

海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 胶原蛋白酶的克隆与表达

薛春旭¹, 陈 威², 周宇芳³, 朱 鹏^{*1}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 平阳县海洋与渔业局, 浙江 温州 325400; 3. 浙江省海洋开发研究院, 浙江 舟山 316100)

摘要: 对交替假单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组中潜在的胶原蛋白酶基因进行克隆与表达, 并鉴定重组蛋白 PNJC 的酶活力。根据 NJ631 基因组序列草图, 利用基因组信息发掘方法获得胶原蛋白酶功能提示的编码基因, 进而利用高效表达质粒 pET28a 构建重组表达系统。经 IPTG 诱导表达、亲和层析纯化获得重组蛋白纯化产物。以不溶性 I 型胶原蛋白为底物, 测定胶原蛋白酶活力。对 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组信息挖掘, 从中发现一条疑似编码胶原蛋白酶的基因序列, 命名为 *Pnjc*。该基因全长 1 359 bp, GC 含量 45.62%, 编码由 452 个氨基酸残基组成的约 51 000 大小的胶原蛋白酶。SDS-PAGE 检测表明, 胶原蛋白酶 PNJC 在 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导下得到高效表达。经过亲和层析获得纯化重组蛋白 PNJC, 蛋白质质量浓度约为 1 mg/mL。酶活检测表明, PNJC 的酶活力为 160.34 U/mg, 为标准品的 70.48%。PNJC 高酶活力表明, *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 来源的胶原蛋白酶具有重要的研究价值与工业开发潜力。

关键词: 交替假单胞菌; 胶原蛋白酶; 基因组发掘; 酶活检测

中图分类号: Q 819 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)02—0180—05

Molecular Cloning and Expression of Collagenase Produce by Marine Bacteria *Pseudoalteromonas* sp. NJ631

XUE Chunxu¹, CHEN Wei², ZHOU Yufang³, ZHU Peng^{*1}

(1. School of Marine Sciences Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. PingYang Oceanic & Fishery Bureau, Wenzhou 325400, China; 3. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316100, China)

Abstract: The gene encoding collagenase from *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 was cloned and expressed in *E.coli* cells. Subsequently, the bioactivity of recombinant protein, named PNJC, was assessed. The gene sequence encoding a putative collagenase, designed *Pnjc*, was obtained from the genome of *Pseudoalteromonas* sp. NJ631 using a genome mining approach. The *Pnjc* coding region was amplified and cloned into pET-28a Vector. The plasmids harboring the assembled full-length sequence encoding PNJC were transformed into the *E.coli* cells for the expression of the PNJC protein. The expression and purification of the recombinant protein were carried on according to

收稿日期: 2014-05-30

基金项目: 浙江省公益技术应用研究项目(2012C22068)。

* 通信作者: 朱 鹏(1979—), 男, 山西人, 长治人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事海洋微生物研究。E-mail: zhupeng@nbu.edu.cn

manufacturer's instruction. Finally, the enzymatic activity of collagenase was assessed by using recombinant protein decomposing the type I collagen as substrate. The 1359-bp open reading frame with 45.62% GC was obtained from the genome of *Pseudoalteromonas* sp. NJ631, which was encoded of a protein of 452 amino acids and shared significant homology with the collagenase from the other genera. The PNJC was highly expressed by adding 0.2 mM IPTG. The assay of enzyme activity showed that the enzyme activity of PNJC was 160.34 U/mg, 70.48% of the standard, confirming that the *Pnjc* gene encoded a functional collagenase. This is the first report of the cloning the expression of collagenase from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. The PNJC encoded by *Pnjc* gene from NJ631 showed high bioactivity on decomposing the type I collagen, which are of potential value for the commercial exploitation.

