

文章编号: 1673-1689(2011)02-0283-04

## *Clostridium cellulolyticum* D-塔格糖 3-差向异构酶基因的克隆、表达及酶活性

储菲菲<sup>1</sup>, 邢庆超<sup>1</sup>, 沐万孟<sup>1</sup>, 张涛<sup>1</sup>, 缪铭<sup>1</sup>, 江波<sup>\*1</sup>, 周榴明<sup>2</sup>  
(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 罗盖特美国公司, 美国基奥卡克, 52632)

**摘要:** D-塔格糖 3-差向异构酶是生物法生产新型功能性因子 D-阿洛酮糖最为有效的酶。作者克隆到一种新型的 D-塔格糖 3-差向异构酶基因, 来源于微生物 *Clostridium cellulolyticum* H10。以 pET-22b(+) 为载体质粒, *E. coli* BL21(DE3) 为宿主细胞, 构建了基因重组菌, IPTG 可诱导目的蛋白质的过量表达; 经亲和层析纯化的重组蛋白质样品进行 SDS-PAGE 分析, 在约 31 000 处出现显著的特征蛋白质条带; 活性检测结果表明: 该重组酶具有较高的转化活性。

**关键词:** D-塔格糖 3-差向异构酶; D-阿洛酮糖; 克隆; 表达; 亲和层析

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

### Cloning, Expression and Characterization of *Clostridium cellulolyticum* D-Tagatose 3-Epimerase

CHU Feifei<sup>1</sup>, XING Qing-chao<sup>1</sup>, MU Wan-meng<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>,  
MIAO Ming<sup>1</sup>, JIANG Bo<sup>\*1</sup>, ZHOU Liu-ming<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Roquette America, Keokuk, 52632, United States)

**Abstract:** D-tagatose 3-epimerase (DTE) is the most effective enzyme for the biological production of D-psicose, a novel functional factor. In this study, a novel gene encoding DTE from *Clostridium cellulolyticum* H10 was cloned. pET-22b(+) was for the plasmid, *E. coli* BL21 (DE3) acted as host cells, then the recombinant strains were constructed. The target protein was over-expressed by IPTG induction; the recombinant DTE purified to electrophoretical homogeneity with affinity chromatography was analyzed by SDS-PAGE, showing approximately 31 000 characteristic protein. The result of activity detection revealed that the recombined enzyme had a higher transforming activity.

**Key words:** D-tagatose 3-epimerase, D-psicose, cloning, expression, affinity chromatography

稀有糖是自然界存在极少的单糖及其衍生物的总称, 具有独特的保健功能和潜在的医疗价值。

收稿日期: 2010-06-22

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP31002); 江苏省社会发展科技支撑项目(BE2010626)。

\* 通信作者: 江波(1962-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品科学和酶应用技术方面的研究。Email: bjiang@jiangnan.edu.cn

D-阿洛酮糖是D-果糖在C3位置的差向异构体,是近年发现的一种具有特殊保健功能的新型功能性因子,甜度相当于果糖的70%,能量只有蔗糖的0.3%,具有低能量、改善肠道菌群、降低血糖、抗龋齿等生理功能<sup>[1-3]</sup>。

D-塔格糖3-差向异构酶(D-tagatose 3-epimerase, DTE)家族蛋白可催化D-果糖异构为D-阿洛酮糖,是D-阿洛酮糖生物转化生产的关键酶<sup>[4]</sup>。1993年,日本香川大学稀有糖研究中心Izumori课题组首次发现了DTE家族<sup>[5]</sup>,该酶来源于菊苣假单胞杆菌ST-24(*Pseudomonas cichorii*)。近几年,韩国世宗大学(Sejong University)Oh团队和中国江南大学江波教授团队也陆续展开研究。目前已确定的DTE家族蛋白只有*Pseudomonas cichorii* DTE<sup>[5-7]</sup>、*Agrobacterium tumefaciens* D-阿洛酮糖3-差向异构酶<sup>[8-9]</sup>和*Rhodobacter sphaeroides* DTE<sup>[10-11]</sup>3种,这3种酶催化果糖转化率分别为20%、32%和23%。

作者以*Clostridium cellulolyticum* H10 DTE基因组为模板,通过基因合成获得DTE的编码基因,以pET-22b(+)为载体,构建获得重组质粒pET22b-cc-dte,并在大肠杆菌中实现成功表达,表达产物被鉴定具有较高的DTE生物活性,对于新型DTE的开发与D-阿洛酮糖产业化生产具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 载体与菌种** *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21(DE3):购于上海生工公司;克隆载体pUC57和表达载体pET-22b(+):购于上海闪晶分子生物科技有限公司。

