

海栖热袍菌耐高温 β -半乳糖苷酶基因的 克隆和表达

张 敏 江正强* 唐 苹 丛倩千 李里特

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要: 本文主要研究了在大肠杆菌中克隆和表达海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) MSB8 的一个 β -半乳糖苷酶基因 (TM_0310)。以海栖热袍菌基因组 DNA (GenBank 登录号 AE000512) 为模板, 设计特异性引物带有 *NcoI*-*HindIII* 酶切位点, 克隆得到的该基因全序列为 2019 bp, 编码 672 个氨基酸, 分子量为 78.972 kD。该基因编码的蛋白质属于 42 族, 根据氨基酸同源性分析, 该 β -半乳糖苷酶与 *Thermotoga petrophila* RKU-1 来源的假想的 β -半乳糖苷酶 (GenBank 登录号 ABQ46628.1) 以及 *Thermotoga* sp. RQ2 来源的 β -半乳糖苷酶 (GenBank 登录号 EDQ29256.1) 同源性最高, 均为 95%。重组转化子经诱导酶比活可达 2.08 U/mg 蛋白。粗酶液经过 80℃ 热处理 10 min, 酶活残留 70% 以上, 表明该酶有很好的耐热性, 在高温工业环境中良好应用前景。

关键词: 海栖热袍菌, β -半乳糖苷酶, 克隆, 表达, 高温

Cloning and Expression of a β -galactosidase Gene from *Thermotoga maritima*

ZHANG Min JIANG Zheng-Qiang* TANG Luo CONG Qian-Qian LI Li-Te

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: The cloning and expression of a β -galactosidase gene (TM_0310) from *Thermotoga maritima* MSB8 was studied. The gene consists of 2019 bp, and the translated protein encodes 672 amino acids and its molecular mass is approximately 78.972 kD. The homology analysis of the deduced amino acid sequences showed that the enzyme shared 95% identity with a putative β -galactosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1 and a β -galactosidase from *Thermotoga* sp. RQ2. The galactosidase activity was up to 2.08 U/mg after the recombinant *E. coli* BL21 was induced by IPTG. The crude lysate remained about 70% activity after treated at 80 °C for 10 min, indicating that the recombinant enzyme is thermostable and may be used at high temperatures.

Keywords: *Thermotoga maritima*, β -galactosidase, Cloning, Expression, Thermostable

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)又称 β -D-半乳糖 苷半乳糖水解酶(β -D-galactoside galacto-hydrolase,

EC.3.2.1.23), 商品名为乳糖酶(Lactase)。它的一个重要应用是水解牛乳和其它乳制品中的乳糖, 这样既可以解决乳糖不耐症患者的乳品消费问题, 又可以提高乳制品的甜度, 减少甜味剂的用量, 而且不增加食品的热量; 它的另一个重要应用是生产低聚半乳糖, 低聚半乳糖热稳定性较好, 具有多种生理功能, 近些年来已引起广泛关注^[1, 2]。

β -半乳糖苷酶来源广泛, 存在于植物, 哺乳动物的肠道, 细菌(大肠杆菌、乳酸菌等), 真菌(米曲霉、黑曲霉、脆壁酵母、乳酸酵母、热带假丝酵母等)以及放线菌等中。由于微生物的快速生长和高效代谢的生物学特性, 使其成为工业化酶制剂的主要来源。在较高的温度下应用 β -半乳糖苷酶有利于提高反应效率和避免微生物污染, 所以嗜热微生物的 β -半乳糖苷酶成为近年来研究热点之一, 其中已有一些研究报道其特性并用于乳糖的水解和低聚半乳糖的生产^[3-7]。但是, 嗜热微生物一般产酶量难以达到工业化应用的需要, 所以在大肠杆菌等系统中高效表达其产酶基因可大幅度提高酶产量, 满足研究和应用的需要^[8-10]。海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)生长在 55 ~90 的海底火山口附近, 最适生长温度 80 左右, 是一种严格厌氧、杆状、无芽孢的真细菌。1999 年 Nelson 等人完成了海栖热袍菌的基因全序列测定^[11]。该菌的开放阅读框 TM_0310, TM_1193, TM_1195 均编码 β -半乳糖苷酶。其中 TM_1193 编码的 β -半乳糖苷酶在大肠杆菌中成功表达, 其分子量是 129.501 kD, 该酶的最适温度 85 (底物是 oNPGal)^[12]。本文主要研究了 TM_0310 基因的克隆和表达, 为研究该酶的性质和潜在价值奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

