

文章编号: 1000-5862(2015)05-0502-05

Burkholderia cepacia XYU-6 脂肪酶的 克隆及其细胞表面展示

黎小军¹ 林陈水²

(1. 新余学院医学与生命科学学院, 江西 新余 338000;

2. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310032)

摘要: 通过分析 GenBank 中 *Burkholderia cepacia* 脂肪酶的序列, 设计简并引物, 采用同源克隆的策略, 成功地从 *B. cepacia* XYU-6 菌株中克隆到脂肪酶基因 *bcl*, 其大小为 1 095 bp, 编码 364 个氨基酸(GenBank 登陆号 KR233260)。将 *bcl* 基因与质粒 pET-28b(+) 连接并转化大肠杆菌, 使脂肪酶 BCL 的大肠杆菌胞内过表达, 其活力是野生菌的 12.9 倍。通过将 *bcl* 基因克隆到细胞表面展示载体 pZXL 中, 构建脂肪酶 BCL 的细胞表面展示工程菌, 使 BCL 在 Lpp-OmpA 引导下定位于大肠杆菌细胞表面, 其活力是野生菌的 3.9 倍。研究结果为脂肪酶 BCL 后续分子改造和应用奠定基础。

关键词: 脂肪酶; 克隆; 细胞表面展示; 表达

中图分类号: Q 812 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.05.13

0 引言

脂肪酶(EC 3.1.1.3) 是一种重要工业酶类, 广泛应用于食品、化工、制药等诸多领域^[1-2]。脂肪酶广泛存在于自然界中的各种生物体内^[3]。与动植物来源的脂肪酶相比, 微生物脂肪酶具有底物谱广、温度和 pH 值适应范围广等特点, 是工业用脂肪酶最重要来源。来源于假单胞菌的脂肪酶具有立体选择性高和有机溶剂耐受性好等优点被广泛用于手性醇的有机合成^[4-5]。

从自然界筛选获得的野生型微生物菌株脂肪酶表达量低、成分复杂且不稳定, 远不能满足工业生产的需要^[2, 6]。随着大量的酶基因序列、微生物基因组序列的公布, 为采用同源克隆的策略从野生菌株中克隆出脂肪酶基因创造了条件。

在前期研究中从土壤中筛选到高产脂肪酶的菌株 *Burkholderia cepacia* XYU-6 的基础上^[7], 本研究拟通过同源克隆的方法, 从该野生菌中克隆脂肪酶基因, 并尝试在大肠杆菌中进行胞内过表达和细胞表面展示, 为其后续分子改造和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 *Burkholderia cepacia* XYU-6 为课题组前期从土壤中筛选、鉴定和保存^[7]; 宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保存; 大肠杆菌胞内表达载体 pET-28b(+) 为 Novagen 公司产品, 细胞表面展示载体 pZXL 为课题组前期构建并保存^[8]。

1.1.2 酶与试剂 *Pfu* DNA 聚合酶、*LA-Taq* DNA 聚合酶为 Takara 公司产品; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 Fermentens 公司; 卡那霉素和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 购自 Sigma 公司; 基因组提取试剂盒、DNA 回收试剂盒和质粒抽提试剂盒均为 Axygen 公司产品; PCR 引物委托上海生工生物工程有限公司合成; 其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶基因 *cpl* 的获得 对 GenBank 中已有的来源于 *B. cepacia* 的脂肪酶编码序列(GenBank 登陆号分别为 HM803235、FJ638612、M58494、AY682925、EU280313、DQ078752、DQ075249 和

收稿日期: 2015-03-21

基金项目: 江西省青年科学基金(20122BAB214011) 资助项目。

作者简介: 黎小军(1979-) 男, 江西南康人, 副教授, 博士, 主要从事应用微生物与基因工程方面的研究。

A22239 等) 进行 Blast 分析, 序列同源性很高. 采用同源克隆的策略, 设计了一对用于脂肪酶基因扩增的简并引物 JB-S (5'-ATGGCCARRWCGATGCGT-TCC-3') 和 JB-A (5'-TTACACGCCCGCSAGYTTTCAG-3'), 以 *B. cepacia* XYU-6 基因组 DNA 为模板, 在 *Pfu* DNA 聚合酶作用下进行 PCR. PCR 程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 80 s, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温 10 min. PCR 产物经质量分数为 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后送样测序, 获得脂肪酶基因 *cpl*.

