

南极深海沉积物宏基因组 DNA 中低温脂肪酶基因的克隆、表达及性质分析*

张金伟 曾润颖**

(国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005)

摘要 从南极普利兹湾深海 900 米深的沉积物中提取获得宏基因组 DNA, 并通过设计引物, 从中克隆到全长为 948 bp 的低温脂肪酶 (*lip3*) 开放阅读框完整序列, 该基因编码一个由 315 个氨基酸残基组成、预计分子质量为 34.557 ku 酶蛋白(Lip3); 氨基酸序列上的 GFGNS (GXGXS) 和 G-N-S-M-G (GXSXG) 在许多脂肪酶中有很高的保守性, 它们的水解机制所必需的序列, 也是丝氨酸水解酶中最保守的序列. 构建了 *lip3* 基因重组表达载体, 并在大肠杆菌中获得表达, 采用镍离子亲和层析柱对表达的酶蛋白 Lip3 进行纯化, 得到约 35 ku 蛋白条带, 酶学性质的分析表明, 该酶的最适作用温度为 25°C, 在 0°C 时表现为最高活力的 22%, 最适 pH 值为 8.0, 对热敏感, 35°C 热处理 60 min 剩余酶活为 10%, 以硝基苯棕榈酸酯为底物, Lip3 的酶促反应常数 K_m 值随着反应温度的升高而升高, 是典型的低温酶.

关键词 南极深海沉积物, 宏基因组, 低温脂肪酶, 克隆与表达

学科分类号 Q78

宏基因组(metagenome)即生境中全部微小生物遗传物质的总和, 目前主要指环境样品中的细菌和真菌的基因组总和^[1]. 宏基因组既包含了可培养(仅占微生物总种类数的 1%左右)的又包含了未能培养或非可培养(99%)的微生物基因^[2], 避开了微生物分离培养的问题, 极大地扩展了微生物资源的利用空间. 在目前的基因结构功能认识和基因操作技术背景下, 环境样品宏基因组成为研究和开发的主要对象^[3], 而采取的主要手段就是构建宏基因组文库, 目前已采用土壤、海水、海洋浮游生物、海绵、甲虫、人唾液等环境样品, 成功构建了宏基因组文库, 已筛选到的生物活性物质有各种酶类及一些次生代谢产物, 包括脂酶/酯酶、蛋白酶、淀粉酶、氧化酶、几丁质酶、核酸酶、膜蛋白、4-羟基丁酸代谢酶系、生物素合成酶系、色素、抗菌抗肿瘤活性物质及抗生素抗性基因等^[4~6]. 而尚未见到通过采用设计引物直接从环境样品宏基因组中 PCR 克隆生物活性物质的报道, 尤其是在南极、深海等极端环境中. 本文首次报道了从南极普利兹湾深海 900 米深的表层沉积物中提取获得宏基因组 DNA, 并通过设计引物从中 PCR 克隆得到低温脂肪酶开放阅读框完整序列. 构建得到该脂肪酶的重

组表达载体, 在大肠杆菌中获得表达, 并对表达的酶蛋白进行纯化和酶学性质分析.

1 材料与方法

1.1 材料

低熔点琼脂糖和低熔点琼脂糖酶购自 Epicentre 公司; Gigapack III XL Packaging Extract 购自 Stratagene 公司; DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 消毒过滤膜装置, 购自 Millipore 公司; 大肠杆菌 *E.coli* TOP10F' 购自深圳市源动力生物技术开发公司; T-载体购自 Promega 公司; 表达载体为 pLLP-OmpA 购自晶美生物工程有限公司; 考马斯亮蓝 G-250 及 R-250、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺为 Amresco 公司产品.

南极样品取自南极普利兹湾深海沉积物(74°25'E, 66°55'S, 水深 900 m), 样品于 2005 年 2 月中国第 21 次南极考察期间采集, 采集后保存于

*国家自然科学基金资助项目(40406029).

** 通讯联系人.

Tel: 0592-2195323, E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-05-19, 接受日期: 2006-07-11

-20℃, 带回实验室在无菌超净台分装后, 转移至-80℃保存.

1.2 方法

1.2.1 环境样品宏基因组 DNA 提取. 沉积物总 DNA 提取方法在原位裂解法的基础上加以改进^[7]. 在 5 g 样品中加入核酸提取缓冲液 (100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH 8.0, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 100 mmol/L EDTA pH 8.0, 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, 10% 蔗糖溶液), 蛋白酶 K (200 mg/L), 溶菌酶 (1 g/L) 和 2% SDS, 混合均匀, 于摇床中 50℃ 低速振荡过夜; 裂解完全后离心, 上清加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 溶液抽提, 直至抽提液中的杂蛋白消失. 总 DNA 用 0.3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5~3 倍体积预冷的无水乙醇进行沉淀, 最终溶解于 1 ml 双蒸水. 粗提总 DNA 用低熔点琼脂糖电泳进行检测, 并用低熔点琼脂糖酶回收纯化.

