

研究报告

定向进化-易错 PCR 方法提高华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的活力

王睿, 喻晓蔚, 沙冲, 徐岩

江南大学 教育部工业生物技术重点实验室 酿酒科学与酶技术中心, 无锡 214122

摘要: 运用定向进化-易错 PCR 的方法, 提高了华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的活力。经过两轮易错 PCR 和 *p*NPP 顶层琼脂法筛选, 从第一轮和第二轮突变库中分别筛选获得最佳突变株 1-11 和 2-28, 脂肪酶酶活与野生菌株相比分别提高 2 倍和 4 倍。基因比对结果表明, 突变脂肪酶 2-28 有 4 个氨基酸发生了突变: A129S、K161R、A230T、K322R。蛋白质分子空间结构模拟显示, 突变 A129S、K161R、A230T 位于脂肪酶分子表面。突变 A230T 增强了 α -螺旋盖结构的稳定性。突变 K322R 处在 loop 上, 靠近脂肪酶底物结合区域, 与邻近的 Asp(带负电)形成盐桥。静电引力将该 loop 向底物进入酶活性中心的通道口反方向牵引, 使底物分子更易进入酶活性中心。酶学性质研究表明, 突变株 2-28 脂肪酶的 K_m 值比出发菌株下降了 10%, K_{cat} 值提高为原来的 2.75 倍。

关键词: 定向进化, 易错 PCR, 华根霉脂肪酶, 脂肪酶活力

Increasing activity of *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 lipase by directed evolution-error prone PCR

Rui Wang, Xiaowei Yu, Chong Sha, and Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Directed evolution strategy (error-prone PCR) was conducted to improve the activity of lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. Through two rounds of ep-PCR and *p*NPP top agar screening, two optimum mutant strains 1-11 and 2-28 were obtained with 2 and 4 fold of enzyme activity higher than that of parent strain, respectively. DNA sequencing of mutant lipase 2-28 revealed four amino acid substitutions: A129S, K161R, A230T, K322R. According to the simulated protein structure of *Rhizopus chinensis* lipase, A129S, K161R, A230T were located on the surface of the protein. A230T substitution improved the stability of the α -helix loop. K322R, near the catalytic center of lipase, located at a loop, formed a salt-bridge with a nearby aspartic acid (negative charged). Electrostatic force pulled the loop to the opposite direction of the substrate channel and made it easier for substrate to enter the lipase catalytic domain. Purified lipase was characterized and the result showed that K_m of 2-28 lipase decreased by 10% compared with K_m of the parent lipase, and K_{cat} was 2.75 fold improved than that of the original lipase.

Received: September 28, 2009; **Accepted:** November 2, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20802027), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2009AA101500, 2008AA10Z304, 2007AA100401, 2006AA020202), National Key Technology R&D Program in the 11th Five-year Plan of China (No. 2008BA163B07), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0532).

Corresponding author: Yan Xu. Tel: +86-510-85918201; Fax: +86-510-85864112; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Xiaowei Yu. E-mail: bioyuxw@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 20802027), 国家高科技研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2009AA101500, 2008AA10Z304, 2007AA100401, 2006AA020202), “十一五”国家科技支撑计划重大项目 (No. 2008BA163B07), 长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT0532) 资助。

Keywords: directed evolution, error-prone PCR, *Rhizopus chinensis* lipase, lipase activity

微生物是脂肪酶(EC 3.1.1.3)的一个重要来源,而根霉又是微生物脂肪酶的重要生产菌。如今,已有超过 30 种根霉脂肪酶实现了商品化生产^[1]。根霉脂肪酶大都具有高度 1,3-位置选择性,因此常用于油脂加工中。此外,根霉脂肪酶还具有稳定性佳、转化效率高等优点,被广泛应用于芳香酯、生物柴油、手性化合物的生产中^[2-4]。

本研究室在前期研究中从酿造浓香型大曲酒的酒曲中筛选到一株华根霉,从中克隆得到脂肪酶基因 *proRCL* (GenBank Accession No. EF405962), 并成功实现了在毕赤酵母中的高效表达^[5]。为了获得更高催化效率的酶,加速其在工业生产上的应用进程,采用定向进化(易错 PCR)的方法,向该酶中随机引入突变,建立华根霉脂肪酶基因突变文库,再结合 *pNPP* 顶层琼脂筛选的方法,获得了催化效率提高的脂肪酶突变株。

