

大肠杆菌植酸酶基因 *appA* 的克隆与高效表达*

陈寅 朱中泽 张志芳** 何家禄

(中国农业科学院蚕业研究所农业部家蚕生物技术重点开放实验室 镇江 212018)

摘要: 从猪粪便中分离并筛选出高效生产酸性植酸酶和磷酸酶双功酶 (*appA* 植酸酶) 的大肠杆菌菌株。通过 PCR 方法从该菌株基因组中扩增获得了植酸酶基因 *appA*, 测序结果显示该基因编码区全长 1,299 个核苷酸。将该基因克隆到原核表达载体 pET-28a (+) 上, 通过转化的大肠杆菌 BL21 在试管摇床培养条件下得到了高效表达, 其表达量达到 692 U/mL。酶学特性分析表明其反应的最适 pH 为 4.5, 最适温度为 60℃。

关键词: 大肠杆菌, 植酸酶, *appA*, 基因表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0074-05

Cloning and Overexpression of Phytase Gene *appA* form *Escherichia coli*

CHEN Yin ZHU Zhong-Ze ZHANG Zhi-Fang HE Jia-Lu

(Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018)

Abstract: A strain *Escherichia coli* with high production of phytase was screened from pig excreta. Phytase gene *appA*, with 1,299 bp coding region in full length, was cloned from its genome by polymerase chain reaction (PCR). The gene *appA* was then cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a (+). In the host BL21, the phytase *appA* was overexpressed by shaker-cultivation (up to 692 U/mL). The enzymatic analysis of the prokaryotic derived *appA* phytase revealed that its optimal pH and temperature was 4.5 and 60℃, respectively.

Key words: *Escherichia coli*, Phytase, *appA*, Gene expression

植酸 (肌醇六磷酸) 是植物中磷的主要储存形式, 植物性饲料中含有大量植酸及其盐类。由于单胃动物的胃内缺乏相应的酶而不能水解利用植酸, 这造成了磷源的浪费^[1], 而且不能被利用的植酸中的磷被直接排出体外, 造成了土壤及水域的磷污染。另外, 饲料中还必须添加无机磷如磷酸氢钙等, 增加了饲料成本。植酸还能与矿质元素及蛋白质螯合, 使这些营养元素不能被有效利用, 导致了植物性饲料营养价值的降低, 因此植酸被普遍认为是饲料中的一种抗营养因子。广泛存在于微生物中的植酸酶 (Phytase, 肌醇六磷酸酶) 能将植酸水解为肌醇和磷酸, 提高单胃动物对饲料中磷的利用率, 降低粪便中磷的含量, 另外还可降低植酸的抗营养作用。因此植酸酶在饲料工业中的应用对提高养殖业效益和降低环境污染有重要意义。天然微生物中植酸酶含量太低, 难以大量获得廉价的植酸酶产品, 不能满足饲料工业发展的要求, 还没有在饲料工业上得到广泛应用。目前多种微生物来源的植酸酶基因已得到了分离, 如黑曲霉等^[2,3]。酸性植酸酶和磷酸酶双功酶 (*appA* 植酸酶) 是一种来源于 *E. coli* 的具有植酸酶功能的酶, 它能在酸性条件下表现出很强的植酸酶活性。与现在已经实现商业化生产

* 江苏省高技术研究计划资助项目 (No. BG2002313)

** 联系人 Tel: 0511-5616659, Fax: 0511-5615044, E-mail: zjsbsri@public.zj.js.cn

收稿日期: 2003-07-21, 修回日期: 2003-10-10

的 *A. niger* 植酸酶相比, appA 植酸酶有许多优点, 如最适 pH 为酸性与畜禽消化道环境相适应; 保持较高活力的酸性 pH 范围更宽; 与底物植酸盐的亲合力更好以及对蛋白酶的抵抗力更强等。另外, appA 植酸酶还是迄今所知的分解植酸能力最强的植酸酶^[4]。Courtois 和 Manet 早在 1952 年就曾报道, 大肠杆菌中有一种在酸性条件下具有活性的植酸酶; Greiner 等^[5] 从大肠杆菌中纯化了植酸酶并发现其动力学性质与 Dassa 等^[6] 纯化的来源于大肠杆菌的编码酸性磷酸酶的 appA 基因极其相似, 但他们却未克隆并鉴定其就是 appA 基因。也就是说 appA 基因的编码产物是一种既具有酸性磷酸酶活性又具有植酸酶活力的双功能酶, 只是最初人们并未认识到它同时又是一种高比活的植酸酶。2001 年, Golovan 等利用该基因进行了转基因鼠的研究^[7], 进一步证明了 appA 具有植酸酶的活性。

