

高效絮凝素毕赤酵母表面展示系统的构建*

韩双艳 韩振林 林影** 郑穗平

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要 为了获得高效的脂肪酶毕赤酵母表面展示系统, 利用来自酿酒酵母絮凝素蛋白 Flo1 的 N 端 874 个氨基酸残基(FS)和 C 端的 1 101 个氨基酸残基(FL)作为锚定蛋白分别构建了 2 套载体系统. 带有前肽的米黑根毛霉脂肪酶(ProRML)克隆到构建的 2 套展示载体中, 使米黑根毛霉脂肪酶(RML)分别以 N 端锚定或 C 端锚定的方式实现在毕赤酵母细胞表面的展示. 利用 RML C 端的 Flag 标签, 通过流式细胞术和激光扫描共聚焦显微镜检测 2 套系统中 RML 在酵母表面的展示情况. 研究发现, N 端锚定于酵母表面的展示酶 FSR 以 pNPC 为底物时, 水解活力达到了 105.3 U/g, 大约为 C 端锚定的展示酶 FLR 活力的 2 倍. 同时 FSR 比 FLR 具有更宽的温度、pH 作用范围和更好的热稳定性. 与游离酶和固定化酶相比, 展示酶 FSR 也表现出更为优良的热稳定性. 结果提示, 基于 Flo1 N 端锚定的展示系统更适合展示活性中心近 C 端的脂肪酶, 推动了展示酶的进一步研究和开发.

关键词 酵母表面展示, 毕赤酵母, 米黑根毛霉脂肪酶, N 端锚定系统, C 端锚定系统

学科分类号 Q814.4, Q785

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00484

米黑根毛霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* lipase, RML)是一条 α/β 型单链多肽, 由 269 个氨基酸残基组成^[1], 有着明显的界面激活效应, 固定化的 RML 可在非水相反应体系中高效催化酯交换、酯合成等反应, 其固定化技术得到广泛研究^[2-6]. 固定化 RML, 如 Lipozyme IM-20, 已经成为商品酶, 但高成本仍然是 RML 应用于大规模生产的主要瓶颈.

展示酶(displaying enzyme)是指利用酵母细胞表面展示技术(yeast surface display), 使酶蛋白与酵母细胞壁蛋白融合, 以天然构象的形式锚定在细胞表面, 类似于“固定化”. 同普通的固定化酶技术相比, 展示酶制备简单, 省去了酶的分离纯化以及固定化等步骤^[7-9], 有助于降低酶制剂生产成本.

目前, 已有多种酶实现了在酵母表面展示, 如脂肪酶、生物素连接酶、有机磷水解酶、羧酸酯酶、异构酶、环糊精糖基转移酶等^[7]. 工业上用量大的淀粉酶、纤维素水解酶、脂肪酶, 尤其是米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)以及南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)的酵母表面展示更是研究热点^[8-13]. 但相比于固定化酶, 展示酶的性能尤其是催化效率还有较大差距. 酶在酵母细胞表面的展示量、展示酶活成为主要的限制因素, 而寻找和建立一套高效经济的展示系统对于

突破上述瓶颈有重要意义.

絮凝素 Flo1p (flocculation protein flo1p)由 *FLO1* 编码, 是一种在絮凝中起重要作用的酵母细胞壁蛋白, Flo1p 包含有分泌信号区(secretion signal domain)、絮凝功能区(flocculation functional domain)、GPI 锚定黏着信号(GPI-anchor attachment signal)及膜锚定区(membrane-anchoring domain), 其中絮凝功能区接近 N 端, 能够识别并且以非共价键连接到细胞壁的甘露聚糖复合物上^[8, 14], 因而将外源蛋白的 N 端与 Flo1p 的絮凝功能区融合, 外源蛋白可以 C 端游离的形式展示在酵母细胞表面^[8], 如 Matsumoto 和 Tanino 等^[10-11]均报道了利用 Flo1p 的 N 端部分(含絮凝功能结构域, 长度分别为 1 417aa 以及 1 099 aa)作为载体蛋白可成功展示 ROL. 另外, Flo1p 也拥有 GPI 锚定区, 外源蛋白通过 C 端与 GPI 融合, 可实现 N 端游离的展示方式^[8], Sato 等^[15]利用 Flo1p C 端不同长度片段(含 GPI)作为锚定蛋白在酿酒酵母 MT8-1 表面成功展示了糖化酶. 因此, 利用 Flo1p 作为锚定蛋白, 外源酶分子可实现在酵母细胞表面两种截然不同的展示方式.

* 国家自然科学基金资助项目(30670053).

** 通讯联系人.

Tel: 020-39380698, E-mail: feylin@scut.edu.cn

收稿日期: 2009-08-12, 接受日期: 2009-11-06

本研究中, 我们利用 Flo1p 的 N 端絮凝功能区、C 端 GPI 锚定信号分别构建了 N 端锚定(目的蛋白 C 端游离)、C 端锚定(目的蛋白 N 端游离) 2 套毕赤酵母表面展示系统. 利用构建的 Flo1p 毕赤酵母展示系统, RML 以 2 种不同的方式展示在毕赤酵母表面. 对展示 RML 的酶学特性进行了研究, 考察了不同展示方式对酶活的影响规律, 获得高效的毕赤酵母表面展示系统的同时, 为实现酶特别是脂肪酶在酵母表面的高效展示提供理论基础和借鉴.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒. 大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 由本室保存; 毕赤酵母 GS115 和质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; 含脂肪酶基因质粒 pPIC9K-RML^[9] 由本实验室构建保存; 含缺失了 225 个氨基酸(301~525)的酿酒酵母絮凝素 *Flo1* 基因(gi:535933)的质粒 pouBis 由法国 Blondin 教授惠赠^[4].

