

分泌表达苹果酸乳酸酶的大肠杆菌系统的构建

王宁宁^{1,2}, 刘瑞^{1,2}, 陈福生^{1,2}, 张秀艳^{1,2*}

(1. 华中农业大学 食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学 环境食品学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 苹果酸乳酸酶(简称苹乳酶)是果酒生产过程中苹果酸乳酸发酵(简称苹乳发酵)的关键酶。为了构建分泌表达苹乳酶的大肠杆菌表达系统,作者通过融合 PCR 将信号肽基因(487 bp)和苹乳酶基因(1 623 bp)的编码序列连接在一起,将融合片段(2110 bp)克隆到表达质粒 pET28a(+)上并转化大肠杆菌,得到阳性克隆子。IPTG 诱导阳性克隆子后可得到相对分子质量约为 60 000 左右的蛋白质,利用 HPLC 可在其发酵上清液中检测到 240.7 mg/L 的 L-乳酸。这说明成功构建了分泌表达苹乳酶的大肠杆菌系统,该菌株的获得将为苹乳酶的研究和应用提供了技术平台。

关键词: 苹果酸乳酸酶;苹乳发酵;分泌表达系统

中图分类号: Q 78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)05—0498—06

Construction of Secretory *Escherichia coli* Expression System of Malolactic Enzyme

WANG Ningning^{1,2}, LIU Rui^{1,2}, CHEN Fusheng^{1,2}, ZHANG Xiuyan^{1,2*}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Malolactic enzyme (MLE) is a key enzyme in malolactic fermentation (MLF) during fruit-wine producing. In order to construct the secretory *Escherichia coli* (*E. coli*) expression system of MLE. The signal peptide gene (487 bp) and the MLE gene (1 623 bp) were combined through fusion-PCR, then the fused fragment was inserted into pET28a (+) and transformed into *E. coli*. 60 000 protein was obtained when the positive strain was cultured and induced with IPTG. 240.7 mg/L L-lactic acids could be detected in the fermentation supernatant with HPLC. All the results indicated the secretory *E. coli* expression system of MLE was successfully constructed. This will provide a technical platform for the research and application of MLE.

Keywords: malolactic enzyme, malolactic fermentation, secretory expression system

收稿日期: 2014-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071588); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2662015PY068)。

* 通信作者: 张秀艳(1973—), 女, 河南南阳人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: xiuyanzhang73@mail.hzau.edu.cn

苹果酸-乳酸发酵(简称苹乳发酵)是果酒生产过程中非常重要的发酵过程,它是在乳酸菌的作用下将酸涩的 L-苹果酸转化成口感柔和的 L-乳酸,并产生 CO_2 ^[1],从而得到预期的酸度,除此之外还具有增加微生物学稳定性、降低生涩味、增加香气、使果酒的口感柔和等作用^[2]。在苹乳发酵过程中,由于果酒的低 pH 值,高 SO_2 浓度,高酒精度等的影响而造成苹乳发酵迟缓,导致生物胺或氨基甲酸乙酯的前体物质等不良代谢产物,甚至导致苹乳发酵终止不彻底而引发生物危害^[3-4]。

针对这一问题,国内外学者开展了系列研究,如向发酵液中加入苹果酸乳酸酶(MLE)^[5],或通过细胞融合构建降酸酿酒酵母^[6-8],或利用基因工程方法构建降酸酿酒酵母等^[9]。但对苹果酸的转化率都不高,这可能是因为 MLE 不能很好地适应果酒的环境。

因此,作者在扩增 MLE 编码序列的基础上,构建分泌型表达 MLE 的大肠杆菌表达系统,为后续 MLE 的酶学性质研究和酶学性质改造奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E.coli* DH5 α , *E.coli* BL21 (DE3), 酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*):作者所在实验室保存;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168):农科院惠赠;pET28a(+):作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 DNA 凝胶回收纯化试剂盒、Easy Taq DNA Polymerase、Trans 2K Plus DNA Marker:北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶(*Nco*I、*Xho*I、*Eco*R I):大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司;T₄DNA 连接酶、dNTPs、RNase:广州东盛生物技术公司;异丙基 β -D-硫代半乳糖甘(IPTG):Sigma 公司;L-乳酸检测试剂盒:Biosentec 公司,其它常规试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基 *E.coli* DH5 α , *E.coli* BL21 (DE3)和枯草芽孢杆菌的保存和培养用 LB 培养基;酒类酒球菌用 ATB 培养基;大肠杆菌阳性转化子用 LB 培养基或含 1% L-苹果酸的 M₉ 培养基培养。

