

青霉素酶基因异源表达及该酶分解牛奶中 残留青霉素的研究

赵洪坤 杜连祥* 李 玉 王晓娟 路福平

(天津科技大学生物工程学院 天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

摘 要: 以获得大量青霉素酶并将其用于分解牛奶中残留青霉素为目的, 通过PCR方法从蜡样芽孢杆菌ATCC10987 基因组中获得了青霉素酶基因, 将该基因克隆至表达载体pET28a(+)中, 并转化到*E. coli* BL21 中; 在IPTG诱导下对目的蛋白进行SDS-PAGE和酶活分析, 结果显示最大酶活力可达到 480.0 U/mL; 利用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化目的蛋白, 纯化后的目的蛋白纯度超过 90%; 采用高碘酸钠氧化法制备固定化的青霉素酶, 并利用该固定化酶将牛奶(含 0.5 U青霉素G/mL)中的青霉素分解到浓度小于 4 ppb程度。

关键词: 青霉素酶, 异源表达, 纯化, 固定化青霉素酶

Study on Heterologous Expression of Penicillinase Gene and the Penicillinase Degrading Residual Penicillin in Milk

ZHAO Hong-Kun DU Lian-Xiang LI Yu WANG Xiao-Juan LU Fu-Ping

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, Biotechnology Engineering Department,
Tianjin of Science and Technology, Tianjin 300457)

Abstract: To obtain a number of penicillinases and degrade penicillin in milk by using the penicillinases, the gene encoding penicillinase was amplified by PCR from *Bacillus cereus* ATCC10987, cloned into pET28a(+), transformed into *E. coli* BL21; analysis of SDS-PAGE and penicillinase activity of the recombinant protein were done under induction of IPTG and the result showed that the maximum penicillinase activity reached 480 U/mL; the purity of penicillinase purified by Ni^{2+} Purification System was more than 90%; the immobilized penicillinases were obtained by sodium periodate method and the residual quantity of penicillin in milk(containing 0.5 U penicillin G/mL) was less than 4 ppb after degraded by the immobilized penicillinase.

Keywords: Penicillinase, Heterologous expression, Purification, Immobilized penicillinase

青霉素是治疗奶牛乳房炎的常用兽药, 卢兆芸^[1]、程慧娟^[2]、贾久满^[3]等分别对不同地区牛奶中青霉素残留的现状进行了考察, 结果发现不同地区的牛奶青霉素残留阳性率约为 2%~15%, 有的甚

至高达 20%。如果人们长期食用含有青霉素的牛乳, 青霉素不但抑制人体肠道内正常微生物的生长, 还会诱发抗药性致病菌大量繁殖。近年来人们对牛乳的需求量的日益增加, 牛乳安全已经成为社会关注

的热点,所以控制牛乳中青霉素残留势在必行,然而目前在国内未见处理青霉素残留的有效方法。

青霉素酶(Penicillinase, EC 3.5.2.6)是 β -内酰胺酶的一种,它能特异性地水解青霉素的 β -内酰胺环使青霉素失活,其产酶菌多为地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌,但这些野生菌产酶量都较低;为了提高酶活力,一些国外学者将青霉素酶基因克隆到原核表达体系并实现了青霉素酶的高水平表达^[4,5],在国内未见青霉素酶异源表达的相关报道。本文尝试将 *Bacillus cereus* ATCC10987 青霉素酶基因在大肠杆菌中异源高效表达,并将该酶用于分解青霉素超标的牛奶,使青霉素残留量达到国家标准(小于 4 ppb),进而消除残留青霉素对人们身体健康带来的不利影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)ATCC10987 为天津大学生物工程系赠送, *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21、克隆载体 pUC18 和表达载体 pET28a(+)均为本实验室保藏。

1.2 主要试剂

Taq 酶、限制性内切酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、纯化 DNA 片段的琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 大连有限公司; DNA Marker(1 kb)、蛋白质分子量标准、卡那霉素和 IPTG 均购自上海生物工程有限公司;引物合成及测序由上海英俊生物工程公司完成;His 纯化 Kit 购自北京韦氏博色谱科技有限公司。

