

海栖热袍杆菌来源的极耐热碱性果胶裂解酶的表达、纯化及定性

李平¹, 景庆庆¹, 邵蔚蓝^{1,2}

1 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046

2 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

摘要: 将来源于极端嗜热菌属海栖热袍杆菌 *Thermotoga maritima* MSB8 的编码碱性果胶裂解酶的结构基因 *pelA* 与新型热激质粒 pHsh 连接, 得到重组质粒 pHsh-*pelA*, 运用 mRNA 二级结构预测软件对 pHsh-*pelA* 的翻译起始区的二级结构进行优化, 得到了具有最佳 mRNA 二级结构及自由能的质粒 pHsh-*pelC*。将重组质粒 pHsh-*pelC* 转入大肠杆菌 JM109(DE3)进行表达, 得到了一种极耐热碱性果胶裂解酶(PelC)。对重组酶的酶学性质研究发现, 该酶的最适反应温度为 90°C, 最适反应 pH 为 8.5, 在 pH 8.2~9.8 之间酶活力稳定, 95°C 酶活半衰期为 2 h, 并且该酶依赖 Ca²⁺作为活性离子。在工业生产常用温度 60°C 下, 该酶能够长时间保持稳定, 并具有较高的酶活力。以多聚半乳糖醛酸(PGA)为底物时, 其动力学参数 K_m 值为 0.11 mmol/L, V_{max} 值为 327 U/mg。SDS-PAGE 结果显示该重组酶的分子量为 43 kD, 与理论值相符。基于热激载体 pHsh 的重组表达系统具有诱导表达简便、诱导方式廉价的优点, 且重组酶热稳定性非常好, 这对该酶的大规模发酵应用具有重要意义。

关键词: 耐热碱性果胶裂解酶, 纯化定性, 热激载体

Expression, purification and characterization of a thermostable pectate lyase from *Thermotoga maritima*

Ping Li¹, Qingqing Jing¹, and Weilan Shao^{1,2}

1 Department of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: The structure gene *pelA* from *Thermotoga maritima* MSB8 encoding pectate lyase was amplified and ligated into pHsh, resulting pHsh-*pelA*. Through structural optimization on pHsh-*pelA*, the ultimate plasmid, pHsh-*pelC*, which possessed the most appropriate structure and free energy of mRNA, was obtained. Pectate lyase C (PelC) was obtained after expressing pHsh-*pelC* in *Escherichia coli* JM109. The optimum activity of PelC was determined at pH 8.5 at 90°C, with a half-life for almost 2 h at 95°C. PelC was stable at the pH range of 8.2–9.8, and was dependent on Ca²⁺ for activity and stability. The enzyme kept stable for a long time and possessed a high level of activity at 60°C. The kinetic assay using polygalacturonic acid (PGA) as substrate gave K_m and V_{max} of 0.11 mmol/L and 327 U per mg of protein. SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the expressed recombinant PelC was about 43 kD, which was exactly the size predicted. The expression vector system of the heat shock plasmid pHsh owned such advantages as high expression level and cheap induction. Moreover, the superior stability of the recombinant enzyme laid the base for large-scale fermentation application.

Received: September 27, 2008; **Accepted:** December 12, 2008

Corresponding author: Weilan Shao. Tel/Fax: +86-25-85891836; E-mail: wlshao@jssmail.com.cn

Keywords: thermostable pectate lyase, purification and characterization, heat-shock plasmid

果胶分子是不同酯化度的半乳糖醛酸以 α -1, 4 糖苷键聚合而成的多糖链, 常带有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、海藻糖、芹菜糖等组成的侧链, 游离的羧基部分或全部与钙、钾、钠离子, 特别是与硼化合物结合在一起^[1]。

碱性果胶裂解酶是果胶酶中的一种, 可在碱性条件下水解聚乳糖醛酸 α -1, 4 糖苷键并释放出可溶性不饱和寡聚乳糖醛酸。该酶在 C4 位置上断开糖苷键, 同时从 C5 处消去一个 H 原子从而产生一个不饱和产物。果胶酶在工业领域是一种重要的新兴酶类, 广泛应用于食品工业中的果汁制造和果酒酿造, 在饲料加工、环境保护、诱导植物抗病等方面都有重大的应用价值^[2]。近几年发现碱性果胶裂解酶是一种重要的清洁生产用酶, 主要运用于纸浆漂白和纺织品的生物精炼等行业^[3-5], 用于替代传统的纺织精炼, 通过酶解精炼的方法解决环境和能源等问题, 在质量与环保方面都具有传统工艺无法相比的优点。随着碱性果胶裂解酶的新用途的不断出现, 因此该酶是近年国内外研究的热点课题。

