

研究报告

高酶活枯草芽孢杆菌碱性磷酸酶 *phoA* 基因克隆表达及降解内毒素的应用

毛婉, 熊梦霞, 李湘, 柳泰, 余兴龙*

湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128

毛婉, 熊梦霞, 李湘, 柳泰, 余兴龙. 高酶活枯草芽孢杆菌碱性磷酸酶 *phoA* 基因克隆表达及降解内毒素的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4018-4027.

MAO Wan, XIONG Mengxia, LI Xiang, LIU Tai, YU Xinglong. The alkaline phosphatase gene *phoA* from a *Bacillus subtilis* strain with high enzyme activity: cloning, expression, and application in degrading endotoxin[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4018-4027.

摘要:【背景】碱性磷酸酶有降解内毒素活性, 在胃肠道中有预防和减弱肠道炎症的作用, 不同的枯草芽孢杆菌能分泌不同酶活性水平的碱性磷酸酶, 可能是该菌保健作用的一个值得重视的因素。【目的】筛选并分离出一株产高酶活碱性磷酸酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 对其 *phoA* 基因进行克隆并原核表达, 研究其酶学性质并对内毒素进行降解研究。【方法】以有机质丰富的土壤环境微生物为样本, 在有机磷筛选培养基中分离枯草芽孢杆菌, 以 4-硝基苯磷酸二钠盐(4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, *p*-NPP)为底物进行酶活测定, 筛选产高酶活碱性磷酸酶的细菌, 克隆表达其 *phoA* 基因并研究重组 PhoA 的酶学特性, 最后用小鼠试验证明该酶对降低内毒素 LPS 的毒性作用。【结果】筛选到 14 株产高酶活碱性磷酸酶枯草芽孢杆菌, 并克隆一株最高酶活的枯草芽孢杆菌 35-16-1 的 *phoA* 基因, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中实现可溶性表达。研究纯化后 PhoA 的酶学性质, PhoA 的最适反应温度为 70 °C; 最适反应 pH 为 9.8; Mg²⁺对 PhoA 的酶活性呈激活作用, 当 Mg²⁺为 14 mmol/L 时, 激活作用最大; Ca²⁺对 PhoA 的酶活性呈抑制作用; K⁺、Zn²⁺、Mn²⁺和 Fe²⁺对 PhoA 的酶活性无明显影响; 以 *p*-NPP 为底物, 在 37 °C下测得 PhoA 的 V_{max} 为 179.86 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, K_m 为 2.38 mmol/L, k_{cat} 为 246.83 s⁻¹。最适条件下测得酶比活为 6 550.00 U/mg。在重组 PhoA 处理后, LPS 对小鼠的毒性明显降低。【结论】枯草芽孢杆菌 35-16-1 的 *phoA* 基因能重组表达出高酶活性的碱性磷酸酶, 对内毒素具有降解功能。

关键词: 碱性磷酸酶; *phoA*; 内毒素; 枯草芽孢杆菌

资助项目: 湖南省重点领域研发计划(2022NK2049)

This work was supported by the Key Areas Research and Development Program of Hunan Province (2022NK2049).

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

Received: 2024-02-03; Accepted: 2024-04-12; Published online: 2024-04-30

The alkaline phosphatase gene *phoA* from a *Bacillus subtilis* strain with high enzyme activity: cloning, expression, and application in degrading endotoxin

