

海栖热袍菌胞外 α -淀粉酶在 *E. coli* 中的高效表达*

王希菊¹ 蒋宇¹ 邵蔚蓝^{1,2,*}

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)¹

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)²

摘要: 为解决密码子偏好性差异造成的表达水平低下问题, 采取了 3 种手段提高海栖热袍菌胞外 α -淀粉酶在 *E. coli* 中的表达水平。用 PCR 方法从海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 基因组 DNA 中扩增出胞外 α -淀粉酶 A 的完整基因 *amyA*, 插入表达载体 pET-20 (b) 中构建质粒 pET-*amyA*; 运用基因工程手段将 *amyA* 基因富含稀有密码子的信号肽进行切除, 将不含信号肽的 *amyA* I 基因插入 pET-20 (b) 中构建质粒 pET-*amyA* I; 用 PCR 法从大肠杆菌基因组中扩增出 *argU* 基因, 插入 pET-*amyA* I 中构建质粒 pET-*amyA* II。将重组质粒分别转化到 *E. coli* JM109 (DE3), 并将重组质粒 pET-*amyA* I 转化 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL。通过 IPTG 诱导测酶活性: 在 *E. coli* JM109 (DE3) 中表达的重组酶 (pET-*amyA*)、(pET-*amyA* I)、(pET-*amyA* II) 的酶活分别是 1658.0 U/mL、6721.7 U/mL、8904.5 U/mL, 在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 中表达的重组酶 (pET-*amyA* I) 的酶活是 13867.7 U/mL。表明通过这些手段能大幅提高 *T. maritima* 胞外 α -淀粉酶在 *E. coli* 中的表达水平。

关键词: 海栖热袍菌, α -淀粉酶, *argU* 基因, 高效表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0025-06

Hgh-level Expression of Extracellular α -Amylase of *Thermotoga Maritima* in *E. coli**

WANG Xi-Ju¹ JIANG Yu¹ SHAO Wei-Lan^{1,2,*}

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)¹

(Department of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)²

Abstract: The complete gene encoding extracellular α -amylase was amplified from the genomic DNA of *Thermotoga maritima* by polymerase chain reaction. The recombinant plasmid pET-*amyA* was constructed by inserting the amplified segment into the expression vector pET-20 (b). The signal peptide of *amyA* gene bound of unoptimal codon was cut off to form *amyA* I. The recombinant plasmid pET-*amyA* I was obtained by inserting the *amyA* I into the vector pET-20 (b). The complete *argU* gene was amplified from the genome of *E. coli* by polymerase chain reaction and was inserted into the plasmid pET-*amyA* I to form pET-*amyA* II. The recombinant plasmids pET-*amyA*, pET-*amyA* I, pET-*amyA* II were transformed into the *E. coli* JM109 (DE3) respectively and The recombinant plasmids pET-*amyA* I was transformed into the *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL. The recombinant strains *E. coli* JM109 (DE3) harbouring pET-*amyA*, pET-*amyA* I, pET-*amyA* II and *E. coli* BL21-Codon-Plus (DE3) -RIL harbouring pET-*amyA* I produced amylase activities of 1,658.0 U/mL, 6,721.7 U/mL, 8,904.5 U/mL, 1,387.7 U/mL through IPTG induction, respectively.

Key words: *Thermotoga maritima*, α -*amyA*, *ArgU* gene, High expression

* 国家经工总局 211 专项基金资助

** 通讯作者 Tel: 86-25-83598838, E-mail: wshao@jssmail.com.cn

收稿日期: 2004-09-16, 修回日期: 2004-11-02

耐高温 α -淀粉酶是工业用量最多的酶之一, 在食品、制药、纺织等行业中有广泛的用途。近年来, 人们从嗜热细菌中分离了多种热稳定性的 α -淀粉酶, 其中来源于 *T. maritima* 的胞外 α -淀粉酶以其优异的耐热性能而受到关注。

