

华根霉(*Rhizopus chinensis*)前导肽脂肪酶基因的克隆及其在 *Pichia pastoris* 中的表达^①

王乐乐^② 喻晓蔚 徐 岩^③

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214122)

摘 要 通过3次PCR程序克隆得到了华根霉(*Rhizopus chinensis* CCTCCM201021)脂肪酶全基因序列,该基因的开放阅读框长1170bp,不含内含子,编码一个389个氨基酸残基的蛋白质,包括26个氨基酸的信号肽,94个氨基酸的前导序列和269个氨基酸的成熟肽,其推断的氨基酸序列与一些已报道的根霉脂肪酶序列同源性为86%。在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115中分泌表达前导肽序列。SDS-PAGE分析表明表达蛋白的分子量约37kD。N-端氨基酸序列分析表明该重组蛋白分泌过程中前导序列N-端的67个氨基酸被切割掉,表达的重组脂肪酶由前导序列C-端的27个氨基酸和成熟肽的269个氨基酸组成。发酵132h后上清中重组脂肪酶的表达量最高,蛋白含量约5.4mg/mL,橄榄油乳化法测水解酶活为161U/mL,其比活比野生型华根霉脂肪酶高约43倍。

关键词 华根霉, 脂肪酶, 克隆, 表达, 毕赤酵母

0 引言

脂肪酶(EC 3.1.1.3)即三酯酰甘油酰基水解酶不仅能催化油脂水解,也能在非水相中催化酯合成反应、转酯化反应、酸解反应等反应,因而被广泛应用于化学、食品、制药和洗涤剂工业中^[1],尤其是多数根霉脂肪酶具有的1,3位置选择性,在油质改性和加工各种功能酯方面具有广阔的发展前景^[2]。但在脂肪酶生物合成的工业生产过程中,催化剂脂肪酶是一个很大的限制因素,自然条件下,菌株产脂肪酶量较低,利用常规育种方法难以满足工业化生产的需要。因此研究人员把注意力集中到克隆和表达脂肪酶基因上,通过基因表达调控来提高脂肪酶的活力。

目前为止,国内外已报道了多个根霉脂肪酶的基因序列^[3]。根霉属主要包括微孢根霉(*Rhizopus microsporus*)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)和米根霉(*Rhizopus oryzae*)3类^[4],由于基因序列存在微小的差异,分类学上将雪白根霉(*Rhizopus niveus*)、德氏根霉(*Rhizopus delemar*)、爪哇根霉(*Rhizopus javanicus*)和少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)归为米根霉一类^[5],其中 *Rhizopus stolonifer* 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶基因

已有报道,两者的脂肪酶基因同源性达到80%以上。日本、德国对米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)的基因序列和表达做了比较深入的研究,并先后用大肠杆菌、酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母成功表达了脂肪酶基因^[5-7]。本研究室在前期研究中成功从酿造浓香型大曲酒的酒曲中筛选到一株高产脂肪酶的华根霉(*Rhizopus chinensis* CCTCC M201021)菌株,并对该菌株的发酵产酶特性、脂肪酶酶学特性和应用研究等方面进行了比较系统的研究^[8,9]。目前尚未见国内外对华根霉脂肪酶分子水平上的研究报道。本研究通过PCR扩增得到华根霉脂肪酶全基因(*Rhizopus chinensis* lipase, RCL,包括信号肽、前导序列和成熟肽),并实现了华根霉脂肪酶前导肽(prosequence RCL, proRCL,包括前导序列和成熟肽)在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的高水平分泌表达,为分子水平研究华根霉脂肪酶及其应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 各种工具酶及其它试剂

限制性内切酶、T4 DNA Ligase、Taq DNA Polymerase、PCR试剂(Takara 宝生物公司),引物(上海申

① 863计划(2006AA020202)、973计划(2003CB716008)、国家自然科学基金(30470046,20802027)和江苏省高等学校大学生实践创新训练计划资助。

② 女,1982年生,硕士;研究方向:生化与分子生物学;