Keywords: *Pseudoalteromonas*, collagenase, genome mining, enzymatic activity

胶原蛋白酶是一类特异性作用于胶原蛋白或其它变性明胶的酶类。它在医学^[1-2]、基础研究^[3]、环境保护^[4]等方面有着重要的研究价值和应用潜力。胶原蛋白酶来源丰富,除动物中发现的胶原蛋白酶外,梭菌、弧菌等微生物也能产生胶原蛋白酶^[5-6]。微生物由于种类多,特异性强,基因资源丰富,具有动物无法比拟的天然优势。微生物来源的胶原蛋白酶的研究开发将为我们筛选酶活更高、特异性更强的潜在工业化的胶原蛋白酶。

基因组测序技术的快速更替带来了基因组数据的爆炸性增长,利用基因组发掘(Genome Mining)方法为胶原蛋白酶编码基因的快速发掘及其功能研究提供了高效平台。Janwiththayanan 等^[7]基于全基因组序列获得细菌胶原蛋白酶基因,利用 RT-PCR 方法体外检测其表达量,验证了胶原蛋白酶在肺出血致病菌的存活与致病性方面起重要的作用。交替假单胞菌属因作为海洋特有菌属而备受关注,其基因组数据库不断得到扩充^[8-9]。目前,交替假单胞菌属基因组中多有胶原蛋白酶这一功能基因的提示,但是相关基因编码的蛋白质是否具有胶原蛋白酶活性未见报道。作者从 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组草图出发^[10],利用基因组发掘方法获得胶原蛋白酶基因,通过原核表达系统获得纯化蛋白并检测其功能活性,以期验证交替假单胞菌属中胶原蛋白酶的活性,为该菌属来源的胶原蛋白酶的深入研究与潜在工业应用价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

海洋细菌交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas*)

NJ631:分离于珍珠膜海绵(*Hymeniacidon perleve*),由宁波大学浙江省海洋生物工程重点实验室保藏;大肠杆菌(*Escherichia coli*)Rosseta(DE3)、质粒 pET28:Novagen 公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)Top10:Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(K1071)、质粒小量提取试剂盒(GK2004):上海捷瑞生物工程有限公司;琼脂糖胶 DNA 回收纯化试剂盒(D6492):Omega 公司;DNA Marker、rTaq 聚合酶、DNA 连接酶:TaKaRa 公司;蛋白质 Marker:碧云天生物技术研究;限制性内切酶 BamHI 和 HindIII:NEB 公司;Ni-NTA agarose:北京康为世纪生物科技有限公司;不溶性 I 型胶原与 I 型胶原蛋白酶标准品:生工生物工程(上海)有限公司;Bio-Rad DC Protein ASSAY 试剂盒:Bio-Rad 公司;其他试剂:均为分析纯试剂;超滤离心管 Amicon Ultra-10:购自 Millipore 公司;纯水制备系统:美国 Pall 公司;台式高速冷冻离心机:Sigma 公司;酶标仪:Thermo 公司;匀浆仪 Precellys 24:Bertin 公司;PCR 仪:杭州博日科技有限公司;凝胶成像系统:上海欧翔科学仪器有限公司。

1.3 主要培养基

2216E 培养基:0.1 g/dL 酵母粉,0.5 g/dL 蛋白胨,0.01 g/dL 柠檬酸铁,过滤海水,用于交替假单胞菌 NJ631 的培养;LB 培养基:1 g/dL 胰蛋白胨,0.5% 酵母粉,1% 氯化钠,用于大肠杆菌 Rosseta(DE3)和 Top10 的培养。

1.4 交替假单胞菌 NJ631 基因组 DNA 抽提

取 1 mL 处于指数生长期的 *Pseudoalteromonas*

sp.NJ631 菌液,按照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取其基因组 DNA。

1.5 基因组中胶原蛋白酶基因的发掘

基于基因组第二代测序技术获得的 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组草图,利用 Glimmer3.0 基因软件预测得到 4658 个开放阅读框(open reading frames, ORFs)。经蛋白质数据库 Blast 比对,获得 ORF 的功能提示^[10],进而发掘潜在的具有胶原蛋白酶功能的编码基因。将基因编码的氨基酸序列提交 NCBI 获得序列登录号,并进行 Blast 比对分析。

1.6 胶原蛋白酶基因的 PCR 扩增

根据胶原蛋白酶基因设计一对引物:P1:5'-CGGGATCCATGTTTGTACCAGAACTTCT-3';P2:5'-CCCAAGCTTTTATGCCTTTTAAAAGGAT-3',下划线分别为限制性内切酶 Bgl II 和 Xho I 的酶切位点,引物由 Invitrogen 公司生产合成。以 NJ631 基因组为模版进行 PCR 扩增,扩增条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,51 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段。

