

铜绿假单胞菌脂肪酶 *Lipase* 基因的原核表达

张煜星^{1,2,3}, 武寒雪³, 祝建波³, 刘焕⁴, 周鹏^{1,2,4} (1. 海南大学农学院, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所国家重点实验室, 海南海口 571101; 3. 石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室, 新疆石河子 832003; 4. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆乌鲁木齐 830091)

摘要 [目的]对铜绿假单胞菌脂肪酶 *Lipase* 基因进行原核表达。[方法]利用 PCR 方法从铜绿假单胞菌基因组 DNA 中扩增得到脂肪酶基因, 测定其核苷酸序列, 利用基因重组技术构建脂肪酶基因的原核表达载体, 加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 诱导蛋白表达 4 h, 并进行 SDS-PAGE 电泳。[结果]从铜绿假单胞菌中克隆的脂肪酶基因成熟肽的序列, 与 NCBI 上所递交的铜绿假单胞菌脂肪酶序列同源性很高, 达 99.36%。成功构建了脂肪酶基因的原核表达载体 pET32a-*Lip*, 进一步 SDS-PAGE 电泳结果显示目的基因得到高效表达。[结论]克隆的铜绿假单胞菌脂肪酶带有自身的信号肽, 也可以在大肠杆菌中正常表达, 可以用于进一步的研究。

关键词 铜绿假单胞菌; 脂肪酶; 原核表达

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)35-15384-02

Prokaryotic Expression of *Pseudomonas aeruginosa Lipase* Gene

ZHANG Yu-xing et al (College of Agronomy, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract [Objective] The aim of this study was to investigate the prokaryotic expression of *pseudomonas aeruginosa lipase* gene. [Method] *Lipase* gene was amplified by PCR from the genome DNA of *pseudomonas aeruginosa*, and its nucleotide sequence was determined. The prokaryotic expression vector of *Lipase* gene was constructed by the gene recombination technique. The protein expression was induced for 4 hours by IPTG with the final concentration of 1.0 mmol/L, and then SDS-PAGE electrophoresis was analyzed. [Result] The sequence of mature peptides in *lipase* gene cloned from *pseudomonas aeruginosa* had a 99.36% homology with that of *pseudomonas aeruginosa lipase* submitted in NCBI, so the prokaryotic expression vector of *lipase* gene pET32a-*Lip* was successfully constructed. Furthermore, the results of SDS-PAGE electrophoresis showed that the target gene was expressed highly and effectively. [Conclusion] The cloned *pseudomonas aeruginosa lipase* with its signal peptide can be normally expressed in *Escherichia coli* and also used for further study.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; *Lipase*; Prokaryotic expression

脂肪酶 (Triacylglycerol lipase, EC3.1.1.3) 是广泛存在的一种酶。动物和植物脂肪酶于 19 世纪被首次报道, 微生物脂肪酶则在 20 世纪初才被微生物学家 Eijkmann 发现, 从此揭开了微生物脂肪酶研究的序幕^[1-3]。由于微生物脂肪酶种类多、来源广、周期短, 具有比动植物脂肪酶广的 pH 值和作用温度范围以及对底物的专一性类型, 又便于进行工业化生产和获得高纯度制剂, 所以比动植物脂肪酶在理论研究和实际应用中有着更重要的作用^[4-7]。

铜绿假单胞菌属脂肪酶具有特殊的热稳定性和碱性条件下的活性, 在降解植物油脂中优先作用于长链脂肪酸 (C_{18}), 因此在生物工程中扮演了重要的角色^[8-9]。同时其产生的脂肪酶还是一种适宜的生物催化剂, 能够在亲脂性有机溶剂或者超临界介质中催化甘油三酯与短链醇的酯交换反应, 生成生物柴油^[10-12]。该试验从铜绿假单胞菌中克隆了脂肪酶基因, 并构建了原核表达载体。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达系统, SDS-PAGE 表明经 IPTG 诱导目的基因可以高效表达。

1 材料与方法

1.1 材料 原核表达载体 pET32a、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 均由石河子大学农业生物技术重点实验室保存; 铜绿假单胞菌分离自克拉玛依油田含油污泥; Taq DNA polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 为上海生工产品; 其他试剂均为进口分析纯。

