

细菌耐热植酸酶基因的克隆及表达*

刘丽丽^{1,2,3} 杨文博² 刘忠²

(天津师范大学化学与生命科学学院 天津 300071)¹

(南开大学生命科学学院 天津 300071)²

(天津市农业生物技术研究中心 天津 300192)³

摘要: 设计筛选培养基, 从 203 株细菌菌株中筛选到四株可以分解植酸的菌株: SD01N, SD01X, SD01B 和 SD01D, 设计植酸酶基因特异性引物 P1 和 P2, 分别以这四株菌的基因组 DNA 为模板进行扩增, 其中菌株 SD01N 出现一条明显的扩增条带, 大小约 1.2 kb。对 PCR 产物进行序列分析表明, 该片段含有一个编码 383 个氨基酸的开放阅读框架。将该片段与载体 pQE-30 连接后转化大肠杆菌 M15, 得到重组菌株 SDLiutP01, 对该菌株进行培养, 经 IPTG 诱导基因表达, 与携带空载体菌株相比较, 在菌株 SDLiutP01 中可检测到植酸酶活力。对重组菌株的植酸酶活力考察表明, 该酶在 25℃ ~ 95℃ 温度范围均具生物活性, 最适反应温度为 75℃, 属于耐热性植酸酶。在各 pH 缓冲系统中反应结果, 酶活力出现两个较高值, 分别为 pH4.6 和 pH7.5。

关键词: 耐热植酸酶, 克隆, 大肠杆菌, 芽孢杆菌。

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0057-04

Clone and Expression of Thermostable Phytase Gene in Bacteria

LIU Li-Li^{1,2,3} YANG Wen-Bo² LIU Zhong²

(Department of Chem & Bio, Tianjin Normal University, Tianjin 300071)¹

(Life Science College, Nankai University, Tianjin 300071)²

(Tianjing Research Center for Agricultural Biotechnology, Tianjin 300071)³

Abstract: Strains SD01N, SD01X, SD01B and SD01D which can decompose phytic acid was screened and isolated from 203 bacteria strains. A pair of primers for myo-Inositol-hexaphosphate-phospho-hydrolyolase gene was designed. A 1.2 kb gene was amplified by PCR from SD01N genome DNA when four strains genome DNA was used as template. Nucleotide sequence analysis revealed the presence of an open reading frame of 1152bp coding for 383 amino acid. The fragment was cloned into *E. coli* expression vector pQE-30 and transform into *E. coli* M15. The myo-Inositol-hexaphosphate-phosphohydrolyolase activity was detected in recombination strain *E. coli* SDLiutP01 compared with *E. coli* M15 with empty vector. Enzymatic characters of myo-Inositol-hexaphosphate-phosphohydrolyolase in recombination strain demonstrated that it is stable in 25℃ ~ 95℃, and belong to thermostable phytase. Its optimum temperature is 75℃. It has two optimum pH: 4.6 and 7.5.

Key words: Thermostable phytase, Clone, *E. coli*, *Bacillus* sp.

微生物来源的植酸酶 (myo-Inositol-hexaphosphate-phosphohydrolyolase) 可使植酸降解成肌醇和磷酸, 即可以使有机磷降解成可溶性的无机磷^[1~4]。耕层土中的磷, 15% ~ 95%

* 天津市科技攻关项目 (No.003122111-4)

天津市自然科学基金项目 (No.013609811)

专利: 03129985.7

收稿日期: 2003-08-20, 修回日期: 2004-01-14

为有机形态^[5]。其中大量有机磷以植酸(六磷酸肌醇)的形式存在。特别是提倡秸秆还田和使用有机肥农家肥以后,更多的植酸被带入耕层土壤。许多研究表明决定磷对植物的有效性的主要因素不是有机磷的含量,而是其矿化速率。植酸酶的作用底物是植酸及其盐类^[6]。植酸酶的存在可以加速有机磷的矿化,增加土壤磷肥力。另一方面植酸还具有螯合根区土壤中重要矿物质的作用,植物根系土壤中的植酸酶可以释放这些矿质营养提供给植物。但是,植物所编码的植酸酶是非分泌型的,由于缺少胞外植酸酶活力,植物对于土壤中有机磷的主要成分植酸的利用率很低。将植酸酶制剂直接施用田间,是非常不经济的做法。所以,必须寻求一种可行的方案,首选方法是植酸酶基因工程菌的构建,并制备生物菌肥,施入田间。本文从土壤中筛选到一株产植酸酶的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)并将植酸酶基因克隆,转入大肠杆菌,表达产物具有植酸酶活性,最适酶促反应温度为75℃。在制剂和工业化处理及产品贮存的过程中具有较高的实用价值。

