

一株产高酶活性碱性磷酸酶解淀粉芽孢杆菌的分离及其 *phoD* 碱性磷酸酶基因的克隆与表达

熊梦霞¹, 廖华媛¹, 郑金², 何景锋¹, 曹锟¹, 余兴龙^{*1}

1 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128

2 湖南康保特生物科技有限公司, 湖南 长沙 410128

熊梦霞, 廖华媛, 郑金, 何景锋, 曹锟, 余兴龙. 一株产高酶活性碱性磷酸酶解淀粉芽孢杆菌的分离及其 *phoD* 碱性磷酸酶基因的克隆与表达[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 505-513

Xiong Mengxia, Liao Huayuan, Zheng Jin, He Jingfeng, Cao Kun, Yu Xinglong. Isolation of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain producing high-activity alkaline phosphatase and cloning and expression of the *phoD* gene[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 505-513

摘要:【背景】碱性磷酸酶作为工具酶被广泛应用于各个领域, 在免疫学检测方面应用较多的是 PhoA 家族的碱性磷酸酶, 尚无关于 PhoD 家族的碱性磷酸酶在免疫学检测方面的研究。【目的】筛选出一株产高酶活性 PhoD 家族碱性磷酸酶的细菌, 并将其 *phoD* 基因进行克隆表达, 研究 PhoD 的酶学性质, 为 PhoD 家族的碱性磷酸酶在免疫学检测方面的应用奠定一定的基础。【方法】采取有机质丰富的土样在有机磷平板中进行细菌分离, 以 4-硝基苯磷酸二钠盐(4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, p-NPP)为底物测定有机磷平板中单菌落的酶活性, 选取酶活性高的菌株作为目的菌株, 克隆其 *phoD* 基因。【结果】筛选到一株产碱性磷酸酶酶活性高的菌株 S2-4, 通过 16S rRNA 基因序列同源性比较分析, 鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌, 克隆了其 *phoD* 基因并进行诱导表达。研究了纯化后 PhoD 的酶学性质, PhoD 的最适反应温度为 70 °C; 最适反应 pH 为 9.8; PhoD 最适 Ca²⁺浓度为 3 mmol/L, Mg²⁺对 PhoD 的酶活性有抑制作用, K⁺、Zn²⁺、Mn²⁺和 Fe²⁺对 PhoD 的酶活性没有明显影响; 以 p-NPP 为底物, 在 25 °C 下测得 PhoD 的 K_m 为 5.94 mmol/L, V_{max} 为 31.46 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, k_{cat} 值为 103.59 s⁻¹, 为大肠杆菌碱性磷酸酶 EAP k_{cat} 值的 1.60 倍。【结论】菌株 S2-4 能产高酶活性的碱性磷酸酶, 其含有的 PhoD 为单体酶, 催化效率高于 EAP, 是比 EAP 具有更大优势的标记酶。

关键词: 碱性磷酸酶; 筛选; 解淀粉芽孢杆菌; *phoD*; 酶学性质

基金项目: 国家自然科学基金(31672539)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31672539)

*Corresponding author: E-mail: xlyu999@126.com

Received: 2021-06-04; Accepted: 2021-08-15; Published online: 2021-09-28

Isolation of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain producing high-activity alkaline phosphatase and cloning and expression of the *phoD* gene

XIONG Mengxia¹, LIAO Huayuan¹, ZHENG Jin², HE Jingfeng¹, CAO Kun¹, YU Xinglong^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Hunan Kangbaote Biotechnology Company Limited, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Background] Alkaline phosphatase (ALP), a tool enzyme, is widely used in various fields. Among the ALPs, PhoA has been extensively applied in immunological detection, while the functions of PhoD in immunological detection have been rarely reported. [Objective] This paper aims to screen a bacterial strain producing high-activity PhoD, clone and express the enzyme gene *phoD*, and study the enzymatic properties of PhoD, which is expected to lay a foundation for the application of PhoD in immunological detection. [Methods] Soil samples rich in organic matter were used to isolate bacteria in organophosphorus plate, and 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (p-NPP) was employed to detect the enzyme activity of single colonies. The strain with high enzyme activity was selected and the *phoD* gene was cloned. [Results] S2-4, the strain producing high-activity ALP, was screened out, which was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by 16S rRNA gene alignment. Its *phoD* gene was cloned and induced, and the enzymatic properties of purified PhoD are as follows: optimal reaction temperature, pH, and Ca²⁺ concentration of 70 °C, 9.8, and 3 mmol/L, respectively, inhibition of Mg²⁺ on PhoD activity, no significant influence of K⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, and Fe²⁺ on PhoD activity, Michaelis constant (K_m), maximum reaction rate (V_{max}), and catalytic constant (k_{cat}) of 5.94 mmol/L, 31.46 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, and 103.59 s⁻¹ at 25 °C in the presence of p-NPP, separately. The k_{cat} was 1.60 folds that of *Escherichia coli* alkaline phosphatase (EAP). [Conclusion] S2-4 can synthesize alkaline phosphatase with high activity and its monomer enzyme PhoD has higher catalytic efficiency than EAP, which is more advantageous than EAP as a marker enzyme.