1.2.2 脂肪酶基因的 PCR 克隆. 参考文献[8]设计 PCR 引物进行扩增. *lip3F1* (forward primer): 5' ATGCTA(C/T)TAA(T/C)ACGC(A/G)TACG(T/C)TC(A/T/G/C)TG 3' 和 *lip3R1* (reverse primer): 5' TTACTCCT(T/C)TGGC(A/G)C(A/G)TCACCA(C/T)ACGCC 3'. PCR 反应体系为: 10 × PCR 缓冲液 10 μl, dNTP 10 μl, 引物各加 10 pmol, Mg²⁺ 浓度为 1 mmol/L, Taq 酶 2 U, 用双蒸水补足体积到 100 μl. 反应条件为: 95℃ 2 min 预变性, 然后以 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1.5 min 为一个循环, 共进行 35 个循环. 产物由 PCR 产物纯化试剂盒(U-gene)纯化后连接到 pMD18-T 载体上(Takara 公司), 转化 *E. coli* Top10 F', 通过菌落 PCR 筛选含有 *lip3* 基因的克隆 pET-*lip3*.

1.2.3 表达载体 pLLP-*lip3* 的构建. 设计两端分别含有 *Bam*H I 和 *Nhe* I 酶切位点的引物进行 *lip3* 基因的扩增, 并且使 5' 端不含终止子 TAG. *lip3F2* (正向): 5' TACGGATCCATGCTATTAA-TACGCATAC 3'; *lip3R2* (反向): 5' TACA-GCTAGCCTCCTTTGGCGCGTCACC 3'. PCR 反应体系为: 10×PCR 缓冲液 10 μl, dNTP 10 μl, 引物各加 10 pmol, Mg²⁺ 浓度为 1 mmol/L, Taq 酶 2 U, 用双蒸水补足体积到 100 μl. 反应条件为: 95℃ 2 min 预变性, 然后以 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1.5 min 为一个循环, 共进行 35 个循环. 产物由 PCR 产物纯化试剂盒纯化后用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 双酶切, 回收目的 DNA. 与同样经 *Bam*H I 和

Nhe I 双酶切、回收的表达载体 pLLP-*OmpA* 于 22℃ 连接过夜. 连接产物转化 TOP10 F' 感受态细胞, 提取质粒用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 双酶切鉴定阳性克隆. 将鉴定正确的阳性克隆扩大培养, 大规模提取质粒, 保存于 -20℃, 得到表达质粒 pLLP-*lip3*.

1.2.4 脂肪酶的诱导表达. 挑取转化了 pLLP-*lip3* 的 TOP10 F' 单菌落至 5 ml LB (另含 0.2% 的葡萄糖, Amp 0.12 g/L) 液体培养基中, 37℃ 培养过夜. 按 1: 50 比例转移 2 ml 菌液至 100 ml 液体 LB (另含 0.2% 的葡萄糖, Amp 0.12 g/L) 培养基中, 180 r/min 30℃ 振荡培养 2~3 h 至 A₆₀₀=0.6, 加入 IPTG 至终浓度 100 mg/L, 于 28℃ 中继续振荡培养 8 h, 发酵液经 6 000 g 离心 10 min, 收集菌体用于 *lip3* 的纯化.

1.2.5 脂肪酶的纯化. 采用镍离子亲和层析柱纯化含组氨酸序列的脂肪酶, 所有的纯化步骤都在 4℃ 下进行. 离心收集得到的菌体, 用结合缓冲液 (5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 混悬后, 超声裂解细菌并离心去除不溶物. 上清液通过镍离子亲和层析柱 (2 cm×10 cm) 并用结合缓冲液洗至基线平稳后, 用洗脱缓冲液 (0.3 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱脂肪酶 Lip3 蛋白. 洗脱液经 280 nm 检测后收集合并, 溶液先用 20 mmol/L NH₄HCO₃ 透析 12 h 以去除高浓度的咪唑, 然后再用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液进行透析处理 12 h, 之后真空冷冻干燥得到酶粉, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测.