pMD 18-T Vector, 限制性内切酶 *Nco* 和 *Hind*, T4 DNA ligase 购自 TaKaRa; Taq Plus DNA Polymerase 购自上海生工; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化; pNP- β -Galacopyranoside(以下简称 pNPGal), 低分子量标准蛋白购自 Sigma。

海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)MSB8 购自德国菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DSM 3109), 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21 (DE3) 购自北京天根生化, 质粒 pET-28a(+)由我校真菌遗传实验室提供。

1.2 菌株培养和基因组 DNA 的提取

种子培养基配方参见 DSMZ 的网站(<http://www.dsmz.de/media/med343.htm>) Medium 343。菌株活化后按 10%接种量接入培养基, 80 静置培养 18 h~20 h。4 12000 r/min 离心 20 min 收集菌体。基因组 DNA 提取参见分子克隆。

1.3 半乳糖苷酶基因克隆

根据海栖热袍菌 MSB8 的 TM_0310 基因的序列和表达载体 pET-28a(+)的多克隆位点设计正向引物 P1:(FW)5'-CCATGGTAAATCCGAAACTTCCTGT-3 (下划线处为 *Nco*I 酶切位点); 反向引物 P2:(REV)5'-AAGCTTTTCTTTTAGAAGGATCAGAAC-3 (下划线处为 *Hind* 酶切位点)。以基因组 DNA 为模板, PCR 条件为 94 5 min; 94 30 s, 52.5 30 s, 72 2 min, 30 个循环后 72 延伸 10 min。采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。将目的片段连接至 pMD18-T 载体, 热激转化 *E. coli* DH5 α 。筛选阳性菌落, 提取重组质粒, 经酶切鉴定后, 由生工测序。将测序正确的重组质粒用 *Nco* 和 *Hind* 酶切后, 回收目的片段, 连接至 pET-28a(+)载体, 转化 *E. coli* BL21, 在含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板筛选阳性转化子。

1.4 重组蛋白的诱导表达

挑取阳性转化子于 10 mL LB (含 50 μ g/mL 卡那霉素)培养基中, 37 振荡培养 15 h, 以 10%的接种量转接到 100 mL 相同培养基中, 30 振荡培养, 当培养液 OD_{600} 达到 0.5~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导培养 12 h 后, 离心收集细胞。用 5 mL 柠檬酸缓冲溶液 (50 mmol/L, pH 6.0)悬浮细胞, 超声波破碎细胞, 于 4 下 12000 r/min 离心 15 min, 收集上清液备用。

1.5 酶活和蛋白浓度的测定

按 Miller^[13] 等方法并稍加改动检测酶活: 225 μ L 5 mmol/L 底物 pNPGal (50 mmol/L, pH 6.0 柠檬酸钠缓冲液配制), 加 25 μ L 适当稀释的酶液, 70 保温 10 min, 加 750 μ L 2 mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 冷却后 410 nm 测吸光值; 1 个酶活力单位(U)定义: 上述条件下每分钟放出 1 μ mol pNP 所需的酶量。

蛋白质含量的测定采用 Lowry 法, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白绘制标准曲线。

1.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 和酶谱检测

按照标准 SDS-PAGE 方法(分离胶浓度 10%, 浓缩胶浓度 4.5%), 经考马斯亮蓝染色后观察结果,

确定目的蛋白的分子量。

酶谱的方法如下:电泳后, 25%异丙醇复性4次, 每次15 min; 50 mmol/L, pH 6.0 柠檬酸缓冲溶液洗4次, 每次8 min; 加入30 mmol/L 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside 40 mL, 50 °C 保温20 min, 在紫外下检测。

