

文章编号:1673-1689(2011)06-0940-05

海栖热袍菌 α -葡萄糖苷酶基因 *aglA* 的 克隆、表达及酶学性质

王月宏¹, 段作营¹, 邵蔚蓝², 李华钟^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214222; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 主要研究了在大肠杆菌中克隆和表达海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的一个 α -葡萄糖苷酶(TM1834)。通过 PCR 方法克隆编码 *T. maritima* 的一个 α -葡萄糖苷酶基因 *aglA*, 构建重组质粒 pHsh-AglA, 电击转化 *Escherichia coli* JM109, 通过热激诱导高效表达。SDS-PAGE 检测出蛋白相对分子质量约 55 000, 经热处理, 阴离子交换层析和疏水层析纯化后的 α -葡萄糖苷酶最适反应温度为 90 °C, 最适反应 pH 为 7.5, 在 pH 6.5~8.5, 温度 65~100 °C 之间酶活仍达到 50% 以上。在辅助因子 NAD⁺, Mn²⁺ 和还原剂 DTT 的存在条件下达到最高酶活。

关键词: α -葡萄糖苷酶; 海栖热袍菌; NAD⁺; 酶学性质

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Expression and Characterization of a Thermostable α -Glucosidase from Hyperthermophile, *Thermotoga maritima*

WANG Yue-Hong¹, DUAN Zuo-ying¹, SHAO Wei-Lan², LI Hua-Zhong^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214036, China; 2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: A thermostable α -glucosidase gene *aglA* (TM1834) from a hyperthermophile bacterium, *Thermotoga maritima*, was expressed in *Escherichia coli* JM109 using the new heat-shock expression vector pHsh. The recombinant α -glucosidase *aglA* was purified by heat treatment, ion exchange chromatography, and hydrophobic chromatography, and had a molecular weight of 55 kDa as indicated by SDS-PAGE analysis. The optimum pH and temperature for this enzyme was pH 7.5 and 90 °C, respectively. More than 50% was detected at pH values between 6.5 and 8.5 and temperatures between 65 °C and 100 °C. The maximal *aglA* activity was observed in the presence of cofactor NAD⁺, Mn²⁺, and DTT.

Key words: α -glucosidase, *Thermotoga maritima*, NAD⁺, characterization

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2006220)。

作者简介: 王月宏(1983—), 女, 江苏仪征人, 发酵工程博士研究生, 主要从事工业微生物及生物制药研究。

Email: wyhredmoon@126.com

* 通信作者: 李华钟(1958—), 男, 山东龙口人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物及生物制药研究。

Email: hzhli@jiangnan.edu.cn

α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, EC 3. 2. 1. 20)又叫 α -D-葡萄糖苷水解酶,它可以从低聚糖类底物的非还原末端切开 α -1, 4 糖苷键,释放出葡萄糖,或将游离出的葡萄糖残基转移到另一糖类底物形成 α -1, 6 糖苷键,从而得到非发酵性的低聚异麦芽糖或糖酯、糖肽等^[1-5]。 α -葡萄糖苷酶广泛分布,几乎存在于所有生物体内,在人类的糖原降解和动物、植物以及微生物的糖代谢中具有重要的生理功能^[4-8]。

目前越来越多的来源于极端嗜热微生物的 α -葡萄糖苷酶受到了研究和重视,如 *Pyrococcus furiosus* (105 ~ 115 °C), *Sulfolobus solfataricus* (105 °C), *Thermus thermophilus* (85 °C)^[9-11]。

海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)是生长在 55~90 °C 海底火山口的极端嗜热严格厌氧杆状微生物,最适生长温度 80 °C,培养条件极其苛刻,并且细胞产量较低^[12-13]。1999 年海栖热袍菌全基因组序列已经测通并公布。该菌的开放阅读框 TM_1834, TM_0434, TM_1068, TM_0752 均编码 α -葡萄糖苷酶。作者主要报道了 TM_1834 基因的克隆,首次利用 Hsh 热激表达系统在大肠杆菌中表达,并对重组酶进行了分离纯化和酶学性质研究,为该重组酶的后续研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 相对分子质量标准、蛋白质相对分子质量标准 and Pyrobest DNA 聚合酶购自宝生物工程公司(TaKaRa);酵母提取物和胰蛋白酶:购自 OXOID 公司;氨苄青霉素(Ampicillin):购自上海生工生物工程技术有限公司;质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒:购自 Qiagen 公司;引物:上海生工生物技术公司合成;其它生化试剂:购于 Sigma 等公司。

