融合短肽促进碱性果胶酶的高效表达

汪明星[1,2]，刘 松[1,2]，刘 龙[*1,2]，堵国成[1,2]，陈 坚[1,2]
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：碱性果胶酶(PGL)是一种重要的工业酶，广泛应用于食品、纺织和造纸等行业。作者将6种双亲短肽(SAP)融合至PGL N端，以期提高PGL在大肠杆菌中的分泌表达效率。得到一株高产菌株PGL-S1，胞外酶活由129.65 U/mL提高到535.47 U/mL，其他5种短肽则酶活降低。通过SDS-PAGE检测发现，PGL-S1的表达量并没有多大变化，推测可能是催化效率提高引起酶活提高。分析双亲短肽的疏水性指数发现，SAP1的疏水性不同于其他短肽，疏水性是蛋白质发生聚集的主要作用力，能够固定N、C末端，加强与底物的相互作用。推测PGL-S1融合蛋白的表面疏水性提高，促进了对底物的催化效率，具有巨大的工业应用潜力。

关键词：碱性果胶酶；双亲短肽；高效表达；疏水性指数；催化效率
中图分类号：TQ 925　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)05—0504—06

Fusions of Amphipathic Peptide to the Alkaline Polygalacturonate Lyase from *Bacillus* sp. WSHB04-02 Improves the Production

WANG Mingxing[1,2]，*LIU Song*[1,2]，*LIU Long*[*1,2]，*DU Guocheng*[1,2]，*CHEN Jian*[1,2]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: Alkaline polygalacturonatelyase(PGL)is one of important industrial enzymes, which was widely used in food, textile and paper industries. In this study, we constructed and expressed six Self-assembling amphipathic peptides (SAPs), whihch were attached to the N terminus of the PGL, to improve the secretory expression of PGL in *E.coli*. Finally PGL-S1 stood out with enzyme activity improving from 129.65 U/mL to 535.47 U/mL, while the otherenzyme activity weredecreased. There was no obvious change in the extracellular yield of PGL by SDS-PAGE analysis. It indicated that the high enzyme activity was caused by the improving catalytic efficiency. The Grave Value showed that the hydrophobicity of SAP1 was different with the others, which was the main interaction for the accumulation of protein to enhance the interaction between protein and substrate. It was conferred that the improving surface hydrophobicity made a big effect on the catalytic efficiency. PGL-S1has huge potential use for industrial application.

Keywords: alkaline polygalacturonatelyase, self-assembling amphipathic peptides, efficient secretory overexpression, grave value, catalytic efficiency

收稿日期：2014-09-03
基金项目：国家“863”计划项目(2012AA022202)；江苏省自然科学基金项目(BK20130132)。
* **通信作者**：刘 龙(1980—)，男，山东诸城人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事微生物系统代谢工程及工业酶的分子定向修饰方面的研究。E-mail：longliu@jiangnan.edu.cn

果胶酶是能够分解果胶质的酶的总称,广泛存在于各种微生物中,细菌、真菌和放线菌都能产生相关酶类。根据不同底物,果胶酶可以分成以下几类:多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶酸裂解酶(PL)和果胶酯酶(PE)[1]。碱性果胶酶(E.C.4.2.2.2,简称PGL),全称聚半乳糖醛酸裂解酶,其可以在碱性条件下,将果胶质分解为不饱和的寡聚半乳糖醛酸。果胶酶在食品加工、饲料加工、纺织、造纸、环境保护等方面应用广泛[2-3]。尤其在纺织行业中,由于传统精炼工艺能耗大污染严重,碱性果胶酶作为一种生物制剂,顺应了绿色生产加工和可持续发展的要求,慢慢取代了传统工艺。随着碱性果胶酯裂解酶新用途的不断出现,对该酶的需求量越来越大,因此提高碱性果胶酶的产量受人关注。

促进酶的高效表达有很多方法,例如异源表达[4]、发酵优化[5],诸葛斌等人成功地将来源于枯草芽孢杆菌WSHB04-02的PGL基因在*P. pastoris* GS115中实现整合分泌表达,优化后现PGL胞外表达量已为全球领先[6-7]。然而,毕赤酵母表达体系存在很多难以克服的问题,比如发酵周期长、过程控制复杂和低温诱导能耗高等。解决这些问题的最有效方法是建立并深化原核表达体系,以实现发酵周期短、过程简便、低能耗的PGL高效表达。