目前我国对碱性果胶裂解酶的研究工作主要集中在菌种筛选、发酵过程优化及酶特性研究等方面, 有关碱性果胶裂解酶基因工程菌构建方面的研究报道很少^[6], 关于热稳定性的碱性果胶裂解酶几乎没有。海栖热袍杆菌 *Thermotoga maritima* 产生的碱性果胶裂解酶具有的热稳定性好^[7], 在工业生产常用温度下酶学性质长时间保持稳定, 并具有较好的酶活力。因此采用基因工程的技术对 *T. maritima* 的果胶裂解酶进行高效率的表达具有一定的应用前景。本研究从 *T. maritima* 菌株中扩增出碱性果胶裂解酶基 *pelA*, 首次采用受 σ^{32} 调控的 pHsh 热激表达载体^[8], 对 *T. maritima* 来源的果胶裂解酶进行了表达, 并对其酶学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

海栖热袍杆菌 *Thermotoga maritima* MSB8 购自美国菌种保存中心, 编号为 ATCC43589; 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 购于 Promega (Wisconsin, WI,

USA); 质粒 pHsh 为本实验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂

限制酶 T4 DNA 连接酶和 DNA 聚合酶购自宝生物工程公司, 质粒抽提试剂盒, 割胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 底物多聚半乳糖醛酸(PGA)购于 Sigma 公司, 质粒小量提取试剂盒购于公司, UNIQ210 柱式 DNA 胶回收试剂盒购于上海生物工程技术服务有限公司, 抗生素购于 Amresco 公司, 其他所用试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 主要仪器

电转化仪、核酸电泳仪、蛋白胶电泳仪、UVP 凝胶成像系统购于 BIO-RAD 公司, pH 测定仪购于 Sartorius 公司, 紫外分光光度仪购于 UNICO 公司, 高压细胞破碎仪购于 Thermo 公司, 水浴锅购于上海一恒科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件

电转化用 SOC 培养液, 转化子的选择用含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基平板, 转化后的大肠杆菌用含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 液态培养基培养, 配方见文献^[9]。

T. maritima 培养基的制备及 *T. maritima* 的接种与培养参考文献^[10]。

1.2.2 基因操作

T. maritima 基因组 DNA 提取, DNA 的内切酶水解和连接, DNA 片段的分离、感受态细胞的制备以及基因的高效电转化方法均参照文献^[9]。质粒的制备, 从琼脂糖凝胶回收 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.2.3 碱性果胶裂解酶表达载体的构建

根据已经报道的 *T. maritima* 的果胶裂解酶基因序列以及 pHsh 中的限制性酶切位点设计 2 条特异性 PCR 引物: *pelA*-1, 5'-cccctgcagatgctcatgaggtttct-3' (下划线为 *Pst* I 酶切位点); *pelA*-2, 5'-cccctgcagttactagccgtatttag-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。用此引物, 以 *T. maritima* 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。该 PCR 扩增反应体系为 50 μ L, 模板和 2 条引物加入量分别为 100 ng 和 300 ng, 采用 TaKaRa Ex *Taq* DNA 聚合酶。该 PCR 扩增反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性

5 min, 扩增反应 30 个循环(94°C 变性 30 s, 50°C 复性 30 s, 72°C 延伸 1.5 min), 72°C 保温 10 min。电泳检测 PCR 扩增产物并将目的片段回收纯化, 用 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切, 割胶回收并乙醇沉淀浓缩, 以适当比例与 *Pst* I 和 *Xho* I 双酶切的载体 pHsh 混合, 16°C 下连接, 转化大肠杆菌 JM109 获得含 *pelA* 基因的重组表达载体 pHsh-*pelA*。

