

文章编号: 1673-1689(2011)02-0234-05

# 三聚氰胺脱氨酶基因克隆表达及活性测定

涂追<sup>1,2</sup>, 许杨<sup>\*1,2</sup>, 季艳伟<sup>1,2</sup>, 陶勇<sup>2</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西南昌 330047)

**摘要:** 从载体 pUC57-MDA 中获得经过大肠杆菌密码子偏好性优化的三聚氰胺脱氨酶编码基因, 将该基因连接至表达载体 6HisT-pRSET 中, 构建了重组表达质粒 6HisT-pRSET-MDA, 将其转化大肠杆菌 BL21(DE3), 得到重组工程菌 BL-MDA 并进行诱导表达, 利用 SDS-PAGE 对表达产物进行分析并测定酶活性。SDS-PAGE 电泳分析结果显示, 表达上清液在 53 000 处有明显的蛋白质条带, 与理论相对分子质量的吻合, 其脱氨酶活性达 5.61 U。

**关键词:** 三聚氰胺; 脱氨酶; 大肠杆菌; 重组蛋白

中图分类号: Q 814

文献标识码: A

## Cloning, Expression and Characterization of Recombinant Melamine Deaminase in *E. coli*

TU Zhui<sup>1,2</sup>, XU Yang<sup>\*1,2</sup>, JI Yanwei<sup>1,2</sup>, TAO Yong<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The melamine deaminase gene MDA with optimized codon usage was obtained from vector pUC57-MDA, and subcloned into the expression vector 6HisT-pRSET generating recombinant expression vector 6HisT-pRSET-MDA. The recombinant strain BL-MDA was generated after 6HisT-pRSET-MDA was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Expression of BL-MDA was analyzed by SDS-PAGE and the activity of recombinant enzyme was determined by indophenol blue spectrophotometric method.

**Key words:** melamine, deaminase, *Escherichia coli*, recombinant protein

三聚氰胺 (melamine) 是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, 简称三胺, 学名三氨基三嗪, 别名密胺、氰尿酸胺、三聚酰胺, 分子式  $C_3N_3(NH_2)_3$ , 相对分子质量 126.12, 化学结构见图 1<sup>[1]</sup>, 其含氮量高达

66.6%。

在食品以及饲料行业, 目前常用的测定蛋白质的方法为凯氏定氮法, 该方法通过测定总氮来估算蛋白质质量分数, 测定结果包含了蛋白质来源的氮

收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA10Z427)。

作者简介: 涂追(1982-), 男, 重庆人, 食品生物技术博士研究生。Email: tuzhui@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 许杨(1951-), 女, 安徽安庆人, 德国博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物及食品技术方面的研究。Email: xuyang1951@yahoo.com.cn

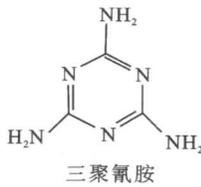


图 1 三聚氰胺化学结构

Fig. 1 Structure of melamine

和非蛋白质来源的氮。近年来,不法分子将三聚氰胺添加到乳品和饲料等产品中,利用三聚氰胺含氮量高的性质,使得测定的蛋白质含量高于实际值。因此,建立一种快速、简便、灵敏、低成本的检测方法是遏制此类事件发生的重要手段。

作者在大肠杆菌中表达了三聚氰胺脱氨酶,并采用靛酚蓝分光光度法测定了该酶的活性,为进一步开发三聚氰胺快速检测试剂奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3), 表达质粒 6HisT-pRSET 以及带有三聚氰胺脱氨酶基因的质粒 pUC57-MDA: 由作者所在实验室保存<sup>[2-3]</sup>。各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶、核酸相对分子质量标准、质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒等: 购自 TaKaRa 公司; 蛋白质相对分子质量标准、IPTG、琼脂糖等: 购自 BBI 公司; 蛋白胨、酵母提取粉: 购自 OXOID 公司; 三聚氰胺、苯酚、亚硝基铁氰化钠: 均为分析纯, 购自国药集团; 其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养基

1) LB 培养基: NaCl 1.0 g/dL, 蛋白胨 1.0 g/dL, 酵母膏 0.5 g/dL, 用 10 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0, 121 °C 高压灭菌 20 min。

