

文章编号:1674-2869(2015)03-0020-05

# 微生物脂肪酶基因表达调控蛋白的研究技术进展

张 瑞

武汉工程大学化工与制药学院,湖北 武汉 430074

**摘 要:**脂肪酶生产成本较高,它的应用受到一定限制,因此利用生物工程技术使得脂肪酶的生产水平得到提升是亟需解决的难题.认识微生物脂肪酶基因表达调控规律,有助于通过基因工程技术,高水平表达生产脂肪酶,而微生物脂肪酶基因表达调控蛋白研究技术的进步决定着其成果的先进性.纵览近年微生物脂肪酶基因表达调控蛋白的研究技术,主要有电泳技术、圆二色谱、酶谱、DNA 宏观阵列技术、质谱、分子对接等,并分析应用此类研究技术的发展方向.发现与微生物细胞表达脂肪酶蛋白调控相关蛋白,就可以对微生物细胞表达脂肪酶的生产过程进行调控操作,使得细胞的代谢过程向着有利于脂肪酶的生产的方向进行.

**关键词:**电泳技术;圆二色谱;酶谱;DNA 宏观阵列技术;质谱;分子对接

**中图分类号:**Q939.97

**文献标识码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2015.03.005

## 0 引 言

脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3)即甘油三酯酯水解酶,其生物学活性是催化甘油酯水解生成甘油和脂肪酸,同时它也能够催化酯合成和酯交换反应.20 世纪初微生物脂肪酶被发现,其具有很多优点,如资源丰富,底物特异性,规模化生产容易,已经成为商业化脂肪酶的主要品种.微生物脂肪酶应用范围很广,从工业上作为洗涤剂的活性剂以及到如今在生物催化等,都表现出很大的潜力,已经受到越来越多的关注,尤其是生物催化剂可以满足对工业需求的广谱性而越来越受欢迎;此外,酯酶在农业和化学工业中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>.

在短时间内应用传统的诱变野生菌的方法筛选出具有高产量和高活性等特定性质的脂肪酶高产菌株较为困难,而运用生物工程方法可高效快速的实现产量、酶活等方面的提高,满足实际生产需要.可采用多种方法提高脂肪酶的表达和稳定性,如分子伴侣与脂肪酶基因的共表达、分泌蛋白与脂肪酶基因的共表达等.此外,通过改造表达基因,如脂肪酶基因或分泌蛋白基因以提高脂肪酶产量、活性和稳定性也有较多报道.

认识微生物脂肪酶基因表达调控规律,有助于通过基因工程技术高水平表达生产脂肪酶,而微生物脂肪酶基因表达调控蛋白研究技术的进步决定其成果的先进性.另一方面,脂肪酶蛋白的 3D 结

构图均已解析,利用已知的脂肪酶结构信息,通过分子设计、体外进化等蛋白质工程技术,对脂肪酶的醇耐受性、转酯活性、转酯反应中的水耐受性等性质进行改性,对于扩大工业生产应用,降低生产成本,具有积极的意义.

纵览先前此类研究所用技术,主要有电泳技术、圆二色谱、酶谱、DNA-阵列技术、质谱、分子对接等,并分析应用此类研究技术的研究方向.

## 1 微生物脂肪酶基因表达调控蛋白的研究技术

### 1.1 电泳技术

1.1.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gelelectrophoresis,简称 SDS-PAGE),用于分离蛋白质和寡核苷酸.聚丙烯酰胺凝胶为网状结构,具有分子筛效应;一般采用的是不连续缓冲系统,与连续缓冲系统相比,能够有较高的分辨率.在电泳时,蛋白质能够在正常状态下,按照其分子量大小、形状及其所带的电荷量而呈梯度展开,其迁移率主要取决于它的相对分子质量,而与所带电荷和分子形状无关.

通过 SDS-PAGE,细胞中的蛋白片段、细胞膜、细胞溶解物等被分离,还可比较同源或同样相对分子量的蛋白,并确定蛋白的分子量大小范围<sup>[2-8]</sup>.

1.1.2 双向凝胶电泳 近年来,经过多方面改进,

收稿日期:2015-03-20

作者简介:张 瑞(1977-),男,湖北黄石人,实验师,博士研究生.研究方向:工业微生物.

