

# 纳豆激酶基因在 *E. coli* HB101 中的初步表达研究\*

罗立新 黄志立\*\* 杨汝德 凌均建 梁世中

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

**摘要:** 利用 PCR 技术以纳豆杆菌染色体 DNA 为模板扩增纳豆激酶基因, 将该基因克隆到温度诱导型表达载体 pBV220 上, 转化 *E. coli* HB101, 获得转纳豆激酶基因重组菌。在确定了其最佳培养时间与诱导时间后, SDS-PAGE 分析结果表明基因表达产物为分泌型, 蛋白表达量占菌体蛋白的 12% 左右, 液体发酵后纳豆激酶产量可达 120U/mL 菌液。对重组菌中重组质粒的稳定性进行研究, 结果表明该质粒在宿主菌中具有良好的分离稳定性, 而结构稳定性较差。

**关键词:** 纳豆激酶基因, 克隆, 表达, 质粒稳定性

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0062-04

\* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 980540)

\*\* 现在深圳职业技术学院生物应用工程系

收稿日期: 2001-04-25, 修回日期: 2001-06-30

CLONING OF NATTOKINASE GENE AND EXPRESSION IN *E. COLI*

LUO Li-Xin HUANG Zhi-Li YANG Ru-De LING Jun-Jian LIANG Shi-Zhong

(The college of food engineering and biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

**Abstract:** In this study, nattokinase gene was amplified by PCR using *bacillus subtilis* chromosomal DNA as template and cloned into expressed vector pBV220. After transforming recombinant plasmid into *E. coli* HB101, the recombinant strain was yielded. It was proved that expression products was secretive and expression protein was 12% of total cell protein by SDS-PAGE. Optimum culture time and inducing time was determined as 6h and 5h respectively. The plasmid stability studies showed that recombinant plasmid has excellent segregational stability but the structural stability was not good in the host cell.

**Key words:** Nattokinase gene, Cloning, Expression, Plasmid stability

纳豆激酶 (nattokinase, 以下简称 NK) 是一种枯草杆菌蛋白激酶, 也是具有纤溶活性的丝氨酸蛋白酶。1987年由日本的须见洋行等首先发现, 由于其具有无毒无副作用, 体内半衰期长, 成本低廉等其它溶栓剂无法比拟的优点, 极有可能成为新一代抗栓药物<sup>[1]</sup>。目前纳豆激酶的生产国际上多采用通过改良菌种和纳豆生产工艺等方法来提高纳豆中纳豆激酶活性<sup>[2]</sup>。国内主要进行了纳豆杆菌液体发酵条件、纳豆激酶的纯化等方面的研究<sup>[3]</sup>。Nadamura 等于 1992 年测定了纳豆激酶基因序列<sup>[4]</sup>, 使从基因工程角度入手提高纳豆激酶活性及产量成为可能。本研究采用 PCR 方法克隆了纳豆激酶基因, 重组到表达载体上进行了初步的表达, 并研究了重组质粒的稳定性, 从而为利用基因工程技术在原核系统乃至真核系统中高效表达纳豆激酶奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和载体:** 纳豆杆菌为本室保存, *E. coli* HB101 由广州军区广州总医院医学实验室惠赠, 表达载体 pBV220 由中国医学科学院病毒学研究所侯云德等人构建, 由广州军区广州总医院医学实验室转赠。

**1.1.2 工具酶与试剂:** 限制性核酸内切酶 *Sal* I、*Xma* I 及  $T_4$  DNA 连接酶购于大连宝生物工程公司; *Hind* III 为美国 Promega 公司产品; TaqDNA 聚合酶、DNA / *Hind* III-*Eco*R I Marker 购于北京华美生物医学工程公司; 尿激酶、牛纤维蛋白原、牛凝血酶购自中国药品生物制品检定所; 其它生化试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 寡核苷酸引物的设计合成:** 根据 Nadamura 发表的纳豆激酶基因序列, 采用计算机 Goldkey Primer 软件设计合成 PCR 扩增所需的两个引物: 5' 引物, 带有 *Xma* I 限制性内切酶识别序列: 5'-AGCCCCGGTAAAGAGTGAGAAGC-3'; 3' 引物, 带有 *Sal* I 限制性内切酶识别序列: 5'-AAGTCGACATGGAGGAACCTGC-3'

