

# 微生物源果胶酶在猪 PK15 细胞中异源表达及其酶学性质分析

莫健新<sup>1</sup>, 王豪强<sup>2</sup>, 黄广燕<sup>2</sup>, 蔡更元<sup>1,2</sup>, 吴珍芳<sup>1,2</sup>, 张献伟<sup>1,2</sup>

1. 温氏食品集团股份有限公司, 新兴 527400

2. 华南农业大学国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642

**摘要:** 果胶是植物细胞壁组分之一, 是畜禽饲料中主要的抗营养因子, 影响畜禽对日粮中能量和氮的利用效率。果胶酶在自然界中广泛存在于细菌、酵母和丝状真菌等微生物中, 对解除果胶的抗营养作用、提高饲料利用率具有良好的效果。为了探索在猪细胞中表达微生物源果胶酶基因的可行性, 本研究通过脂质体转染法将微生物源果胶酶基因 *pg5a*、*pgI*、*pga3A* 和 *pgaA* 导入猪 PK15 细胞中进行异源表达, 利用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 法测定这 4 种基因编码果胶酶的酶活力。结果显示, 4 种果胶酶基因均能在猪 PK15 细胞中转录出 mRNA, 但只有 *pg5a* 和 *pgI* 适应猪细胞表达系统。其中, 果胶酶 PG5A 的最高酶活为 0.95 U/mL, 最适作用 pH 为 pH4.0, 在 pH4.6~6.0 范围内维持 46% 以上的酶活; PGI 在 pH5.0 处获得最高酶活, 为 0.30 U/mL, 在 pH4.0~6.0 范围内维持 35% 以上的酶活。消化蛋白酶耐受实验结果显示, PG5A 和 PGI 对胃蛋白酶和胰蛋白酶均有较强的耐受能力, 用 1 mg/mL 的猪胃蛋白酶处理 2 h 后, PG5A 和 PGI 的剩余酶活分别为 76% 和 71%; 用 1 mg/mL 的猪胰蛋白酶处理 2 h 后, PG5A 和 PGI 的剩余酶活分别为 44% 和 93%。综上所述, 果胶酶基因 *pg5a* 和 *pgI* 能在猪细胞中正常表达, 其编码的果胶酶对猪消化道 pH 条件和消化蛋白酶具有较强的耐受能力, 可作为制备转果胶酶基因猪的候选基因。

**关键词:** 果胶酶; 果胶; 抗营养因子; 转基因; 猪

## Heterogenous expression and enzymatic property analysis of microbial-derived pectinases in pig PK15 cells

Jianxin Mo<sup>1</sup>, Haoqiang Wang<sup>2</sup>, Guangyan Huang<sup>2</sup>, Gengyuan Cai<sup>1,2</sup>,  
Zhenfang Wu<sup>1,2</sup>, Xianwei Zhang<sup>1,2</sup>

1. Wens Foodstuff Group Co. LTD, Xinxing 527400, China

2. National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** As one of plant cell wall components, pectin is the main anti-nutritional factor in livestock and poultry feeds

收稿日期: 2019-03-27; 修回日期: 2019-07-18

基金项目: 国家转基因重大专项(编号: 2016ZX08006002)和广东省科技厅平台条件建设项目(编号: 2013B070702003)资助[Supported by the National Transgenic Major Projects (No.2016ZX08006002) and Guangdong Provincial Science and Technology Department Platform Condition Construction Project (No. 2013B070702003)]

作者简介: 莫健新, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 2696064146@qq.com

通讯作者: 张献伟, 博士, 在站博士后, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: zxianw@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.19-087

网络出版时间: 2019/8/5 20:59:45

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190805.2059.002.html>

and has an adverse effect on utilization efficiency of feed energy and nitrogen. Pectinases, which are widely found in microorganisms such as bacteria, yeast and filamentous fungi in nature, can improve feed efficiency by relieving the anti-nutritional effect of pectin through promoting the hydrolysis reaction of feed pectin. To explore the feasibility of expressing microbial-derived pectinase genes in pig cells, we introduced microbial-derived pectinase genes *pg5a*, *pgI*, *pga3A*, and *pgaA* into porcine PK 15 cells by lipofection for heterogenous expression. Enzymatic activities of the pectinases encoded by these genes were analyzed using the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) method. Results showed that all four pectinase genes were able to be transcribed into mRNAs in porcine PK 15 cells, but only *pg5a* and *pgI* were adapted to the porcine cell expression system. Among them, the maximum activity of pectinase PG5A was 0.95 U/mL, the optimum pH was pH 4.0, and the enzymatic activity was maintained above 46% in the range of pH 4.6 to 6.0. Pectinase PGI obtained the highest enzymatic activity at pH 5.0, which was 0.30 U/mL, and maintained more than 35% of the activity in the range of pH 4.0 to 6.0. The results of digestive protease tolerance test showed that PG5A and PGI were highly resistant to pepsin and trypsin. After treatment with 1 mg/mL pig pepsin for two hours, the residual enzymatic activities of PG5A and PGI were 76% and 71%, respectively. And after two hours treatment with 1 mg/mL of pig trypsin, the remaining enzymatic activities of PG5A and PGI were 44% and 93%, respectively. In summary, pectinase PG5A and PGI can be effectively expressed in pig cells, and have strong tolerance to pig intestinal pH environment and digestive proteases. Therefore, both *pg5a* and *pgI* can be used as candidate genes for production of transgenic pigs.