1.2.6 脂肪酶酶活力测定. 采用对硝基苯棕榈酸酯 (p-nitrophenyl palmitate, p-NPP) 法, 参考文献[9]略有修改, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液配制浓度为 5 mmol/L 的 p-NPP 作为酶反应的底物. 在 3 ml 的反应体系中, 加入 1.5 ml 浓度为 5 mmol/L 的底物 p-NPP, 1 ml 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液, 0.01 ml 浓度为 0.5 mmol/L 的 CaCl₂, 之后将此混合液在 25℃ 下预热 5 min, 然后再加入 0.5 ml 的纯酶液, 反应 10 min 后, 立即加入 4 ml 浓度为 0.1 mmol/L 的 NaOH, 终止酶反应, 使黄色的反应产物对硝基酚 (p-nitrophenol, p-NP) 可以稳定一段时间, 然后测定 A₄₀₅ 值, 每个样品均测定 3 个平行样. 空白试验用灭活的酶液代替酶液. 单位酶活力定义为: 以 25℃ pH 8.0 条件下, 每分钟分解对硝基苯棕榈酸酯释放出 1 μmol 对硝基酚 (p-Nitrophenol) 定义为 1 个酶活力单位,

以 U 表示。

1.2.7 温度对酶活力及稳定性的影响测定. 测定纯酶在不同温度下(10~50℃, 间隔 5℃)水解底物的活力, 以研究其最适作用温度. 取 20 ml 酶液分别置于不同温度中温育 60 min, 在最适反应温度下测定酶的残留活力, 以研究酶的热稳定性.

1.2.8 pH 值对酶活力及稳定性的影响. 测定纯酶在最适作用温度、不同 pH 下(pH 5~12)水解底物的活力, 以研究其最适作用 pH. 取 2 ml 酶液和等量各种不同 pH 缓冲液于 4℃ 温育 24 h, 然后再调节至最适 pH, 测定酶的残留活力, 反应在最适酶活温度下进行.

1.2.9 温度对酶促反应的影响. 根据酶促反应的动力学原理, 在不同的温度下, 酶的最大反应速度不同, 由米氏方程式推导计算出不同温度下的米氏常数 K_m .

1.2.10 引物合成、测序及同源性分析. 引物合成、序列测定均由上海生工生物技术有限公司完成, 序列同源性分析在 NCBI 网站上完成(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2 结 果

2.1 DNA 提取结果

进行宏基因组文库构建、筛选功能基因的前提是获得大片段, 高纯度和高浓度的宏基因组 DNA, 采用原位裂解法能最大限度地获取环境样品中的总 DNA, 避免因被样品微粒吸附而造成微生物 DNA 的损失, 尤其适用于生物量较低的极端环境样品. 南极普利兹湾深海 3 个站位及中国长城站和中山站 2 个陆地站位等 5 个站位的深海沉积物或陆地土壤中 DNA 抽提结果表明(图 1), 样品 CC0105 和 ZS0106 这 2 个陆地土壤样品中获得的 DNA 含量比较多; 而样品 PB0102、PB0103、PB0104 这 3 个深海沉积物样品中获得的 DNA 含量比较少, 说明南极陆地土壤比深海沉积物中生物量高, 所得 DNA 片段都在 20 kb 以上, 满足构建 DNA 文库或进行功能基因 PCR 克隆的要求. 将从 5 个站位获得的 DNA 纯化后, 作为模板, 以 *lip3F1* 和 *lip3R1* 引物进行 PCR 的定向克隆, 结果表明(图 2), 所设计的引物能从 5 个不同站位的 DNA 样品中克隆出大小约为 900 bp 左右的片段, 并以 PB0102 和 PB0103 这 2 个深海站位的样品最为明显.

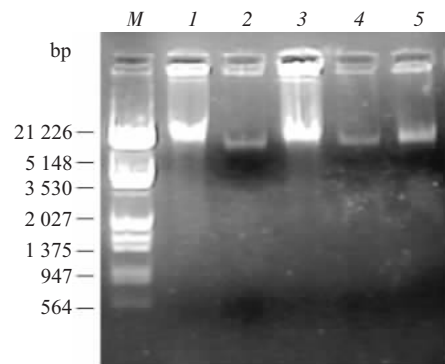


Fig. 1 Total DNA extracted from different sediments

M: λ DNA /EcoR I + Hind III; 1: CC0105; 2: PB0101; 3: ZS0106; 4: PB0102; 5: PB0103.