**1.2.2 纳豆激酶基因的 PCR 扩增及克隆:** 将纳豆杆菌在斜面培养基中进行数次活化后接种入摇瓶, 35℃ 振荡培养 16h, 取 1.5mL 菌液于 Eppendorf 管中, 按照文献 [5] 的方法提取染色体总 DNA。以该 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得特异、高效、忠实的纳豆激酶基因产物<sup>[6]</sup>, 将 PCR 产物用 Sephacryl S-400 离心柱纯化。纯化产物与 pBV220 质粒分别进行 *Sal* I、*Xma* I 双酶切, 低熔点琼脂糖回收目的片段, 按照质粒 DNA: 目的

基因 = 1:5 的比例混合, 在  $T_4$  DNA 连接酶作用下于 14℃ ~ 16℃ 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* HB101 感受态细胞, 筛选阳性重组子, 提取重组质粒, 分别用 *Sal* I、*Xma* I 进行双酶切及利用 *Hind* III 进行单酶切, 同时以该重组质粒为模板, 以扩增纳豆激酶基因的引物为引物进行 PCR 扩增, 上述产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.3 表达产物的鉴定及活性测定:** 参照 CLT 法<sup>[7]</sup>, 检测重组菌的发酵上清液是否具有溶纤活性。pBV220 质粒属于温度诱导表达型, 培养温度为 30℃, 诱导温度为 42℃。通过分别测定在不同培养时间及诱导时间下, 重组菌的培养上清液中纳豆激酶的活性相当于尿激酶的单位数, 从而确定重组菌的最佳培养及诱导时间, 取在此条件下培养的菌液离心, 分别取上清液及细胞裂解液进行 SDS-PAGE 分析, 并测定发酵液中纳豆激酶表达量。

**1.2.4 重组质粒稳定性研究:** 质粒分离稳定性的检测采用平板稀释计数法和平板点种法, 将重组菌在非选择性液体培养基中连续培养, 在不同时间取等体积菌液分别涂固体选择性培养基和非选择性培养基平板, 30℃ 倒置培养 18h, 将选择性培养基中的菌落数与非选择性培养基中的菌落数进行比较, 计算出质粒的缺失率; 同时随机挑取在非选择性培养基上生长的菌落, 分别点种在对应的选择性培养基和非选择性培养基平板上, 比较两种平板中菌落数, 验证质粒的缺失率。在不同时间的选择培养基上挑出菌体提取质粒进行凝胶分析, 检测重组质粒的结构稳定性。

## 2 结果

### 2.1 纳豆激酶基因的 PCR 扩增及克隆

在优化条件下进行 PCR 扩增, 以  $\lambda$ DNA/*Hind* III-*Eco*R I Marker 为对照, 将产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。由图中可看出在 1.2kb 处有一明显的特异性扩增带, 与 NK 基因片段大小相符。将 PCR 产物与质粒 pBV220 同时进行 *Sal* I 和 *Xma* I 双酶切, 回收目的片段, 连接, 转化 *E. coli* HB101 感受态细胞, 利用氨苄青霉素抗性筛选出阳性重组子, 提取重组质粒进行酶切及 PCR 分析, 结果见图 2。