Keywords: alkaline phosphatase; screening; *Bacillus amyloliquefaciens*; *phoD*; enzymatic properties

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)在碱性条件下能水解磷酸酯类化合物, 已被广泛用于免疫学标记检测, 如: 自动免疫分析系统、Southern 及 Western 印迹分析^[1]。目前, 商业化的碱性磷酸酶中活性最高的为牛小肠碱性磷酸酶, 但是由于哺乳动物的碱性磷酸酶产率低、热稳定性差等使其应用受到限制, 因此微生物的碱性磷酸酶受到关注^[2]。

碱性磷酸酶来源广泛, 不同来源的碱性磷

酸酶分子量大小、编码序列、空间结构及催化功能都有很大差异^[3]。原核生物的碱性磷酸酶主要分为 3 个家族, 即 PhoA、PhoD 和 PhoX^[4]。PhoA 主要为磷酸单酯酶, 属于二聚体酶, 活性位点包括 2 个 Zn²⁺和 1 个 Mg²⁺^[5]。PhoD 能水解磷酸单酯及磷酸双酯, 属于单体酶, 需 Ca²⁺激活^[6]。PhoX 既是磷酸单酯酶, 也是磷酸二酯酶, 属于单体酶^[7], 该酶的辅基包含 2 个 Fe³⁺、3 个 Ca²⁺及一个连接金属离子的氧代基团^[8]。

在免疫学检测应用方面,许多研究者将单链抗体与大肠杆菌碱性磷酸酶(*Escherichia coli* alkaline phosphatase, EAP)融合表达后,建立了一步法 ELISA 进行检测,如检测植物中的镰刀菌感染^[9]、人体中蜘蛛毒液^[10]、谷物中的黄曲霉毒素^[11]及狂犬病病毒^[12]等。这种抗体与 EAP 融合表达的蛋白既有抗原的特异性,又有标记酶的显色能力,可使构建的一步法 ELISA 简单高效。EAP 为二聚体酶,有复杂的空间结构^[13],而 PhoD 为单体酶,若将 PhoD 与单链抗体进行融合表达,得到的双功能蛋白所受空间位阻影响也更小,推测能更有效地使抗原蛋白发挥出其原有的生物特性。EAP 的 k_{cat} 值约为 65 s^{-1} ^[14],催化效率较低,若筛选到一个催化效率比 EAP 高的 PhoD,将使 PhoD 在免疫学检测方面有更大的价值。因此,本文从土壤微生物中筛选到一株产碱性磷酸酶活性较高的解淀粉芽孢杆菌,克隆了其 *phoD* 基因,研究了其酶学性质,为寻找更有利于作为融合表达的碱性磷酸酶标记基因奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 培养基、主要试剂和仪器

有机磷筛选培养基(g/L):葡萄糖 10.00,硫酸铵 0.50,氯化钠 0.30,氯化钾 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03, CaCO_3 5.00,卵磷脂 0.20, pH 7.5,琼脂粉 15.00。LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0,氯化钠 10.0。

胰蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉,卡那霉素、4-硝基苯磷酸二钠盐(4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, p-NPP)、DNA 分子量标准,北京索莱宝科技有限公司; PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase、*Bam*H I /*Xho*I 限制性内切酶,宝生物工程(大连)有限公司;异丙基硫

代半乳糖苷(IPTG),Sigma 公司;Ni 离子亲和层析介质,武汉汇研生物科技有限公司;二乙醇胺(diethanol amine, DEA),上海麦克林生化科技有限公司;Pierce[™]考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