1.7 重组 β -半乳糖苷酶的耐热性

将粗酶液分别在50、60、70、80、90 °C下保温10 min, 置冰水浴中冷却30 min后, 离心取上清, 测定各样品酶活和蛋白的变化, 分析粗酶的耐热性。

2 结果与讨论

2.1 β -半乳糖苷酶基因的克隆

利用引物P1和P2扩增到与TM_0310基因大小基本一致的2 kb的片段(图略)。构建测序用重组质粒后, 用NcoI和HindIII酶切, 证实目的基因片段(2019 bp)已连接到pMD 18-T载体(2692 bp)(图1)。

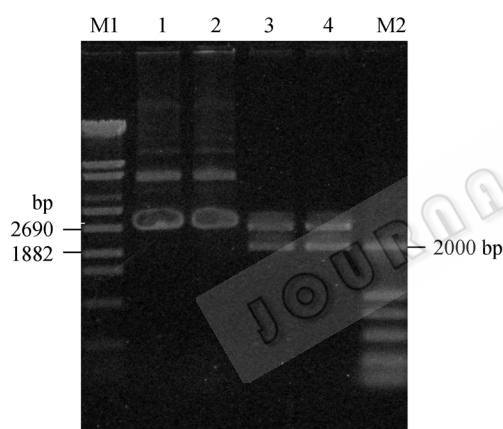


图1 重组质粒及其酶切电泳图

Fig. 1 The recombinant plasmids and digested with NcoI and HindIII

M1: λ -EcoT 14I digest Marker; 1, 2: 重组质粒; 3, 4: 重组质粒 NcoI, HindIII 双酶切; M2: DL2000 Marker

M1: λ -EcoT 14I digest Marker; 1, 2: recombinant plasmids of TA clone transformants; 3, 4: two recombinant plasmids that digested with NcoI and HindIII; M2: DL2000 Marker.

测序结果表明, 该片段与NCBI海栖热袍菌基因组信息中TM_0310片段的序列一致。在该数据库中进行基因同源性分析, 该基因与Thermotoga petrophila RKU-1的半乳糖苷酶基因(GenBank登录号CP000702.1的Tpet_0607基因片段)的同源性最高, 为94%, 这与两株菌是同属的有很大关系; 其次与Bacillus clausii KSM-K16的半乳糖苷酶序列

(GenBank登录号AP006627.1的ABC_1405基因片段)的同源性是64%, 与Bacillus circulans的半乳糖苷酶基因(GenBank登录号L03424.1)同源性63%; 但是, 该半乳糖苷酶基因与海栖热袍菌的另两个半乳糖苷酶基因(TM_1193和TM_1195)的同源性分别为18%和37%。说明, 海栖热袍菌产生的半乳糖苷酶具有多样性, 其他一些细菌也同时具有2个以上半乳糖苷酶基因。

2.2 重组蛋白的表达

将测序正确的重组质粒用NcoI和HindIII酶切后, 回收 β -半乳糖苷酶片段连接于pET-28a(+)的NcoI和HindIII位点并转化大肠杆菌BL21, 重组蛋白C端带有6个组氨酸标记。选取经菌落PCR和酶切检测的阳性转化子, 经诱导培养后, 检测酶活为2.23 U/mL发酵液, 其酶比活2.08 U/mg蛋白。

大肠杆菌自身也产生 β -半乳糖苷酶, 但由于其所产酶不耐热, 在70 °C时测定空载体的酶活不足重组菌的3%; 同时从电泳图判断(图2), 重组菌多了一条分子量与预测值78 kD相近的蛋白带, 且经酶谱确认是半乳糖苷酶, 进一步确认该 β -半乳糖苷酶基因已在大肠杆菌中表达。将该基因翻译成蛋白质, 根据氨基酸的同源性分析, 该半乳糖苷酶属于42族, 除与Thermotoga petrophila RKU-1和Thermotoga sp. RQ2的半乳糖苷酶的同源性是95%外, 与GenBank中登录的其余半乳糖苷酶的同源性小于50%, 说明此族耐热的半乳糖苷酶研究的很少。