Liebl^[1] 等人首先于 1996 年报道了 *T. maritima* 胞外 α -淀粉酶的基因序列, 但未针对该基因的表达进行研究。由于极端嗜热菌的密码子偏好性^[2,3] 与常温菌如大肠杆菌差别很大, 极端嗜热菌来源的蛋白使用大量大肠杆菌稀有密码子, 直接影响了这些蛋白在大肠杆菌中的表达水平。*T. maritima* α -淀粉酶 A 基因中高比例的非优势密码子成为限制其在大肠杆菌中表达水平的主要因素之一。为解决密码子偏好性的差异造成的表达水平问题, 本文采取了 3 种手段: (1) 去除海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 基因 *amyA* 富含稀有密码子的信号肽序列; (2) 将不含信号肽的 *amyA* I 基因与大肠杆菌中编码 Arg 稀有密码子 (AGA, AGG) tRNA 的 *argU* 基因共表达来提高表达量。(3) 将不含信号肽的 *amyA* I 基因在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 中表达。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准和 Pyrobest DNA 聚合酶购自宝生物工程公司 (TaKaRa); Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司; 可溶性淀粉, 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 购于上海化学试剂公司; IPTG、氨苄青霉素购自上海生工生物工程技术有限公司; SDS-PAGE 分子量标准购自 Promega, QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司。

1.2 菌株和质粒

海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) MSB8 由美国佐治亚大学 (University of Georgia) 的 Adams 教授惠赠。大肠杆菌 JM109 和 JM109 (DE3) 购于 Promega 公司。质粒 pET-20b (+) 购于 Novagen 公司。

1.3 培养基和培养条件

海栖热袍菌培养基 (g/L): NaCl 28, $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 3.5, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.7, KCl 0.33, NH_4Cl 0.25, $CaCl_2$ 0.0855, 可溶性淀粉 5.0, Reazurin 1 mL/L, Na_2S 0.5, 半胱氨酸 0.5, 酵母粉 0.5, K_2HPO_4 (100 mmol/L) 10 mL/L, Bis-Tris (pH 7.2, 1 mol/L) 20 mL/L, 微量元素 (1,000 \times) 1 mL/L。微量元素 (1,000 \times) 配方: 浓 HCl 1 mL/L, Na_4EDTA 0.5, $FeCl_3$ 2.0, H_3BO_3 0.05, $ZnCl_2$ 0.05, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.03, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.05, $(NH_4)_2MoO_4$ 0.05, $AlKSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05。

培养基煮沸充氮排氧, 稍冷却加还原剂半胱氨酸; 分装预先充氮的厌氧菌培养管或血清瓶, 密封灭菌。用无菌注射器按 2% 接种, 80 $^{\circ}C$ 静置培养, 对数生长后期停止培养。

1.4 基因操作和蛋白质操作

LB 培养基配方、分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析, 参照文献[4, 5] 进行。

1.5 α -淀粉酶酶活的测定

将分析正确的重组质粒及空载质粒分别转化大肠杆菌 JM109 (DE3), 挑取单菌落转接到含 50 $\mu g/mL$ Amp 的 3 mL LB 培养基的试管, 37 $^{\circ}C$ 培养至 OD_{600} 0.6 ~ 1.0, 加 IPTG

至终浓度 1 mmol/L, 37°C 诱导 4h, 5,000 g, 4°C 离心 5 min 收集细胞, 加 500 μ L 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 重悬细胞, 超声波破碎, 30 s, 4 次。12,000 r/min, 4°C 离心 15 min 去除细胞碎片沉淀, 取上清酶活分析。

标准酶反应体系为: 2% (w/v) 的可溶性淀粉 100 μ L, 0.5 mol/L 咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液液 50 μ L, 去离子水 340 μ L, 重组大肠杆菌粗酶液 10 μ L; 空白对照中相应加入 10 μ L 含空载质粒的大肠杆菌粗酶液。85°C 反应 10 min, 加 750 μ L 终止和显色剂 DNS。DNS 配方为: 1 g DNS, 10 mL NaOH (100 g/L), 30 g 酒石酸钾溶解于 100 mL 去离子水中, 煮沸 20 min, 冷却后, 测 A_{575} 值的增加^[1]。

酶单位 (U) 的定义: 在该反应条件下, 1min 内催化产生 1 μ mol 还原末端所需的酶量。

2 结果

2.1 重组质粒 pET-amyA I 的构建

根据 GenBank 中的完整 *amyA* 序列设计一对引物: N 端引物 (5' - GGCATATGAAGAAGCCTTTTTTA-3'), 带 *Nde* I 酶切位点, C 端引物 (5' -GGAAGCTTTTAGTCGACCTTTTTGAAAATGTACG-3')。含 *Sal* I、*Hind*III 酶切位点。*Sal* I 和 *Hind*III 之间加终止密码子 TTA 终止翻译。