**1.1.2 工具酶和试剂** DNA聚合酶、质粒抽提试剂盒、T4 DNA连接酶及脱氧核苷三磷酸(dNTP)、Wide Range DNA Marker(500~15 000)、DNA marker(*N* EcoR I+ *H*ind III)、限制性内切酶*Nde* I、*Xho* I:购自宝生物工程(大连)有限公司;低聚核苷酸:由上海生工合成;Chelating Sepharose Fast Flow:购自GE公司;蛋白质电泳标样:购自中科院上海生化研究所;Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)、D-阿洛酮糖标准品:购自Sigma公司;其它均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 *Clostridium cellulolyticum* H10 DTE基因的克隆** 编码*Clostridium cellulolyticum* DTE

的基因由上海闪晶分子生物科技有限公司合成,并于上下游引物5'端分别引入*Nde* I和*Xho* I酶切位点,合成后构建至克隆载体pUC57,获得重组质粒pUC57-cc-dte。将pUC57-cc-dte及质粒pET-22b(+)分别用*Nde* I和*Xho* I双酶切,回收目的片段后,以T4 DNA连接酶进行连接,连接产物转化至*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞中。通过筛选与鉴定,获得重组质粒阳性克隆,重组质粒命名为pET22b-cc-dte,将该重组质粒转化至*E. coli* BL21(DE3)获得重组菌*E. coli* BL21(pET22b-cc-dte)。

**1.2.2 *Clostridium cellulolyticum* H10 DTE基因重组菌的诱导表达** 将重组菌*E. coli* BL21(pET22b-cc-dte)接种于4 mL LB液体培养基(含50  $\mu$ g/mL氨苄抗生素)中,37  $^{\circ}$ C条件下200 r/min培养过夜。将其接种至200 mL LB培养基中,37  $^{\circ}$ C、200 r/min培养至OD值为0.6~0.8,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,28  $^{\circ}$ C下200 r/min诱导培养6 h。

**1.2.3 SDS-PAGE电泳分析** 取诱导后的菌液80  $\mu$ L,加入20  $\mu$ L 5 $\times$  SDS样品缓冲液,混匀后于沸水中加热3~5 min,12 000 r/min离心3 min,取20  $\mu$ L上清液进行浓缩胶质量浓度为4 g/dL,分离胶质量浓度为12 g/dL的SDS-PAGE电泳分析。

**1.2.4 重组DTE的纯化** 离心收集菌体,以Binding Buffer(50 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,pH 7.5)重悬菌体,超声波破碎细胞(250 W,超声1 s,停顿2 s,全程工作时间6 min)后,4  $^{\circ}$ C 15 000 r/min离心20 min,弃细胞碎片,收集上清液进行亲和层析纯化。采用Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose Fast Flow亲和介质填充层析柱,对重组蛋白质进行纯化。上柱前预先以3倍柱体积的Binding Buffer平衡亲和柱,样品上柱后以Wash buffer(50 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,50 mmol/L 咪唑,pH 7.5)洗脱杂蛋白,再用Elution buffer(50 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,pH 7.5)洗脱重组蛋白质,最终用Sample buffer(50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,pH 7.5)对洗脱蛋白质进行透析(以上操作均在4  $^{\circ}$ C条件下进行)。将纯化的重组蛋白质进行SDS-PAGE分析。

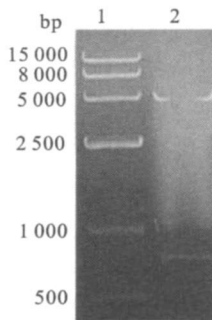
**1.2.5 重组DTE生物活性测定** DTE可催化果糖催化生成D-阿洛酮糖,底物果糖与产物D-阿洛酮糖质量浓度可通过HPLC进行测定。HPLC条件:Waters 600高效液相色谱仪,Sugarpak-1钙型阳离子交换柱,Waters 2410示差折光检测器;流动

相: 纯水, 柱温: 85 °C, 流速: 0.4 mL/min, 进样量: 10  $\mu$ L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组表达质粒 pET22b-cc-dte 的构建

编码 *Clostridium cellulolyticum* DTE 的基因通过基因合成并构建至 pUC57 载体质粒中获得重组质粒 pUC57-cc-dte。再经亚克隆将 *Clostridium cellulolyticum* DTE 基因通过 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切, 连接至表达载体质粒 pET-22b(+) 中, 获得重组质粒 pET22b-cc-dte, 酶谱鉴定结果见图 1。重组质粒 pET22b-cc-dte 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 得到 pET-22b(+) 线性片段和插入的目的基因片段, 该片段与 *Clostridium cellulolyticum* DTE 基因大小相同, 表明重组质粒构建成功。将该重组质粒送上海生工测序, 测序结果显示与预期完全吻合。



