

文章编号:1673-1689(2006)02-0074-05

耐热过氧化氢酶基因工程菌的构建及其发酵条件

段绪果, 沈微, 李艳丽, 饶志明, 唐雪明,
方慧英, 刘吉泉, 诸葛健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 利用 PCR 扩增技术以嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 染色体 DNA 为模板, 扩增得到嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶编码基因 *perA*。再与经 *EcoR*I 酶切的温控表达载体 pBV220 连接, 构建重组质粒, 并转化宿主大肠杆菌 JM109, 得到耐热过氧化氢酶基因工程菌, 然后对该工程菌在 LB 培养基和半合成培养基中的发酵条件进行了优化。结果表明: 在 LB 培养基中, 诱导时期和酶合成最佳诱导时间均为 5 h, 最大产酶量达到 72.9 U/mL; 在半合成培养基中, 于 30 °C 培养 4 h, 再于 42 °C 诱导培养 6 h, 产酶量最高达到 131 U/mL。

关键词: 耐热过氧化氢酶; 基因工程菌; 温控表达载体; 发酵条件

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

Construction of Recombinant Thermo-Stable Catalase Engineering Strain and Optimization of Its Fermentation Condition

DUAN Xu-guo, SHEN Wei, LI Yan-li, RAO Zhi-ming, TANG Xue-ming,
FANG Hui-ying, LIU Ji-quan, ZHUGE Jian*

(The Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The gene encoding a thermo-stable catalase was amplified from the chromosomal DNA of *Bacillus stearothermophilus* IAM11001 by PCR. It was then inserted into the temperature control expression vector pBV220 and expressed in *E. coli* JM109. The fermentation conditions were optimized both in the LB medium and semi-synthetic medium. The results indicated that both of the inducing time and the length of inducing time were 5 hours and the maximal enzyme activity reached 72.9 U/mL in LB medium; The maximal enzyme activity of 131 U/mL in semi-synthetic medium could be obtained when keeping temperature at 30 °C for 4 hours in the growth phase and then shifting to 42 °C for 6 hours.

Key words: thermo-stable catalase; engineering strain; temperature control expression vector; fermentation condition

过氧化氢酶(Catalase, 简称 CAT)广泛存在于自然界的生物体中, 它能够将过氧化氢分解为水和

分子氧^[1]。过氧化氢酶除了具有重要的生物功能以外, 在纺织、造纸、食品、临床分析、医疗诊断等行

收稿日期: 2005-04-05; 修回日期: 2005-05-16.

作者简介: 段绪果(1981-), 男, 江苏徐州人, 微生物学硕士研究生.

业中也具有重要的应用价值^[2]。

目前,国内外对过氧化氢酶的研究主要停留在不同来源过氧化氢酶的性质上,真正将其进行工业化生产并用于棉纺织行业的不多。现在商品过氧化氢酶主要为牛肝来源的过氧化氢酶,纺织用商品过氧化氢酶基本为丹麦 Novozyme 垄断,主要来源于经基因改性后的黑曲霉(*Aspergillus niger*),但这类过氧化氢酶耐热性不好。近年来,国内外研究者对嗜热性微生物的耐热性过氧化氢酶产生了浓厚的兴趣。国内已有研究利用嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*)生产碱性耐热过氧化氢酶的专利,但尚未实现工业化生产^[3]。

来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的过氧化氢酶最适温度为 70 ℃,并且在 30 ℃条件下可以稳定保存一个月。由于这些优良特性,该酶具有潜在的实际应用价值^[4]。但是,直接以嗜热微生物发酵生产过氧化氢酶存在培养基及培养条件苛刻、培养周期长等缺陷。以大肠杆菌为宿主的外源蛋白质表达系统是迄今为止研究得最为详尽的原核表达系统。大肠杆菌具有繁殖迅速、培养与代谢易于控制等优点。因此,利用 DNA 重组技术构建来源于嗜热微生物的过氧化氢酶基因工程菌,对大规模生产目的蛋白质具有重大的经济价值。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