1.2.4 重组表达质粒 pHsh-*pelA* mRNA 二级结构优化

取重组质粒 pHsh-*pelA* 从转录起始位点开始至下游 76 个碱基进行在线 mRNA 二级结构分析, 网址 <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mflod>, 具体序列如下(5'-3'): ACCTGTTAACCGTCGACAAGAA GGAG ATATACCCATGGAGGCTCTAGACTGCAG ATGCTCATGAGGTTTTCTCGT, 得出预测的 mRNA 二级结构分析图。

通过碱基的替换和数目的变化, 得出具有最佳 mRNA 二级结构及自由能质粒, 命名为 pHsh-*pelC*。

同样取从转录起始位点开始至下游 76 个碱基在线分析。

设计 2 条引物: *pelC*-1, 5'-ttcggctgctgacgtctaaA attaatccaaatcatctcaccaaagaaa-3'; *pelC*-2, 5'-ccatttttatctctctctgtctctttttctattcattggatcat-3'。以质粒 pHsh-*pelA* 为模板进行反向 PCR。为提高扩增的保真性, 用 TaKaRa *Pyrobest* DNA 聚合酶进行扩增。通过 PCR 纯化试剂盒对扩增产物进行纯化, 由于 *Pyrobest* DNA 聚合酶扩增产物的两端都是平末端, 因此在磷酸化后, 可以用 T4 DNA 连接酶直接进行片段内连接, 并转化大肠杆菌 JM109 获取重组质粒 pHsh-*pelC*。

1.2.5 果胶裂解酶基因在原核表达载体中的表达

将构建好的重组质粒 pHsh-*pelC* 转入大肠杆菌 JM109, 挑取单菌落接入含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养液中。30°C 培养至 OD_{600} 0.6~0.8, 转入 42°C 热激诱导 8 h, 离心收集菌体, 破碎细胞, 取上清, 跑 SDS-PAGE 胶检测果胶裂解酶基因在原核表达载体中的表达情况。

1.2.6 重组酶的分离纯化

重组菌的培养: 将含有质粒 pHsh-*pelC* 的大肠杆菌 JM109 的 LB 平板菌种接种于含有氨苄青霉素抗性 LB 液体培养基中, 30°C 培养至 OD_{600} 0.6~0.8, 转入 42°C 热激诱导 8 h。

重组酶的纯化: 将离心收集的细胞用 50 mmol/L 的 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液重悬, 经高压细胞破碎仪破碎细胞, 13 000×g 离心 15 min, 取上清于 80°C 热处理 0.5 h 后, 13 000×g 离心 15 min。离心上清液过阴离子柱(离子交换层析), 经 NaCl 离子梯度洗脱, 完成粗酶纯化, 使重组酶达到电泳均一。

1.2.7 酶活性测定

活性测定采用分光光度法, 根据果胶裂解酶只能裂解果胶中贴近甲酯基的 α -1, 4 糖苷键的原理, 测定生成在还原端的 C4 和 C5 位置有不饱和键的半乳糖醛酸的量。设计反应体系为 200 μ L, 内含 50 μ L 20 mmol/L 底物 PGA, 148 μ L 20 mmol/L 的一系列缓冲液(Tris, Glycine)^[11], 加入 2 μ L 重组酶反应 20 min, 最后加入 700 μ L 0.1 mol/L 的 HCl 终止反应, 235 nm 处测定其吸光值^[12]。

果胶裂解酶的一个酶活单位(1U)定义为: 在一定反应条件下, 每分钟释放 1 μ mol 不饱和半乳糖醛酸所需酶量^[13]。

PelC 的活性和稳定都完全依赖 Ca^{2+} , 因此在配置的反应缓冲液中都加入了 0.2 mmol/L 的 Ca^{2+} 。

1.2.8 重组酶的性质分析

重组酶的 Ca^{2+} 依赖性测定: 通过有无 Ca^{2+} 的反应体系在 235 nm 处的吸光值来判定其对 Ca^{2+} 的依赖性, 缓冲液为 pH 8 的 Tris/Glycine。

最适反应温度的测定: 在 50°C~100°C 范围内, 每隔 10°C, 缓冲液为 pH 8 的 Tris/Glycine, 分别测定酶活。以酶活最高为 100%, 计算相对酶活。

最适反应 pH: 在 pH 7.0~11.0 范围内, 缓冲液为 Tris/Glycine, 每隔 pH 0.4, 分别测定酶活, 以酶活最高为 100%, 计算相对活性。