1.2.2 大肠杆菌胞内表达质粒与工程菌的构建 设计引物 BCL1-S (5'-CATGCCATGGCCGACGAC-TACGCGACGTG-3', 下划线部分为 *NcoI* 酶切位点) 和 BCL1-A (5'-TGCTCTAGATTACACGCCCGCGAGCTTC-3', 下划线部分为 *XbaI* 酶切位点), 以 *B. cepacia* XYU-6 基因组 DNA 为模板, 在 *Pfu* DNA 聚合酶作用下进行 PCR. PCR 产物经电泳、切胶回收, 进行 *NcoI/XbaI* 双酶切处理, 连接到同样酶切处理的表达载体 pET-28b(+) 后, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 涂布于终浓度为 50 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 培养过夜. 挑取单克隆进行菌落 PCR 验证和测序证实, 构建工程菌 *E. coli* BL21(DE3) /pET28-*cpl*.

1.2.3 大肠杆菌细胞表面展示系统的构建 设计引物 BCL2-S (5'-GCCGACGACTACGCGACGTG-3') 和 BCL2-A (5'-TTACACGCCCGCGAGCTTCAG-3'), 以 *B. cepacia* XYU-6 基因组 DNA 为模板, 在 *LA-Taq* DNA 聚合酶作用下进行 PCR. PCR 产物经切胶回收, T/A 克隆到细胞表面展示型 T 载体 pZXL-T (由载体 pZXL 经 *XcmI* 酶切处理得到, 处理方法见文献 [8]), 转化 *E. coli* BL21(DE3), 涂布于终浓度为 50 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 培养过夜. 挑取单克隆进行菌落 PCR 验证和测序证实, 获得 *B. cepacia* XYU-6 脂肪酶的大肠杆菌细胞表面展示工程菌 *E. coli* BL21(DE3) /pZXL-*cpl*.

1.2.4 脂肪酶的诱导表达 将本文 1.2.2 节和 1.2.3 节获得的工程菌分别接种于添加 50 mg · L⁻¹ 卡那霉素的 LB 培养基, 37 °C 培养过夜. 然后按 1% 的接种量接种 LB 培养基, 37 °C、200 r · min⁻¹ 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 加入终浓度为 0.1 mol · L⁻¹ 的 IPTG, 28 °C 诱导 10 h.

1.2.5 酶活的测定 以对硝基苯棕榈酸酯 (pNPP) 为底物, 参照文献 [9] 方法, 根据 405 nm 吸收值的变化快速测定脂肪酶活力. 每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个活力单位 (U).

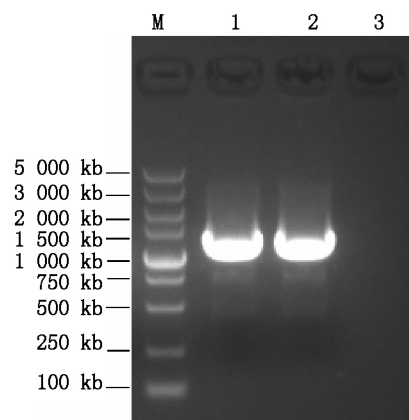
1.2.6 重组脂肪酶细胞定位分析 参照文献 [8] 对诱导表达的工程菌细胞进行蛋白酶 K 敏感性试验, 比较蛋白酶处理前后细胞活力的变化, 分析重组脂肪酶在大肠杆菌细胞的定位.

1.2.7 脂肪酶序列分析 DNAMAN 软件预测脂肪酶的氨基酸序列; 采用 NCBI 中的 BLAST 功能和 CLUSTAL W 对脂肪酶氨基酸序列进行分析和同源序列比对; 利用在线分析服务 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对脂肪酶 BCL 进行信号肽序列分析^[10].

2 结果与分析

2.1 脂肪酶基因的克隆与序列分析

通过对 GenBank 中部分来源于 *B. cepacia* 脂肪酶编码序列进行分析, 设计简并引物 JB-S 和 JB-A, 采用同源克隆的策略, 以提取的 *B. cepacia* XYU-6 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得了大小约为 1.1 kb 的脂肪酶基因 *cpl* (见图 1). 测序结果表明, *cpl* 基因全长 1 095 bp, 序列已提交到 GenBank 数据库 (登陆号 KR233260). DNAMAN 软件预测其编码 364 个氨基酸.



M-DL5000 DNA marker; 1-2-PCR 产物; 3-对照.

