

文章编号:1673-1689(2006)03-0011-04

洋葱伯克霍尔德氏菌 L68 邻苯二酚 2,3-双加氧酶 基因克隆、表达和纯化

吕 鹏, 刘大桅, 张长铠*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100)

摘 要: 采用自行设计的引物,从洋葱伯克霍尔德氏菌 L68 中 PCR 扩增得到 *phnE*(邻苯二酚 2,3-双加氧酶)基因,亚克隆到高表达载体 pET 32a 上,转入表达菌株中。经双向测序,证实构建过程中未出现突变。重组子经 IPTG 诱导后,可以表达有活性的重组双加氧酶。选择 26 °C 进行重组蛋白诱导。薄层扫描显示,表达重组蛋白总量最高可占总蛋白的 64.92%。利用金属螯合层析对重组蛋白进行了一步纯化,SDS-PAGE 结果显示,重组蛋白纯度达到 95%。

关键词: 洋葱伯克霍尔德氏菌;邻苯二酚 2,3-双加氧酶;克隆表达;金属螯合层析

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Cloning, Expression and Purification of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Burkholderia cepacia* L68

LUI Peng, LIU Dawei, ZHANG Chang-kai*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Catechol 2,3-dioxygenase (C23O) gene was amplified with the designed primers from the total DNA of *Burkholderia cepacia* L68. The PCR product was double digested and connected with the pET 32a vector. The recombined vector was transformed to *E. coli* BL21 trxB (DE3). After induced by 5 mM IPTG, the lysis of the transformants showed specific C23O activities. Three temperatures were tested to optimize the induce temperature, and 26 °C was selected as the optimal induce temperature. The total recombined C23O protein was about 64.92% of the total cell proteins base on the thin layer scanning analysis. The recombined C23O was further purified with Ni-NTA His Bind Resins to electrophoretic homogeneity.

Key words: *Burkholderia cepacia*; catechol 2,3-dioxygenase; cloning; expression; purification

在芳香烃化合物的微生物降解过程中,邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (Catechol 2,3-Dioxygenase, C23O, EC1.13.11.2)是催化芳香烃化合物代谢的关键酶。许多芳香烃化合物在降解过程中都会形

成中间产物邻苯二酚,细菌可以通过邻位裂解和间位裂解两种途径继续降解邻苯二酚^[1]。在间位降解途径中,邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化邻苯二酚的苯环裂解,转化为 2-羟粘糠酸半醛(HMS),对消除

收稿日期:2005-12-23; 修回日期:2006-01-20.

基金项目:国家自然科学基金项目(30370014).

作者简介:吕鹏(1978-),男,山东济南人,微生物学博士研究生;* 通讯作者.

芳香烃类化合物的污染具有重要作用^[2]。

作者所在实验室从炼油厂废水中分离筛选到一株苯酚高效降解菌 L68,经形态、生理生化及 16S rRNA 同源性等指标分析,鉴定该菌株为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)^[3]。经过初步分析,该菌株可产生邻苯二酚 2,3-双加氧酶,通过间位降解途径催化邻苯二酚的苯环裂解^[4]。通过构建染色体文库筛选,得到了该菌株 C23O 基因序列,经 BLAST 比对,该序列仅与 *Burkholderia sp.* RP007 的 *phnE2* 基因^[5]同源性较高,而与广泛报道的假单胞菌的 C23O 基因同源性较低,将该基因命名为 *phnE*。研究中应用 PCR 扩增的方法得到 *phnE* 基因,亚克隆到高表达载体 pET 32a 上,转入表达菌株实现了 C23O 的高效表达,并利用金属螯合层析对重组蛋白进行了一步纯化,为该酶的进一步研究及利用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

菌株 *Burkholderia cepacia* L68, *Escherichia coli* BL21 *trxB* (DE3),质粒 pET 32a,均为作者所在实验室保存。