③ 联系人,E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn
(收稿日期:2007-09-20)

能博彩生物科技有限公司合成), 200bp DNA Ladder Maker, 1kb DNA Ladder Maker, 植物基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司), Plasmid Mini Kit I (OMEGA BIO-TEK), 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 菌株, 质粒和培养基

E. coli DH5 α 和华根霉 (*Rhizopus chinensis* CCTC-CM201021) 由本实验室保存。毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和表达载体 pPIC9k 购自 Invitrogen 公司。pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司。华根霉发酵培养基(g/L): 葡萄糖 10, 豆饼粉 40, 蛋白胨 60, CaCl₂ 6, ZnSO₄ 1.5, 橄榄油 20, pH 5.5。酵母培养基 YPD、MD、MM、BMGY、BMMY、YPD-G418 按《Invitrogen 公司操作手册》方法配制。YPD-rho 平板: YPD 培养基中添加 100g/L 橄榄油和 0.5g/L 罗丹明 B。

1.3 华根霉总 DNA 的提取

将华根霉孢子接种于发酵培养基中, 30℃、200 r/min 培养 72h, 橄榄油作为脂肪酶合成诱导剂。总 DNA 的提取参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书方法。

1.4 RCL 基因的 PCR 扩增

1.4.1 根霉保守序列至 3' 端下游序列的扩增

来源不同的脂肪酶, 均具有保守序列 Gly-X-Ser-

X-Gly 模体^[10], 结合已报道的 *Rhizopus stolonifer* (GenBank 登录号: DQ139862) 和 *Rhizopus oryzae* (GenBank 登录号: E02831)^[6] 脂肪酶基因模体保守序列的特点, 设计简并引物 p1, 下游引物 p2 根据 *Rhizopus stolonifer* 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶基因下游序列比对后设计, 扩增保守序列至 3' 端终止密码子部分的脂肪酶基因序列。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 1min、52℃ 45s、72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。

1.4.2 5' 端上游序列至根霉保守序列的扩增

根据 *Rhizopus stolonifer* 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶基因 5' 端序列设计上游简并引物 p3, 由“1.4.1”测序结果设计下游序列特异性引物 p4。扩增出 5' 端从起始密码子开始的部分脂肪酶基因序列。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 1min、52℃ 1min、72℃ 1min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。

1.4.3 RCL 全基因的扩增

将上述得到得两段基因拼接后设计全基因上游特异性引物 p5。使用引物对 p5/p2 经 PCR 扩增得到 RCL 全基因。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 1min、52℃ 2min、72℃ 2min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增产物的回收与亚克隆见“1.4.4”。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
p1	ACYGGYCACTCYCTCGGYGGYGC
p2	CAGTGGGCGCGCTTACAAACAGCTTCCTTCGTT (限制性酶切位点 <i>Not</i> I 用斜体表示)(终止密码子用粗体表示)
p3	CCGATGGTTTCATTCATWTCNATTWCTC
p4	GGCTTGGGCACCAACGAGGGAGTG
p5	CCGATGGTTTCATTCATTTCCATTCTC (起始密码子用粗体表示)
p6	ATCCTAGGGTTCCTGTGCTGGTCATAAAGGTTT (限制性酶切位点 <i>Avr</i> II 用斜体表示)
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

(简并碱基代码: N = A/C/G/T, W = A/T)

1.4.4 PCR 扩增产物的克隆

将 PCR 扩增产物回收, 连接到 T 载体 pMD19-T 上, 转化 *E. coli* DH5 α 细胞。用内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、*Xba* I 对克隆片段进行酶切鉴定。上海生物工程技术有限公司测序。

1.5 表达载体的构建

利用引物对 p6/p2 以 *Rhizopus chinensis* 基因组

为模板 PCR 扩增得到不含自身信号肽的前导肽序列 *proRCL*, 连接到载体 pMD19-T 中, 构建克隆质粒 pMD19-*proRCL*。

使用限制性内切酶 *Avr* II 和 *Not* I 分别对质粒 pMD19-*proRCL* 和 pPIC9k 进行消化, 将 *proRCL* 基因片段与线性化载体片段连接后转化 *E. coli* DH5 α , 构建表达质粒 pPIC9k-*proRCL*(图 1)。