1.2 菌株和质粒

T. maritima MSB8、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、表达质粒 pHsh (中国专利, 200410041636. 7)由作者所在研究室保藏, *E. coli* JM109 购于 Promega 公司。

1.3 培养基和培养条件

T. maritima MSB8 培养基采用改良的 LB 培养基,培养方法参照参考文献^[13],大肠杆菌重组子培养采用含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7. 0)。

1.4 引物设计

按照已公布海栖热袍菌 α -葡萄糖苷酶基因序列^[6]设计引物,委托中科院上海生物工程中心合成。

引物 1: 5'-CTCCATCTGTGAAGATC-3';

引物 2: 5'-CCCCTCGAGTTATCTTCAGAT AATGTT-3',引入 *Xho* I 位点。

1.5 重组质粒 pHsh-AglA 的构建

以提取的 *T. maritima* MSB8 的基因组 DNA 为模板,用高保真性聚合酶 Pyrobest 酶对模板进行扩增(94 °C, 30 s; 46 °C, 80 s; 72 °C, 1. 5 min), 30 个循环后电泳检查。PCR 扩增产物回收参考 Qian-gen PCR 产物纯化试剂盒操作手册。得到 *T. maritima* MSB8 α -葡萄糖苷酶基因 *aglA*。用 *Xho* I 酶切并纯化得到的 α -葡萄糖苷酶基因片段,以适当比例与已经 *Stu* I、*Xho* I 酶切并纯化的 pHsh 载体混合,加入连接酶,16 °C 过夜,转化 *E. coli* JM109 构建含 *T. maritima* MSB8 葡萄糖异构酶基因 *aglA* 的重组质粒 pHsh-AglA。

1.6 α -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的诱导表达

将重组菌接种到 5 mL 氨苄 LB 培养基,在 37 °C 摇床中进行振荡培养至对数期,以 2% 接种量于 50 mL 氨苄 LB 培养基中,先置于 30 °C 摇床,200 r/min 进行振荡培养至 $A_{600\text{ nm}}$ 为 0. 8 时,再迅速移至 42 °C 水浴摇床中继续进行振荡培养热激表达,继续培养 6~8 h 后,8 000 r/min 离心收集菌体,用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7. 0)洗涤菌体 2 次,再用 2. 5 mL 同样缓冲液重悬菌体,超声波破碎细胞后 12 000 r/min 离心,取上清即为重组 α -葡萄糖苷酶粗酶液。

1.7 重组 α -葡萄糖苷酶酶活的测定

将酶液用对硝基酚 α -D-葡萄糖苷(pNPG)为底物测定酶活,总酶活反应体系 200 μ L,其中 10 μ L pNPG(浓度为 0. 1 mol/L),20 μ L MnCl_2 (浓度为 10 mmol/L),20 μ L NAD^+ (浓度为 9 mmol/L),10 μ L DTT(浓度为 1 mol/L),20 μ L Tris-HCl 缓冲液(浓度为 0. 5 mol/L, pH 7)于 80 °C 水浴中保温 5 min,加入 10 μ L 酶液,反应 10 min,取出放在冰上终止反应,立即加入 600 mL 1 mol/L 碳酸钠溶液显色,于 410 nm 测定吸光度。在上述条件下,每分钟水解生成 1 μ mol 对硝基酚所需的酶量为一个酶活力单位。

1.8 重组 α -葡萄糖苷酶的纯化及保存

高温热处理:将粗酶液置于 80 °C 水浴锅中热处理 10 min,随后置于冰上冷却 5 min,12 000 r/min 离心 30 min 去除大热变性杂蛋白。

阴离子交换层析:将热处理酶液经过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后上样于 DEAE Sepharose Fast Flow,由含有 $100\sim 400\ \text{mmol/L}$ NaCl 的样品缓冲液以 $1.5\ \text{mL/min}$ 的速度进行线性洗脱,收集到活力峰后,用质量分数 50% 的硫酸铵沉淀。

