

黎小军,蔡礼年,郑建永.杜邦嗜热菌脂肪酶在黑曲霉中的异源表达[J].江西师范大学学报(自然科学版) 2022 46(5):503-507.
LI Xiaojun, CAI Linian, ZHENG Jianyong. The heterologously expression of *Thermomyces dupontii* lipase in *Aspergillus niger* [J]. Journal of Jiangxi Normal University(Natural Science) 2022 46(5):503-507.

文章编号:1000-5862(2022)05-0503-05

杜邦嗜热菌脂肪酶在黑曲霉中的异源表达

黎小军¹,蔡礼年²,郑建永³

(1. 新余学院基础医学教研室,江西 新余 338004;2. 浙江大学化学工程与生物工程学院,浙江 杭州 310027;

3. 浙江工业大学生物工程学院,浙江 杭州 310032)

摘要:该文将杜邦嗜热菌脂肪酶 TDL2 在黑曲霉系统中异源表达,并考察 TDL2 自带信号肽和 pCAMBIA 质粒信号肽对脂肪酶 TDL2 表达的影响.利用 PCR 和无缝克隆技术,将脂肪酶 TDL2 的编码序列与质粒 pCAMBIA0380 线性片段拼接,分别构建利用 β -葡萄糖苷酶 bgl2 的信号肽的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和利用 TDL2 信号肽序列的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-2.用根瘤农杆菌介导转化宿主细胞 *A. niger* CICC 2213 构建组成型黑曲霉工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2.在发酵 120 h 后其发酵单位分别达到 $18.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $38.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,实现了脂肪酶 TDL2 在黑曲霉中的异源表达. SDS-PAGE 分析和活力测定结果表明:利用脂肪酶 TDL2 信号肽的工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 比利用 bgl2 信号肽的工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 的表达量更大、发酵单位更高.

关键词:黑曲霉;脂肪酶 TDL2;杜邦嗜热菌;信号肽;异源表达

中图分类号:Q 786 文献标志码:A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2022.05.10

0 引言

热稳定酶因其良好的热稳定性和溶剂稳定性而具有很好的生物技术和工业应用潜力^[1-3],备受学术界和工业界的关注.嗜热菌是热稳定酶的重要来源^[1],不断有新的热稳定酶基因从嗜热菌中被克隆表达.杜邦嗜热菌(*Thermomyces dupontii*)是近年来被研究较多的一种嗜热真菌,过去其命名比较混乱,曾用名有 *Talaromyces thermophilus*、*Thermomyces thermophilus* 和 *Talaromyces dupontii* 等,现被统一命名为 *Thermomyces dupontii*^[4-5].

在笔者的前期研究^[6]中,通过基因挖掘的策略结合 RACE 技术,从 *T. dupontii* ATCC 16461 菌株中克隆到脂肪酶 TDL2,在大肠杆菌和毕赤酵母中异源表达后发现其对 2-羧乙基-3-氰基-5-甲基己酸乙酯(CNDE)表现出优良的立体选择性,生成普瑞巴林手性中间体(3S)-2-羧乙基-3-氰基-5-甲基己酸.笔者前期研究还发现:TDL2 在大肠杆菌中异源表达活

力非常低,其主要原因是大部分酶蛋白形成了包涵体.黑曲霉被 FDA 划分为“通常是安全的”微生物;作为一种常见的丝状真菌,黑曲霉具有极强的蛋白分泌能力和较为完善的蛋白修饰能力,加上其培养成本低,已被广泛用于食品和工业酶制剂的生产中^[7].与异源表达常用的大肠杆菌表达系统相比,虽然黑曲霉表达系统转化难度更大,但它能有效地解决外源蛋白在大肠杆菌中形成包涵体的问题.

本文拟将杜邦嗜热菌脂肪酶 TDL2 在黑曲霉系统中异源表达,并考察 TDL2 自带信号肽和 pCAMBIA0380 质粒信号肽对脂肪酶 TDL2 表达的影响,为其应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 以 *A. niger* CICC 2213 作为黑曲霉表达宿主菌,购自中国工业微生物菌种保藏管

收稿日期:2022-04-12

基金项目:国家自然科学基金(31660247,31600639)资助项目.