温度稳定性: 在最适反应 pH 8.5 下, 缓冲液为 Tris/Glycine, 使酶在某个温度下保温不同的时间, 再测定相对酶活, 以未保温 (4°C 保存) 的酶样活性为 100%, 计算百分比, 确定酶的温度稳定性。

pH 稳定性: 酶在 pH 6.8~11.0 条件下, 缓冲液为 Tris/Glycine, 以最适反应温度 90°C 保温 2 h 后, 再分别测定残留酶活性, 与不保温酶的酶活相比, 计算百分比, 确定酶的 pH 稳定性。

酶的动力学参数的测定: 以 20 mmol/L 的 PGA 为底物母液, 分别以 4~50 μ L 不等的量加入终体积为 200 μ L 酶活反应体系中, 在最适反应条件下, 测

定酶活力。采用 Eadie-Hofstee 作图法, 计算动力学参数。

金属离子及有机抑制剂对酶活性影响的测定: 以 2 μL 酶、1 μL 金属离子或者有机抑制剂、50 μL 20 mmol/L PGA、147 μL Tris/Glycine 缓冲液为 200 μL 反应体系, 在最适反应条件下测定酶活力, 以加入 Ca^{2+} 的反应体系中的酶活力作为 100%, 计算百分比, 确定金属离子及有机试剂对酶活性的影响。选取的金属离子分别为 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Hg^{2+} , 选取的有机抑制剂分别为 EDTA、SDS 和 Triton-X100。

2 结果

2.1 原核表达质粒的构建

琼脂糖电泳检测结果表明, 扩增的果胶裂解酶基因片段在 1.1 kb 左右, 用限制性内切酶 *Pst* I 和 *Xho* I 对重组质粒 pHsh-*pelA* 分别进行单酶切和双酶切验证。结果如图 1 所示, 该重组质粒 pHsh-*pelA* 能被得到 1 条 3.5 kb 的条带或者 2 条分别为 1.1、2.4 kb 的条带, 符合重组质粒应有特性, 因此, 初步证实碱性果胶裂解酶基因已插入热激载体中。

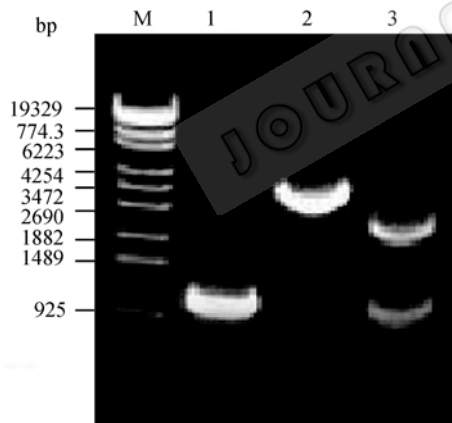


图 1 重组质粒 pHsh-*pelA* 酶切及 PCR 扩增片段鉴定

Fig. 1 PCR amplification of *PelA* and enzyme identification of recombinant plasmid. M: maker; 1: PCR amplification of gene; 2: single enzyme digest of pHsh-*pelA*, 3.5 kb; 3: double enzyme digestion of pHsh-*pelA*, 2.4 kb, 1.1 kb.

优化重组质粒 pHsh-*pelA* mRNA 翻译起始区的二级结构, 优化结果如图 2 所示, 利用合成引物以 pHsh-*pelA* 为模板进行反向 PCR, 用 T4 DNA 连接酶直接进行片段内平端连接, 并转化大肠杆菌