多功能酶标仪, Molecular Devices 公司;全温度振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;凝胶成像系统,上海天能公司;PCR 仪,北京东胜创新生物科技有限公司;超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技有限公司;小型垂直电泳系统,伯乐生物医学产品有限公司;高速冷冻离心机, Thermo 公司;电热恒温水浴锅,上海飞越实验仪器有限公司。

1.2 采样及菌株分离培养

采取有机质丰富的土样,用灭菌的生理盐水进行稀释,取 500 倍的稀释液涂布于有机磷筛选培养基中,置于 37 °C 恒温箱中静置培养 20 h^[15]。

1.3 产高酶活性碱性磷酸酶菌株的筛选

挑取筛选培养基中的单菌落至加入了 100 μL 生理盐水的 96 孔板中混匀,加入 50 μL 的底物(1 mg/mL p-NPP, pH 9.8),在 37 °C 避光反应 20 min 后,加入 50 μL 0.5 mol/L NaOH 终止反应,在 405 nm 处测定 OD 值。选取读数高的单菌落进行平板划线,如此操作 3 次,最终得到纯菌株。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 菌株形态学观察

通过在筛选培养基中划线观察菌落形态,挑取单菌落进行革兰氏染色观察。

1.4.2 16S rRNA 基因分子鉴定

采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')扩增保守序列。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后

测序。测序结果经 BLAST 进行序列比对, 利用 MEGA 7.0 中的邻接法(neighbor-joining method) 构建系统发育树。

1.5 碱性磷酸酶 *phoD* 基因的克隆

根据 16S rRNA 基因的 BLAST 比对结果, 参考 GenBank 数据库中 *Bacillus amyloliquefaciens* strain ALB69 (登录号: CP029070.1) 的 *phoD* 基因设计扩增引物, 上游引物为 5'-GCAGGATC CCTCCGAAATTTTCAAACACTATC-3'; 下游引物为 5'-GAGCCTCGAGTTGTGAGATTTTGGCC CGTT-3', 其中上游引物下划线处为 *BamH* I 酶切位点, 下游引物下划线处为 *XhoI* I 酶切位点。以目的菌株全基因组为模板, 采用 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 体系进行 PCR 扩增。PCR 产物和 pET-28a(+) 载体经 *BamH* I/*XhoI* I 双酶切连接后转入到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板中筛选阳性菌株, 提取阳性菌株质粒测序。

1.6 蛋白的诱导及纯化

将重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET-28a(+)-*phoD* 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜复苏, 按 1% 将复苏菌液接种到 200 mL 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养至菌液 OD_{600} 为 0.6–0.8; 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 诱导约 20 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 加入 10 mL Tris-HCl 缓冲液重悬菌体后进行超声破碎, 功率 25%, 工作 5 s, 间隔 5 s, 共超声 20 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 20 min, 取上清, 得到 PhoD 碱性磷酸酶粗酶液。利用 Ni 离子亲和层析介质对 PhoD 碱性磷酸酶粗酶液进行纯化, 经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.7 碱性磷酸酶 PhoD 酶学性质分析

1.7.1 确定酶最适反应 pH

用纯水将蛋白稀释到 500 ng/mL, 取 100 μL

稀释好的蛋白液, 加入 50 μL 不同 pH (pH 值为 8.0、9.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 值为 9.5、9.8、10.0、10.5、11.0、12.0 的 10% 二乙醇胺缓冲液) 的 p-NPP 底物 (1 mg/mL p-NPP, 2 mmol/L Ca^{2+}), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 加入 50 μL 0.5 mol/L NaOH 终止反应, 测定 405 nm 处的 OD 值。以酶活性最高为 100%, 计算其他 pH 下 PhoD 的相对酶活性。

1.7.2 确定酶最适反应温度

在 1.7.1 方法的基础上, 调整反应底物 pH 值为 9.8, 分别在 37、40、50、60、65、70、75、80 $^{\circ}\text{C}$ 下反应。以酶活性最高为 100%, 计算其他温度下 PhoD 的相对酶活性。

1.7.3 不同浓度金属离子对 PhoD 酶活性的影响

在 1.7.1 方法的基础上, 调整反应底物 pH 值为 9.8, 反应温度为 70 $^{\circ}\text{C}$, 分别配制含 0–10 mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 K^{+} 的底物及 0–100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的底物, 以酶活性最高为 100%, 分别计算其他离子浓度下 PhoD 的相对酶活性。