**Keywords:** pectinases; pectin; anti-nutritional factors; transgene; pigs

果胶是畜禽饲料中主要的抗营养物质, 阻碍动物对饲料中营养物质的消化吸收。有研究显示, 在 30 kg “杜长大” 生长猪日粮中添加 8% 果胶, 显著降低日粮的能量表观消化率、表观消化能和氮表观消化率, 极显著降低能量表观代谢率和表观代谢能<sup>[1]</sup>; 在每千克日粮中添加 62.2 g 果胶, 显著降低白罗曼鹅(White Roman Geese)日增重和饲料转化率<sup>[2]</sup>; 在每千克玉米日粮中添加 30 g 甲基化程度为 60% 的果胶, 使 1~21 日龄肉鸡的饲料利用率下降 37%, 增重下降 19%<sup>[3]</sup>。

果胶在结构上主要由 D-半乳糖醛酸(D-Galacturonic acid)通过  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接构成, 同时含有 DL-鼠李糖、D-半乳糖和 D-阿拉伯糖等中性糖<sup>[4,5]</sup>, 是一类广泛存在于植物细胞初生壁和细胞中间片层的杂多糖<sup>[6]</sup>, 占双子叶植物和非禾本科单子叶植物初生壁的 35%、草类初生壁的 2%~10%、木本植物细胞壁的 5%<sup>[4,7]</sup>。在植物细胞壁中, 果胶对纤维素和半纤维素起到包裹和粘连的作用, 降低了畜禽对植物性饲料细胞壁物质的可消化性。此外, 果胶具有较强的持水性, 溶于水后使肠道中食糜粘性增大, 阻碍消化酶与营养物接触和减缓营养小分子向小肠粘

膜扩散<sup>[8]</sup>。果胶酶在自然界中广泛存在细菌、酵母和丝状真菌等微生物中, 在线虫和昆虫中也有少量分布<sup>[9,10]</sup>, 是可特异性降解果胶的一类非淀粉多糖酶。在饲料中添加果胶酶对解除果胶的抗营养作用、提高饲料利用率和改善畜禽的生长性能具有显著的效果<sup>[8,9,11]</sup>。高玉红等<sup>[12]</sup>研究显示, 在“杜长大”三元杂交仔猪基础日粮中添加含有 1% 果胶酶的复合酶制剂使日增重提高 14.50%, 料肉比降低 17.8%。郑腾<sup>[13]</sup>研究显示, 在“长大”二元杂交猪的基础日粮中添加含有活性为 5195 U/kg 果胶酶的复合酶制剂, 对 36~56 日龄仔猪和 57~98 日龄生长猪的日增重、料肉比和饲料利用率都有显著的改善作用。

尽管果胶酶以饲料添加剂的方式使用可有效解除果胶的抗营养作用, 但是其酶活力容易受环境温度、湿度和酸碱度等条件影响, 饲用效果极不稳定<sup>[14,15]</sup>。随着基因编辑技术的不断发展, 创制能在消化道分泌非淀粉多糖酶的节粮环保转基因畜禽新品种为解决非淀粉多糖的抗营养作用提供了新方案<sup>[16,17]</sup>。2001 年, Golovan 等<sup>[18]</sup>利用转基因方法首次获得在唾液腺中表达大肠杆菌(*Escherichia coli*)植酸酶 EsAPPA (GenBank 登录号: M58708.1)的转

基因猪,该猪对饲料磷的消化率提高 88%~99%,粪磷排放量降低 75%。2018 年,本课题组利用 *PiggyBac* 转座子介导的转基因技术成功得到在唾液腺中特异性表达葡聚糖酶、木聚糖酶和植酸酶的转基因猪,与非转基因猪相比,该猪在生长-育成阶段粪氮排放显著减少 24.0%,粪磷排放显著减少 45.8%,对饲料磷的表观消化率显著提高 119.3%,对饲料氮的表观消化率显著提高 7.8%,对饲料钙的表观消化率显著提高 41.2%,日增重显著提高 30.69%,料肉比显著下降 12.03%,育成所需饲料减少 12.18%,育成周期缩短 22.58%,具有明显的环保和经济价值<sup>[19]</sup>。但到目前为止,表达果胶酶的转基因动物模型尚未见报道。

猪消化道有其本身特殊的环境条件,温度较为稳定,一般在 38.5~40 之间波动<sup>[20]</sup>。pH 处于动态变化中:正常情况下胃液 pH 在 1.7~4.9 间波动,小肠液 pH 在 6.1~6.7 间波动,盲肠液 pH 在 6.0~6.4 间波动,结肠液 pH 在 6.1~6.6 间波动。果胶酶的活力极容易受到温度与酸碱度影响,温度过高或者过低、pH 偏酸或偏碱均会抑制果胶酶的活性,甚至使其失活。因此,筛选作用条件与猪消化道环境条件相适应的果胶酶是成功制备转果胶酶基因猪的关键。目前已有数条微生物源果胶酶基因被挖掘出来。Wang 等<sup>[21]</sup>报道,黑曲霉(*Aspergillus niger* ZJ5) *pga-zj5a* 基因(GenBank 登录号:KU896780,简称为 *pg5a*)编码的果胶酶在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中异源表达,最高酶活为 10436 U/mL,最适温度为 25~45,最适 pH 为 4.5~6.5。Tu 等<sup>[22]</sup>研究表明,无毛壳属微生物(*Achaetomium* sp. Xz8) *pgI* 基因(GenBank 登录号:KC633130)编码的果胶酶在毕赤酵母中异源表达,最高酶活为 49934 U/mL,最适温度为 30~60,最适 pH 为 4.0~6.5。Zhou 等<sup>[23]</sup>研究表明,黑曲霉(*Aspergillus niger* SC323) *pga3a* 基因(GenBank 登录号:KP265703)编码的果胶酶在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中异源表达,最大酶活为 1448.48 U/mg,最适温度为 35~70,最适 pH 为 3.0~6.0。Liu 等<sup>[24]</sup>报道,黑曲霉(*Aspergillus niger* JL-15) *pgaA* 基因(GenBank 登录号:KF157661)编码的果胶酶在毕赤酵母中异源表达,最高酶活为 2091 U/mg,最适温度为 30~60,最适 pH 为 4.0~6.0。以上 4 种果胶

酶在酵母中异源表达均能获得高酶活,且其最适作用温度和最适作用 pH 与猪消化道条件较为接近,具备作为制备转果胶酶基因猪候选基因的条件。

本课题组前期研究显示,猪肾细胞系 PK15 (porcine kidney 15, PK15)能很好地模拟外源非淀粉多糖酶基因在猪唾液腺分泌细胞中的表达模式,用猪 PK15 细胞筛选得到的外源非淀粉多糖酶基因可有效地在猪腮腺分泌细胞中表达<sup>[19]</sup>。本研究根据猪遗传密码子使用偏好,对微生物源果胶酶基因 *pg5a*、*pgI*、*pga3a* 和 *pgaA* 的编码序列进行优化,通过脂质体转染法导入猪 PK15 细胞中进行异源表达,参照国家行业标准《QB 1502-92 食品添加剂果胶酶制剂》,利用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定这些基因编码的果胶酶在猪 PK15 细胞中表达的酶活力,并分析它们的最适作用 pH 范围和对酸碱度以及消化蛋白的耐受能力,旨在筛选出作用条件与猪消化道环境条件相适应的果胶酶,为创制分泌果胶酶的新型节粮环保转基因猪提供候选基因和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 候选果胶酶基因密码子优化、真核表达载体构建及在猪 PK15 细胞中表达