JM109 提取质粒 pHsh-*pelC*(图 3)。

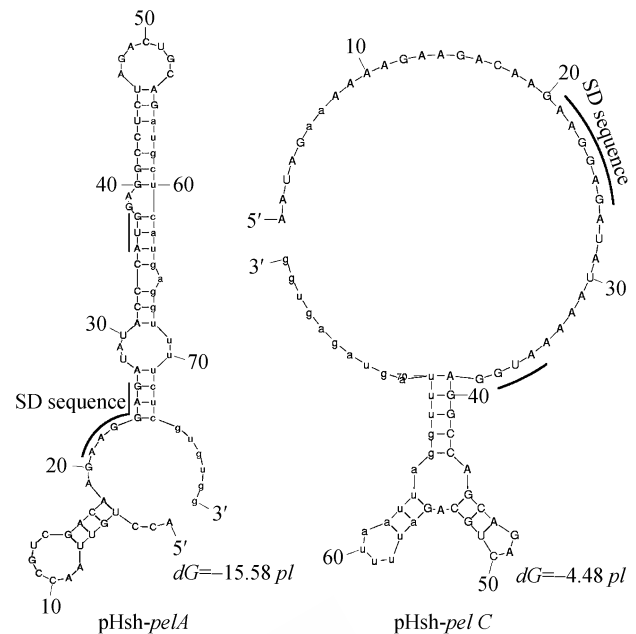


图 2 重组质粒 pHsh-*pelA* 及优化后的 pHsh-*pelC* 的 mRNA 二级结构

Fig. 2 mRNA secondary structure of recombinant plasmid pHsh-*pelA* and pHsh-*pelC*.

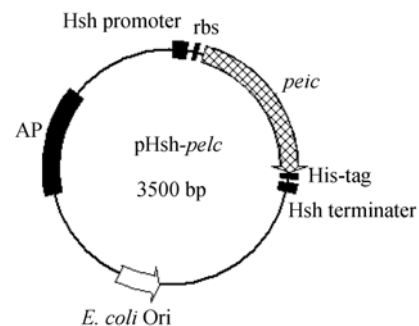


图 3 重组质粒 pHsh-*pelC* 的构建图谱

Fig. 3 Construction map of pHsh-*pelC*.

由图 2 可知, 优化后质粒的 mRNA 二级结构中, 原来的发卡结构被彻底破坏, SD 序列和 AUG 均被释放到一个很大的环状结构中, 核糖体能够毫无阻碍地与 mRNA 结合, 起始重组蛋白的翻译。所分析区域的自由能也变为 -4.48 cal/mol , 由于自由能的绝对值越小, 所形成的 mRNA 的结构越不稳定, 从而更利于翻译的顺利进行, 同时 SD 序列和 AUG 的间距也处于最佳的 8 个碱基^[14]。

2.2 碱性果胶裂解酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化和 SDS-PAGE 分析

重组质粒 pHsh-*pelA*、pHsh-*pelC* 和质粒 pHsh 转化大肠杆菌 JM109, 表达后取全细胞蛋白进行 SDS-PAGE (分离胶的浓度为 10%) 分析, 考马斯亮蓝染色的结果见图 4。以 pHsh 转化产物为对照, 从电泳图谱上可以看出, 含有重组质粒 pHsh-*pelA* 和 pHsh-*pelC* 的大肠杆菌在分子量 43 kD 处都有明显的蛋白表达带, 与预期的蛋白相对分子量大小一致, 由此可知碱性果胶裂解酶基因通过热激质粒 pHsh 在大肠杆菌中实现了表达。含质粒 pHsh-*pelA* 的重组菌中蛋白表达量较低, 经扫描确认表达量为 3.7%。含质粒 pHsh-*pelC* 重组菌中蛋白表达量显著提高了约 1 倍左右, 经扫描确认为 8.3%。

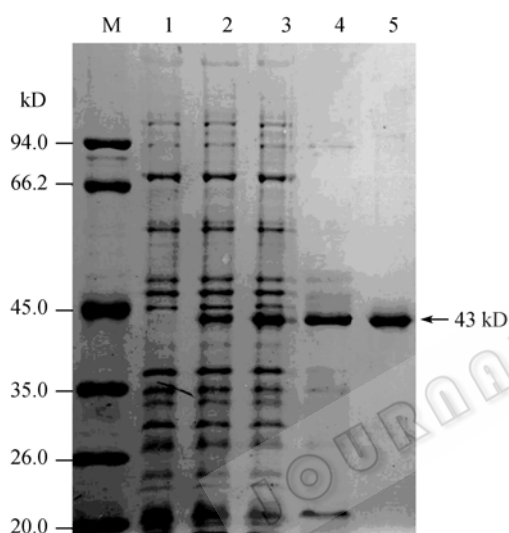


图 4 碱性果胶裂解酶纯化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of pectate lyase C in purification steps. M: protein marker; 1: crude extract of *E. coli* JM109/pHsh; 2: crude extract of *E. coli* JM109 /pHsh-*pelA*; 3: crude extract of *E. coli* JM109 /pHsh-*pelC*; 4: proteins remained after a heat treatment of 30 min; 5: the purified recombinant PelC protein.