1.3 目的基因的 PCR 扩增及测序

蜡样芽孢杆菌 ATCC10987 染色体 DNA 的提取参考文献[6],参照 GenBank 上报道的青霉素酶基因(*penp*)序列设计引物,上游引物 P1: 5'-CGGAATTCATAAAAATCAGGCGACG-3 (下划线部分为 *EcoR* 酶切位点),下游引物 P2: 5'-ACGCGTCGACTTATTTAATATCATCAATTACAAC-3 (下划线部分为 *Sal* 酶切位点)。选定退火温度为 49 $^{\circ}$ C,按设定好的程序进行 PCR 反应,并对产物进行回收和纯化。

纯化后的 PCR 产物与 pUC18 载体进行连接,连接产物电转化 *E. coli* DH5 α 中,转化后的细菌涂布于含 X-Gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 固体培养

基上(蓝白筛选平板)。37 $^{\circ}$ C 培养过夜后,在蓝白斑筛选平板上挑取白色菌落,抽提质粒,将经验证为阳性的重组子命名为 pUC-*penp* 并送至公司测序。

1.4 pET28-*penp* 原核表达载体的构建

将目的基因和载体 pET28a(+)进行连接,电转化入 *E. coli* DH5 α 中,利用卡那霉素抗性筛选转化子,并对转化子进行验证(酶切和 PCR 验证)。

1.5 重组菌 *E. coli* BL21/pET28-*penp* 的诱导表达

将验证后的阳性转化子质粒转入表达宿主菌 *E. coli* BL21 中进行诱导表达。具体方法:将重组菌 BL21/pET28-*penp* 和对照菌 BL21/pET28a(+) 分别接种于 2 mL 含卡那霉素(30 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 水浴振荡培养过夜,按 1%的接种量转接于装有 50 mL 含卡那霉素(30 μ g/mL)的 LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下振荡培养至对数生长期($OD_{600}=0.6\sim0.8$),加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG,继续于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h。3 h 后,取 30 mL 发酵液,4000 r/min 冷冻离心 10 min,收集菌体,然后将菌体悬于 pH 值 7.0 的 6 mL 磷酸盐缓冲液中,冰浴超声。超声波功率为 330 W,每次 7 s,间隔 5 s,共进行 10 min。15000 r/min 离心破碎液,分别取上清和沉淀用于 SDS-PAGE(分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%)分析,检测蛋白的表达情况。

1.6 青霉素酶活力测定

测定方法参考文献[7],酶活力定义:在 37 $^{\circ}$ C、pH 7.0 条件下,每分钟水解 1 μ mol 青霉素 G 所需要的酶量,用 U 表示。

1.7 重组蛋白纯化

采用 His Bind Purification Kit 纯化重组蛋白,具体操作步骤参见说明书。

1.8 高碘酸钠氧化法制备固定化的青霉素酶

取一张直径为 12.5 cm 的定性滤纸置于 20 mL pH 值为 5.0 的 0.1 mol/L 高碘酸钠水溶液中,35 $^{\circ}$ C 条件下氧化 6 h,取出后立即用去离子水洗至中性,室温下晾干即得到固定化所需载体。将载体与 pH 值为 6.0 的一定浓度经纯化的酶液于 4 $^{\circ}$ C 交联 24 h,每隔一段时间摇动 1 次,交联结束后取出载体,置于 20 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,室温振荡 5 min 以除去未反应的游离青霉素酶,按上述方法连续洗涤 6 次,即得到固定化的青霉素酶膜。固定化酶活回收率按下式计算:固定化酶活回收率 = 固定化酶总酶

活力/(初始酶液总酶活-残液总酶活)×100%。

1.9 固定化酶活力测定

测定方法参见中国药典中的碘量法^[8], 固定化酶活力定义: 在 37℃、pH 7.0 条件下, 每分钟水解 1 μmol 青霉素 G 所需要的酶量, 用 U/cm² 表示。

1.10 牛奶中青霉素残留的测定

测定方法参考文献^[9], 本方法测定牛奶中残留青霉素的检测限为 4 ppb。

2 结果与分析

2.1 目的基因的获得及测序

PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 结果如图 1 所示, 在约 800 bp 左右出现 1 条特异性条带, 大小与预期值相符。测序结果显示目的基因全长为 789 bp, 与青霉素酶基因(GenBank 中注册号为 AE017194.1)大小一致, 但有 1 处差异(773 处 T 变为 A, 相应的氨基酸由 Ile 变为 Glu)。