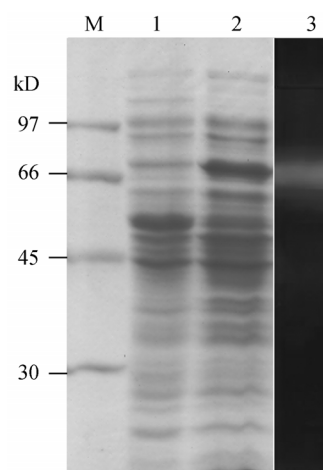


图2 重组蛋白的电泳和酶谱图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of a crude lysate fraction

M: 低分子量标准蛋白; 1: 含空载体的BL21; 2: 粗酶; 3: 酶谱

M: Low molecular weight standards; 1: BL21 without insert; 2: Crude lysate; 3: Enzyme zymogram

本文是首次将来源于海栖热袍菌的 TM_0310 半乳糖苷酶基因在 *E. coli* 中高效表达。另外, 来源于海栖热袍菌的 TM_1193 半乳糖苷酶基因在 *E. coli* 中表达后的比活是 1.08 U/mg^[12] (80 °C, 底物为 oNPGal)。

2.3 重组 β -半乳糖苷酶的耐热性

将粗酶液分别在不同温度下处理, 分析比活和回收率的变化见表 1。50 ~80 °C 处理后酶活回收率在 73.4%~80.4% 间, 表明该酶是耐热的; 且经高

温处理后, 一部分杂蛋白变性沉淀, 达到与目标蛋白的分离, 对该酶的纯化是有很有效的; 尤其是 80 °C 处理后, 酶活回收率 70% 以上, 纯化倍数可达 5.18 倍, 将来作为纯化的第一步是比较理想的。将各样品电泳检测(图 3), 也能反应随着热处理温度的增加, 目标蛋白在总蛋白中所占的比例逐渐增加, 说明该酶通过热处理可以得到较好的纯化效果。通常, 热处理可用于在 *E. coli* 中表达的耐热酶的纯化。

表 1 不同温度下细胞裂解液的热处理结果
Table 1 Summary of heat treatment of crude lysate

Temperature (°C)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude lysate	1964.4	944.7	2.08	100	1
50	1580.1	389.6	4.05	80.4	1.95
60	1509.4	263.7	5.73	76.8	2.75
70	1500.9	204.0	7.36	76.4	3.54
80	1441.3	133.8	10.77	73.4	5.18
90	702.6	83.2	8.45	35.8	4.06

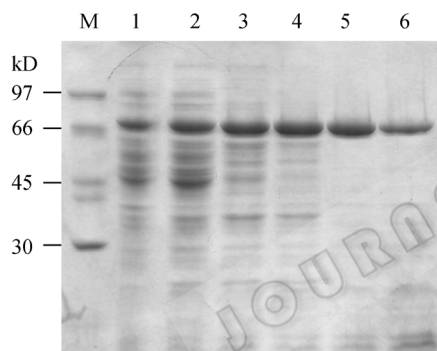


图 3 经不同温度热处理粗酶液的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of a crude lysate fraction

M: 低分子量标准蛋白; 1: 粗酶; 2, 3, 4, 5, 6: 粗酶分别在 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C 处理 10 min

M: Low molecular weight standards; 1: Crude lysate; 2~6: Crude lysate after treated at 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C for 10 min

3 结论

本文通过设计合适的引物, 将来源于海栖热袍菌的属于 42 族的 β -半乳糖苷酶基因(TM_0310)成功在大肠杆菌中表达, 氨基酸同源性分析表明, 与 *Thermotoga petrophila* RKU-1 和 *Thermotoga* sp.RQ2 的半乳糖苷酶的同源性均是 95%, 经诱导酶活可达 2.23 U/mL。且对粗酶的耐热性研究发现, 该酶的热稳定性还是比较好的, 热处理有明显纯化效果, 可以方便进一步研究该酶的性质, 为工业应用提供参考数据。