用在线分析程序 Signal P V2.0 对海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 的氨基酸序列进行分析, 发现在海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 的 N 端含有一段信号肽, 且富含大肠杆菌非优势密码子。设计引物去掉起始的 64 个碱基:

N 端引物为 (5' -GGCATATGCGTCTATGAGTCAATC-3')。其中含有 *Nde* I 位点。C 端引物不变。

以 *T. maritima* 基因组 DNA 为模板, 分别用上述两对引物 PCR 进行扩增, 条件为: 95°C, 5 min; 暂停计时, 加 *Pyrobest* DNA 聚合酶, 40 μ L 石蜡油液封; 94°C, 30 s; 48°C, 90 s; 72°C, 2 min, 循环 35 次; 72°C, 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果各得 1.6 kb 的基因片断 *amyA*、*amyA* I, 符合 GenBank 中完整 *amyA* 的序列大小。

分别将 *amyA*、*amyA* I 用 *Nde* I 和 *Hind*III 双酶切, 插入质粒 pET-20 (b), 转化 *E. coli* JM109, 酶切分析获得正确的转化子。重组质粒 pET-*amyA* I 的酶切检测如图 1。重组质粒 pET-*amyA* I 经 *Nde* I 和 *Hind*III 双酶切后, 产生 1.6 kb 和 3.7 kb 两条带, 与 *amyA* I 和空载线性 pET-20 (b) 大小一致。

2.2 重组质粒 pET-amyA II 的构建

海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 基因 *amyA*, 使用 Arg 稀有密码子 (AGA, AGG) 高达 2.3%。大肠杆菌 *argU* 基因能够编码 Arg 稀有密码子 (AGA, AGG) 的 tRNA 基因。用 PCR 法从大肠杆菌基因组中扩增出 *argU* 基因, 插入 pET-*amyA* I 中构建成质粒 pET-*amyA* II。

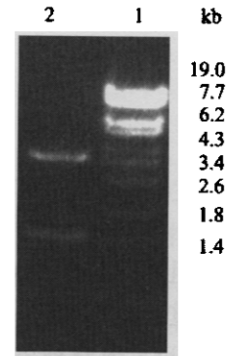


图 1 DNA 琼脂糖电泳图
1 ADNA/ *Eco*T14 I marker, 2 pET-*amyA* I *Nde* I and *Hind*III digestion

根据文献[6, 7]分析 *argU* 基因序列, 设计引物扩增 *argU* 基因。

N 端引物为 (5' -CCCAGATCTCTTTGATACATGAAAATACGG-3');

C 端引物为 (5' -CCCAGATCTACCAAGCGCGCTAAGCG-3')。

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 50℃ 退火, 其它条件同上。将 PCR 产物 *argU* 基因用 *Bgl* II 酶切, 插入 pET-amyA I, 转化 *E. coli* JM109, 挑取正确转化子。重组质粒 pET-amyA II 构建过程如图 2。