1.2 铜绿假单胞菌基因组 DNA 的获得 步骤依次为: 分装菌液, 12 000 r/min 离心 2 min, 去上清; 加入 400 μ l TE 悬浮沉淀, 并加入 20 μ l 10% 的 SDS 和蛋白酶 K 2 μ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h; 加入 60 μ l 5 mol/L NaCl, 混匀; 加入 120 μ l CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 保温 20 min; 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 抽提, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取水相; 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24:1), 抽提, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取水相; 加入 2 倍体积的异丙醇 (预冷), 颠倒混匀, 室温静置 10 min; 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 70% 乙醇洗涤沉淀, 吹干; 加入 TE, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

1.3 *Lipase* 目的基因的 PCR 扩增 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 反应 30 循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。之后, 目的片段连接 pBS-T 载体, 接着转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 鉴定和酶切鉴定克隆。酶切、回收、连接、转化步骤按《分子克隆实验指南》(第 3 版) 进行。阳性克隆命名为 pBS-T-*Lip*。

1.4 *Lipase* 基因原核表达载体的构建 将原核表达载体 pET32a、pBS-T-*Lip*、BamH I、Xho I 双酶切, 回收载体大片段和目的基因, 载体和目的基因连接、转化, 提取质粒后进行 PCR、酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pET32a-*Lip*。

1.5 *Lipase* 基因的原核表达 提取 pET32a-*Lip* 质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 PCR 鉴定阳性克隆。将工程菌在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 扩大培养后, 按 100:1 比例转接到新鲜的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 为 0.5~1.0 时加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 诱导 4 h 时取出 1 ml 菌液, 高速离心后弃去上清收集菌体, 加入 100 μ l 蛋白上样液, 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮 10 min。配制 12% 的分离胶, 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE。电泳后, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色。

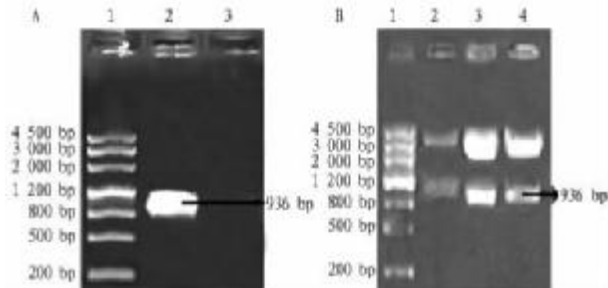
基金项目 国家“863”子项目“特殊生境植物资源的开发利用技术”(2007AA021401); 兵团博士基金项目“转基因育种技术研究”(2006JC07)。

作者简介 张煜星 (1967-), 男, 河南永城人, 在读博士, 副教授, 从事植物基因工程研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-09-25

2 结果与分析

2.1 *Lipase* 目的基因的获得 *Lipase* 基因连接 pBS-T 后, 构建 pBS-T-*Lip* 质粒, 经 PCR 鉴定和 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定 (图 1), 均能得到与预期大小一致的特异目的片段。送去北京三博公司测序, 并与 NCBI 上所递交的铜绿假单胞菌脂肪酶序列进行比对, 结果表明二者同源性很高, 达 99.36%。



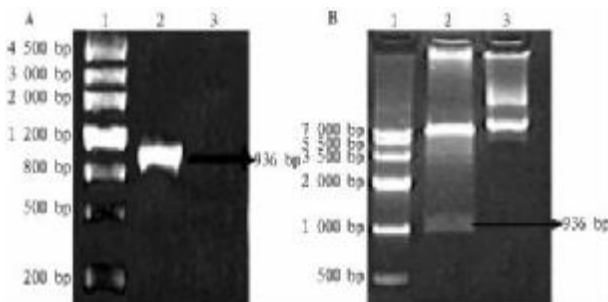
注: A. 1 为 DNA Marker III, 2 为 pBS-T-*Lip* PCR 结果, 3 为阴性对照; B. 1 为 DNA Marker III, 2 为 *Hind* III/*Xba* I 酶切 pBS-T-*Lip*, 3 为 *Bam*H I/*Xho* I 酶切 pBS-T-*Lip*, 4 为 *Bam*H I/*Sac* I 酶切 pBS-T-*Lip*。

Note: A. 1 means DNA Marker III; 2 means PCR results of pBS-T-*Lip*; 3 means the negative control; B. 1 means DNA Marker III; 2 means restriction enzyme digestion of pBS-T-*Lip* with *Hind* III/*Xba* I; 3 means restriction enzyme digestion of pBS-T-*Lip* with *Bam*H I/*Xho* I; 4 means restriction enzyme digestion of pBS-T-*Lip* with *Bam*H I/*Sac* I.