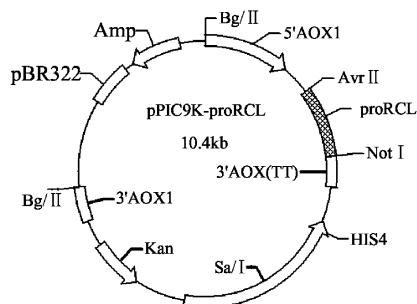


图1 重组质粒 pPIC9k-proRCL 的构建

1.6 重组毕赤酵母的构建与鉴定

pPIC9k-proRCL 经 *Bgl* II 酶切线性化后,电转化酵母感受态 GS115,涂布于 MD 平板,用 YPD-G418 浓度梯度平板筛选高拷贝转化子^[11]。将抗最高浓度 G418 的 His⁺ 转化子点至 YPD-rho 平板,甲醇蒸汽诱导表达重组脂肪酶,挑取透明圈较大单菌落接种 YPD 液体振荡培养后,提取酵母基因组,以载体 pPIC9k 序列引物(5' AOX1, 3' AOX1)进行 PCR 鉴定。根据文献[10]的方法摇瓶水平下诱导表达重组脂肪酶,每隔 24h 添加 0.5% 的甲醇诱导表达,并取样测酶活。

1.7 表达产物的鉴定

取发酵液用 SDS-PAGE 检测目的蛋白表达量和分子量。按照文献[13]的方法配制各种试剂^[12]。

1.8 脂肪酶酶活测定

脂肪酶活性测定采用橄榄油乳化法^[13]。酶活单位定义为:在 30℃、pH 8.0 的反应条件下,每分钟释放 1 μmol 脂肪酸的脂肪酶量为一个酶活单位(U)。

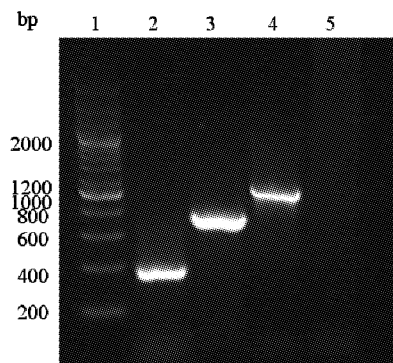
1.9 N-端氨基酸序列分析

重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳转印到 PVDF 膜上,LC/MS/MS 系统进行测序,中国科学院上海生命科学研究所完成。

2 结果与分析

2.1 RCL 基因的获得及序列分析

用引物对 p1/p2 PCR 扩增 RCL 3' 端部分基因序列,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,大小约为 380bp (如图 2 泳道 2);用引物对 p3/p4 PCR 扩增 RCL 5' 端部分基因序列,大小约为 810bp (如图 2 泳道 3);用引物对 p5/p2 PCR 扩增 RCL 全基因序列,大小约为 1170bp (如图 2 泳道 4)。



1. 200bp 核酸分子量标准; 2. 以 p1/p2 为引物扩增的 PCR 片段; 3. 以 p3/p4 为引物扩增的 PCR 片段; 4. 以 p5/p2 为引物扩增的 PCR 片段; 5. 阴性对照

图2 华根霉脂肪酶 PCR 扩增电泳图

RCL 序列开放阅读框长 1170bp,与其它根霉属脂肪酶序列比对后发现其不含内含子,编码 389 个氨基酸的多肽,计算分子量为 42kD,该基因已提交到 GenBank 数据库,数据库登录号为:EF405962。

将扩增出的 RCL 全基因与 *Rhizopus stolonifer* 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶基因序列比对后发现其核苷酸和氨基酸同源性均为 86%,氨基酸序列比对如图 3。根据比对结果得出 RCL 序列包含 26 个氨基酸的信号肽,94 个氨基酸的前导序列和 269 个氨基酸的成熟序列。