作者简介:黎小军(1979—),男,江西赣州人,副教授,博士,主要从事生物催化与基因工程研究. E-mail: lxj341401@163.com

理中心 *E. coli* DH5 α 用于质粒的构建,携带一个辅助 Ti 质粒的根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 用于介导黑曲霉转化;黑曲霉表达实验所用质粒为 pCAMBIA0380^[8],含有黑曲霉的 β -葡萄糖苷酶 bgl2 的信号肽;携带脂肪酶 TDL2 完整 ORF 序列 (GenBank no. MN782511.1 876 bp) 的质粒 pGEM-T-TDL2 为笔者前期研究^[6]构建,用于 TDL2 基因的克隆。

1.1.2 试剂 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 购自 Vazyme, KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶购自 TOYOBO, DpnI 购自 TaKaRa; 卡那霉素、利福霉素和潮霉素 B 为 Sigma 公司产品;引物由常州基宇生物科技有限公司合成。

1.1.3 培养基 LB 培养基用于 *E. coli* DH5 α 和 *A. tumefaciens* AGL-1 的培养与筛选;PDA 培养基用于黑曲霉的培养;AM 培养基和 MM 培养基用于黑曲霉的转化和筛选实验。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 1) 利用载体 bgl2 信号肽的重组质粒构建。以 pGEM-T-TDL2 为模板,利用引物 L3P-S (tggtcctcctcggtgggtgccGAAGTCTCGCAGGA-TCTGCTCG) (在引物中的小写部分为设计用于无缝克隆的序列,下同) 和 L3-N (caggtttcgccacggagctTTA-ATCACACTCTGCAATGGCTCC) 进行 PCR 扩增,获得不含信号肽的 TDL2 编码序列;同时以 pCAMBIA0380 为模板,利用引物 p-S (AGCTCCGTGGCGA-AAGCCTG) 和 p-N (GGCACCCACGGAGGGAGCC) 进行扩增包含 bgl2 信号肽的质粒序列,扩增完成后立即加入 1 μ L DpnI,在 37 $^{\circ}$ C 下处理 1 h,去除质粒模板。PCR 体系均为 50.0 μ L,包含质粒模板 0.5 μ L、正反引物 (5 mmol \cdot L⁻¹) 各 1.0 μ L、KOD-Plus-Neo DNA 聚合酶 1.0 μ L。PCR 程序:94 $^{\circ}$ C 3min 98 $^{\circ}$ C 10 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min (在扩增 pCAMBIA0380 质粒时延伸时间改为 6 min) 30 个循环 68 $^{\circ}$ C 10 min,16 $^{\circ}$ C 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的基因扩增产物和 DpnI 处理的质粒载体扩增产物。回收的质粒 DNA 片段和基因片段利用 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 进行拼接,使用方法参照试剂盒说明。拼接液热击法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布含 Kan 的 LB 平板,于 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜。挑取 Kan 平板上的菌落,利用引物 YZ-S/YZ-A 进行菌落 PCR 验证,其中正向验证引物 YZ-S (TCGACCTGCTGAGGTC-CCTCAGTCC) 设计在质粒信号肽的上游中,反向验

证引物 YZ-A (TGAAGGAATGTCCGGGATATTCGGC) 设计在目的基因的 3' 端处。阳性克隆保存并进行测序验证,构建黑曲霉表达质粒 pCAMBIA-TDL2-1,用于后续试验。

2) 利用 TDL2 自身信号肽的重组质粒 (pCAMBIA-TDL2-2) 构建。方法和过程与 1) 利用载体信号肽的重组质粒构建完全相同,所不同的是在扩增包含信号肽的 TDL2 编码序列时引物为 L3-S (cgcttgagcagacatcacaATGAGAGGTTTTCTCGTGTCTTC) 和 L3-N,在扩增不包含 bgl2 信号肽的质粒序列时引物为 p-S 和 p-N (TGTGATGTCTGCTCAAGCGGGG)。

