

黑曲霉阿魏酸酯酶A的克隆、表达 及快速酶活检测体系的建立*

张帅兵^{1,2} 裴小琼¹ 吴中柳^{1**}

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

(²中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 阿魏酸酯酶是参与半纤维素降解的重要酶类. 为了提高阿魏酸酯酶的活性和其它性能, 本文作者采用RT-PCR技术从黑曲霉CIB 423.1中克隆了编码阿魏酸酯酶A的cDNA, 构建了外泌表达的质粒, 并将其转化到毕赤酵母GS115进行表达. 通过检测培养液上清中的酶活, 表明阿魏酸酯酶已成功在这一体系表达. 同时, 本文还建立了快速、稳定的酶活检测体系, 为后续对阿魏酸酯酶突变体活性进行高通量筛选奠定了基础. 图5 参17

关键词 黑曲霉; 阿魏酸酯酶A; 高通量筛选; 毕赤酵母

CLC Q78 + Q556.1

Cloning and Expression of Feruloyl Esterase A from *Aspergillus niger*, and Establishment of Fast Activity Detection Methods*

ZHANG Shuaibing^{1,2}, PEI Xiaoqiong¹ & WU Zhongliu^{1**}

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Feruloyl esterases (FAEs) play an important role in hemicellulose degradation. In order to apply the directed molecular evolution method to improve the feruloyl esterase's activity and performances, the cDNA encoding feruloyl esterase A (FAEA) was cloned from *Aspergillus niger* CIB 423.1 using RT-PCR. The recombinant plasmid encoding FAEA was constructed and transformed into *Pichia pastoris* GS115. The extracellular expression was proven to be successful by enzymatic activity detection of the culture supernatant. Meanwhile, a fast and stable platform for feruloyl esterase assay was established, which made it possible to screen FAEA mutants in a high-throughput fashion in upcoming studies. Fig 5, Ref 17

Keyword *Aspergillus niger*; feruloyl esterase A; high-throughput screening; *Pichia pastoris*

CLC Q78 + Q556.1

阿魏酸酯酶对植物细胞壁的降解具有重要作用, 主要降解植物细胞壁多糖如阿拉伯木聚糖、果胶等中的阿拉伯糖或半乳糖与羟基肉桂酸之间的酯键^[1]. 这类酶与其他的糖类水解酶如 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、纤维素内切酶等联合作用可较彻底地降解植物细胞壁^[2]. 阿魏酸酯酶对羟基肉桂酸的降解可使木聚糖等降解半纤维素的酶类更容易接近底物而加速降解半纤维素. 实验证明, 阿魏酸酯酶与木聚糖酶联合水解植物细胞壁比阿魏酸酯酶单独水解植物细胞壁所产生阿魏酸的量提高了很多, 这是由于木聚糖酶生成短链的阿魏酸酯化寡聚木聚糖而使阿魏酸酯酶更容易接近底物^[3].

阿魏酸酯酶已经在多种真菌和细菌中被发现, 如乳酸菌和乳酸杆菌^[4]、热纤梭菌^[5]、黑曲霉^[6]、泡盛曲霉^[7]等. 这些已发现的阿魏酸酯酶的生物化学特性都已被证明, 而且一些酶已经在大肠杆菌^[8]、黑曲霉和泡盛曲霉^[9]、毕赤酵母^[10~12]

等表达系统中得到了较好的外源表达. 随着生物能源和其他生物制品的开发, 目前工业上对阿魏酸酯酶的需求很大, 而应用于工业的阿魏酸酯酶主要由黑曲霉生产. 由于黑曲霉的阿魏酸酯酶对高温、酸或碱等条件耐受性不足, 很大程度上限制了阿魏酸酯酶在工业上的应用. 通过分子生物学手段改造阿魏酸酯酶以使其对高温、酸或碱等条件具有较好的耐受性, 从而能更广泛地应用于工业生产.