宿主大肠杆菌 JM109,作者所在实验室保存。嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) IAM11001(ATCC 8005)购自东京大学应用微生物研究所。温控表达质粒 pBV220 由中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德等构建^[5],由江南大学环境科学实验室廖鲜艳老师惠赠。

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10。pH 7.0。添加 1.5 g/dL 琼脂为 LB 固体培养基,使用前加入氨苄青霉素至 100 μg/mL。

发酵培养基(g/L):无水葡萄糖 10,NaCl 3,(NH₄)₂SO₄ 8,KH₂PO₄ 4,K₂HPO₄ 15,MgSO₄ 0.1。微量元素溶液 1 mL,pH 7.0。

微量元素溶液(g/L):FeSO₄·7H₂O 40,CaCl₂·2H₂O 40,AlCl₃·6H₂O 10,MnSO₄·H₂O 10,CoCl₂·6H₂O 4,Na₂MoO₄·2H₂O 2,ZnSO₄·7H₂O 2,CuCl₂·2H₂O 1,H₃BO₃ 0.5^[6]。

种子培养:采用新近转化和鉴定的菌株。菌种

在含 5 mL 液体 LB 的试管中于 30 ℃、200 r/min 培养过夜,再按体积分数 2% 的接种量转接一次,相同条件下培养 4 h,作为活化的种子。

摇瓶发酵:取活化的种子以体积分数 2% 的接种量接入装有 50 mL LB 或半合成培养基的 250 mL 摇瓶中,分别进行发酵。

1.3 工具酶和试剂

蛋白胨(tryptone)和酵母粉(yeast extract)为英国 Oxoid 公司产品;实验所用的工具酶 EcoR I、Pst I、Sal I、碱性磷酸酶 CIAP、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶、DNA 相对质量标准购自 Takara 公司;蛋白质相对质量标准购自上海生工生物工程公司。实验所用其它各种试剂为国产分析纯。

1.4 嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 染色体 DNA 的提取

将菌种接入含 50 mL LB 培养基的 250 mL 摇瓶中,于 55 ℃、200 r/min 摇床培养 24 h。培养液于 4 000 r/min 离心 15 min,参照文献^[7]所述方法提取染色体 DNA。

1.5 DNA 操作技术

质粒 DNA 提取、纯化、酶切、连接,感受态细胞的制备、转化,重组菌的筛选、鉴定等参照文献^[7]所述方法。PCR 产物纯化参照上海华舜生物工程有限公司 PCR 产物纯化试剂盒操作说明。

1.6 perA 基因的 PCR 扩增

根据 NCBI 已公布的嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶基因(长度为 2 196 bp)和载体 pBV220 的序列,设计合成下列引物 perA 基因的上游引物:5'-ACCGAATTCATGGAAAATCAAATCGTCAG-3';下游引物:5'-ACCGAATTCTTAAGCGGTGACCGATTC-3'。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.7 重组表达质粒的构建及重组菌的筛选

将 perA 基因克隆到表达载体 pBV220 中,得到重组质粒 pBV220-perA。利用含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板筛选具抗性单菌落,然后摇瓶培养阳性转化子、提质粒,进行限制性酶切鉴定^[8]。

1.8 过氧化氢酶活测定

取 50 mL 发酵液于 3 000 r/min 离心 15 min,收集细胞,重悬于 0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中,超声波破碎 10 min,8 000 r/min 离心 15 min 后得粗酶液。酶活力测定反应体系包括适当稀释的粗酶液、0.05 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液、0.01 mol/L H₂O₂。240 nm 下测量 OD₂₄₀ 值的变化,

每 5 s 记录一次吸光值,取线性下降部分计算酶活。酶活力单位(U)定义为 25 ℃、pH 7.0 条件下每分钟降解 1 μmol H_2O_2 所需的酶量^[9]。取 $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

