

海栖热袍菌葡萄糖异构酶基因 *xylA* 的克隆、 表达及酶学性质

王一帆¹ 裴建军² 邵蔚蓝^{1,2} 段作营¹ 李华钟^{1*}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214222)

(2. 南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)是嗜极端高温的厌氧细菌,其产生的葡萄糖异构酶由于其出色的耐热性有着潜在的工业应用价值。由于海栖热袍菌苛刻的培养条件导致其葡萄糖异构酶产量较低。通过 PCR 方法克隆编码 *T. maritima* MSB8 葡萄糖异构酶基因 *xylA*, 构建重组质粒 pHsh-*xylA*, 转入 *Escherichia coli* JM109, 通过热激诱导表达。通过热处理和离子交换层析纯化两步得到电泳纯的酶制品, 纯化倍数和回收率分别为 8.02 和 49.02。对酶学性质研究表明, 该重组酶为金属离子激活性酶, Mg^{2+} , Co^{2+} 对相对酶活有很强的激活作用, 其最适 pH 为 7.0, 最适反应温度为 95°C, 且在 pH 6~8 之间有着较好的稳定性, 在 95°C 下半衰期长达 5 h 以上。以葡萄糖为底物时的表现 K_m 和 V_{max} 分别为 105 mmol/L 和 45.2 mol/min·mg。

关键词: 葡萄糖异构酶, 海栖热袍菌, 表达, 酶学性质

Expression and Characterization of a Thermostable Glucose Isomerase from the Hyperthermophile, *Thermotoga maritima*

WANG Yi-Fan¹ PEI Jian-Jun² SHAO Wei-Lan^{1,2} DUAN Zuo-Ying¹ LI Hua-Zhong^{1*}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214222)

(2. The Key Laboratory of Microbiol Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: The glucose isomerase produced from *Thermotoga maritima*, a hyperthermophilic anaerobic bacterium, has a large potential in industrial application because of its excellent thermostability. *T. maritima* can only produce small amount glucose isomerase since the rigorous cultivation conditions. The gene *xylA* encoding glucose isomerase from *T. maritima* MSB8 were cloned and expressed in *Escherichia coli* JM109 using a heat-shock expression vector pHsh. The recombinant glucose isomerase was purified 8.02-fold from the *E. coli* JM109 recombinant with a recovery of 49.02% using heat treatment and ion exchange chromatography, to give a single band on SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of the enzyme were found to be pH 7.0 and 95°C. The enzyme was stable in the range pH 6~9, and showed a half-life of over 5 h at 95°C. The enzyme activity was activated with 5mmol/L Mg^{2+} and Co^{2+} . The apparent K_m and V_{max} values for glucose were 105 mmol/L and 45.2 mol/(min·mg), respectively.

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK2006220)

* 通讯作者: Tel: 0510-85918110; E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2008-03-17; 接受日期: 2008-04-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Keywords: Glucose isomerase, *Thermotoga maritima*, Expression, Characterization

葡萄糖异构酶(glucose isomerase, GI), 又称木糖异构酶(xylose isomerase, XI)(EC 5.3.1.5), 可以催化 D-葡萄糖等醛糖至 D-果糖等相应酮糖的异构化反应, 因此是工业生产上大规模以淀粉制备高果糖浆的关键酶之一^[1]。据报道, 提高异构化反应的温度可以获得更高的果糖转化率, 因此耐热葡萄糖异构酶的发现使得避免使用层析等浓缩步骤直接获得 55% 高果糖浆成为可能^[2]。

目前, 人们已经从一些天然嗜热菌中分离出了耐热性葡萄糖异构酶, 如 *Bacillus thermoantarcticus*^[3], *Thermus aquaticus* HB8^[4] 等。海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)是生长在海底火山口的极端嗜热专性厌氧微生物, Brown SH 等人于 1993 年对其产生的耐热葡萄糖异构酶进行了纯化、定性^[5], 肯定了它在制备高糖果浆工业上的巨大潜力。但由于嗜热菌苛刻的培养条件以及低细胞产量, 其产酶量并不适合工业化生产。