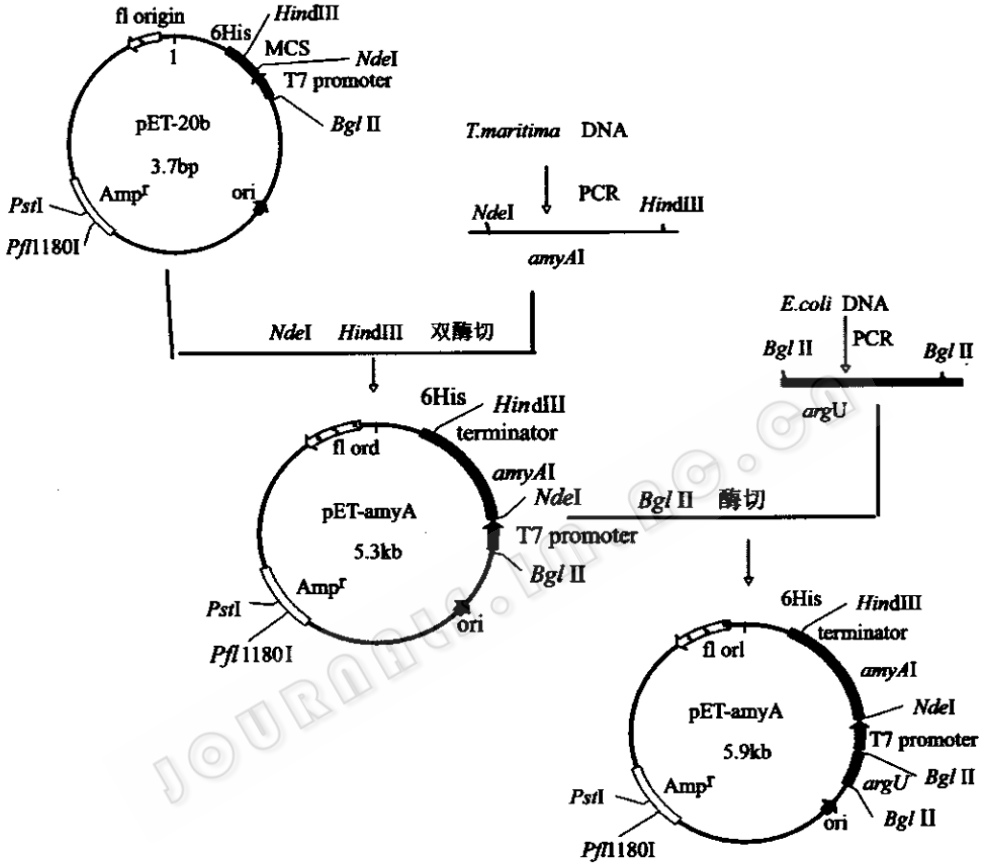


图 2 重组质粒 pET-amyA II

重组质粒 pET-amyA II 的双酶切检测如图 3。由图 3 可见: 重组质粒 pET-amyA II 经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后, 在 DNA 琼脂糖电泳图上产生两条带。一条在 1.6 kb 左右, 与 *amyA* I 基因理论大小 1.66 kb 相符; 另一条在 4.1 kb 左右, 与线性 pET-20 (b) 加 *argU* 基因的理论大小 4.15 kb 相符。

2.3 酶活力的测定

重组菌株 (pET-amyA)、(pET-amyA I)、(pET-amyA II) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 和重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 中经诱导后测得酶活分别是 1, 658.0 U/ mL、6, 721.7 U/ mL、

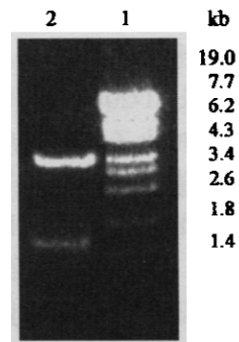


图 3 DNA 琼脂糖电泳图
1 λDNA/ EcoT14 I marker, 2 pET-amyA II *Nde* I and *Hind* III digestion

8,904.5 U/mL、1,3867.7U/mL, 较原始重组菌株 (pET-amyA) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 表达的酶活相比, 重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 表达的酶活提高了 4.05 倍; 重组菌株 (pET-amyA II) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 表达的酶活提高了 5.37 倍; 重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 表达的酶活提高了 8.38 倍。

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

取诱导 4h 的重组菌的菌液 1mL, 5,000 g 离心 10 min, 去上清。加 5 μ L 5 \times 上样缓冲液和 20 μ L H₂O 煮沸 10min, 离心取上清上样。SDS-PAGE 结果如图 4。

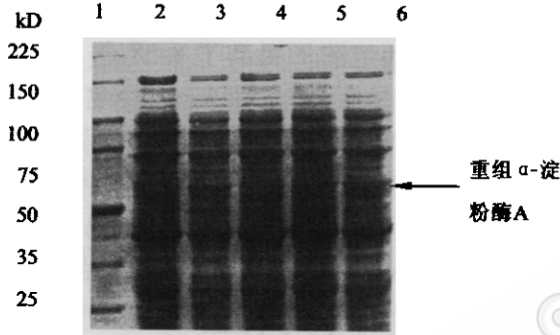


图 4 海栖热袍菌胞外 α -淀粉酶表达产物 SDS-PAGE 电泳图谱

- 1 Protein molecular mass markers, 2 Recombinant *E. coli* JM109 (DE3) / pET20 (b), 3 Recombinant *E. coli* BL21 - CodonPlus (DE3) -RIL/pET - amyA I, 4 Recombinant *E. coli* JM109 (DE3) / pET-amyA, 5 Recombinant *E. coli* JM109 (DE3) / pET-amyA I, 6 Recombinant *E. coli* JM109 (DE3) / pET-amyA II