定向进化具有两个关键因素^[6]: 其一是建立较大容量的突变文库。对于分子量为 37 kD 的华根霉脂肪酶来说,具有高催化活力的目的转化子的获得,需要建立一个容量为 1×10^5 的易错 PCR 突变文库;其二是建立高通量的筛选方法。本课题建立了利用 *pNPP* 顶层琼脂法初筛和 96 孔板发酵复筛的筛选体系。该筛选体系能够灵敏、快速、准确地筛选具有高水解活力的脂肪酶突变菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂(TaKaRa 宝生物公司),引物(上海生物工程技术有限公司合成),DL2000 DNA Ladder Maker、E10000 DNA Ladder Maker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司),Plasmid Mini Kit I(OMEGA BIO-TEK),Stirred Ultrafiltration Cell 8050 Ultrafiltration Membrane(Millipore Corporation, Bedford, USA),SP-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose 6 FF (Pharmacia 公司),其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 菌株和质粒

E. coli JM109、巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021 由本实验室保存。重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 由本实验室构建,载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 培养基

酵母培养基 YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 和 YPD-G418 按“Invitrogen 公司操作手册”方法配制。

1.2 方法

1.2.1 *proRCL* 基因中 *Sal I* 酶切位点的定点突变

以重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 为模板(本实验室构建),设计如下 4 条引物,F 和 R 为基因上下游引物,Fm 和 Rm 为突变位点的上下游引物。F: 5'-TCAAGAT CCCTAGGGTTCCTGTTGGTCATAAAGGTTTC-3'; F_m: 5'-GC ATTCGCTTACTACGTTGACAGCACC GG-3'; R_m: 5'-GGTG CTGTCAACGTAGTAAGCGAATG-3'; R: 5'-AATCCAGT GCGGCCGCTTACAAACAGCTTCCTTCG-3'。其中下划线部分为 *Avr II* 和 *Not I* 酶切位点,粗体部分是 *Sal I* 酶切位点,由 *GTCGAC* 突变成 *GTTGAC*。分别以 F/R_m 以及 F_m/R 为引物,扩增出含有突变位点的片段 A 和 B。

PCR 扩增条件: 94°C 预变性 3 min; 94°C 1 min, 64°C 45 s, 72°C 1 min, touchdown 程序,退火温度由 63°C 降至 51°C,共 14 个循环; 72°C 延伸 10 min。

PCR 产物纯化后,作为第二次重叠 PCR 的模板。向 PCR 体系中加入等摩尔的片段 A 和 B,不加入引物,交错延伸 5 个循环,PCR 扩增条件为: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 59°C 1 min, 72°C 1 min。然后加入引物 F 和 R,进行 30 个循环的扩增,PCR 扩增条件为: 95°C 3 min; 94°C 1 min, 59°C 45 s, 72°C 2 min,共 30 个循环; 72°C 10 min。突变基因命名为 *proRCL'*。

限制性内切酶 *Avr II* 和 *Not I* 分别对突变基因 *proRCL'* 和表达 pPIC9K 进行消化,将消化后的载体与基因片段连接,构建表达质粒 pPIC9K-*proRCL'*。上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.2 易错 PCR 扩增与突变文库的构建

以 pPIC9K-*proRCL'* 为模板,易错 PCR 向 *proRCL'* 基因中随机引入突变。50 μL 易错 PCR 体系如下: 5 μL 10×易错 PCR 缓冲液 (500 mmol/L KCl, 70 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.1% (W/V),

明胶)); 0.5 mmol/L dATP/dGTP, 2.5 mmol/L dCTP 和 dTTP; 引物 F/R 各 40 pmol; MgCl₂ 7 mmol/L; MnCl₂ 0.3 mmol/L; Taq DNA 聚合酶 2.5 U, ddH₂O 补至 50 μ L。

PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 59 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

易错 PCR 扩增产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后, 限制性内切酶 *Avr II* 和 *Not I* 分别对易错 PCR 扩增产物和质粒 pPIC9K 进行消化、连接, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞。涂布于 LB(含 100 μ g/ μ L 的 Amp) 平板。生长 12 h 后, 将转化子转移至 LB 液体培养基中培养, 获得突变质粒。

将突变质粒经限制性内切酶 *Sal I* 线性化后, 电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。取 8 μ L 浓度为 1 μ g/ μ L 的线性化质粒与 80 μ L 感受态细胞混合均匀, 转至 0.2 cm 冰预冷的电激杯中。冰上放置 5 min, 电压 1500 V, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω , 进行电击。立刻加入 1 mL 1 mol/L 山梨醇复苏, 30 $^{\circ}$ C 培养 1 h。将转化液涂布于 MD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d, 构成突变文库。

1.2.3 高酶活重组毕赤酵母的初步筛选

用灭菌牙签将 MD 平板上生长出的 His⁺转化子复制到 YPD 和 BMMY 平板的相同位置, 同时将对照菌 GS115 pPIC9K-proRCL 接种至 BMMY 平板上。30 $^{\circ}$ C 培养 2 d。