1.1.2 酶与试剂. PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、DNA marker 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 酵母培养用 YNB、蛋白胨购自 Difco 公司; 酵母抽提物购自 Oxford 公司; 硝基仲丁酸酯 pNPB(C4)、对硝基苯酚辛酸酯 pNPC(C8)、对硝基苯基月桂酸酯 pNPL(C12)、对硝基苯基棕榈酸酯 pNPP(C16)购自 Sigma 公司; 引物合成及 DNA 测序鉴定由上海生工生物技术公司完成. RML 游离酶由本实验室纯化制备, RML 固定化酶 Lipozyme RMIM 购自诺维信中国公司.

1.2 方法

1.2.1 Flo1p 表面展示载体 pKFS 及 pKFL 的构建.

本文所构建的酵母展示载体均是在商业毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K 的基础上改造得到. 其中, 利用 Flo1p N 端絮凝功能区(874aa, Flo1p short chain, 缩写为 FS)构建 N 端锚定的毕赤酵母表面展示载体 pKFS, 利用 Flo1p C 端 GPI 锚定功能区(1 101aa, Flo1p long chain, 缩写为 FL)构建 C 端锚定展示载体 pKFL.

设计引物 A、B, 选取 *Bam*H I 和 *Eco*R I (黑体表示)作为酶切位点在载体 pPIC9K 上引入 FS 片段, 同时下游引物 B 添加 *Mlu* I、*Apa* I 和 *Sac* II (下划线标出)构建多克隆位点便于下一步克隆. 设计引物 C、D, 选取 *Eco*R I 和 *Not* I (黑体表示)为酶切位点引入 FL 片段, 上游引物 C 添加 *Sac* II、

Apa I 和 *Mlu* I 构建多克隆位点(下划线标出). A: 5' gat **ggatcc** aaacgatgacaatgcctcatcgctatatgttttggcagtc 3'; B: 5' aat **gaattc** ccgcgga ata gggccc ata **acg**cgt agagctggtgattgtcctgaagatg 3'; C: 5' aat **gaattc** ccgcgga ata gggccc ata **acg**cgt ccgggaggctactattatccaatgaaggtgtttac 3'; D: 5' aacaga **g**cgccgc ttaataattgccagcaataaggacgcaatgagac 3'.

以质粒 pouBis 模板, 利用上述引物 A、B 与 C、D 分别扩增 FS 和 FL 片段. PCR 产物均经切胶回收酶切, 其中 FS 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 与经同样双酶切后去掉载体自身信号肽编码序列的质粒 pPIC9K 构建 N 端锚定的毕赤酵母展示载体 pKFS. FL 经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后连入 pPIC9K (保留原载体 α -factor 信号肽序列)构建载体 pKFL. 以上重组质粒经化学法转化到 *E. coli* DH5 α 中进行阳性克隆筛选, 阳性转化子所提重组质粒经酶切鉴定后送公司测序鉴定.

1.2.2 米黑根毛霉脂肪酶表面展示重组质粒的构建. 为了便于检测表达情况, 在脂肪酶序列 C 端添加 Flag 标签(DYKDDDDK), 设计并合成引物 E、F (分别含 *Mlu* I 和 *Eco*R I, 黑体示出; Flag 序列用下划线示出), 从质粒 pPIC9K-RML 上 PCR 扩增带前肽的米黑根毛霉脂肪酶基因 *ProRML* (*RML* with a pro sequence), 定向克隆到 pKFS, 获得 RML N 端锚定质粒 pKFS-RML (缩写为 pKFSR). 设计引物 G、H (分别含 *Eco*R I 和 *Mlu* I, 黑体示出; Flag 序列用下划线示出), PCR 扩增的 *ProRML* 经相应酶切连入 pKFL, 构建 RML C 端锚定质粒 pKFL-RML (缩写为 pKFLR). E: 5' ccg **acg**cgt gttccaattaagagacaatctaac 3'; F: 5' cgc **gaattc** tta cttatcgtcgtcatccttgaatcagtagacaaaaccagtgtaataac 3'; G: 5' ccg **gaattc** gttccaattaagagacaatctaac 3'; H: 5' cgc **acg**cgt atcgtcgtcatccttgaatcagtagacaaaaccagtgtaataac 3'.

1.2.3 毕赤酵母转化及重组子筛选. 质粒 pKFSR 和 pKFLR 及不含 RML 的 pPIC9K 经 *Sal* I 线性化后, LiCl 法分别转化毕赤酵母 GS115, MD 平板筛选重组子. 随机挑取 pKFSR 和 pKFLR 转化的重组子点接到三丁酸甘油酯乳化平板, 在平板盖上添加 100 μ l 甲醇 30 $^{\circ}$ C 下倒置培养 48 h 诱导产酶, 分别挑选形成最大透明圈的重组子.

