

枯草杆菌 *manA* 基因的克隆及定点突变*

毛绍名¹ 章怀云¹ 张学文^{2**}

(中南林业科技大学生命科学与技术学院 长沙 410004) (湖南农业大学生物科学技术学院 长沙 410128)

摘要 :*manA* 是编码 β -甘露聚糖酶(β -1,4-mannan mannohydrolase EC 3.2.1.78)的基因。将枯草杆菌 A33 株的 *manA* 基因插入到 pET-32a 载体,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了异源非融合表达,表达活力为 41.58U/mL。为了提高酶的表达活力,当采用 PCR 介导的定点突变技术将该基因第 2 号密码子 CUU 突变为 GUU,构建成突变表达载体 pET-32a-*manA*^{*} 并转入大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,目标酶表达活力增加到 138.65U/mL。说明当 β -甘露聚糖酶 N 端第二号氨基酸由亮氨酸突变为缬氨酸后,酶在大肠杆菌中的表达活力大大提高。推测是由于突变后的 β -甘露聚糖酶在大肠杆菌中的稳定性增强所致。突变表达的 β -甘露聚糖酶最适作用温度和 pH 值并没有发生明显改变。

关键词 : β -甘露聚糖酶,基因克隆,定点突变

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)03-0528-05

Cloning and Site-directed Mutation of *manA* Gene from *Bacillus subtilis* *

MAO Shao-Ming¹ ZHANG Huai-Yun¹ ZHANG Xue-Wen^{2**}

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004)

(College of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract :*manA* is a gene that encode β -mannanase(β -1,4-mannan mannohydrolase EC 3.2.1.78). *ManA* gene isolated from *Bacillus subtilis* strain A33 was cloned into an *E. coli* expression vector pET-32a and be transformed into *E. coli* strain BL21(DE3). An expression activity 41.58 U/ml was obtained after inducing. To get a better expression level that a site-directed mutation based on PCR was used to induce a mutant β -mannanase gene. The second code of the gene CUU was changed into GUU thus the second amino acid of β -mannanase of N-terminus changed from leucine to valine. The constructed mutated gene vector pET-32a-*manA*^{*} was transformed into strain *E. coli* BL21(DE3) and induced. The expression activity is increased to 138.65U/ml. It is predicted that a single change of amino acid enhancing the stability of expressed β -mannanase and greatly improve the expression level. The optimum temperature and pH of the enzyme is not changed observably.

Key words : β -Mannanase, Gene clone, Site-directed mutation

manA 是编码 β -甘露聚糖酶(β -1,4-mannan mannohydrolase EC 3.2.1.78)的基因。 β -甘露聚糖酶又简称为 β -D-甘露聚糖酶或 β -1,4-D-甘露聚糖酶,是一类能够水解含有 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖的内切水解酶,它属于半纤维素酶类^[1]。并具有纤维素酶活性的广谱诱导型多功能酶,广泛存在于动植物和微生物中^[2]。通过对各种来源的 β -甘露聚糖酶的研究和开发,这类酶已在食品、医药、饲料、造纸、印染、纺织、石油开采及生物研究技术等多方面得到了广泛的应用^[3]。

本文首先将枯草杆菌 A33 株的 β -甘露聚糖酶基因 *manA*,插入到 pET-32a 载体,并在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现异源非融合表达。为了提高酶的表达活力,采用 PCR 介导的定点突变技术将该酶 N-端第二个氨基酸亮氨酸(CUU)突变成缬氨酸(GUU)。构建了突变非融合表达载体 pET-32a-*manA*^{*},在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了异源非融合表达。以期获得高产量、高酶活力、高稳定性的酶。

* 基金项目:湖南省优秀中青年基金(No. 01JZY2099)

** 通讯作者 Tel: 0731-4673602, E-mail: xwzhang@mail.hunau.edu.cn

收稿日期:2006-09-14,修回日期 2006-10-27

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. coli Inv(F'菌株、*E. coli* BL21(DE3)菌株及枯草杆菌 A33 菌株均由湖南农业大学遗传工程实验室提供; pET-32a 质粒购自 Novagen 公司。