图 1 pBS-T-*Lip* PCR 扩增和酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification and enzyme digestion of pBS-T-*Lip*

2.2 *Lipase* 基因原核表达载体的构建 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切原核表达载体 pET32a 和 pBS-T-*Lip* 后, 连接、转化。转化质粒经 PCR 筛选和 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定 (图 2), 均能得到与预期大小一致的特异目的片段。



注: A. 1 为 DNA Marker III, 2 为 pET32a-*Lip* PCR 结果, 3 为阴性对照; B. 1 为 DNA Marker IV, 2 为 *Bam*H I/*Xho* I 酶切 pET32a-*Lip*, 3 为 pET32a-*Lip* 质粒对照。

Note: A. 1 means DNA Marker III; 2 means PCR results of pET32a-*Lip*; 3 means the negative control; B. 1 means DNA Marker IV; 2 means restriction enzyme digestion of pET32a-*Lip* with *Bam*H I/*Xho* I; 3 means the plasmid control of pET32a-*Lip*.

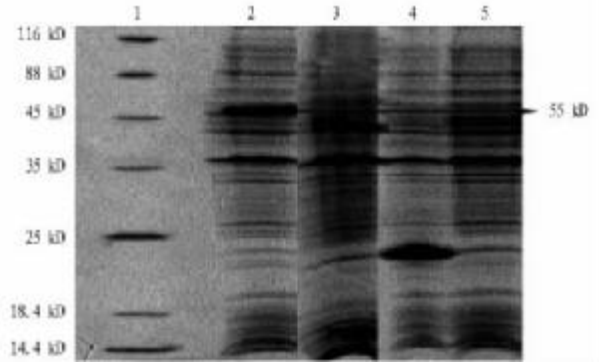
图 2 pET32a-*Lip* PCR 扩增和酶切鉴定

Fig. 2 PCR amplification and enzyme digestion of pET32a-*Lip*

2.3 *Lipase* 基因的原核表达 pET32a-*Lip* 质粒 SDS-PAGE 的结果见图 3。电泳结果显示目的基因高效表达, 目的条带大小为 55 kD, 与预期相同。

3 讨论

脂肪酶是分解三脂酰甘油的水解酶类, 被水解底物三脂



注: 1 为蛋白 Marker; 2 为 pET32a-*Lip* 转 DE3 IPTG 诱导; 3 为 pET32a-*Lip* 转 DE3 非诱导; 4 为 pET32a 转 DE3 IPTG 诱导; 5 为 DE3 IPTG 诱导。

Note: 1 means protein Marker; 2 means DE3 is transformed by pET32a-*Lip* under IPTG induction; 3 means DE3 is transformed by pET32a-*Lip* under non-induction; 4 means DE3 is transformed by pET32a under IPTG induction; 5 means DE3 is transformed under IPTG induction.

图 3 pET32a-*Lip* SDS-PAGE 结果

Fig. 3 SDS-PAGE of pET32a-*Lip*

酰甘油的醇部分是丙三醇, 酸部分为水不溶的 C_{12} 以上的长链饱和或不饱和脂肪酸, 水解反应发生的部位是三脂酰甘油的酯键。脂肪酶的水解反应是一种非均相体系, 水溶性的酶在底物 (水不溶性) 和水的界面上催化底物反应, 对水溶性底物不起催化作用^[13], 因此它对于催化短碳链醇和脂肪酸, 以及甘油三酯经过酯化或者酯交换生产生物柴油具有重要意义。

该研究从铜绿假单胞菌中克隆了脂肪酶基因, 由序列生物信息学分析可知, 该脂肪酶由信号肽和成熟肽 2 个部分构成。信号肽由 78 个核苷酸编码, 包含 26 个氨基酸; 成熟肽由 855 个核苷酸编码, 包含 285 个氨基酸。序列比对选用成熟肽的序列进行, 结果与 NCBI 上所递交的铜绿假单胞菌脂肪酶序列进行比对, 结果表明二者同源性很高, 达 99.36%。

前人研究表明, 尽管不同来源的脂肪酶具有不同的氨基酸组成, 但是绝大多数脂肪酶的活性中心都由丝氨酸和组氨酸组成^[3], 并且它们与另一种氨基酸残基一起构成脂肪酶催化活性中心的三分体。3D 模型预测该铜绿假单胞菌脂肪酶含有 Ser82、Asp229 和 His251 共同组成的三连体催化中心, 及一个连接 Cys183 和 Cys235 残基的二硫键。