1.2.4 脂肪酶的诱导表达. 重组毕赤酵母菌株 GS115/pKFSR 以及 GS115/pKFLR 以单菌落接种制备种子液, 10%接种 50 ml BMGY 液体培养基中, 当 A_{600} 达到 2~6 时, 6 000 g 离心 10 min 收集菌

体. 同时设毕赤酵母重组菌株 GS115/pPIC9K 为阴性对照. 随后将菌体转至 50 ml 的 BMMY 液体培养基, 调节至 A_{600} 为 1, 30°C, 250 r/min 恒温摇床培养细胞 6 天.

1.2.5 流式细胞仪检测酵母表面脂肪酶展示情况.

6 000 *g* 离心 5 min 收集菌体, 用 pH 7.4 PBS(8.0 g/L NaCl, 1.92 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KCl, 0.24 g/L KH_2PO_4) 洗涤 3 次, 含 1% BSA 的 PBS 封闭 (A_{600} = 10), 取 BSA 封闭的悬浮酵母细胞 200 μl , 加入 1 μl 鼠源 Flag 单抗(0.2 g/L), 37°C 温育 1~2 h. PBS 洗涤 3 次, 200 μl PBS (1% BSA) 悬浮, 加 1 μl Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG antibody (2 g/L), 37°C 温育 1 h, PBS 洗涤后用流式细胞仪 (COHERENT INNOVA 300, Beckman Coulter) 检测, 收集测定细胞 20 000 个.

1.2.6 激光扫描共聚焦显微镜观察.

取经流式细胞仪检测展示脂肪酶的酵母细胞样品, 在激光扫描共聚焦显微镜 (LSM510 META DUO SCAN) 下用油镜观察, 荧光激发光波长 488 nm, 用 LSM Image Browser 软件拍照分析.

1.2.7 展示酶制备和酶活测定.

诱导 6 天后, 将培养物 6 000 *g* 离心弃上清, 用 100 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液洗 2 遍, 并重悬于 100 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 分别调整菌体浓度至 A_{600} 值为 50, 获得展示酶 FSR、FLR 的混悬液(基于 FS 系统展示的 RML 表示为 FSR, 其 N 端锚定于酵母细胞壁; 基于 FL 系统展示的 RML 表示为

FLR, 其 C 端锚定于酵母细胞壁). 展示 RML 的酶活力测定采用吸光度法并略作修改^[13]. 将不同链长的对硝基苯酚酯(C4、C8、C12、C16)底物溶于 4.85 ml 异丙醇中, 添加 125 μl Triton X-100 作乳化剂制备浓度为 1.25 mmol/L 的底物溶液. 将 50 μl 含有上述 FSR 和 FLR 的混悬液和 50 μl 底物溶液与 900 μl 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液混合, 配制 1 ml 酶活反应体系, 于适当的温度反应 5 min 后终止反应, 测量 A_{405} . 1 个酶活力单位定义为每分钟水解底物对硝基苯酚酯生成 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量.

1.2.8 展示酶的底物专一性.

展示酶 FSR、FLR 分别以 pNPB(C4)、pNPC(C8)、pNPL(C12)、pNPP(C16)为底物在相同条件下反应. 测定 405 nm 处吸光值, 确定展示酶的最适底物.

1.2.9 最适温度和最适 pH 值确定.

根据上述酶活反应体系, 在 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 分别测定展示酶 FSR、FLR 在 pH 8.0 时的酶活力, 最适反应温度下, pH 7~9 之间每隔 0.5 个 pH 值测定酶活力. 在优化温度和 pH 条件下测定酶活, 确定展示酶的最高活力.

1.2.10 热稳定性测定.

将展示酶 FSR、FLR 置于 60°C 保温 0~5 h, 每隔 1 h 取样, 立即放入冰浴 10 min, 于最适条件测定残留活力, 以保存于冰浴中的酶活力为 100%, 考察展示酶的热稳定性.

1.2.11 英文缩略词注解见表 1.

Table 1 Abbreviations of displaying enzyme and its corresponding anchoring terminus, anchoring protein, display vector, recombinant expression plasmid, recombinant yeast

Displaying enzyme	Anchoring terminus	Anchor protein	Display vector	Recombinant expression plasmid	Recombinant yeast
FSR	N-terminal anchored	FS (Flo1p short chain, containing flocculation functional domain)	pKFS (FS was introduced into pPIC9K)	pKFSR(RML were ligated into pKFS)	GS115/pKFSR (<i>P. pastoris</i> GS115 carrying plasmid pKFSR)
FLR	C-terminal anchored	FL (Flo1p long chain, containing GPI-anchor attachment signal)	pKFL (FL was introduced into pPIC9K)	pKFLR(RML were ligated into pKFS)	GS115/pKFLR (<i>P. pastoris</i> GS115 carrying plasmid pKFLR)

2 结 果

2.1 毕赤酵母絮凝素表面展示载体构建

以质粒 pouBis 为模板, PCR 扩增分别获得 2.6 kb 和 3.3 kb 长的 FS 和 FL 片段, 如方法 1.2.1 所述对毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K 进行改造, 得到重组 N 端锚定展示载体 pKFS 和 C 端锚定展示载体 pKFL, 转入 *E. coli* DH5 α 进行质粒扩增, 提取质粒经测序鉴定正确, 表明成功构建 2 种絮凝