保存生长完毕的 YPD 平板。每 12 h 向 BMMY 平皿盖上补加 200 μ L 甲醇诱导重组脂肪酶表达。诱导 2~3 d。向酶活测定底物 pNPP 中加入 0.6% 琼脂, 混合均匀后, 倒于 BMMY 平板形成顶层琼脂。2 min 内出现明显黄色的菌株为初筛目的菌株。相同条件下, 对照菌 GS115 pPIC9k-pro' 不能显示出明显黄色。

1.2.4 初筛目的菌株的复筛与鉴定

向 1.8 mL/孔(平底)的 96 孔板中加入 300 μ L BMMY 培养基, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。向其中接入保藏于 YPD 平板上的初筛目的菌株(同时接入 GS115 pPIC9K-proRCL 作为对照), 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 2~6(约 16~18 h)。离心, 弃上清, 用 900 μ L BMMY 培养基重悬菌体, 并加入 1% (V/V) 甲醇诱导脂肪酶表达。此后每 24 h 补加 100 μ L BMMY 培养基和 1% (V/V) 甲醇, 诱导 4 d。

将诱导表达 96 h 的 96 孔板发酵液经 3000 r/min 离心 10 min, 收集上清。取 1 μ L 上清液稀释 500 倍后, 取 5 μ L 于另一 96 孔板中, 用排枪加入底物, 振荡混匀。2 min 内迅速显示明显黄色的菌株为复筛目的菌株。相同条件下, 对照菌 GS115 pPIC9K-proRCL 的发酵上清液不能显示明显黄色。

复筛目的菌株经过基因的酶切和 PCR 验证后测序。

1.2.5 脂肪酶的诱导表达和分离纯化

将含有氨基酸突变的菌株, 接种至 25 mL BMMY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 16~20 h 至 OD₆₀₀ 为 2~6, 离心收集菌体, 用 BMMY 培养基稀释至 OD₆₀₀ 为 1, 每隔 24 h 添加 0.5% 的甲醇诱导表达, 培养 3~4 d 后, 收集发酵上清液。

将突变菌株的发酵上清液经过 10 kD 超滤膜浓缩, SP-Sepharose FF 强阳离子交换层析和 Phenyl-Sepharose 6 FF 疏水色谱柱层析后得到突变脂肪酶活性组分 proRCL。

1.2.6 脂肪酶酶活测定

方法参见文献[7]。

1.2.7 脂肪酶酶学性质研究

纯化后的脂肪酶用于 V_{max} 、 K_m 值、 K_{cat} 值、pH 和热稳定性研究, K_m 值的测定采用双倒数作图法。配制 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6~8)、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8~9)、0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH 9~10) 以测定脂肪酶的最适 pH。测定 pH 稳定性时, 将 0.25 U 的酶液分别加在上述不同 pH 的缓冲液中于 25 $^{\circ}$ C 下保温 1 h 后, 标准条件下测定酶活。测定热稳定时, 将 0.25 U 酶液分别保温于 20 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C 1 h, 标准条件下测定脂肪酶酶活。 K_m 值测定过程中, 底物浓度范围是 25~1000 mmol/L。

1.2.8 突变脂肪酶三维结构模拟和与底物的分子对接

利用同源建模法 (SWISS-MODEL) 对出发脂肪酶进行结构建模, 同源搜索比对发现其三级结构与来自 *Rhizopus niveus* 的脂肪酶 (PDB 登录号 1LGY) 结构同源性最高, 为 81%, 以 1LGY 为模板酶进行同源建模。

底物 pNPP 使用 chemDraw 模拟结构, 应用 AutoDock 软件进行底物和脂肪酶的分子对接。采用基于量子行为的微粒群算法 (Quantum-behaved particle

swarm optimization, QPSO)。QPSO 构象搜索算法的初始设置粒子数为 50, 最大迭代次数为 250 万次, 程序中其他参数均使用 Autodock 默认设置。然后对能量得分最优的前 50 个小分子构象求能量平均值。

2 结果与分析

2.1 *Sal* I 酶切位点的定点突变

分别用引物 F/Rm 和 Fm/R 扩增突变位点上下游两片段 A 和 B。再以 A 和 B 模板, 以 F 和 R 为引物, PCR 扩增出基因全片段 C。

构建突变基因的重组表达质粒 pPIC9K-*proRCL*', 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果表明: 酶切位点 *Sal* I 成功地由 GTCGAC 突变为 GTTGAC。

2.2 易错 PCR 条件优化

较低浓度的 Mg^{2+} 对 *Taq* DNA 聚合酶是必需的, 较高浓度可以稳定非互补的碱基对, 有利于突变。实验尝试了 6、7、8、9、10、11 mmol/L Mg^{2+} , 发现 6 mmol/L 时无条带, 7 mmol/L、8 mmol/L 和 11 mmol/L 时扩增条带较淡, 8 mmol/L 和 9 mmol/L 时条带比较浓(图 1)。

