

文章编号:1673-1689(2006)02-0112-04

耐热果胶裂解酶基因 *pel9A* 的克隆和表达

甄东晓¹, 王树英², 严群¹, 李华钟^{1,3}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036;2. 江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036;3. 江南大学 医学系,江苏 无锡 214036)

摘要: 利用 PCR 技术从耐热梭状芽孢杆菌(*Clostridium stercorarium*)中扩增得到产耐热果胶裂解酶的结构基因 *pel9A*,并将其克隆于表达载体 pET28a 中,最后将此重组质粒转化到受体菌 *E. coli* BL-21 中进行表达。诱导条件为:37 °C 诱导 5 h, IPTG 浓度为 0.8 mmol/L。重组菌经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 分析表达的蛋白质的相对分子质量为 130 000,与预期相对分子质量相符。细胞经超声破碎后,测得果胶酶的比酶活为 15 U/mg 粗蛋白。

关键词: 果胶裂解酶;耐热梭状芽孢杆菌;重组质粒;大肠杆菌 BL-21;表达

中图分类号: Q 557

文献标识码: A

Cloning and Expression of Gene *Pel9A* Encoding Thermostable Pectate Lyase

ZHEN Dong-xiao¹, WANG Shu-ying², YAN Qun¹, LI Hua-zhong^{1,3}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Testing & Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. Department of Medicine, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: With genomic DNA of *Clostridium stercorarium* as a template, a structural gene *pel9A* encoding pectate lyase was obtained by PCR amplification. The *pel9A* was cloned into pET28a to recombine an express plasmid p*Pel9A*, and then the plasmid p*Pel9A* was transformed into *E. coli* BL-21, expressed under the control of T7lac promoter at 37 °C. and induction with 0.8 mmol/L IPTG for 5 h. SDS-PAGE analysis revealed that with IPTG induction, the recombinant strain harboring the plasmid p*Pel9A* could express the target protein (130 000), with the molecular weight same as the expected pectate lyase protein. The specific activity of pectate lyase was 15 U/mg crude protein.

Key words: pectate lyase; *Clostridium stercorarium*; recombinant plasmid; *E. coli* BL-21

果胶酶是广泛存在于果实及多种微生物中可以作用于果胶质的一类由许多单酶组成的复合酶的总称。按其作用原理,果胶酶可分为果胶解聚酶、果胶酯酶和原果胶酶。碱性果胶酶一般指聚半乳糖醛酸裂解酶(Polygalacturonate lyase, PGL),

即果胶裂解酶,是果胶解聚酶的一种。果胶裂解酶可用于香料油和类胡萝卜素等医用原料的提取、咖啡和茶的发酵、含有果胶质废水的处理以及原油的提取过程。近年来又发现了果胶裂解酶还可用于植物病毒的纯化、纸浆漂白和纺织品的生物精炼

收稿日期:2005-05-18; 修回日期:2005-06-23.

作者简介:甄东晓(1978-),男,山东青岛人,微生物学硕士研究生.

等^[1-2]。

果胶酶有广泛的微生物来源,细菌、真菌和放线菌都可以产果胶酶,但能产生果胶酶并具有工业化使用前景的细菌却不多。1972 年,Koki Hoikoshi 第一次用嗜碱细菌制得了碱性果胶酶。此后,不同的研究表明^[3-5],芽孢杆菌作为生产果胶酶用菌较为理想。

耐热梭状芽孢杆菌是具有很强半纤维素和果胶降解能力的厌氧耐热菌,但由于其生长时绝对厌氧,直接发酵法生产耐热果胶裂解酶有一定的困难。根据已经报道的耐热梭状芽孢杆菌果胶裂解酶 Pel9A 基因为一个由 3 720 bp 组成的开放读框,作者将其果胶裂解酶的产酶基因克隆至质粒 pET28a 中,并使其在 *E. coli* BL-21 中高效表达,以获得相对分子质量为 130 000 的果胶裂解酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 耐热梭状芽孢杆菌(*Clostridium stercorarium*)由日本三重大学生物资源学部提供;*Escherichia coli* XL-1 Blue、*Escherichia coli* BL-21 菌株以及质粒 pET-28a,均由作者所在研究室保藏。

1.1.2 酶和化学试剂 质粒小量提取试剂盒购自碧云天公司;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司;限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、LA Taq DNA 聚合酶分别购于日本 TaKaRa 公司;抗生素为华美生物工程公司产品;IPTG 购于日本 Nacalai Tesque 公司;聚半乳糖醛酸购于 Sigma 公司;其他所用试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基 LB 培养基用于大肠杆菌及转化子培养,固体 LB 培养基添加 1.5 g/dL 的琼脂,固体和液体 LB 培养基在使用时按需要加入卡那霉素(终质量浓度 50 μg/mL)。