图 1 PCR 扩增脂肪酶基因

NCBI 数据库 BLAST 分析表明 CPL 与数据库中的其他来源于 *B. cepacia* 脂肪酶同源性较高, 其比对结果见图 2. 其中 CPL 与来自 *B. cepacia* S31 的脂肪酶 LipA (FJ638612) 同源性最高, 仅 5 个氨基酸残基不同, 同源性高达 98.5%. SignalP4.1 分析表明脂肪酶 CPL 的 N 端 1~44 个氨基酸是信号肽序列, 其成熟肽由 320 个氨基酸组成, 该分析结果与 Wang Xi-aoning 等^[11] 对 *B. cepacia* ATCC 25416 脂肪酶的分析结果一致.

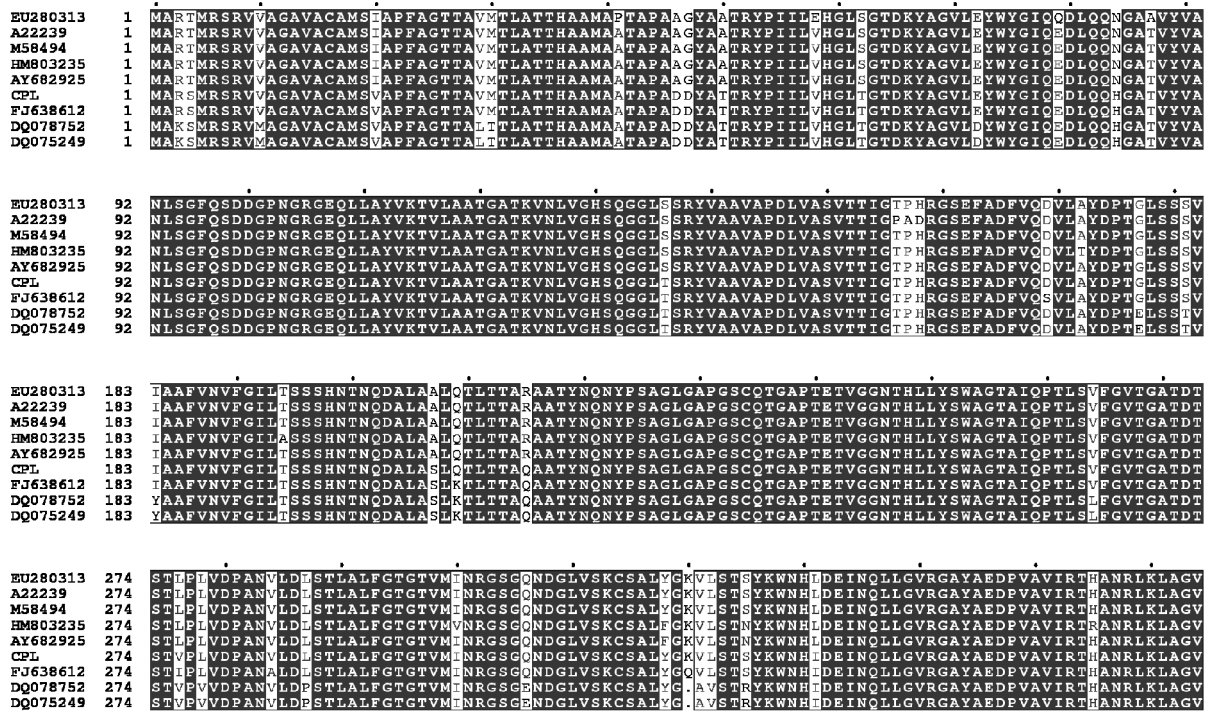


图2 脂酶CPL与来源于*B. cepacia*脂酶的多重比对

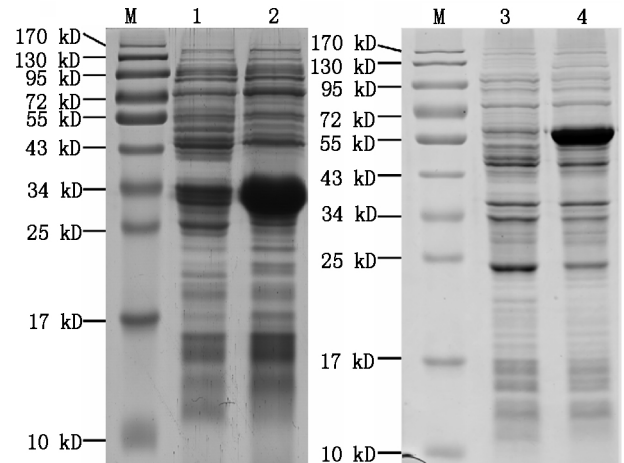
2.2 重组脂酶的诱导表达

根据 SignalP4.1 分析结果,设计引物,扩增只编码成熟肽的 *cpl* 基因,分别连接到胞内表达载体 pET28 和细胞表面展示载体 pZXL,并转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3). 测序结果证实外源基因 *cpl* 插入位置正确,ORF 正确,成功构建了 BCL 的胞内表达和细胞表面展示工程菌. *E. coli* BL21(DE3) /pET28-*cpl* 和经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 分析表明在 35 kD 附近出现了明显的特异蛋白条带,而未诱导的对照中则没有出现该条带(见图 3),说明 CBL 在大肠杆菌细胞中成功表达,且表达量较高;*E. coli* BL21(DE3) /pZXL-*cpl* 经 IPTG 诱导后则表达 55 kD 左右的特异蛋白条带,且分子量与预期相符,说明脂酶已经与载体上编码的锚定蛋白 Lpp-OmpA 融合,并成功表达. Lpp-OmpA 由来源于大肠杆菌的脂蛋白(Lpp)的信号肽序列加上 N-端的前 9 个氨基酸残基,以及同样来源于大肠杆菌的外膜蛋白 A(OmpA)的跨膜结构域这两部分组成,能有效地将外源蛋白以 C-末端融合方式跨越外膜并定位于大肠杆菌细胞表面,是一种典型的 C 端融合载体蛋白^[12-43].