1.7.4 PhoD 米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{\max} 和 k_{cat} 的测定

配制不同浓度 (1、2、3、4、5 mmol/L) 的 p-NPP 底物 (pH 9.8, 3 mmol/L Ca^{2+}), 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下测定不同底物浓度下的酶促反应速度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 分别以 p-NPP 浓度和反应速度的倒数为横、纵坐标, 计算出 PhoD 的米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{\max} 和 k_{cat} 。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

经碱性磷酸酶酶活性检测筛选, 从土壤中分离到一株产碱性磷酸酶酶活性较高的菌株 S2-4。如图 1A 所示, 在筛选培养基中, 菌株

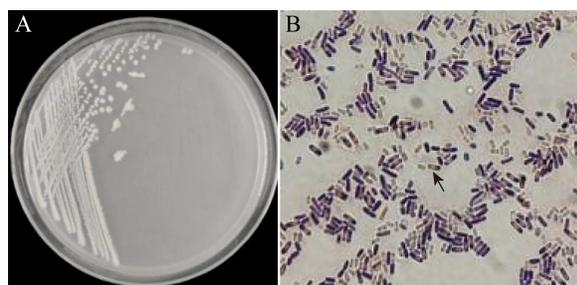


图 1 菌株 S2-4 菌落形态(A)和革兰氏染色镜检结果(100×) (B)

Figure 1 Colony morphology (A) and Gram staining of strain S2-4 (100×) (B).

S2-4 的菌落呈乳白色, 形状不规则, 表面粗糙无光泽。如图 1B 所示, 革兰氏染色呈阳性, 菌体呈短杆状, 两端钝圆。

2.2 菌株分子学鉴定

以菌株 S2-4 的全基因组为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增, 在 1 500 bp 左右出现目的条带, 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后测序。将得到的测序结果在 NCBI 进行 BLAST, 利用 MEGA 7.0 中的邻接法构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 菌株 S2-4 与已报道的 *Bacillus amyloliquefaciens* (MN099360.1、KU359247.1)亲缘关系最近, 相似

性达 100%, 判断菌株 S2-4 为解淀粉芽孢杆菌。

2.3 碱性磷酸酶 *phoD* 基因的克隆

以菌株 S2-4 全基因组为模板, 扩增其碱性磷酸酶 *phoD* 基因, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 3, 在 1 500 bp 左右有一特异性条带, 与目的片段 1 581 bp 大小相符。

PCR 产物和 pET-28a(+)载体经 *Bam*H I/*Xho*I 双酶切, 连接后转入 *E. coli* BL21(DE3), 经含卡那霉素的 LB 平板筛选后, 挑取单克隆进行鉴定, 将阳性菌株进行蛋白诱导表达并提取质粒测序, 质粒测序后获得的编码蛋白基因的 GenBank 登录号为 MN579654。

2.4 碱性磷酸酶 PhoD 纯化结果

重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET-28a(+)-*phoD* 和阴性对照菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET-28a(+)经 1 mmol/L IPTG 16 °C 诱导约 20 h 后收集菌体, 超声破碎后得到粗酶液。利用 Ni 离子亲和层析介质对 PhoD 粗酶液进行纯化, SDS-PAGE 电泳图中目的条带与 PhoD 预期大小 59.7 kDa 相符。阴性对照、PhoD 粗酶液和 PhoD 纯化后电泳图见图 4。纯化后的 PhoD 纯酶经 Bradford 法测定蛋白浓度为 195.85 μg/mL。

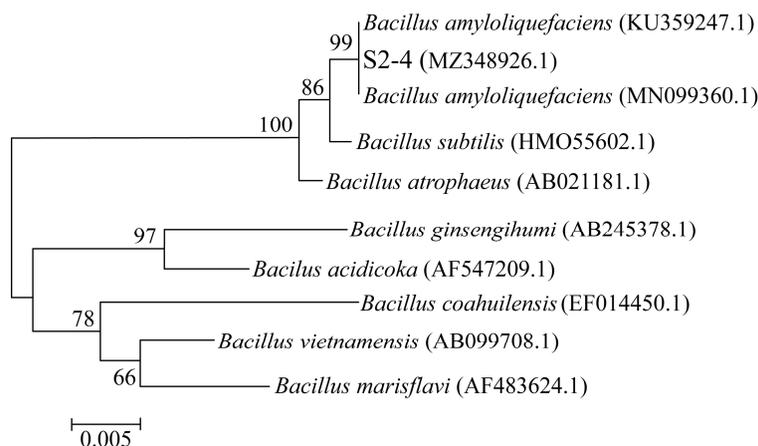


图 2 菌株 S2-4 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain S2-4 based on 16S rRNA gene sequence.