本研究从猪粪便中筛选出了高效生产 appA 植酸酶的菌株并从中克隆 appA 基因, 在原核表达系统进行表达并对表达产物的酶学性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 试剂及菌株

生化试剂 IPTG、SDS 及植酸钠为 Sigma 公司产品。Gene clean 试剂盒、过硫酸铵、TEMED、丙烯酰胺为 Promega 公司产品。RNA 酶、Proteinase K、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 10 kD 标准分子量蛋白购于 Gibco-BRL 公司; 高保真 DNA 聚合酶 Platinum pfx 购自 Invitrogen 公司; 其他均为分析纯试剂。大肠杆菌菌株 TG1、质粒载体 pGEM-3Z 与 pET-28a (+)、表达菌株 BL21 均由本实验室保存。

1.2 产 appA 植酸酶高效菌株的筛选

采集饲料喂青饲料为主的猪新鲜粪便样本, 称取 0.05 g 加入蒸馏水 1 mL, 充分摇匀后用蒸馏水稀释 1,000 倍, 取 100 μ L 稀释液涂布于 LB 平板上 37℃ 倒置培养。挑取单菌落于 LB 液体培养基培养, 离心收集菌体后将菌体用 1 mL 蒸馏水洗一次, 充分混匀, 再次离心去上清。沉淀中加入 250 μ L 溶液 I (葡萄糖 50mmol/L, Tris-HCl 25mmol/L, pH8.0 EDTA 10mmol/L), 摇匀后加入少许溶菌酶, 混匀, 于 37℃ 温育 10 min。样品于冰上进行超声波破碎, 适当稀释后检测植酸酶活力。保留酶活最高的相应原菌株。

1.3 appA 植酸酶基因的克隆和序列分析

将活力最好的高效 *E. coli* 菌株制备基因组 DNA。根据 Dassa 等 GenBank Accession No: M58708 设计 appA 基因引物并由上海生工生物工程公司化学合成。

5'-GAGGATCCACGATGAAAGCGATCTTAATCCCAT-3' (Forward)

5'-TTGAATTCATTACAAACTGCACGCCCGTAT-3' (Reverse)

用高保真 DNA 聚合酶 Platinum pfx 以植酸酶活力最高的大肠杆菌基因组 DNA 作为模板进行 PCR 反应, 扩增 appA 基因。PCR 反应过程: 94℃ 变性 10 min; 94℃ 20 s, 53℃ 40 s, 68℃ 100 s, 共 35 个循环; 最后 68℃ 延伸反应 10 min。电泳鉴定后回收 PCR 片段克隆到 pGEM-3Z 上进行双向测序。再将 appA 基因克隆到大肠杆菌表达载体 pET-28a (+) 中。测序由上海基康有限公司完成。

1.4 appA 植酸酶基因在大肠杆菌中的表达

将鉴定正确的重组子 pET-appA 转化大肠杆菌 BL21。挑取阳性克隆接种 LB 培养基 (含 100 μ g/mL Kan), 37℃ 过夜培养, 将菌液以 1% 比例接种到 3mL LB 中, 37℃ 培养 3 h

后加入诱导物。诱导物为 IPTG 时其终浓度为 0.5 mmol/L, 诱导物为乳糖时在 0.1% ~ 2.0% (w/v) 之间设计不同浓度。加入诱导物后 30℃ 培养。每隔 1 h 取样一次测酶活力。

1.5 表达产物的 SDS-PAGE

浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%。取菌体裂解蛋白 2 μ L 加入 8 μ L H₂O 中, 再加入 10 μ L 2×SDS 加样缓冲液, 煮沸 5 min, 电泳后, 用 0.25% 的 R-250 染色, 用脱色液脱色。