1.2 工具酶及主要试剂

Nde I、*Eco*R I、*T*₄ DNA 连接酶、Taq DNA 酶、dNTPs、DNA Marker 以及 Prestained Protein Molecular Weight Marker # SM0441 均购自 MBI 公司, 槐豆胶购自 Sigma 公司。

1.3 引物设计及目的基因的 PCR 扩增

1.3.1 引物设计 (1) 正常引物的设计: 根据毛绍名等已在 GenBank 注册(Accession Number :DQ269473)的 β -甘露聚糖酶基因 *manA* 及 pET-32a 表达载体的特点, 设计引物如下: P1(含 *Nde* I 酶切位点): 5'-CGCCAT ATG CTTAAAAAGTTAGCAG-3'; P2(含 *Eco*R I 酶切位点): 5'-CCG GAATTCTTATTCCGCGATCGGCG-3', 由上海生物工程技术公司合成。

(2) 突变引物的设计: 根据《pET System Manual》^[4]中的“N-end rule”-原核生物的蛋白质稳定性与其 N-端氨基酸的组成有很大关系, 研究发现当表达的目标蛋白质 N-端是 Arg, Lys, Phe, Leu, Trp, Tyr 时其半寿命仅仅 2min。尤其当亮氨酸出现在目标蛋白质 N-端第二位时(即甲硫氨酸之后), 亮氨酸很容易因为 fMet 被去除而暴露出来, 从而导致目标蛋白的迅速降解, 因此当 *Nde* I 酶切位点被用作在 pET 载体中产生非融合蛋白时, 在目标蛋白质 N-端第二个位置应当避免出现 Leu 密码子。由于该 β -甘露聚糖酶(N-MetLeuLysLysLeuAlaValCysLeuSer-)的 N-端第二位氨基酸刚好是亮氨酸(Leu)。推测该蛋白质原核表达后可能不稳定, 从而通过 PCR 介导的定点突变技术来改造此酶。由于亮氨酸(CUU)是中性氨基酸, 它和中性氨基酸缬氨酸(GUU)分子结构相差一个亚甲基, 密码子仅相差一个碱基, 所以设计点突变引物将 C 突变成 G。突变上游引物: P3(含 *Nde* I 酶切位点, G* 为突变碱基): 5'-CGCCAT ATG G* TTA AAAAGTTAGCAG-3'; 下游引物使用 P2, 引物由上海生物工程技术公司合成。

1.3.2 *manA* 和突变体 *manA 的获得**: 按姚斌等^[5]

的方法提取枯草杆菌 A33 菌基因组 DNA。用正常引物(P1 和 P2)和突变引物(P3 和 P2)分别对 A33 菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增。使用降落 PCR 程序: 95℃预变性 4min, 94℃变性 1min, 62℃退火 50s, 72℃延伸 120s, 4 个循环; 再 94℃变性 1min, 60℃退火 50s, 72℃延伸 120s, 4 个循环; 再 94℃变性 1min, 58℃退火 50s, 72℃延伸 120s, 4 个循环; 再 94℃变性 1min, 56℃退火 50s, 72℃延伸 120s, 4 个循环; 再 94℃变性 1min, 54℃退火 50s, 72℃延伸 120s, 4 个循环; 再 94℃变性 1min, 52℃退火 50s, 72℃延伸 120s, 30 个循环后, 最后 72℃延伸 15min。

PCR 产物经电泳检测、胶回收后, 分别用 *Nde* I 与 *Eco*R I 进行双酶切, 37℃酶切 12 h, 经凝胶电泳后回收目的片段, 再将目的片段与 pET-32a 载体的连接并转化 *E. coli* Inv(F')。

1.3.3 表达载体 pET-32a-*manA* 和 pET-32a-*manA 的鉴定**: 分别对两组转化菌进行菌落 PCR 反应检测。并用 *Nde* I 和 *Eco*R I 对重组质粒进行双酶切检测。将菌落 PCR 及双酶切检测均呈阳性的质粒送往上海英俊生物技术有限公司测序。