素毕赤酵母表面展示载体. 根据方法 1.2.2 所述, 以质粒 pPIC9K-RML 为模板, 不同引物扩增分别获得约 1kb 的 *ProRML*, 将获得的两条基因酶切纯化后分别与载体 pKFS 和 pKFL 连接, 构建 RML N 端锚定表达质粒 pKFSR 与 RML C 端锚定表达质粒 pKFLR. RML 与 FS、FL 的融合方式以及构建的 2 种 RML 毕赤酵母表达载体如图 1 所示. 上述重组质粒经酶切和 DNA 测序证实插入序列与设计一致, 融合基因未出现碱基突变或移码.

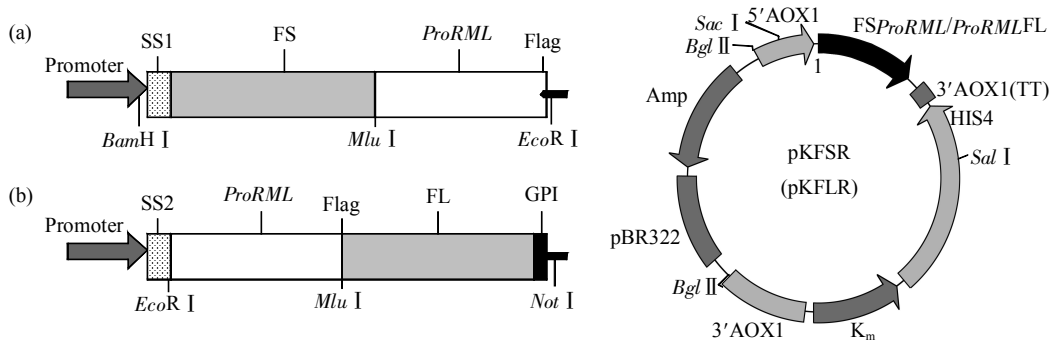


Fig. 1 Construction of two RML-displaying *Pichia pastoris* expression systems based on FLo1p

(a) pKFSR. (b) pKFLR. SS1: Signal peptide of FLo1p; SS2: α -factor signal sequence.

2.2 毕赤酵母转化及重组子鉴定

RML N 端锚定质粒 pKFSR 与 RML C 端锚定质粒 pKFLR 按 1.2.3 所示, 转化毕赤酵母宿主菌 GS115, 在 MD 平板上筛选展示 RML 的重组毕赤酵母 GS115/pKFSR 以及 GS115/pKFLR 转化子. 随机选取转化子点种三丁酸甘油酯乳化平板上进行培养, 甲醇诱导 48 h 后转化子菌落周围有透明圈出现, 重组酵母 GS115/pKFSR 形成的透明圈要明显大于 GS115/pKFLR 所形成的透明圈, 对照菌株 GS115/pPIC9K 周边无透明圈出现(图 2). 这一结果表明, 以不同方式展示在毕赤酵母表面的 RML 对三丁酸甘油酯均表现出水解活性, 但可能因展示方式不同, 酶活力也表现出差异. 2 种重组菌均选取透明圈较大的菌株进行培养并制备为展示酶混悬液进行后续研究.

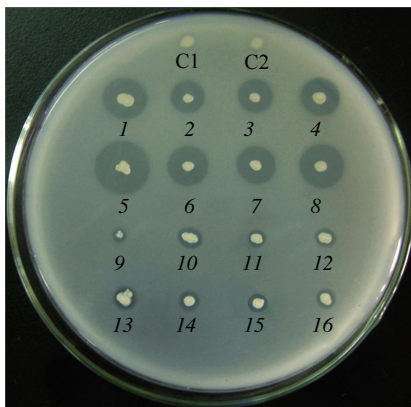


Fig. 2 Halo formation of recombinant *P. pastoris* on diffusion plate

C1: GS115/pKFS; C2: GS115/pKFL; 1 ~ 8: GS115/pKFSR; 9 ~ 16: GS115/pKFLR.

2.3 重组酵母 RML 表面展示分析

重组毕赤酵母 GS115/pKFSR, GS115/pKFLR 经相同的培养过程和 Flag 荧光染色处理, 考察 RML 在毕赤酵母细胞表面的表达与锚定. 同时设未携带 RML 基因的重组酵母 GS115/pKFS、GS115/pKFL 为阴性对照. 流式细胞仪分析显示, 在 495 nm 激发光激发下, 重组酵母 GS115/pKFSR 与对照 GS115/pKFS 相比, 有明显的荧光漂移, 其细胞表面的平均荧光强度均强于对照, 表明融合蛋白在重组酵母 GS115/pKFSR 上成功表达(图 3a). 进一步通过激光扫描共聚焦显微镜观察, 在 488 nm 激发光激发下, 重组酵母 GS115/pKFSR 细胞周围表面有明显的特异性荧光, 对照 GS115/pKFS 无荧光. 与预期一致, RML 主要锚定于酵母细胞壁上(图 4).