Mn^{2+} 可以降低聚合酶对模板的特异性。比较了不同 Mn^{2+} 浓度时的条带, 发现在所有梯度条带的浓度均很理想。但随着 Mn^{2+} 浓度的增高, 条带弥散的现象越来越严重(图 2)。

组合不同浓度的 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} , 构建突变文库, 每个突变梯度随机挑取 10 株菌进行测序以确定突变

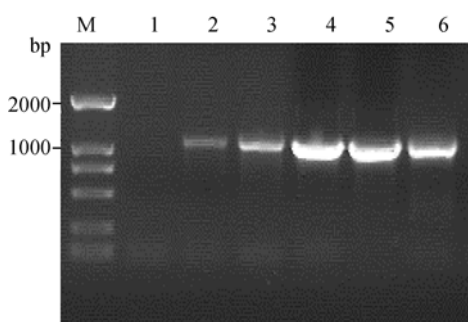


图 1 不同 Mg^{2+} 浓度时 *proRCL* 的 PCR 扩增电泳图
Fig. 1 Error-prone PCR conducted with different Mg^{2+} concentration. M: DNA marker; 1-6: PCR products with different Mg^{2+} concentrations (6 mmol/L, 7 mmol/L, 8 mmol/L, 9 mmol/L, 10 mmol/L, 11 mmol/L, respectively).

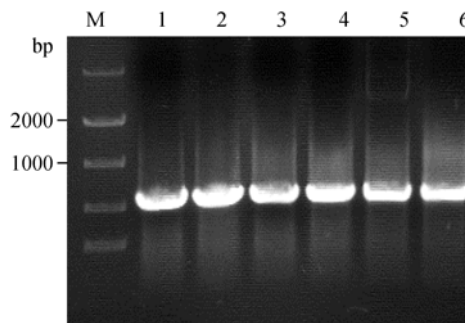


图 2 不同 Mn^{2+} 浓度时 *proRCL* 的 PCR 扩增电泳图
Fig. 2 Error-prone PCR conducted with different Mn^{2+} concentration. M: DNA marker; 1-6: PCR products with different Mn^{2+} concentrations (0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.3 mmol/L, respectively).

率。结果表明, 梯度 1 (Mg^{2+} 7 mmol/L、 Mn^{2+} 0.1 mmol/L) 的平均突变率为 0.25%; 梯度 2 (Mg^{2+} 9 mmol/L、 Mn^{2+} 0.2 mmol/L) 的平均突变率为 0.5%; 梯度 3 和梯度 4 的突变率更高, 弃用。

综上, 梯度 1, 即每个基因序列平均有 4 个碱基突变、有 2.5 个氨基酸突变较为可行。

2.3 高酶活重组酵母菌株的初筛与复筛

实验共经过两轮易错-PCR, 突变文库容量均为 10 000~15 000 株菌。以平板显色为初筛方法, 第一轮得到目的菌株 20 株, 第二轮得到目的菌株 41 株。

将初筛目的菌株进行 96 孔板发酵作为复筛。第一轮复筛目的菌株为 1 株。以其基因组为模板, 进行第二轮易错 PCR。第二轮复筛目的菌株共有 3 株。此 4 株菌经测序确定含有碱基突变的为 3 株, 含有氨基酸突变的为 2 株, 分别命名为 1-11 和 2-28。

2.4 突变菌株的基因序列分析

突变菌株的基因序列分析表明, 菌株 1~11 共有 2 个碱基发生了突变; 2~28 有 4 个碱基发生突变, 包括 3 个转换和 1 个颠换; 颠换发生在 G 和 T 之间, 转换均发生在 G 和 A 之间。碱基的变化均导致了蛋白质的变化(表 1)。

2.5 突变脂肪酶的酶学性质研究

2.5.1 最适温度和温度稳定性

如图 3 所示, 出发菌株 *proRCL* 与突变菌株的 *proRCL*2-28 最适温度均为 40°C。在 30°C~40°C 范围内, 酶活均可以保持在 80% 以上。当温度上升至 45°C 时, 酶活下降至原来的 60% 和 70%。如图 4 所示, *proRCL* 与 *proRCL*2-28 在热稳定性方面没有太

大变化, proRCL2-28的热稳定性稍高于 proRCL。可能是因为突变位点形成了一个盐桥增强了酶分子的刚性: 据突变脂肪酶三维结构分析, A129S 位处 loop 中, 突变氨基酸 Ser 的羟基可以与 Gln133(位处于 loop 顶端)的氨基形成盐桥, 静电作用可以稳定 Ser 所在的 loop 结构, 从而提高分子刚性。