1.2 培养基、酶类及试剂

LB 培养基按文献^[6]配制,固体培养基加 1.7 g/dL 琼脂粉;苯酚培养基按文献^[4]配制;氨苄青霉素、总 DNA 提取试剂盒为“上海生工”产品;TaqDNA 聚合酶和 dNTP 为上海博亚公司产品;限制性内切酶 SalI 和 EcoRI 为 MBI 公司产品;T₄DNA 连接酶、IPTG、DNA Marker DL2000 为大连宝生物公司产品;质粒小量提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、凝胶回收试剂盒均为 Omega 公司产品;His·Bind Resin 为 Novagen 公司产品;咪唑为 BBI 公司产品;扩增基因用的引物由上海博亚公司合成,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 重组质粒的构建

B. cepacia L68 接种于苯酚液体培养基中,35℃振荡培养 24 h 后离心收集菌体,提取总 DNA。具体步骤按试剂盒说明书进行。

目的基因的 PCR 扩增按常规方法进行,扩增条件:94℃ 60 s,58℃ 30 s,72℃ 45 s,30 个循环,最后 72℃ 保温 10 min。

质粒提取、PCR 产物回收、凝胶产物回收,分别按试剂盒说明书进行。

限制性内切酶酶切、连接,感受态细胞的制备、转化,重组克隆的筛选,按文献^[6]进行。

1.4 重组蛋白的诱导表达

表达菌株接种于 100 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃振荡通气培养至 OD₆₀₀ 0.6 左右时,加入 IPTG 至浓度 1 mmol/L,26℃诱导 12 h 后离心收集菌体,保存备用。

1.5 重组可溶蛋白的金属螯合层析纯化

按照 100:4(菌体初始培养基体积:缓冲液体积)的比例在菌体中加入 Binding Buffer(0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris·HCl,5 mmol/L 咪唑,pH 7.9),充分悬浮后在冰浴中超声破碎,裂解菌体。菌体裂解液 12 000 r/min 离心 20 min 后,上清液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,上 His·Bind Resin 柱。分别用 50 mL Binding Buffer 和 25 mL Wash Buffer(0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris·HCl,20 mmol/L 咪唑,pH 7.9)洗脱非特异性结合蛋白后,用 10 mL Elute Buffer(0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris·HCl,250 mmol/L 咪唑,pH 7.9)洗脱,收集蛋白峰。SDS-PAGE 电泳检测。

1.6 其他分析方法

邻苯二酚 2,3-双加氧酶活力测定采用分光光度法^[7]。测定系统总体积 3 mL,内含 1 mol 邻苯二酚和 130 mol pH 7.5 的磷酸钾缓冲液和 0.2 mL 酶液。30℃反应 1 min,在 375 nm 处测定光吸收的增加值。

SDS-PAGE 电泳按照文献^[8]进行,分离胶质量分数为 12%,浓缩胶质量分数为 5%。染色、脱色后拍照,目的蛋白含量用 TotalLab v2005 软件分析。

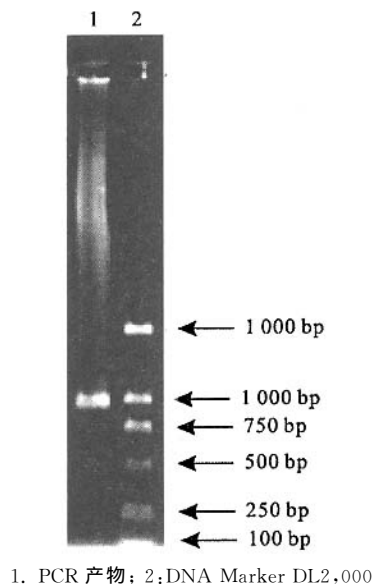
阳性克隆用 ABI3730 型 DNA 测序仪进行核酸序列测定,采用 T₇ promoter primer 和 T₇ terminator primer 进行双向测序,Vector NTI Suite 9 软件进行拼接。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

根据 *B. cepacia* L68 C23O 基因序列,合成一对分别含有 *Eco* RI 和 *Sal* I 限制性内切酶位点的引物,其序列分别为:BCO1(5'-GTC GAA TTC ATG GGT GTG ATG CGA -3')和 BCO2(5'-ACT GTC GAC TCA GGT GTA AAC CTC -3')。

利用上述引物,PCR 方法从 *B. cepacia* L68 总 DNA 中扩增 *phnE* 基因,扩增产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,扩增出一条约 1 kb 的条带,与预期结果 963 bp 一致(图 1)。