1.3.4 表达载体 pET-32a-*manA* 和 pET-32a-*manA 在大肠杆菌中的诱导表达**: 将重组质粒 pET-32a-*manA* 和 pET-32a-*manA** 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)。获得的阳性菌按常规方法进行摇瓶培养, 当 *OD*₆₀₀ 至 0.6 时, 加入 IPTG 至不同的终浓度(0.5mmol/L, 1.0mmol/L, 1.5 mmol/L, 2.0 mmol/L), 在不同的诱导温度(37℃、30℃、28℃、25℃)条件下, 继续培养 6h~7h, 每隔 1h 取 1mL 菌液, 12000r/min 离心 30s, 菌体与培养基分离, 于 -20℃保存。

1.3.5 表达产物生物学活性的测定: 参照 Akino 等^[6]的方法, 取 0.025mL 经 IPTG 诱导的重组菌上清液与 1mL 槐豆胶溶液(0.5% pH7.0 磷酸缓冲液配制)混合, 55℃准确反应 10min, 然后用 DNS 法测定水解产生的还原糖, 在上述反应条件下, 每分钟产生 1 μ mol 还原糖所需酶量为 1 个酶活力单位。表达的 β -甘露聚糖酶分别在不同的 pH 值和温度下进行酶促反应测定其最适 pH 和最适温度。

1.3.6 表达产物的 SDS-PAGE 检测: 取 1mL 诱导培养物离心收集菌体。用双蒸水洗 2 遍后重悬于 100 μ L 双蒸水中。加入等体积的 2 \times SDS 加样缓冲液, 100℃煮 5min, 取 10 μ L 上 10% 的聚丙烯酰胺凝胶

电泳^[7]。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pET-32a-manA 和 pET-32a-manA* 的构建流程见图 1

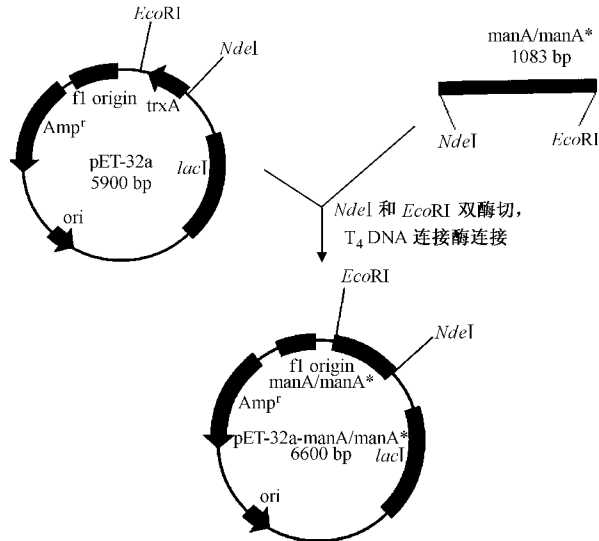


图1 pET-32a-manA 和 pET-32a-manA* 表达载体构建流程

2.2 重组子 pET-32a-manA 和 pET-32a-manA* 的鉴定

在两组转化平板上分别随机挑取 5 个菌落,分别对其进行菌落 PCR 反应,都能扩出约 1100bp 的特异条带,与预期大小相符。选取 PCR 检测呈阳性的菌落培养后提取质粒以 *NdeI* 和 *EcoRI* 进行酶切,均能切出一条约 1100bp 的条带,与预期结果相

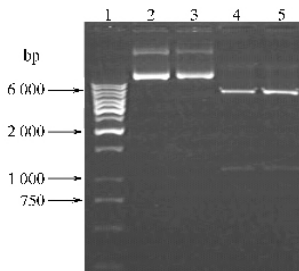


图2 pET-32a-manA 重组质粒双酶切

一致(图2和图3)。将菌落 PCR 及双酶切检测均呈阳性的 pET-32a-manA 和 pET-32a-manA* 质粒进行测序鉴定,结果表明两组质粒构建正确,具有正确的