据报道,双亲短肽(SAPs)与蛋白末端融合,SAPs形成的水凝胶能够对酶分子进行固定化,提高酶的催化效率和稳定性,从而提高酶活。杨海泉等将双亲短肽与碱性淀粉酶N端融合,得到酶活提高3.2倍的重组碱性淀粉酶[8]。

作者对6种不同性质的SAPs分析,将其与PGL N端融合,发酵测PGL酶活。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* JM109,*E. coli* BL21(DE3),*Bacillus* sp. WSHB04-02和pET-22b(+):作者所在实验保存。

1.1.2 双亲短肽SAPs 清华大学林章凛教授的研究发现,融合强疏水性的双亲短肽会使重组酶以有活性的包涵体形式出现在胞内[8]。为避免融合蛋白形成包涵体,作者选择了亲水性较强双亲短肽作为研究对象。编码6个短肽的基因,以及在其N端的6×His-tag和C端的PT linker(PTPPTTPTPPTTPTPT)基因,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。随后与质粒pET-22b(+)连接,详细的SAPs信息见表1。

表1 双亲短肽的氨基酸序列及结构特点

Table 1 Sequence,character and scoure of SAPs

双亲短肽	氨基酸序列	结构特点
SAP-1	AEAEAKAKAEAEAKAK	在水溶液中可自发组装成β-折叠结构
SAP-2	VNYGNGVSCSKTKCSVNWGQAFQERYTAGTNSFVSGVSGVASGAGSIGRR	自发组装成α-螺旋的双亲短肽
SAP-3	DWLKAFYDKVAEKLKEAFKVEPLRADWLKAFYDKVAEKLKEAF	由两个相同的α-螺旋双亲短肽(18个氨基酸)组成
SAP-4	DWLKAFYDKVAEKLKEAFGLLPVLEDWLKAFYDKVAEKLKEAF	由两个相同的α-螺旋双亲短肽(18个氨基酸)组成
SAP-5	DWLKAFYDKVAEKLKEAFKVQPYLDDWLKAFYDKVAEKLKEAF	由两个相同的α-螺旋双亲短肽(18个氨基酸)组成
SAP-6	DWLKAFYDKVAEKLKEAFNGGARLADWLKAFYDKVAEKLKEAF	由两个相同的α-螺旋双亲短肽(18个氨基酸)组成

1.1.3 培养基

1)LB培养基:酵母粉5 g/L,胰蛋白胨10 g/L,NaCl 10 g/L;pH 7.0。

2)种子培养基:酵母粉5 g/L,胰蛋白胨10 g/L,NaCl 10 g/L,葡萄糖20 g/L;pH 7.0。

3)发酵培养基(TB):酵母粉24 g/L,胰蛋白胨12 g/L,甘油5 g/L,K_2HPO_4 72 mmol/L,KH_2PO_4 17 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 PGL基因扩增 用表2中引物PCR扩增PGL基因片段,在上下游分别加上*Nco*I和*Xho*I两个酶切位点。

表2 引物序列

Table 2 Primer Sequence

引物	引物序列
上游引物	5-CATGCCATGGATGCTGATTTAGGCCACCAGAC-3
下游引物	5-CCCTCGAGTTAATTTAATTTACCCGCACCC-3

1.2.2 胶回收 详见 TAKARA 公司胶回收试剂盒的产品说明书。

1.2.3 连接 使用 TAKARA 公司连接试剂盒分别将双亲短肽,PGL 基因依次与整合好的 pET-22b(+) 连接。

1.2.4 转化 将连接好的 pET-22b (+)/*pgl-S* 转进 JM109,测序正确后转进 *E.coli* BL21 (DE3)。

1.2.5 培养方法

1)种子培养:从甘油管中将重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)(pET-22b(+)/*pgl-S*) 接种于含有 100 μg/mL 氨苄青霉素和 2 g/dL 葡萄糖的 LB 培养基中,装液量为 20 mL/250 mL。培养温度 37 ℃,200 r/min 摇床上振荡培养 10 h。

2)摇瓶发酵:将培养 10 h 的种子液以 3%的接种体积分数接入含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的发酵培养基 TB 中,装液量为 20 mL/250 mL,于 37 ℃、200 r/min 培养。菌体生长到一定阶段(OD_{600}=0.6),加入终浓度 0.04 mmol/L IPTG 进行诱导,同时将温度调整为 30 ℃,诱导 48 h。