2.3 BCL 的细胞定位分析

由于蛋白酶 K 不能跨越细胞膜进入到细胞内部,只能对位于细胞表面的蛋白质产生降解作

用^[8, 14],因此对诱导表达后大肠杆菌细胞加入蛋白酶 K 预处理,进行酶活测定并比较蛋白酶处理前后细胞脂酶活力的变化.从图 4 可知,经蛋白酶 K 处理后胞内表达脂酶 BCL 的大肠杆菌活力变化不大,而同样经过蛋白酶 K 处理的 *E. coli* BL21(DE3) /pZXL-*cpl* 的酶活不到处理前的 10%. 实验结果说明细胞内表达产生的 Lpp-OmpA-BCL 融合蛋白经 Lpp-OmpA 引导成功定位于大肠杆菌细胞表面,也就是达到了细胞表面展示的预期目标.



M 为蛋白质分子量标准;1 和 2 分别为未诱导和诱导的 *E. coli* BL21(DE3) /pET28-*cpl* 菌体蛋白;3 和 4 分别为未诱导和诱导的 *E. coli* BL21(DE3) /pZXL-*cpl* 菌体蛋白.

图3 脂酶CPL的诱导表达

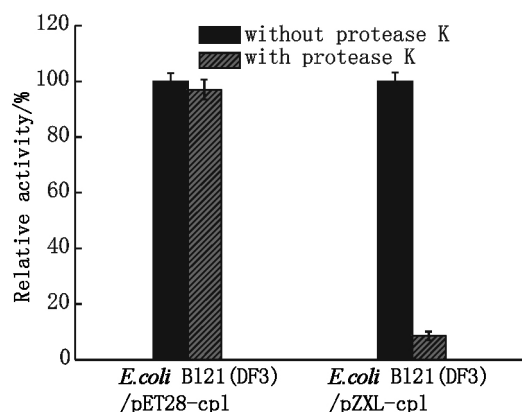


图4 蛋白酶K处理对重组细胞活力的影响

2.4 活力分析

以 pNPP 为底物,分别测定经 IPTG 诱导后的 *E. coli* BL21 (DE3) /pET28-cpl 和 *E. coli* BL21 (DE3) /pZXL-cpl 的发酵液,以及野生菌 *B. cepacia* XYU-6 发酵液的脂肪酶活力,结果见表 1。从表 1 可以发现,不管是细胞内表达 BCL 还是细胞表面展示 BCL 的大肠杆菌细胞的活力均高于原始菌 *B. cepacia* XYU-6,分别是野生菌活力的 12.9 倍和 3.9 倍。而细胞表面展示有 BCL 的大肠杆菌活力远远低于胞内表达 BCL 的重组大肠杆菌细胞活力,只有其活力的 30.3%。这可能是跟表达量更低有关,也可能是跟 BCL 与锚定蛋白 Lpp-OmpA 融合表达,影响其正确折叠有关^[15]。

表1 不同细胞的脂肪酶活力

样品	酶活/(U · L ⁻¹)	相对值
<i>B. cepacia</i> XYU-6	8.4	1.0
<i>E. coli</i> BL21(DE3) /pET28-cpl	108.2	12.9
<i>E. coli</i> BL21(DE3) /pZXL-cpl	32.8	3.9