本文采用基因操作技术, 首次对 *T. maritima* MSB8 葡萄糖异构酶基因 *xylA* 进行克隆并利用 Hsh 热激表达系统在大肠杆菌中进行表达, 并对纯化重组酶进行了酶学性质研究, 为该重组酶的工业生产和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准和 Pyrobest DNA 聚合酶购自宝生物工程公司(TaKaRa); 酵母提取物和胰蛋白酶购自 OXOID 公司; 氨苄青霉素(Ampicillin)购自上海生工生物工程技术有限公司; 质粒抽提试剂盒(QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit)、胶回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)购自 Qiagen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株和质粒

T. maritima MSB8^[6]、含有 σ^{32} 因子识别和调控的热激方法表达外源基因的表达质粒 pHsh (中国专利, 200410041636.7)由本研究室保藏, *E. coli* JM109 购于 Promega 公司。

1.3 培养基和培养条件

T. maritima MSB8 采用改良的 LB 培养基进行

培养^[6], 大肠杆菌重组子培养采用含 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0)。

1.4 海栖热袍菌基因组 DNA 提取方法

参照参考文献[7]。

1.5 引物设计

按照已公布 *T. maritima* 葡萄糖异构酶基因序列^[8]设计引物, 委托中科院上海生物工程中心合成。

引物 1: 5'-AATTTTTCCTCCAGAAATCCCAAAG-3';

引物 2: 5'-CCCCTGCAGTTACCTCAGTTCTGCTATTGTC-3', 引入 *Pst* 位点。

1.6 重组质粒 pHsh-*xylA* 的构建

以提取的 *T. maritima* MSB8 的基因组 DNA 为模板, 用合成的引物进行 PCR 扩增 (94°C 30 s; 50°C 80 s; 72°C 90 s), 35 个循环后电泳检查。为提高所扩增片段的保真性, 用 Pyrobest 酶对模板进行扩增。通过凝胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化。得到 *T. maritima* MSB8 葡萄糖异构酶基因 *xylA*。用 *Pst* 酶切并经纯化, 以适当比例与已经 *Stu*、*Pst* 酶切并纯化的 pHsh 载体混合, 加入连接酶, 16°C 过夜, 转化 *E. coli* JM109 构建含 *T. maritima* MSB8 葡萄糖异构酶基因 *xylA* 的重组质粒 pHsh-*xylA*。

1.7 *xylA* 基因在宿主细胞中的表达

将重组质粒利用电穿孔法转入到大肠杆菌 *E. coli* JM109 中, 选出的转化子接入 20 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基, 在 37°C 摇床中进行振荡培养至对数期, 以 2%接种量于 250 mL 三角瓶中的 50 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 置于 30°C 摇床, 200 r/min 进行振荡培养, 培养至 OD_{600} 为 0.8 时, 将三角瓶移至 42°C 水浴摇床中继续进行振荡培养, 6 h~8 h 后停止培养, 8000 r/min 离心收集菌体, 用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(含 5 mmol/L Mg^{2+} , 1 mmol/L Co^{2+} , pH 7.0)洗涤菌体 2 次后用相同的缓冲液 2.5 mL 重悬细胞, 超声波破碎, 12000 r/min 离心菌体碎片, 上清即为粗酶液。

1.8 葡萄糖异构酶的纯化及酶学性质的研究

1.8.1 重组酶的纯化: 热处理: 将超声波破碎后获得的粗酶液置于 95°C 水浴锅中热处理 10 min, 随

后置于冰上冷却, 12000 r/min 离心 15 min, 上清即为除去绝大部分杂蛋白的酶液。

离子交换层析: 将热处理酶液经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤后上样于 DEAE Sepharose Fast Flow, 由含有 100 mmol/L ~300 mmol/L NaCl 的缓冲液以 1.5 mL/min 的速度进行阶段式洗脱, 待收集到活力峰后, 经过透析除盐即得纯酶样品。

1.8.2 重组酶的酶学性质分析: (1) 最适反应 pH 的测定: 在不同的 pH 条件下分别测定酶活, 以最高酶活为 100%, 计算相对活性。测定采用邻苯-咪唑广谱缓冲液, pH 范围 4.5~8.5, 且 pH 均在 95°C 下得以校正。