双向凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 2D-PAGE)已成为研究蛋白质组的最有使用价值的核心方法. 2D-PAGE 的工作机理为:第一向根据蛋白质的等电点不同而利用等电聚焦使其分离,第二向就根据分子量的大小使用 SDS-PAGE 使其分离,使多种蛋白混合物在二维平面上展开. 电泳后,用图像扫描仪、莱赛密度仪、电荷组合等装置把蛋白质图谱数字化,再经计算机利用相关软件对电泳图象进行分析处理,确定所有蛋白斑点的准确位置和强度,得到蛋白斑点图像,即“蛋白质图谱”.

利用 2D-PAGE 分离出来的蛋白及其图谱,可进行定性和定量的分析,此方法中微量的蛋白也可被鉴定. 软件分析蛋白质图谱,或蛋白免疫印迹法探究各类微生物表达蛋白的差异,得出能影响脂肪酶基因表达的蛋白类别. 因此可分离蛋白质组所有蛋白质,只要通过差异分析或其它方法找到需要的蛋白后,就可以切取这些目标蛋白质进行分析<sup>[9-15]</sup>.

**1.1.3 Northern 杂交** Northern 杂交(Northern blotting)是研究基因表达中使用最广泛的技术之一,其基本原理是,DNA 能与 RNA 进行分子杂交,在变性条件下,在尼龙或硝化纤维膜的固定载体上,使用标记探针,检测特异性 RNA,这个探针 DNA 或 RNA 可放射性或非放射性标记,进行放射性自显影,最后根据结果对表达量进行定性或定量. 该技术应用于特定性状基因在 mRNA 水平上的动态表达研究,通过使用放射性互补探针,鉴定特定的信使 RNA 分子组件. 如信使核糖核酸由于大小不同,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后使用反义探针来确定凝胶的 mRNA 的种类<sup>[16]</sup>.

**1.1.4 Southern 印迹杂交** Southern 印迹杂交(Southern blotting)是进行基因组 DNA 特定序列定位的通用方法,即在一定的条件下,两条具某种程度上同源性的核酸单链,按碱基互补的原则可特异性地杂交而形成双链. 一般是先经限制性内切酶消化 DNA 片段,再经过琼脂糖凝胶电泳将之分离,然后将 DNA 变性,并在原位将单链 DNA 片段转至尼龙膜或其他固相支持物上,干烤或紫外线照射固定后,再与相应结构的标记探针杂交,用放射自显影或酶反应显色,达到检测特定 DNA 分子的含量的目的.

由于核酸分子具有高度特异性,检测方法的灵敏性也强,结合凝胶电泳和核酸内切限制酶分析的数据,可绘制 DNA 分子的限制图谱;应用 Southern

印迹杂交技术,进一步构建出 DNA 分子的遗传图,或进行目的基因序列的测定,可以满足基因克隆的特殊要求,还能掌握 DNA 分子中基因编码区的大小和位置.

Southern 印迹法可进行克隆基因的酶切、图谱分析、基因组中基因的定性或定量分析、基因突变分析等<sup>[13]</sup>.

**1.1.5 免疫印迹法** 免疫印迹(Western blotting)是指的一种在聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的蛋白质转移到硝基或尼龙膜,并以抗体复合物确定具体的构造的程序,与蛋白质的特异性抗体结合后发现,与辅助蛋白质生成一个为探测信号的标签. 免疫印迹的方法通常是定量或定性地研究蛋白质表达的一个选择,它允许蛋白质的检测和特定的抗体在固相载体上(主要是硝基或 PVDF 膜). 检测的信号可以通过使用放射性,染色底物,或者是化学发光底物,经底物显色或放射自显影可检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分,能够快速、准确检测的蛋白质,也普遍用于检测蛋白水平的表达. 采用免疫印迹检测的固定在硝化纤维膜蛋白质和其它大分子. 这种快速和敏感的鉴定和量化特定的细胞溶解物中的蛋白质或蛋白质的混合物<sup>[2,5,10,13]</sup>.