1.7 表达载体的构建

利用限制性内切酶 Bgl II 和 Xho I 分别对表达质粒 pET28a 和胶原蛋白酶基因进行双酶切,回收的酶切片段经 DNA T4 连接酶连接后转化大肠杆菌 *Rosetta*(DE3)感受态细胞。通过菌落 PCR 检测筛选获得阳性转化子,获得重组质粒 pET28a-*Pnjc*。核苷酸序列的测序由 Invitrogen 公司完成。

1.8 胶原蛋白酶的诱导表达与纯化

过夜培养的重组表达菌液按 1%接种体积分数转接到 20 mL 含卡那霉素(25 μg/mL)的 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养。当 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,添加 IPTG 至终浓度分别为 0.2、1 mmol/L,于 28 ℃、120 r/min 条件下诱导表达 4 h。培养基经离心后收集菌体,利用 buffer A (25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 400 mmol/L NaCl, 体积分数 10%甘油)进行重悬。菌体细胞经匀浆仪破碎后离心,分别收集上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。胶原蛋白酶的纯化参考 McQuade 等方法^[11],获得的纯化蛋白质经超滤离心管浓缩后测定蛋白质浓度并进行 SDS-PAGE 检测。

1.9 胶原蛋白酶活性检测

以不溶性 I 型胶原蛋白为底物,采用茚三酮显

色法^[12]测定胶原蛋白酶 PNJC 水解底物释放的水溶性氨基酸和短肽。反应体系:0.1 mL 酶液,0.5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 50 mmol CaCl₂, pH 7.5),不溶性 I 型胶原 1 mg。37 ℃ 孵育 30 min,加入 0.6 mL 10%的三氯乙酸(TCA)终止反应。反应物 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.6 mL 并加入 0.6 mL 2 mol/L 乙酸缓冲液(pH 5.4)及 0.6 mL 茚三酮显色溶液,充分混合后,100 ℃ 水浴加热 15 min,冰水冷却 5 min,经 60%乙醇稀释后于 570 nm 处测定吸光值。以不加目的蛋白质作为阴性对照,胶原蛋白酶标准品作为酶活反应的阳性对照,每组反应均重复 3 次。以甘氨酸为标准制作标准曲线。

酶活力定义为:在 37 ℃, pH 值 7.5 条件下,每分钟水解胶原蛋白产生相当于 1 μg 甘氨酸的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

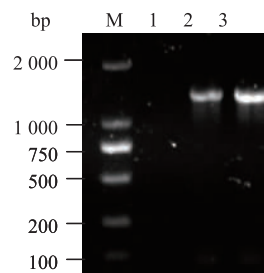
2 结果与讨论

2.1 NJ631 基因组中胶原蛋白酶基因的发掘

根据 ORF 的基因功能提示,我们发现 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组中含有一条完整的胶原蛋白酶编码基因,命名为 *Pnjc*。该基因全长 1 359 bp, GC 含量 45.62%,编码由 452 个氨基酸残基组成的约 51 000 大小的胶原蛋白酶。经 Blast 比对分析发现,该基因编码的胶原蛋白酶 PNJC 与同属中的蛋白酶相似性均在 85% 以上,其中与 *Pseudoalteromonas piscicida* 中的蛋白酶相似性最高,达到 99%。

2.2 重组表达载体 pET28a-PNJC 的构建

利用带有酶切位点的引物对进行 PCR 扩增结果显示,扩增片段大小与交替假单胞菌 NJ631 中胶原蛋白酶编码基因 *Pnjc* 的序列大小相符,见图 1,表明成功获得 *Pnjc* 基因片段。



M: DNA marker; 1: PCR 阴性对照; 2~3: *Pnjc* DNA 片段扩增

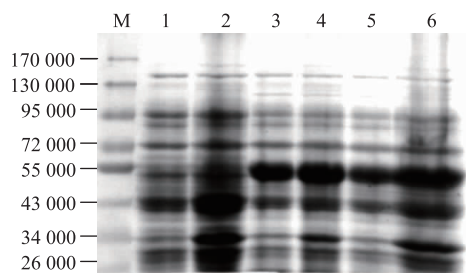
图 1 胶原蛋白酶编码基因 *Pnjc* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Pnjc* DNA fragment