(2) 最适反应温度: 在 60°C~100°C 范围内, 每隔 5°C 测定酶活, 以最高酶活为 100%, 计算相对酶活。

(3) pH 稳定性: 将酶液置于不同 pH 的缓冲液下于室温中放置 2 h, 随后在最适 pH, 最适温度条件下测定其酶活, 以未处理的酶样酶活为 100%, 计算其相对酶活。缓冲液采用邻苯-咪唑缓冲液, pH 范围为 5~8。

(4) 温度稳定性: 将酶液置于指定温度(95°C)的水浴锅中保温, 每隔一段时间取样测定其酶活, 以未处理的酶液酶活为 100%, 计算其相对酶活。

(5) 金属离子对酶活的影响: 在标准酶反应体系中, 用 5 mmol/L 各种不同金属离子代替原有体系中的金属离子, 测得经过 EDTA 处理过的酶液的酶活力。以未加金属离子下的酶活力为 100%, 计算其相对酶活。

(6) 酶促反应动力学参数: 以葡萄糖为底物, 测得一系列底物浓度[S](40 mmol/L~280 mmol/L)下的反应速度 V , 通过 Lineweaver-Burk 作图法, 得到酶的 K_m 和 V_{\max} 。

1.9 葡萄糖异构酶活力和蛋白质浓度的测定

标准酶反应体系组成为: 50 μL 3 mol/L 葡萄糖溶液, 400 μL 100 mmol/L pH 7.0 邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液(含 5 mmol/L Mg^{2+} , 1 mmol/L Co^{2+}), 50 μL 稀释酶液。95°C 反应 10 min 后, 用 500 μL 50% 三氯乙酸中止反应。反应液中果糖的含量用半胱氨酸-咪唑法进行测定^[9]。

酶单位(U)的定义: 在该反应条件下, 1 min 内转化生成的 1 μmol 果糖所需的酶量。

蛋白浓度测定: 以牛血清白蛋白(BSA)为标准, 采用 Bradford 法测定^[10]。

2 结果

2.1 重组质粒 pHsh-xylA 的构建

以 *T. maritima* MSB8 基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物经琼脂糖电泳检测, 结果见图 1。结果表明, 在 1.3 kb 左右有一明显条带, 与期望扩增的葡萄糖异构酶结构基因 *xylA*(1335 bp)长度相符, 且特异性较高。经序列测定, 扩增产物序列与文献报道^[8]一致。将经 *Pst* 酶切、胶回收纯化后的 PCR 产物与用 *Stu* /*Pst* 双酶切、胶回收的表达载体 pHsh 大片段(2.3 kb 左右)连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 挑选阳性转化子 *E. coli* JM109(pHsh-xylA)。

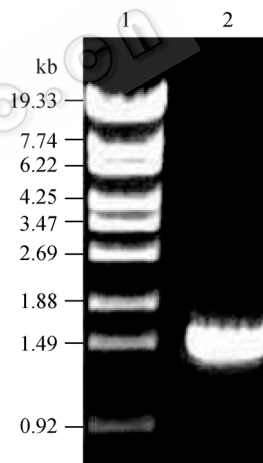


图 1 PCR 扩增片段电泳图

Fig. 1 Agarose-electrophoresis of the amplified DNA
1: DNA marker; 2: Amplified DNA

2.2 pHsh-xylA 的酶切鉴定

接种 *E. coli* JM109(pHsh-xylA)于含 Amp 的 LB 液体培养基中培养 12 h 后进行质粒提取。提取所得的重组质粒 pHsh-xylA 图谱及酶切后琼脂糖凝胶电泳鉴定结果分别见图 2 和图 3。由图 3 可见, 经 *Sal* /*Pst* 双酶切 pHsh-xylA 得到 1.3 kb 的结构基因 *xylA* 片段和 2.3 kb 的 pHsh 片段, 表明重组表达质粒构建成功。