果胶酶基因 *pg5a*、*pgI*、*pga3a* 和 *pgaA* 经 SignalP 4.1 Server 预测信号肽后,去掉其原有信号肽,利用 OptimumGene<sup>TM</sup> 基因设计软件根据猪密码子使用偏好进行优化(由南京金斯瑞生物科技有限公司完成)。将牛源的腮腺分泌蛋白信号肽编码序列添加到密码子优化后的候选基因上,在其 5'端添加 *Hind* 酶切位点,3'端添加 *Not* 酶切位点,利用南京金斯瑞生物科技有限公司的 Gene-on-Demand<sup>TM</sup> 技术平台合成基因并分别克隆到 pcDNA3.1(+)真核表达载体上(由南京金斯瑞生物科技有限公司完成),分别得到果胶酶真核表达载体 pCD-*pg5a*、pCD-*pgI*、pCD-*pga3a* 和 pCD-*pgaA*。

将上述质粒转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞,扩大培养。用无内毒素质粒抽提试剂盒 Endo-free Plasmid Mini Kit (OMEGA, 广州)提取质粒,保存于-20℃冰箱中备用。复苏猪 PK15 细胞,培养至密度为 80%

左右。以 pcDNA3.1(+)作为空白对照, 利用脂质体转染试剂盒 Lipofectamine™ LTX + PLUS™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, 美国)将无内毒素的果胶酶基因真核表达载体导入猪 PK15 细胞, 每个反应转染 4 μg 质粒, 每个质粒进行 3 次重复。48 h 后收集细胞培养液, 90 g 离心 3 min, 取上清液作为粗酶液, 保存于-20 °C 冰箱中备用。收集剩余细胞, 用 RNA 抽提试剂盒 Total RNA Kit (OMEGA, 广州)抽提 RNA, 通过 RT-PCR 法检测果胶酶基因 mRNA 水平的表达情况(引物序列见表 1)。

## 1.2 果胶酶酶学性质分析

### 1.2.1 标准曲线绘制

取 150 μL 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液于 2 mL 离心管中, 加入 450 μL DNS 试剂, 混匀, 沸水加热 5 min。冷却至室温, 用双蒸水定容至 1 mL, 10 000 g 离心 1 min, 取上清液作为标准空白样。

取 7 个洁净的 100 mL 容量瓶, 依次加入 1~7 mL 1% 的半乳糖醛酸溶液, 用磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液定容至 100 mL, 摇匀, 获得浓度为 0.10~0.70 mg/mL 的半乳糖醛酸标准溶液。

分别吸取 50 μL 半乳糖醛酸标准溶液 (每个浓度梯度进行 3 次重复) 到 2 mL 离心管中, 依次加入 100 μL 磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲溶液和 450 μL DNS 试剂, 混匀, 沸水浴 5 min。冷却至室温, 用双蒸水定容至 1 mL, 10 000 g 离心 1 min。用标准空白样调

零, 在 540 nm 处测定标准液的吸光度 OD 值。

以半乳糖醛酸标准液浓度为 Y 轴, 吸光度 OD 值为 X 轴, 绘制标准曲线:  $y = 3.3889x + 0.2707$  (相关系统  $R^2=0.997$ )。对应的果胶酶酶活计算公式为: 果胶酶活力 (U/mL)= $D \times ((A_1 - A_0) \times 3.3889 + 0.2707) / 6483.6 \times 1000$ ; 其中,  $A_1$  为酶反应液吸光度,  $A_0$  为灭活组吸光度, D 为酶液稀释倍数。

### 1.2.2 果胶酶活性测定方法

以 1% 多聚半乳糖醛酸溶液作为底物, 以转染质粒 pcDNA3.1(+)的猪 PK15 细胞培养液作为空白对照, 分别测定质粒 pCD-pg5a、pCD-pgI、pCD-pga3A 和 pCD-pgaA 表达果胶酶的酶活性。测定方法参考国行行业标准《QB 1502-92 食品添加剂果胶酶制剂》, 具体如下:

灭活组: 取 50 μL 粗酶液放入 2 mL 离心管中, 加入 450 μL DNS 试剂, 混匀。加入 100 μL 底物, 39.5 °C 处理 30 min, 沸水浴加热 5 min。冷却至室温, 用双蒸水定容到 1 mL, 混匀, 10 000 g 离心 1 min, 吸取上清液, 测定 540 nm 处的吸光度 OD 值。

酶活测定组: 取 50 μL 粗酶液 (设置 3 个重复) 放入 2 mL 离心管中, 加入 100 μL 底物, 混匀, 39.5 °C 反应 30 min。加入 450 μL DNS 试剂, 沸水浴加热 5 min。冷却至室温, 用双蒸水定容到 1 mL, 混匀, 10 000 g 离心 1 min, 测定 540 nm 处吸光度 OD 值。

表 1 RT-PCR 扩增引物  
Table 1 RT-PCR amplification primers

引物名称	序列(5'→3')	复性温度(°C)	产物长度(bp)
pg5a-F	GGAGCTAGGTGGTGGGA	60	155
pg5a-R	ATGGTCAGGTGGTCGGC		
pgI-F	GCAATGGAGCTAAATGGTGG	60	190
pgI-R	GCGGAGTTATCGAGGTGGAC		
pga3a-F	ACCTCCTGCTCCGACATCGT	60	132
pga3A-R	GTCCCACTCCTCGTACTCCC		
pgaA-F	CTGCTGGCGAAACACTGAA	60	121
pgaA-R	TCTTTCCCGCTGATTCCGAG	60	
β-actin F	CCACGTTACTACCTTCTTCTC	60	131
β-actin R	TGATCTCCTTCTGCATCCTGT		