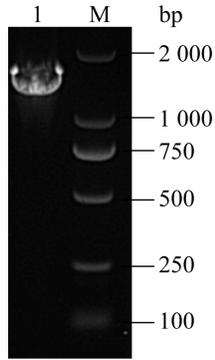


图3 *phoD* 基因 PCR 扩增结果 1: *phoD* 基因 PCR 扩增产物; M: DL2000 DNA Marker

Figure 3 Results of PCR amplification of *phoD* gene. 1: PCR amplification product of *phoD* gene; M: DL2000 DNA Marker.

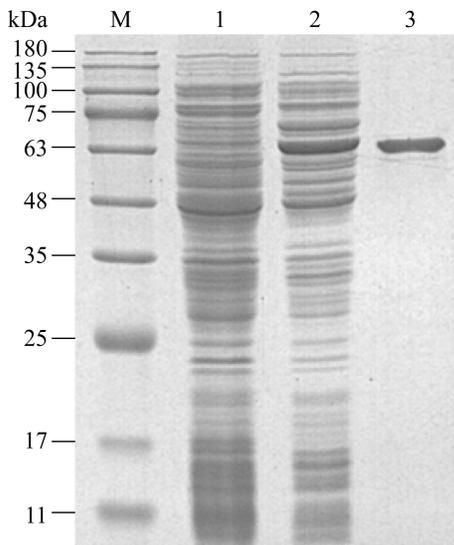


图4 *PhoD* 重组表达和纯化后 SDS-PAGE 电泳图
Figure 4 SDS-PAGE electrophoresis after recombinant expression and purification of *PhoD*. M: Protein Marker; 1: pET-28a(+) empty vector; 2: *PhoD* crude enzyme solution; 3: Purified *PhoD*.

2.5 *PhoD* 酶学性质分析

2.5.1 *PhoD* 最适反应 pH

由图 5 可知, 在 pH 8.0–9.8 之间, *PhoD* 的相对酶活性逐渐增加, 在 pH 9.8 时, 酶活性达到最大, 当 pH 值超过 9.8 时, 酶活性迅速下降。

因此, *PhoD* 的最适反应 pH 值为 9.8。

2.5.2 *PhoD* 最适反应温度

由图 6 可知, 从 37–70 °C, *PhoD* 的相对酶活性逐渐增加, 在 70 °C 时, 酶活性达到最大, 在 65–75 °C 之间, 酶的相对活性都在 95% 以上, 但当温度达到 80 °C 时, 酶活性迅速下降。因此, *PhoD* 的最适反应温度在 65–75 °C 之间, 其中 70 °C 为最适反应温度。

2.5.3 不同浓度金属离子对 *PhoD* 酶活性的影响

在反应底物中加入不同浓度的金属离子, 结果如图 7 所示, Ca^{2+} 对 *PhoD* 的酶活性呈激活作用, 当 Ca^{2+} 为 3 mmol/L 时, 激活作用最大;

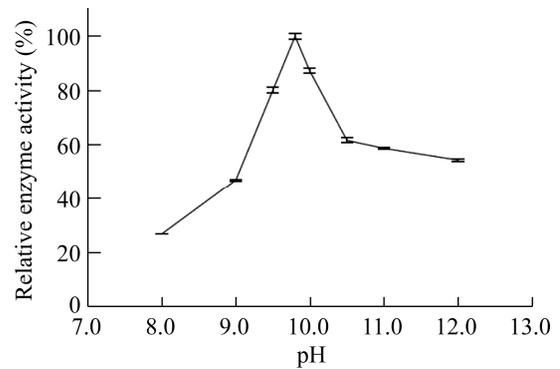


图5 *PhoD* 的最适反应 pH

Figure 5 The optimum reaction pH of *PhoD*.

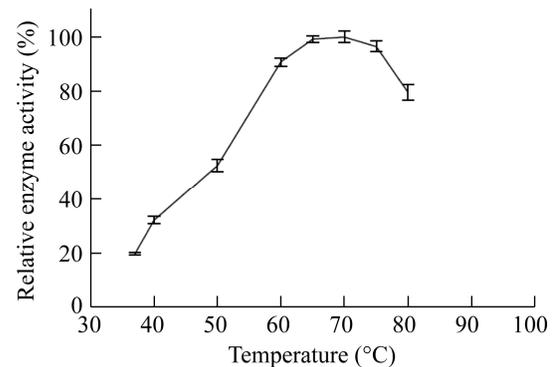


图6 *PhoD* 的最适反应温度

Figure 6 The optimum reaction temperature of *PhoD*.

