌感受态细胞。转化后长出的菌落转移到含有罗丹明 B 和橄榄油的 LB(kan^R) 平板 (定性平板) 上培养过夜,明显观察到菌落的周围产生透明圈,说明有脂肪酶分泌到培养基中。挑取产生较大透明圈的菌落,过夜培养后提取其质粒,经 *Bam*H1/*Eco*R1 双酶切,电泳能检测到 1.8kb 目的片段条带 (图 3)。对比原始菌株不含有质粒且不具有卡那霉素抗性,工程菌株中包含有质粒而且能够在含有卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的培养基中生长,由此可以证明,脂肪酶基因已转入荧光假单胞菌 26-2

2.3 原始菌株 26-2 与工程菌株 26-2-1 的产酶效果比较

图 4 的结果表明,定性平板上原始菌株与工程菌株均有一定的产酶效果,且经改选后的工程菌株产酶能力较强。

```

26-2 MGYYDYKRFOTADSRALFSDAMAITYSYHNLDNGFAAQYQHMGGLDLFATLVTALIG
P.fluorescens P 1 MGYYDYKRFOTADSRALFSDAMAITYSYHNLDNGFAAQYQHMGGLDLFATLVTALIG
P.fluorescens H 1 MGYYDYKRFOTADSRALFSDAMAITYSYHNLDNGFAAQYQHMGGLDLFATLVTALIG
26-2 DTSQGVIFQIFWHPDSEKLALEAVKKAQWTFSAAQLOVDGKIDAROTFFQERQVTSR
P.fluorescens P 61 DTSQGVIFQIFWHPDSEKLALEAVKKAQWTFSAAQLOVDGKIDAROTFFQERQVTSR
P.fluorescens H 61 DTSQGVIFQIFWHPDSEKLALEAVKKAQWTFSAAQLOVDGKIDAROTFFQERQVTSR
26-2 VEILQYDAQGHLETLQIAFROTSPRELIQDSIQDVIIDLAAAFQFDYAKNYVGEA
P.fluorescens P 121 VEILQYDAQGHLETLQIAFROTSPRELIQDSIQDVIIDLAAAFQFDYAKNYVGEA
P.fluorescens H 121 VEILQYDAQGHLETLQIAFROTSPRELIQDSIQDVIIDLAAAFQFDYAKNYVGEA
26-2 QNLDVYAFKANGLSQKDLVLSQHSLSQGLAVNSMADLSQKGGFFADSNYIYVASF
P.fluorescens P 181 QNLDVYAFKANGLSQKDLVLSQHSLSQGLAVNSMADLSQKGGFFADSNYIYVASF
P.fluorescens H 181 QNLDVYAFKANGLSQKDLVLSQHSLSQGLAVNSMADLSQKGGFFADSNYIYVASF
26-2 QSSDKVNLQVENDPFRALDQSPFSAAGVHDAPFSLQDNVLSFNDHYASAWRV
P.fluorescens P 241 QSSDKVNLQVENDPFRALDQSPFSAAGVHDAPFSLQDNVLSFNDHYASAWRV
P.fluorescens H 241 QSSDKVNLQVENDPFRALDQSPFSAAGVHDAPFSLQDNVLSFNDHYASAWRV
26-2 MSLNIPFWISHLFSLVQDMRVESEKPYDLTSSSTIIIVANLSDPARANTVWQDLN
P.fluorescens P 301 MSLNIPFWISHLFSLVQDMRVESEKPYDLTSSSTIIIVANLSDPARANTVWQDLN
P.fluorescens H 301 MSLNIPFWISHLFSLVQDMRVESEKPYDLTSSSTIIIVANLSDPARANTVWQDLN
26-2 NAITKROSTFIIGSDDLIQGSDNLLQKRAQDFRFGQVNIILQGGQSTIFLQ
P.fluorescens P 361 NAITKROSTFIIGSDDLIQGSDNLLQKRAQDFRFGQVNIILQGGQSTIFLQ
P.fluorescens H 361 NAITKROSTFIIGSDDLIQGSDNLLQKRAQDFRFGQVNIILQGGQSTIFLQ
26-2 LKHPDFANQDQALVIRDAHQISITRDQSLKREPFILWQFKDDVIRNVLQK
P.fluorescens P 421 LKHPDFANQDQALVIRDAHQISITRDQSLKREPFILWQFKDDVIRNVLQK
P.fluorescens H 421 LKHPDFANQDQALVIRDAHQISITRDQSLKREPFILWQFKDDVIRNVLQK
26-2 QNLFAYESSVYKQADTLKAKAGDLPQIGNDHLLQGAQNDYVYQAGNDLMSG
P.fluorescens P 481 QNLFAYESSVYKQADTLKAKAGDLPQIGNDHLLQGAQNDYVYQAGNDLMSG
P.fluorescens H 481 QNLFAYESSVYKQADTLKAKAGDLPQIGNDHLLQGAQNDYVYQAGNDLMSG
26-2 GADTFLFNGAFQDRVYVYVTLQDKLVFLQGVLFQDDLRHAHSAVQDQTVLFGQDSV
P.fluorescens P 541 GADTFLFNGAFQDRVYVYVTLQDKLVFLQGVLFQDDLRHAHSAVQDQTVLFGQDSV
P.fluorescens H 541 GADTFLFNGAFQDRVYVYVTLQDKLVFLQGVLFQDDLRHAHSAVQDQTVLFGQDSV
26-2 LVQVALQSLNSDQIVIA
P.fluorescens P 601 LVQVALQSLNSDQIVIA
P.fluorescens H 601 LVQVALQSLNSDQIVIA