我们利用实验室保藏的黑曲霉菌株*Aspergillus niger* CIB 423.1, 通过RT-PCR技术克隆了编码阿魏酸酯酶A的cDNA, 并在毕赤酵母GS115中进行外泌表达. 为了对后续试验中利用分子生物学手段改造的阿魏酸酯酶进行高通量筛选, 我们还建立了快速、灵敏的酶活检测方法.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

黑曲霉CIB423.1、*Escherichia coli* DH5 α 和毕赤酵母菌株*Pichia pastoris* GS115为实验室保藏菌株; *E. coli* DH5 α 和*P. pastoris* GS115感受态细胞参照分子克隆手册^[13]方法自制; 质粒pPIC9K为实验室保存; pMD18-T 购自Takara公司; RT-PCR试剂盒、Taq聚合酶和连接试剂盒购自Takara公司; 质粒抽提试剂盒QIAGEN mini prep kit和胶回收试剂盒QIAquick

收稿日期: 2008-11-25 接受日期: 2008-12-15

*中国科学院百人计划项目、四川省青年科技基金项目(No. 08ZQ026-023)和中国科学院知识创新工程重大项目(No. KSCX1-YW-11B2)资助 Supported by the Program of 100 Distinguished Young Scientists of the Chinese Academy of Sciences, the Provincial Science Foundation for Young Scholars of Sichuan, China (No. 08ZQ026-023) and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-YW-11B2)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wuzhl@cib.ac.cn)

Gel Extraction Kit 购自QIAGEN; dNTP、*pfu*聚合酶购自Stratagene, T4连接酶、限制性内切酶购自NEB公司, 毕赤酵母基因组DNA提取试剂盒TIANamp Yeast DNA Kit购自天根公司; 所有引物合成和序列测定均由Invitrogen公司(上海)完成. 阿魏酸对硝基苯酚酯由本实验室合成^[14].

1.2 培养基

PDA固体培养基: 马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L和琼脂 20 g/L, 用于活化黑曲霉; LB培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L和氯化钠 10 g/L, 用于培养大肠杆菌; 黑曲霉基本培养基^[6]: NaNO_3 6.0 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、KCl 0.5 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、葡萄糖 1 g/L、桦木木聚糖(Sigma公司) 10 g/L和微量元素(1 000×母液: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.4 g/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.32 g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.32 g/L、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L、EDTA 10 g/L), 用于培养黑曲霉; YPD培养基: 酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 20 g/L和葡萄糖 20 g/L, 用于培养毕赤酵母; MD固体培养基: 无氮基酵母氮源(YNB) 13.4 g/L、生物素0.04 mg/L、葡萄糖20 g/L和琼脂粉20 g/L, 用于培养毕赤酵母转化子; BMGY和BMMY培养基配方见Invitrogen公司提供的毕赤酵母操作手册(www.invitrogen.com), 用于毕赤酵母转化子的诱导表达.

1.3 黑曲霉阿魏酸酯酶A cDNA的获得

黑曲霉CIB 423.1在PDA固体培养基上划线活化, 培养5 d. 挑取黑曲霉孢子接种于50 mL黑曲霉液体基本培养基中, 培养24 h后收集菌体, 以CTAB法提取总RNA^[15]. 以总RNA为模板, 参照RT-PCR试剂盒说明书, 以oligo(dT)为引物逆转录合成第一链cDNA. 然后以第一链cDNA为模板进行PCR扩增出编码阿魏酸酯酶的cDNA. 正向引物Faea-F1: 5'-CCGGAATTCATGAAGCAATTCTCTGCAAAATACG-3', 反向引物Faea-R1: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTACCAAGTACAAGCTCCGC-3'. PCR反应条件如下: 95 °C变性30 s, 53 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 反应30个循环, 最后72 °C延伸10 min. 经胶回收纯化的PCR产物连接到pMD18-T克隆载体上后转化*E.coli* DH5 α 感受态细胞. 经酶切鉴定的阳性克隆进行测序分析. 序列已保存在NCBI Genbank, 收录号为FJ430154.

1.4 表达载体的构建

以正确的质粒为模板, 采用正向引物Faea-F2: 5'-TAGGAGGTGAATTCGCCTCCACGCAAGGCATCTC-3'和反向引物Faea-R2: 5'-TAGAGGTGCGGCCGCTTACCAAGTACAAGCTCCGCTCG-3', 扩增无信号肽-的成熟阿魏酸酯酶编码序列, PCR反应条件如下: 95 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 反应30个循环, 最后72 °C延伸10 min. 产物经胶回收后用EcoR I和Not I限制性内切酶进行双酶切, 然后连接到pPIC9K上相应的多克隆位点, 此重组质粒命名为pPIC9K-NSfaeA.