1.9 菌体浓度的测定

菌体浓度用分光光度计在 600 nm 波长处测光密度值(OD_{600})。

1.10 目的蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

取 1 mL 菌液于 5 000 r/min 离心 5 min,弃上清,菌体悬浮在 20 μL 去离子水中,再加入 20 μL 2 \times SDS 上样缓冲液,混匀后煮沸 10 min,8 000 r/min 离心 10 min,取 20 μL 上清液进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶经染色液染色,脱色,就可见清晰的蛋白条带^[10]。

2 结果

2.1 温控表达载体的构建和验证

温控表达载体的构建见图 1。

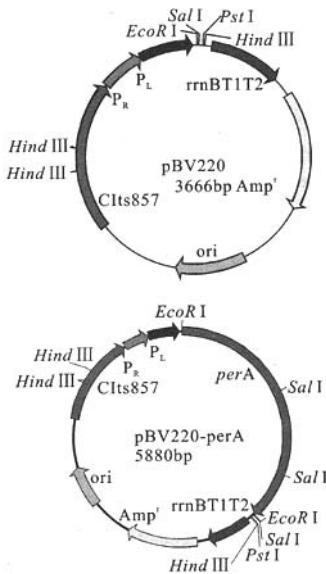
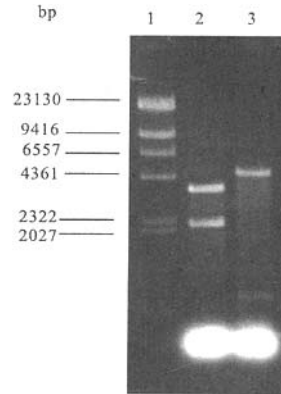


图 1 pBV220 和 pBV220-*perA* 的图谱

Fig. 1 pBV220 and pBV220-*perA*

以嗜热脂肪芽孢杆菌 IAM11001 染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得 *perA* 基因,PCR 产物经纯化柱纯化、*EcoRI* 酶切、胶回收,在 T_4 DNA 连接酶作用下与经同样酶切并去磷酸化的 pBV220 载体连接,连接产物转化大肠杆菌 JM109。涂布含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板,30 ℃ 培养过夜。转化子划线分离后培养并提质粒,进行限制性酶切验证(见图 2),以该质粒为模板进行 PCR 扩增

验证(见图 3)。将质粒送上海 Sangon 生物工程技术服务有限公司测定其中 *perA* 基因的序列,发现与 Genebank 中报道的完全一致。



1. λ DNA/*Hind* III; 2. *Eco*RI single cut of pBV220-*perA*; 3. *Sal*I single cut of pBV220-*perA*

图 2 pBV220-*perA* 的酶切图谱

Fig. 2 Enzyme cut of pBV220-*perA*

pBV220-*perA* 经 *EcoRI* 酶切为 3.6 kb 和 2.2 kb 大小左右的两条带,与预计的片段大小相符合,表明 *perA* 基因已经连接到载体 pBV220 中。质粒 pBV220-*perA* 用 *SalI* 酶切来判断 *perA* 基因的正反接。酶切图谱显示酶切后得到 4.7 kb、0.6 kb 和 0.5 kb 的 3 条片段,说明重组质粒 pBV220-*perA* 中的 *perA* 基因为正接。

1. λ DNA/*Hind* III; 2. PCR product of pBV220-*perA*

图 3 pBV220-*perA* 的 PCR 鉴定结果

Fig. 3 The PCR analysis of pBV220-*perA*

从电泳结果可以看出得到一条与嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶基因同样大小的片段。

2.2 重组菌的全细胞蛋白 SDS-PAGE

以含有空载体 pBV220 的 *E. coli* JM109 为对照,将重组菌在 30 ℃ 下培养 4 h,然后在 42 ℃ 下诱导表达。制备全细胞蛋白样品并进行 SDS-PAGE