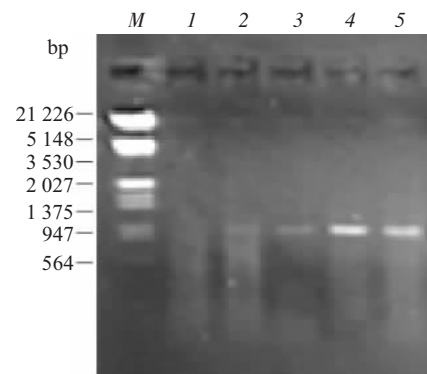


Fig. 2 PCR amplification of lipase gene from different environmental soil DNA

M: λ DNA /EcoR I + Hind III; 1~5: PCR products by the primers of *lip3F1* and *lip3R1*.

2.2 脂肪酶基因 (*lip3*) 的克隆和测序

以 PB0103 深海站位沉积物样品的总 DNA 为模板, 引物 *lip3F1* 和 *lip3R1* 的 PCR 扩增产物大小在 900 bp 左右(图 3), 纯化后连接到 T 载体(3 kb)上, 转化 *E.coli* TOP10F', 培养过夜. 经 *Bam*H I 和

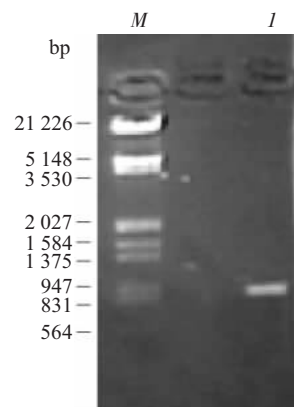


Fig. 3 PCR amplification of *lip3* gene

M: λ DNA /EcoR I + Hind III; I: PCR product of *lip3*.

Nhe I 双酶切鉴定正确后(图 4)测序, 获得 *lip3* 的核酸全长 ORF 序列为 948 bp. 该序列在 EMBL 上的注册号为: AM259557.

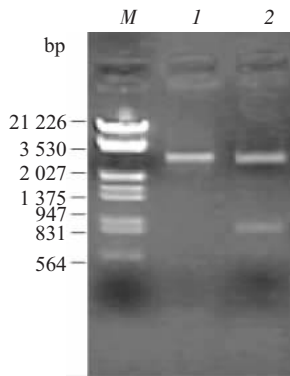


Fig. 4 Digestion pattern of recombinant plasmid pT-*lip3*

M: λDNA /*Eco*R I + *Hind* III; 1: Recombinant plasmid; 2: Double digestion of recombinant plasmid pT-*lip3* with *Bam*H I and *Nhe* I.

2.3 序列分析

应用 DNAMAN(5.1)软件对全长为 948 bp 的 *lip3* 基因进行分析. *lip3* 基因编码一个由 315 个氨基酸残基组成、预计分子质量为 34.557 ku 的 Lip3 蛋白(EMBL 注册号为: CAJ90853), 其理论 pI 为 5.05. 通过比较发现(图 5), Lip3 与 *Moraxella* sp. TA144 的脂肪酶 Lip3(CAA7863)有 92.7%的相似性. 除了 23 个氨基酸不同之外, 在核酸水平上反映出等量的核苷酸. 位于 Lip3 氨基酸序列 102~106 位的 GFGNS(GXGXS)和位于 140~144 位的 G-N-S-M-G(GXSXG)在许多脂肪酶中有很高的保守性, 它们是水解机制所必需的序列, 也是丝氨酸水解酶中最保守的序列. 通过与已知的其他脂肪酶序列比较, 推测 Lip3 中的 Ser142、Asp264 和 His292 组成该脂肪酶的水解三分体.

CLUSTAL multiple sequence alignment
Identity=92.7%

CAJ90853	MLLIRIRLAAVYSPSMLGCTTAPNTLAVNTTQKIIQYERSKSDLEVKSLTLASGDKMVYA	60
CAA37863	MLLKLRLGLAALFSLSMVGCTTAPNTLAVNTTQKIIQYERSKSDLEVKSLTLASGDKMVYA	
	*** * . *** . . * * .*****	
	GXGXS	
CAJ90853	ENDNVTGEPILLIHGLGGKDNFTRIADKLEGYHLIIPDLLGFGNSSKPMPTADYRADAQA	120
CAA37863	ENDNVTGEPILLIHGFGGKDNFTRIADKLEGYHLIIPDLLGFGNSSKPMPTADYRADAQA	
	***** . *****	
	GXSXG	
CAJ90853	TRLHELMQAKGLASNTHVGGNSMGGAISVAYAAKYPKEIKSLWLVDTAGFWSAGVPKSLE	180
CAA37863	TRLHELMQAKGLASNTHVGGNSMGGAISVAYAAKYPKEIKSLWLVDTAGFWSAGVPKSLE	