2) LBA 培养基: 含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基。

1.2.2 载体构建 质粒的提取, DNA 片段的回收分别参照试剂盒说明书进行。DNA 的酶切、连接、转化均参照文献[4]进行。随机挑选 LBA 平板上的转化子单菌落接种于 LBA 液体培养基中培养, 提取重组质粒进行酶切鉴定。将鉴定为阳性克隆质粒转入 BL21(DE3) 中进行表达。

1.2.3 诱导表达及粗酶提取方法 挑取 LBA 平板上的转化子单菌落接入 4 mL LBA 液体培养基中, 37 °C、250 r/min 振荡培养 12 h; 以 1% 的接种体积分数将其转接到 50 mL LBA 液体培养基中,

37 °C、250 r/min 振荡培养至 OD600 达到 0.5 (约需 2.5 ~ 3 h) 后, 加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG, 30 °C、200 r/min 诱导培养。

诱导培养物 8 000 r/min 离心, 细胞沉淀加入 20 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 混匀, 8 000 r/min 离心, 去上清液, 保留细胞沉淀; 细胞沉淀加入 10 mL 相同缓冲液, 混匀, 冰上超声波细胞破碎处理, 超声破碎条件为 200 W 破碎 2 s, 间歇 3 s, 共 240 个循环, 在 4 °C 下对细胞破碎物于 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 加入终浓度为 30% 的甘油, 混匀, 保存于 -20 °C 冰柜待用。

1.2.4 三聚氰胺脱氨酶活性测定 脱氨酶活性测定以及相关试剂的配置参照文献[5-6]进行, 并做如下改动: 精确称取 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶于超纯水, 配置质量浓度分别为 750、600、450、300、150  $\mu$ g/mL 的标准溶液。按表 1 进行工作曲线的制作以及三聚氰胺脱氨酶活性的测定。

表 1 三聚氰胺脱氨酶活性测定步骤

Tab. 1 Procedure for melamine deaminase determination

试剂	测定管	对照管	标准管	空白管
粗酶液体积/ $\mu$ L	20	20		0
硫酸铵标准液体积/ $\mu$ L			20	
超纯水体积/ $\mu$ L			250	270
三聚氰胺溶液体积/ $\mu$ L	250			
37 °C, 水浴 15 min				
酚试剂体积/mL	1.0	1.0	1.0	1.0
三聚氰胺溶液体积/ $\mu$ L		250		
次氯酸钠试剂体积/mL	1.0	1.0	1.0	1.0

按照表 1 依次加入各种试剂, 充分混合后放入 37 °C 水浴显色 20 min, 分光光度计测定 630 nm 吸光度, 测定管吸光度减去对照管吸光度所得的吸光度值, 对照标准曲线得到脱氨反应产生的氨态氮质量  $X$  ( $\mu$ g), 按照如下公式计算酶活:

$$\text{酶活}(\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})) = (X \mu\text{g}/15\text{min}) \times (1/0.02 \text{ mL}) = X/0.3$$

酶活性单位定义 (U): 1 mL 酶液在 37 °C 与底物作用 1 min 产生 1  $\mu$ g 氨为 1 个酶活性单位。

## 2 实验结果

### 2.1 表达载体的构建

用限制性内切酶 NdeI 和 BamHI 双酶切含有三聚氰胺脱氨酶编码基因的质粒 pUC57-MDA, 琼脂糖凝胶电泳回收 1 424 bp 的片段, 将该片段与经

同样限制性内切酶酶切的表达质粒片段连接、转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 得到重组质粒 6HisT-pRSET-MDA, 见图 2。

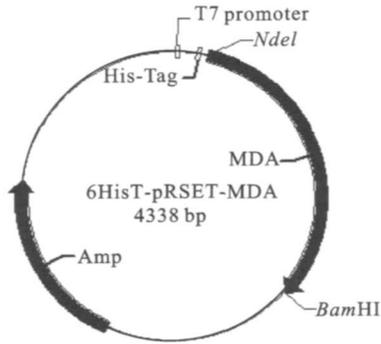
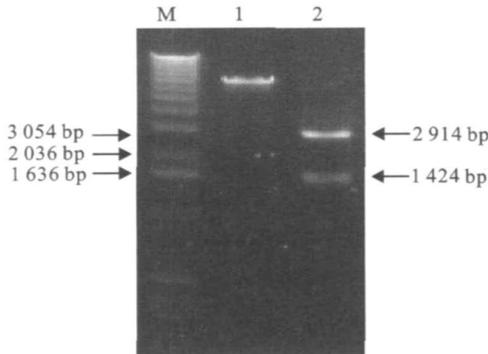