MAO Wan, XIONG Mengxia, LI Xiang, LIU Tai, YU Xinglong*

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

Abstract: **[Background]** Alkaline phosphatase (ALP) with the ability of degrading endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) can prevent and weaken intestinal inflammation. Different strains of *Bacillus subtilis* can secrete ALP with different activities, which may be an important factor in the health effects of *B. subtilis*. **[Objective]** To study the enzymatic properties and endotoxin-degrading performance of the recombinant protein by cloning the ALP gene *phoA* from a *B. subtilis* strain with high ALP activity and expressing this gene in *Escherichia coli*. **[Methods]** We used the organophosphorus agar medium to isolate *B. subtilis* strains from the soil samples with rich organic matter. The ALP activity was assayed with 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (*p*-NPP) as the substrate. The strains producing ALP with high activity were screened and *phoA* was cloned and expressed. The enzymatic characteristics of recombinant PhoA were studied, and the LPS-attenuating effect of PhoA was evaluated in mice. **[Results]** Fourteen strains of *B. subtilis* with high ALP activities were screened out, and *phoA* was cloned from the strain 35-16-1 with the highest ALP activity and expressed solubly in *E. coli* BL21(DE3). The enzymatic properties of PhoA after purification were studied. PhoA showcased the optimum reaction performance at 70 °C and pH 9.8. Mg²⁺ activated the activity of PhoA, with the maximum activating effect at 14 mmol/L. Ca²⁺ inhibited the activity of PhoA. K⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, and Fe²⁺ had no significant effect on PhoA activity. With *p*-NPP as the substrate, PhoA presented the V_{\max} of 179.86 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, K_m of 2.38 mmol/L, and k_{cat} of 246.83 s⁻¹ at 37 °C. The specific activity of 6 550.00 U/mg under optimal conditions. The toxicity of LPS treated with recombinant PhoA was significantly reduced in mice. **[Conclusion]** The *phoA* gene of *B. subtilis* 35-16-1 can be expressed with high ALP activity in *E. coli* and the recombinant protein can degrade endotoxin.

Keywords: alkaline phosphatase; *phoA*; endotoxin; *Bacillus subtilis*

枯草芽孢杆菌在畜牧业生产中有着广泛的应用,对改善饲料品质、提高禽畜健康水平和生长速度等有着积极的作用^[1]。人们不仅在枯草芽孢杆菌的畜禽生产的应用方面进行了大量的研究,也对其作用机理进行了多方面的研究。研究发现:枯草芽孢杆菌可分泌多种酶、有助于动物的消化;改善胃肠道的菌群环境、保护

肠道屏障而提高肠道健康水平;可以分泌抑菌物质抑制有害菌及提高动物的免疫力等^[2]。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)在自然界中分布广泛,在人、动植物和原核生物中普遍存在^[3-6],有着重要的生物学作用。ALP可参与生物物质的循环^[7]、维持人和动植物的正常生理功能^[8-10]并对人和动物的健康(如炎症、癌症

的发生)有着重要的影响。在胃肠道中, ALP 有预防和减弱肠道炎症的作用, Poelstra 等^[11]在 1997 年首次报道了 ALP 可以灭活细菌内毒素。胃肠道是断奶仔猪吸收饲料中营养物质的主要场所, 健康的肠胃不仅能充分吸收饲料中的营养物质, 还能对饮食结构的改变做出良好的适应反应^[12], 而内毒素的存在对畜禽的健康有着严重的危害, 如胃肠道炎症的发生等。内毒素这方面的危害不可不重视, 如猪饲料中内毒素平均含量为 13 mg/kg, 最高可达 60 mg/kg^[13]。体内内毒素的积累主要发生在肠道, 肠道长期暴露于低剂量内毒素环境下, 也会导致机体损伤, 造成长期低度炎症综合征^[14], 含有内毒素的饲料长期饲养畜禽, 会造成其胃肠道炎症的发生, 并可能引发一些其他疾病。

目前 GenBank 中收录了 400 多株枯草芽孢杆菌的全基因组序列, 借此可知这些菌株全部携带有 ALP 基因。由于 ALP 广泛的生物学作用, 特别是其降解内毒素的作用, 我们推测 ALP 在枯草芽孢杆菌的保健方面有可能也发挥着重要作用。本研究从枯草芽孢杆菌中克隆表达其 ALP 酶活性较高的 *phoA* 基因, 对重组 PhoA 的酶学性质进行研究并探究 PhoA 降解内毒素活性成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的作用, 为枯草芽孢杆菌 PhoA 在降低或消除内毒素对禽畜身体损害方面的研究奠定一定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

实验动物: 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 Institute of Cancer Research (ICR) 小鼠 18 只, 雌性, 4 周龄, 体质量 20–22 g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物质量合格证号: 430727230102062965。本实验以科研为目的对小鼠进行养殖和使用, 所有动物研