## 1.2 圆二色谱

圆二色性(circular dichroism, 简称 CD),可检测手性对映体,立体异构体具有圆二色性,不同的区段具有吸收右圆偏振光和左圆偏振光的特性;同时,某些类型的二级结构,如蛋白质的  $\alpha$  螺旋和  $\beta$ ,表现出不同波长的可预测的圆二色性摩尔吸光系数之间的差异为左旋和右旋,偏振光可观察到分子手性对映体. 这种对 R 和 L 两种圆偏振光吸收程度的不同与波长的变化关系性质称为圆二色谱,是一种测定分子不对称结构的光谱法. 圆二色性(CD)光谱学是一个独特的光学技术,能够检测分子结构的手性和估计其数量,并提供二级和三级结构的蛋白质分子的信息<sup>[3,17]</sup>.

## 1.3 酶谱

酶谱(Zymography)分析是一种广泛使用的技术,研究基于蛋白质底物降解的活动的蛋白水解活动,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离含有蛋白水解底物的蛋白质,变性电泳后(不是非还原性的),蛋白质是用在一个适当的缓冲液复性. 酶是基因编码的表达物,所以酶蛋白的肽链氨基酸的序列变化等性质,通过分析酶谱可获得,如同工酶是一个重要的分析工具,它是催化同一生化反应,但运

动性质有所不同的同一种酶的不同表现形式,这是由于构成蛋白质亚基的氨基酸组成和顺序有所不同而造成的. 酶谱法是基于酶的底物全部水解酶检测的电泳技术,通过对脂肪酶活性的检测,可知鉴定和描述脂肪酶基因表达情形<sup>[7,9,18]</sup>.

#### 1.4 DNA 宏观阵列技术

DNA macro-array 是指点阵密集度较低的尼龙膜基因微阵列,膜及其上的每个点的面积相对较大,是固-液相杂交的模式,与常规的Southern 杂交相似,根据探针标记分子的种类等条件选择检测方法,如选择同位素标记. 通过比较芯片上相同位置上的基因在不同样品的杂交信号,就可以得到基因的表达信息,例如对蛋白分子在转录水平的超表达分析等.

根据影响脂肪酶基因表达的蛋白类别的基因序列,并用 DNA 阵列方法检测 mRNA 的表达水平,从转录水平分析脂肪酶基因调控蛋白. 分别屏蔽影响脂肪酶基因表达的蛋白基因,检测胞内物质和溢流代谢物质和培养基中残余底物的检测,研究并证实影响脂肪酶基因表达的蛋白的作用以及这些蛋白之间互相作用的网络<sup>[10]</sup>.

#### 1.5 质谱法

质谱法(Mass Spectrometry)普遍用于各领域中通过制备、分离、检测气相离子而鉴定化合物的一种方法,是与光谱并列的谱学技术,当前绝大多数蛋白质的鉴定是利用质谱法进行的. 质谱学方法是一种同时具备高特异性和高灵敏度、迅速、准确的优点的普适性方法. 质谱分析是一种测量离子质荷比(质量-电荷比)的分析方法,对于蛋白质样品,可以测定氨基酸序列,能进行蛋白质序列分析和翻译后修饰分析,它能在一次分析中提供充分的结构信息,因此生物质谱已经成为蛋白质研究中分析与鉴定肽和蛋白质的主要技术之一.

基质辅助激光解吸离子化质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry,简称为 MALDI-MS)是 20 世纪 80 年代末出现并迅速发展和在科研中被广泛应用的分析技术. 其离子化方式产生的离子一般使用飞行时间(time of flight, TOF)检测器测定,因此 MALDI 常与 TOF 一起被称之为基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS). MALDI-TOF-MS 技术,使传统的主要用于小分子物质研究的质谱技术能够用于测定生物大分子,从而进入生物质谱分析技术时代. 该技术使用“软电离”方式,通常能产生稳定分子离子,是测定生物大分子分子量的可靠方法,能用

于生物化学分析,特别是在蛋白质、核酸的定量分析研究中的大量应用,如气相色谱-质谱联用仪或液相色谱-质谱联用等获得定量数据.<sup>[9,11,13,19,20]</sup>.

#### 1.6 分子对接

分子对接(Molecular Docking)是一种对两个或多个分子的几何结构的结合的计算机辅助预测模拟,可理论上模拟分子间结合的计算方法,分子可以借助计算机图形学或通过使用计算机算法自动结合,对接使用分子可视化软件,手动完成;可优化受体化合物的位点,得到受体小分子化合物与靶标大分子作用的最佳构象,通过打分函数找出接近天然构象的与受体亲和力最佳的配体,从而模拟小分子配体与受体生物大分子相互作用的过程和结果,从而进行分子之间结合的虚拟筛选.