表 1 突变体的测序结果

Table 1 Sequencing results of mutants

Mutants	Mutant nucleotide bases	Mutant amino acids
1-11	G358T/G688A	A129S/ A230T
2-28	G358T/G688A/ A482G/A965G	A129S/A230T/ K161R/K322R

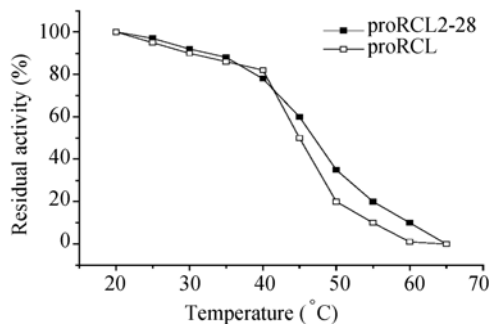


图 3 温度对 proRCL 和 proRCL2-28 稳定性的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the stability of proRCL and proRCL2-28.

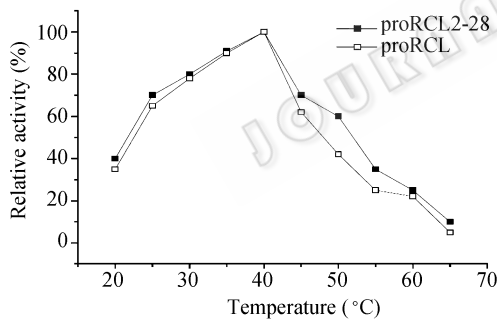


图 4 温度对 proRCL 和 proRCL2-28 活力的影响
Fig. 4 Effect of temperature on the activity of proRCL and proRCL2-28.

2.5.2 酶的 pH 稳定性和最适 pH

如图 5 所示, proRCL2-28 的 pH 稳定性稍优于 proRCL, 在 pH 7.5 的环境下, proRCL 可保持 90% 的活力, 而 proRCL2-28 为 80%; 在 pH 8.5 的环境下, proRCL2-28 可以保持 90% 的活力, 而 proRCL 为 80% 左右。如图 6 所示, proRCL 和 proRCL2-28 的最适 pH 均为 8.0, 在 pH 7.5~9.0 的范围内, 酶活均可保持在 80% 以上。在 pH<7 和 pH>9 的情况下, 酶活迅速降低。

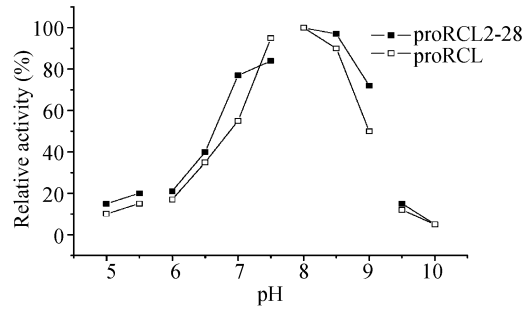


图 5 pH 对 proRCL 和 proRCL2-28 稳定性的影响
Fig. 5 Effect of pH on the stability of proRCL and proRCL2-28.

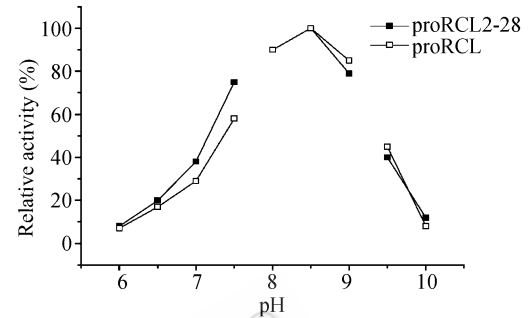


图 6 pH 对 proRCL 和 proRCL2-28 活力的影响
Fig. 6 Effect of pH on the activity of proRCL and proRCL2-28.

2.5.3 酶动力学分析

proRCL 和 proRCL2-28 动力学参数见图 7。由图可见, 突变后脂肪酶的 K_m 值下降了 10%, 由原来的 0.304 mmol/(min·mg) 下降为 0.275 mmol/(min·mg)。 K_m 值下降表明突变株 proRCL2-28 脂肪酶对底物的亲和力提高, 比活力上升。 K_{cat} 值由原来的 1138/min 提高至 3140/min。 K_{cat} 值的提高表明了当酶被底物饱和时, 每分钟每个酶分子转换底物的分子数在上升, 即酶的催化效率提高了。

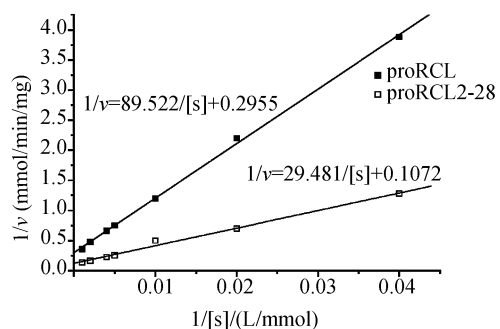


图 7 proRCL 和 proRCL2-28 双倒数曲线
Fig. 7 Double-reciprocal courses of proRCL and proRCL2-28.