### 1.2.3 最适 pH 测定

配制 pH 梯度(pH2.5~7.0)的 1%多聚半乳糖醛酸溶液作为底物,分别与粗酶液进行酶促反应(设置 3 个重复),测定果胶酶的最适 pH。

### 1.2.4 pH 稳定性测定

配制 pH 梯度(pH2.0~8.0)的缓冲液,分别取 200  $\mu$ L 不同 pH 的缓冲液与 50  $\mu$ L 粗酶液混合(设置 3 个重复),39.5  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加入 1.2.3 中测得的最适 pH 多聚半乳糖醛酸溶液 100  $\mu$ L,39.5  $^{\circ}$ C 反应 30 min,加入 450  $\mu$ L DNS 试剂,沸水浴 5 min,以最高酶活为 100%,测定不同 pH 缓冲液处理后果胶酶的剩余酶活。

### 1.2.5 胃蛋白酶和胰蛋白酶耐受能力测定

果胶酶胃蛋白酶和胰蛋白酶耐受性测定参考 Tu 等<sup>[25]</sup>和孙悦<sup>[26]</sup>报道的方法,具体如下:

**胃蛋白酶耐受性分析** 取 50  $\mu$ L 粗酶液与 200  $\mu$ L 猪胃蛋白酶溶液(1 mg/mL, pH4.3)混合(设置 3 个重复),39.5  $^{\circ}$ C 处理 2 h,加入 1.2.3 中测得的最适 pH 多聚半乳糖醛酸溶液 100  $\mu$ L,39.5  $^{\circ}$ C 反应 30 min,视粗酶液经 pH4.3 谷氨酸-盐酸缓冲液处理 2 h 后测得的酶活力为 100%,测定果胶酶的剩余酶活。

**胰蛋白酶耐受性分析** 取 50  $\mu$ L 粗酶液与 200  $\mu$ L 猪胰蛋白酶(1 mg/mL, pH8.0)混合,39.5  $^{\circ}$ C 处理 2 h,加入 1.2.3 中测得的最适 pH 多聚半乳糖醛酸溶液 100  $\mu$ L,视粗酶液经 pH7.0 Tris-HCl 缓冲液处理 2 h 后测得的酶活力为 100%,测定其剩余酶活。

## 2 结果与分析

### 2.1 果胶酶基因对猪细胞表达系统适应性提高

根据猪基因表达系统的密码子使用偏好,对果胶酶基因 *pg5a*、*pgI*、*pga3A* 和 *pgaA* 的编码序列进行优化。结果显示,4 种果胶酶基因优化后的密码子适应指数(codon adaptation index, CAI)分别为 0.98、0.81、0.97 和 0.82,均大于 0.8 (一般认为 CAI> 0.8 时,基因即可得到较高水平的表达)(表 2);4 种基因评分为 0~50 的低频率使用的密码子和稀有密码

子被完全剔除,猪高频使用的密码子比例均显著提高(图 1 A);4 种基因的 GC 含量均在 30%~70%理想范围内,统计区域 60 bp 以内的 GC%峰被移除(图 1 B)。以上结果表明,4 种果胶酶基因经密码子优化后对猪基因表达系统的适应性提高,有利于它们在猪细胞中表达。

### 2.2 果胶酶基因在猪 PK15 细胞中成功转录

以空白载体 pcDNA3.1(+)为对照,分别将果胶酶基因表达载体通过脂质体转染法导入猪 PK15 细胞。48 h 后,利用 RT-PCR 检测 4 种果胶酶基因 mRNA 水平的表达情况。结果显示,果胶酶基因 *pg5a*、*pgI*、*pga3A* 和 *pgaA* 均能成功转录出 mRNA (图 2)。

### 2.3 果胶酶 PG5A 和 PGI 的酶活力较 PGA3A 和 PGAA 强

以转染 pcDNA3.1(+)空载体的细胞培养液作为对照组,根据猪消化道的温度条件和 4 种果胶酶在酵母细胞中表达的最适 pH,测定它们在 39.5  $^{\circ}$ C 和 pH5.0 条件下的果胶酶活力。结果显示,果胶酶 PG5A 的活性最高,为 0.48 U/mL;其次是 PGI,为 0.37 U/mL;PGA3A 的果胶酶活性极低;PGAA 与对照组酶活差异不显著( $P>0.05$ )(图 3)。果胶酶 PGAA 进行完酶活力比较实验后被淘汰,不再进行后续的实验。

### 2.4 果胶酶 PG5A 和 PGI 最适 pH 与猪消化道 pH 相近

分别用 pH 梯度(pH2.5~7.0)底物溶液与果胶酶 PG5A、PGI 和 PGA3A 进行酶促反应,测定它们的最适作用 pH,结果如图 4 所示。PG5A 在 pH4.0 处

表 2 4 种果胶酶基因密码子适应指数优化结果

Table 2 Codon adaptation index optimization result of the four pectinase genes

果胶酶基因	CAI	
	优化后	优化前
<i>pg5a</i>	0.98	0.80
<i>pgI</i>	0.81	0.80
<i>pga3A</i>	0.97	0.79
<i>pgaA</i>	0.82	0.77