泳道 1: DNA 标样; 泳道 2: pET22b-cc-dte 质粒经 *Nde*I 和 *Xho*I 双切产物

图 1 重组质粒 pET22b-cc-dte 的酶切鉴定

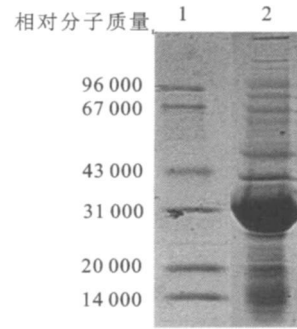
Fig. 1 Restriction enzymatic analysis of the recombinant plasmid pET22b-cc-dte

### 2.2 基因重组菌的诱导表达及重组 DTE 的纯化

对重组菌 *E. coli* BL21(pET22b-cc-dte) 的诱导表达进行了初步研究, 为了防止目的蛋白 DTE 形成大量包涵体, 使用诱导温度 28 °C。在此温度下, 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 可使重组 DTE 的量达到重组菌表达总蛋白的 40% 以上, 结果见图 2。经镍柱亲和层析的重组 DTE 样品进行 SDS-PAGE 分析, 见图 3。该重组 DTE 的相对分子质量约为 31 000, 与预期相对分子质量相吻合。

### 2.3 生物催化产物鉴定

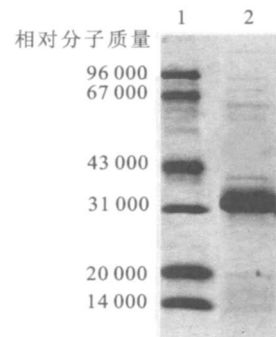
DTE 可催化果糖催化生成 D-阿洛酮糖, 底物果糖与产物 D-阿洛酮糖含量通过 HPLC 进行测定, 果糖与 D-阿洛酮糖的保留时间分别约为 14 min 和 20 min (见图 4a 和 4b)。果糖经重组菌生物转化产物 HPLC 分析结果见图 4c。结果表明, 该重组菌可以高效催化果糖制备 D-阿洛酮糖。



泳道 1: 为蛋白质标样; 泳道 2: 重组菌经诱导表达后的全细胞蛋白质

图 2 重组 DTE 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

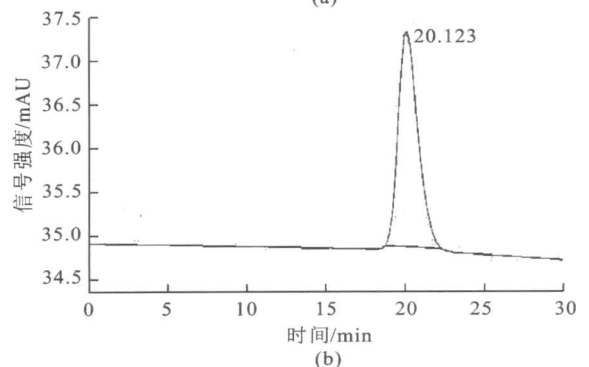
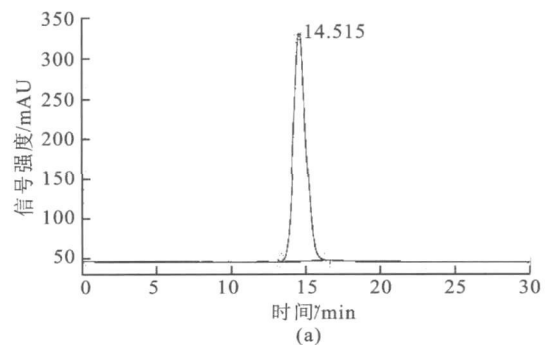
Fig. 2 Expression of the recombinant DTE in *E. coli* BL21(DE3)