综合流式细胞仪分析和激光共聚焦显微镜观察结果发现, 激发波长下, 重组酵母 GS115/pKFLR 与对照 GS115/pKFL 相比, 既无荧光漂移(图 3b), 细胞周围也看不到特异性荧光(未示出), 这可能是由于融合蛋白 C 端锚定于细胞壁时, 位于分子 C 端

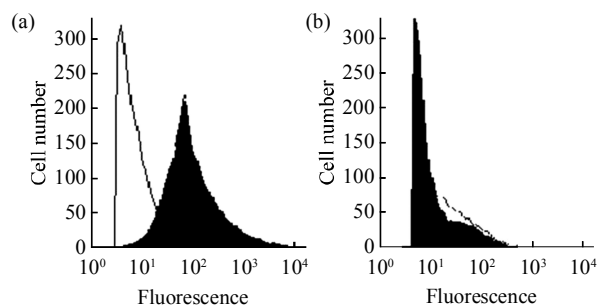


Fig. 3 Flow cytometer analysis of recombinant *P. pastoris*

(a) GS115/pKFS(White) and GS115/pKFSR (Black). (b) GS115/pKFL (White) and GS115/pKFLR (Black).

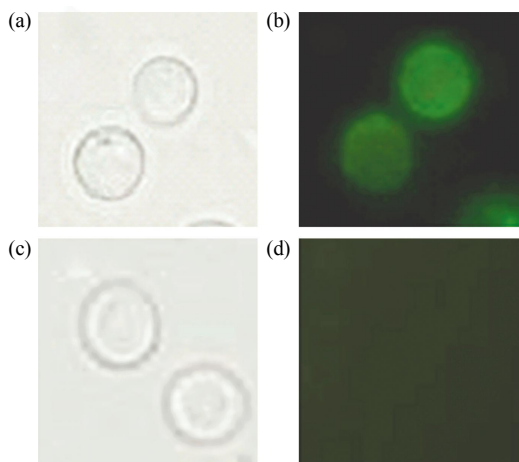


Fig. 4 Detection of recombinant *P. pastoris* with laser scanning confocal microscope

Phase contrast micrographs (a, c), immunofluorescence micrographs (b, d); GS115/pKFSR (a, b), GS115/pKFS (control) (c, d).

的 Flag 标签过于接近酵母细胞表面而不易被检测到。同时，由于 RML 的活性中心靠近 C 端^[4]，采用 C 端锚定时，RML 的活性中心在酵母表面暴露较少或 RML 正确折叠受到干扰，表现为其在三丁酸甘油酯乳化平板上形成的水解圈较小。

2.4 展示酶最适底物确定

按照方法 1.2.7 和 1.2.8 所述，制备展示酶 FSR (N 端锚定)和 FLR(C 端锚定)。分别以不同碳链长度的 pNP(C4、C8、C12、C16)为底物在 40℃ 和 pH 8.0 进行催化反应。发现 2 种展示酶均较适合中短链脂肪酸的水解，最适作用底物也一致表现为 C8 (图 5)，与游离 RML 的最适底物一致(数据未示

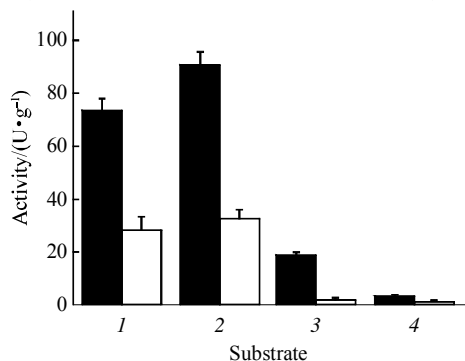


Fig. 5 Comparison of the substrate specificity of FSR and FLR

1: p-Nitrophenyl butyrate (C4); 2: p-Nitrophenyl caprylate (C8); 3: p-Nitrophenyl laurate (C12); 4: p-Nitrophenyl palmitate (C16). Enzyme activities of FSR (■) or FLR (□) were measured using p-nitrophenyl esters with various acyl chain lengths (C4, C8, C12, C16) as the substrates. Products were determined from a standard curve prepared using p-nitrophenol as a standard (data not shown). Based on three independent experiments, the means and standard deviations are shown by the error bars.

出)。表明在酵母表面展示的 RML 其最适作用底物未改变，提示利用酵母表面展示技术“固定”脂肪酶，对酶的底物识别不会产生影响。

2.5 展示酶最适温度与最适 pH 确定

展示酶 FSR 和 FLR 以 pNPC (C8)作底物进行部分催化性能研究，并与游离酶 RML 比较，发现两种展示方式分别影响了 RML 的最适温度和最适 pH。游离酶 RML 的最适温度是 40℃，展示酶 FLR 的最适温度与其一致。FSR 的最适温度则是稍有提高，为 45℃ (图 6)，并且酶活在温度由 35℃ 升至 55℃ 波动不大。最适 pH 测定发现(图 7)，展示酶 FSR 与游离酶 RML 的最适 pH 一致(pH 为 8.0)，但表现出了宽 pH 适应性。FLR 的最适 pH 虽稍有提高(pH 为 8.5)，但与其受温度影响大一致，该酶受 pH 影响也较大。