阅读框。

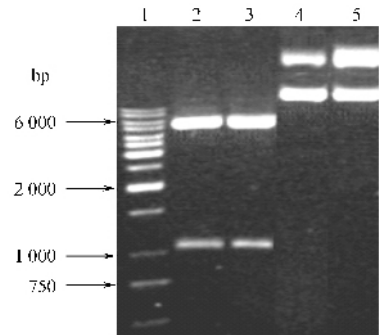


图3 pET-32a-manA* 重组质粒双酶切

1 DNA Marker 2,3 pET-32a-manA* 重组质粒双酶切 4,5 pET-32a-manA* 重组质粒

2.3 pET-32a-manA 和 pET-32a-manA* 在大肠杆菌中的诱导表达

2.3.1 诱导时间对表达的影响 通过 DNS 法^[6]检测重组菌诱导表达后上清液的酶活力,检测不同的诱导时间对重组菌表达的影响,结果见图4。由图可知,两组重组菌诱导表达后的上清液都具有 β -甘露聚糖酶活性,所以推测该酶为可溶性表达;当没有 IPTG 诱导时,两重组菌均有一定的本底表达;当加入 IPTG 诱导 6h 后,重组菌 pET-32a-manA (*E. coli* BL21(DE3))上清液酶活力达到最高 41.58 U/mL,而突变重组菌 pET-32a-manA* (*E. coli* BL21(DE3))诱导时间达到 5h 时,上清液酶活力就达到最高 138.65 U/mL,是突变前表达的酶活力的 3 倍多。

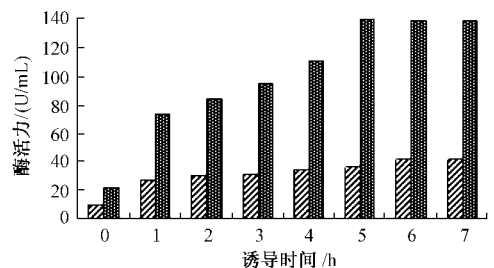


图4 pET-32a-manA (*E. coli* BL21(DE3))和 pET-32a-manA* (*E. coli* BL21(DE3))重组菌不同诱导时间后上清液 β -甘露聚糖酶的活力分析

▨ 未突变非融合表达,■ 突变后非融合表达

2.3.2 IPTG 浓度对表达的影响 用不同终浓度的 IPTG 在 37℃ 和 30℃ 分别诱导未突变和突变重组菌 6h,取重组菌诱导后产生的粗酶液,检测其酶活力,结果见图5和图6。由图可知:在 37℃ 和 30℃ 诱导条件下,当 IPTG 终浓度达到 1.0 mmol/L 时,两组重

组菌产生的酶液,其酶活力均达到最高,为最佳 IPTG 诱导浓度。

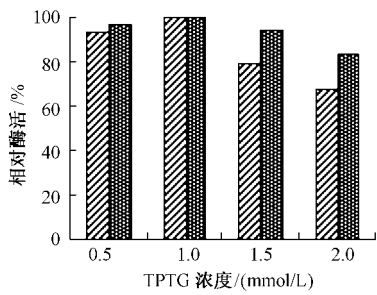


图 5 37℃诱导时 IPTG 浓度对 β -甘露聚糖酶表达的影响

▨ 未突变非融合表达 ■ 突变后非融合表达

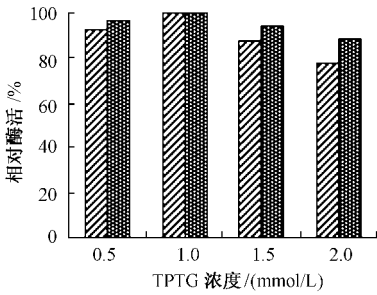


图 6 30℃诱导时 IPTG 浓度对 β -甘露聚糖酶表达的影响

▨ 未突变非融合表达 ■ 突变后非融合表达

2.3.3 诱导温度对表达的影响:在 25℃、28℃、30℃、37℃下用终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导重组菌 6h,其粗酶液活力的检测结果见图 7。由图可知:

(1) 未突变重组菌在 37℃ 诱导表达后产生的粗酶液,酶活力较低,28℃ 诱导时,酶活力最高,为最佳诱导温度 (2) 突变重组菌在 30℃ 诱导表达后产生的粗酶液,其酶活力最高,为最佳诱导温度,而其它温度诱导时酶活力不高。