CAJ90853	GATLENNPLLINSKEDFYKMYDFVYKPPYIPKSVKAVFAQERINNKALDTKILEQIVTD	240
CAA37863	GATLENNPLLINSKEDFYKMYDFVYKPPYIPKSVKAVFAQERINNKALDTKILEQIVTD	

	D H	
CAJ90853	NVGERAKIIAKFNIPTLVVWGDQVIKPETTELITEIIPQALVMMNDVAHVPMVEAVQ	300
CAA37863	NVEERAKIIAKYNIPTLVVWGDQVIKPETTELIKEIIPQAQVIMMNDVGHVPMVEAVK	
	** ***** .***** ***** * .***** ***** .	
CAJ90853	DTASDYQAYGDAPKE	315
CAA37863	DTANDYKAFRDGLKK	
	*** ** . * *	

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences between CAJ90853 and CAA37863

CAJ90853: Lip3 from soil sample PB0101; CAA37863: Lip3 from strain *Moraxella* sp. TA144.

2.4 脂肪酶基因在大肠杆菌中的表达及产物纯化

重组质粒转化 *E.coli* TOP10F' 感受态细胞, 在 30°C 培养并经 IPTG 诱导后, 离心获得的菌体用结合缓冲液悬浮, 超声裂解细菌并离心去除不溶物得到的样品, 经镍离子亲和层析柱纯化得到纯酶样品. 最后纯化样品的纯化倍数为 9.7 倍, 产率为 45.6%, 比活力为 326.8 U/mg (表 1).

通过 10% SDS-PAGE 电泳分析(图 6), 可以看

出重组表达载体 pLLP-*lip3* 在诱导前后的 SDS-PAGE 泳带有差别, 说明重组的 *lip3* 基因获得了表达, 表达的蛋白质的分子质量大小约 35 ku, 与 Lip3 的预计分子质量大小(34.557 ku)相符. 采用 GIS 凝胶图像处理系统(上海天能公司)对凝胶进行扫描分析, 该重组表达蛋白的相对表达量为 19.4%.

Table 1 Purification of recombinant Lip3

Purification method	Total protein/mg	Total activity/U	Special activity/(U·mg ⁻¹)	Purification /fold	Yield/%
Cell extract*	160	5 376	33.6	1	100
Ni ²⁺ affinity column	7.5	2 451	326.8	9.7	45.6

*The supernatant of cell culture treated by ultrasonic.

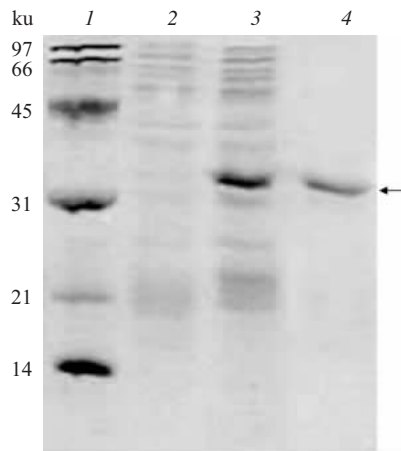


Fig. 6 SDS-PAGE analysis of *lip3* expressed in *E. coli* Top 10F'

1: Protein molecular mass marker; 2: Crude extract from *E. coli* Top 10F' after 8 h induction by IPTG(Control); 3: Crude extract from *E. coli* Top 10F' transformant with the pLLP-*lip3* after 8 h induction by IPTG; 4: Purified *lip3* after Ni²⁺ affinity column (amount of protein loaded, 10 μg). The position of *lip3* is indicated by an arrow.

2.5 纯酶性质

2.5.1 温度对酶活力及稳定性的影响. 从图 7 中可以看出, 酶作用的最适温度为 25°C, 0°C 时酶的相对活力有 22%, 50°C 时酶的相对活力仅为 5%. 该酶在 5°C 时稳定性最好, 保温 60 min 后仍有 98% 活力, 随着温度的升高稳定性下降, 35°C 保温

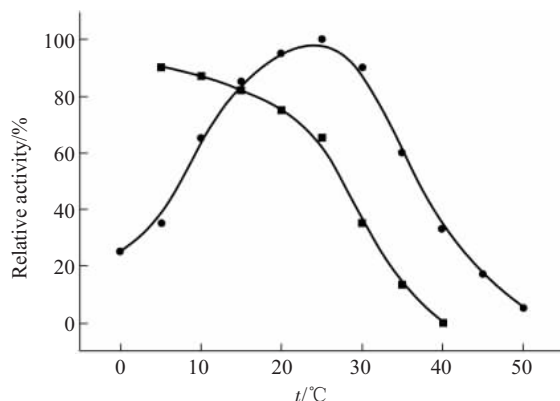


Fig. 7 Effect of temperature on activity (●) and stability (■) of the enzyme

60 min 后, 剩余活力不到 10%, 40°C 时酶极不稳定, 保温 60 min 后活力丧失, 这说明低温酶具有相当的热不稳定性.