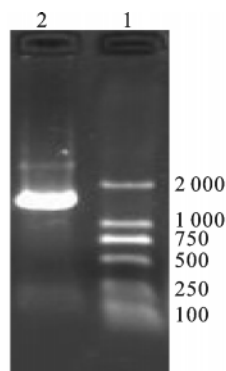
疏水柱层析:输水柱经过 Tris-HCl 缓冲液(浓度为 $0.5\ \text{mol/L}$, pH 7, 质量分数 50% 硫酸铵)平衡后,将上述酶液上柱后,先用含有质量分数 50% 硫酸铵上样缓冲液洗脱未结合蛋白,然后以质量分数 50%~0% 硫酸铵洗脱,收集活力峰。

纯酶的保存:用 $20\ \text{mmol/L}$ 磷酸缓冲液(pH 6.5, 体积分数 20% 甘油, 4°C)透析过夜后,加入适量 DTT、 MnCl_2 和 NAD^+ 后 -20°C 保存。

2 结 果

2.1 α -葡萄糖苷酶基因的克隆、鉴定及表达载体的构建

采用 PCR 技术成功的从 *T. maritima* MSB8 基因组中扩增得到 α -葡萄糖苷酶基因 *aglA* ($1\ 443\ \text{bp}$),见图 1。PCR 产物经过 *Xho* I 酶切后,与经过 *Stu* I 和 *Xho* I 双酶切的 pHsh 质粒以适当比例混合连接,得到含有 α -葡萄糖苷酶基因 *aglA* 的表达载体 pHsh-AglA,转化受体菌 *E. coli* JM109。在 AMP 平板中挑选转化子,进行菌落 PCR 验证。采用 α -葡萄糖苷酶结构基因的上下游引物扩增出大约 $1.5\ \text{kb}$ 的特异性片段(图 2)。



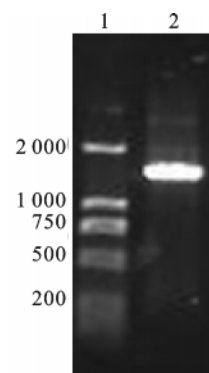
1: DNA marker; 2: α -葡萄糖苷酶基因

图 1 海栖热袍菌 α -葡萄糖苷酶基因的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR results of α -glucosidase gene in *T. maritima*

2.2 α -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达及酶的纯化

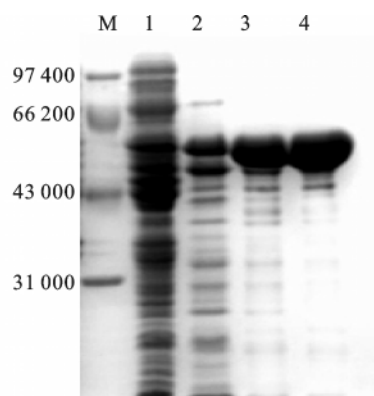
将重组菌株接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基,经 $6\sim 8\ \text{h}$ 热诱导后,离心收集菌体,超声波破碎,离心获得上清可溶性粗酶液,将粗酶液经过 80°C 水浴锅热处理 $10\ \text{min}$,再经过离子交换层析和疏水层析后可以得到电泳纯的酶样品(列 4),见图 3。



1: DNA marker; 2: 菌落 PCR 特异性片段

图 2 重组质粒酶切验证图

Fig. 2 Verification by colony PCR



M: Protein Marker, 1: *E. coli* JM109 重组菌粗酶液, 2: 热处理后上清液, 3: 经过阴离子柱纯化后的蛋白, 4: 经过疏水柱纯化后的蛋白

图 3 重组蛋白纯化过程 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE of purified enzyme from recombined strain

2.3 重组葡萄糖异构酶的酶学性质

2.3.1 NAD^+ 浓度对酶活的影响 反应体系中含有 $1\ \text{mmol/L}$ MnCl_2 和 $50\ \text{mmol/L}$ 的 DTT, 加入不同浓度的 NAD^+ , 计算其相对酶活。结果如图 4, NAD^+ 浓度为 $0.9\ \text{mmol/L}$ 时酶活最高。