1.2 方法

1.2.1 酒类酒球菌基因组 DNA 的提取, 大肠杆菌质粒 DNA 的提取 参照文献[10]。

1.2.2 PCR 反应条件

1) 苹乳酶基因的 PCR 扩增:根据已报道的酒类酒球菌中苹乳酶基因序列设计引物,引入 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点,上游引物 F (*mle*):5'-CGGAATTCATGACAGATCCAGTAAGT-3',下游引物 R (*mle*):5'-TCGCTCGAGTTAGTATTTTCGG CTCCCAC-3'。PCR 反应程序:94 °C 预变性 4 min, 94 °C 30 s, 58 °C 1.5 min, 35 个循环(两步 PCR 反应);

2) 信号肽基因的 PCR 扩增:根据 NCBI 发布的 *Bacillus subtilis* 168 菌株 β -葡聚糖酶基因序列设计引物,引入 *Nco*I 酶切位点和与苹乳酶基因反向互补的碱基,上游引物 F (sig):5'-CATGCCATGGAAACCTACATTGAGCGGGGAG-3',下游引物 R (sig):5'-TACTTACTGGATCTGTCATTTGAGCTGAGGCAGTAGCAGTG-3'。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min;

3) 信号肽基因和苹乳酶基因的融合 PCR:重新设计苹乳酶基因的上游引物 F (*mle2*):5'-ATGACAGATCCAGTAAGT-3',下游引物仍为 R (*mle*):5'-TCGCTCGAGTTAGTATTTTCGGCTCCCAC -3', 5' 端带有 *Eco*R I 酶切位点 CTCGAG 和保护碱基 TCG。融合 PCR 体系中信号肽基因和苹乳酶(摩尔比)以 1:1 加入 25 μL 反应体系中,反应体系其它成分组成同前。融合 PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 5 min, 72 °C 2 min 30 s, 15 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 DNA 的酶切、连接和测序 酶切和连接按照产品说明书进行,测序工作由南京金斯瑞公司完成。

1.2.4 大肠杆菌的转化和质粒提取 参照文献[10]进行。

1.2.5 大肠杆菌阳性转化子的诱导表达 将活化好的阳性转化子以体积分数 1%接种于 5 mL LB 液体培养基中(含 50 mg/L 卡那霉素), 37 °C、200 r/min 下培养 2~3 h ($\text{OD}_{600\text{ nm}}=0.6\sim0.9$), 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h。取 1 mL 培养液, 12 000 r/min 离心 15 min 后去上清液;加 50 μL 1 $\times$ SDS 上样缓冲液到沉淀中,沸水浴 10 min,离心后的上清液可用于 SDS-PAGE 检测。

1.2.6 阳性转化子产 L-乳酸能力的分析 阳性转化子经 IPTG 诱导后,在培养上清中加入终浓度为 1 mmol/L NAD, 0.5 mmol/L Mn^{2+} , 37 °C 反应 1 h, 取

100 μ L 反应液进行 HPLC 分析。高效液相检测条件: 固定相为 C18-EP 柱; 流动相为 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH 2.5); 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 210 nm。为了测试酶法分析乳酸方法在检测发酵液中苹果酶活性的可行性, 我们同时用乳酸检测试剂盒检测了反应液中乳酸的含量, 检测方法参见 Labarre 等(1996)的方法。

2 结果与分析

2.1 分泌型表达 MLE 的大肠杆菌表达系统构建

通过融合 PCR 将苹果酶基因编码序列 (1 623 bp) 和信号肽序列 (487 bp) 连接, 得到大小为 2 110 bp 的片段, 见图 1。用 *EcoR* I 和 *Nco* I 限制酶切合片段和载体 pET28a(+), 通过 T4 连接酶将酶切片段连接以构建重组载体 pET28a(+)-*mle*, 具体过程见图 2。将重组载体转入大肠杆菌感受态细胞, 并涂在含 50 mg/L 的卡那霉素的 LB 平板上, 筛选阳性转化子。