电泳分析。由已知的嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶蛋白相对分子质量及亚基情况可知单个亚基大小为 87 500,从电泳结果(见图 4)可以看出,与对照相比,重组菌株获得一条与预期大小一致的特异条带。由此可以推断该特异蛋白质条带为嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶亚基的条带。

1. 蛋白质相对分子质量标记; 2. JM109 · pBV220-*perA*; 3. JM109 · pBV220

图 4 转化子的全细胞 SDS-PAGE

Fig. 4 The total soluble cell proteins SDS-PAGE of transformed cells

2.3 重组菌在 LB 培养基中发酵条件的优化

2.3.1 LB 培养基中诱导时期对过氧化氢酶合成的影响 诱导时期对重组菌过氧化氢酶的表达水平有较大的影响,结果见图 5。在重组菌的对数生长中期(5 h)升高温度至 42 °C 进行诱导,可以获得较高的过氧化氢酶表达水平(63.6 U/mL),比对数生长早期和对数生长后期分别提高 68 % 和 88 %。这是因为在对数生长早期菌体生长浓度太低,而生长后期由于营养消耗、副产物增多及菌体老化等,使得菌体表达外源基因的能力降低。

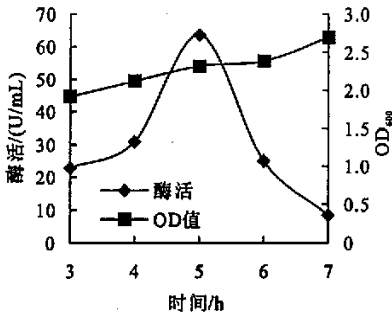


图 5 诱导时期对过氧化氢酶表达的影响

Fig. 5 Effect of inducing time on the catalase expression

2.3.2 LB 培养基中诱导时间对过氧化氢酶合成的影响 LB 培养基中诱导时间对过氧化氢酶合成的影响见图 6。在重组菌诱导表达外源基因的过程中,虽然菌体终浓度随着诱导培养时间的延长而增加,但过氧化氢酶表达水平在诱导培养时间为 5 h 时最高(31.3 U/mL),因此诱导时间最好为 5 h。

根据优化后的诱导时期(5 h)和过氧化氢酶合成的诱导时间(5 h)重新接种培养,测得酶活为 72.9 U/mL。

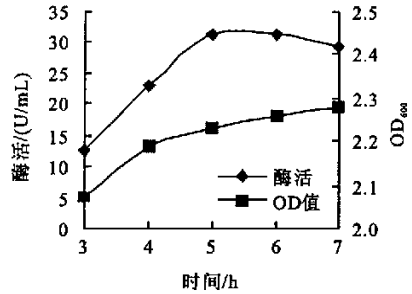


图 6 诱导时间对过氧化氢酶表达的影响

Fig. 6 Effect of inducing time on the catalase expression

2.4 重组菌在半合成培养基中发酵条件的优化

2.4.1 半合成培养基中起始葡萄糖浓度的优化

在半合成培养基中分别添加 5, 10, 20, 30, 40 g/L 6 种不同浓度的葡萄糖,在 30 °C、200 r/min 条件下摇瓶培养 4 h,然后转入 42 °C、200 r/min 条件下培养 4 h,测定菌体浓度 OD₆₀₀,见图 7。当葡萄糖质量浓度为 10 g/L 时,菌体浓度达到最大,随着葡萄糖质量浓度的增加,菌体浓度又呈下降趋势。这是由于随着葡萄糖质量浓度的增加,菌体代谢产酸增多,从而导致 pH 值不断下降,最终抑制了菌体的生长。