2.3.2 金属离子和还原剂 DTT 对酶活的影响 在标准酶反应体系中,用 $5\ \text{mmol/L}$ 各种不同金属离子代替原有体系中的金属离子,测得经过 EDTA 处理过的酶液的酶活力。结果表明,纯化后的 AglA,在没有添加 Mn^{2+} 情况下无法检测到酶活。 Ca^{2+} , Mg^{2+} 或者 Zn^{2+} 的加入只能检测到微量酶活,当 Mn^{2+} 浓度 $1\ \text{mmol/L}$ 时酶活达到最高。当还原剂 DTT 的浓度高于 $50\ \text{mmol/L}$ 时,重组酶的酶活仍然在提高。

2.3.3 最适反应 pH 在不同的 pH 条件下分别测定酶活。结果如图 5,该重组酶最适反应 pH $7\sim 7.5$ 。

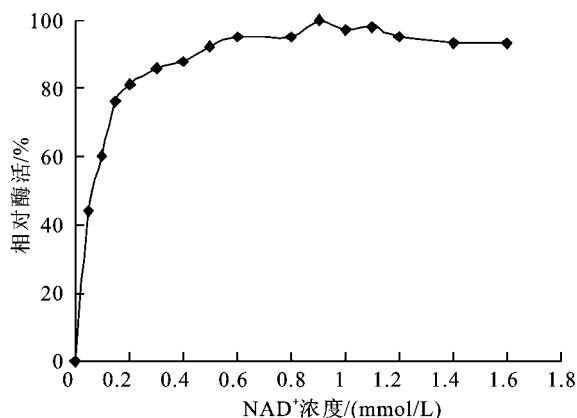
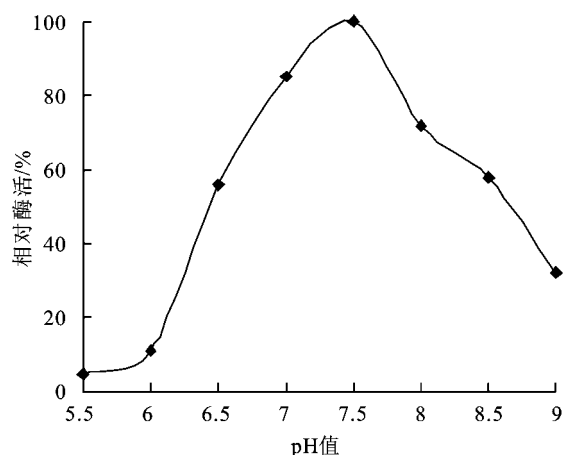
图4 NAD^+ 浓度对酶活的影响Fig. 4 Effect of NAD^+ concentration on the the purified AglA activity

图5 重组酶的最适反应 pH

Fig. 5 Optimum pH of the AglA

2.3.4 最适反应温度 在不同温度下测定酶活,以最高酶活为100%,结果见图6,该重组酶最适温度为90℃。并在75℃和100℃之间仍有80%的活性。

2.3.5 酶的底物专一性 在标准反应条件下,用1 g/dL的不同底物与酶进行反应。该酶能水解 *p*NPG, *p*NP- α -D-Galactoside, 麦芽糖, 异麦芽糖, 麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖, 蔗糖, 海藻糖, 但是不能水解可溶性淀粉。

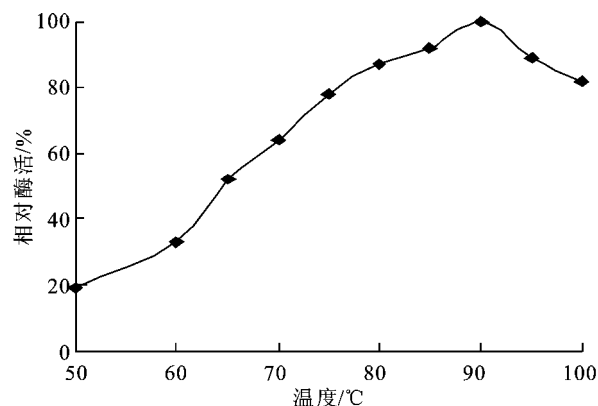


图6 重组酶的最适反应温度

Fig. 6 Optimum temperature of AglA

3 结 语

采用新型的热激表达质粒 pHsh 成功表达了来源于海栖热袍菌的 α -葡萄糖苷酶。pHsh 含有能被大肠杆菌中的 σ^{32} 识别的启动子,作为表达载体的优势在于避免使用了常规的诱导底物 IPTG,在一定程度上减少了成本。