将 *Pnjc* 与表达载体 pET28a 分别经限制性内切酶酶切后,回收酶切片段。经转化、菌落 PCR 检测,筛选获得重组转化子。测序结果显示 pET-28a 在酶切位点 Bgl II 和 Xho I 之间成功插入 *Pnjc* 基因片段且无突变点。

2.3 重组蛋白的诱导表达与重组蛋白纯化

以 pET-28a 为表达载体,经 IPTG 诱导表达后发现重组蛋白 PNJC 在大肠杆菌 *Rosetta*(DE3)中得到高效表达,见图 2。在 51 000 附近有明显蛋白质条带,与胶原蛋白酶 PNJC 大小相符。PNJC 在 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L 时的表达量与 1 mmol/L IPTG 诱导下的表达量相当。细胞裂解液上清液与沉淀的分析结果表明,可溶性重组蛋白 PNJC 表达显著。



M:Markers;1:未诱导的 pET28a-PNJC 转化子的细胞裂解上清液;2:未诱导的 pET28a-PNJC 转化子的细胞裂解沉淀;3:0.2 mmol/L IPTG 诱导的 pET28a-PNJC 转化子的细胞裂解上清液;4:0.2 mmol/L IPTG 诱导的 pET28a-PNJC 转化子的细胞裂解沉淀;5:1 mmol/L IPTG 诱导的 pET28a-PNJC 转化子的细胞裂解上清液;6:1 mmol/L IPTG 诱导的 pET28a-PNJC 转化子的细胞裂解沉淀。

图 2 重组蛋白 PNJC 的诱导表达与 SDS-PAGE 检测

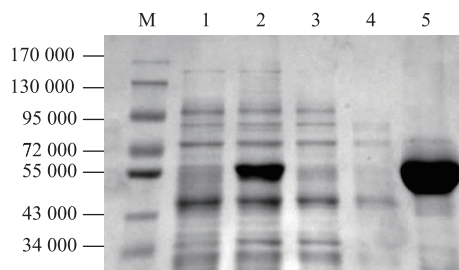
Fig. 2 Heterogeneous expression of PNJC in Rosetta

将含有重组蛋白 PNJC 的细胞裂解上清液上样 Ni-NTA 琼脂糖凝胶纯化柱,利用 PNJC 碳端带有组氨酸标签对其进行亲和层析纯化,通过梯度洗脱获得纯化重组蛋白质。SDS-PAGE 检测表明,成功获得纯化的胶原蛋白酶 PNJC,见图 3。经蛋白质定量试剂盒检测显示纯化得到的胶原蛋白酶 PNJC 蛋白质质量浓度约为 1 mg/mL,可进行该酶的酶活测定。

2.4 胶原蛋白酶酶活测定

以不溶性 I 型胶原蛋白为底物,测定纯化得到的胶原蛋白酶 PNJC 的酶活活性。结果显示,相较于 I 型胶原蛋白酶标准品 227.51 U/mg 的酶活活性,PNJC 表现出 160.34 U/mg 的酶活活性,为标准品的 70.48%,见表 1。这意味着 *Pseudoalteromonas* sp.

NJ631 来源的胶原蛋白酶 PNJC 具有一定的研究价值与工业开发潜力。



M:Markers;1:未诱导组的细胞裂解上清液;2:0.2 mmol/L 诱导的细胞裂解上清液;3:流穿液;4:杂蛋白质清洗;5:纯化的目的蛋白。

图 3 重组胶原蛋白酶 PNJC 的纯化

Fig. 3 Purified recombinant collagenase PNJC

表 1 胶原蛋白酶 PNJC 的底物活性检测

Table 1 Enzymatic activity of collagenase PNJC

底物	胶原蛋白酶	酶活力/(U/mg)
I 型不溶性胶原蛋白	I 型胶原蛋白标准品	227.51
—	PNJC	160.34

本研究中 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组中胶原蛋白酶编码基因 *Pnjc* 已提交 NCBI,并获得序列登录号:KF439859