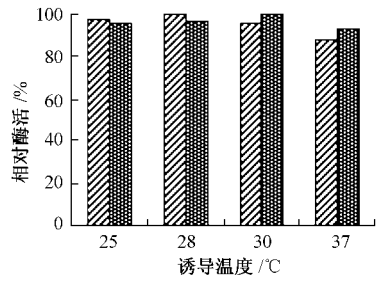


图 7 诱导温度对 β -甘露聚糖酶表达的影响

▨ 未突变非融合表达 ■ 突变后非融合表达

2.3.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析:将经过 IPTG 诱导后的重组菌菌体 SDS-PAGE(图 8 和图 9)检测,结果表明 (1) 未突变重组菌和突变重组菌经过 SDS-PAGE 电泳后,结果都有分子量大小约为 40kD 的明

显条带出现,该条带大小与所预测的 β -甘露聚糖酶非融合蛋白大小一致,分子量约为 40kD,没有经过 IPTG 诱导的重组菌有一定的本底表达,但是经 IPTG 诱导后,随着诱导时间的增长,酶蛋白的量逐渐增多。

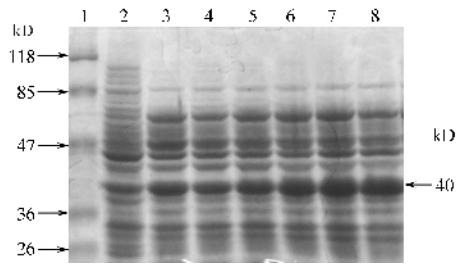


图 8 pET-32a-manA⁺(*E. coli* BL21(DE3))诱导表达蛋白的 SDS-PAGE

1 蛋白质 Marker, 2 pET-32a(*E. coli* BL21(DE3))空质粒菌表达的蛋白 3~8 不同诱导时间后重组菌表达的蛋白(依次为 0h、2h、3h、4h、5h、6h)

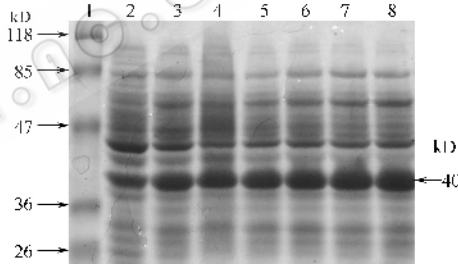


图 9 pET-32a-manA⁺(*E. coli* BL21(DE3))诱导表达蛋白的 SDS-PAGE

1 蛋白质 Marker, 2 pET-32a(*E. coli* BL21(DE3))空质粒菌表达的蛋白 3~8 不同诱导时间后重组菌表达的蛋白(依次为 0h、2h、3h、4h、5h、6h)

2.3.5 β -甘露聚糖酶的生物学活性测定:取菌体表达后产生的粗酶液,进行生物学活性的测定,结果表明:在含空载体的菌株中检测不到 β -甘露聚糖酶活性,而两组重组菌诱导后产生的粗酶液,都有 β -甘露聚糖酶活性,酶学性质研究结果(图 10 和图

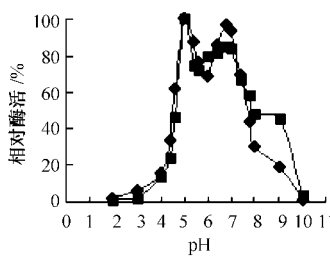


图 10 pH 值对 β -甘露聚糖酶活力的影响
◆ 未突变非融合表达 ■ 突变后非融合表达

11)(1)未突变重组菌和突变重组菌表达的 β -甘露聚糖酶,在55℃下其作用pH都有pH5.0和pH6.8两个峰值,最适作用pH值都为5.0;在pH5.0下,未突变和突变的 β -甘露聚糖酶最适作用温度都为60℃,当温度达到95℃时,两组酶都没有完全失活,这表明两组酶都有一定的耐热性。