在结合时,刚体和柔性对接过程,处理分子的灵活性和构象变化,有各种各样的算法自动对接. 分子对接的种类主要包括:刚体对接、半柔性对接、柔性对接. 不同的算法通常用于对接两个高分子相对于高分子和低分子量化合物的结合. 通过分子对接可以选择最适合的脂肪酶底物,也可奠定未来旨在研究脂肪酶在优化化学活性和立体选择性的基础<sup>[21]</sup>.

#### 1.7 其他技术

还有一些常用的方法,如免疫检测(immuno-odection)<sup>[6,10]</sup>,射线自显迹法(autoradiography)<sup>[5,15]</sup>,自动荧光摄影法(autofluorography)<sup>[15]</sup>,脉动追踪法(pulse-chase)<sup>[13]</sup>,生物信息学<sup>[22]</sup>等,都是微生物脂肪酶基因表达调控蛋白研究上的利器.

## 2 展 望

随着分析检测技术的进步,以及现代科学技术的发展,对生命活动规律的探究和利用越来越深入彻底和高效合理. 在利用微生物脂肪酶基因表达调控蛋白的研究中,通过对宿主和途径的优化,在转录、翻译和翻译后水平直接控制生物合成途径的通量,功能基因组学的方法非常适合于识别在生物合成途径中的限速步骤,如利用目标蛋白质组学来研究调控脂肪酶表达的蛋白. 通过 2D-PAGE 分离微生物细胞表达蛋白,研究脂肪酶野生型、过表达微生物表达蛋白与不表达脂肪酶基因菌株的表达蛋白的图谱;利用相关蛋白图谱软件分析蛋白质图谱,或以蛋白免疫印迹(Western blotting)方法检测电泳分离的特异性脂肪酶基因表达相关的蛋白成分,分析研究与微生物细胞外分泌脂肪酶蛋白调控相关蛋白,并确定此类蛋白的有关基因序列;研究

与微生物细胞表达脂肪酶蛋白调控相关蛋白的调控关系网络. 找到了与微生物细胞表达脂肪酶蛋白调控相关蛋白, 就可以对微生物细胞表达脂肪酶的生产过程进行调控操作, 使得细胞的代谢过程向着有利于脂肪酶的生产的方向进行.

微生物分泌事件中有几个瓶颈问题, 例如瞄准目标转移酶较难, 分泌蛋白的降解和不正确的折叠等影响, 然而分泌机制和途径的研究将会改善微生物蛋白分泌系统和扩大其作为工业生产菌的应用前景. 如今, 许多微生物的完整基因序列已知, 用现代技术广泛地应用于基因组学和蛋白质组学, 那些已存在的微生物生产菌株的优化之路行进得更远. 尽管如此, 每一个分泌蛋白是独一无二的, 对于生产表达系统而言需要调整, 如改变稀有密码子优化翻译, 但是以所有的关于启动子、质粒、发酵、信号肽、分泌组织蛋白酶和分子伴侣以及突变株的收集等, 使之更具有发展前景<sup>[10]</sup>. 随着发酵控制以及微生物表达调控技术的深入研究, 脂肪酶的产量和品质还将得到更大的提高, 其成本也会越来越低, 而在生产和生活中的应用将越来越广泛.

## 致 谢

感谢华中科技大学生命与科学技术学院能源生物技术与生态学研究所在本论文撰写过程提供的研究平台!