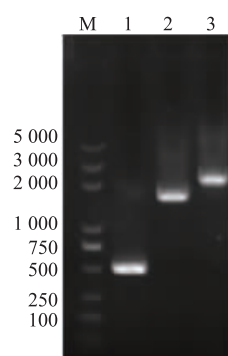


图 1 信号肽和 *mle* 编码序列及其融合片段

Fig. 1 Signal peptide and *mle* encoding sequence and the fused fragment

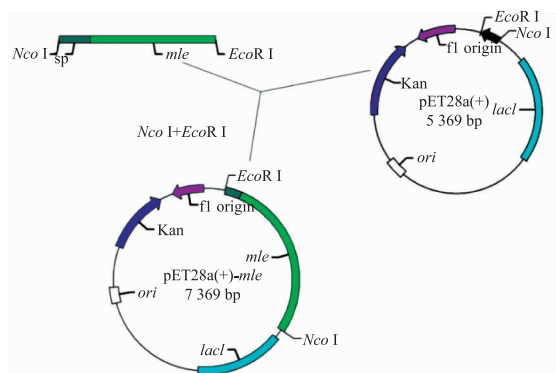
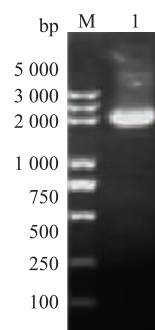


图 2 重组质粒 pET28a(+)-*mle* 构建流程图

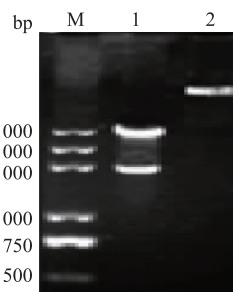
Fig. 2 Flowchart for pET28a(+)-*mle* construction

2.2 阳性转化子的 PCR 和双酶切验证

对筛选到的阳性转化子进行 PCR 和双酶切验证, 以含有 pET28a(+)-*mle* 的菌株作为对照菌株。以 F (*sig*) 和 R (*mle*) 为引物对转化子进行 PCR 验证。结果显示, 在含有重组载体菌株中扩增出大小为 2 110 bp 的片段, 而对照菌株则未扩增出片段, 见图 3。用 *EcoR* I 和 *Nco* I 限制酶对重组载体进行双酶切验证, 结果显示: 重组载体经双酶切后得到了大小为 5 400 bp 和 2 110 bp 的片段, 而未经切割的载体仍为 7 369 bp, 表明已经得到了含有重组载体 pET28a(+)-*mle* 的阳性克隆子。



M: Trans 2K Plus DNA Marker; 1: 信号肽和 *mle* 编码序列的融合片段。
(a) pET28a(+)-*mle* 的 PCR 验证



M: Trans 2K Plus DNA Marker; 1: pET28a(+)-*mle* *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切;
2: pET28a-*mle*。

(b) pET28a(+)-*mle* 的 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切验证

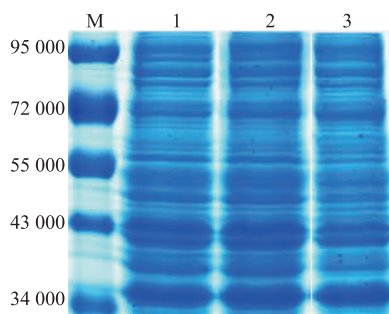
图 3 重组质粒 pET28a(+)-*mle* 的 PCR 和双酶切验证

Fig. 3 Verification of recombinant pET28a (+)-*mle* by PCR and enzyme digestion

2.3 含重组载体 pET28a(+)-*mle* 的大肠杆菌的诱导表达

按照方法 1.2.5 对阳性克隆子进行诱导表达, 并进行 SDS-PAGE。以含有 pET28a(+)-*mle* 的菌株作为对照。结果见图 4。可以看出, 含有 pET28a(+)-*mle* 的 *E. coli* BL21 在经过 IPTG 诱导后得到相对分子质量大小约为 60 000 蛋白质, 与预期大小相符合; 而在未经诱导的含有 pET28a(+)-*mle* 的 *E. coli* BL21, 在经 IPTG 诱导的含有 pET28a(+)-*mle* 的 *E. coli* BL21 和

E.coli BL21 中未发现该蛋白质的表达。这说明分泌型表达苹果乳酶的重组表达系统已经成功构建。



M:Protein Marker;1:*E.coli* BL21;2: 含 pET28a(+) 的 *E.coil* BL21;3: 诱导的含 pET28a(+)-*mle* 的 *E.coil* BL21

图 4 阳性转化子全蛋白质的 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE photograph of whole protein from transformants