2.5.2 pH 值对酶活力及稳定性的影响. 如图 8 所示, 该酶的最适 pH 在 7~9 之间, pH 6 时相对活力为 73%, pH 5 时为 27%. pH 对酶稳定性的影响与 pH 对酶活力的影响基本一致. 在 pH 6 的缓冲液中处理 60 min 后酶活力还剩余 71.3%, 在 pH 5 的缓冲液中处理 60 min 后酶活力只剩余 15.6%, 这说明该酶为碱性脂肪酶且有一定程度的耐酸性, 在 pH 6~11 之间相对比较稳定.

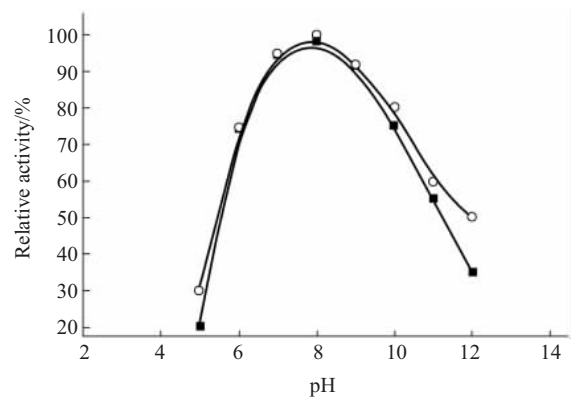


Fig. 8 Effect of temperature on activity (○) and stability (■) of the enzyme

2.5.3 温度对酶促反应的影响. 如图 9 所示, 以硝基苯棕榈酸酯为底物, Lip3 的酶促反应常数 K_m 值

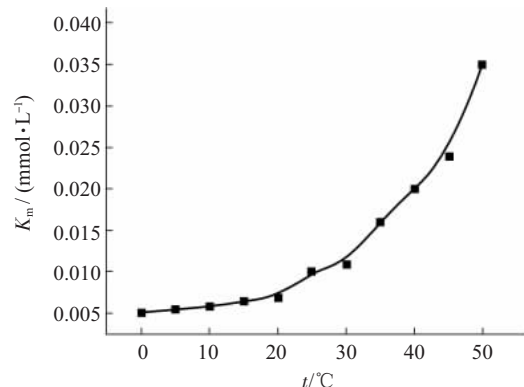


Fig. 9 Effect of temperature on the Michaelis constant of Lip3

随着反应温度的降低而降低, 在 0~10℃时表现为最小的 K_m 值, 这和样品所处的环境温度特征相符.

3 讨 论

极地、深海低温环境中的微生物资源十分丰富, 而且由于环境条件的特殊性, 隐藏着各种具有特殊活性的物质. 在这些特殊活性物质中, 低温酶、冷适应酶由于在低温下具有较高的催化效率, 在工业上具有重要的应用价值, 因此受到广泛的关注^[10].

传统的微生物酶(活性物质)来源主要是通过分离可培养的微生物而获得, 具有很大的局限性, 因为环境中的微生物绝大部分无法通过现有技术进行人工培养, 尤其在南极、深海等极端环境中, 因此造成研究结果不能全面反映所在环境的微生物活性物质的状况. 我们采用原位裂解法能最大限度地获取南极深海和陆地环境样品中的总 DNA, 对环境样品中所含有的微生物遗传物质直接分析, 避开了人工培养这一瓶颈, 采用分子生物学技术进行环境活性物质的筛选. 从单位定量凝胶电泳图上可以看出, 从陆地土壤样品获得的 DNA 要比深海沉积物样品多得多, 说明定量的南极陆地土壤样品比同样定量的深海沉积物生物量高.

通过对基因组文库进行研究分析, 不仅可以获得环境样品中微生物群体组成信息, 还可以利用各种引物和筛选方式, 寻找感兴趣的功能基因或发现未知的新基因进行深入研究, 本研究通过设计引物 lip3F1 和 lip3R1, 均能不同程度地从 5 个不同站位的 DNA 样品中克隆出 lip3 开放阅读框完整序列, 全长为 948 bp, 编码一个由 315 个氨基酸残基组成, 分子质量预计为 32.7 ku 酶蛋白. 说明了该引物在克隆 lip3 具有通用性, 同时也说明了 lip3 基因存在于南极海洋和陆地等多个站点.

