

文章编号 :1009 - 038X(2002)03 - 0296 - 03

耐热 β -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达

葛佳佳 , 陈 卫 , 张 灏

(江南大学 食品学院 , 江苏 无锡 214036)

摘 要 : 将来自嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 的高温乳糖酶基因 *bgaB* 亚克隆到具强启动子的大肠杆菌载体 pKK-223-3 中 , 经 IPTG 诱导后 , 表达出的重组蛋白质仍具有耐高温活性 , 其相对分子质量与天然蛋白质相似 , 表达量为 1.5 U/mg , 比出发菌株高 10 倍 .

关键词 : 嗜热脂肪芽孢杆菌 ; β -半乳糖苷酶 ; 表达 ; 大肠杆菌

中图分类号 : Q 78

文献标识码 : A

Expression of Thermostable β -galactosidase Gene in *E. coli*

GE Jia-jia , CHENG Wei , ZHANG Hao

(School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : A thermostable β -galactosidase gene *bgaB* of *Bacillus stearothermophilus* was subcloned into *E. coli* vector pKK-223-3. The recombinant protein was produced after induced by IPTG , and showed the same thermo-stability and molecular mass as the original enzyme. The expression level reached 1.5 U/mg , 10 times higher than the original strain.

Key words : *Bacillus stearothermophilus* ; β -galactosidase ; expression ; *E. coli*

乳糖酶 , 即 β -半乳糖苷酶 (E. C. 2.3.1.23) 是一种广泛应用的酶 , 能水解乳糖为半乳糖和葡萄糖 , 也具有半乳糖苷的转移作用 . 通常用以分解乳糖 , 提高牛奶的可消化性 , 防治炼乳和冰淇淋中乳糖的析出 .

乳糖酶作用的最适温度、pH 值和相对分子质量随酶源不同而异 . 一般而言 , 微生物乳糖酶的最适作用温度为 35 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$, 而一些嗜热菌产生的乳糖酶具有热稳定性 , 能长期在 60 $^{\circ}\text{C}$ 或更高温度下存活 , 使用该种乳糖酶进行工业化生产具有转化率高、污染小等优点 . 但国内有关耐热菌乳糖酶的研究尚未见报道 , 目前仅有 4 种耐热酶基因被克隆出来^[1 5 6 7] , 其中源自嗜热脂肪芽孢杆菌的乳糖酶的最适温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 是适合工业化生产的一种乳糖

酶 . 据报道 , 嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 中含有 3 种乳糖酶基因 , 其中乳糖酶 II 和 III 由同一基因 *bgaA* 编码 , 乳糖酶 I 由 *bgaB* 编码 , 并且是 3 种乳糖酶中最耐热的一种 , 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 仍可具稳定性^[1] . *bgaB* 由 2 016 个碱基构成 , 所编码的蛋白质相对分子质量约为 78 051 . 作者选取来自嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 的 *bgaB* 基因进行研究 , 将其在大肠杆菌中进行表达 .

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、酶和主要试剂

嗜 热 脂 肪 芽 孢 杆 菌 (*Bacillus stearothermophilus*) IAM11001 和大肠杆菌 DH5 α 由作者所在实验室保存 . pKK223-3 表达载体由江南大学客座

收稿日期 2001 - 11 - 14 ; 修订日期 2002 - 01 - 16 .

作者简介 : 葛佳佳 (1979 -) , 女 , 江西景德镇人 , 工学硕士 .

万方数据

教授刘吉泉惠赠. 限制酶、T4 连接酶均购自 Takara 公司。

1.2 目的基因片段的扩增

引物由上海生物工程有限公司合成.上游引物: 5'-CGGAATTCATGAATCTGTTATCCTC-3', 引入 *EcoR* I 位点;下游引物: 5'-CGCTGCAGC-TAAACCTTCCCGGCTTC-3', 引入 *Pst* I 位点. 以嗜热脂肪芽孢杆菌的染色体 DNA 为模板, PCR 扩增条件为 96 ℃ 54 ℃ 72 ℃.

1.3 重组质粒的构建

将 PCR 产物与 pKK223-3 载体同时用 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切,再连接 *bgaB* 基因与 pKK223-3 载体。

1.4 质粒转化大肠杆菌

将宿主菌 JM109 用 CaCl_2 法制成感受态细胞, 取出 $100\ \mu\text{L}$ 与连接反应液混合, 按文献 [2] 的方法进行转化, 然后将菌液涂布在 LB + AMP 抗性平板上, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $14\sim 16\ \text{h}$.

1.5 转化子的 PCR 检测

将转化子小量培养,提取质粒,采用目的基因片段的引物和 T_{aq} 酶进行扩增.

1.6 菌株的诱导表达

将表达菌株培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,诱导 4 h.

1.7 检测

以 ONPG 为底物,在 55 ℃ 下测定(pH 7.0)β-半乳糖苷酶活^[3]。1 单位酶活定义为 1 min 内酶水解底物的微摩尔数。蛋白质含量的测定依据考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白 BSA 为标准^[4]。

2 实验结果

2.1 重组质粒的构建

重组质粒的构建如图 1. PCR 扩增的 *bgaB* 基因片段的长度为 2 kb 左右, 与预计的大小相符, 插入 pKK-223 载体, 转化宿主菌 JM109.