1.5 阳性克隆的筛选和表达

用限制性内切酶Bgl II分别酶切质粒pPIC9K、pPIC9K/NS-faeA并回收目的片段, 用电击法转化感受态毕赤酵母GS115. 将转化的毕赤酵母涂布于MD琼脂平板上, 培养2 d后挑取单菌落, 在BMGY中培养1 d, 离心收集菌体后提取其基

因组DNA, 用5'AOX1和3'AOX1引物进行PCR验证质粒转化情况. PCR反应条件: 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 反应30个循环, 最后72 °C延伸10 min. 挑取质粒转化成功的阳性菌落, 在30 °C、摇床转速为240 r/min的条件下在25 mL BMGY培养基中培养2 d, 离心收集的菌体重悬于10 mL BMMY培养基, 同样条件继续培养3 d, 每天补加50 μL 的甲醇.

1.6 酶活的快速检测

反应体系为1 mL, 其组成为: 100 μL 体积10 mmol/L的阿魏酸对硝基苯酚酯的DSMO溶液, 800 μL 含有2.5% (V/V)的Triton X-100的0.1 mol/L磷酸钠缓冲液 (pH 6.4)和100 μL 的酶溶液^[16]. 在40 °C反应30 min后于410 nm波长处测定阿魏酸对硝基苯酚酯降解生成对硝基苯酚的吸光度, 并计算出生成对硝基苯酚的浓度. 酶活单位定义为: 在反应条件下, 每分钟降解1 μmol 阿魏酸对硝基苯酚酯所需要的酶量.

2 结果与分析

2.1 黑曲霉总RNA的提取与faeA cDNA的获得

利用CTAB法提取了产生阿魏酸酯酶的黑曲霉CIB423.1菌丝体的总RNA (图1), 从图1中可以看出, 总RNA提取效果较理想. 用分光光度计测定其260 nm和280 nm出的吸光值, 得出 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1.999$, 说明总RNA纯度较高, 可以进行RT-PCR.

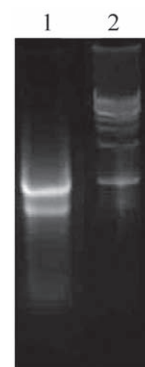


图1 总RNA提取琼脂凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

1, Total RNA; 2, Marker

利用RT-PCR技术成功获得了编码阿魏酸酯酶的cDNA (图2). 这段序列包含一个有846 bp的开放阅读框, 编码含有21个氨基酸信号肽的281个氨基酸的前蛋白. 用分析软件计算成熟蛋白质的相对分子质量(M_r)为28 290. 在NCBI上进行核苷酸序列比对, 其序列与NCBI编号为XM_001393300.1、AF361950.1、NW_001594204.1的序列相似性为98%. 将序列上传到Genbank中, 编号为FJ430154. 软件预测成熟蛋白质结构中含有阿魏酸酯酶的催化区域(Ser133-His247-Asp194)和N-糖基化位点^[17].

2.2 酶活检测体系的建立

阿魏酸对硝基苯酚酯是根据对硝基苯酚在410 nm处有较强吸收的原理而设计的模拟底物, 为非商品化化合物. 以阿魏酸和对硝基苯酚为原料, 一步法合成了阿魏酸对硝基苯酚酯. 经过在热水中对产物进行4次重结晶纯化, 经核磁共振

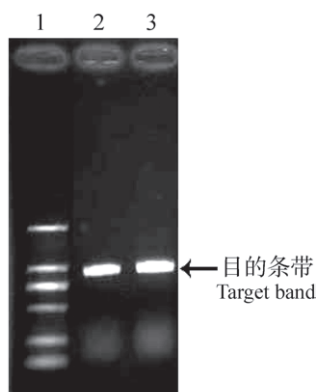


图2 RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products

1, Marker; 2~3, *faeA*

¹H谱验证准确后用于酶活检测分析。

反应条件下该底物摩尔消光系数为 $0.26 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 而产物对硝基苯酚的摩尔消光系数为 $1.80 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (图3), 另一产物阿魏酸的吸收很小, 可以忽略不计。

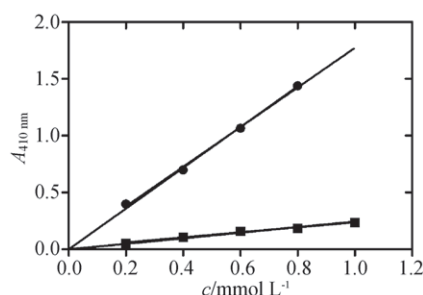


图3 阿魏酸对硝基苯酚酯和对硝基苯酚在410 nm下的吸收曲线

Fig. 3 Absorbance of 4-nitrophenyl ferulate and 4-nitrophenol at 410 nm

- : 阿魏酸对硝基苯酚酯; ◆: 对硝基苯酚
- : 4-nitrophenyl ferulate; B: ◆4-nitrophenol

在这个检测体系中, 对阿魏酸酯酶的最优反应温度进行了评定, 40 °C为最佳反应温度, 温度低则反应速率较慢; 温度过高则使酶失活较快; 反应时间过长, 体系也不稳定, 主要是因为底物阿魏酸对硝基苯酚开始出现沉淀而变浑浊。