图 2 重组表达质粒 6HisT-pRSET-MDA 图谱

Fig. 2 Structure of recombinant expression vector 6HisT-pRSET-MDA

重组质粒 6HisT-pRSET-MDA 酶切鉴定见图 3。结果显示, 酶切产物长度为 1 424 bp 和 2 914 bp, 与预期的长度一致。将鉴定为阳性的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取单菌落进行诱导表达, 表达菌株命名为 BL-MDA。



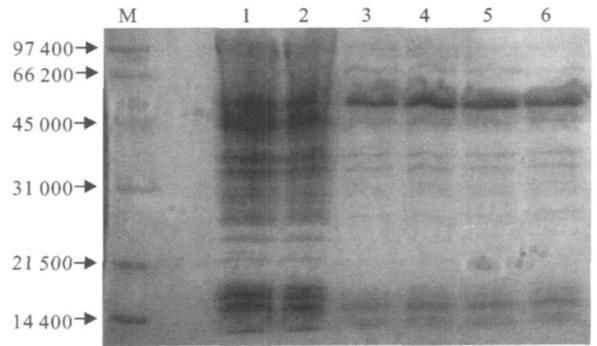
M: DNA marker; 1: 6HisT-pRSET-MDA; 2: 6HisT-pRSET-MDA/NdeI + BamHI

图 3 重组质粒 6HisT-pRSET-MDA 酶切鉴定电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digested 6HisT-pRSET-MDA

### 2.2 IPTG 诱导时间对重组三聚氰胺酶表达水平的影响

按照 1.2.3 的方法, 加入 IPTG 后分别培养 2、3、4、5 h 取样, 取 10  $\mu$ L 未经超声波破碎的菌悬液与等体积 2 $\times$  上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min, 然后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果见图 4。在 53 000 处有明显的蛋白质条带, 与重组三聚氰胺脱氨酶理论相对分子量 (52 606.31) 吻合。当诱导 2 h 时就已经有大量目的蛋白质产生, 因此, 后续实验选择诱导时间为 2 h。



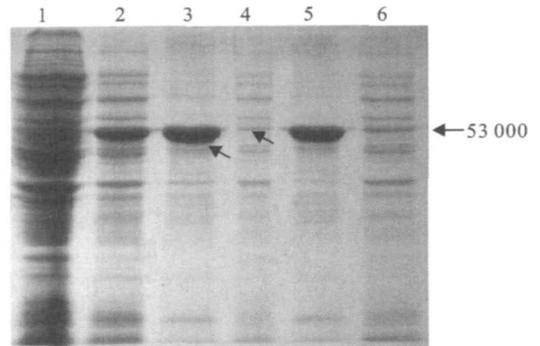
M: 低相对分子质量蛋白质标准; 1: BL21(DE3) 菌体; 2: BL-MDA 未诱导菌体; 3~6: BL-MDA 分别诱导 2、3、4、5 h 菌体

图 4 BL-MDA 不同诱导时间的 SDS PAGE 分析

Fig. 4 SDS PAGE analysis of MDA expression in E. coli

### 2.3 重组蛋白质可溶性分析

分别从 LBA 平板上挑取两个单菌落, 按照 1.2.3 的方法进行诱导表达, 对诱导 2 h 后的菌体进行了超声破碎, 分别取经超声波破碎高速离心后得到的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 5。重组蛋白质大部分分布于沉淀中, 上清液也存在明显的重组蛋白质条带。



1: BL-MDA 未诱导菌体; 2: BL-MDA 诱导 2 h 菌体; 3: BL-MDA 单菌落 A 诱导 2 h 超声波破碎沉淀; 4: BL-MDA 单菌落 A 诱导 2 h 超声波破碎上清液; 5: BL-MDA 单菌落 B 诱导 2 h 超声波破碎沉淀; 6: BL-MDA 单菌落 B 诱导 2 h 超声波破碎上清液