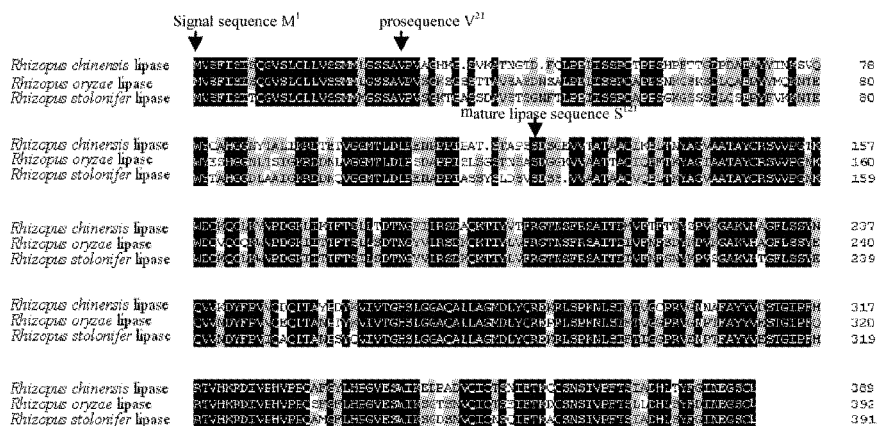


图3 根霉脂肪酶氨基酸序列比对

熟肽。RCL 蛋白序列中含有 3 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。

2.2 RCL 模拟三维结构分析

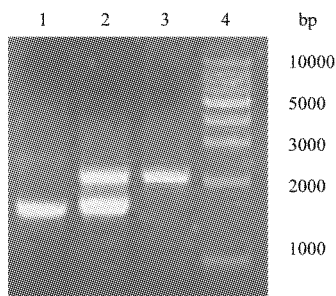
将 RCL 基因序列上传蛋白质结构数据库(<http://www.rcsb.org/pdb/>)进行序列比对和三维结构分析,得到该脂肪酶的三维结构(如图 4 所示)。绿色标记的氨基酸位点表示脂肪酶的催化三联体 Ser145-His257-Asp204,蓝色标记的氨基酸位点表示脂肪酶的 α -螺旋盖上的关键位点 Phe86-Asp92^[14]。各关键位点与 *Rhizopus niveus* (PDB 登录号:1LGY)均相同,两者的三维晶体结构同源率为 81%。



图 4 华根霉脂肪酶的三维结构模拟图

2.3 重组毕赤酵母的获得与鉴定

PCR 扩增结果如图 5 所示。产物经琼脂糖凝胶电泳分析,以菌株 1 基因组为模板扩增得到 1584bp 的条带,酵母表型为 His⁺ Mut^s。以菌株 2 基因组为模板扩增得到 1584bp 和 2200bp(2200bp 的条带为野生型 AOX1 基因两条带),酵母表型为 His⁺ Mut⁺。若线性化质粒没有整合入酵母基因组,只能扩增得到野生型 AOX1 基因的 2200bp 的 DNA 片段,证明重组表达载体 pPIC9k-*proRCL* 已经正确整合到毕赤酵母基因组中。



1. GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s(1 092 bp + 492 bp = 1 584 bp); 2. GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut⁺(2 200 bp + 1 584 bp); 3. GS115 (2 200 bp); 4. 1kb 核酸分子量标准