将热激诱导的菌体裂解, 80°C 热处理 0.5 h, 取上清液, 过 DEAE-Sepharose FF 柱, 经 NaCl 离子梯度洗脱, 完成粗酶纯化。SDS-PAGE 检测结果表明重

组酶经以上处理后, 酶纯度达到电泳均一。纯化各步骤相应的酶活性、蛋白浓度、收率和纯化倍数见表 1。由表 1 可知, 热处理去除了大部分的杂蛋白和色素, 使得纯化倍数提高到 6.3, 整个纯化过程中酶活力的回收率为 24.6, 纯化了 9.4 倍, 比活力从 11 U/mg 提高至 103 U/mg。

2.3 重组酶的酶学性质

对重组碱性果胶裂解酶进行初步酶学性质研究 (图 5~9), 结果表明该酶具有很好的热稳定性, 是一种耐热性很好的酶。该酶的最适反应温度为 90°C, 95°C 酶活半衰期为 2 h, 100°C 保温 1 h 酶活力仍保持在 30% 左右, 工业生产常用温度 60°C 下该酶的酶学性质长时间保持稳定, 并具有较好的酶活力。该酶反应最适 pH 为 8.5, 在 pH 8.2~9.8 之间酶活力稳定, 从 pH 7.0~8.5 酶活急速升高, 在 pH 7.0 左右基本没有酶活, 而在 pH 8.5 时达到最高, 从 pH 8.5~9.8 酶活是缓慢降低, 而在 pH 9.8 后酶活又快速下降。由表 2 可知, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Hg^{2+} 都不能代替 Ca^{2+} 对该酶的作用, Ba^{2+} 、 Hg^{2+} 、SDS 和 Triton-X100 对此酶活性有严重抑制作用, 该酶需要完全依靠 Ca^{2+} 作为活性离子。以 PGA 为底物时, 在 90°C、pH 8.5 条件下, 其动力学参数 K_m 值为 0.11 mmol/L (图 9), V_{max} 值为 327 U/mg。

3 讨论

构建合适的极端菌的外源基因表达系统, 高效率地表达一些极端酶, 一直是人们研究的热点。*T. maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧真细菌, 生长在 55°C~90°C 海底火山口处, 是极端耐热性酶的重要来源。但是 *T. maritima* 生长条件要求苛刻, 细胞密度较低, 不适合工业化生产。利用基因重组技术, 将 *T. maritima* 的碱性果胶裂解酶基因通过合适的载体在大肠杆菌中高效表达, 可为该酶的大规模制备及后续的工业化应用奠定基础。

表 1 大肠杆菌中重组碱性果胶裂解酶的纯化过程

Table 1 Purification process of pectate lyase C in *E. coli*

Step	Total protein (mg)	Total activity(U)	Specific activity (U/mg)	Recovery rate (%)	Purification (fold)
Crude extract	232.0	2552	11.0	100.0	1.0
Heat treatment	18.6	1298	69.8	50.9	6.3
DEAE-Sepharose FF	6.1	628	103.0	24.6	9.4

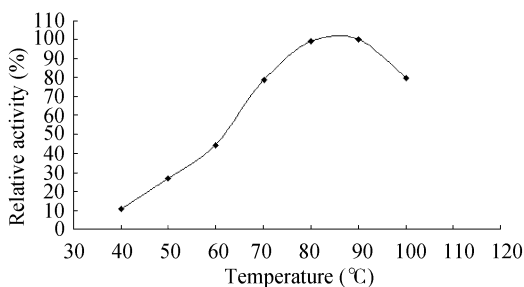


图 5 碱性果胶裂解酶的最适反应温度
Fig. 5 Optimum temperature for pectate lyase C activity.