图 5 重组蛋白可溶性分析

Fig. 5 Solubility analysis of the recombinant protein

### 2.4 三聚氰胺脱氨酶活性测定

2.4.1 测定波长的确定 按照 1.2.4 的方法, 用紫外可见分光光度计对已经显色完毕的溶液在 400 ~ 800 nm 波长范围扫描, 见图 6。结果显示不同浓度的氨, 经反应后所生成的显色物质在 630 nm 处有最大吸收峰, 因此选择 630 nm 为检测波长。

2.4.2 氨态氮标准曲线的制作及酶活测定 按照表 1 中标准管列分别加入不同浓度的标准溶液, 反应后测定 630 nm 波长的吸光值, 以标准氨态氮量为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 见图 7。

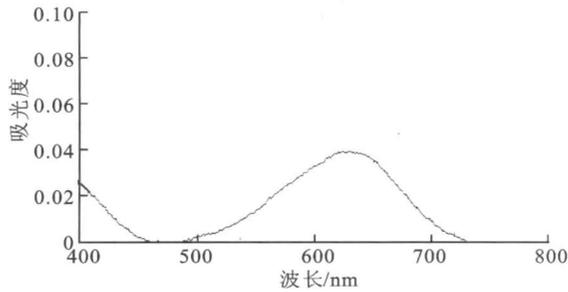


图 6 靛酚蓝法显色液吸收波长扫描曲线

Fig. 6 Wavelength scanning of indophenol blue reaction

方程为  $y = 0.0044x (\mu\text{g}) + 0.0012$ ,  $R^2 = 0.9919$ , 表明其线性相关性较好。

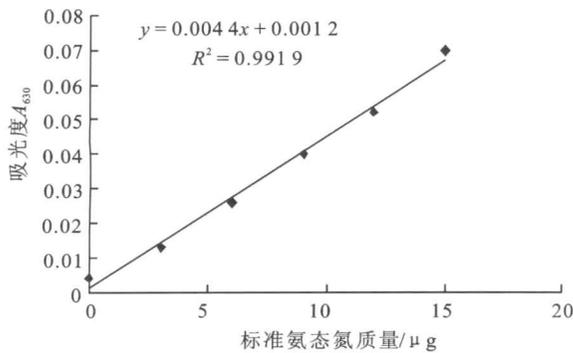


图 7 氨态氮标准曲线

Fig. 7 Standard curve of ammonium nitrogen assay

按照 1.2.4 中所述方法, 分别测定沉淀和上清液的酶活性, 结果显示, 沉淀没有三聚氰胺脱氨酶的催化活性, 而表达上清液具有催化三聚氰胺脱氨酶的活性, 其酶活性为 5.61 U。

### 3 结 语

Seffernick 等从假单胞菌 NRRL B-12227 中克隆获得了三聚氰胺脱氨酶的编码基因并在大肠杆菌中进行了表达, 该基因全长 1425 bp (GenBank 登录号 AF312304), 编码 475 个氨基酸<sup>[3]</sup>。本研究

基于该序列, 根据大肠杆菌密码子使用偏好性对该序列进行了修饰<sup>[7]</sup>, 将修饰过的 DNA 片段克隆至具有强启动子的表达载体, 实现了三聚氰胺脱氨酶在大肠杆菌中高效表达, 细胞经超声波破碎后的上清液具有酶活性。

大量目的蛋白质存在于沉淀之中, 表达菌株 BL-MDA 在诱导后很短的时间内表达出了大量的重组蛋白质, 合成速率过快, 多肽不能正确折叠而凝集成非水溶、无活性的包涵体。通过优化诱导物浓度, 诱导培养温度等参数可以提高可溶性重组蛋白质的表达量<sup>[8-9]</sup>。