## 参考文献:

- [1] WESTERS H, BRAUN P G, WESTERS L, et al. Genes Involved in SkfA Killing Factor Production Protect a *Bacillus subtilis* Lipase against Proteolysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005(4):1899-1908.
- [2] KOUWEN T R H M, NIELSEN A K, DENHAM E L, et al. Contributions of the Pre- and Pro-Regions of a *Staphylococcus hyicus* Lipase to Secretion of a Heterologous Protein by *Bacillus subtilis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3):659-669.
- [3] BIELEN A, CETKOMIC H, LONGP F, et al. The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl) esterase and a true lipase activity [J]. *Biochimie*, 2009, 91:390-400.
- [4] MA Ji-sheng, ZHANG Zuo-ming, WANG Bai-jing, et al. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2006(45):22-29.
- [5] WESTERS H, BRAUN P G, WESTERS L, et al. Genes Involved in SkfA Killing Factor Production Protect a *Bacillus subtilis* Lipase against Proteolysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4):1899-1908.
- [6] EGGERT T, BROCKMEIER ULF, MELLONEY J D, et al. Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003 (225):319-324.
- [7] KOBAYASHI G, TOIDA J, AKAMATSU T, et al. Accumulation of a Recombinant *Aspergillus oryzae* Lipase Artificially Localized on the *Bacillus subtilis* Cell Surface [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90 (4):422-425.
- [8] LITANTRA R, LOBIONDA S, YIM J H, et al. Expression and Biochemical Characterization of Cold-Adapted Lipases from Antarctic *Bacillus pumilus* Strains [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, 23 (9):1221-1228.
- [9] GALKA F, WAI S N, KUSCH H. Proteomic Characterization of the Whole Secretome of *Legionella pneumophila* and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles [J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76 (5):1825-1836.
- [10] WESTERS L, WESTERS H, QUAX W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1694:299-310.
- [11] SCHMIDT F, DONAHOE S, HAGENS K, et al. Complementary Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Proteome by Two-dimensional Electrophoresis and Isotope-coded Affinity Tag Technology [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004 (3):24-42.
- [12] NOUWENS A S, BEATSON S A, WHITCHURCH C B, et al. Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the las and rhl quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Microbiology*, 2003, 149:1311-1322.
- [13] JONGBLOED J D H, ANTELMANN H, HECKER M, et al. Selective Contribution of the Twin-Arginine Translocation Pathway to Protein Secretion in *Bacillus subtilis* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (15):44068-44078.
- [14] HIROSE I, SANO K, SHIODA I, et al. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study [J]. *Microbiology*, 2000, 146:65-75.
- [15] LORINCZ A T, MILLER M J, XUONG N H, et al. Identification of Proteins Whose Synthesis Is Modulated During the Cell Cycle of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1982, 2 (12):

- 1532–1549.
- [16] FUJIMOTO D F, BRUNSKILL E W, BAYLES K W. Analysis of Genetic Elements Controlling *Staphylococcus aureus* *lrgAB* Expression; Potential Role of DNA Topology in *SarA* Regulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4822–4828.
- [17] YEDAVALLI P, RAO N M. Engineering the loops in a lipase for stability in DMSO[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2013, 26(4): 317–324.
- [18] KOBAYASHI G, FUJII K, SERIZAWA M, et al. Simultaneous display of bacterial and fungal lipases on the cell surface of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(1): 15–19.
- [19] GOUW J W, KRIJGSVELD J, HECK A J. R. Quantitative Proteomics by Metabolic Labeling of Model Organisms[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2010(9): 11–24.
- [20] OOSTHUIZEN M C, STEYN B, THERON J, et al. Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* during Biofilm Formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2770–2780.
- [21] GODINHO LF, REIS C R, TEPPER P G, et al. Discovery of an *Escherichia coli* Esterase with High Activity and Enantioselectivity toward 1,2-O-Isopropylidenglycerol Esters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011(9): 6094–6099.
- [22] GOMEZ M, JOHNSON S, GENNARO M. Identification of Secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a Bioinformatic Approach[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(4): 2323–2327.

## Technical development of regulation protein of expression of microbial lipase gene

ZHANG Rui

School of Chemical Engineering & Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China

**Abstract:** Owing to relatively high production costs of the present commercial lipases, the more practical application of lipase is restricted. Therefore, it is urgent to further enhance the productivity of lipase by bioengineering technology. Based on understanding the expression regulation mechanism and control law of microbial lipase gene, lipase high expression was achieved by using the strategy of genetic engineering technology. It's well known that the progress of research technology on the microbial lipase gene expression regulation of protein is vital to advances of its achievements. Through overview of microbial lipase gene expression regulatory proteins in recent years, the main research techniques including the electrophoresis technology, circular dichroism, zymogram, DNA – array technology, mass spectrometry, and molecular docking applied to the regulation of microbial lipase are discussed. If regulation protein of expression of microbial lipase gene were found, the production process of microbial cells express lipase operation could be controlled, and the process of cell metabolism towards the direction of lipase production could be made.

**Key words:** microbial lipase; electrophoresis technology; circular dichroism; zymogram; DNA – array technology; mass spectrometry; molecular docking

本文编辑: 龚晓宁