1.1.4 主要仪器 垂直电泳仪 Compact PAGE SYSTEM AE-7300(日本 ATTA 制造);超声波破碎仪 High Intensity Ultrasonic Processor WCX400(美国 SONIC MATERIALS 制造);UVP 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 制造)。

1.2 方法

1.2.1 耐热梭状芽孢杆菌染色体 DNA 的提取 提取方法按文献^[6]进行操作。

1.2.2 目的基因片断的克隆及表达载体的构建 根据已经报道的耐热梭状芽孢杆菌果胶裂解酶

Pel9A 基因为一个由 3 720 bp 组成的开放读框^[9],设计和合成了两个引物:

引物 1:5′TTCCATGGTTGAAGAAGCAGAGGCAATGCC3′

引物 2:5′GGGCTCGAGTTTTATGCTTTT TATTTTGA3′

引物 1 的 5′端含 NcoI 酶切位点,引物 2 的 5′端含 XhoI 酶切位点。

将从耐热梭状芽孢杆菌中提取的染色体 DNA 作为 PCR 扩增的模板。PCR 方法扩增条件:95 ℃变性 5 min,扩增反应 30 个循环(95 ℃变性 30 s,50 ℃复性 30 s,72 ℃延伸 4 min),72 ℃延伸 10 min。

DNA 片段的回收、DNA 酶切、电泳鉴定、连接、转化和质粒提取等操作均按文献^[6]进行。

1.2.3 重组大肠杆菌的培养及诱导表达 将含 Pel9A 基因重组质粒的大肠杆菌 *E. coli* BL-21 接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃下培养 8~10 h,然后以体积分数 5%的接种量接种至新鲜的 LB 培养基中,至 A₆₀₀ 为 0.5~0.7 时加入终浓度为 0.8 mmol/L 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导 5 h。取 5 mL 菌液 8 000 r/min 离心 5 min,将沉淀重悬浮于 2 mL、20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,超声波破碎(400 W),离心除去碎片,上清液即为所得粗酶液,粗酶液用于目的酶的蛋白质分析和酶活测定。

1.2.4 SDS-PAGE 蛋白电泳检测酶蛋白表达 SDS-PAGE 垂直板蛋白电泳(分离胶质量浓度为 10 g/dL,浓缩胶质量浓度为 4 g/dL)检测外源蛋白的表达情况,蛋白质条带用考马斯亮蓝染色,参照文献^[6]。

1.2.5 酶活测定 酶活测定方法参照文献^[7]并作出适当调整,反应体系的 pH 值为 7.0,反应温度为 65 ℃。

酶活定义:每分钟裂解聚半乳糖醛酸产生 1 μmol 的不饱和半乳糖二酸(unsaturated digalacturonide)所需要的酶量为一个酶活单位。

1.2.6 蛋白质浓度测定 以牛血清白蛋白(BSA)为标准,采用 Bradford 法测定蛋白质浓度^[8]。

2 结 果

2.1 表达重组质粒 pPel9A 的构建与鉴定

以提取的耐热梭状芽孢杆菌染色体 DNA 为模板,用合成的引物进行 PCR 扩增。琼脂糖电泳检测扩增片断,见图 1。扩增的 DNA 片断与预期的大小一致,约 3 700 bp。

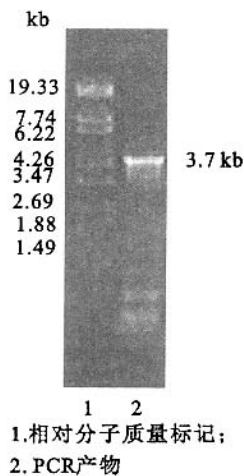


图 1 PCR 扩增片断电泳图

Fig. 1 Agarose-electrophoresis of the amplified DNA

PCR 产物与质粒 pET-28a 分别经 *Xho*I/*Nco*I 进行双酶切并纯化,经 T₄ DNA 连接酶连接后转化感受态细胞 *E. coli* XL1-Blue。少量制备所获得的重组质粒 pPel9A 经双酶切后,琼脂糖凝胶电泳检测,见图 2。显示一条与 PCR 扩增片断大小一致的 3 700 bp 片断和一条大小为 5 300 bp 线性的 pET28a,证明已获得所需要的重组质粒 pPel9A。DNA 序列测定结果表明,所克隆的基因与已报道的原序列完全一致,没有突变。