3 结论

本研究通过分析 GenBank 中 *B. cepacia* 脂肪酶的序列,设计简并引物,采用同源克隆的策略,成功地从课题组筛选的 *B. cepacia* XYU-6 菌株中克隆到脂肪酶基因 *bcl* (GenBank 数据库登陆号 KR233260),其大小为 1 095 bp,编码 364 个氨基酸,BCL 的氨基酸序列与已报道的来源于 *B. cepacia* S31 的脂肪酶 LipA 同源性高达 98.5%。SignalP4.1 分析表明脂肪酶 BCL 的 N 端 44 个氨基酸是信号肽序列,其成熟肽由 320 个氨基酸组成。设计引物,将编码成熟肽的 *bcl* 基因与质粒 pET-28b(+) 连接并

转化大肠杆菌,构建了 BCL 的大肠杆菌胞内表达工程菌,活力是野生菌的 12.9 倍。同时将编码 BCL 成熟肽序列克隆到细胞表面展示载体 pZXL-T 中锚定单元 Lpp-OmpA 编码序列下游,使脂肪酶在 Lpp-OmpA 引导下定位于大肠杆菌细胞表面,成功构建脂肪酶 BCL 的细胞表面展示工程菌,活力是野生菌的 3.9 倍。本研究为 *B. cepacia* XYU-6 脂肪酶的分子改造和应用奠定基础。

4 参考文献

- [1] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 235-251.
- [2] Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004, 118: 155-170.
- [3] Treichel H, de Oliveira D, Mazutti M A, et al. A review on microbial lipases production [J]. *Food and Bioprocess Technology* 2010, 3: 182-196.
- [4] Jaeger K E, Liebeton K, Zonta A, et al. Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 46: 99-105.
- [5] 彭仁, 林金萍, 魏东芝. 耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选和鉴定 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 35(2): 197-200.
- [6] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology [J]. *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13: 390-397.
- [7] 黎小军, 谢莲萍, 刘建宏, 等. 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版*, 2014, 38(1): 14-18.
- [8] 黎小军, 林陈水, 胡军民. 有机磷水解酶的大肠杆菌细胞表面展示 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版*, 2010, 34(1): 93-97.
- [9] Li Xiaojun, Zheng Renchao, Wu Zheming, et al. Thermophilic esterase from *Thermomyces lanuginosus*: Molecular cloning, functional expression and biochemical characterization [J]. *Protein Expression and Purification* 2014, 101: 1-7.
- [10] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods* 2011, 8: 785-786.
- [11] Wang Xiaoqing, Yu Xiaowei, Xu Yan. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*,

- 2009 ,45: 94-102.
- [12] Bae W ,Chen W ,Mulchandani A ,et al. Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins [J]. *Biotechnology and Bioengineering* 2000 ,70: 518-524.
- [13] Francisco J A ,Earhart C F ,Georgiou G. Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ,1992 ,89: 2713-2717.
- [14] Takayama K ,Suye S ,Kuroda K ,et al. Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology Progress* 2006 ,22: 939-943.
- [15] 侯玥 ,孙非 ,金惊 ,等. 融合蛋白表达过程中 N 末端蛋白对下游蛋白正确折叠的影响 [J]. *高等学校化学学报* , 2014 ,35(2) : 303-308.

The Cloning and Cell Surface Display of a Lipase from *Burkholderia cepacia* XYU-6

LI Xiaojun¹ ,LIN Chenshui²

(1. School of Medicine and Life Sciences ,Xinyu University ,Xinyu Jiangxi 338004 ,China;

2. College of Pharmaceutical Science Zhejiang University of Technology ,Hangzhou Zhejiang 310032 ,China)

Abstract: The lipase gene *bcl* was isolated from *Burkholderia cepacia* XYU-6 by homologous cloning method using degenerate primers ,which was design based on the analyzing the sequences of lipases from *B. cepacia*. The gene *bcl* contained a 1 095 bp open reading frame encoding a protein of 364 amino acids (GenBank accession number: KR233260) . The gene *bcl* was cloned into the expression vector pET-28b(+) ,and intracellular overexpressed in biologically active in *Escherichia coli*. Meanwhile ,the gene *bcl* was cloned into the cell-surface display vector pZXL and transformed into *E. coli*. The lipase BCL was successfully achieved on the cell surface of engineering strain using the anchoring motif Lpp-OmpA. The two recombinant strains demonstrated 12. 9-fold and 3. 9-fold of lipase activity compared to the wild *B. cepacia* XYU-6 ,respectively. This study paves the way for the further research of the lipase for protein engineering and application in the industry.

Key words: lipase; cloning; cell surface display; expression

(责任编辑: 刘显亮)