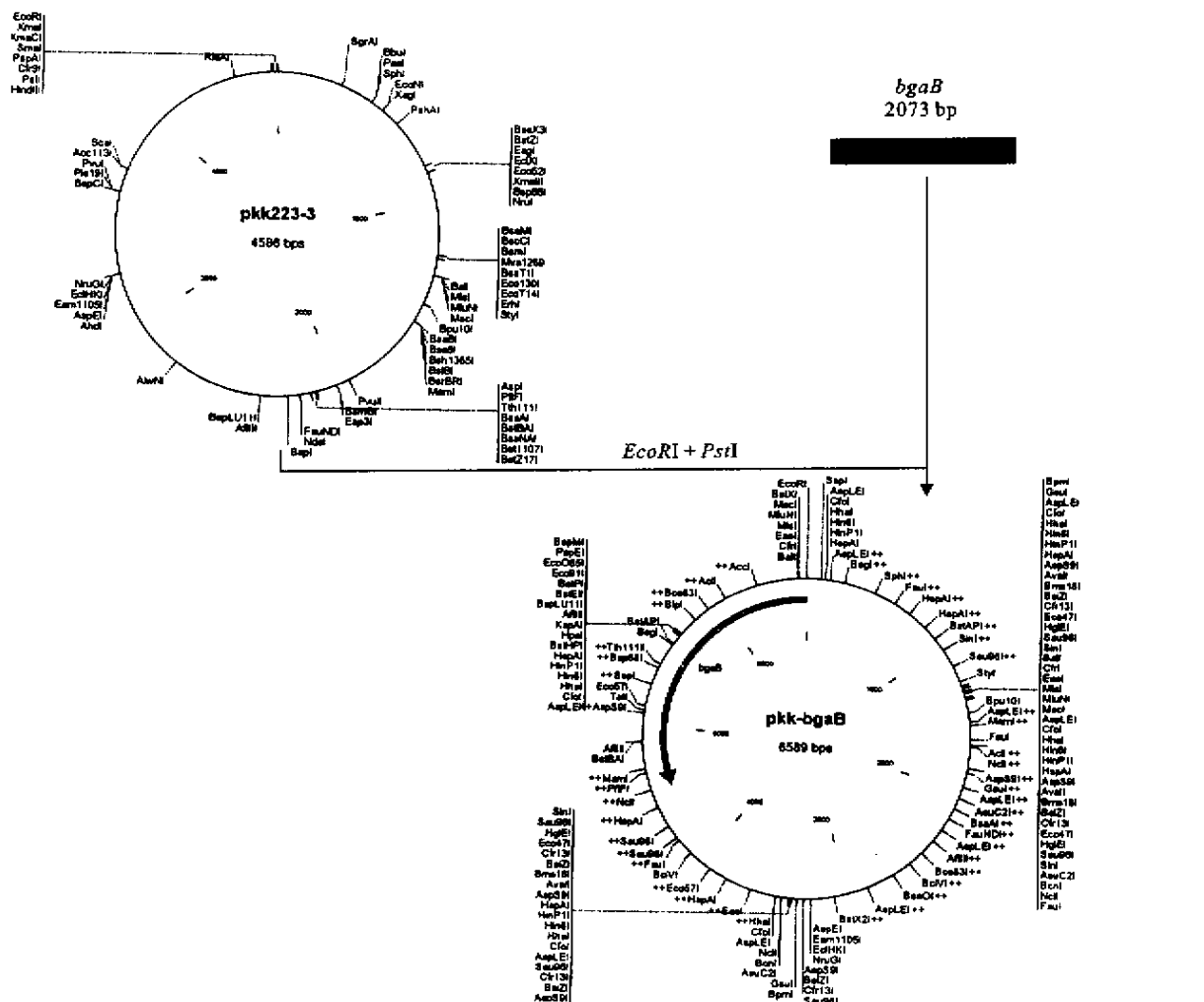
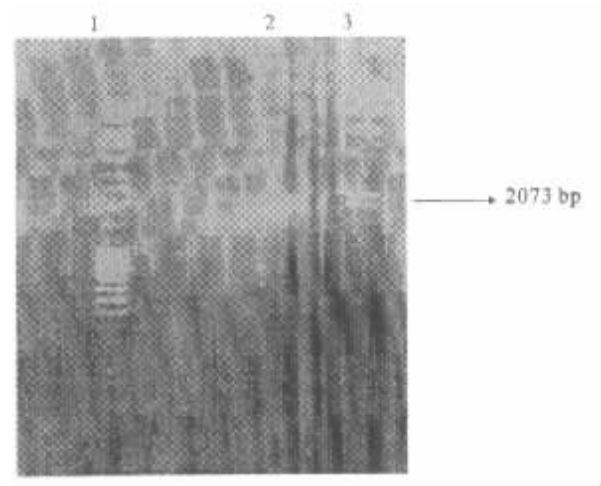


图 1 重组质粒 pKK-bgaB 的构建

Fig.1 Construction of pKK-bgaB

2.2 重组质粒的鉴定

将转化子进行质粒的小量提取 ,用 *bgaB* 基因的引物进行 PCR 扩增后 ,得到了相应的片段(图 2).