```

图 2 *P. fluorescens* 26-2 脂肪酶氨基酸序列与其它荧光假单胞菌脂肪酶 (*P. fluorescens* PFO-1 *Pseudomonas* HU 380) 氨基酸序列的多重比较

Fig. 2 Multi alignment of amine acid of *P. fluorescens* 26-2 lipase

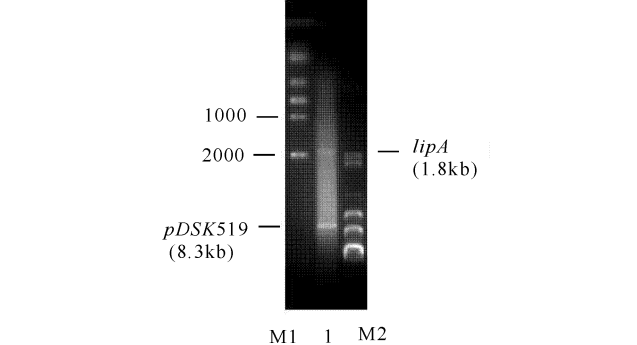


图 3 重组质粒 *pDSK519-lipA* 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid *pDSK519-lipA* by enzyme digestion

1 *pDSK519-lipA* digested by *Bam* H1/*Eco*R 1; M1 DL2000, M2 λ DNA/*Hind*III.

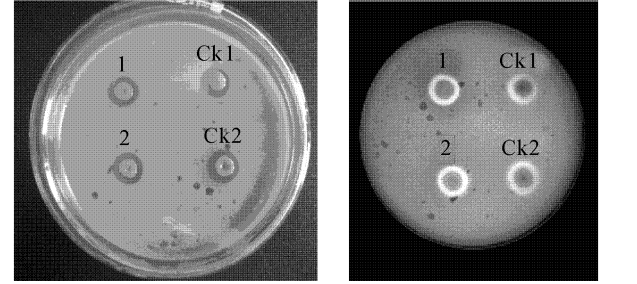


图 4 工程菌 1.2 与原始菌株 CK1 CK2 对橄榄油的水解作用

Fig. 4 Hydrolyzation of olive oil by engineered strain 1.2 and original strain CK1 CK2

将工程菌株与原始菌株接到种子液中过夜培养,第 2 天转接到发酵培养基中(其中工程菌的发酵培养基加入适量的卡那霉素),30°C、160 转/min,发酵

72h 后测发酵液酶活力。其中工程菌株 26-2-1 发酵液的酶活力为 30_u/ml,原始菌株 26-2 的发酵液的酶活力为 14.6_u/ml 这说明在同样情况下,工程菌株的发酵液中脂肪酶活力是原始菌株的发酵液中的脂肪酶活力的 2 倍

3 结束语

本文用到的荧光假单胞菌 26-2 具有一定的产脂肪酶能力^[7],该菌株具有氨基青霉素抗性。构建的工程菌由于包含有 *pDSK519* 质粒,而且具有卡那霉素抗性,因此可用卡那霉素筛选。我们所获得的工程菌株比野生菌株的产酶能力提高 2 倍,而且质粒中的脂肪酶基因表达较稳定,实现了荧光假单胞菌脂肪酶基因的同源性表达。文献 [3] 曾报道荧光假单胞菌的 ABCexporter 基因有助于脂肪酶的分泌,而且工程菌在长期使用过程中,难免会有质粒丢失或者表达水平降低现象的发生。因此,今后可以尝试克隆 ABC 基因,并整合到荧光假单胞菌染色体上,以获得更实用、高效的工程菌株

参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业(下) [M]. 北京: 科学出版社, 1984 655-670.
- [2] Amada K, Kwon HJ, Haruki M, et al. Ca(2+) -induced folding of a family I .3 lipase with repetitive Ca(2+) binding motifs at the C-terminus [J]. FEBS Lett, 2001, 509(1): 17-21.
- [3] Jung H A, Jae G P, Joon S R. Homologous expression of the lipase and ABC transporter gene cluster, tliDEF A, enhances lipase secretion in pseudomonas spp [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 5506-5511.
- [4] Keen N T, Tamaki S, Kobayashi D, et al. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria [J]. Gene 1988, 70 191-197.
- [5] 金冬雁. 分子克隆实验指南 [M]. 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] 唐良华, 苏敏, 薛建平, 等. 脂肪酶的发酵及催化生成生物柴油的研究 [J]. 生物技术, 2006, 5(16): 67-70.
- [7] 张搏, 杨江科, 苏华武, 等. 脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化 [J]. 生物技术, 2007, 17(1): 67-70.

(责任编辑: 尹 闯)