1.2.6 PGL 酶活测定 碱性果胶酶酶活力检测:取一定量发酵液,8 000 r/min 离心 10 min, 胞外碱性果胶酶即包含于发酵上清液中。碱性果胶酶反应体系为: 酶稀释液 20 μL, 含 0.2% PGA 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 (0.2 mol/L,0.44 mmol/L 的 $CaCl_2$,pH 9.4) 2 mL,无活性的酶液为空白对照。碱性果胶酶反应条件为:45 ℃水浴 15 min, 使用 3 mL 磷酸溶液(0.03 mol/L)终止反应,235 nm 处测定反应物吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 PGL 重组菌的构建

重组载体 pET-22b (+)/*pgl-S* 的构建流程见图 1 。将合成短肽整合到 pET-22b(+)载体上,随后再将扩增的 *pgl* 连接到带有 SAP 的载体上。

将上海生工合成的双亲短肽基因通过 *Nco*I 与 *Nde*I 酶切位点与 pET-22b(+)连接,得到 6 个重组质粒 pET-22b(+)/*S1*,pET-22b(+)/*S2*,pET-22b(+)/*S3*,pET-22b(+)/*S4*,pET-22b(+)/*S5* 和 pET-22b(+)/*S6*。胶回收后,电泳验证结果见图 2,条带大小与预期 5.6 kb 上下吻合。

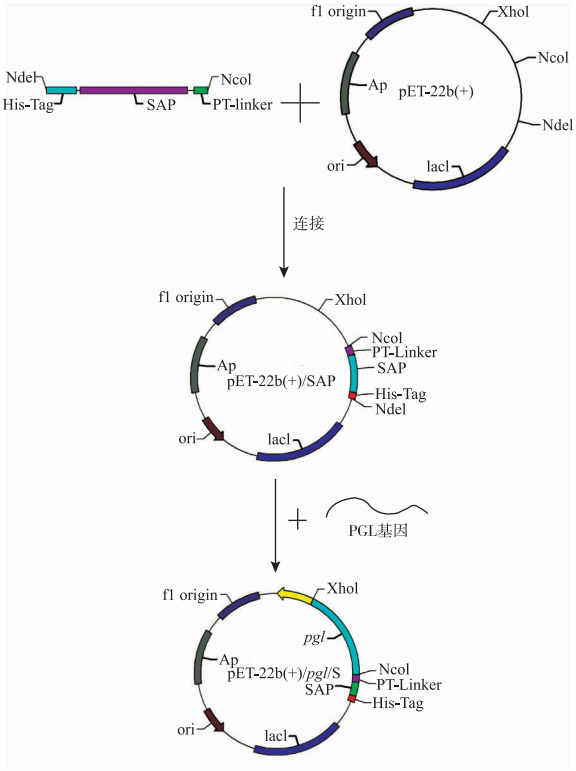
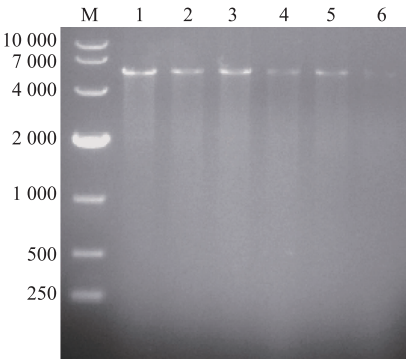


图 1 pET-22b(+)/*pgl-S* 质粒构建流程图

Fig. 1 Construction of pET-22b(+)/*pgl-S*

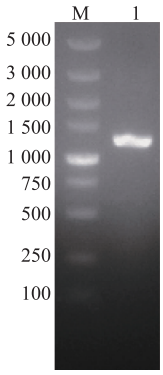


M:DL 10,000 DNA 标准相对分子质量;1:pET-22b (+)/*S1*;2:pET-22b(+)/*S2*;3:pET-22b(+)/*S3*;4:pET-22b(+)/*S4*;5:pET-22b(+)/*S5*;6:pET-22b(+)/*S6*

图 2 pET-22b(+)/S 构建琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pET-22b(+)/S

以 *Bacillus* sp. WSHB04-02 为模板, 利用高保真聚合酶 Primer Star PCR 扩增得到不含自身信号肽的 PGL 基因 *pgl*。凝胶电泳检测确认为正确长度 1.2 kb 左右,见图 3。