2.6 突变脂肪酶的突变位点分析与结构模拟

4 个突变位点在脂肪酶分子中所处位置见图 8。

图中标出的氨基酸突变位点的位置由起始密码子 ATG 翻译的蛋白质算起。其中, Ser129 在空间结构上位于蛋白质边缘的一个 loop 上, 经过三级结构模拟分析与突变前蛋白的三级结构相比对, 认为该位点突变对脂肪酶酶活贡献不大。但本突变位点对脂肪酶热稳定性的提高起到了一定的积极作用(见图 3)。

Arg161 在空间结构上处于酶分子表面, 该突变位点由 Lys 突变为 Arg。经三维结构模拟分析和分子对接, 尚未发现该位点突变对突变脂肪酶酶活的贡献。

Thr230 处于 α -螺旋盖上, 且十分靠近脂肪酶 α -螺旋盖上的关键位点^[7] Phe112-Asp118 中的后者。 α -螺旋盖是维持酶稳定性和活性的关键因素, 它覆盖在活性位点的上方, 能阻挡水溶性因子进入酶活性中心。Asp118 是酸性氨基酸, 其所带有的羧基与 Thr230 上的羟基形成氢键, 使 α -螺旋盖的结构更加稳定, 从而使酶活有所增加。详见图 8(Asp118 为紫色圆球部分)。

Arg322 处在脂肪酶三级结构内部的 loop 上。分子对接结果表明, 该 loop 处于底物与活性中心结合的通道口上(图 9)。Arg322 在空间结构上十分临近脂肪酶活性三联体 S-D-H。而 Arg322 的强正电, 与 A 通道口一侧的一个 β -折叠上的 Asp376(带负电)形成

表 2 出发菌株与突变菌株 2-28 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the parent strain and mutant 2-28

Strains	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)	K_m ($\text{mmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)	K_{cat} (/min)
Starting strain	3.38	0.304	1138
Mutant 2-28	9.33	0.275	3140



图 8 突变华根霉脂肪酶的三维结构模拟图

Fig. 8 Simulated three-dimensional structure of mutant *Rhizopus chinensis* lipase. The red parts were mutant residues, the blue part was lipase activity center, the purple sphere part was Asp residue.

盐桥。静电引力将该 loop 向通道口反方向牵引, 减小了该 loop 对底物进入活性中心的阻碍(图 10)。

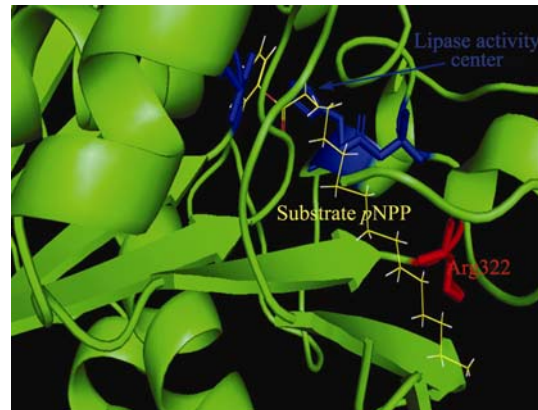
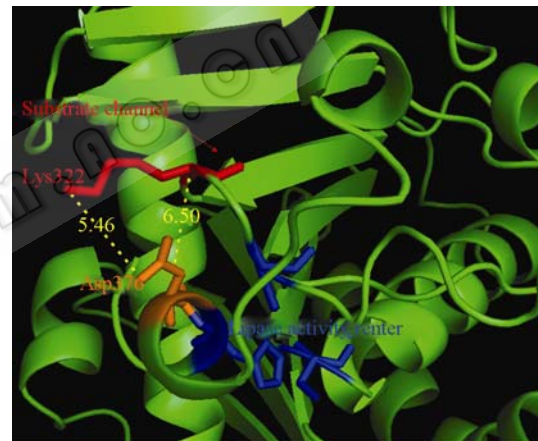
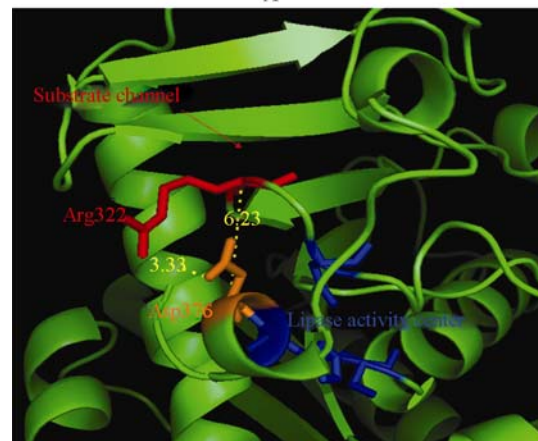


图 9 突变脂肪酶与底物 pNPP 的对接

Fig. 9 Docking of the mutant lipase and the substrate pNPP. The red parts were mutant residue Arg322, the blue part was lipase activity center, the yellow molecule was substrate pNPP.