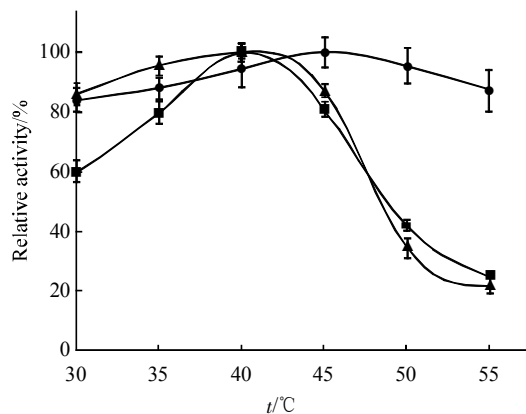


Fig. 6 Effect of temperature on the activity of FSR, FLR and free RML

The optimal temperature of FSR (●-●), FLR (▲-▲) and free RML (■-■) were determined by measuring the activity in the temperature range from 30℃ to 55℃.

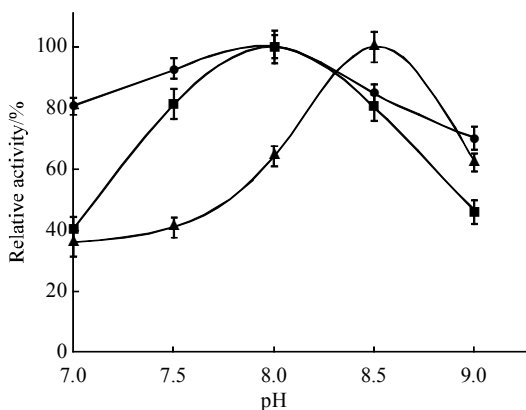


Fig. 7 Effect of pH on the activity of FSR, FLR and free RML

The optimal pH of FSR (●-●), FLR (▲-▲) and free RML (■-■) were determined by measuring the activity in the different pH buffers at their optimal temperature.

进一步将 FSR、FLR 置于最适温度和最适 pH 条件下, 以 pNPC 为底物比较水解活力, 发现 FSR 酶活为 105.3 U/g, 而 FLR 酶活为其一半, 仅为 52.3 U/g(数据未示出). 结合上面的结果, 基于 N 端锚定的展示酶 FSR 不仅具有较宽的作用温度、pH 范围, 每单位质量全细胞的水解活力更高.

2.6 展示酶的热稳定性测定

对展示酶 FSR、FLR、游离酶 RML 及固定化酶 Lipozyme RMIM 的热稳定性进行了测定和比较(图 8). 经 60°C 不同时间保温后, 以 pNPC 为底物, 在最适条件测定各酶的残余活力. 游离酶 RML 和展示酶 FLR 耐热性均不佳, 保温 1 h 后, 酶活分别急降至 10% 以下和 16%. 固定化酶 Lipozyme RMIM 耐热性稍好一些, 但在保温 2 h 后, 酶活力也仅保留 30%. 相比之下, 展示酶 FSR 表现出优良的耐热性, 60°C 保温 5 h 后, 酶活仍能保持初始的 50%, 再次证明了利用酵母表面展示技术“固定”酶可以改善酶的耐热性^[10-13]. 有趣的是, 展示酶 FSR 在 60°C 保温 1 h 酶活升高, 变为初始酶活的 1.6 倍, 此后缓慢下降, 出现先升后降的趋势. Tanino 等^[11]利用相似的 Flo1 N 端锚定展示系统(Flo1 N 端 1 099 aa, 含絮凝功能区)在毕赤酵母表面展示 ROL 时, 也发现类似的现象, 展示 ROL 在 60°C 保温 2 h 后, 酶活变为初始酶活的 6.5 倍, 提示基于 Flo1 N 端锚定的展示酶可在使用前温育进一步提高酶活力.

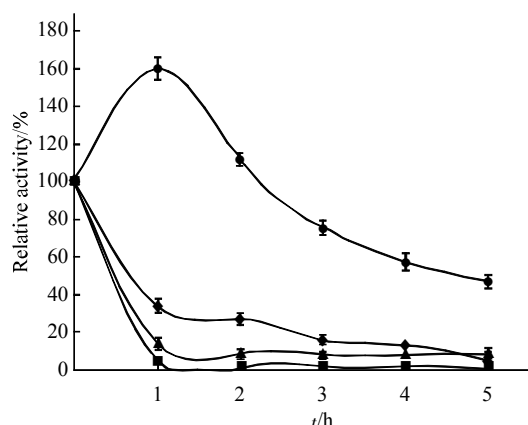


Fig. 8 Comparison of the thermostability of FSR, FLR, free RML, and Lipozyme RMIM

The thermostability of FSR (●—●), FLR (▲—▲), free RML (■—■) and Lipozyme RMIM (◆—◆) on the yeast cell surface were determined by measuring residual activity after thermal treatment from 0 to 5 h at 60°C. Relative activity is shown by taking the initial lipase activity as 100%. Based on three independent experiments, the means and standard deviations are shown by the error bars.