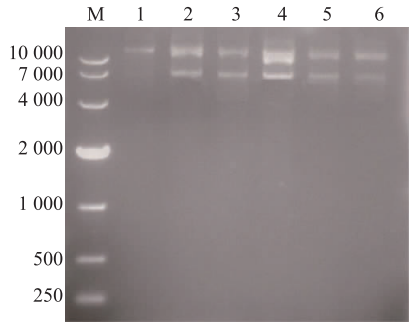


M：DL 5 000 DNA 标准相对分子质量；1：PGL gene

图 3　PGL 基因琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3　Agarose gel electrophoresis of PGL gene

将 *pgl* 与重组质粒 pET-22b(+)/(*S1-S6*)通过 *Nco*I，*Xho*I 连接，得到 PGL 基因与双亲短肽 SAP 连接得到最终的重组载体 pET-22b（+)/*pgl-S1*，pET-22b(+)/*pgl-S2*，pET-22b(+)/*pgl-S3*，pET-22b(+)/*pgl-S4*，pET-22b(+)/*pgl-S5* 和 pET-22b(+)/*pgl-S6*。整合后的双亲短肽 SAP 与 PGL 的 N 端连接。之所以选择 N 端连接，是因为之前为了便于纯化，将 PGL 的 C 端融合 His-Tag，由于改造后蛋白质的二级结构发生变化，致使催化残基结构受到影响，导致表达后的 PGL 活性降低 50%[10]。而 N 端结果就相对稳定。原始 PGL 中 N 端有 21 个氨基酸的信号肽，信号肽在合成后，将蛋白质携带至内质网上后被切割，为了使双亲短肽不会因此被切割，去除原始 PGL 中 N 端的信号肽，与双亲短肽 SAP 直接相连。对将重组质粒转化 *E.coli* JM109，提质粒，将测序正确的重组载体跑胶见图 4。



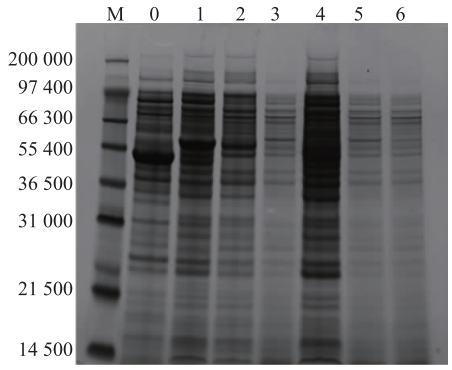
M：DL 10 000 DNA 标准相对分子质量；1：pET-22b（+)/*pgl-S1*；2：pET -22b （+)/*pgl -S2*；3：pET -22b （+)/*pgl -S3*；4：pET-22b（+)/*pgl-S4*；5：pET-22b（+)/*pgl-S5*；6：pET-22b(+)/*pgl-S6*

图 4　pET-22b(+)/*pgl-S* 构建琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4　Agarose gel electrophoresis of pET-22b(+)/*pgl-S*

2.2　重组 PGL 的表达

将测序正确的 pET-22b（+)/*pgl-S* 转化进入 *E. coli* BL21（DE3)，种子生长 10 h 后以 3%的接种体积分数加入到发酵培养基 TB 中，发酵 48 h 后离心取上清液，将发酵上清液组分进行 SDS-PAGE 电泳分析，见图 5。并检测 PGL 酶活，见图 6。由于加入 SAPs 的相对分子质量不同，融合之后的蛋白质大小由 43 400 依次变为 48 200，51 400，51 600，51 300，51 700 和 51 500。由图 5 可知，其中 PGL-S1、PGL-S2、PGL-S4 分泌表达量与改造之前的 PGL 相比变化不大，PGL-S3、PGL-S5、PGL-S6 分泌表达量下降明显。



M：蛋白质标准相对分子质量；0：PGL；1：PGL-S1；2：PGL-S2；3：PGL-S3；4：PGL-S4；5：PGL-S5；6：PGL-S6

图 5　*E. coli* BL21（DE3)(pET-22b(+)/*pgl-S*)发酵上清液 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of *E. coli* BL21（DE3)(pET-20b(+)/*pgl-S*) in supernatant