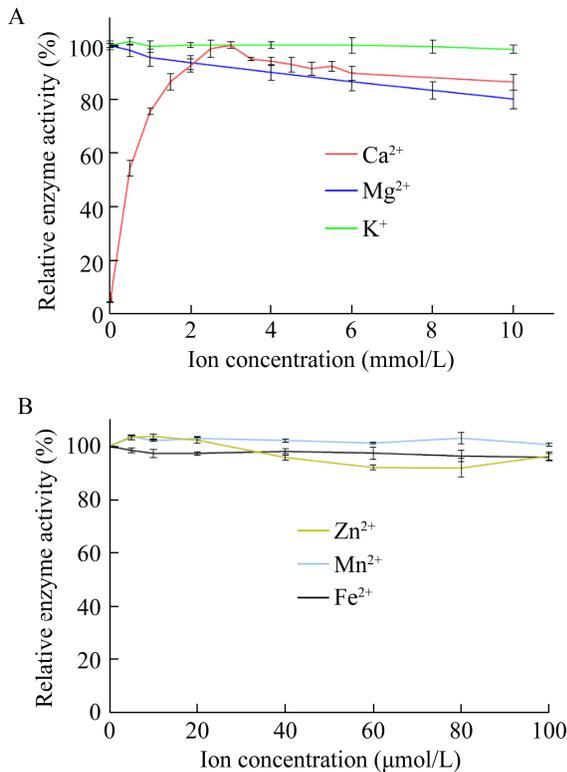


图7 不同浓度金属离子对 PhoD 酶活性的影响
Figure 7 Effect of different concentrations of metal ions on the activity of PhoD enzyme.

Mg²⁺对 PhoD 的酶活性呈抑制作用; K⁺、Zn²⁺、Mn²⁺和 Fe²⁺对 PhoD 的酶活性没有明显影响, 详细结果见图 7A 和 7B。

2.5.4 PhoD 米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{max} 和 k_{cat} 的测定

配制浓度为 1、2、3、4、5 mmol/L 的底物, 在 25 °C 下测定不同浓度的酶促反应速度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 拟合曲线的线性回归方程为 $y=0.031\ 79+0.058\ 35x$ ($r^2=0.999\ 1$), 计算米氏常数 K_m 为 5.94 mmol/L, V_{max} 为 31.46 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, k_{cat} 为 103.59 s^{-1} 。与大肠杆菌碱性磷酸酶 EAP 的 k_{cat} 值 65 s^{-1} 相比较, PhoD 的 k_{cat} 是 EAP 的 1.60 倍, 说明 PhoD 的酶活性明显高于大肠杆菌碱性磷酸酶 EAP 的酶活。

3 讨论与结论

有机磷或无机磷培养基可用于解磷菌的筛选。宁清等^[16]利用无机磷培养平板筛选磷矿区土壤中的解磷菌, 选取平板中溶磷圈较大的菌株为目标菌株, 最终筛选出一株成团泛生菌并克隆了其碱性磷酸酶基因。上官亦卿等^[17]用有机磷培养基, 通过解磷圈法筛选出 11 株解磷菌。在前期试验中, 本研究也引用这种解磷圈的方法来筛选高效的解磷菌, 然后克隆其碱性磷酸酶基因, 但是进展缓慢。后经试验调整, 尝试将筛选培养基中的单菌落直接检测碱性磷酸酶酶活性, 结果显示, 细菌碱性磷酸酶酶活的高低和有解磷圈并不成正比关系。最终, 本研究以有机质丰富的土壤为样本, 在有机磷筛选培养基中挑取单菌落, 以 p-NPP 为底物筛选碱性磷酸酶酶活较高的菌株, 通过比较, 筛选出一株解淀粉芽孢杆菌, 克隆了其 *phoD* 基因, 成功在 *E. coli* BL21(DE3) 中实现可溶性表达。