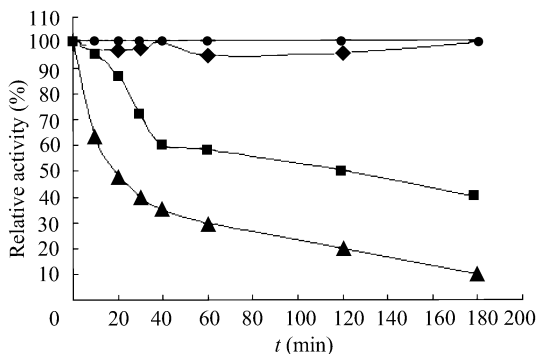


图 6 碱性果胶裂解酶的温度稳定性
Fig. 6 Thermal stability of pectate lyase C. The purified enzyme was pre-incubated for various time at 60°C (●), 90°C (◆), 95°C (■) and 100°C (▲).

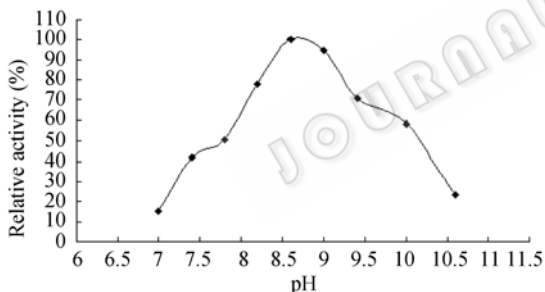


图 7 碱性果胶裂解酶的最适反应 pH
Fig. 7 Optimum pH for pectate lyase C activity.

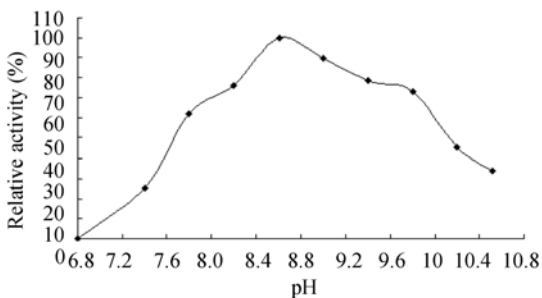


图 8 碱性果胶裂解酶的 pH 稳定性
Fig. 8 pH stability of pectate lyase C.

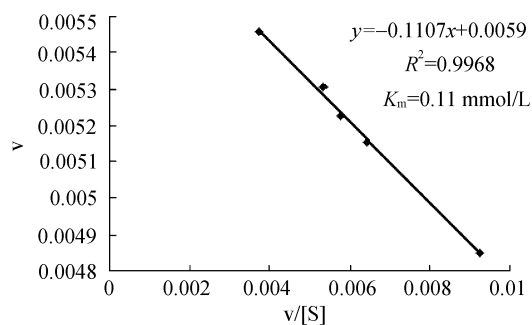


图 9 碱性果胶裂解酶的动力学参数 K_m
Fig. 9 K_m of pectate lyase C.

表 2 金属离子及抑制剂对碱性果胶裂解酶活性的影响
Table 2 Effect of metal ions and inhibitors on the activity of pectate lyase C

Metal ions and surfactants	Pectate lyase C (relative activity, %)
Ca ²⁺	100.0
Mn ²⁺	27.4
Co ²⁺	15.6
Cu ²⁺	16.7
Ba ²⁺	4.2
Zn ²⁺	18.3
Ni ²⁺	11.5
Hg ²⁺	5.1
EDTA	17.8
SDS	3.7
Triton-X100	6.4

Various ion reagents were used at 1 mmol/L, EDTA (1 mmol/L), SDS (0.1%, W/V) and Triton-X100 (0.05%, V/V). The activity with Ca²⁺ was taken as 100%. Values shown are the mean of duplicate experiments, and the variation about the mean was below 5%.

该重组酶的最适反应温度为 90°C, 95°C 酶活半衰期 2 h, 热稳定性非常好, 在 pH 8.2~9.8 之间酶活稳定, 具有很高的耐碱性, 是至今为止报道的少有的热稳定性耐碱性非常好的酶类。在有些工业应用中, 为了提高生产效率, 常在高温高碱等极端条件下对工业原材料进行处理, 如需添加辅助酶类, 该酶的耐热耐碱性能力就得到了体现。同时, 在不需要太高温度的常规工业生产中, 比如纸浆漂白和纺织品的生物精炼等, 该酶的酶学性质长时间保持稳定, 并具有较好的酶活力, 保存相对比较容易, 可以应用于一般条件下的工业生产。因此, 该极耐热性碱性果胶裂解酶具有很好的工业应用前景。