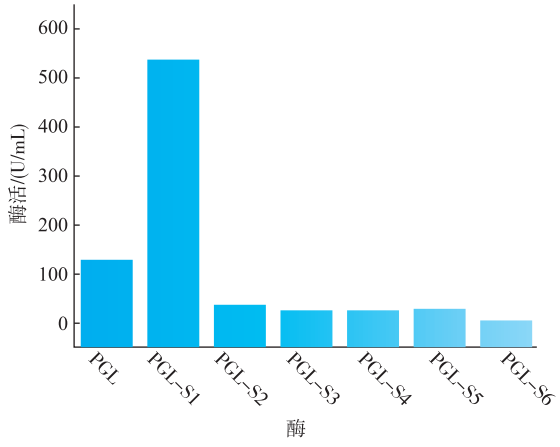


图 6　重组蛋白质发酵上清酶活

Fig. 6　Enzyme activity of recombinant PGL in supernatant

由于 PGL 已经工业化,在工业应用中为了减少工艺流程降低成本,只提取胞外分泌的 PGL。所以本研究主要集中在 PGL 的胞外分泌表达量。改造后,PGL-S1 摇瓶发酵的胞外酶活由129.65 U/mL 提高到 535.47 U/mL,胞外酶活提高至PGL 的 4.13 倍。虽然之前 PGL 的罐上产量已达到1 593 U/mL,却是总酶活,其中胞内酶活占了相当大比例[6-7]。再者,毕赤酵母作为单细胞真核生物,具有较完备的基因表达调控机制和对表达产物的修饰能力,非常有利于真核基因的表达,但是 PGL 基因是来源于原核细胞 *Bacillus* sp. WSHB04-02,不需要毕赤酵母强大的产物修饰能力,加上毕赤酵母表达体系仍存在很多难以克服的问题,比如过程控制复杂,低温诱导耗能高和发酵周期长等,如果能在工艺简单周期短生产成本低的大肠杆菌表达系统中得到高效表达,则能从根本上将 PGL 的工业化推进一步。

PGL 在毕赤酵母中的摇瓶产量达到 220 U/mL,3 L 罐上优化后提高至 1 593 U/mL。PGL 在大肠杆菌中罐上优化的胞外酶活为 257.8 U/mL,相比摇瓶水平提高了一倍。将改造后的 PGL-S1 在罐上做扩大培养,其单位酶活很有可能超过之前,潜力巨大。

2.3 S1 提高胞外 PGL 酶活水平的机制解析

融合 SAP 之后 PGL-S 的酶活有了不同程度的变化。其中以 PGL-S1 的酶活提高最为显著。但是 SDS-PAGE 检测分析,却发现 PGL-S1 的蛋白质表达量反而比之前略有降低,表达量变化不大而酶活却提高了 3 倍多,由此推出改造后的 PGL-S1 催化效率大幅提高,即改造后的比酶活提高。利用在线软件(http://www.expasy.org)计算自组装双亲短肽的疏水性指数(Gravy value)。Gravy value 越小表明亲水性越强,反之则说明疏水性越强。自组装双亲结果发现,所有短肽的 Gravy value 都呈现负值,表明这些短肽总体体现亲水性。SAP1 的疏水性性明显高于其他双亲短肽,。已有的研究表明[11],疏水性是蛋白质发生聚集的主要作用力。大量研究表明[12-13],寡聚能够加强蛋白质相互作用,固定 N、C 末端,加强与底物的相互作用,推测由于 PGL-S1 融合蛋白的表面疏水性得到了提高,因而加强了其与底物聚半乳糖醛酸的相互作用,进而提高了其比酶活。

表 2 双亲短肽疏水性指数

Table 2 Gravy value of SAPs

双亲短肽	疏水性指数
SAP1	-0.950
SAP2	-0.278
SAP3	-0.505
SAP4	-0.184
SAP5	-0.553
SAP6	-0.451

3 结 语

引入双亲短肽,可改变蛋白质的表面疏水性,增强蛋白质的相互作用,进而提高蛋白质催化效率,促进高效表达。作者通过将 6 条不同性质的双亲短肽 SAP 与碱性果胶酶的 N 端进行融合表达,得到一株高效表达菌株。PGL-S1 的酶活大幅提高,仅仅摇瓶产量就提高至出发菌株 PGL 的 4.13 倍,达到 535.47 U/mL,进一步证明了该策略的高效性。SAP1 与碱性果胶酶的融合表达大大提高了酶的催化效率,从而使得碱性果胶酶高效表达。通过进一步的发酵优化,并最终实现工业化有良好前景,可以极大的避免长期以来在工业应用中毕赤酵母表达系统的各种弊端,降低工业成本。

参考文献:

[1] 黄俊丽,李常军,王贵学. 微生物果胶酶的分子生物学及其应用研究进展[J]. 生物技术通讯,2006,6:992-994.
HUANG Junli,LI Changjun,WANG Guixue. The research progress on molecular biology and application of microbial pectinase [J]. **Letters in Biotechnology**,2006,6:992-994.(in Chinese)

[2] Kashyap D,Vohra P,Chopra S,et al. Applications of pectinases in the commercial sector:a review[J]. **Bioresource Technology**, 2001,77:215-227.