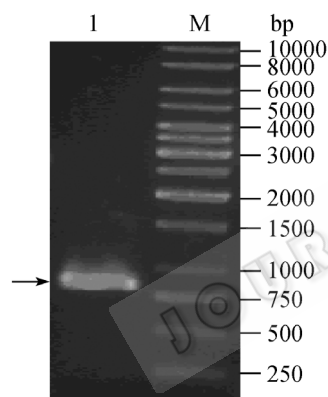


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR

M: 1 kb DNA marker; 1: PCR 产物

M: 1 kb DNA marker; 1: Product of PCR

2.2 pET28-penp 原核表达载体的构建与鉴定

按方法 1.4 构建重组质粒, 在卡那霉素筛选平板上挑取单菌落, 抽提质粒, 酶切和 PCR 验证结果见图 2。从图中可知, 单酶切显示在 6200 bp 处出现预期大小条带; 双酶切后获得约 800 bp 和 5400 bp 大小的两条片段, 与预期结果相符, 初步证明重组质粒构建成功; 以重组质粒为模板进行 PCR, 在约 800 bp 处扩增出特异性条带。以上结果证明 *penp* 成功地插入到 pET28a(+) 中, 将重组表达质粒命名为 pET28-penp。

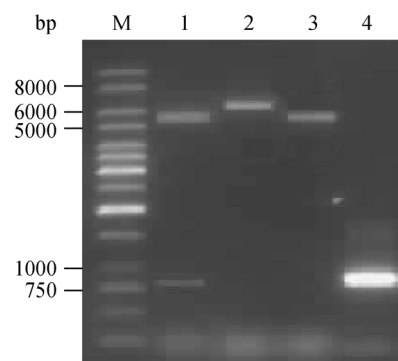


图 2 重组表达质粒 pET28-penp 的酶切和 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of enzyme digestion and PCR of pET28-penp

M: 1 kb DNA marker; 1: 重组质粒 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切; 2: 重组质粒 *EcoRI* 单酶切; 3: 空质粒单酶切; 4: 重组质粒 PCR

M: 1 kb DNA marker; 1: pET28-penp/*EcoRI* + *SalI*; 2: pET28-penp/*EcoRI*; 3: pET28a(+)/*EcoRI*; 4: pET28-penp/PCR

2.3 重组菌 *E. coli* BL21/pET28-penp 的诱导表达与 SDS-PAGE 及酶活力分析

按方法 1.5 诱导目的基因, 表达蛋白经 SDS-PAGE 结果见图 3。未诱导的重组菌在 33 kD 处未出现条带, 经 IPTG 诱导的重组菌与对照菌(BL21/pET28a(+))相比在约 33 kD 处出现一特异性条带, 与预期融合蛋白分子量大小相符, 以上结果说明青霉素酶得到表达; 另外重组菌细胞破碎上清

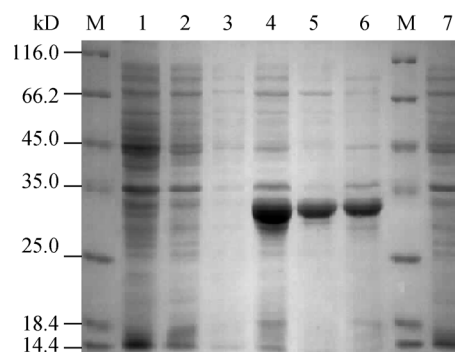


图 3 目的蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein

M: 分子量标准; 1: 未诱导 BL21/pET28a(+) 全细胞; 2: 诱导后 BL21/pET28a(+) 全细胞; 3: 诱导后 BL21/pET28a(+) 破碎上清; 4: 诱导后 BL21/pET28-penp 全细胞; 5: 诱导后 BL21/pET28-penp 破碎上清; 6: 诱导后 BL21/pET28-penp 破碎沉淀; 7: 未诱导 BL21/pET28-penp 全细胞