1 材料与方法

1.1 基因供体菌株的筛选

取土样1g,放入装有无菌水的三角瓶中,摇匀,稀释,涂布于基因供体菌筛选平板培养基上,37℃培养24h,挑选单个菌落转接基因供体菌筛选培养基上。收集各种细菌纯培养菌种,转接基因供体菌筛选培养基斜面培养基上,以相同的方法转接于基因供体菌筛选平板培养基上,37℃培养24h,取出,比较水解圈的情况。挑选形成明显水解圈的菌种。

1.2 菌体总DNA的提取

菌种转接LB培养基,37℃摇床培养过夜,取50mL培养液离心沉淀菌体,沉淀重悬于25mL 1.0mol/L的NaCl中,4℃下剧烈振荡1h,离心后沉淀溶于25mL冷缓冲液(0.01mol/L Tris, pH 8.0, 0.025mol/L EDTA; 0.15mol/L NaCl)中,离心,沉淀重悬于5mL TE缓冲液中,加入0.5mL 2mg/mL的溶菌酶,37℃保温15min,再加入0.6mL的肌氨酸蛋白酶溶液(10%肌氨酸和5mg/mL的蛋白酶溶于TE中),37℃保温1h,细胞裂解液分别用苯酚、苯酚-氯仿、氯仿各抽提一次,加入2倍体积冷乙醇,离心后沉淀溶于TE(pH8.0)备用。

1.3 PCR反应参数

94℃ 1min, 50℃ 1min, 72℃ 2min, 30个循环, 72℃ 10min。

1.4 植酸酶基因克隆^[7]

将含有植酸酶基因序列的PCR产物用DNA回收试剂盒回收,DNA片段进行序列分析,经GenBank比较,确定植酸酶基因,并将其连接于pMD18-T载体上,导入*E. coli* JM109,得到基因克隆。

1.5 在*E. coli* M15中的表达^[8-10]

(1) 表达载体pQE-30,酶切位点为:*Bam* H I 和 *Hind* III,选择标记为:Ap^r和Km^r。

(2) 将植酸酶基因重组于pQE-30,导入*E. coli* M15,于LB平板(Ap100μg/mL, Km 50μg/mL)上筛选大肠杆菌重组子,并接种于LB培养液,37℃,300r/min,培养过夜,转接0.1%至20mL新鲜LB培养液中,继续培养至OD值达到0.6~0.8,加入IPTG至

终浓度为 1 mmol/L, 诱导培养 3 h。

(3) 取 1 mL 诱导培养物离心收集菌体, 用无离子水洗 2 遍后重悬于 100 μ L 无离子水中, 加入等体积的 2 倍 SDS 上样缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH6.8, 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油), 煮沸 3 min, 冷却后电泳。

其它: 引物合成经上海基康生物技术公司和上海生工生物公司; DNA 序列测定经大连宝生物公司和联合基因科技公司; *E. coli* JM109 和 pMD18-T, 购于大连宝生物公司。

2 结果与分析

2.1 植酸酶基因的克隆

在筛选的平板培养基上从土壤中筛选到 203 株细菌。经复筛得到 4 株菌: SD01N, SD01X, SD01B, SD01D。菌株形成可见的水解圈。

分别以 SD01N, SD01X, SD01B, SD01D 菌株的总 DNA 为模板, 设计 6 对引物, 分别进行 PCR, 形成 PCR 产物的引物为:

P1: 5' CTG CAG GAT CCA TGA ATC ATT CAA AAA CAC TTT TGT 3'

P2: 5' TTT AAG CTT CGT TCT TCA CAT GCA AAA AGC 3'

由 SD01N 菌株的基因组 DNA 扩增出约 1.2 kb 的 DNA 片段 (图 1)。对 PCR 产物进行序列测定, 经分析得到植酸酶基因的 DNA 序列, 见 GenBank (USA) Accession No: AY518208。此基因全长 1200 个核苷酸, 编码 383 个氨基酸, N-端 26 个氨基酸为信号肽, 信号肽的切割在 +26 位的 Ala 之后, 推测 TAA 为终止信号。经 GenBank 比对未见相同序列, 与已报道的植酸酶基因序列比较存在差异, 这些差异的存在可能赋予该植酸酶具有耐热特性。

2.2 在大肠杆菌中的表达

选择耐热植酸酶基因表达系统, 载体为 pQE-30, 受体菌株为 *E. coli* M15。

将耐热植酸酶基因从 pMD18-T 的 *Bam* HI 和 *Hind* III 位点之间切下, 连接于同样酶切的 pQE-30 上, 转化 *E. coli* M15, 得到菌株 SDLiuTP01。将 SDLiuTP01 接种于 LB 培养基, IPTG 诱导。收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 见图 2。