图 1 PCR 扩增 *phnE* 基因Fig. 1 Amplification of *phnE*

PCR 产物经回收后,用 *Eco* RI/*Sal* I 双酶切,与同样双酶切的表达载体 pET 32a 连接,转化入表达菌株 *E. coli* BL21 *trxB* (DE3) 中,获得了氨苄青霉素抗性的转化子。转化子 *E. coli* L3 (pET32a-*phnE*) 经菌落 PCR 初筛及重组质粒 *Eco* RI/*Sal* I 双酶切验证,均证明成功转入 1 kb 左右的片段。经双向测序证明, *phnE* 成功插入到 pET 32a 的 *Eco* RI/*Sal* I 位点,且构建过程中未发生突变。重组子 *E. coli* L3 在含氨苄青霉素的 LB 培养基中经 IPTG 诱导表达,酶活力测定结果显示,重组子 *E. coli* L3 菌体裂解液中含有较高的 C23O 酶活力,达到 1.3 U/mg 总蛋白;而转入空载体的宿主菌菌体裂解液中无 C23O 酶活力。

2.2 重组蛋白的诱导表达

对工程菌 *E. coli* L3 的诱导表达温度进行优化。加入 IPTG 后,分别考察了 37, 30 °C 和 26 °C 对重组蛋白表达的影响。在诱导的不同时间取样,直接进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 电泳结果经扫描后,用 totallab 软件分析目的蛋白含量。结果表明,在加入 IPTG 诱导前,重组 C23O 的表达不明显;IPTG 加入后,随着诱导时间的增加,重组 C23O 的表达量逐步增加,到达一定时间后,其含量基本不再变化。诱导温度不同时,重组 C23O 的最终表达量也不一致。与 26 °C 和 30 °C 诱导相比,37 °C 诱导时最终表达量反而较低(图 2)。

表达的重组蛋白占总蛋白的比率见图 3。与重组 C23O 的表达量不同,表达的重组蛋白占总蛋白的比率随着时间的增加快速达到最高值后缓慢下降,说明在诱导的后期,重组蛋白的合成速度与

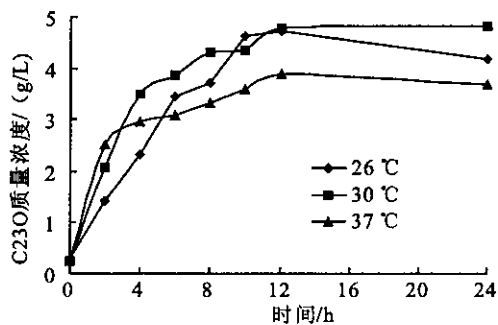


图 2 不同诱导温度下重组 C23O 的表达量

Fig. 2 Effects of induce temperatures on recombinant C23O expression

其他蛋白相比相对下降。当诱导温度为 30 °C 和 37 °C 时,诱导 2 h 时表达的重组蛋白占总蛋白的比率达到最高值,略高于 50%。当诱导温度下降为 26 °C 时,诱导 6 h 时,表达的重组蛋白占总蛋白的比率达到 66.19%;8 h 时,表达的重组蛋白占总蛋白的比率最高,达到 64.92%;12 h 时,表达的重组蛋白占总蛋白的比率仍高达 62.13%。综合不同诱导温度下重组 C23O 的表达情况,选定 26 °C 诱导重组 C23O 蛋白的表达。