3 讨 论

酵母表面展示技术能将外源酶以融合蛋白的形式展示在酵母的表面, 保持酶分子相对独立的空间构象和原有的生物活性. 展示酶可催化各种反应, 表现出耐高温、耐有机溶剂以及热稳定性好等优良特性^[10-13, 17]. 对于游离酶来讲, 有机溶剂常常降低其在非水相催化中的活力, 而展示酶有力地改善了上述缺点. 如, 天然的 ROL 在有机溶剂中是不能催化对映体拆分的, 而展示的 ROL 却可以催化对映体拆分^[7]. Shiraga 等^[18]报道了在酿酒酵母中展示的 ROL 在正庚烷中水解棕榈酸对硝基苯酯的酶活是游离酶的 4.4×10^4 倍. 在正庚烷中以棕榈酸和正戊醇为底物时, 其酯化活性是游离酶的 3.8×10^4 倍. 需要指出的是, 大多数展示酶的催化效率还不能与固定化酶竞争. 尽管 Shiraga 等发现利用 α -凝集素展示在酿酒细胞表面展示 ROL 时, 展示量可达 0.2 mg/g, 推测与其他固定化方法的载酶量相当, 但酶在单位质量酵母细胞表面的展示量、展示酶活仍是制约展示酶催化效率的主要原因.

一直以来, 人们不断尝试开发新的展示系统提高展示酶催化效率. α -凝集素-GPI 锚定系统作为最早开发的酵母表面展示系统, 其展示的酶活大多偏低, 如 Washida 等^[19]报道利用将 α -凝集素的 C 端部分片段(含 GPI 锚定区)通过 Gly/Ser 连接肽与 ProROL(含有前肽的 ROL)融合, 成功地展示了第一个脂肪酶 ROL, 但其水解 BALB (2, 3 二巯基丙烷三丁基酯)的酶活为仅 4.1 U/g. 相比之下, 絮凝素 Flo1p 展示系统作为后续发展系统, 已被证实具有更多的展示方式和更好的展示能力. Sato 等^[15]发现, 利用 Flo1p 絮凝素 C 端不同长度片段(含 GPI)作为锚定蛋白均可在酿酒酵母 MT8-1 表面展示糖化酶, 长片段锚定糖化酶效率最佳. Matsumoto 等^[10]采用与本文相似的 Flo1p N 端锚定系统展示 ROL, 水解 BALB 的酶活分别为 29.7 U/g 和 61.3 U/g, 均高于 α -凝集素-GPI 锚定系统展示的 ROL.

一个成功的展示载体系统除了要求稳定外, 载体蛋白与表达酶的融合方式、融合位点也非常重要, 因为它们会影响融合蛋白的定位、稳定、比活性以及翻译后修饰, 从而直接影响酶在细胞表面的展示量和酶活. 本研究中, 为寻找 RML 最适合的展示系统, 我们同时建立了 N 端锚定和 C 端锚定 2 种不同的表面展示系统. 正如我们预计的, 2 种不同展示方式对 RML 在酵母表面空间构象的影

响, 导致最适温度、最适 pH、热稳定性和活力出现了明显差异. 结果显示, 利用 Flo1p 的 N 端絮凝功能结构域展示比利用其 C 端 GPI 锚定展示效果要好, 原因可能在于 RML 的催化三联体由 Ser144、Asp203 和 His257 组成, 靠近 C 端^[1], 当 RML 借助 GPI 锚定时, 脂肪酶活性中心会贴近酵母细胞壁, 融合方式产生的空间位阻影响了活性中心与底物、尤其是长链底物的结合从而间接降低了酶活. 这种现象在使用同样基于 GPI 锚定的 α -凝集素系统展示活性中心近 C 端的 ROL 时也有发现^[9]. 这些研究结果提示, 在展示活性中心靠近 C 端的脂肪酶或者其他酶时可以优先采用含絮凝功能结构区的 Flo1p N 端锚定系统.

毕赤酵母具有细胞生长快、易于培养、遗传操作简单、可高密度发酵等特点, 在工业上具有很好的应用前景. 因此本研究采用毕赤酵母作为酶展示宿主, 尽管毕赤酵母展示的 RML 活力略低于酿酒酵母展示的 RML^[20], 但是毕赤酵母培养能达到比酿酒酵母更高的细胞密度, 因此可获得高于酿酒酵母的产量. 脂肪酶不仅在油脂加工、皮革、纺织、造纸、洗涤剂等传统行业广泛应用, 而且在化妆品、医药、环境修复等高附加值产品领域的应用也日益增多. 本研究建立了脂肪酶高效毕赤酵母展示系统的同时, 首次将 RML 实现 N 端锚定和 C 端锚定两种不同形式的展示与比较, 研究了不同展示方式对展示酶活力、酶催化性质的影响, 为其他脂肪酶寻求最适的展示方式乃至避开固定化提供了借鉴, 推动了展示酶的进一步研究开发和潜在应用.