3 结 语

胶原蛋白酶的重要应用价值使其备受关注。本研究首次基于 *Pseudoalteromonas* sp.NJ631 基因组草图,利用基因组信息发掘方法获得胶原蛋白酶编码基因 *Pnjc*,并通过异源表达与亲和层析纯化获得重组蛋白 PNJC。胶原蛋白酶 PNJC 的酶活力为 160.34 U/mg,达到胶原蛋白酶标准品的 70.48%,具有重要的研究开发价值。异源表达系统诱导条件的优化、重组蛋白纯化方法的改进、氨基酸位点的突变将有助于我们获得高质量的具有生物活性的重组蛋白 PNJC,为首个交替假单胞菌属来源的胶原蛋白酶的工业化生产奠定坚实的基础。

目前,NCBI 数据库已收录超过 7 000 个物种的基因组数据,其中细菌来源的基因组数据约 4 500 个,后基因组时代已经到来。较真核生物而言,细菌具有无可比拟的优势,细菌丰富的基因资源为潜在的功能蛋白质的发掘与新型化合物的指导发现提供了充足的数据资源。而基因组信息发掘方法为如

何利用细菌基因组资源获得目的基因提供了思路,避免了通过构建基因组文库获得目的基因的传统方法^[6],达到快速筛选、节约时间、提高效率的目的。Rainbow 等从类鼻疽杆菌基因组数据库中发掘到一条胶原蛋白酶的编码基因,通过基因克隆、异源表

达与酶活检测验证了该基因编码蛋白具有明胶酶与胶原蛋白酶活性^[13]。以细菌基因组为基础,借助基因组发掘技术将有助于我们快速获得更加高效、工业化开发潜力的胶原蛋白酶。

参考文献:

- [1] Cakir M, Tekin A, Kucukkartallar T, et al. Effectiveness of collagenase in preventing postoperative intra-abdominal adhesions[J]. **International Journal of Surgery**, 2013, 11(6):487-491.
- [2] Torrai Bou JE, Paggi B. Collagenase and devitalized tissue in the framework of the wound bed preparation [J]. **Revista de Enfermería**, 2013, 36(2):37-42.
- [3] Leonardi R, Caltabiano R, Loreto C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions; an immunohistochemical study [J]. **European Society of Endodontology**, 2005, 38(5):297-301.
- [4] 赵海霞, 赵培培, 吴小峰, 等. 短小芽孢杆菌胶原蛋白酶基因 *cola* 的克隆及序列分析[J]. 四川农业大学学报, 2011, 29(4):524-527.
ZHAO Haixia, ZHAO Peipei, WU Xiaofeng. Cloning and sequence analysis of collagenase gene *Cola* from *Bacillus pumilus* Col-J[J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**, 2011, 29(4):524-527. (in Chinese)
- [5] Eckhard U, Schönauer E, Ducka P, et al. Biochemical characterization of the catalytic domains of three different *Clostridial* collagenases[J]. **Biological Chemistry**, 2009, 390(1):11-18.
- [6] Teramura N, Tanaka K, Iijima K, et al. Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium *Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* 1706B and Its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2011, 193(12):3049-3056.
- [7] Janwiththayan W, Keelawat S, Payungporn S, et al. *In vivo* gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase[J]. **Microbiological Research**, 2013, 168(5):268-272.
- [8] Xie B B, Shu Y L, Qin Q L, et al. Genome sequences of type strains of seven species of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2012, 194(10):2746-2747.
- [9] Ballestrero F, Thomas T, Burke C, et al. Identification of compounds with bioactivity against the nematode *Caenorhabditis elegans* by a screen based on the functional genomics of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* D2 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010, 76(17):5710-5717.
- [10] 陈威, 朱鹏, 何山, 等. 海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. NJ631 中 NRPS 基因簇及核心模件的发掘[J]. 微生物学报, 2012, 52(12):1531-1539.
CHEN Wei, ZHU Peng, HE Shan. Nonribosomal peptides synthetases gene clusters and core domain in *Pseudoalteromonas* sp. NJ631[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2012, 52(12): 1531-1539. (in Chinese)
- [11] McQuade T J, Shallop A D, Sheoran A, et al. A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis[J]. **Analytical Biochemistry**, 2009, 386(2):244-250.
- [12] Sung-II Kang S, Jang YB, Choi YJ, et al. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2005, 10:5935-5998.
- [13] Rainbow L, Wilkinson M C, Sargent P J, et al. Identification and expression of a *Burkholderia pseudomallei* collagenase in *Escherichia coli*. [J]. **Current Microbiology**, 2004, 48(4):300-304.