根据 Arpigny 和 Jaeger^[11]对细菌脂蛋白水解酶的分类, Lip3 应该归为第 5 族(Family V). 该族的脂蛋白水解酶菌株来源, 包括嗜温性细菌 (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*)、嗜冷性细菌 (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*)、嗜热性细菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*). 它们在氨基酸序列的 100~205 位有 GX SXGG 的保守区域, 在 212~318 位有 Asp 位点, 在 242~348 位有 His 位点, 它们构成了酶对脂蛋白水解的三分体.

构建重组表达载体 pLLP-lip3, 在 *E.coli*

TOP10F' 中获得低温酶的表达, 采用镍离子亲和层析柱纯化获得含组氨酸序列的脂肪酶 Lip3. Lip3 与菌株 *Moraxella* sp. TA144^[12]的脂肪酶 Lip3 有 92.7% 的相似性. 除了 23 个氨基酸不同之外, 在核酸水平上反映出等量的核苷酸. Feller 等^[13]也对 *Moraxella* sp. TA144 产生的 3 个重组脂肪酶基因 *reLip* (其中包括 *lip3*) 做了表达, 但并未单独对 *lip3* 表达纯化及性质的分析. 另外, *lip3* 与菌株 *Psychrobacter immobilis* B10^[14]的 *lip1* 有 82% 的相似性, 但该基因并没有做表达与性质的分析, *lip3* 与作者新近在南极普利兹湾深海分离得到 *Psychrobacter* sp. 7195^[10]的 *lipA1* 有 81% 的相似性, 但 *lipA1* 还未做表达分析.

纯酶 Lip3 酶学性质的分析表明, 该酶的最适作用温度为 25℃, 是目前报道中比较低的, 如来自阿拉斯加耐冷菌 *Pseudomonas* sp. strain B11-1 产的 *lipP*, 在 *E.coli* C600 表达后的 LipP 蛋白最适作用温度为 40℃; 耐冷菌 *Pseudomonas* sp. strain KB700A 产的 KB-lip, 在 *E. coli* strain BL21(DE3) 表达后的 KB-Lip 蛋白最适作用温度为 30℃^[15]. Lip3 在低温条件下较为活跃, 在 0℃时表现为最高活力的 22%. Lip3 对热敏感, 35℃热处理 60min 剩余酶活为 10%, 符合低温酶的热不稳定性特点, 但比来自 *Moraxella* TA144^[16]和 *Acinetobacter* O16^[17]的脂肪酶的热稳定性要好一些. Lip3 最适 pH 值为 8.0, 为碱性脂肪酶, 目前报道的大部分脂肪酶均是偏碱性, 如 KB-Lip 和 lipA1 的最适 pH 都是 8.0, 来自 *Pseudomonas cepacia* 和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 的脂肪酶最适 pH 在 8.0~9.0^[18]. Lip3 有一定程度的耐酸性, 在 pH 6~11 之间相对比较稳定, 如来自 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 和 *Pseudomonas mendocina* 的重组脂肪酶在 pH 5~10 之间相对比较稳定^[18].

Somero^[19, 20]认为, 酶与底物的配合(价)体会随着温度的升高和降低而被破坏. 来自各种变温生物, 包括嗜热和嗜冷微生物等的各种酶在其生理温度下对相应的作用底物均表现为最低的 K_m 值^[19]. 鲑鱼根据它们的栖息环境温度产生乙酰胆碱酯酶和柠檬酸合成酶的冷适应形式和温适应形式, 它们的 K_m 值均为所适应生活温度下的最低值^[21, 22]. 来自嗜冷菌 *Pseudomonas putida* 的尿刊酸酶也表现为低温、低 K_m 值^[23]. 另外, 来自嗜热菌 *Thermus aquaticus* YT-1 的烯醇酶则在低温下 K_m 值升高, 在最适生长温度, 即高温下表现出最低的 K_m 值^[24]. 硝基苯棕榈酸酯为

底物, Lip3 的酶促反应常数 K_m 值随着反应温度的升高而升高, 是典型的低温酶.