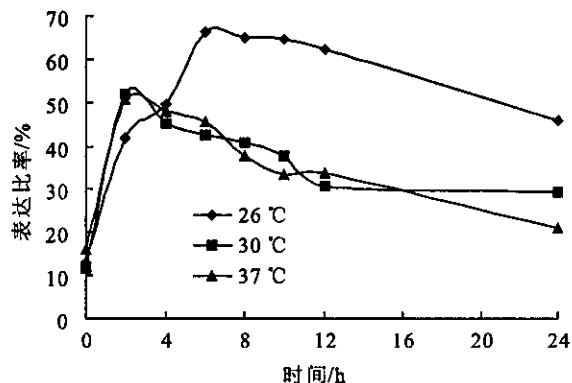


图 3 不同诱导温度下表达的重组 C23O 占总蛋白的比率

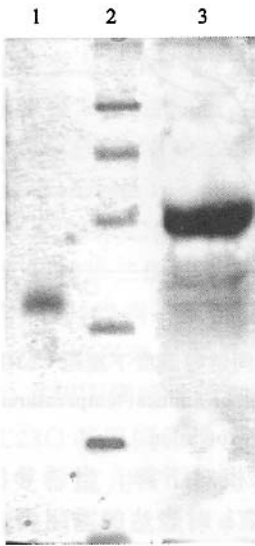
Fig. 3 Effects of induce temperatures on recombinant C23O protein ratio

2.3 重组可溶蛋白的金属螯合层析纯化

重组可溶蛋白由于带有 His · Tag, 因此可以采用金属螯和层析进行一步纯化。用含有高浓度咪唑的缓冲液洗脱后,重组 C23O 蛋白得到了一步纯化,经 SDS-PAGE 分析,其纯度达到了 95%(图 4)。

3 结 论

1961 年,Yutaka Kojima 等首先报道了对恶臭假单胞菌中邻苯二酚 2,3-双加氧酶性质的研究^[9]。随后发现有很多种细菌都能产生邻苯二酚 2,3-双加氧酶,不同细菌产生的邻苯二酚 2,3-双加氧酶在理化性质、催化活性、酶作用底物等方面都有不同



1. C23O; 2. 低相对分子质量蛋白标准;3. 重组 C23O

图 4 重组 C23O 蛋白

Fig. 4 Recombined C23O

程度的差别。通过检索 GenBank,发现目前报道的 C23O 多来源于假单孢菌。本文报道的 C23O 基因 *phnE* 来源于 *Burkholderia cepacia* L68。与大多数 C23O 基因序列不同的是,根据 Eltis 和 Bolin 的分类,*phnE* 基因属于 I. 2. C 亚家族。该亚家族的一个显著特点就是比其他 C23O 基因序列多出 24 个碱基^[10]。从酶动力学考虑,该亚家族的 C23O 有可能对低浓度的底物比较敏感^[11];而从分类角度出发,多出的 24 个碱基则可能与进化压力有关^[12]。鉴于该基因的特点,研究 *phnE* 编码的 C23O 的性质有着重要的理论意义和潜在的应用价值。作者利用 pET 32a 表达载体,成功构建了邻苯二酚 2,3-双加氧酶表达载体,在表达菌株中实现了 C23O 的高效表达。进而利用重组蛋白的 His · Tag,采用金属螯和层析方法一步纯化了重组蛋白,为进一步研究该酶的性质奠定了基础。

参考文献:

[1] Harayama S, Rekik M. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families[J]. **J Biol Chem**, 1998,264(26):15328—15333.

[2] McClure NC, Fry JC, Weightman AJ. Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1991,57(2):366—373.

[3] 刘涛,张长铠,薛勇等. L68 菌株邻苯二酚 2,3-双加氧酶纯化及性质[J]. **食品与生物技术**, 2002,21(1):53—57.

[4] 刘涛,刘正学,张长铠等. 苯酚高效降解菌 L68 菌株的分离及分类鉴定[J]. **山东大学学报:自然科学版**,2002, 37(4):369—372.

[5] Laurie A D, Lloyd-Jones G. Conserved and hybrid meta-cleavage operons from PAH-degrading *Burkholderia* RP007[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1999,262 (1): 308—314.

[6] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002.

[7] Yutaka K, Nobutomo I, Osamu H. Metapyrocatechase: a new catechol-cleaving enzyme[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1961(8):2223—2228.

[8] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2002.

[9] Eltis L D, Bolin J T. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases[J]. **J Bacteriol**,1996, 178: 5930—5937.

[10] Kukor J K, Olsen R H. Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments[J]. **Appl Environ Microbiol**,1996, 62: 1728—1740.

[11] Andrew D Laurie, Gareth Lloyd-Jones. Conserved and hybrid meta-cleavage operonsfrom PAH-degrading *Burkholderia* RP007[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,1999,262, 308—314.

(责任编辑:杨 萌,秦和平)