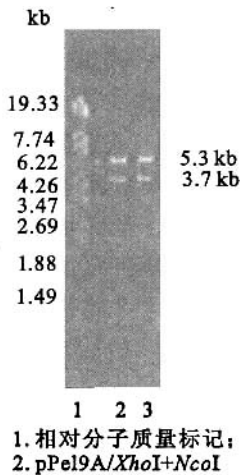


图 2 重组质粒 pPel9A 的 *Xho*I/*Nco*I 酶切

Fig. 2 Double digestion of pPel9A with *Xho*I/*Nco*I

2.2 Pel9A 基因在 *E. coli* BL-21 中的表达

将从 *E. coli* XL1-Blue(pPel9A)中纯化得到的重组质粒 pPel9A 转化受体菌 *E. coli* BL-21 感受态细胞并通过抗生素(卡那霉素)平板挑取阳性转化子 *E. coli* BL-21(pPel9A)。

2.2.1 诱导温度对 PGL 表达的影响 37 ℃培养 *E. coli* BL-21(pPel9A)2 h(A_{600} 为 0.5~0.7),加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,分别于 24,28,37,42

℃下诱导 6 h,不同诱导温度下 PGL 活性表达情况见图 3。由图 3 可知,在 37 ℃下 PGL 的活性达到 12.22 U/mg 粗蛋白,为试验温度下的最高值。较高的诱导温度造成酶过快积累,使得酶活降低,过低的诱导温度会导致酶积累太慢,从而影响酶活。

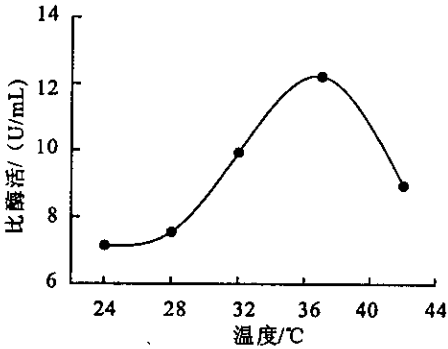


图 3 诱导温度对 PGL 活性的影响

Fig. 3 Effect of inducing temperature on PGL activity

2.2.2 IPTG 浓度对 PGL 表达的影响 由于诱导剂 IPTG 的添加量往往对外源蛋白质的表达有较大的影响,作者讨论了 37 ℃培养菌体 2 h 后不同浓度 IPTG 对酶活的影响。分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1,0.3,0.5,0.8,1 mmol/L,于 37 ℃诱导 4 h。在上述浓度下,PGL 的活性最高达到 13.95 U/mg。不同 IPTG 浓度下 PGL 表达情况见图 4。可见 0.8 mmol/L 的 IPTG 剂量可以诱导酶较充分表达,过多添加 IPTG 并没有提高酶活。

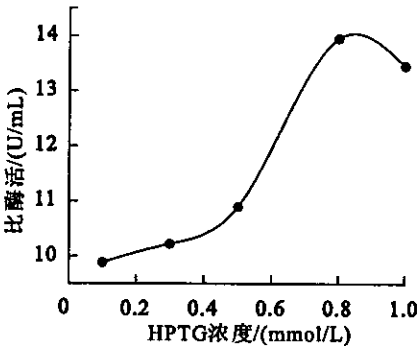


图 4 IPTG 浓度对 PGL 活性的影响

Fig. 4 Effect IPTG concentration on PGL activity

2.2.3 诱导时机对 PGL 表达的影响 由于过早诱导会使能量和营养物质主要供给外源蛋白质的表达而影响菌体生长,诱导时机滞后又会导致外源蛋白质表达不充分,所以作者分别在 37 ℃培养菌体 1,2,3,4,5 h 后加入 IPTG(终浓度 1 mmol/L),并于 37 ℃诱导 4 h。不同诱导时机下 PGL 表达情况见图 5。可知,当重组菌在 37 ℃生长 2 h 时达到一定菌体量(A_{600} 为 0.8 左右)后再进行诱导时,酶活性达到最高值,为 12.54 U/mg。

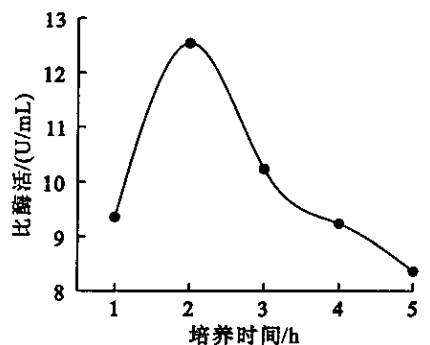


图 5 诱导时机对 PGL 活性的影响

Fig. 5 Effect inducing time on PGL activity

2.2.4 诱导时间对 PGL 表达的影响 菌体于 37℃ 培养 2 h 后加入 IPTG(终浓度 0.8 mmol/L), 分别诱导 2,3,4,5,6,7 h。不同诱导时间对 PGL 活性的影响情况见图 6。当诱导至 5 h 左右时酶活较高,为 13.31 U/mg。另一方面,随着诱导时间的增长,酶活反而下降。