1.2.2 黑曲霉工程菌的构建 1.2.1 节构建并测序验证的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和 pCAMBIA-TDL2-2 均通过冻融法转化农杆菌 AGL-1。具体操作如下:向 *A. tumefaciens* AGL-1 感受态细胞中加入重组质粒 10 μ L,冰浴 5 min,液氮冷冻 5 min,37 $^{\circ}$ C 热激 5 min,冰浴 5 min,然后加入 1 mL LB 液体培养基,28 $^{\circ}$ C 复苏 4 h,涂布于含 50 μ g \cdot mL⁻¹ 卡那霉素和 50 μ g \cdot mL⁻¹ 利福霉素的 LB 培养基中,在 28 $^{\circ}$ C 下培养 3 d。在利用验证引物 YZ-S 和 YZ-A 进行菌落 PCR 验证后,阳性克隆保存并用于黑曲霉转化。

根瘤农杆菌介导转化黑曲霉的步骤参照 Cai Linian 等^[8]改良的方法进行,分别将 pCAMBIA-TDL2-1 和 pCAMBIA-TDL2-2 导入宿主细胞 *A. niger* CICC 2213 中。将活化的 *A. tumefaciens* AGL-1 和 *A. niger* CICC 2213 孢子悬液混合,并涂布于铺玻璃纸的 AM 琼脂上,于 22 $^{\circ}$ C 条件下共培养 48 h。取出玻璃纸,转移至含有 100 μ g \cdot mL⁻¹ 潮霉素 B 的 MM 平板上筛选。将筛选出的转化子接种到含有 100 μ g \cdot mL⁻¹ 潮霉素 B 的 PDA 平板上,然后传代至第 3 代,观察其生长情况,并提取基因组进行 PCR 验证,验证方法与根瘤农杆菌转化子的验证方法相同。

1.2.3 工程菌的表达 将构建的 2 个黑曲霉工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 分别接种到含有 100 μ g \cdot mL⁻¹ 潮霉素 B 的 PDA 平板上,在 30 $^{\circ}$ C 下培养 5 d,用无菌水制成孢子浓度为 10⁷ 个 \cdot mL⁻¹ 的孢子悬浮液。按 1% 的接种量接种发酵摇瓶 (在 500 mL 摇瓶中装有 100 mL 发酵培养基),在 30 $^{\circ}$ C 下培养 6 d。发酵液取样,用于 SDS-PAGE 分析和活力测定。在发酵结束后,发酵液经纱布过滤并离心,获得粗酶液。

1.2.4 酶活的测定 以对硝基苯月桂酸酯 (p-NPL) 为底物,通过在 405 nm 处吸收值的变化快速测定脂肪酶活力,测定方法和酶活定义参考文献 [9-10]。

2 结果与分析

2.1 杜邦嗜热菌脂肪酶 TDL2 黑曲霉工程菌的构建

根据笔者前期研究获得的 TDL2 序列(GenBank MN782511.1) 设计引物,以保存的质粒 pGEM-T-TDL2 为模板,PCR 扩增获得不含信号肽的 TDL2 编码序列(TDL2-1 810 bp) 和含信号肽的 TDL2 编码序列(TDL2-2 876 bp) ,两端各含有 20 bp 用于拼接的序列;同时以 pCAMBIA 为模板,PCR 扩增含 bgl2 信号肽序列的质粒线性片段(pCAMBIA-1) 和不含 bgl2 信号肽序列的质粒线性片段(pCAMBIA-2) . 利用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit ,采用无缝克隆技术,将 TDL2-1 与 pCAMBIA-1、TDL2-2 与

pCAMBIA-2 分别拼接,经筛选和测序验证,分别构建利用 pCAMBIA 质粒 bgl2 信号肽的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和利用脂肪酶 TDL2 信号肽的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-2. 质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和 pCAMBIA-TDL2-2 的图谱及构建过程如图 1 所示.