CAI: 密码子适应指数(codon adaptation index)。

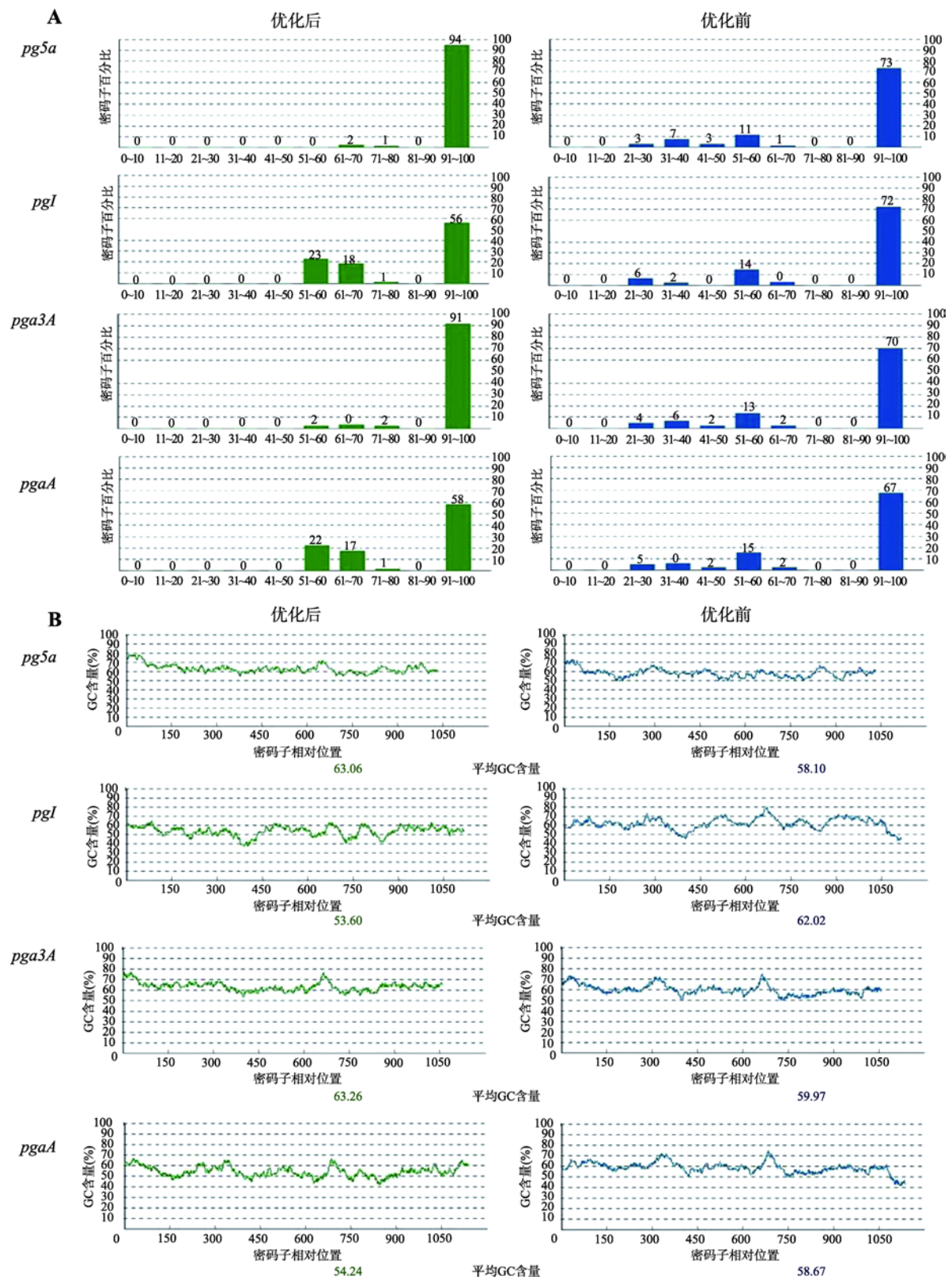


图 1 4 种果胶酶基因最优密码子频率和 GC 含量优化结果

Fig. 1 Frequency of optimal codon and GC content optimization results of the four pectinase genes

A：最优密码子频率优化结果；B：GC 含量优化结果。

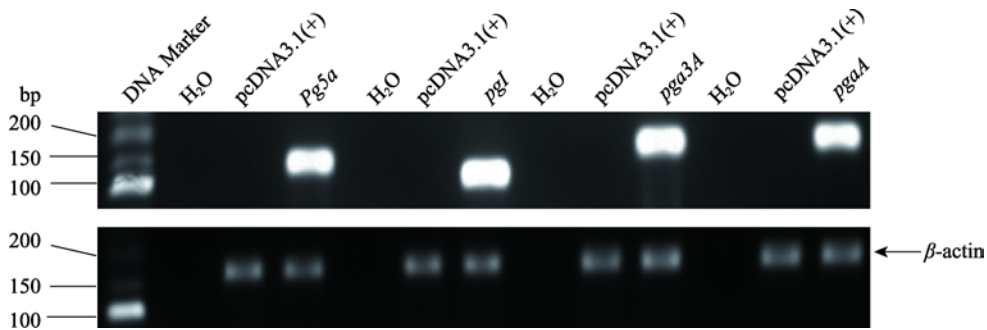


图 2 4 种果胶酶基因 mRNA 水平表达检测

Fig. 2 mRNA expression level detection of the four pectinase genes

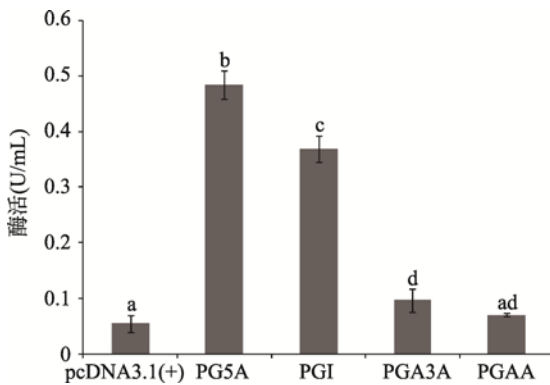


图 3 4 种果胶酶酶活力比较

Fig. 3 Comparison of the four pectinase activities

不同字母标注表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

获得最高酶活, 为 0.95 U/mL, 在 pH3.0 和 pH5.0 处的酶活分别为 0.51 U/mL 和 0.57 U/mL, 当底物 pH 低于 pH2.5 或者大于 pH6.0 时, 其活性受到了极大的抑制。PGI 在 pH5.0 处获得最大活性, 为 0.30 U/mL, 在 pH4.0 处和 pH6.0 处的活性分别为 0.25 U/mL 和

0.19 U/mL, 当底物 pH 小于 pH3.0 或者大于 pH7.0 时几乎不表现出酶活力。PGA3A 在 pH2.5~7.0 范围内均没有检测到果胶酶活性。综上所述, 果胶酶 PG5A 和 PGI 的最适 pH 范围分别为 pH3.0~5.0 和 pH3.0~6.0, 均在猪消化道 pH 波动范围(pH1.7~6.7)内。果胶酶 PGA3A 进行完最适 pH 测定后被淘汰, 不再进行后续实验。