2.3 *xylA* 基因在大肠杆菌中的表达及重组酶的纯化

重组质粒 pHsh-xylA 转化 *E. coli* JM109 中, 经

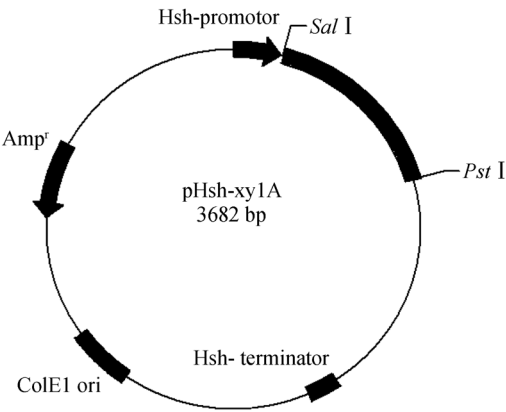


图 2 表达质粒 pHsh-xy1A 的物理图谱
Fig. 2 Physical map of plasmid pHsh-xy1A

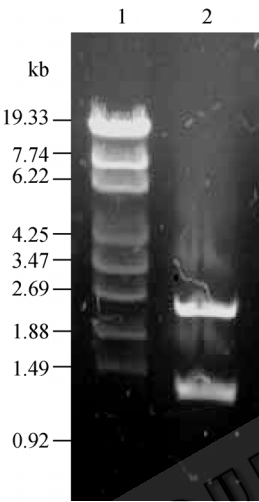


图 3 质粒 pHsh-xy1A 的酶切鉴定
Fig. 3 Double digestion of pHsh-xy1A with Sal I/Pst I
1: DNA marker; 2: pHsh-xy1A digested with Sal I/Pst I

6 h~8 h 热激诱导后, 离心收集菌体, 超声波破碎, 获得粗酶液, 将粗酶液经过 95℃ 热处理, 再经过离子交换层析后可以得到电泳纯的酶样品, 见图 4。由重组酶的纯化表(表 1)可以看出, 95℃、10 min 的热处理可除去 86.5% 的杂蛋白、回收 94.7% 的酶活, 酶

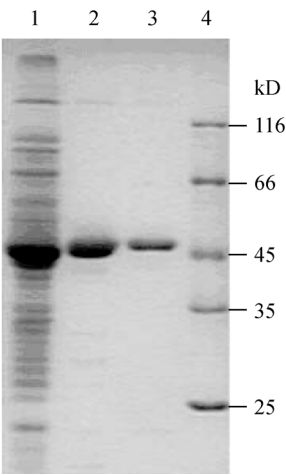


图 4 纯化重组葡萄糖异构酶的电泳图
Fig. 4 SDS-PAGE of purified glucose isomerase from re-combined strains
1: Crude extract; 2: Enzyme treated with heat; 3: Enzyme purified with Sepharose FF; 4: Protein marker

的纯度达到 87.4%, 这无疑为其在工业化提供了便利的条件。

2.4 重组酶的酶学性质

如图 5 所示, 重组葡萄糖异构酶的最适 pH 在 7.0(图 5A), 且在 pH 6~8 之间经 2 h 的处理仍然保存 75% 以上的酶活(图 5B), 属于典型的中性酶。重组葡萄糖异构酶在 90℃ 以上相对酶活达到 85% 以上, 其中最适反应温度为 95℃ (图 5C), 在 95℃ 经 1 h 处理, 酶活仍保持 70% 以上(图 5D), 表明该重组葡萄糖异构酶有很好的耐热性和热稳定性, 能够在高温下发挥相对高的酶催化能力, 且重组酶一定程度上保持了其天然酶的耐热性等特性。由表 2 可以看出, 重组葡萄糖异构酶和天然酶一样, 依然是金属离子激活酶, Mg^{2+} 和 Co^{2+} 对其活性有着很大的激活作用, 当有 5 mmol/L 的 Mg^{2+} 存在时, 酶活提高 4.5 倍, 而 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子却对酶活有很强的抑制作用。以不同浓度葡萄糖为底物测重组酶的反应速度, 通