表达的特异蛋白相对分子质量约为55 000,经过纯化后的 α -葡萄糖苷酶无法检测到酶活,在强还原性体系中,加入辅助因子 NAD^+ 以及 Mn^{2+} 后才能检测完全检测到酶活,没有发现其他的金属离子对该酶有较强的激活作用。目前还没有其他来源的 α -葡萄糖苷酶具有此类的特征。该重组酶最适反应温度90℃,最适反应 pH 为7.5。该酶能作用于 *p*NPG,可水解含有 α -1,1, α -1,2, α -1,4 和 α -1,6 的短碳链(≤ 5)糖类底物,不能水解长链大分子如淀粉。同大部分的 α -葡萄糖苷酶一样,该酶水解底物的速度随着底物链长的增加而降低。

实验中的表达产物是胞内酶,增加了后续的分离纯化的步骤和成本,因此在下一步实验中,作者将在分泌型表达载体毕赤酵母中表达胞外酶,以期得到更高的表达水平,为后续酶分子的结构研究以及酶的应用奠定基础。

参考文献(References):

- [1] 胡学智, 凌晨, 武雯, 等. 葡萄糖苷转移酶生产菌种的筛选[J]. 工业微生物, 1998, 28(1): 1-6.
HU Xue-zhi, LING Chen, WU Wen, et al. Studies on the screening of transglucosidase producing strains[J]. *Industrial Microbiology*, 1998, 28(1): 1-6. (in Chinese)
- [2] Akikiko K, Hirokaju M, Akiskige S et al. Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Asperillus niger*[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2327-2335.
- [3] Takewaki S, Kimura A, Kubotra M, et al. Substrate specificity and substrate affinities of honeybee α -glucosidase II [J].

- Biosci Biotech Bioch**, 1993, 57(9): 1508—1513.
- [4] 岳振锋, 陈小霞, 彭志英. α -葡萄糖转苷酶研究现状及进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(3): 63—67.
YUE Zhen-feng, CHEN Xiao-xia, PENG Zhi-ying. Status quo and advance of research on α -glucosidase[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2000, 26(3): 63—67. (in Chinese)
- [5] Chiba S. Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase[J]. **Biosci Biotechl Biochem**, 1997, 61(8): 1233—1239.
- [6] Kobayashi I, Tokuda M, Hashimoto H, et al. Purification and characterization of a new type of α -glucosidase from *Paecilomyces lilacinus* that has transglucosylation activity to produce α -1,3- and α -1,2-linked oligosaccharides[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 2003, 67: 29—35.
- [7] Hung VS, Hatada Y, Goda S, et al. α -Glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the bio-synthesis of complex carbohydrates[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2005, 68(6): 757—765.
- [8] 毕金峰, 魏宝东, 李长彪. 黑曲霉产 α 转移葡萄糖苷酶固态发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 65—68.
BI Jin-feng, WEI Bao-dong, LI Chang-biao. Studies on solid-state fermentation conditions for producing α -transglucosidase from *Asp. Niger*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(2): 65—68. (in Chinese)
- [9] Costantino HR, Brown SH, Kelly RM. Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115 degrees C[J]. **J Bacteriol**, 1990, 172: 3654—3660.
- [10] Martino A, Schiraldi C, Fusco S. Properties of the recombinant α -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing. *Journal of Molecular Catalysis*[J]. **Enzymatic**, 2001, 11: 787—794.
- [11] 刘军, 周成, 马延和等. 嗜热栖热菌 α -葡萄糖苷酶基因的表达及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 232—235.
LIU Jun, ZHOU Cheng, MA Yan-he, et al. Expression and enzymatic characterization of *thermus thermophilus* α -Glucosidase gene[J]. **Microbiology**, 2007, 34(2): 232—235. (in Chinese)
- [12] Wiegel J, Ljungdahl LG. *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium[J]. **Arch Microbiol**, 1981, 128(4): 343—348.
- [13] JIANG Yu, ZHOU Qin, Shao Wei-lan. A highly efficient method for liquid and solid cultivation of the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2006, 259: 254—259.