通过冻融法分别将重组质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和 pCAMBIA-TDL2-2 转化 *A. tumefaciens* AGL-1,验证后利用根瘤农杆菌介导转化 *A. niger* CICC 2213,经筛选和验证,成功构建黑曲霉工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2. 传代培养发现:黑曲霉转化子均能在含有 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素 B 的 PDA 平板上再次生长,且前后生长形态基本一致(见图 2) .

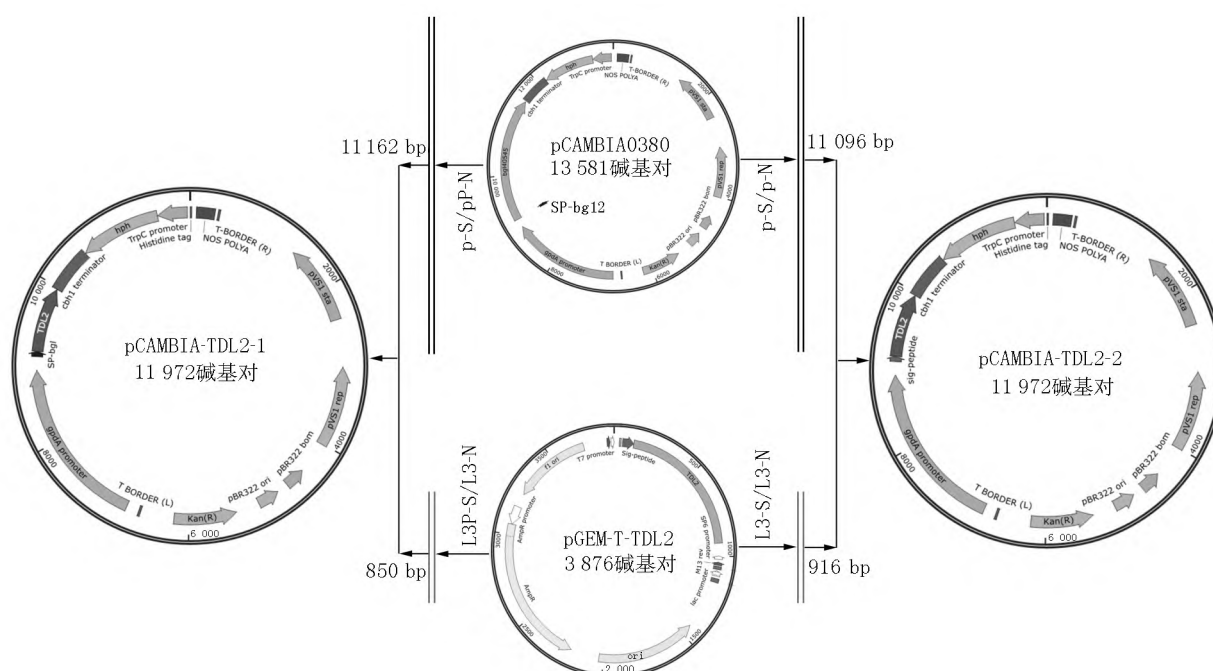
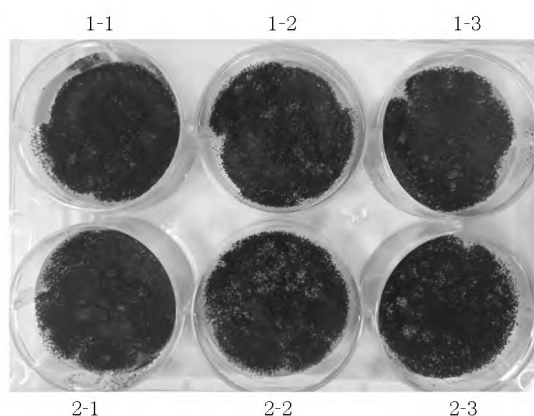