A



B

图 10 位点 322 突变前(A)后(B)三维结构模拟图

Fig. 10 Simulated three-dimensional structure prior and after site 322 mutation. The red parts were mutant residue Arg322, the blue part was lipase activity center, the orange part was the nearby Asp376, forming salt bridge with Arg322.

Arg322 中的带正电的氨基与 Asp376 中带负电的羧基形成相互吸引力, 两者间距由原来的 5.46 Å 缩小为 3.33 Å, 形成盐桥。另外, 此作用力还将 loop 与 β -折叠主链之间的距离由 6.50 Å 缩小到 6.23 Å。由此推断底物进入酶活性中心的通道口变大, 阻力减小, 从而促进了酶活的提高。分子对接结果表明, 突变前后底物与酶分子的结合能由 -3.21 kcal/mol 降低至 -3.87 kcal/mol, 进一步说明突变后, 底物进入酶活性中心与酶结合时阻力变小, 结合更加稳定, 因此酶活提高。

3 讨论

为了控制突变库的容量, 易错 PCR 时可以通过控制 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 dNTP 浓度有效地控制突变率。但需要指出的是, 此法在进行相应基因的体外突变时, 出现的有益突变往往少于有害突变, 因此, 一个基因突变体中如出现大量有害突变和少量有益突变, 则一般仅能形成无活性酶分子; 同样, 如果突变位点过少, 则野生型序列在整个体系中占绝对优势, 此将不利于后续的筛选和鉴定工作。温和的突变产生高适合度、低丰度的文库, 剧烈的突变产生低适合度、高丰度的文库^[8]。一般来说, 控制合适的突变率为 0.5%~2%^[9-11]之间。

巴斯德毕赤酵母表达载体 pPIC9K 经过不同的酶切线性化, 可以与酵母基因组进行插入型重组或整合型重组。而插入型重组发生的概率为整合型重组的 5~10 倍。因此, 本研究通过将插入基因中的 *Sal I* 酶切位点突变, 从而重组质粒可以经 *Sal I* 线性化而不切断外源基因, 进而实现外源基因的插入型重组。因为重组成功的概率与突变库的大小密切相关, 因此, 相同条件下, 插入型重组突变库要远大于整合型重组突变库。

另外, 巴斯德毕赤酵母实现了外源基因的高水平分泌表达, 这是高活力脂肪酶平板筛选的前提。应用平板法筛选高活力脂肪酶时, fast-blue RR 顶层琼脂法比 pNPP 顶层琼脂法更加灵敏。可是针对本实验中的脂肪酶表达量大、酶活高的情况, 使用 fast-blue RR 顶层琼脂法筛选时反应过于敏感, 在 2 min 内, 几乎所有的突变株都可以水解底物并显示

极深的颜色, 导致酶活的差异无法辨别。而 pNPP 顶层琼脂法虽然灵敏度也较高, 但其颜色变化是由白色至黄色。又由于 BMMY 培养基底色的干扰, 反应得到的黄色不很明显。只有当酶活远高于平均水平, 才会显示出明显的黄变色圈。

在用 96 孔板进行重组毕赤酵母的高通量诱导表达时, 实验优化了 BMGY、BMMY 的最适加量、诱导表达时 BMGY 培养基的更换、诱导过程中培养基补加量、甲醇的最适补加量。结果表明 1.8 mL 的孔板最大加液量为 1.4 mL。当加液量不超过 1.4 mL 时, 振荡培养过程中发酵液不会从孔中溢出, 而且溶氧可以得到满足。经优化, 确定 BMGY 初始加量为 300 μ L, 诱导时加入 900 μ L BMMY, 可以在保持酶活不损失的情况下, 积累最大的菌体量。在 30°C 培养条件下, 每 24 h 培养基的蒸发量为 100 μ L, 需补加 100 μ L 培养基。经气相色谱分析甲醇耗量, 确定甲醇最佳浓度为 1%。