2.4 阳性转化子培养上清中产生 L-乳酸的分析

根据方法 1.2.6 用 HPLC 对阳性转化子发酵上清液中的乳酸进行分析,以 *E.coli* BL21 和含 pET28a(+) 的 *E.coli* BL21 作为对照,分析图谱见图 5-8。

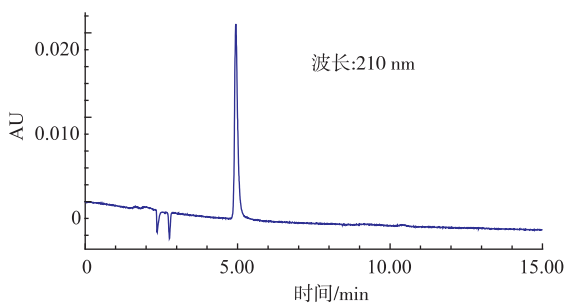


图 5 L-乳酸标准品(200 mg/L)的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of L-lactic acid standard solution(200 mg/L)

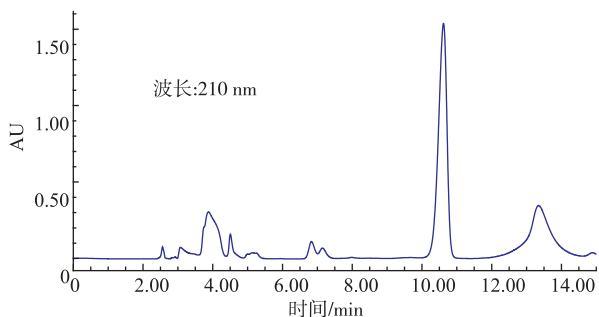


图 6 *E. coli* BL21 培养上清液中 L-乳酸 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of L-lactic acid in supernatant of *E.coli* BL21

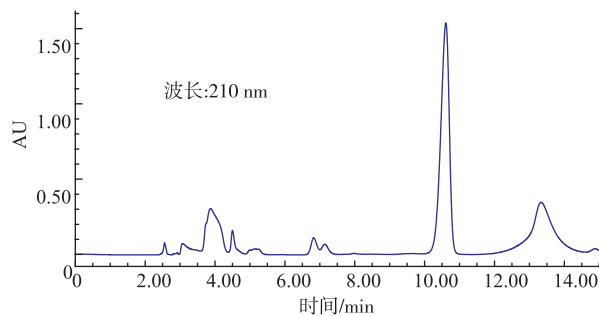


图 7 含 pET28a(+) *E.coli* BL21 培养上清液的 L-乳酸 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of L-lactic acid for supernatant of *E. coli* BL21 with pET28a(+)

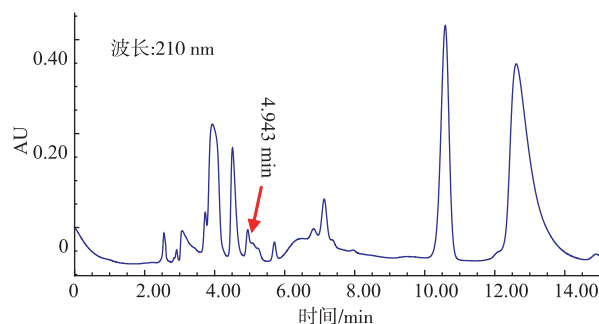


图 8 含 pET28a(+) -*mle* *E.coli* BL21 培养上清液的 L-乳酸 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of L-lactic acid for supernatant of *E.coli* BL21 with pET28a(+)-*mle*

由图 5 可以看出,L-乳酸的保留时间是 4.941 min。由图 6-8 可以看出,野生型和含 pET28a(+) 的 *E.coli* BL21,在保留时间 4.9 min 附近无吸收,而含 pET28a(+)-*mle* 的 *E.coli* BL21 在 4.943 min 处有吸收,表明经过诱导含有 pET28a(+) -*mle* 的 *E.coli* BL21 能够表达苹果乳酶且能转化苹果酸为乳酸。通过外标法计算出 L-乳酸质量浓度为 240.7 mg/L。