参 考 文 献

- 1 Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 1998, **5** (10): 245~249
- 2 Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59** (1): 143~169
- 3 杨官品, 茅云翔. 环境细菌宏基因组 研究及海洋细菌生物活性物质 BAC 文库筛选. 青岛海洋大学学报, 2001, **31** (5): 718~722
Yang G P, Mao Y X. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2001, **31** (5): 718~722
- 4 Schloss P D, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14** (3): 303~310
- 5 Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, *et al.* Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnology*, 2002, **13** (6): 572~577
- 6 Lorenz P, Schleper C. Metagenome—a challenging source of enzyme discovery. *J Mol Catal B Enzym*, 2002, **19** (20): 13~19
- 7 曾润颖, 赵晶, 张锐, 等. 西太平洋“暖池”区沉积物中的细菌类群及其与环境的关系. 中国科学 D 辑, 2004, **34** (3): 265~271
Zeng R Y, Zhao J, Zhang R, *et al.* *Science in China, Ser. D*, 2004, **34** (3): 265~271
- 8 Fischer M, Pleiss J. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (1): 319~321
- 9 张金伟, 曾润颖. 产复合酶菌株 *Pseudomonas* sp. NJ197 产酶发酵条件的研究. 台湾海峡, 2005, **24** (4): 405~407
Zhang J W, Zeng R Y. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2005, **24** (4): 405~407
- 10 张金伟, 曾润颖. 南极产低温脂肪酶菌株 *Psychrobacter* sp. 7195 的选育、发酵条件及酶学性质研究. 生物磁学, 2006, **6** (10): 6~10
Zhang J W, Zeng R Y. *Biomagnetism*, 2006, **6** (10): 6~10
- 11 Arpigny J L, Jaeger K E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J*, 1999, **343** (1): 177~183
- 12 Feller G, Thiry M, Gerday C. Nucleotide sequence of the lipase gene lip3 from the antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1088** (2): 323~324
- 13 Feller G, Thiry M, Arpigny J L, *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella* TA144. *Gene*, 1991, **102** (1): 111~115
- 14 Arpigny J L, Feller G, Gerday C. Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1171** (3): 331~333
- 15 Choo D W, Kurihara T, Suzuki T, *et al.* A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (2): 486~491
- 16 Feller G, Thiry M, Arpigny J L, *et al.* Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **66**: 239~244
- 17 Grochulski P, Li Y, Schrag J P, *et al.* Insight into interfacial activation from an open structural of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem*, 1993, **268** (17): 12843~12847
- 18 Svendsen A, Borch K, Barfoed M, *et al.* Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1259** (1): 9~17
- 19 Somero G N. Temperature as a selective factor in protein evolution: the strategy of “compromise”. *J Exp Zool*, 1977, **194** (1): 175~188
- 20 Somero G N. Temperature adaptation of enzymes: role of free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**: 430~432
- 21 Baldwin J, Hochachka P W. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimatization. Acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem J*, 1970, **116** (5): 883~887
- 22 Hochachka P W, Lewis J K. Enzyme variants in thermal acclimation. Trout liver citrate synthase. *J Biol Chem*, 1970, **245**: 6567~6573
- 23 Hug D H, Hunter J K. Effect of temperature on urocanase from a psychrophile, *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 1974, **13** (7): 1427~1431
- 24 Stellwagen E, Cronlund M M, Barnes L D. A thermostable enolase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* YT-1. *Biochemistry*, 1973, **12** (8): 1552~1559

Cloning, Expression and Characterization of The Cold Active Lipase (Lip3) From Metagenomic DNA of an Antarctic Deep Sea Sediment*

ZHANG Jin-Wei, ZENG Run-Ying**

(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract The metagenomic DNA was extracted from the deep sea sediment with the depth of 900m of Prydz Bay, Antarctic. A lipase gene (*lip3*) with the size of 948bp was cloned from the metagenomic DNA by PCR with the primers designed. The deduced Lip3 protein was composed of 315 amino acids (AA) with a molecular mass of 34.577 ku. The motifs GFGNS(GXGXS) and G-N-S-M-G(GXSXG) in the AA sequences of Lip3 were found to be conserved in other lipase. They were most conserved sequence among the serine hydrolase and were necessary for the activity. A 35 ku of Lip3 was purified by Ni-NTA chelating sepharose column from the extract of recombinant *E.coli* Top 10F' cell harboring a pLLP-OmpA plasmid inserted with *lip3*. The purified Lip3 was most active at 25°C and kept 22% of activity at 0°C. Only 10% of activity was retained after it was incubated at 35°C for 60 min. The optimal pH value for the Lip3 activity was 8.0. The K_m value of the enzyme towards *p*-nitrophenyl palmitate increased with the increasing of assayed temperature. These results indicated that Lip3 was a typical alkaline cold active enzyme.

Key words Antarctic deep sea sediment, metagenome, cold active lipase, cloning and expression

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Youth Foundation of China (40406029).

**Corresponding author . Tel: 86-592-2195323, E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn

Received: May 19, 2006 Accepted: July 11, 2006