图 5 重组毕赤酵母的 PCR 鉴定

2.4 甲醇诱导对巴斯德毕赤酵母表达脂肪酶的活性与生物量的影响

2.4.1 重组脂肪酶的诱导表达

电转化一共得到两种表型的基因重组菌,分别为 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut⁺ 和 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s。摇床水平甲醇诱导表达如图 6 所示,36h 开始流加甲醇诱导表达。分泌表达脂肪酶的 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s 和 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut⁺ 酶活检测结果表明两者发酵液上清均在 60h 开始有活性,慢生型 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s 在 132h 酶活性达到最高,而快生型 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut⁺ 在 108h 酶活性达到最高。虽然慢生型初始脂肪酶酶活力与快生型相比差别不大,但是随着发酵时间延长慢生型脂肪酶酶活力最高达到 161U/mL,比快生型高 1.4 倍。这可能是慢生型生长速度缓慢有利于对产物的翻译后修饰,例如二硫键的形成、糖基化、蛋白空间折叠等。GS115/pPIC9k 阴性对照发酵液上清未见脂肪酶水解活性。以下实验选取酶活较高的慢生型 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s 继续研究。

2.4.2 基因重组巴斯德毕赤酵母生长曲线

GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s 的细胞生长曲线显示 0~20h 毕赤酵母处于迟滞期,细胞生长缓慢;20~36h 进入对数生长期,细胞成指数生长;36~100h 处于稳定期,细胞浓度基本不变;100h 以后细胞处于衰亡期。0~36h 以 BMGY 培养基培养,甘油为主要碳源,用于积累生物量,36h 以后换成 BMMY 培养基,流加甲醇诱导表达。随着时间的延长,表达量逐步升高,大约 132h 达到最大表达量,约 5.4mg/mL,酶活为 161U/mL,随后菌体逐步自溶,细胞释放大蛋白酶将外源蛋白降解,脂肪酶活力几乎下降为 0。

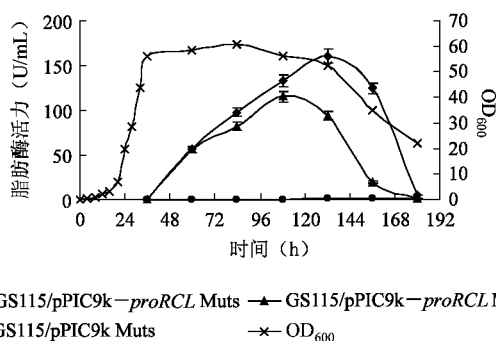
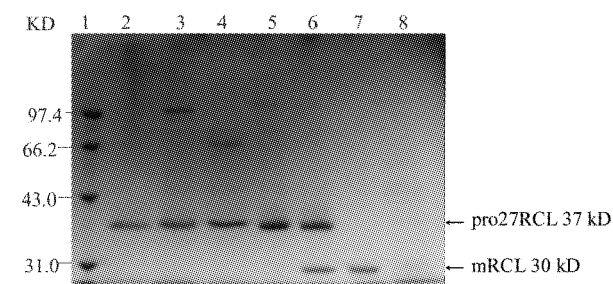


图 6 甲醇诱导对巴斯德毕赤酵母表达脂肪酶的活性与生物量的影响

2.5 重组脂肪酶表达的 SDS-PAGE 电泳分析

GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s 分泌表达脂肪酶,其

发酵上清的 SDS-PAGE 结果如图 7 所示,在阳性转化子的诱导上清中 37kD 处出现特征性条带(2~6 条带),而阴性对照空载转化子 GS115-pPIC9k 诱导上清未见特征性条带(条带 8)。用 Folin-酚检测法定量分析蛋白含量,以 GS115/pPIC9k 诱导上清作为阴性对照,发酵 132h 时脂肪酶蛋白浓度为 5.41mg/mL,占分泌蛋白总量的 78.3%。同时发现发酵 156h 和 180h 在 30kD 处出现明显的特征性条带,180h 脂肪酶酶活力下降为 1.5U/mL。根据文献[15]报道推测酵母细胞自溶后分泌的蛋白酶将 proRCL 前导序列切割掉,变为成熟肽 mRCL。米根霉脂肪酶的前导序列至少有两个功能:第一,前导序列起到分子伴侣的作用,有利于脂肪酶形成有活性的构象,其半胱氨酸残基能够促进二硫键的形成;第二,调节脂肪酶的活力,成熟肽脂肪酶与前导肽脂肪酶在底物特异性与催化活力上存在区别[15]。