表 1 重组葡萄糖异构酶的纯化表					
Table 1 Purification of recombinant glucose isomerase from <i>E. coli</i> JM109(pHsh-xy1A)					
纯化步骤 Purification step	总酶活 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比酶活 Specific activity (U/mg)	回收率 Recovery (%)	纯化倍数 Purification (fold)
粗酶液 Crude extract	1683	340	4.95	100	1
热处理 Heat treatment	1594	46	34.7	94	7
离子交换层析 Ion exchange	825	20.8	39.7	49	8

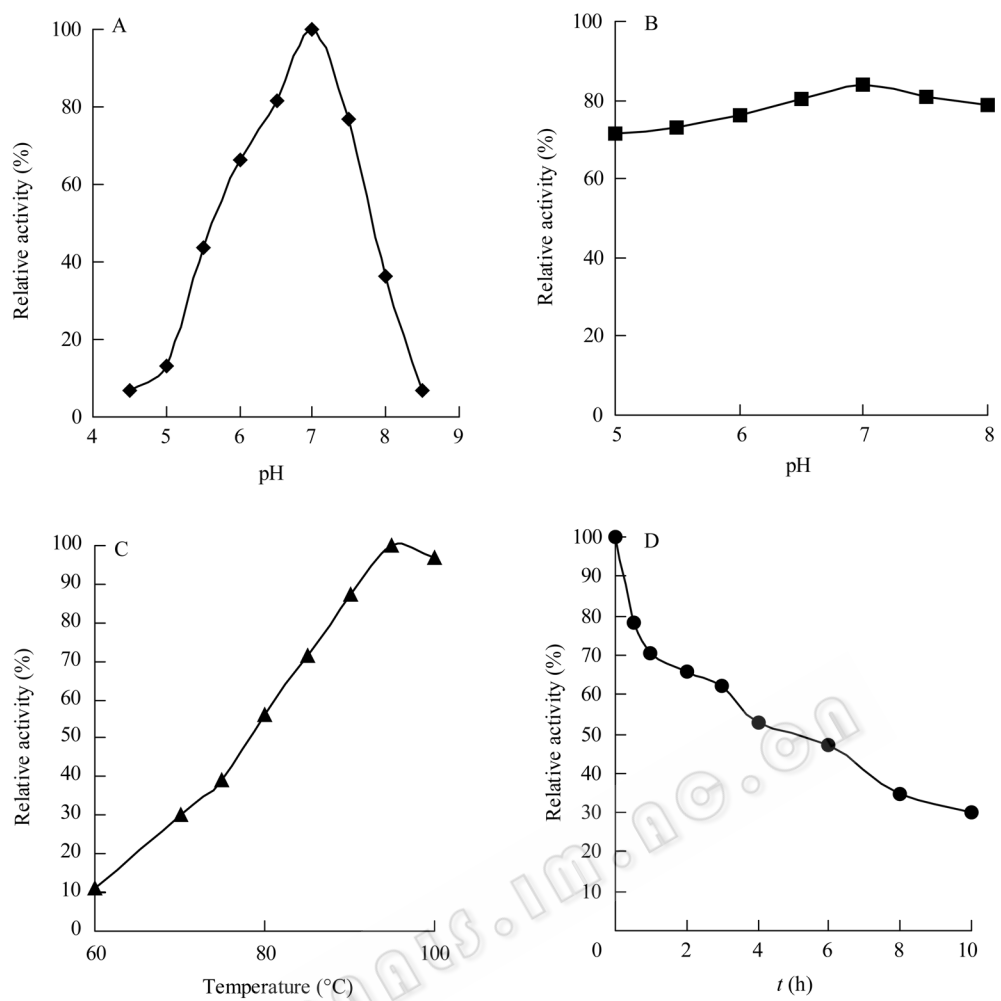


图 5 温度和 pH 对纯化重组葡萄糖异构酶的影响

Fig. 5 Effect of temperature and pH on the purified recombinant glucose isomerase

Note: A: Optimum pH; B: pH stability; C: Optimum temperature; D: Thermo stability

表 2 金属离子对酶活的影响							
Table 2 Effect of metal ions on recombinant glucose isomerase							
Metal ions	NONE	Co ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Ni ²⁺
Relative activity (%)	100	435	550	160	26	35	29