参考文献

- [1] Nakayama T, Amachi T. β -Galactosidase, enzymology. In: Flickinger MC, Drew SW (Eds.). Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bio-separation. New York, Wiley, 1999, pp. 1291–1305.
- [2] Boon MA, Janssen AEM, van't Riet K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microbiol Technol*, 2000, **16**: 274–181.
- [3] Ohtsu N, Motoshima H, Goto K, *et al.* Thermostable β -galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus* sp. A4: enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing. *Biosci Biotech Biochem*, 1998, **62**: 1539–1545.
- [4] Garcia-Garibay J, Liebl W, Schleifer KH. Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one- phase system with a hyperthermophilic β -galactosidase. *Biotech Bioeng*, 2000, **69**: 627–632.
- [5] Gul-Guven R, Guven K, Poli A, *et al.* Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *rittmannii* isolated from Antarctica. *Enzyme Microbiol Technol*, 2007, **40**: 1570–1577.
- [6] Hansson T, Adlercreutz P. Enhanced transglucosylation/hydrolysis ratio of mutants of *Pyrococcus furiosus* β -glucosidase: effects of donor concentration, water content, and temperature on activity and selectivity in hexanol. *Biotech Bioeng*, 2001, **75**: 656–665.
- [7] Petzelbauer I, Splechna B, Nidetzky B. Galactosyl-transfer catalyzed by thermostable β -glycosidases from *Sulfolobus solfataricus* and *Pyrococcus furiosus*: kinetic studies of the reactions of galactosylated enzyme inter-

- mediates with a range of nucleophiles. *J Biochem*, 2001, **130**: 341–349.
- [8] Ishikawa E, Sakai T, Ikemura H, *et al.* Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galactooligosaccharide production. *Society Biotech*, 2005, **99**(4): 331–339.
- [9] Kim Y, Park C, Oh D. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme Microbiol Technol*, 2006, **39**: 903–908.
- [10] Nguyen T, Splechtna B, Yamabhai M, *et al.* Cloning and expression of the β -galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*. *J Biotech*, 2007, **129**: 581–591.
- [11] Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, *et al.* Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 1999, **399**: 323–329.
- [12] Kim CS, Ji ES, Oh DK. Characterization of a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *J Appl Microbiol*, 2004, **97**: 1006–1014.
- [13] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

主编点评

一株新的药用植物内生菌 *Burkholderia* sp. H-6

赫荣乔

(《微生物学通报》编委会 北京 100101)

植物内生菌(Plant endophyte)是微生物中的一个重要类群,能参与植物次级代谢产物的合成与转化或独立合成次级代谢产物,其物种丰富,数量庞大,已经成为新医(农)药活性物质的潜在资源。研究显示,目前从植物内生菌中分离出的生物活性物质,大约51%属于未报道过的新化合物。因此,植物内生菌相关领域的研究工作,愈来愈受到国内外同行的关注。

曾庆桂、朱笃等^[1]对珍贵药用蕨类植物蛇足石杉(*Huperzia serrata*)内生菌进行了研究,从中筛选到一株对小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)等植物病害真菌具有强拮抗作用的内生细菌。通过形态、培养特性的观察,生理生化实验以及 16S rDNA 序列分析等工作,初步鉴定该菌株属伯克霍尔德属,并与常用的生防菌洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)亲缘关系较远,他们将其命名为 *Burkholderia* sp. H-6。值得注意的是, H-6 菌株显示出了较好的开发应用潜力。因此,我们将进一步关注朱笃等,有关 H-6 菌株所产生的拮抗物质及其抑菌机理等方面的研究进展。

关键词: 内生细菌, 蛇足石杉, 拮抗真菌活性, 鉴定

参 考 文 献

- [1] 曾庆桂, 朱 笃, 颜日明, 等. 一株拮抗真菌的蛇足石杉内生细菌分离鉴定及培养条件优化. *微生物学通报*, 2008, **35**(4): 512–518.

A Novel Endophytic Bacteria H-6 with High Antifungal Activity from *Huperzia serrata*

HE Rong-Qiao

(The Editorial Board of Microbiology, Beijing 100101)

Keywords: Endophytic bacterium, *Huperzia serrata*, Antifungal activity, Identification