1996 年, Eder 等^[18]在枯草芽孢杆菌中最早发现了 *phoD* 基因, 不同细菌种属之间的 *phoD* 基因差别较大, 而其他细菌种属中的 *phoD* 鲜有报道, 只能从全基因组序列中找到相关基因。本研究中的 *phoD* 基因是从一株解淀粉芽孢杆菌中克隆得到的, 目前尚无相关文献单独报道过解淀粉芽孢杆菌中的 *phoD* 基因。有研究表明^[19], *phoD* 基因多样性在土壤和海洋中高于 *phoA* 和 *phoX*, 对维持生态系统中的初级生产力有重要作用, 所以关于 *phoD* 的研究中, 大部分是关于生态环境方面的研究, 尚无关于 *phoD* 应用方面的研究。

PhoA 家族的碱性磷酸酶为二聚体, 分子量大, 穿透细胞的特性较差, 较少应用于免疫酶定位研究^[20]。PhoD 为单体酶, 有更小的分子量, 应具有更大的优势进入细胞, 发挥出标记酶的

作用。与 PhoA 同源二聚体相比, PhoD 与抗原蛋白进行融合表达后,得到的双功能分子蛋白有更小的空间位阻,应能更好地发挥出融合蛋白的功能。

有假说认为在常温下嗜热酶比嗜温酶具有更好的稳定性,这是蛋白在高热条件下保持稳定的先决条件^[21]。通过 PhoD 的最适反应温度的试验可知,PhoD 为嗜热酶,在常温下应有比牛小肠碱性磷酸酶更好的稳定性。虽有许多关于 EAP 与特异性单链抗体融合表达后进行检测的成功研究,但是在尚国富等^[22]建立的一步法 ELISA 检测中,EAP 的酶活性尚未达到检测应用的要求。在本研究中比较了 PhoD 和 EAP 在 25 °C 下的催化效率,结果显示 PhoD 的催化效率是 EAP 的 1.6 倍左右,那么 PhoD 在免疫检测中将有比 EAP 更大的优势发挥作用。本文为 PhoD 作为免疫检测中抗原标记基因奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Nasu E, Ichiyanagi A, Gomi K. Cloning and expression of a highly active recombinant alkaline phosphatase from psychrotrophic *Cobetia marina*[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(2): 321-328
- [2] 庄百川. 一株产碱性磷酸酶菌株的分离鉴定及发酵条件研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2006
Zhuang BC. Study on isolation and identification of a alkaline phosphatase-producing bacterium and its enzyme production conditions[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2006 (in Chinese)
- [3] 黄旭. 大肠杆菌碱性磷酸酶分子改造, 高效表达研究及应用[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(武汉病毒研究所)博士学位论文, 2005
Huang X. The directed evolution, high-level expression, single-step purification and the application of *Escherichia coli* alkaline phosphatase[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Wuhan Institute of Virology), 2005 (in Chinese)
- [4] Kageyama H, Tripathi K, Rai AK, Cha-Um S, Waditee-Sirisattha R, Takabe T. An alkaline phosphatase/phosphodiesterase, PhoD, induced by salt stress and secreted out of the cells of *Aphanothece halophytica*, a halotolerant cyanobacterium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5178-5183
- [5] Lassila JK, Zalatan JG, Herschlag D. Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80(1): 669-702
- [6] Rodriguez F, Lillington J, Johnson S, Timmel CR, Lea SM, Berks BC. Crystal structure of the *Bacillus subtilis* phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(45): 30889-30899
- [7] 戴江玉, 高光, 吴时强, 吴修锋, 周杰, 薛万云, 杨倩倩, 陈丹. 水体细菌碱性磷酸酶及其编码基因研究进展[J]. *湖泊科学*, 2016, 28(6): 1153-1166
Dai JY, Gao G, Wu SQ, Wu XF, Zhou J, Xue WY, Yang QQ, Chen D. Bacterial alkaline phosphatases and affiliated encoding genes in natural waters: a review[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2016, 28(6): 1153-1166 (in Chinese)
- [8] Yong SC, Roversi P, Lillington J, Rodriguez F, Krehenbrink M, Zeldin OB, Garman EF, Lea SM, Berks BC. A complex iron-calcium cofactor catalyzing phosphotransfer chemistry[J]. *Science*, 2014, 345(6201): 1170-1173
- [9] Hu ZQ, Li HP, Zhang JB, Huang T, Liu JL, Xue S, Wu AB, Liao YC. A phage-displayed chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Fusarium* pathogens and their presence in cereal grains[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 764: 84-92
- [10] Jiacomini I, Silva SK, Aubrey N, Muzard J, Chavez-Olortegui C, De Moura J, Billiald P, Alvarenga LM. Immunodetection of the "brown" spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrototoxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein[J]. *Immunology Letters*, 2016, 173: 1-6
- [11] 曹冬梅, 许杨, 涂追, 李燕萍, 熊亮, 付金衡. 基于纳米抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的一步酶联免疫吸附分析法检测黄曲霉毒素 B₁[J]. *分析化学*, 2016, 44(7): 1085-1091
Cao DM, Xu Y, Tu Z, Li YP, Xiong L, Fu JH. One-step enzyme linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B₁ using a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(7): 1085-1091 (in Chinese)
- [12] 胡娟. 抗狂犬病毒磷蛋白单链抗体—碱性磷酸酶融