过图 6 进行计算，得到该重组酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 105 mmol/L 和 45.2 mol/(min·mg)。

3 讨论

海栖热袍菌 *T. maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧真细菌，生长在 55°C~90°C 海底火山口，是极耐热酶重要来源。但是由于其生长条件苛刻，细胞密度低，不适合工业化生产。利用基因克隆技术，将极耐热葡萄糖异构酶基因克隆至表达载体，通过提高

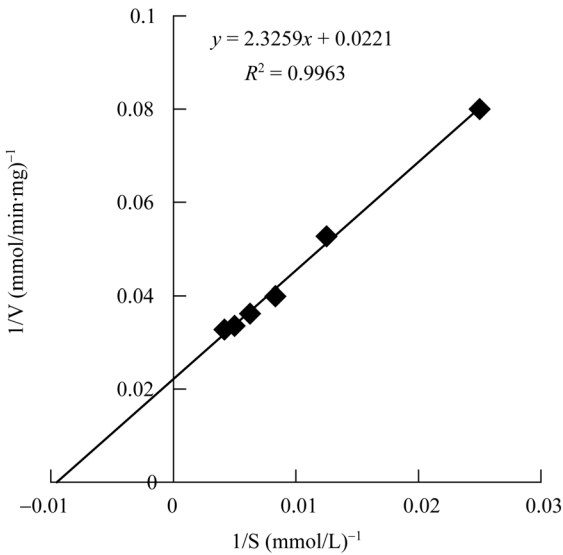


图 6 重组葡萄糖异构酶作用葡萄糖的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot of recombinant glucose isomerase activity against glucose

表达水平可以得到自然界难以得到的有可观潜在用途的热稳定性葡萄糖异构酶。

本文通过基因克隆手段并采用新型的热激表达质粒,成功的表达了海栖热袍菌葡萄糖异构酶,表达量约 150 mg/L,它相对于传统的基因克隆的优势在于避免了 IPTG 等诱导剂的使用,且在热激过程中有效的降低了宿主的蛋白酶活性,有利于目的产物的大量表达。

由本文看出重组葡萄糖异构酶一定程度上继承了其天然酶的特性,具有很高的耐热性,并且由此,使得不需要复杂的纯化工序就能得到相对纯的产品,这对于其在高果糖浆工艺上的应用无疑是潜力十分巨大的。当然,此重组酶依然需要金属离子 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 的支持来保持其耐热性与稳定性,这点与这类酶的活性中心催化原理是分不开的^[11]。

通过进一步优化重组菌的培养和表达条件,实现高密度培养和高效表达,将使利用热激型诱导表达外源葡萄糖异构酶在工业上大规模应用成为可能。

参 考 文 献

- [1] SH Bhosale, MB Rao, VV Deshpande. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(3): 280–300.
- [2] YB Tewari, RN Goldberg. Thermodynamics of the conversion of aqueous glucose to fructose. *Journal of Solution Chemistry*, 1984, **11**: 523–547.
- [3] Licia Lama, Barbara Nicolaus, Valeria Calandrelli, *et al.* Xylanase produced by *Bacillus thermoantarcticus*, a new thermophilic bacillus. *Enzyme Eng XIII* (Annals of the New York Academy of Sciences), 1996, **799**: 285–289.
- [4] Lehmacher A, H Bisswanger. Isolation and characterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8. *Journal of General Microbiology*, 1990, **136**: 679–686.
- [5] Brown SH, C Sjöholm, RM Kelly. Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extreme thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnol Bioeng*, 1993, **41**: 878–886.
- [6] Yu Jiang, Qing Zhou, Wei-lan Shao, *et al.* A highly efficient method for liquid and solid cultivation of the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **259**: 254–259.
- [7] Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp.786–797.
- [8] 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.
- [9] Dische Z, Borenfreund E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugar and trioses. *J Biol Chem*, 1951, **192**: 583–587.
- [10] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.47–50.
- [11] Brian S Hartley, Neil Hanlon, Robin J Jackson, *et al.* Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1543**: 294–335.

新辟栏目介绍

生 物 实 验 室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度,深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果,交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室,以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。