M: Protein marker; 1: Lysate of pET28a(+) not induced with IPTG; 2: Lysate of pET28a(+) induced with IPTG; 3: Supernatants of lysate of pET28a(+) induced with IPTG; 4: Lysate of pET28-penp induced with IPTG; 5: Supernatants of lysate of pET28-penp induced with IPTG; 6: Sediments of lysate of pET28-penp induced with IPTG; 7: Lysate of pET28-penp not induced with IPTG

和沉淀均有目的条带说明目的蛋白是以可溶性和包含体两种形式存在的。取超声上清液,适当稀释,取 10 μ L 测定酶活力(按方法 1.6),发现酶活力达到 227.8 U/mL。通过对诱导条件的优化,获得了产酶的最佳诱导条件(试验数据略):诱导温度为 25 $^{\circ}$ C,诱导时间为 7 h,诱导时机为 $OD_{600}=1.0$,IPTG 浓度为 1.0 mmol/L。在最佳诱导条件下重组菌产生的酶活力为 480 U/mL。

2.4 重组融合蛋白的纯化

按方法 1.7 进行纯化,图 4 显示了目的蛋白纯化前后的 SDS-PAGE 情况,从图 4 可知纯化后的酶液中杂蛋白含量很低,经软件分析纯化后目的蛋白纯度达到 92.3%,酶活回收率为 56%。

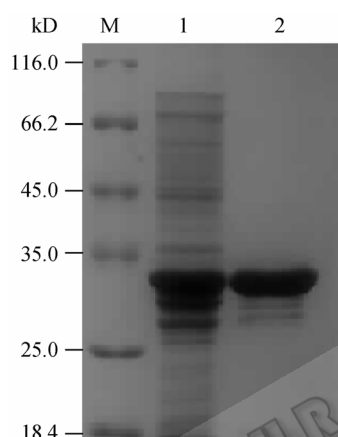


图 4 目的蛋白纯化前后 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein

M: 分子量标准; 1: BL21/pET28-penp 破碎上清; 2: 纯化后的目的蛋白

M: Protein marker; 1: Supernatants of lysate; 2: Purified fusion protein

2.5 青霉素酶的固定化及其在处理青霉素超标牛奶中的应用

按方法 1.8 制备青霉素酶膜,利用碘量法测定固定化酶膜的活力为 0.377 U/cm²,固定化酶活回收率为 23%,剪取 2 cm²酶膜加入 20 mL 含 0.5 U 青霉素 G/mL 的牛奶中,室温条件下振荡处理,分别在 0 min、5 min、15 min 时取样 1 mL 牛奶,然后按微生物法测定样品中青霉素含量,即各取 90 μ L 样品加到双碟中直径为 1.3 cm 滤纸片上,4 h~5 h 后观察各个样品抑菌圈的大小,以确定青霉素残留量,结果如图 5 所示。

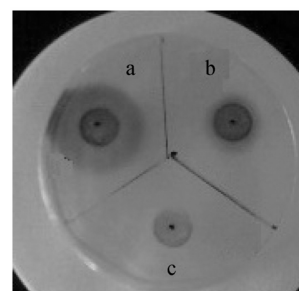


图 5 青霉素酶膜分解牛奶中青霉素的实验

Fig. 5 Experiment which immobilized penicillinase degraded penicillin in milk

a: 未经青霉素酶膜处理的牛奶; b: 经青霉素酶膜处理 5 min 的牛奶; c: 经青霉素酶膜处理 15 min 的牛奶

a: Milk not treated with immobilized penicillinase; b: Milk treated with immobilized penicillinase for 5 min; c: Milk treated with immobilized penicillinase for 15 min

从图 5 可知,未经固定化酶膜处理的牛奶,由于青霉素的存在抑制菌体的生长,从而形成直径为 2.92 cm 的抑菌圈,如图 5(a)所示;被固定化酶膜处理 5 min 的牛奶,由于青霉素未被分解完全仍有残留,使得平皿上出现了直径为 1.60 cm 的抑菌圈,见图 5(b);牛奶经固定化酶膜处理 15 min 后,平板上不再有抑菌圈出现,见图 5(c),即青霉素被降解到检测不到的浓度(小于该方法的检测限 4 ppb)。