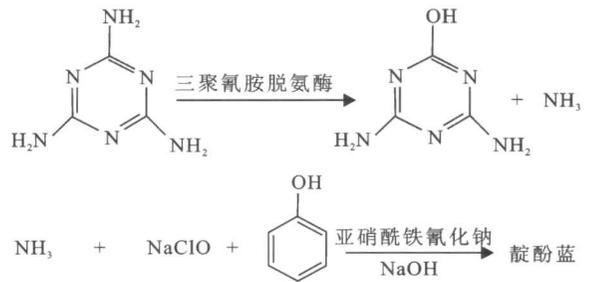


图 8 酶活性测定原理

Fig. 8 Principle of enzyme activity assay

酶活性测定原理见图 8。首先三聚氰胺脱氨酶特异性地催化三聚氰胺分解为 ammeline 和  $\text{NH}_3$ , 然后采用靛酚蓝显色反应测定释放出的  $\text{NH}_3$ , 通过测定单位时间内释放出的  $\text{NH}_3$  量来计算三聚氰胺脱氨酶的活性。

$\text{NH}_3$  的测定方法较多, 如纳氏试剂法, 靛酚蓝显色法, 亚硝酸法, 酶法、微传感器法和试纸条比色法等。靛酚蓝分光光度法测量氨含量具有准确、稳定、安全的特点<sup>[10]</sup>。在医学领域, 靛酚蓝分光光度法常作为转氨酶的活性测定方法<sup>[5]</sup>。基于酶催化反应的特异性, 本研究获得的三聚氰胺脱氨酶可以用于开发三聚氰胺检测试剂, 目前相关研究工作正在进行中。

### 参考文献(References):

- [1] 王永勤, 林梅英, 栾淑芹. 食品中三聚氰胺几种检测方法的进展分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 1190-1192. WANG Yong qin, LIN Hai ying, NU AN Shu qin. Progress of determination methods of melamine in foodstuffs[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2009, 19(5): 1190-1192. (in Chinese)
- [2] Wu C F, Xu Y, Tao Y, et al. Establishment of hypoglycemic agent screening method based on human glucokinase[J]. **Biomed Environ Sci**, 2009, 22(1): 62-69.
- [3] Seffernick J L, De Souza M L, Sadowsky M J, et al. Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98% identical but functionally different[J]. **Journal of Bacteriology**, 2001, 183(8): 2405-2410.
- [4] Sambrook J., Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] 何战胜, 邓健, 许金生, 等. 催化光度法测定体液腺苷脱氨酶的活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 546-547.

- HE Zharr sheng, DENG Jian, XU Jir seng, et al. Determination of adenosine deaminase activity in body fluids by catalytic spectrophotometry [ J ]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, 2005, 15(5): 546- 547. ( in Chinese)
- [ 6 ] GB/T 14679- 93. 气质量 氨的测定 次氯酸钠 水杨酸分光光度法[S]. 1994.
- [ 7 ] Gustafsson C, Govindarajan S and Minshall J. Codon bias and heterologous protein expression [ J ]. **Trends in Biotechnology**, 2004, 22( 7 ): 346- 353.
- [ 8 ] 白剑宇,周晨妍,王瑾,等. 宇佐美曲霉木聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达与优化[J]. 食品工业科技,2007,28(6):100-103.
- BAI Jiar yu, ZHOU Chen yan, WANG Jin, et al. Expression of xylanase gene xyn II from *Aspergillus usamii* E001 in *Escherichia coli*[ J ]. **Science and Technology of Food Industry**, 2007, 28(6): 100- 103. ( in Chinese)
- [ 9 ] 徐娴,谢承佳,何冰芳. 枯草芽孢杆菌葡萄糖脱氢酶基因的克隆及高效表达[ J ]. 食品与生物技术学报, 2007, 26( 5 ): 75- 78.
- XU Xian, XIE Cheng jia, HE Bing fang. Cloning and effective expression of glucose dehydrogenase gene from *Bacillus subtilis* in *E. coli*[ J ]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(5): 75- 78. ( in Chinese)
- [ 10 ] 侯书平,孙秀萍,袁连宝. 室内空气中氨的检测方法分析比较[J]. 计量与测试技术, 2008, 35(9): 79- 80.
- HOU Shu ping, SUN Xiu ping, YUAN Lian bao. Analysis and contrast to methods for determination of ammonia in air [ J ]. **Metrology & Measurement Technique**, 2008, 33( 9 ): 79- 80. ( in Chinese)

## 《食品与生物技术学报》征稿、征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为CSCD核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外10余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》,双月刊,A4(大16K)开本,160页,全年6期,每册定价15.00元,邮发代号:28-79,全国各地邮局均可订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部