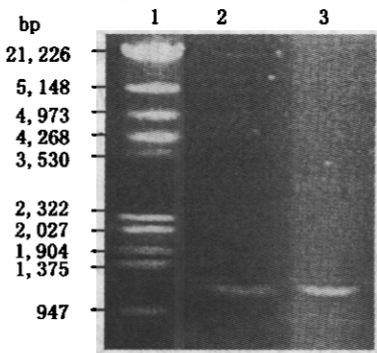


图 1 NK 基因的 PCR 扩增

1 DNA/*Hind* III-*Eco*R I Marker,  
2, 3 NK 基因 PCR 扩增产物

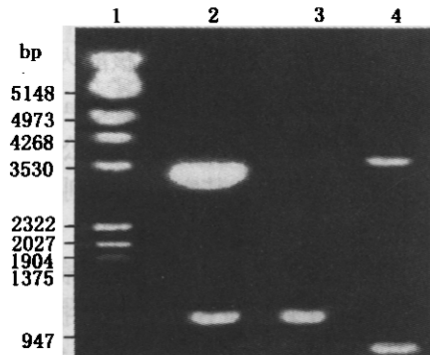


图 2 重组表达载体的凝胶电泳图谱

1 DNA/*Hind* III-*Eco*R I Marker, 2 重组质粒 *Xma* I、*Sal* I 双酶切,  
3 以重组质粒为模板的 PCR 扩增产物, 4 重组质粒 *Hind* III 酶切

重组质粒先后用 *Sal* I 和 *Xma* I 消化, 电泳图谱出现一条与 PCR 产物一致的带。在 pBV220 载体上和纳豆激酶基因内部各有一个 *Hind* III 酶切位点, 酶切重组质粒后产生大小为 800bp 和 3.9kb 左右的两个片段, 电泳图谱显示经 *Hind* III 消化后的重组质粒在

800bp 和 3.9kb 处各有一条明显的带。用纯化的重组质粒为模板进行 PCR 反应, 在 1.2kb 处出现明显的扩增带, 这说明重组质粒上克隆的外源基因即为纳豆激酶基因。为了进一步证实, 将 PCR 产物送交大连宝生物工程有限公司进行 DNA 序列测定, 将测序结果与已发表的纳豆激酶基因同区段序列作同源性比较分析, 结果表明 1.192kb 的基因片段中只有 11 个碱基不同, 同源率达到 99.08%。

## 2.2 表达产物的鉴定及活性测定

将重组菌的培养上清液与牛纤维蛋白原溶液混合, 加入牛凝血酶溶液, 摇匀, 置于 37℃ 水浴中观察, 发现溶液中首先出现凝块, 随后凝块溶解, 证明培养上清液中含有具溶纤活性的纳豆激酶。不同培养时间及诱导时间对表达产物的影响见图 3, 由图中可以看出, 在 30℃ 培养 6h, 42℃ 诱导 5h 时, 可获得较高的纳豆激酶表达量, CLT 法测得发酵上清液中纳豆激酶活性为 120U/mL 菌液。

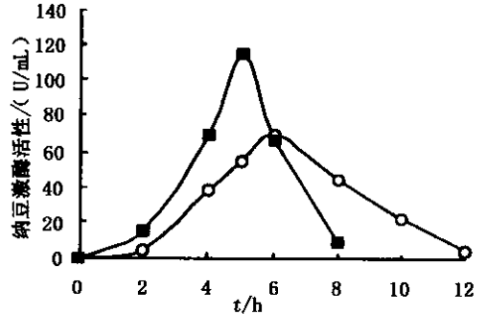


图3 不同温控时间对 NK 表达量的影响

○ 30℃ 培养不同时间, 42℃ 诱导 4h,  
■ 30℃ 培养 6h, 42℃ 诱导不同时间

将重组菌与宿主菌同时在 30℃ 培养 6h, 42℃ 诱导 5h, 二者的培养上清液、细胞裂解液的 SDS-PAGE 分析结果如图 4 所示。结果表明重组菌在分子量约为 27kD 处表达出一条特异的蛋白带, 与已知 NK 的分子量相符, 而对照菌中没有出现这条带, 并且上清液中的表达蛋白量高于细胞裂解液, 表明 NK 基因的表达产物大部分是分泌至胞外的。对重组菌泳道 2 上的新蛋白进行薄层扫描分析, 表明新蛋白带占菌体总蛋白的 12% 左右。

## 2.3 重组质粒稳定性研究

有关资料表明大肠杆菌工程菌在摇瓶培养时, 每 12h 菌数增加 100~150 倍, 约繁殖 7 代<sup>[8]</sup>, 本研究据此对质粒稳定性进行分析研究, 实验结果见图 5, 由图中可以看出重组质粒在宿主菌中的分离稳定性较好而结构稳定性差, 在没有选择压力 (Amp) 的情况下, 质粒缺失率较低, 经过约 70 代繁殖只有 10% 的缺失率; 而培养至 21 代时, 外源基因的缺失率即达到 52%, 这可能是因为人工构建的串联启动子的质粒特别容易发生外源基因片段缺失的缘故<sup>[9]</sup>。