## 2.5 果胶酶 PG5A 和 PGI 对酸碱度和消化蛋白酶耐受能力强

利用不同 pH (pH2.0~8.0) 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液处理 2 h 后, 测定果胶酶 PG5A 和 PGI 的剩余酶活力, 分析它们的酸碱度耐受能力, 结果如图 5A 所示。PG5A 在 pH4.0~6.0 范围内维持 46% 以上的活性, 当 pH 低于 pH3.0 或高于 pH7.0 时, pH 对其活性的具有明显的抑制作用; PGI 在 pH4.0~6.0 范围内维持 35% 以上的活性, 而当 pH 低于 pH3.0

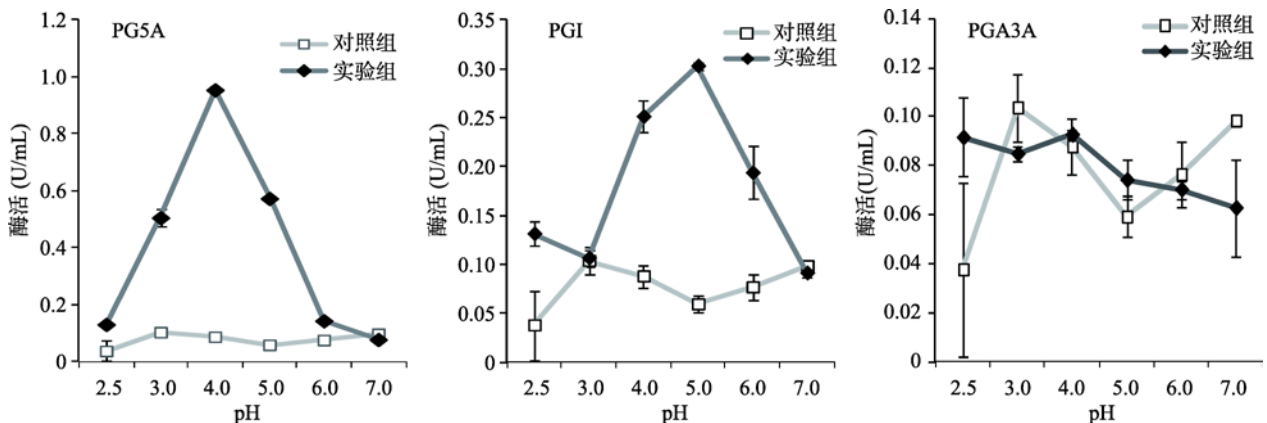


图 4 果胶酶 PG5A、PGI 和 PGA3A 的最适作用 pH 测定

Fig. 4 Optimal pH determination of pectinase PG5A, PGI, and PGA3A

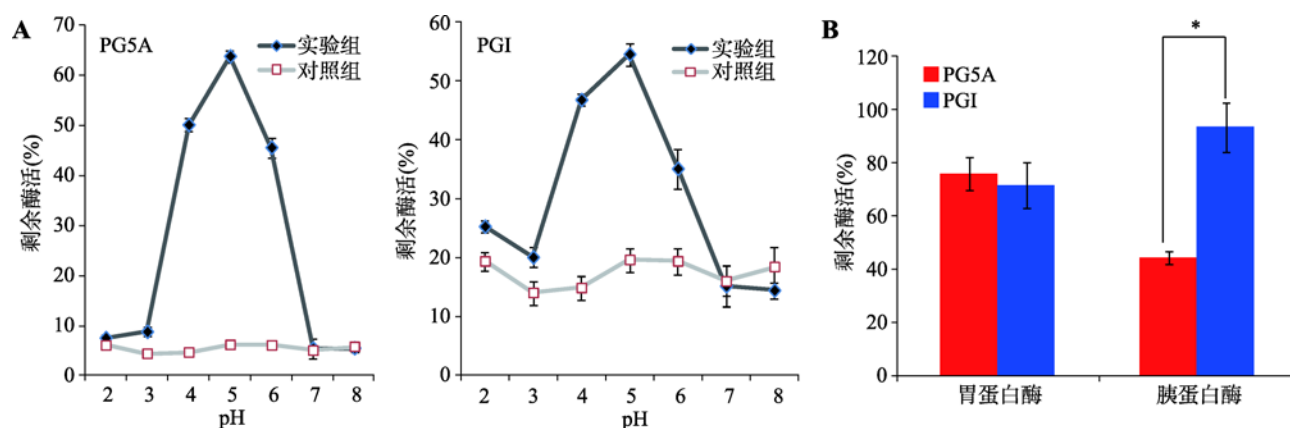


图 5 果胶酶 PG5A 和 PGI 的 pH 稳定性和消化蛋白酶耐受性测定

Fig. 5 pH stability and digestive protease tolerance assays of pectinase PG5A and PGI

A: pH 稳定性; B: 消化蛋白酶耐受性。\*表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

或者高于 pH7.0 时, 其活性同样受到极大的抑制。利用猪胃蛋白酶和胰蛋白酶处理 PG5A 和 PGI, 测定它们对消化蛋白酶的耐受能力。胃蛋白酶耐受性试验结果显示, PG5A 和 PGI 对胃蛋白酶均具有较强的耐受能力, 处理后剩余酶活分别为 76% 和 71% (图 5 B); 胰蛋白酶耐受性试验结果显示, PGI 对胰蛋白酶的耐受能力较强, 处理后保留 93% 的剩余酶活, 而 PG5A 仅保留 44% 的剩余酶活(图 5 B)。以上结果表明, 果胶酶 PG5A 和 PGI 对酸碱度和消化蛋白酶具有较强的耐受能力。

### 3 讨论

果胶酶基因 *pg5a*、*pgI*、*pga3A* 和 *pgaA* 在酵母中高效表达, 其编码果胶酶发挥最大酶活力的温度和 pH 范围与猪消化道温度和 pH 范围相似<sup>[21~24]</sup>。本文根据猪基因表达系统遗传密码使用偏好, 对 *pg5a*、*pgI*、*pga3A* 和 *pgaA* 的编码序列进行优化, 并导入猪 PK15 细胞中异源表达, 探究它们在猪细胞中表达的可行性, 为创制转果胶酶基因猪提供候选基因。研究结果显示, *pg5a* 在猪 PK15 细胞表达果胶酶活力最高, 其次为 *pgI*。而 *pga3A* 和 *pgaA* 虽然能正常转录, 但在其细胞培养液中没能检测到果胶酶活力。