1.6 appA 植酸酶的活性测定

取 100 μ L 适当稀释的酶液于试管中, 加入含植酸钠的缓冲液 (4 mmol/L 植酸钠, 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH4.5), 于 37℃ 水浴中反应 30 min。加入 1 mL 10% TCA 终止反应, 再加入 2 mL 硫酸亚铁-钼酸铵显色, 750 nm 波长处测定光密度值。对照的设置为先加 TCA 使酶失活后再加入底物。一个酶活单位 (U) 定义为上述条件下每分钟释放出 1 μ mol 无机磷所需的酶量。

1.7 appA 植酸酶的最适反应 pH 与最适反应温度

用不同 pH 缓冲液调节底物 pH 值。0.25 mol/L Gly-HCl (pH1.2 ~ 3.5)、0.25 mol/L NaAc-HAc (pH4 ~ 6)、0.25 mol/L Tris-HCl (pH6 ~ 7)、0.1 mol/L Tris-HCl (pH6 ~ 9), 酶液在 37℃ 与不同 pH 的底物反应 30 min, 测定光密度值以确定酶活力。最适反应温度的确定为在最适 pH 条件, 20℃ ~ 90℃ 不同温度下酶促反应 30 min 后检测酶活。每个反应点重复测定 3 次。

1.8 不同金属离子对 appA 植酸酶活力的影响

在含底物的 NaAc-HAc 缓冲液 (pH4.5) 中分别加入 Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺ 及 Zn²⁺ (终浓度为 1 mmol/L), 酶促反应后检测不同离子对酶活力的影响。每个反应重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 高效菌株筛选与 appA 基因的克隆

共筛选 120 个单菌落, 在 LB 培养基中培养后收集菌体, 超声波破碎后适当稀释测定酶活, 发现不同菌落间植酸酶活力相差悬殊, 最高与最低的菌株之间相差 500 倍以上。以植酸酶活力最高的菌株基因组 DNA 作为模板进行 PCR 反应, 电泳检查发现有一条大小约 1.3 kb 的特异性扩增条带。以 Gene clean 试剂盒纯化, 再用 BamH I + EcoR I 消化 PCR 片段后将其克隆进同样双酶切的 pGEM-3Z 中进行双向测序。从测序结果可知, 所克隆的 appA 基因 (GenBank accession No: AF 537219) 全长 1,299 bp, G + C 含量为 53.73%, 编码 432 个氨基酸, 翻译产物理论分子量为 47.06 kD。与 Dassa 等的 appA 基因相比较有 2 个核苷酸突变, 一个是位于起始密码子后 721 核苷酸处 C 突变为 A, 另一个是 835 核苷酸处 C 突变为 T。其中第一个颠换导致编码氨基酸由 Glu 突变为 Lys。

将 pGEM-appA 用 BamH I 和 EcoR I 消化后克隆到大肠杆菌表达载体 pET-28a (+) 中 (图 1)。在高产菌株筛选中, 结果显示不同单菌间植酸酶活力相差悬殊, 由于同其它大肠杆菌菌株的 appA 基因相互间的序列同源性很高, 均在 99% 以上, 活性中心氨基酸序列相同, 推测是由于不同大肠杆菌调控 appA 基因表达的顺式或反式元件有较大差异的结果。Golovan 亦认为在某些大肠杆菌菌株中存在能严格调控基因组中 appA 表达的

调控因子的编码序列^[8]。

2.2 *appA* 基因的原核表达

将 *appA* 植酸酶基因在大肠杆菌表达系统中进行了表达。IPTG 诱导时, *appA* 植酸酶活性很低。在采用另外一种较为温和的诱导物乳糖进行诱导时, 单位体积菌液的植酸酶活力比 IPTG 诱导时高 5 倍以上。不同浓度梯度乳糖的诱导效果对比发现, 以 0.4% (w/v) 的诱导效果最好, 在含 3 mL LB 培养基的试管中摇床培养条件下表达量达到 692 U/mL。未诱导以及空载体对照均检测不出植酸酶活性。而且乳糖诱导的有效表达时间较长, 通过表达时相发现, 在加入诱导物 8 h 以内植酸酶的表达量呈上升趋势。SDS-PAGE 结果 (图 2) 表明, 在 50 kD 预计目的蛋白处有一诱导带。