本研究采用了本实验室构建的具有自主知识产权的热激载体 pHsh 作为表达载体, 该表达载体是由

大肠杆菌 σ^{32} 调控, 包括一个热激启动子和终止子, 通过热激就可以高效的表达外源基因, 所以在诱导外源基因表达过程中就不需要加入化学诱导剂, 而化学诱导剂比较昂贵, 是基因工程菌株在工业化应用中的一个瓶颈。而热激诱导能很好的减少基因诱导表达时的成本, 这无疑在工业化应用中具有巨大的优越性和现实意义。实验中利用海栖热袍杆菌碱性果胶裂解酶的极耐热性, 将重组菌细胞破碎后的上清经过 80°C 的热处理后就基本纯化, 可以用于工业应用, 这大大地简化了重组酶的纯化步骤同时也极大的降低了该酶的下游处理成本; 同时, 经过对碱性果胶裂解酶重组表达质粒的二级结构优化, 重组菌中碱性果胶裂解酶蛋白表达量明显提高, 降低了其工业生产成本, 为该重组酶的大规模工业化提取奠定了基础。

本研究着重对重组酶的酶学性质进行了分析和测定, 并对其工业应用前景进行了探讨和展望; 但对该耐热耐碱酶的分子机制研究还处于探索阶段。我们相信, 对该酶的分子机制的更进一步研究, 将有利于后续的更多微生物极端酶的开发和利用。

REFERENCES

- [1] Perez S, Rodriguez-Carvajal MA, Doco T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 2003, **85**: 109–121.
- [2] Xue CH, Zhang YQ, Li ZJ, *et al.* Recent development of pectin and pectolytic enzyme. *J Food Sci Bio*, 2005, **24**(6): 94–99.
薛长湖, 张永勤, 李志军, 等. 果胶及果胶酶研究进展. *食品与生物技术学报*, 2005, **24**(6): 94–99.
- [3] Bruhlmann F, Leupin M, Erismann KH, *et al.* Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *J Biotechnol*, 2000, **76**: 43–50.
- [4] Zhang J, Henriksson G, Johansson G. Polygalacturonase is the key component in enzymatic retting of flax. *J Biotechnol*, 2000, **81**: 85–891.
- [5] Liu CL, Wang XL. The key of cost effectiveness to the preliminary treatment of environment friendly. *Yin Ran Yi Cong*, 2000, **4**: 41–44.
刘昌龄, 王秀玲. 成本有效对环境有利的前处理的关键. *印染译丛*, 2000, **4**: 41–44.
- [6] Zhuge B, Du GC, Chen J, *et al.* Properties of alkaline pectate lyase from recombinant strain *E. coli* JM109 (pHsh PL). *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48**(1): 121–125.
诸葛斌, 堵国成, 陈坚, 等. 重组菌产碱性果胶酯裂解酶酶学性质研究. *微生物学报*, 2008, **48**(1): 121–125.
- [7] Kluskens LD, van Alebeek GJWM, Voragen AGJ, *et al.* Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Biochem*, 2003, **370**: 651–659.
- [8] Shao WL, Wu HW, Pei JJ. Novel expression vector system regulated by sigma32 and methods for using it to produce recombinant protein: US patent, US 2007/0254335A1. 2007-11-07.
- [9] Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Wang Z, Pei JJ, Shao WL, *et al.* Expression, characterization and application of thermostable β -glucuronidase from *Thermotoga maritima*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(8): 1407–1412.
王卓, 裴建军, 邵蔚蓝, 等. 极耐热性 β -葡萄糖醛酸酶的高效表达和酶学性质及其应用. *生物工程学报*, 2008, **24**(8): 1407–1412.
- [11] Zhao QX, Yuan S, Zhang YL, *et al.* Expression, purification and characterization of pectate lyase A from *Aspergillus nidulans* in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**: 1057–1064.
- [12] Macmillan JD, Vaughn RH. Purification and properties of a polygalacturonic acid-trans-eliminase produced by *Clostridium multifementans*. *J Biochem*, 1964, **3**: 564–572.
- [13] Collmer A, Ried JL, Mount MS. Assay methods for pectic enzymes. *Methods Enzymol*, 1988, **161**: 329–335.
- [14] de Smit M, van Duin J. Secondary structure of ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(19): 7668–7672.