1. 蛋白低分子量标准; 2~7. GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s (培养时间:60h、84h、108h、132h、156h、180h) 发酵液上清; 8. GS115/pPIC9k 发酵液上清

图 7 GS115/pPIC9k-*proRCL* Mut^s 发酵上清液 SDS-PAGE 检测图谱

2.6 重组脂肪酶 N-端氨基酸序列分析

重组脂肪酶的发酵上清液在 SDS-PAGE 上的表现分子量为 37kD(图 7)。而本实验中克隆的 *proRCL* 基因为 1 092bp(363 个氨基酸),表达产物的理论分子量应该为 39kD 左右。重组蛋白经 N-端氨基酸测序分析,其 N-端七个氨基酸为 Asp-Thr-Glu-Thr-Val-Gly-Gly,表明重组脂肪酶的 N-端前导序列部分缺失了 67 个氨基酸。表达的重组脂肪酶由前导序列 C-端的 27 个氨基酸和成熟肽的 269 个氨基酸组成(简称 pro27RCL),这说明该重组脂肪酶是加工过的产物。而 pro27RCL 的理论分子量应该为 32kD 左右,说明毕赤酵母对重组脂肪酶翻译过程中,可能进行了糖基化修饰,理论分析 pro27RCL 蛋白序列中含有 1 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)。

3 讨论

本研究用根霉通用引物 PCR 扩增其 18S rDNA,表明该菌属于 *Rhizopus microsporus* 的一个变种,因此根据脂肪酶基因保守序列 Gly-X-Ser-X-Gly 以及 *Rhizopus stolonifer* 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶基因比对结果设计引物扩增 RCL 全基因。扩增出的 RCL 全基因与 *Rhizopus stolonifer*、*Rhizopus oryzae* 脂肪酶基因比对后其核苷酸同源性与氨基酸源性均为 86%。

巴斯德毕赤酵母表达系统是近年来发展迅速、应用广泛的一种真核表达系统。与大肠杆菌相比,能够进行真核蛋白翻译后修饰(信号肽加工、蛋白质折、二硫键形成、糖基化修饰等)。选择合适的表达载体,不但提高表达蛋白的活性,而且有利于产物的纯化[16]。Minning 等[5]在毕赤酵母中表达米根霉脂肪酶成熟肽(ROL)基因,以 triolein 为底物测定摇瓶培养条件下诱导 48h,上清重组脂肪酶酶活达到 110U/mL,5L 发酵罐培养后酶活提高约 5 倍。谭天伟等[17]在毕赤酵母中表达少根根霉脂肪酶前导肽(rRAL)基因,以橄榄油为底物测定摇瓶培养条件下诱导 48h,上清重组脂肪酶酶活达到 18U/mL,5L 发酵罐培养后酶活提高约 10 倍。本研究成功实现了华根霉脂肪酶 *proRCL* 基因在毕赤酵母中的高水平分泌表达,仅在摇床水平条件下以橄榄油为底物测定重组脂肪酶活力最高达到 161U/mL,相应蛋白含量约 5.4mg/mL,比活比野生型华根霉脂肪酶高约 43 倍。经 SDS-PAGE 分析表达蛋白分子量约 37kD,132h 发酵上清中目的蛋白占 78%,为进一步的纯化和发酵罐提高酶活奠定了基础。

重组脂肪酶 N-端氨基酸序列分析表明该重组脂肪酶是加工过的产物,分泌表达的重组脂肪酶只保留了前导序列 C-端的 27 个氨基酸和成熟肽的 269 个氨基酸(简称 pro27RCL)。文献[18]报道重组米根霉脂肪酶在酿酒酵母分泌过程中,受到 Kex2 内切蛋白酶(Kex2)的作用后保留前序列 C 端 28 个氨基酸(r28ROL)[18]。proRCL N-端第 66 和 67 个氨基酸分别是 Lys 和 Arg, Kex2 内切蛋白酶的酶切位点(Lys-Arg)。据此推断在毕赤酵母中表达 proRCL 时受到 Kex2 类蛋白酶的作用仅得到被加工过的重组蛋白 pro27RCL,没有发现全长的 proRCL 被分泌表达。