同时用乳酸检测试剂盒(酶法检测原理)检测各菌株发酵上清液中 L-乳酸的质量浓度,结果见表 1。

表 1 乳酸试剂盒检测培养上清中 L-乳酸质量浓度

Table 1 L-lactic acid content detected with L- lactic acid assay kit

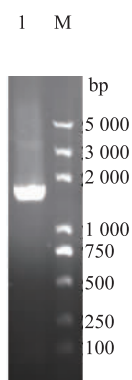
菌株	上清中 L-乳酸质量浓度/(mg/L)
野生型 <i>E.coli</i> BL21	未检出
含 pET28a(+) <i>E.coli</i> BL21	未检出
含 pET28a(+)- <i>mle</i> <i>E.coli</i> BL21	252.8

由表 1 可以看出,野生和含 pET28a(+) 的 *E.coli* BL21 的培养上清液中未检出 L-乳酸,和 HPLC 检测结果相一致。含 pET28a(+)-*mle* 的 *E.coli* BL21 上清液中检出 L-乳酸的质量浓度为 252.8 mg/L,比 HPLC 法检出的结果稍大,这说明含 pET28a(+)-*mle* 的 *E.coli* BL21 外分泌的 MLE 有活性,具有将 L-苹果酸转化为 L-乳酸的能力。乳酸检测试剂盒可用于苹果酶活性的检测。

3 结 语

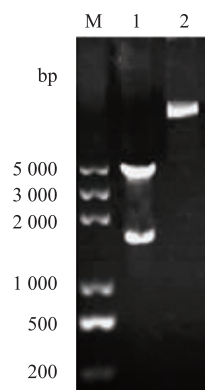
作者将来自枯草芽孢杆菌的 β -葡聚糖酶的信号肽序列与苹果酶基因的编码序列融合并克隆入载体 pET28a(+)中,成功构建了分泌型表达苹果酶的载体。含有该载体的 *E.coli* BL21 能够成功地诱导表达苹果酸乳酸酶,表达的苹果酸乳酸酶能够转化苹果酸产生乳酸,分别用 HPLC 和乳酸检测试剂盒在发酵上清液中检测到 240 mg/L 和 252.8 mg/L 的乳酸。

同时作者将含有信号肽编码序列 MLE 插入表达载体 pET22b(+)中,成功构建了重组载体 pET22b(+)-*mle*,见图 9。SDS-PAGE 分析结果表明,在 IPTG 诱导的条件下,阳性克隆子能高效表达苹果酶,见图 10。但是其培养上清液中并没有检测到 L-乳酸的存在,见图 11,这说明表达的 MLE 没有活性,这可能是因为在 pET22b(+)表达系统中,表达量虽然较高,但信号肽不能有效地引导蛋白质进入周至空间和细胞外,而在胞内的蛋白质则可能因为没有来得及正确折叠而无法发挥其活性。



M: Trans2K Plus DNA Marker; 1: pET22b(+)-*mle*的PCR验证

(a)

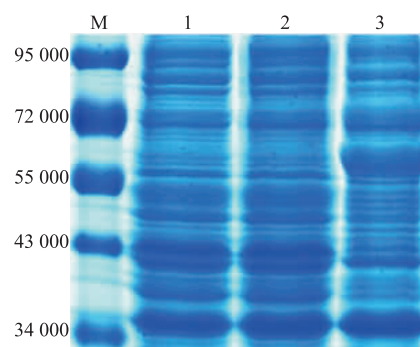


M: Trans2K Plus DNA Marker; 1: pET22b(+)-*mle* PCR 双酶切验证;
2: 质粒pET22b(+)-*mle*

(b)双酶切验证

图 9 pET22b(+)-*mle* 的 PCR 和双酶切验证

Fig. 9 Verification of pET22b(+)-*mle* by PCR and double digestion



M: Marker; 1: *E.coli* BL21; 2: 未诱导的含 pET22b(+)-*mle* 的 *E.coli* BL21; 3: 诱导的含 pET22b(+)-*mle* 的 *E.coli* BL21

图 10 苹果酸乳酸酶的 SDS-PAGE 图

Fig.10 SDS-PAGE analysis of MLE

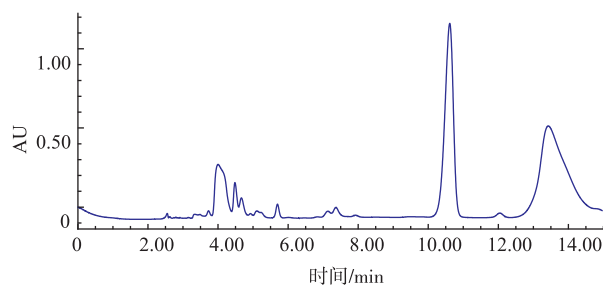


图 11 含 pET22b(+)-*mle* *E.coli* BL21 培养上清液的 L-乳酸 HPLC 图

Fig. 11 HPLC of L-lactic acid for supernatant of *E.coli* BL21 with pET22b(+)-*mle*