- 合蛋白的制备及其初步应用[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2017
- Hu J. Preparation and preliminary application of anti-rabies virus phosphoprotein ScFv-alkaline phosphatase fusion protein[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2017 (in Chinese)
- [13] Xu HF, Zhang XN, Zhang ZP, Zhang YM, Cass AEG. Directed evolution of *E. coli* alkaline phosphatase towards higher catalytic activity[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2003, 21(1): 41-47
- [14] Muller BH, Lamoure C, Du MHL, Cattolico L, Lajeunesse E, Lemaître F, Pearson A, Ducancel F, Ménez A, Boulain JC. Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket[J]. Chembiochem, 2001, 2(7/8): 517-523
- [15] 高俊乾, 黄俊元, 张君奇, 蔡佳佳, 亓正良, 刘浩. 一株高产碱性磷酸酶菌株的分离鉴定及其培养基配方优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 124-131
- Gao JQ, Huang JY, Zhang JQ, Cai JJ, Qi ZL, Liu H. Isolation and identification of a high-yield alkaline phosphatase strain and its optimization of medium formula[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 124-131 (in Chinese)
- [16] 宁清, 刘迪, 靳翔, 弓亚杰, 薛智权, 吕建华. 磷矿区高效解磷菌的分离鉴定及其碱性磷酸酶的克隆表达[J]. 山西农业科学, 2019, 47(11): 1974-1979
- Ning Q, Liu D, Jin X, Gong YJ, Xue ZQ, Lyu JH. Isolation and identification of high-efficient phosphate-solubilizing bacteria and cloning and expression of alkaline phosphatase in phosphate mines[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(11): 1974-1979 (in Chinese)
- [17] 上官亦卿, 常帆, 吕睿, 齐凡, 贾凤安, 王艳, 丁浩. 解磷菌的分离、筛选、鉴定及解磷能力研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(1): 30-34, 38
- Shangguan YQ, Chang F, Lyu R, Qi F, Jia FA, Wang Y, Ding H. Isolation, screening, identification and phosphate solubilizing ability of phosphate solubilizing bacteria[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(1): 30-34, 38 (in Chinese)
- [18] Eder S, Shi L, Jensen K, Yamane K, Hulett FM. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, *phoD*[J]. Microbiology: Reading, England, 1996, 142(Pt 8): 2041-2047
- [19] 刘欣. 长江口低氧区表层沉积物中微生物群落及 *phoD* 碱性磷酸酶基因的时空变化[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2019
- Liu X. Temporal and spatial changes of microbial community and *phoD* alkaline phosphatase gene in surface sediments of the Yangtze estuary[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2019 (in Chinese)
- [20] 武建国. 实用临床免疫学检验[M]. 江苏科技技术出版社, 1989: 94
- Wu J. Practical Clinical Immunology Test[M]. Jiangsu Science and Technology Press, 1989: 94 (in Chinese)
- [21] 郁锋. 耐热碱性磷酸酶耐热机理研究和互补密码子使用关系探讨[D]. 南京: 南京师范大学硕士学位论文, 2003
- Yu F. Heat resistant mechanism of thermostable alkaline phosphatase and its relationship with complementary codon usage[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2003 (in Chinese)
- [22] 尚国富, 刘江丽, 于欢, 唐开义, 曾柱, 胡祖权, 王赞. 前列腺干细胞抗原及其单链抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的表达与检测[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(12): 1968-1971
- Shang GF, Liu JL, Yu H, Tang KY, Zeng Z, Hu ZQ, Wang Y. Expression and detection of prostate stem cell antigen and fusion protein comprising a PSCA-specific single-chain antibody and alkaline phosphatase[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2020, 55(12): 1968-1971 (in Chinese)