从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果图上可以明显地发现 C、D、E 和 F 道的蛋白电泳条带在 61kD 处与 B 道相比出现了特征性条带, 通过对比分子量初步确定它是表达的 α -淀粉酶。

3 讨论

海栖热袍菌属栖热袍菌属, 生长在 55 $^{\circ}$ C ~ 90 $^{\circ}$ C 的海底火山口附近, 最适生长温度 80 $^{\circ}$ C 左右, 是一种严格厌氧、杆状、无孢子的发酵型细菌, 难于培养。而它作为一种热稳定酶源, 有很大的开发应用潜力, 因此一直是科学家们的研究热点。但到目前, 在几个常用的常温菌表达系统中, 极端菌特有的耐热蛋白的表达水平都不高。这是因为极端嗜热菌常使用数量较大的常温菌稀有密码子, 直接影响了这些蛋白的表达水平。本文通过对海栖热袍菌胞外 α -淀粉酶基因非优势密码子进行了一系列改造, 对酶活的提高贡献很大。重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 表达的酶活提高了 4.05 倍, 分析可能的原因: (1) 热袍菌属的海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 的信号肽不能被大肠杆菌识别, 使得海栖热袍菌的 α -淀粉酶 A 停留在细胞膜上, 加重了细胞生存的负担, 影响表达量, 还有可能会影响 α -淀粉酶 A 的折叠。(2) 海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 基因的信号肽被切除后, 起始密码子区域大约 60 个氨基酸中优势密码子比例的增高, 也将提高翻译速度, 从而提高 α -淀粉酶 A 的表达量^[3,4,8,9]。(3) 海栖热袍菌 α -淀粉酶 A 的基因的信号肽切除后, 使得形成的 mRNA 二级结构更有利于翻译, 从而使得基因高效表

达。重组菌株 (pET-amyA II) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 表达的酶活提高了 5.37 倍, 但相对与重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* JM109 (DE3) 表达的酶活的提高并不是很大, 分析可能的原因: (1) 大肠杆菌 *argU* 基因产物是一种 tRNA, 此 tRNA 对稀有密码子 AGA 和 AGG 专一。当基因中具有较多 AGA 和 AGG 密码子时, 宿主菌细胞中的 *argU* 基因产物就不敷使用, 表达量受到限制。 α -淀粉酶 A 基因仅含有 2.3% 的 Arg 稀有密码子, *argU* 基因的插入, 增加了 Arg 稀有密码子的 tRNA, 将提高 α -淀粉酶 A 的表达量^[10]。(2) α -淀粉酶 A 基因总共含有高达 19.36% 的稀有密码子, Arg 稀有密码子只占其中的 18.9%, *argU* 基因的插入不可能消除全部稀有密码子对表达水平的限制, 也提示 α -淀粉酶的表达水平还有很大的提高空间。重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 表达的酶活提高了 8.38 倍, 分析可能的原因: *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 补充带有大肠杆菌 3 种稀有密码子的 tRNA 基因的额外拷贝: *argU* tRNA、*ileY* tRNA 和 *leuW* tRNA, 以识别稀有密码子 AGA AGG AUA CUA, 而 α -淀粉酶 A 基因大量运用这 3 种稀有密码子, 因此重组菌株 (pET-amyA I) 在 *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) -RIL 中的表达消除了 3 种稀有密码子对表达水平的影响。这个结果也提示了这个极端高温菌来源的热稳定的 α -淀粉酶 A 的工业应用前景。

参 考 文 献

- [1] Wolfgang I., Ilse S., Peter R. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179** (3): 941~948.
- [2] Toshimichi I. *J Mol Biol*, 1981, **151**: 389~409.
- [3] LI H., LUO L. F. *J Theor Biol*, 1996, **181**: 111~124.
- [4] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] Weaver R. F. *Molecular Biology*. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] Pratibha S., James R. W. *Journal of Bacteriology*, 1992, **174** (6): 1956~1964.
- [7] Arthur M. B., Wim G. J. H. *International Journal for Parasitology*, 2000, **30**: 113~118.
- [8] Guay M., Gautier C. *Nucleic Acids Res*, 1982, **10**: 7055~7075.
- [9] Holm L. *Nucleic Acids Res*, 1986, **14**: 3075~3087.
- [10] 华子春, 王惠生, 董 晨, 等. *科学通报*, 1995, **40** (2): 175~178.