该研究为进一步规模化发酵生产提高重组脂肪酶活力,以及利用现代分子生物学技术对脂肪酶进

行分子改造奠定了基础,从而广泛应用于油脂水解、功能酯制备等领域。开发我国特有菌种资源,生产廉价的新型脂肪酶制剂,实现化工产业逐步转向“绿色化工”,不仅具有重要的学术意义,而且对于综合提高我国酶制剂行业以及相关化工产品领域的科技水平也具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] Jaeger K E, Eggert T. Lipase for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13 : 390-397
- [2] Xu X, Fomuso L B, Akoh C C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(1): 3-10
- [3] Pleiss J, Fischer M, Peiker M, et al. Lipase engineering database understanding and exploiting sequence structure function relationships. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, 10: 491-508
- [4] Liou G Y, Chen C C, Yuan G F, et al. A taxonomics study of the genus *Rhizopus* by isozyme patterns. *Nova Hedwigia*, 2001, 72 : 231-239
- [5] Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid R D, et al. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J Biotechnol*, 1998, 66: 147-156
- [6] Beer H D, McCarthy J E G, Bornscheuer U T, et al. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1399 : 173-180
- [7] Ueda M, Takahashi S, Washida M, et al. Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, 17: 113-124
- [8] Xu Y, Wang D, Mu X Q, et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, 18: 29-37
- [9] Wang D, Xu Y, Teng Y. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2007, 30(3): 147-155
- [10] Brenner S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, 1988, 334: 528-530
- [11] Wu S X, Letchworth G J. High efficiency transformation by electroporation of *picha pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 2004, 36 : 152-154
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学技术出版社, 2000. 80-82
- [13] Beisson F, Tiss A, Rivière C, et al. Methods for lipase detection and assay : a critical review. *Eur J Lipid Technol*, 2002, 2 : 133-153
- [14] Kohno M, Funatsu J, Mikami B, et al. The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 Å resolution. *J Biotechnol*, 1996, 120(3): 505-510
- [15] Takahashi S, Ueda M, Tanaka A. Function of the prosequence for in vivo folding and secretion of active *Rhizopus oryzae* lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55 : 454-462
- [16] Siegel R S. Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 34: 403-404
- [17] 牛卫宁, 谭天伟. 少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*) 脂肪酶基因在毕赤酵母中的分泌表达. 生物加工过程, 2006, 4 (2): 37-40
- [18] Takahashi S, Ueda M, Tanaka A. Independent production of two molecular forms of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by KEX2-engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52 : 534-540

Cloning and expression of pro- and mature *Rhizopus chinensis* lipase in *Pichia pastoris*

Wang Lele, Yu Xiaowei, Xu Yan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract

The whole-length sequence of a lipase gene was cloned from the genomic DNA isolated from *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021 by three PCR programs. Its entire open reading frame was 1170bp without intron, encoding a 389 amino acid protein including 26 amino acid signal sequence, 94 amino acid prosequence and 269 amino acid mature lipase sequence. The amino-acid sequence showed 86% similarity to those of the other *Rhizopus sp.* lipase amino-acid sequences. The *RCL* gene without its signal sequence was successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. The result of SDS-PAGE showed that the molecular weight of the aimed protein was nearly 37kD. The N-terminal amino acid sequence analysis showed that the N-terminal 67 amino acids were degraded when the recombinant protein was secreted, the expressed recombinant protein consisted of a 27 amino acid prosequence and a 269 amino acid mature lipase sequence. The highest specific activity of lipase in the supernatant was 30U/mg after 132h of culture, which was 43-fold higher than that of the wild-type *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021.

Key words: *Rhizopus chinensis*, lipases, cloning, expression, *Pichia pastoris*