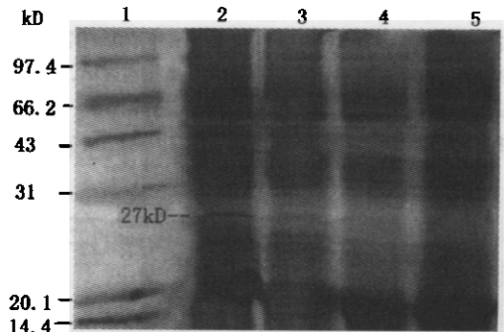


图4 NK 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

1 标准分子量蛋白,  
2 *E. coli* HB101/pBV220-NK 发酵上清液,  
3 *E. coli* HB101/pBV220-NK 细胞裂解液,  
4 *E. coli* HB101/pBV220 发酵上清液,  
5 *E. coli* HB101/pBV220 细胞裂解液

## 3 讨论

本研究成功地构建了纳豆激酶基因的表达载体 pBV220-NK, 并转化入 *E. coli* HB101 中, 重组质粒经过限制性内切酶双酶切、单酶切及 PCR 分析, 与预期结果相符, 同时 DNA 的测序结果也证明克隆到的目的片段即为纳豆激酶基因。

采用 SDS-PAGE 分析发酵液的菌体和上清液实验表明: 该酶基因的表达产物可以分

泌到细胞外, 表达量占菌体蛋白的12%左右; 而类似报道中纳豆激酶是以融合蛋白的形式表达, 表达量占菌体蛋白的15.2%<sup>[10]</sup>。表达动态研究表明: 重组菌在30℃培养6h后, 在42℃诱导5h, 可以获得较高的表达量, 相当于120个尿激酶单位/mL菌液, 是有关报道的2倍<sup>[10]</sup>。大肠杆菌表达外源基因产物多数是以包涵体形式分泌至周质空间, 本实验所获得表达产物大部分存在于发酵液中, 即使通过超声波破碎细胞壁后也不能令产量提高, 证明该重组子为分泌表达型, 究其原因, 可能是由于PCR扩增的目的片段还包含有信号肽序列, 可令表达产物分泌至胞外。

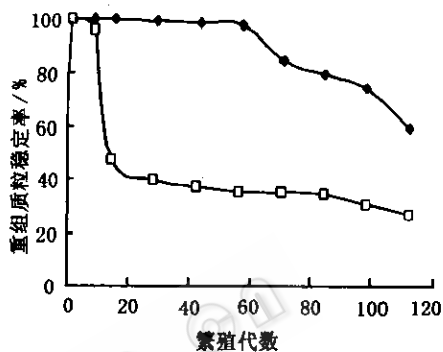


图5 重组质粒在 *E. coli* HB101 中的稳定性  
◆ 分离稳定性, □ 结构稳定性

重组质粒的稳定性实验表明: 该质粒具有良好的分离稳定性, 而结构稳定性较差, 分析原因, 可能是由于表达载体 pBV220 携带人工构建的  $P_R P_L$  串联启动子, 而此类启动子极易发生外源基因的缺失, 因此重组质粒的结构稳定性有待提高。

### 参考文献

- [1] 须见洋行. 化学と生物. 1991, 29 (2): 119~123.
- [2] 永井利郎. 日本食品科学工学会志. 1999, 46 (2): 39~44.
- [3] 傅利, 李荣萍, 李晶, 等. 生物工程进展, 1997, 17 (3): 31~33.
- [4] Nadamura T, Youher Y, Eiji I. *Biotech Biochem.* 1992, 56 (11): 1869~1871.
- [5] 李建武. 生物化学原理和方法. 北京: 北京大学出版社. 1994, 275~277.
- [6] 罗立新, 凌均建, 黄志立, 等. 华南理工大学学报, 2000, 28 (10): 59~62.
- [7] 原敏夫, 田所优子, 里山俊哉. 日本食品科学杂志, 1996, 43 (2): 173~175.
- [8] 邱晓颖, 朱红惠, 卢秋雁, 等. 高技术通讯, 1998, 16 (1): 52~55.
- [9] 吴乃虎主编. 基因工程原理 (上册). 北京: 科学出版社, 1999, 229~230.
- [10] 张淑梅, 张云湖, 赵晓祥, 等. 中国生物化学与分子生物学报. 1999, 15 (6): 912~915.