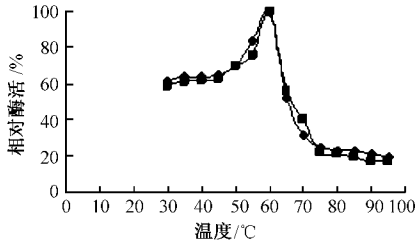


图 11 温度对 β -甘露聚糖酶活力的影响

◆—未突变非融合表达, ■—突变非融合表达

3 讨论

3.1 关于非融合表达和本底表达

由于融合表达时表达的目的蛋白需要进一步切割与纯化,经切割后的目的蛋白上往往带有少数载体融入的氨基酸,这样往往会使得对N-端要求较严格的目的蛋白发生构象改变甚至生物学活性部分或全部丧失。本研究将pET-32a载体中的his标签序列去除,采用非融合表达方式,除去了融合表达时his标签序列对 β -甘露聚糖酶性质的影响,使表达产物能与 β -甘露聚糖酶的序列完全一致,为更好的研究酶的生物学特性奠定了基础。

虽然认为pET系统理论上讲可以严格调控目的基因的表达,但调控不是绝对的,即使在没有IPTG存在的情况下,也会有少量lacUV5启动子表达的T7 RNA聚合酶,它将结合T7启动子,启动其下游目的基因的转录。因此,在IPTG诱导前,产生目的蛋白的本底表达。

3.2 关于PCR介导的体外突变

定点突变是普遍用于分子生物学和生物化学的有效方法。早期应用于定点突变的方法,得到突变子的效率很低^[8]。随着PCR技术的发展,为定点诱变开辟了一条新途径,并建立起多种诱变方法^[9]。

本研究采用PCR介导定点突变将枯草杆菌A33株的 β -甘露聚糖酶N-端第二个氨基酸亮氨酸(CUU)突变成缬氨酸(GUU),结果发现(1) β -甘露聚糖酶N-端第二个氨基酸亮氨酸突变成缬氨酸,并没有丧失酶活性,突变重组菌诱导的上清液最高酶活力是突变前的3倍多,推测基因突变后可能增强了 β -甘露聚糖酶在大肠杆菌中的稳定性,从而导致酶的表达量提高了。(2)未突变重组菌低温诱导酶活力更高,最佳诱导温度为28℃;而突变重组菌其最佳诱导温度却为30℃。一般温度越低,酶的性质越稳定,所以推测可能由于突变后的 β -甘露聚糖酶在大肠杆菌中的降解速率减弱,增强了其稳定性,使重组菌在30℃诱导时达到最高酶活力。

本研究表明枯草杆菌A33株的 β -甘露聚糖酶N-端第二个氨基酸亮氨酸不是催化甘露聚糖降解所必须的活性中心或底物结合位点,它的突变不会对酶的催化作用产生影响,在进行非融合表达时反而能增强 β -甘露聚糖酶的稳定性,提高了酶的表达量和酶活力。本工作为研究 β -甘露聚糖酶作用机理及通过分子进化技术改善酶的特性使其能在生产中应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Eduardo A X, Huizhong C, Irina A K, *et al.* Can J Microbiol, 2005, **51**: 559 ~ 568.
- [2] Per Hagglund, Torny Eriksson, Anna Collen, *et al.* Journal of Biotechnology, 2003, **101**: 37 ~ 48.
- [3] TseChun L, Chinshuh C. Process Biochemistry, 2004, **39**: 1103 ~ 1109.
- [4] Novagen, pET System Manual, the 10 th edition, www.novagen.com, 2002 pp.40.
- [5] 姚斌,袁铁铮,王元火,等. 生物工程学报, 2000, **17**(1): 11 ~ 15.
- [6] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K, *et al.* Anric Biol Chem, 1988, **52**: 773 ~ 779.
- [7] 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯 著. 金冬雁, 黎孟枫 等译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993.
- [8] Weiner M P, Felts K A, Sisim T G T, *et al.* Gene, 1993, **126**: 35 ~ 41.
- [9] Landt O, Grunert H P, Hahn U. Gene, 1990, **96**: 125 ~ 128.