参 考 文 献

- [1] Brady L, Brzozowski A M, Derewenda Z S. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 1990, **343**(6260): 767-770
- [2] Gandhi N N, Vijayalakshmi V, Sawant S B, *et al.* Immobilization of *Mucor miehei* lipase on ion exchange resins. *Chem Engin J Biochem Engin J*, 1996, **61**(2): 149-156
- [3] Bruno L M, Lima filho J L, Castro H F. Comparative performance of microbial lipases immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol particles. *Braz Arch Biol Tech*, 2008, **51**(5): 889-896
- [4] Szczesna-Antczak M, Antczak T, Rzycka M, *et al.* Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. *J Mol Cata B: Enzym*, 2002, **19-20** (1-4): 261-268
- [5] Christensen M W, Lotte A, Husum T L, *et al.* Industrial lipase immobilization. *European J Lipid Sci Tech*, 2003, **105**(6): 318-321
- [6] Grazi V, Abian O, Mateo C, *et al.* Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. *Biotech Bioengin*, 2005, **90**(5): 597-605
- [7] Gai S A, Wittrup K D. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr Opin Stru Biol*, 2007, **17**(4): 467-473
- [8] Shibasaki S, Ueda M, Maeda H. Molecular display technology using yeast arming technology. *Anal Sci*, 2009, **25**(1): 41-49
- [9] Pepper L R, Cho Y K, Boder E T, *et al.* A decade of yeast surface display technology: Where are we now?. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, **11**(2): 127-134
- [10] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(9): 4517-4522
- [11] Tanino T, Fukuda H, Kondo A. Construction of a *Pichia pastoris* cell-surface display system using Flo1p anchor system. *Biotech Prog*, 2006, **22**(4): 989-993
- [12] Jiang Z B, Song H T, Gupta N, *et al.* Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif*, 2007, **56**(1): 35-39
- [13] Han S Y, Pan Z Y, Huang D F, *et al.* Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *J Mol Cata B: Enzym*, 2009, **59**(1-3): 168-172
- [14] Bidard F, Bony M, Blondin B. The *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 flocculation gene encodes for a cell surface protein. *Yeast*, 1995, **11**(9): 809-822
- [15] Sato N, Matsumoto T, Ueda M, *et al.* Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl Microbiol Biotech*, 2002, **60**(4): 469-474
- [16] 徐苏炜, 韩双艳, 韩振林, 等. 米黑根毛霉脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达. *食品与发酵工业*, 2008, **34**(11): 10-14
- [17] Xu S W, Han S Y, Han Z L, *et al.* *Food Ferment Indus*, 2008, **34**(11): 10-14
- [17] Matsumoto T, Ito M, Fukuda H, *et al.* Enantioselective transesterification using lipase-displaying yeast whole-cell biocatalyst. *Appl Microbiol Biotech*, 2004, **64**(4): 481-485
- [18] Shiraga S, Kawakami M, Ishiguro M, *et al.* Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4335-4338
- [19] Washida M, Takahashi S, Ueda M, *et al.* Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotech*, 2001, **56**(5-6): 681-686
- [20] Zhang W G, Han S Y, Wei D Z, *et al.* Functional display of *Rhizomucor miehei* lipase on surface of *Saccharomyces cerevisiae* with higher activity and its practical properties. *J Chem Tech Biotech*, 2007, **83**(3): 329-335

Construction of High Efficiency *Pichia pastoris* Surface Display System Based on Flo1 Protein*

HAN Shuang-Yan, HAN Zhen-Lin, LIN Ying**, ZHENG Sui-Ping

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract To obtain a high efficiency *Pichia pastoris* cell surface display system, two new systems based on two different anchor proteins derived from *Saccharomyces cerevisiae* Flo1 protein (Flo1p) were constructed respectively. The N-terminal anchor system could make the foreign lipase displayed on the *P. pastoris* cell surface with its C terminus free by fusion with an anchor protein containing N-terminal flocculation functional domain of Flo1p (874 residues, FS), which was able to adhere to the cell surface *via* noncovalent interaction with the mannan chain of the cell wall. Conversely, the foreign lipase can kept its N terminus free in another C-terminal anchor system, which utilizes a GPI-attachment signal domain located at C-terminal region of Flo1p (1 101 residues, FL) as anchor protein. Using these systems above, recombinant *R. miehei* lipase with a pro region (ProRML), which had its active site near the C-terminus, was displayed on the *P. pastoris* cell surface, and two surface-displayed RML, named as FSR and FLR, were obtained. Cell-surface display of the RML *via* Fs or FL anchor system was confirmed by flow cytometer and laser scanning confocal microscope. A strong fluorescence was clearly observed in recombinant yeast cells harboring pKFSR (pKFS-RML), but no fluorescence was detected in the yeast cells harboring pKFLR (pKFL-RML). The hydrolytic activity of FSR reached 105.3 U/g •[dry cell weight] with p-Nitrophenyl caprylate (pNPC) as the substrate, which is 2 times as high as that of FLR. In addition, the cell-surface display systems based on FS or FL endowed the displayed RML with different enzymatic properties. The surface-displayed RML with its C-terminus free (FSR) showed a better catalytic performance at temperature, pH and thermostability than the surface-displayed RML with its N-terminus free (FLR) did. The results suggest that the surface display of RML based on FS anchor system is more promising and more effective, especially for N-terminal immobilization of target enzyme whose catalytic site is near the C terminus.

Key words yeast cell-surface display, *Pichia pastoris*, *Rhizomucor miehei* lipase, N-terminal anchor system, C-terminal anchor system

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00484

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670053).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-39380698, E-mail: feylin@scut.edu.cn

Received: August 12, 2009 Accepted: November 6, 2009