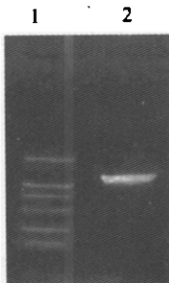


图 1 以 SD01N 总 DNA 为模板的 PCR 产物

1 DL 2000 marker,
2 PCR products (约 1,200bp)

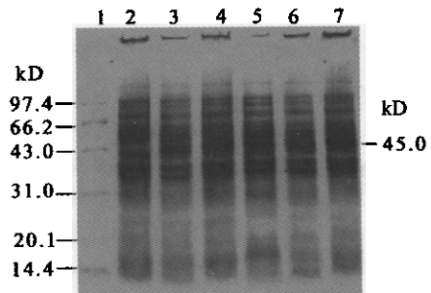


图 2 在 *E. coli* M15 中表达耐热植酸酶基因的 SDS-PAGE 结果

1 标准蛋白质分子量, 2 空载体, 3~7 转化子

2.3 生物学测定

收集 SDLiutP01 表达培养的菌体，在 Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲体系中，于 25℃、35℃、45℃、55℃、65℃、75℃、85℃、95℃条件下测定植酸酶活性。酶活表示如下：

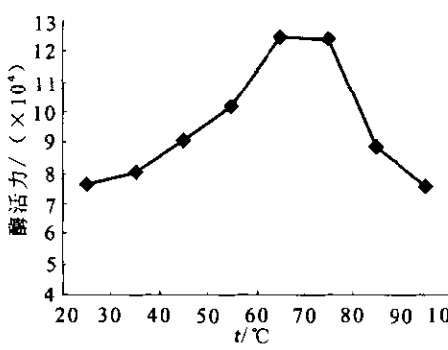


图3 SD LiutP01 产生的耐热植酸酶在不同温度下酶活力

酶活力单位 (U/mL) = $OD_{700} / T \cdot K \cdot \text{稀释倍数} \cdot \text{反应体积}$ ； OD_{700} 为采用铝锶抗比色法，用 723 型分光光度计 (型号：vis-723)，波长 700 nm 条件下，直接测定反应液的 OD 。T 为酶促反应时间，K 是标准曲线的斜率，经测定 K 的平均值是 5.717。实验用植酸酶的稀释倍数是 2.5×10^6 ，反应体积为 1 mL。其中以经 IPTG 诱导基因表达的携带空载体的菌株为对照，以灭活植酸酶为空白对照，结果如图 3 所示。

收集 SDLiutP01 表达培养的菌体，在 37℃ 下，pH 分别为 3.6、4.6、5.4 的乙酸—乙酸钠缓冲液；pH 为 6.0、7.0 的 Tris—顺丁烯二酸缓冲液；pH 为 7.5、8.0、9.0 的 Tris—HCl 缓冲液中，测定植酸酶活性，结果如表 1 所示。

表 1 基因工程菌株 SD LiutP01 产生的耐热植酸酶在不同 pH 环境中的酶活力

pH	3.6	4.6	5.4	6.0	7.0	7.5	8.0	9.0
OD_{700}	0.288	0.29	0.283	0.229	0.249	0.261	0.259	0.238
酶活力 (U/mL)	137208	138161	134826	109099	118628	124345	123392	113387

实验结果表明，植酸酶在 25℃ ~ 95℃ 温度范围均具生物活性，最适反应温度为 75℃ 为耐热植酸酶在各 pH 缓冲系统中反应结果表明，酶活力出现两个较高值，分别为 pH4.6 和 pH7.5。

作者还将植酸酶施用于植物的栽培，表明植酸酶有促进植物生长的作用，特别是促进植物根部的生长发育效果更佳，将另文报道。

致谢 本文得到了中国科学院微生物研究所陈晓英老师的指导和帮助，特此致谢。

参考文献

[1] 米苏斯金 E H (苏). 土壤微生物和土壤肥力. 北京: 农业出版社, 1992.
[2] 黄遵锡, 章克昌. 食品与发酵工业, 1999, 25 (2): 54~58.
[3] Benjartin L T, Ian D M, Philip M H. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34: 27~35.
[4] Yamada K, Minoda Y, Yamamoto S. Agric Biol Chem, 1968, 32: 1275~1282.
[5] Piddington C S, Houston C S, Cantrell M, et al. Gene, 1993, 31: 55~62.
[6] Muriel B, Isabelle M, Guy D, et al. Microbiology, 2002, 148: 2819~2829.
[7] Von T M A, Robbins H L, Efficient F. Microbiol Lett., 1990, 58 (3): 309~314.
[8] Macaluso A, Mettus A M. J Bacteriol, 1991, 173 (3): 1553~563.
[9] Panbangred W, Weeradechapon K, Udomvaraphant S, et al. J Appl Microbiol, 2000, 89 (1): 1152~159.
[10] Jung H C, Park J H, Park S H, et al. Enzyme and Microbiol Technology, 1998, 22 (5): 348~354.