参考文献:

- [1] 张浩,莫海珍,李华. 酒精、SO₂ 和 pH 值对酒类酒球菌生长特性影响[J]. 中国酿造,2006(5):38-40.
ZHANG Hao,MO Haizhen,LI Hua. Effect of ethanol,SO₂ and pH on the growth of *Oenococcus oeni* [J]. **China Brewing**,2006,(5):38-40.(in Chinese)
- [2] 高年发,孙腾飞,罗建华,等. 葡萄酒生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:71-90.
- [3] Labarre C,Guzzo J,Cavin J F. Cloning and characterization of the genes encoding malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,1996,62(4):1274-1282.
- [4] Izquierdo Canas P M,Garcia Romero E,Gomez Alonso S. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines[J]. **Journal of Food Composition and Analysis**,2008,21:731-735.
- [5] Liu Y L,Li H. Integrated expression of the *oenococcus oeni* mleA Gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Agricultural Sciences in China**,2009,8(7):821-827.
- [6] 高年发,王淑豪,李晓刚. 酿酒酵母与粟酒裂殖酵母属间原生质体融合选育降解苹果酸的葡萄酒酵母[J]. 生物工程学报,2000,16(6):718-722.
GAO Nianfa,WANG Shuhao,LI Xiaogang,et al. Construction of yeast of reducing acid by intergeneric fusion between *Saccharomyces bayanus* and *Schizosaccharomyces pombe*[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2000,16(6):718-722.(in Chinese)
- [7] 高年发,张颖. 酿酒酵母和酒类酒球菌原生质体制备与再生的条件优化[J]. 中国酿造,2006(12):13-16.
GAO Nianfa,ZHANG Ying. Method optimization on protoplast preparation and regeneration of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*[J]. **China Brewing**,2006(12):13-16.(in Chinese)
- [8] 李华,游玲,刘晓晴,等. 酿酒酵母与酒类酒球菌融合子特性及分子生物学研究[J]. 西北农林科技大学学报,2006,34(6):133-136.
LI Hua,YOU Ling,LIU Xiaoqing,et al. Study of the fusant between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*[J]. **Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry**,2006,34(6):133-136.(in Chinese)
- [9] 李华,刘延琳,蒋思欣,等. *Oenococcus oeni* 苹果酸-乳酸发酵关键基因在酿酒酵母中的转化与表达[J]. 农业生物技术学报,2006,14(4):606-611.
LI Hua,LIU Yanlin,JIANG Sixin,et al. Cloning of two key enzyme genes from *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation and their expressions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**,2006,14(4):606-611.(in Chinese)
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔著. 分子克隆实验指南[M]. D.W,黄培堂等,译.(第三版). 北京:科学出版社,2003:1217-1265.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第七届全国微生物遗传学学术研讨会

开始日期: 2016-08-05

结束日期: 2016-08-08

所在城市: 内蒙古自治区 呼和浩特市

主办单位: 中国遗传学会微生物遗传专业委员会

承办单位: 内蒙古大学生命科学学院、中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室

会议主席: 谭华荣, 向华

全文截稿日期: 2016-07-05

联系人: 莫日根 15148048149

联系电话: 0471-4992442

传真: 0471-4992435

E-MAIL: morigenm@life.imu.edu.cn

会议网站: http://www.gsc.ac.cn/tzgg/201601/t20160111_322526.html

会议背景介绍: 为充分展示我国微生物遗传学及其交叉学科研究的最新成果、加强学术交流、推动微生物遗传学发展和促进生物技术与生物产业创新,由中国遗传学会微生物遗传专业委员会主办、内蒙古大学生命科学学院和中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室等承办的“第七届全国微生物遗传学学术研讨会”,将于2016年8月5日-8月8日在内蒙古自治区呼和浩特市召开。在中国遗传学会指导下,每两年一届的“全国微生物遗传学学术研讨会”系列会议,已成为我国微生物学领域具有优良传统和广泛影响的学术盛会。我们热忱欢迎国内外从事微生物遗传与分子生物学、微生物组学、微生物遗传相关交叉学科研究、以及微生物技术与产业发展的科研工作者及研究生等积极投稿,踊跃参会。