图1 重组质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和 pCAMBIA-TDL2-2 的构建

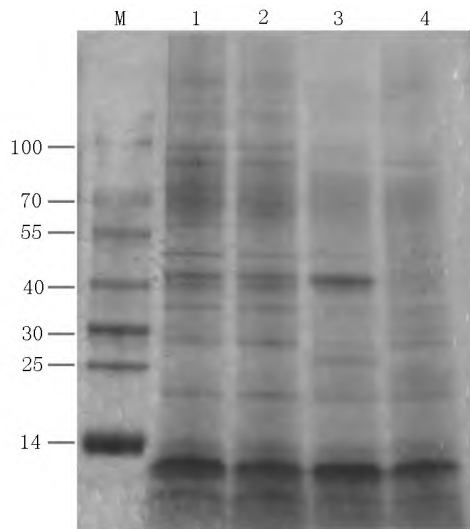


注:1-1、1-2 和 1-3 分别为 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 传代至第 1、2、3 代的结果,2-1、2-2 和 2-3 分别为 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 传代至第 1、2、3 代的结果.

图2 黑曲霉转化子的传代培养

2.2 异源表达分析

将构建的组成型黑曲霉工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 分别于 30°C 下培养 6 d,取发酵液进行 SDS-PAGE 分析(见图 3). 工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 在分子量为 40 kD 附近有明显的蛋白表达条带,其大小比预测的分子量略大,这可能原因是与酶蛋白糖基化有关. 作为对照的宿主菌 *A. niger* 没有该条带,这说明 TDL2 在 *A. niger* CICC 2213 中被成功表达. 从图 3 还可以看出:泳道 3 在分子量为 40 kD 处的条带比泳道 1 和泳道 2 的更明显,这说明利用脂肪酶 TDL2 自身信号肽的 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 的表达量比利用 bgl2 信号肽的 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 的表达量更大.



注: M 为蛋白分子量标准, 1 和 2 均为 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1, 3 为 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2, 4 为空白宿主菌 *A. niger* CICC 2213。

图 3 SDS-PAGE 分析

2.3 不同信号肽对表达的影响

以 pNPL 为底物, 测定了在发酵过程中的脂肪酶酶活, 在发酵过程中工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 的酶活如图 4 所示。工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 的发酵曲线相似, 前 48 h 发酵单位均比较低, 在发酵 120 h 后发酵单位达到最大值, 分别为 $18.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $38.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 该结果均高于笔者前期研究中脂肪酶 TDL2 在大肠杆菌中异源表达、低于毕赤酵母异源表达的发酵单位^[6]。另外 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 是 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 发酵单位的 2.07 倍, 相差较大, 此结果与 SDS-PAGE 分析的目的蛋白表达结果基本吻合, 这说明: 在构建的 2 个工程菌中, 利用脂肪酶 TDL2 自身信号肽比利用 pCAMBIA 质粒中 bgl2 信号肽更有利于脂肪酶 TDL2 的表达, 这导致其表达量更大、发酵单位更高。该结果也同时说明来源于 *T. dubonii* 的脂肪酶 TDL2 的信号肽序列能被黑曲霉