为了检验酶活检测体系的灵敏度, 以1 mL反应体系进行阿魏酸酯酶酶活检测。用前述的黑曲霉基本培养基培养黑曲霉3 d后, 离心取上清液进行酶活检测体系可行性验证, 在40 °C水浴反应30 min后, 于410 nm处测定吸光值, 酶比活为70 U/mL。这个方法也很容易扩展到96孔板筛选平台操作。这种

阿魏酸酯酶酶活检测和通过HPLC分析阿魏酸酯酶水解阿魏酸甲酯或阿魏酸乙酯等底物的检测方法相比, 具有简便、快速、廉价和可高通量测定酶活力的优势。

2.3 毕赤酵母中阿魏酸酯酶的表达

分别以转化了pPIC9K-NS*faeA* 和pPIC9K的毕赤酵母基因组为模板, 用5'AOX1和3'AOX1引物进行PCR, 分析*faeA* cDNA的转化效果(图4)。由于用限制性内切酶*Bgl*II切割pPIC9K和重组质粒pPIC9K/NS-*faeA*所得的线性化片段以双交换的形式替换醇氧化酶AOX1而整合到基因组上, 所以在MD平板上的两种毕赤酵母转化子都为His⁺Mut^s表型。以含空质粒的*Pichia pastoris* /pPIC9K转化子基因组DNA为模板进行PCR, 扩增得到500 kb大小的PCR产物片段, 包含两端引物之间的α-factor等片段(图5-A); 而以*Pichia Pastoris* /pPIC9K-NS*faeA*转化子基因组DNA为模板进行PCR, 扩增产生一条1.3 kb大小的PCR产物条带, 增加了800 bp左右的*faeA* cDNA片段(图5-B), 显示*faeA* 已经成功整合到这些转化子基因组中。

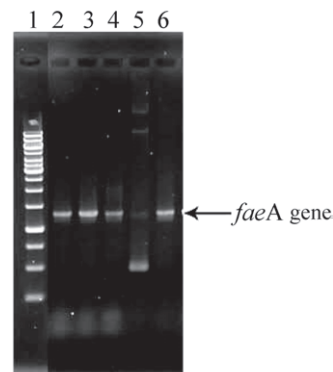


图4 *faeA*转化效果PCR琼脂糖凝胶电泳验证

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products from *P. pastoris* transformants

1号泳道为DNA Ladder Marker; 2~4号泳道是以转化子基因组为模板扩增出的目的条带; 5号泳道为以pPIC9K转化子为模板扩增出的目的条带; 6号泳道为以pPIC9K/*faeA*质粒为模板扩增出来的目的条带
Lane 1: Marker; Lane 2, 3, 4: *P. pastoris* GS115/(pPIC9K-US*faeA*); Lane 5: *P. pastoris* GS115/pPIC9K; Lane 6: Plasmid pPIC9K-US

挑取上述阳性的转化子, 对其进行培养和诱导表达。甲醇诱导3 d后, 取培养液上清以阿魏酸对硝基苯酚酯为底物检测酶活, 测得阿魏酸酯酶的比活力为16.6 U/mL, 说明阿魏酸酯酶以外泌蛋白的形式得到有效表达。其表达条件的优化、拷贝子数和宿主甲醇营养型(Mut^s或Mut⁺)等因素对酶表

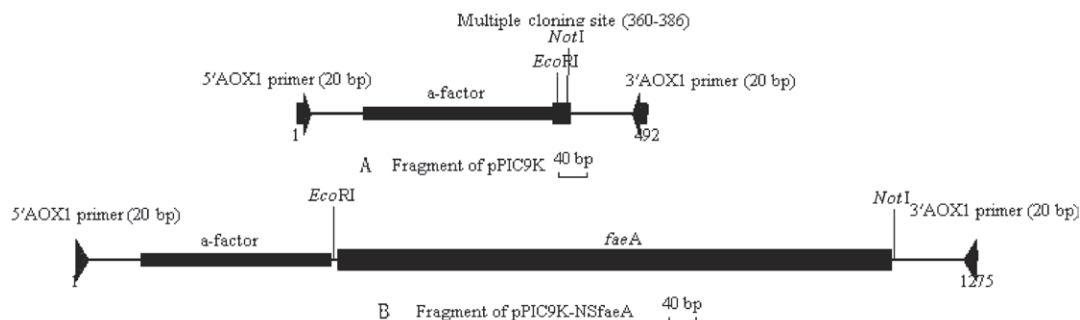


图5 以5'AOX1和3'AOX1引物分别对*P. pastoris*/pPIC9K和*P. pastoris*/pPIC9K-NS*faeA*转化子的基因组DNA为模板进行PCR示意图