[3] Jayani R S,Saxena S,Gupta R. Microbialpectinolytic enzymes:a review[J]. **Process Biochemistry**, 2005,40:2931-2944.

[4] Zhao Q,Ding R,Kang Y,et al. Expression of pectatelyase A from *Aspergillus nidulans* in *Bacillus subtilis* [J]. **World J Micro Biot**,2008,24:2607-2612.

[5] Junjiao Z,Zhen K,Zhenmin L.,et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonatelyasein *Bacillus subtilis*

with optimized regulatory elements[J]. **Bioresource Technology**,2013,146:543-548.

[6] Wang Z H,Wang Y,Zhang D X,et al. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonatelyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation[J]. **Bioresource Technol**,2010,101:1318-1323.

[7] Wang Y,Wang Z,Du G C,et al. Enhancement of alkaline polygalacturonatelyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration[J]. **BioresourceTechnol**,2009,100:1343-1349.

[8] Haiquan Y,Xinyao L,Long L,et al. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline α-amylase from *Alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency,thermal stability,and resistance to oxidation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2013,79(9):3049-3058.

[9] Wu W,Xing L,Zhou B,et al. Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*[J]. **Microb Cell Fact**,2011,10(1):9.

[10] Matsumoto T,Katsura D,Kondo A,et al. Efficient secretory overexpression of *Bacillus subtilis* pectatelyase in *Escherichia coli* and single-step purification[J]. **Biochem Eng J**,2002,12:175-179.

[11] Vieille C,Zeikus G J. Hyperthermophilic enzymes:sources,uses,and molecular mechanisms for thermostability[J].**Microbiol Mol Biol R**,2001,65(1):1-43.

[12] Pearce F G,Dobson R C,Jameson G B,et al. Characterization of monomeric dihydrodipicolinate synthase variant reveals the importance of substrate binding in optimizing oligomerization[J]. **Biochim Biophys Acta**,2011,1814(12):1900-1909.

[13] Clantin B,Tricot C,Lonhienne T,et al. Probing the role of oligomerization in the high thermal stability of *Pyrococcus furiosusor* nithine carbamoyl transferase by site-specific mutants[J]. **Eur J Biochem**,2001,268(14):3937-3942.

会　议　信　息

会议名称(中文):第六届中美生物力学大会

开始日期:2016-08-01　　所在城市:上海市　黄浦区

主办单位:中国力学学会　　承办单位:上海交通大学

联系人:齐颖新　　联系电话:13681951183

E-MAIL:qiyx@sjtu.edu.cn　　通讯地址:上海交通大学　　邮政编码:200240

会议网站:http://www.cstam.org.cn/templates/lxxh_1/index.aspx?nodeid=543&page=ContentPage&contentid=174821

会议背景介绍:讨论近3年来生物力学与力学生物学中国和美国乃至世界主要的前沿及发展趋势。

会议名称(中文):第十五届中国生态学大会

开始日期:2016-08-25　　结束日期:2016-08-27

所在城市:甘肃省　兰州市　　主办单位:中国生态学学会

承办单位:兰州大学　　摘要截稿日期:2016-07-25

联系人:施茜 李博 张丹 庄琰　　联系电话:(010)62849113;62849101

E-MAIL:xs-esc@rcees.ac.cn　　会议网站:http://esc2016.csp.escience.cn/dct/page/1

会议背景介绍:由中国生态学学会主办,兰州大学承办的"第十五届中国生态学大会"拟于2016年8月25-27日在甘肃省兰州市举行,大会主题为"创新生态科学,建设美丽中国"。

会议包括:特邀专家大会报告、分会专题报告、学术墙报、第七届中国生态文明腊子口论坛、全国生态学研究生论坛等。会议同时举办与生态学相关的科研仪器、设备、软件、文献出版和生态产品展示活动。现已启动会议报名及学术论文征集工作,欢迎国内外生态学以及相关领域的专家、学者踊跃投稿参加这次会议。