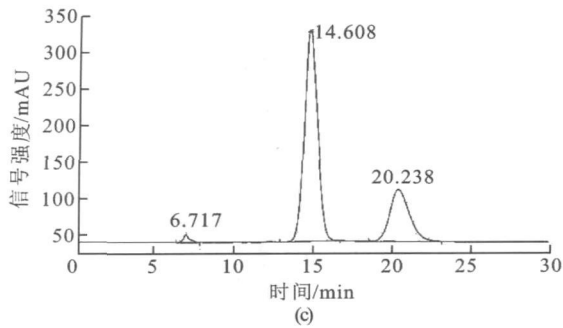


泳道 1: 为蛋白质标样; 泳道 2: 镍柱亲和和层析纯化后的重组 DTE

图 3 SDS PAGE 分析纯化的目标酶

Fig. 3 SDS PAGE analysis of the purified enzyme





a: 果糖标样; b: D-阿洛酮糖标样; c: 重组菌催化果糖反应产物

图4 D-阿洛酮糖转化产物的HPLC鉴定

Fig. 4 HPLC analysis of transferred product D-psicose

## 2.4 重组DTE的活性研究

利用重组DTE细胞进行果糖转化实验, 结果见图5。

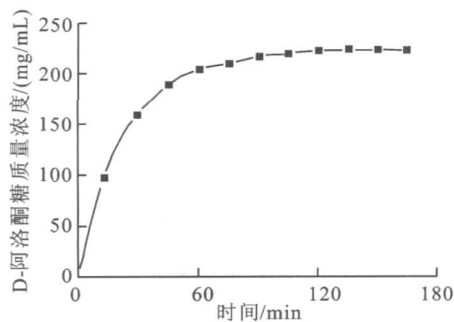


图5 重组DTE细胞催化果糖生产D-阿洛酮糖进程曲线

Fig. 5 Process curve of catalyzing fructose into D-psicose through recombinant DTE cells

## 参考文献(References):

- [1] Matsuo T, Suzuki H, Hashiguchi M, et al. D-Psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats[J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2002, 48(1):77-80.
- [2] Matsuo T, Baba Y, Hashiguchi M, et al. Dietary D-psicose, a G-3 epimer of D-fructose, suppresses the activity of hepatic lipogenic enzymes in rats[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2001, 10(3):233-237.
- [3] Matsuo T, Izumori K. Effects of dietary D-psicose on diurnal variation in plasma glucose and insulin concentrations of rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(9):2081-2085.
- [4] 沐万孟, 张涛, 江波. 稀有糖的生物转化生产策略: Izumoring 方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27: 129-136. MU Wanmeng, ZHANG Tao, JIANG Bo. A strategy for bioproduction of rare sugars: izumoring [J]. *China Biotechnology*, 2007, 27: 129-136. (in Chinese)
- [5] Izumori K, Khan A R, Okaya H, et al. A new enzyme, D-ketohexose 3-epimerase, from *Pseudomonas sp.* ST-24 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57: 1037-1039.
- [6] Itoh H, Okaya H, Khan A R, et al. Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas sp.* ST-24 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58: 2168-2171.
- [7] Yoshida H, Yamada M, Nishitani T, et al. Crystal structures of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* and its complexes with D-tagatose and D-fructose [J]. *J Mol Biol*, 2007, 374: 443-453.
- [8] Kim H J, Hyun E K, Kim Y S, et al. Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* D-psicose 3-epimerase that converts D-fructose to D-psicose[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72:981-985.
- [9] Kim K, Kim H J, Oh D K, et al. Crystal structure of D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* and its complex with true substrate D-fructose: a pivotal role of metal in catalysis, an active site for the non-phosphorylated substrate, and its conformational changes[J]. *J Mol Biol*, 2006, 361: 920-931.
- [10] Zhang L, Mu W, Jiang B, et al. Characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts D-fructose into D-psicose [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31: 857-862.
- [11] Zhang L, Jiang B, Mu W, et al. Characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* SK011 [J]. *J Biotechnol*, 2008, 136S: S726.

反应条件为 55 °C, pH 8.0, 在 750 mg/mL 的 D-果糖反应体系中, 55 °C 下反应 2 h, D-阿洛酮糖质量浓度达到 220 mg/mL, 转化率为 30%。在 DTE 家族蛋白中, *Pseudomonas cichorii* DTE<sup>[5-7]</sup>、*Agrobacterium tumefaciens* D-阿洛酮糖 3-差向异构酶<sup>[8-9]</sup> 及 *Rhodobacter sphaeroides* DTE<sup>[10-11]</sup> 催化果糖转化率分别为 20%、32% 和 23%。这充分说明该 DTE 基因在 *E. coli* 中得到了正确的表达, 并具有较高生物活性。

## 3 结语

作者以微生物 *Clostridium cellulolyticum* H10 的基因组 DNA 为模版, 通过基因工程构建获得重组质粒 pET22b-cc-dte, 将其成功转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中获得基因重组菌。IPTG 可诱导该基因重组菌过量表达重组 DTE, 表达量达到细胞总蛋白质的 40% 以上。经亲和层析纯化的重组蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 约在 31 000 处出现显著的特征蛋白条带, 进一步证明了该酶在 *E. coli* BL21 中得到了正确的表达。同时对该重组 DTE 的活性进行了初步研究, 在 55 °C 条件下, 全细胞反应 2 h, D-阿洛酮糖的转化率为 30%, 表明在大肠杆菌 *E. coli* BL21 中成功表达了具有生物活性的重组 DTE, 且该 DTE 具备工业化生产 D-阿洛酮糖的潜能。