*pg5a* 和 *pgI* 在猪 PK15 细胞表达获得果胶酶的最适作用 pH 范围分别在 3.0~5.0 和 4.0~6.0 之间, 与它们在毕赤酵母中表达获得果胶酶的最适 pH 范

围相似。在 PK15 细胞中, *pg5a* 编码果胶酶的最大酶活在 pH4.0 处测得, 为 0.95 U/mL, *pgI* 编码果胶酶的最大酶活在 pH5.0 处测得, 为 0.30 U/mL, 二者均与它们在毕赤酵母中表达获得的最大酶活存在较大差异(*pg5a* 为 10 436 U/mL, *pgI* 为 49 934 U/mL), 与孙悦<sup>[26]</sup>报道的结果相似。原因可能与果胶酶基因在两种细胞中的表达效率差异导致的单位体积培养基内含有酶数量的不同有关。首先, *pg5a* 和 *pgI* 在毕赤酵母中的表载体是 pPIC9K, 该载体允许基因多拷贝插入<sup>[27]</sup>, 而在 PK15 细胞中的表达载体是 pcDNA3.1(+), 只含有单拷贝的外源基因, 导致二者在 PK15 细胞中表达量远低于它们在毕赤酵母中的表达量。其次, 毕赤酵母在培养罐中可进行高密度发酵, 外源基因的表达量可随细胞密度的增加而呈指数式增加, 而 PK15 细胞在培养皿中为单层细胞贴壁生长, 细胞愈合之后停止生长, 导致 PK15 细胞介导 *pg5a* 和 *pgI* 表达的能力远低于毕赤酵母。

经密码子优化后 *pga3A* 和 *pgaA* 的 CAI 分别为 0.97 和 0.82, 均大于 0.8, GC 含量分别为 63.26% 和 54.24%, 密码子均分布在评分为 51~100 之间的高频使用密码子间, 优化结果与 *pg5a* 和 *pgI* 相似, 说明优化结果利于 *pga3A* 和 *pgaA* 在猪细胞中表达。但在它们的细胞培养液中没有检测到果胶酶活性, 与它们在酵母中表达的结果不同。*pga3A* 在酿酒酵母中表达获得果胶酶的最大酶活为 1448.48 U/mg<sup>[23]</sup>, *pgaA* 在毕赤酵母中表达获得果胶酶的最大酶活为

2091.0 U/mg<sup>[24]</sup>, 均远小于 *pg5a* 和 *pgI* 在酵母细胞中表达获得果胶酶的最大酶活。结合 *pg5a* 和 *pgI* 在猪 PK15 细胞中表达获得果胶酶的最大酶活仅为 0.95 U/mL 和 0.30 U/mL 的结果, 我们推测 PGA3A 和 PGAA 不表现出果胶酶活性的原因可能与二者的活性低有关, 在 PK15 细胞的表达量可能不足以使它们表现出酶活力。此外, 动物细胞表达系统与酵母表达系统对目标蛋白翻译后修饰方式存在明显差异。PGA3A 和 PGAA 不表现果胶酶活性也可能是它们无法适应猪细胞表达系统导致的。PG5A 和 PGI 在猪细胞表达系统获得最大酶活力(PG5A>PGI)与酵母表达系统(PG5A<PGI)相反, 可能也与此有关, 需进一步研究证实。

猪的消化道有其独特的生理条件, 其消化液一般为酸性, 且处于动态变化中。猪胃液 pH 在 1.7~4.9 间变化, 平均水平为 4.4, 小肠液 pH 在 6.1~6.7 间变化, 盲肠液 pH 在 6.0~6.4 间变化, 结肠 pH 在 6.1~6.6 间变化。因此, 果胶酶必须含有较宽的适宜 pH 范围且对酸碱度有较强的耐受能力才能在猪消化道内发挥作用。本研究筛选得到的果胶酶 PG5A 和 PGI 的最适 pH 范围在 3.0~5.0 和 4.0~6.0 之间, 在猪消化道 pH 的波动范围内。PG5A 和 PGI 在 pH4.0~6.0 条件下处理 2 h 后分别维持 46% 和 35% 以上的酶活, 说明二者对酸碱度有较强的耐受能力, 适应猪消化道的 pH 条件。另外, 猪消化道还含有高浓度的消化蛋白酶。果胶酶能在猪消化道发挥作用的另一个条件是对消化蛋白酶具有较强的耐受能力。消化蛋白酶耐受性实验显示, PG5A 和 PGI 在 1 mg/mL 胃蛋白酶溶液中分别维持 76% 和 71% 的酶活, 在 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液中分别维持着 93% 和 44% 的酶活, 对消化道的消化蛋白酶具有较强的耐受能力。

综上所述, 果胶酶基因 *pg5a* 和 *pgI* 能在猪细胞中高效表达。其编码果胶酶的最适作用 pH 在猪消化道 pH 变化范围内, 且对酸碱度和猪消化蛋白酶具有较强的耐受能力, 可作为创制新型节粮环保转基因猪的功能基因。