Fig. 5 Diagram of PCR template in genomic DNA of *P. pastoris*/pPIC9K (A) and *P. pastoris*/pPIC9K-NS*faeA* (B) respectively with 5'AOX1 and 3'AOX1 primers

达的影响正在进一步研究中。

3 结论

毕赤酵母是一个优良的表达体系, 具有操作简便、可高水平地胞外表达、可进行糖基化、二硫键形成等真核转录后修饰等优点。我们把编码阿魏酸酯酶的cDNA克隆到pPIC9K表达质粒中, 在乙醇氧化酶(AOX1)启动子的调控下在毕赤酵母中进行表达。阿魏酸酯酶在 α -factor信号肽的引导下分泌到胞外, 在信号肽水解后成为成熟的阿魏酸酯酶。我们在实验中尝试了用带有黑曲霉本源信号肽cDNA插入pPIC9K载体中在毕赤酵母中表达, 不能检测到酶活。这可能是由于两个信号肽相连不能正确水解而不能产生成熟的有活性的阿魏酸酯酶。

本文研究通过对编码阿魏酸酯酶的cDNA的克隆表达以及阿魏酸酯酶检测体系的建立, 为在后续试验中利用分子生物学技术改造阿魏酸酯酶对高温、酸或碱等条件的耐受性和对改造后的阿魏酸酯酶活性的高通量筛选奠定了基础。

References

- Williamson G, Kroon PA, Faulds CB. Hairy plant polysaccharides: A close shave with microbial esterases. *Microbiology*, 1998, **144**: 2011~2023
- Wong WS. Feruloyl esterase. *Appl Biochem & Biotechnol*, 2006, **133**: 87~112
- De Vries RP, Michelsen B, Poulsen CH, Kroon PA, Van Den Heuvel RHH, Faulds CB, Williamson G, van den Hombergh JPTW, VISSER J. The *faeA* Genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *App & Environ Microbiol*, 1997, **11**: 4638~4644
- Donaghy J, Kelly PF, McKay AM. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**: 257~260
- Donaghy JA, Bronnenmeier K, Soto-Kelly PF, McKay AM. Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercoararium*. *J Appl Microbiol*, 2000, **88**: 458~466
- Faulds CB, Williamson G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Apergillus niger*: Specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology*, 1994, **140**: 779~787
- Takuya K, Shinji F, Kimio I, Hiroshi M. Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, **62** (10): 1998
- Blum DL, Kataeva IA, Li XL, Ljungdahl LG. Feruloyl Esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *J Bacteriol*, 2000, **3**: 1346~1351
- Knoshaug EP, Selig MJ, Baker JO, Decker SR, Michael E. Himmel, William SA. Heterologous expression of two ferulic acid esterases from *Penicillium funiculosum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, **146**: 79~87
- Juge N, Williamson G, Puigserver A, Cummings NJ, Connerton IF, Faulds CB. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*, 2001, **1**: 127~132
- Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: Identification of the nucleophilic serine. *Protein Expression & Purification*, 2003, **29**: 176~184
- Moukoulis M, Topakas E, Christakopoulos P. Cloning, characterization and functional expression of an alkali-tolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*. *Appl Microbiol & Biotechnol*, 2008, **79**: 245~254
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Wei CM (韦长梅), Xu B (徐斌), Zhu HJ (朱红军), Wang JT (王锦堂). One-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate in presence of DCC as catalyst. *Chin J Appl Chem (应用化学)*, 2004, **21** (11): 1184~1186
- Stephen LD, Jonathan W, James BH. A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, **1** (4): 19~21
- Mastihuba V, Kremnický L, Mastihubová M, Willett JL, Côté GL. A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Anal Biochem*, 2002, **309**: 96~101
- Hermoso JA, Sanz-Aparicio J, Molina R, Juge N, González R, Faulds CB. The crystal structure of feruloyl esterase a from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *J Mol Biol*, 2004, **338**: 495~506