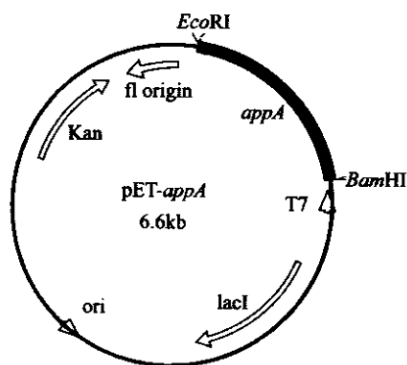


图 1 表达载体 pET-*appA* 的构建

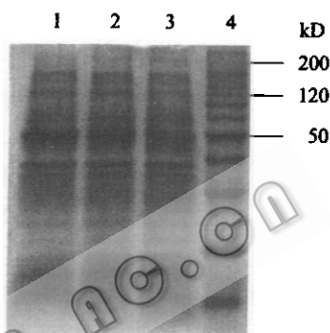


图 2 BL21 中表达产物的 SDS-PAGE 电泳

1 IPTG 诱导的 BL21/pET-*appA*, 2 乳糖诱导的 BL21/pET-*appA*, 3 IPTG 诱导的 BL21/pET, 4 10 kD ladder 标准分子量蛋白 (GIBCO BRL)

所克隆的 *appA* 基因编码 432 个氨基酸, 其中第 +38 ~ +44 为 RHGVRAP, 是一个典型的组氨酸酸性磷酸酶活性位点 (RHGxRxP, x 为任意氨基酸), 这说明 *appA* 植酸酶可归为组氨酸酸性磷酸酶这一家族^[9]。另外, +161 ~ +163、+226 ~ +228 和 +339 ~ +341 分别是 3 个潜在的糖基化位点。*appA* 基因翻译产物理论分子量为 47.06 kD, 由于本实验中外源蛋白的 N-末端有一个约 3.5 kD 融合片段, 从 SDS-PAGE 可看出融合表达的蛋白约为 50 kD, 与预期大小一致。虽然 *appA* 植酸酶含有潜在的糖基化位点, 但由于原核表达系统的蛋白加工修饰的缺陷, 表达产物的分子量并未增加, 这与理论推断亦是相符合的。在融合片段中还有一个由 6 个组氨酸串联的 His-tag, 这为大量目的蛋白的纯化提供了方便。

在异源蛋白的表达中, 大肠杆菌由于其背景清晰得到了广泛的应用。IPTG 目前已被广泛应用于诱导大肠杆菌 T7 表达系统的转录, 但由于 IPTG 本身具有一定的毒性, 是一种强诱导剂, 对于表达某些外源基因并不适合。本实验中首先使用 0.5 mmol/L IPTG 进行诱导表达时, 但产物的生物活性较低。目前, 有利用乳糖作为诱导物诱导重组产物表达的报道, 由于乳糖所具备的无毒及价廉的优点使其在重组蛋白的生产中具有优于 IPTG 的潜在价值。乳糖首先借助于乳糖透过酶的作用进入细胞, 在 β -半乳糖苷酶作用下生成异乳糖, 而异乳糖具有诱导效果。由于这一过程涉及乳糖的转运与转化, 其效率受到多种因素的影响。本实验中使用乳糖替代 IPTG 诱导 lac 启动子的转录实现了 *appA* 的高效表达, 经过不同浓度乳糖的诱导, 发现以 0.4% (w/v) 的诱导效果最好。虽然 *appA* 植酸酶在大

肠杆菌中实现了高效表达,但从 SDS-PAGE 结果来看,外源蛋白条带并不能反映表达产物占总蛋白的比例。因为考马斯亮蓝对 appA 植酸酶的染色效果较差,这种方法估计的表达产物量仅为检测 280 nm 吸收值所显示量的 1/15 左右^[8]。