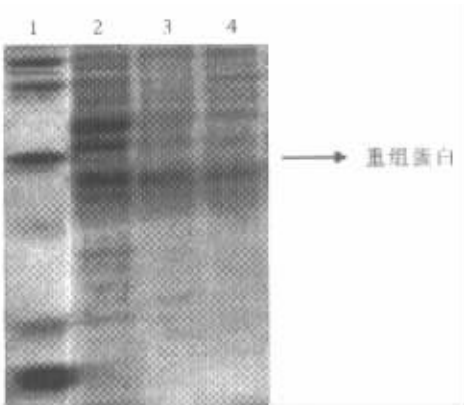
1. DNA-ladder 标准 2. 转化子 3. λ-DNA *Hind*Ⅲ 标准

图 2 pKK-*bgaB* 质粒的 PCR 鉴定结果.

Fig.2 The PCR analysis of recombinant plasmid

2.3 重组蛋白质的表达及酶活测定.

以出发菌株嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 为对照 ,将转化子用 IPTG 诱导表达 ,取 1 mL 培养液用细胞破碎机破碎 ,用于酶活测定和蛋白质电泳 (图 3).由于 *B. stearothermophilus* 中含有 3 种乳糖酶 ,其中所克隆的 *bgaB* 编码的乳糖酶 I 具有极高的耐热性^[1] ,在 70 ℃ 下保温 1 h 后仍保留 80% 的活性 ,而其它两种乳糖酶则已全部失活 .因此将两种样品在 70 ℃ 下保温 1 h 后才进行酶活的检测 ,以确保在 *B. stearothermophilus* 中所检测出的酶活完全为 *bgaB* 所编码乳糖酶的酶活 .所测出酶的比活力分别为 :JM109(pKK-*bgaB*) 1. 5 U/mg ; *B. stearothermophilus* 0. 145 U/mg .由此可知 ,酶活提



1. 标准相对分子质量蛋白 2. 含 pKK-*bgaB* 重组质粒的 JM109 全细胞蛋白(未稀释) 3. 未转化 JM109 全细胞蛋白 (稀释 2 倍) 4. 含 pKK-*bagB* 重组质粒的 JM109 全细胞蛋白 (稀释 2 倍)

图 3 产物的 SDS-PAGE 蛋白质电泳

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the gene products

高了 10 倍.

3 讨 论

来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的 *bgaB* 基因 ,所编码的蛋白质相对分子质量为 78 051 ,经 SDS-PAGE 电泳后估测出的相对分子质量为 70 000 ,比预计的低 10%^[1] .而在大肠杆菌中表达出的乳糖酶相对分子质量也为 70 000 左右 ,可见重组蛋白质在大肠杆菌中受到了和出发菌株中相似的修饰作用 .

作者所采用的大肠杆菌 PKK 载体所用的启动子为 *Tac* 启动子 ,该启动子是由 *trp* 启动子的-35 序列和 *lacUV5* 的 Pribnow 序列拼接而成的杂合启动子 ,调控模式与 *lacUV5* 相似 ,但 mRNA 转录水平高于 *trp* 和 *lacUV5* 启动子 ,因此在要求有较高基因表达水平的情况下 ,选用 *tac* 启动子比用 *lacUV5* 启动子更优越 .

参考文献 :

[1] HIRUHISA HIRATA , TSUYOSHI FUKAZAWA. Structure of αβ-galactosidase gene of *bacillus stearothermophilus*[J]. *Journal of bacteriology* ,1986 , 166 :722 - 727 .
[2] J. 萨姆布鲁克 .分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京 : 科学出版社 ,1996 .
[3] HIRATA H , NEGORO S , OKADA H. Molecular basis of isozyme formation of in *Bacillus stearothermophilus* : isolation of two β-galactosidase genes , *bgaA* and *bgaB*[J]. *J Bacteriol* ,1984 ,160 :9 - 14 .
[4] F. 奥斯伯 . 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京 : 科学出版社 ,1998 .
[5] CUBELLIS M V , C ROZZO P. Isolation and sequencing of a newβ-galactosidases-encoding archaeobacterial gen[J]. *Gene* ,1990 , 94 :89 - 94 .
[6] KOYAMA Y , OKAMOTO S , FURUKAWA K. Cloning of α- and β-galactosidase genes from an extreme thermophile ,*thermus* strain T2 , and their expression in *Thermus thermophilus* HB27[J]. *Appl Environ Microbiol* ,1990 ,56 :2251 - 2254 .
[7] MOORE J B , MARKIEVICZ P , MILLER J H. Identification and sequencing of the *thermotoga maritima* *lacZ* gene , part of a divergently transcribed operon[J]. *Gene* ,1994 ,147 :101 - 106 .

(责任编辑 杨 萌 朱 明)