克隆的铜绿假单胞菌脂肪酶带有自身的信号肽, 也可以在大肠杆菌中正常表达, 对于该酶的信号肽与分子伴侣的研究将是笔者下一步的工作重点。

参考文献

- [1] DEWEY D Y, RYU DOO, HYUN N. Biomolecular engineering: A new frontier in biotechnology[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10: 23 - 27.
- [2] DREYFUS L A, URBAN R G, WHIPP S C, et al. Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity[J]. Mol Microbiol, 1992, 6: 2397 - 2406.
- [3] DANIEL DUBREUIL J. *Escherichia coli* STB enterotoxin[J]. Microbiology, 1997, 143: 1783 - 1795.
- [4] LINKO Y, LAMSA M, WU X. Biodegradable products by lipase biocatalysis[J]. Biotechnol, 1998, 66: 41 - 50.

(下转第 15388 页)

条带。经蛋白质定量,1 L 大肠杆菌菌体裂解上清纯化可得到 FMDV-VP1-6p 融合蛋白约 2 mg。

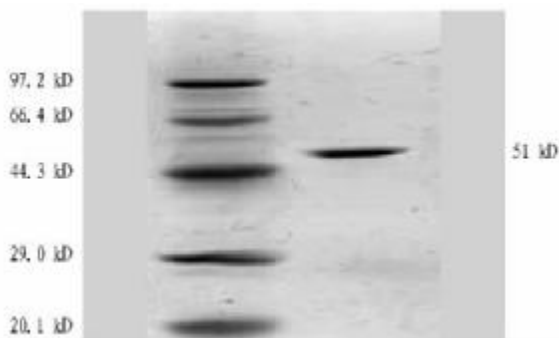
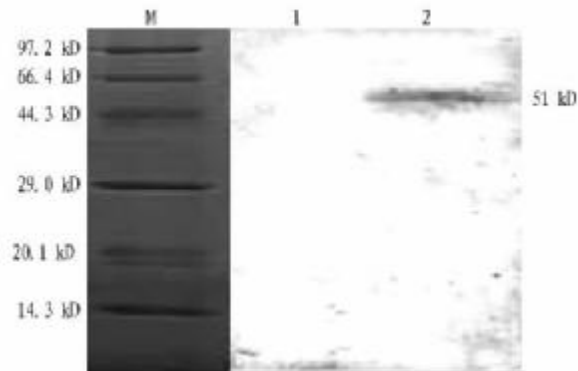


图 5 融合蛋白的纯化效果分析

Fig. 5 Effect analysis of fusion protein purification

2.5 融合蛋白的特异性鉴定 表达产物进行 Western Blot 检测,结果显示重组菌 FMDV-VP1-6p 诱导表达产物在约 51 kD 处出现清晰的特异性反应条带,而 pGEX-6p-1 空载体表达菌诱导表达产物无此条带。表明表达蛋白为预期的特异性蛋白(图 6)。



注:M. 标准蛋白质分子量;1. IPTG 诱导的 pGEX-6p-1/BL21 (4 h);2. IPTG 诱导的 FMDV-VP1-6p/BL21 (5 h)。

Note: M. Standard protein molecular weight marker;1. pGEX-6p-1/BL21 (4 h) with IPTG induction;2. FMDV-VP1-6p/BL21 (5 h) with IPTG induction.

图 6 重组质粒转化菌诱导表达产物的 Western Blot 分析

Fig. 6 Western Blot analysis of product expressed in bacteria transformed by recombinant plasmid

3 讨论

口蹄疫是一种全球流行性传染病,不仅影响畜牧业的发展,也给经贸活动特别是对外经济贸易带来严重影响。随着

分子生物学的发展及相关技术的进步,通过基因工程手段克隆并表达 FMDV 免疫相关基因,为口蹄疫的诊断和新型疫苗的研究提供了新思路。单克隆抗体技术已经证明 O 型口蹄疫病毒的主要保护性抗原表位在 VP1 上^[7-9],因此 VP1 基因在 FMD 研究中占有举足轻重的作用。