2.3 appA 植酸酶的酶学特性

测定了 appA 植酸酶 37℃ 时不同 pH 值条件下的催化活性,结果显示 appA 植酸酶最适 pH 为 4.5,另外在 pH 2.5 时有一个次高峰。当 pH 值超过 5.5 时,酶活力迅速下降(图 3)。在 pH 4.5 时,分别比较 20℃ ~ 90℃ 下酶促反应 30 min 后的酶活力。结果显示 appA 植酸酶活力在 20℃ ~ 60℃ 之间随温度的上升而增强,至 60℃ 时达最大,此后随温度的上升而逐渐降低,当温度超过 90℃ 后酶已基本失活(图 4)。

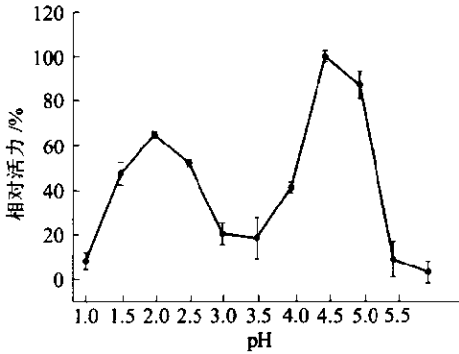


图 3 appA 植酸酶的最适 pH

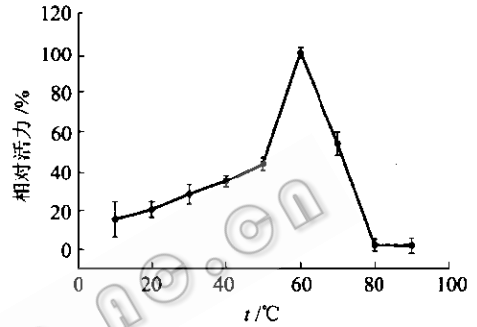


图 4 appA 植酸酶的最适反应温度

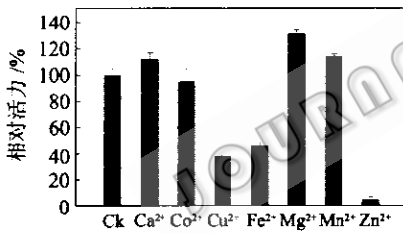


图 5 不同离子对酶活力的影响

当 Mg^{2+} 存在, appA 植酸酶的催化活性可提高 30% 左右, 而 Zn^{2+} 则能强烈抑制其活力, 当反应体系中含有 1 mmol/L 的 Zn^{2+} 时酶已基本失去活性(图 5)。

本实验的 appA 植酸酶源于原核生物 *E. coli*, 它能在大肠杆菌表达系统中得到高效表达可能由于其本身就来源于大肠杆菌, 表达产物对于宿主菌的毒性小, 表达产物很可能大多以可溶性蛋白存在, 而无需以包涵体形式使目标蛋白处于无活性状态来实现宿主的自身防御。

另外 Golovan 等将用 PCR 法扩增的大肠杆菌 ATCC33965 菌株的 appA 基因克隆 pET21a (+), 采用补料培养时, 其表达量达到 652 U/mL^[8], 本实验 appA 植酸酶的表达是在试管中摇床培养的条件下获得的, 如果采用高密度发酵等大规模培养方法使单位体积的菌体数量成倍增加还可能实现表达量的进一步提高。

参考文献

- [1] Nelson T S. Poult Sci, 1967, 46: 862 ~ 871.
- [2] 姚 斌, 张春义, 王建华, 等. 农业生物技术学报, 1998, 6 (1): 1 ~ 6.
- [3] 王红宁, 吴 琦, 刘世贵, 等. 微生物学报, 2001, 41 (3): 310 ~ 314.
- [4] Lei X G, Stahl C H. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57 (4): 474 ~ 481.
- [5] Greiner R, Konietzny U, Jany K. Arch Biochem Biophys, 1993, 303: 107 ~ 113.
- [6] Dassa E, Cahu M, Desjoyaux-Cherel B, et al. J Biol Chem, 1982, 257: 6, 669 ~ 6, 676.
- [7] Golovan S, Hayes M, Phillips J, et al. Nature Biotechnology, 2001, 19 (5): 429 ~ 433.
- [8] Golovan S, Wang G, Zhang J, et al. Can J Microbiol, 2000, 46: 59 ~ 71.
- [9] 姚 斌, 范云六. 生物工程学报, 2000, 16 (1): 1 ~ 5.