3 讨论

本研究成功地实现了青霉素酶基因在表达载体 pET28a(+) 中表达,但在 37 $^{\circ}$ C 诱导条件下,可溶性蛋白只占表达总蛋白一半左右;在 25 $^{\circ}$ C 条件下,诱导产生的目的蛋白绝大多数是可溶性的,而且诱导时间为 8 h 时,酶活力为 480.0 U/mL,比国内 *Bacillus cereus* CMCC (B)63301 产生的青霉素酶活力 (98.6 U/mL)^[10] 高出了 3.86 倍。Jeffrey 等人也将青霉素酶基因(*B. cereus*)实现了在大肠杆菌中的异源表达,并且通过降低温度提高了青霉素酶的可溶性表达,但最高酶活力只有 369 U/mL,这可能是由于 *Lac* 启动子的转录能力低于 T7 启动子的缘故。此外根据 pET28a(+) 上带有 His-tag 的特点,利用 His Bind Purification Kit 对可溶性蛋白进行了一步纯化,简化了 *B. cereus* 青霉素酶复杂的提取工艺^[11]。

上世纪 80 年代,国外学者利用青霉素酶特性处理青霉素超标牛奶。Korycka 利用游离青霉素酶分解牛奶中残留的青霉素,使其含量降低到无法检测的

含量(少于 0.003 U/mL)^[12]。Lee 等人将青霉素酶(*Bacillus cereus*)固定在经溴化氰活化的琼脂糖上,用该固定化酶连续 7 次处理 10 mL 含 0.5 U 青霉素 G/mL 的牛奶,酶活力只有 2% 的损失^[13]。我国未见相关报道,本文在低温条件下,将纤维素载体(高碘酸钠法制备)与纯化的青霉素酶共价结合,形成无毒性的固定化青霉素酶。在室温条件下,利用该固定化酶处理 20 mL 含 0.5 U 青霉素 G/mL 的牛奶,结果发现在处理 15 min 后,牛奶中青霉素含量降低到 4 ppb 以下。

本研究通过分子生物学手段大大降低了青霉素酶的生产成本;利用高碘酸钠氧化法固定青霉素酶反应条件温和,操作简单,载体便宜,所以利用该低成本的固定化酶处理青霉素超标牛奶经济成本上完全可行。另外,整个固定化过程未使用任何有机溶剂,产生的固定化酶安全可靠,易于应用推广。

参 考 文 献

- [1] 卢兆芸. 乳和乳制品中抗生素残留的危害及检测方法. 中国乳品工业, 2006, 34(11): 43-45.
- [2] 程慧娟, 齐津权, 张 兵, 等. 动物性食品中青霉素残留量调查. 中国公共卫生, 2001, 17(5): 449.
- [3] 贾久满, 要瑞莉, 朱莲英. 我国动物性产品中抗生素残留问题的现状及对策. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 1368-1370.
- [4] Jeffrey J, Eunki K, John N. Effect of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(1): 104-111.
- [5] Susan J, Thornwell, Alison K, et al. An efficient expression and secretion system based on *Bacillus subtilis* phage 105 and its use for the production of *B. cereus* beta-lactamase. *Gene*, 1993, 133: 47-53.
- [6] 王黎明, 尚玉磊, 王勇军, 等. 蜡样芽孢杆菌 M22 锰超氧化物歧化酶基因在毕赤酵母中的表达. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 360-364.
- [7] Samuni A. A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the beta-lactamase reaction. *Anal Biochem*, 1975, 63(1): 17-26.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2002, 二部, 附录 pp.84-85.
- [9] 农业部畜牧兽医局. 动物性食品中青霉素类抗生素残留检测方法-微生物法. 中国兽药杂志, 2004, 38(3): 14-15.
- [10] 张凤凯, 张 枫. 蜡样芽孢杆菌 CMCC (B)63301 产生青霉素酶的特性及其应用的研究. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 158-160.
- [11] Kuwabara S. Purification and properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem J*, 1970, 118: 457-465.
- [12] Korycka. Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk. *J Dairy Sci*, 1985, 68(8): 1910-1916.
- [13] Lee MZ, Richardson T. Preparation and characterization of immobilized beta-lactamase for destruction of penicillin in milk. *J Dairy Sci*, 1987, 70(10): 2032-2039.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括 9 以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材,两种商品等。