经过第一轮易错 PCR, 筛选出了脂肪酶水解活力提高 2 倍的突变株。以此突变株的基因为模板, 进行第二轮易错 PCR, 筛选得到了脂肪酶水解活力再提高 2 倍的突变株。但是, 由于 ep-PCR 本身所固有的缺陷^[12], 大幅提高酶活还存在一定的困难, 因此可以在此突变株的基础上进一步结合其他定向进化方法如 DNA shuffling 或理性设计来进一步提高酶活。

REFERENCES

- [1] Haas MJ, Joerger RD. Food Biotechnology: Microorganisms. Hui YH, Khachatourians GG, Eds. Weinheim: VCH, 1995: 549-588.
- [2] Xu Y, Wang D, Mu XQ, et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021 in non-aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2002, **18**: 29-37.
- [3] Yan XH, Wang D, Xu Y. Research progress in *Rhizopus* lipase. *Ind Microbiol*, 2005, **35**(3): 45-49. 颜兴和, 王栋, 徐岩. 根霉脂肪酶的研究进展. *工业微生物*, 2005, **35**(3): 45-49.
- [4] Yasohara Y, Kizaki N, Miyamoto K, et al. Enzymatically enantioselective hydrolysis of prochiral 1,3-diacyloxy-glycerol derivatives. *Biosci Biotech Biochem*, 2001, **65**(9): 2044-2049.
- [5] Yu XW, Wang LL, Xu Y. *Rhizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. *J Mol Catal B: Enzym*, 2009, **57**: 304-311.

- [6] Wang L, Yang HX, Zeng JY, *et al.* Latest research progress and application of directed evolution of enzyme molecule. *Gansu Med J*, 2009, **28**(1): 24–27.
王黎, 袁红霞, 曾家豫, 等. 酶分子定向进化的最新研究进展与应用. *甘肃医药*, 2009, **28**(1): 24–27.
- [7] Derewenda U, Swenson L, Wei Y, *et al.* Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humimla lanuginose* and *Rhizopus delemar*. *J Lipid Res*, 1994, **35**: 524–534.
- [8] Pencreach G, Baratti JC. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme Microb Tech*, 1996, **18**: 417–422.
- [9] Jia XD, Cheng DF, Chen XW, *et al.* Comparison of several directed evolution techniques and strategy of library construction. *China Biotechnol*, 2003, **23**(12): 68.
贾向东, 陈德富, 陈喜文, 等. 几种定向进化技术的比较及文库构建策略. *中国生物工程杂志*, 2003, **23**(12): 68.
- [10] Spee JH, de Vos WM, Kuipes OP. Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation by use of PCR and Dtp. *Nucl Acids Res*, 1993, **21**(3): 777–778.
- [11] Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Method Appl*, 1992, **2**(1): 28–33.
- [12] Formant M, Blanquet S, Plateau P. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragment using polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1995, **224**(3): 347–353.

快 讯

百人博士最新文章提出新观点

中科院微生物研究所李寅研究员和张延平博士在《生物技术趋势》(Trends in Biotechnology)上发表了文章,系统阐述了微生物生理功能工程的新观点(Opinion),并建议大力发展微生物生理功能工程技术,从而适应新型生物产业发展对微生物菌种改造的要求。文章已于9月29日在线发表(doi: 10.1016/j.tibtech.2009.08.006)。

近十年来,代谢工程技术已被广泛应用于微生物菌种改造,并取得了巨大成功。但是,代谢工程技术在提高微生物在工业环境下的适应能力和胁迫抗性方面的作用还很有限。新型大宗生物产品——生物燃料、生物基化学品和生物材料的特点是量大、价廉。为了利用微生物高效、经济地生产这些产品,急需发展新的菌株改造技术。

近年来,李寅研究组在中国科学院、科技部、国家自然科学基金委员会支持下,以梭菌、克雷伯氏菌和乳酸菌为模型,在分子水平上研究如何提高这些菌株的生理性能。基于微生物生理状态与目标功能的关系,李寅小组提出了微生物生理功能工程技术,强调通过改善工业菌种必需的鲁棒性(Robustness)和适切性(Fitness),来提高菌种的工业化应用潜力。在设计菌种改造策略时,除了考虑工业发酵过程的传统指标如底物谱、产物得率、发酵浓度、生产强度等,还需要考虑菌种对pH、温度、氧化还原电势、渗透压等环境参数波动的稳定性,以及菌种对木质纤维素水解抑制物的耐受性。在此基础上,文章根据相应生理功能的复杂性和改造的难易程度,设计了不同的技术路线,明确了对微生物生理功能进行系统改造的原则和方法。

微生物生理功能工程将微生物生理学、系统生物学、合成生物学的相关理论与工程方法结合起来,来改善宿主菌的生理功能或导入新的目标生理功能。利用这一技术改造的菌株,将有可能满足多元化的工业需求,特别是满足新兴生物燃料、生物基化学品种和生物材料发展的需求。

来源: 生物通