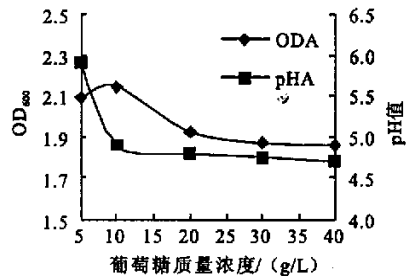


图 7 葡萄糖质量浓度对菌体质量浓度及 pH 值的影响

Fig. 7 The effect of glucose on the bacteria growth and pH

2.4.2 半合成培养基中诱导时期对过氧化氢酶合成的影响

在半合成培养基中改变诱导时期,而诱导时间都为 5 h 的条件下发酵。图 8 显示,当培养时间为 4 h 时,产酶活力最高为 115.2 U/mL,此时菌体浓度并非最大;而继续培养时,菌体浓度虽然增大,但不利于诱导表达外源基因。

2.4.3 半合成培养基中诱导时间长度对过氧化氢酶合成的影响

半合成培养基中诱导时间长度对过氧化氢酶合成的影响见图 9。在诱导时期都为 5 h,诱导时间从 4 ~ 7 h 条件下,过氧化氢酶合成水平在诱导 6 h 时达到最高,酶活力为 97.8 U/mL,

因此诱导时间长度最好为6 h。

根据优化后的诱导时期(4 h)和诱导时间长度(6 h)进行发酵,收集菌体破碎细胞,测得半合成培养基中产酶活力为131 U/mL,比在LB培养基中提高了79.7%。

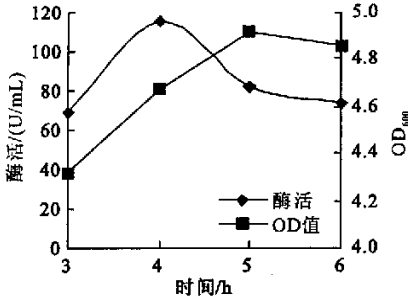


图8 诱导时期对过氧化氢酶表达的影响

Fig. 8 Effect of inducing time on the catalase expression

3 结论

作者构建了耐热过氧化氢酶温控表达载体,并

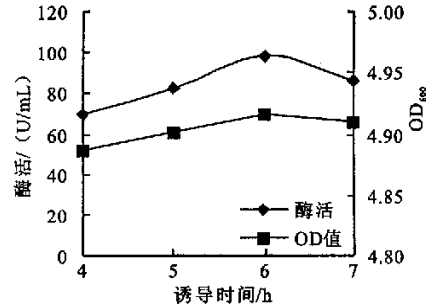


图9 诱导时间对过氧化氢酶表达的影响

Fig. 9 Effect of inducing time on catalase activity

转化大肠杆菌 JM109 得到高表达水平的工程菌。探讨了工程菌的产酶过程特征及其一些影响因素,包括培养基类型、诱导时期诱导时间长度、葡萄糖浓度。在LB培养基中,诱导时期和酶合成最佳诱导时间长度都为5 h,最大产酶量达到72.9 U/mL;在半合成培养基中,先在30 ℃培养4 h,再于42 ℃诱导培养6 h,产酶量最高达到131 U/mL。

参考文献:

- [1] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京:科学出版社,1989.
- [2] 方芳,李寅,堵国成,等. 一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力[J]. 生物工程学报,2003,5(3): 423-428.
- [3] 方芳. 纺织用碱性耐热过氧化氢酶的微生物法生产及其应用[D]. 无锡:江南大学,2004.
- [4] Suvit Loprasert, Seiji Negoro, Hirosuke Okada. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus stearothermophilus* peroxidase gene(perA)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(9): 4871-4875.
- [5] 陈惠鹏. 医药生物工程进展[M]. 北京:人民军医出版社,2004.
- [6] 张智清,姚立红,侯云德. 含PRPL启动子的原核高效表达载体的构建及其应用[J]. 病毒学报,1990,6(2): 111-116.
- [7] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂译. 北京:科学出版社,2002.
- [8] Haas A, Brehm K, Kreft J, et al. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding *listeria seeligeri* catalase a bacterial enzyme highly homologous to mammalian catalases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 5159-5167.
- [9] Bergmeyer H U. Methods of Enzymatic Analysis[M]. Weinheim: Verlag Chemie, 1983.
- [10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999.

(责任编辑:李春丽)