该试验以 pGEX-6p-1 为表达载体,经 PCR 和双酶切鉴定,同时经测序和与 GenBank 中已发表序列比对,证明目的基因已和表达载体成功连接。pGEX-6p-1 表达载体的 GST 基因可与插入的 VP1 成熟蛋白基因进行融合表达,能在一定程度上增加蛋白的可溶性。该研究得到的目的蛋白 FMDV-VP1-6p 以可溶性和包涵体 2 种形式存在,通过 Western Blot 鉴定,能与猪抗 FMDV 高免血清发生免疫学反应,说明得到的蛋白具备较好的免疫原性。对 FMDV-VP1-6p 可溶性表达产物,利用 GST 琼脂糖亲和层析进行纯化,获得了高纯度 FMDV-VP1-6p。该重组猪 O 型口蹄疫 VP1 融合蛋白的获得,为将来以之作为包被抗原,研制口蹄疫诊断试剂盒奠定了基础。

参考文献

- [1] 杨晓伟,姜平. 口蹄疫的流行新动态[J]. 畜牧与兽医,2005,37(9):53-55.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:459-464.
- [3] PARRY N R, BARNETT P V, PULDRIDGE E J, et al. Neutralizing epitopes of type o foot-and-mouth disease virus [J]. J Gen Virol,1989,70:1493-1503.
- [4] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京:学苑出版社,1985:395-414.
- [5] MATEU M G, VALERO M L, ANDREU D, et al. Systematic replacement of amino acid residues virus and effect on cell recognition[J]. J Biological Chemistry,1996,271:12814-12819.
- [6] 柳晓省. 口蹄疫研究进展[J]. 中国兽医科技,1999,29(3):17-22.
- [7] CROWTHER J R, FARIAS S, CARPENTER W C, et al. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants [J]. J Gen Virol,1993,74:1547-1553.
- [8] FU W, CHEN L, XIONG Y, et al. Cloning and prokaryotic expression of VP1 gene of foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O[J]. Agricultural Science & Technology,2008,9(5):55-58,154.
- [9] KITSON J D A, MCCAHERON D, BELSHAM G J. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites [J]. Virology,1990,179:26-34.
- [10] 蒲静,张伟,段向英,等. 口蹄疫病毒非结构蛋白基因的克隆表达及免疫活性的研究[J]. 动物医学进展,2007,28(12):6-12.
- [11] ZHAO H, ZHOU J C, LI J G, et al. Study on the cloning and isolation of *sus scrofa* GPX2 gene by RACE method [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(1):24-28.
- [12] ZHANG Y X, WU H X, ZHU J B, et al. Prokaryotic expression of *Pseudomonas aeruginosa* Lipase gene [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(5):59-62.
- [12] 彭立凤,赵汝淇,谭天伟. 微生物脂肪酶的应用[J]. 食品与发酵工业,2000,26(3):68-73.
- [13] SUKUMAR M, RIZO J, WALL M, et al. The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by nuclear magnetic resonance and circular dichroism [J]. Protein Sci,1995,4:1718-1729.
- [14] 张灏,夏雨,傅晓燕,等. 耐热 β -半乳糖苷酶基因 *bgab* 在枯草芽孢杆菌中的整合表达[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(6):1-4.
- [15] XIE J W, SHEN Z Q, WANG J L, et al. Cloning and prokaryotic expression of NS1 gene of porcine parvovirus (PPV) SD1 strain [J]. Agricultural Science & Technology, 2007,8(3/4):59-63.
- [16] CHEN Z Q, WU K X, LIANG X D, et al. Prokaryotic expression of rubber elongation factor gene and preparation of its polyclonal antibody [J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(4):29-33.

(上接第 15385 页)

- [5] Schmid R D, Verger R. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications [J]. Angew Chem Int Ed,1998,37:1608-1633.
- [6] SVEN PANKE, WUBBOLTS M G. Enzyme technology and bioprocess engineering [J]. Biotechnology,2002,13:111-116.
- [7] VANETE T. Soccoco The realm of microbial lipases in biotechnology [J]. Biotechnol Appl Biochem,1999,29:119-131.
- [8] GHOSH P K, SAXENA R K, RANI GUPTA, et al. Microbial lipase: production and applications [J]. Science Progress,1996,79(2):119-157.
- [9] GILBERT E J, CORNISH A, JONES C W. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2 [J]. Jgen Microbiol,1991,137:2223-2229.
- [10] 龚树华. 生物柴油的研究进展 [J]. 山西化工,2006,26(4):37-39.
- [11] 彭立凤. 有机介质中脂肪酶催化反应在有机合成中的应用 [J]. 生物工程进展,1999,19(5):61-66.