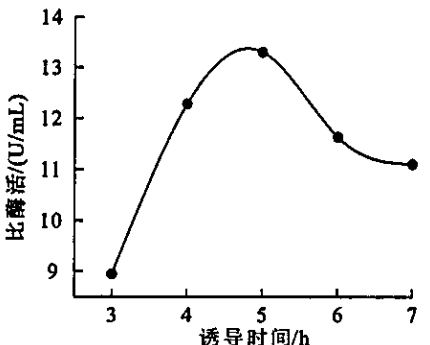


图 6 诱导时间对 PGL 活性的影响

Fig. 6 Effect inducing duration on PGL activity

2.3 表达产物的分析鉴定与比酶活测定

37℃ 培养 *E. coli* BL-21 (pPel9A) 2 h 后加入 IPTG(终浓度为 0.8 mmol/L), 诱导 5 h, 经 SDS-

参考文献:

[1] Fredi Bruhlmann, Marianne Leupin, Karl H Erismann, et al. Enzymatic degumming of ramie bast fibers[J]. **Biothechnol.** 2000,76:43-50.

[2] 刘昌龄,王秀玲. 碱性果胶酶:成本有效、对环境有利的前处理的关键[J]. 印染译从,2000(4):41-44.

[3] Mukesh Kapoor, Qasim Khalil Beg. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus sp.* MG-cp-2[J]. **Process Biochemistry**,2000,36:467-473.

[4] T Kobayashi, K Koike. Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkali-philic strain of *Bacillus biosci*[J]. **Biotech Biochem**, 1999,63(1):65-72.

[5] M Kapoor, G S Hoondal. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus sp.* MG-cp-2 in degumming of ramie(*Boehmeria nivea*) and sunn hemp(*Crotalaria juncea*) bastfibres[J]. **Process Biochemistry**, 2001,36:803-807.

[6] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.

[7] 丁凤平,张秀芝. 碱性果胶酶 PATE 及其测定方法[J]. 中国生化药物杂志,1993,64(2):42-43.

[8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72:248-254.

PAGE 蛋白质电泳检测了外源 PGL 的表达,结果见图 7。电泳结果显示,*E. coli* BL-21 (pPel9A) 细胞破碎、离心后上清液比空载的 *E. coli* BL-21 (pET28a) 明显多出一条蛋白质谱带,对照相对分子质量标准可知大约为 130 000,与预期相对分子质量大小相符。测得粗酶液的比酶活为 15 U/mg 粗蛋白。

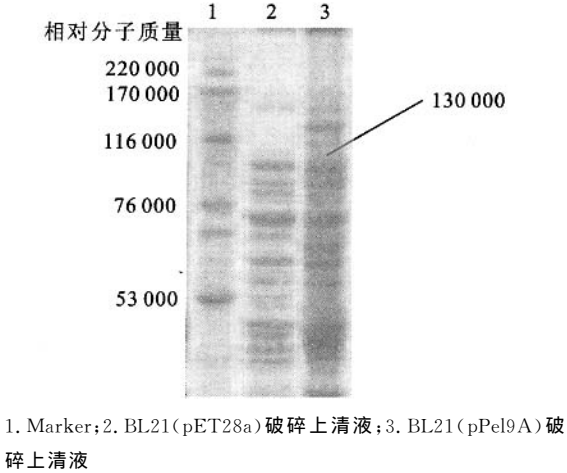


图 7 SDS-PAGE 蛋白电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE of expressed protein

3 结 论

作者利用 PCR 方法从耐热梭状芽孢杆菌 (*Clostridium stercorarium*) 中成功克隆出全长为 3 700 bp 的耐高温果胶酶编码基因 *pel9A*, 并将其插入到表达载体 pET-28a 中, 构建重组质粒 pPel9A。将重组质粒 pPel9A 成功转化大肠杆菌宿主 *E. coli* BL-21, 在 IPTG 的诱导下成功表达重组耐热梭状芽孢杆菌耐高温果胶裂解酶。诱导后的粗酶液果胶去除率为 81%。

(责任编辑:李春丽)