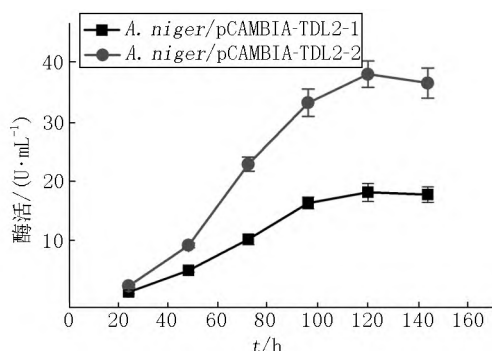


图 4 工程菌发酵曲线

表达系统识别, 这可能原因是与杜邦嗜热菌和黑曲霉同属丝状真菌有关。

3 结论

本文通过 PCR 技术和无缝克隆技术, 将来源于杜邦嗜热菌的脂肪酶 TDL2 的编码序列与质粒 pCAMBIA0380 线性片段拼接, 分别构建利用 β -葡萄糖苷酶 bgl2 信号肽的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-1 和利用 TDL2 自带信号肽的重组质粒 pCAMBIA-TDL2-2, 用根瘤农杆菌介导转化宿主细胞 *A. niger* CICC 2213, 成功构建组成型黑曲霉工程菌 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 和 *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2, 在发酵 120 h 后其发酵单位分别达到 $18.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $38.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 实现了脂肪酶 TDL2 在黑曲霉中的异源表达。SDS-PAGE 分析和发酵曲线结果表明: 脂肪酶 TDL2 自身信号肽序列能被黑曲霉识别, 且利用脂肪酶 TDL2 自身信号肽比利用 bgl2 信号肽更有利于脂肪酶 TDL2 在黑曲霉中的表达, 其表达量更大、发酵单位更高。研究结果为杜邦嗜热菌脂肪酶 TDL2 的应用奠定基础, 同时也为其他酶的黑曲霉表达提供参考。

4 参考文献

- [1] HAKI G D, RAKSHIT S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89(1): 17-34.
- [2] WILLIES S, ISUPOV M, LITTLECHILD J. Thermophilic enzymes and their applications in biocatalysis: a robust aldo-keto reductase [J]. *Environmental Technology*, 2010, 31(10): 1159-1167.
- [3] MAHESHWARI R, BHARADWAJ G, BHAT M K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 461-488.
- [4] HOUBRAKEN J, DE VRIES R P, SAMSON R A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2014, 86: 199-249.
- [5] DE OLIVERIA T B, GOMES E, RODRIGUES A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy [J]. *Extremophiles*, 2015, 19(1): 31-37.
- [6] LI Xiaojun, LI Qi, ZHAN Xingxin, et al. Expression and

- characterization of a thermostable lipase from *Thermomyces dupontii* [J]. Chemical Papers 2022 ,76(5) : 2811-2821.
- [7] 姚善泾,蔡礼年,林东强. 黑曲霉作为分泌蛋白细胞工厂的研究进展 [J]. 化工学报,2019 ,70(10) : 3690-3703.
- [8] CAI Linian ,XU Shengnan ,LU Tao ,et al. Directed expression of halophilic and acidophilic β -glucosidases by introducing homologous constitutive expression cassettes in marine *Aspergillus niger* [J]. Journal of Biotechnology 2019 , 292: 12-22.
- [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] 黎小军,林陈水. *Burkholderia cepacia* XYU-6 脂肪酶的克隆及其细胞表面展示 [J]. 江西师范大学学报(自然科学版) 2015 ,39(5) : 502-506.

The Heterologously Expression of *Thermomyces dupontii* Lipase in *Aspergillus niger*

LI Xiaojun¹ ,CAI Linian² ,ZHENG Jianyong³

(1. Department of Foundamental Medicine ,Xinyu University ,Xinyu Jiangxi 338004 ,China;

2. College of Chemical and Biological Engineering ,Zhejiang University ,Hangzhou Zhejiang 310027 ,China;

3. College of Biotechnology and Bioengineering ,Zhejiang University of Technology ,Hangzhou Zhejiang 310032 ,China)

Abstract: In this study ,the lipase TDL2 from *Thermomyces dupontii* is heterologously expressed in the *Aspergillus niger* and the effects on the expression of lipase TDL2 of signal peptides ,TDL2 and plasmid pCAMBIA are investigated. Using PCR and seamless cloning techniques ,the coding sequence of lipase TDL2 is spliced with the linear fragment of plasmid pCAMBIA0380 and the recombinant plasmid pCAMBIA-TDL2-1 using the signal peptide of β -glucosidase bgl2 and the plasmid pCAMBIA-TDL2-2 using the signal peptide of TDL2 are successfully constructed , respectively. Constitutive engineered *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 and *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 are successfully constructed by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The lipase TDL2 is heterologous expression of in *Aspergillus niger*. After 120 h of fermentation ,the fermentation units of *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 and *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 reach $18.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $38.3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,respectively. SDS-PAGE analysis and fermentation curve results show that *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-2 with the signal peptide of lipase TDL2 has higher expression levels and fermentation unit than *A. niger*/pCAMBIA-TDL2-1 with the signal peptide of bgl2.

Key words: *Aspergillus niger*; lipase TDL2; *Thermomyces dupontii*; signal peptide; heterologous expression

(责任编辑: 刘显亮)