## 参考文献(References):

- [1] Tan XW. Effect of pectin on digestion, metabolism and plasma glucose, plasma ammonia in growing pigs [Dissertation]. Hunan Agricultural University, 2002.
- 谭翔文. 果胶对生长猪消化代谢和血糖、血氨的影响 [学位论文]. 湖南农业大学, 2002. [DOI]
- [2] Yu B, Tsai CC, Hsu JC, Chiou PW. Effect of different sources of dietary fibre on growth performance, intestinal morphology and caecal carbohydrases of domestic geese. *Brit Poultry Sci*, 1998, 39(4): 560–567. [DOI]
- [3] Langhout DJ, Schutte JB, Van Leeuwen P, Wiebenga J, Tamminga S. Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. *Brit Poultry Sci*, 1999, 40(3): 340–347. [DOI]
- [4] Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(3): 266–277. [DOI]
- [5] Pérez S, Mazeau K, Penhoat C. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol Bioch*, 2000, 38(1–2): 37–55. [DOI]
- [6] Xie MY, Li J, Nie SP. A review about the research and applications of pectin. *J Chin Inst Food Sci Tech*, 2013, 13(8): 1–14.
- 谢明勇, 李精, 聂少平. 果胶研究与应用进展. 中国食品学报, 2013, 13(8): 1–14. [DOI]
- [7] Cheng Z, Chen D, Wang Q, Xian L, Lu B, Wei Y, Tang H, Lu Z, Zhu Q, Chen Y, Huang R. Identification of an acidic endo-polygalacturonase from *penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *J Biosci Bioeng*, 2017, 123(6): 665–672. [DOI]
- [8] Wang ZR, Qiao SY, Lu WQ, Li DF. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. *Poult Sci*, 2005, 84(6): 875–881. [DOI]
- [9] Torres S, Sayago JE, Ordoñez RM, Isla MI. A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(2): 123–128. [DOI]
- [10] Sassi AH, Tounsi H, Trigui-Lahiani H, Bouzouita R, Romdhane ZB, Gargouri A. A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanis*: characterization and application in juice clarification. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 158–164. [DOI]
- [11] Mei NA, Bai J, Shao XC, Mu YP, Ding JN, Chen GF. Feed grade pectinase affect the performance of broiler chickens grow. *Poul Science*, 2014, (2): 12–13.
- 梅宁安, 白洁, 邵喜成, 慕仰平, 丁建宁, 陈桂芬. 饲料级果胶酶对肉仔鸡生长性能的影响. 家禽科学, 2014, (2):

- 12–13. [DOI]
- [12] Gao YH, Zang SM, Liu YQ, Guo WH, Liu YQ. Effects of compound enzyme on production performance and digestion and absorption capacity of weaned piglets. *Feed Res*, 2000, (3): 8–10.  
高玉红, 臧素敏, 刘艳琴, 郭卫华. 复合酶对断奶仔猪生产性能和消化吸收能力的影响研究. *饲料研究*, 2000, (3): 8–10. [DOI]
- [13] Zheng T. Characterization and application to pig feedstuff of the enzymes from *Aspergillus niger* [Dissertation]. Nanjing Agricultural University, 2006.  
郑腾. 黑曲霉产酶特性研究及其酶制剂在猪饲料中的应用[学位论文]. 南京农业大学, 2006. [DOI]
- [14] Prandini A, Sigolo S, Morlacchini M, Giuberti G, Moschini M, Rzepus M, Della Casa G. Addition of nonstarch polysaccharides degrading enzymes to two hullless barley varieties fed in diets for weaned pigs. *J Anim Sci*, 2014, 92(5): 2080–2086. [DOI]
- [15] Inbarr J, Schmitz M, Ahrens F. Effect of adding fibre and starch degrading enzymes to a barley/wheat based diet on performance and nutrient digestibility in different segments of the small intestine of early weaned pigs. *Anim Feed Sci Tech*, 1993, 44(1–2): 113–127. [DOI]
- [16] Xing YY, Yang Q, Ren J. Application of CRISPR/Cas9 mediated genome editing in farm animals. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(03): 217–226.  
幸宇云, 杨强, 任军. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在农业动物中的应用. *遗传*, 2016, 38(03): 217–226. [DOI]
- [17] Huanag JJ, Cao CW, Zheng GM, Zhao JG. Genome editing technologies drive the development of pig genetic improvement. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(11): 1078–1089.  
黄娇娇, 曹春伟, 郑国民, 赵建国. 基因组编辑技术在猪遗传改良中的应用. *遗传*, 2017, 39(11): 1078–1089. [DOI]
- [18] Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW, Fan MZ, Hayes MA, Laursen J, Hjorth JP, Hacker RR, Phillips JP, Forsberg CW. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(8): 741–745. [DOI]
- [19] Zhang X, Li Z, Yang H, Liu D, Cai G, Li G, Mo J, Wang D, Zhong C, Wang H, Sun Y, Shi J, Zheng E, Meng F, Zhang M, He X, Zhou R, Zhang J, Huang M, Zhang R, Li N, Fan M, Yang J, Wu Z. Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact. *eLife*, 2018, 7. [DOI]
- [20] Xu Y. Study on the effects of pectinase on the nutrition utilization of corn-soybean meal diet in broilers [Dissertation]. Nanjing Agricultural University, 2004.  
许毅. 果胶酶对肉鸡玉米豆粕型日粮养分利用率的影响[学位论文]. 南京农业大学, 2004. [DOI]
- [21] Wang J, Zhang Y, Qin X, Gao L, Han B, Zhang D, Li J, Huang H, Zhang W. Efficient expression of an acidic Endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* and its application in juice production. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(13): 2730–2736. [DOI]
- [22] Tu T, Meng K, Bai Y, Shi P, Luo H, Wang Y, Yang P, Zhang Y, Zhang W, Yao B. High-yield production of a low-temperature-active polygalacturonase for papaya juice clarification. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2974–2981. [DOI]
- [23] Zhou H, Li X, Guo M, Xu Q, Cao Y, Qiao D, Cao Y, Xu H. Secretory expression and characterization of an acidic endo-polygalacturonase gene from *Aspergillus niger* SC323 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(7): 999–1006. [DOI]
- [24] Liu MQ, Dai XJ, Bai LF, Xu X. Cloning, expression of *Aspergillus niger* JL-15 endo-polygalacturonase A gene in *Pichia pastoris* and oligo-galacturonates production. *Protein Express Purif*, 2014, 94(2): 53–59. [DOI]
- [25] Tu T, Meng K, Huang H, Luo H, Bai Y, Ma R, Su X, Shi P, Yang P, Wang Y, Yao B. Molecular characterization of a thermophilic endo-polygalacturonase from *Thielavia arenaria* XZ7 with high catalytic efficiency and application potential in the food and feed industries. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(52): 12686–12694. [DOI]
- [26] Sun Y. Non-starch polysaccharides enzyme genes selection and co-expression vector construction with phytase gene [Dissertation]. South China Agricultural University, 2016.  
孙悦. 非淀粉多糖酶基因筛选及其与植酸酶基因共表达载体构建[学位论文]. 华南农业大学, 2016. [DOI]
- [27] Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 1991, 9(5): 455–460. [DOI]

(责任编辑: 任军)