究均按照伦理准则进行, 并按照中华人民共和国《实验动物管理条例》进行动物实验(湖南农业大学生物医学研究伦理委员会批准, 编号: 伦理科 2024 第 138 号)。

有机质丰富土壤环境样品: 生长茂盛的树底下、施过肥的农作物中、草丛里、黄土中以及池塘边的泥土。

质粒: pET-28a(+)质粒由湖南农业大学分子生物与免疫学实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

4-硝基苯磷酸二钠盐(4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, *p*-NPP)和二乙醇胺, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 限制性核酸内切酶 *Bam*H I/*Xho* I, 宝生物工程(大连)有限公司; Ni Focurose FF (IDA), 武汉汇研生物科技有限公司; 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; 内毒素 LPS, Sigma-Aldrich 公司; 鲎试剂, 厦门鲎试剂生物科技股份有限公司。

多功能酶标仪, Molecular Devices 公司; 凝胶成像系统, 上海天能生命科学有限公司; 高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 小型垂直电泳系统, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 全温度振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司。

1.3 培养基

有机磷筛选培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 氯化钠 0.3, 硫酸铵 0.5, 氯化钾 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.3, FeSO₄·7H₂O 0.03, MnSO₄·H₂O 0.03, CaCl₂ 1.0, 酵母浸粉 0.5, 卵磷脂 0.2, 琼脂粉 15.0, pH 7.5。

1.4 产高酶活碱性磷酸酶菌株分离

1.4.1 菌株的分离培养

采取有机质丰富的土壤环境样品, 将 3 g 样品用 7 mL 灭菌生理盐水进行重悬, 继续稀释

300 倍后, 将稀释液均匀涂布于有机磷筛选培养基中, 于 37 °C 恒温培养箱中静置 12 h。

1.4.2 产高酶活碱性磷酸酶菌株的筛选及鉴定

在无茵的 96 孔酶标板中依次加入 100 μ L 灭菌生理盐水, 将有机磷筛选培养基中长出的单菌落进行形态学鉴定, 挑取疑似枯草芽孢杆菌的单菌落置于 96 孔酶标板中重悬均匀, 加入 50 μ L 底物(1 mg/mL *p*-NPP, pH 9.8)后于 37 °C 避光反应 20 min, 加入 50 μ L 终止液(0.5 mol/L NaOH), 采用多功能酶标仪在 405 nm 处测定 OD 值, 选取数值高的单菌落在有机磷筛选培养基中划线纯化, 重复 3 次后得到纯化后产高酶活碱性磷酸酶菌株。以纯菌株的单菌落为模板, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGA GTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TAC GGYTACCTTGTTACGACTT-3')扩增保守序列。PCR 反应体系(50 μ L): 5 \times PrimeSTAR[®] GXL Buffer 10 μ L, PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 1 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 引物 27F/1492R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 无菌双蒸水 33 μ L, 模板用 10 μ L 吸头蘸取单菌落在配制好的体系溶液中重悬。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 95 °C 10 s, 55 °C 15 s, 68 °C 100 s, 32 个循环; 68 °C 10 min。将扩增产物进行 1%凝胶电泳检测后送测序, 并将测序结果采用 BLAST 进行序列比对, 使用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.5 碱性磷酸酶 *phoA* 基因克隆及原核表达

1.5.1 *phoA* 基因克隆

分离菌株进行 BLAST 序列比对后, 参考 GenBank 数据库中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) HD15 (登录号为 CP080508.1)的 *phoA* 基因设计扩增引物, 通过 SignalP 5.0 信号肽预测工具预测 *phoA* 基因中信号肽片段并去除信号肽后, 对无信号肽基因序列进行克隆引物设计, 设计上游引物为: 5'-CGCGGATCCGGAGCTGAGCTGC

AGCAAAC-3' (下划线处为 *Bam*H I 酶切位点), 下游引物为: 5'-CCGCTCGAGTTTTCCAGTTTT TAAAATCTTAAATAT-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点)。以复苏后的菌液为模板, 采用 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 体系进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(50 μ L): 模板为复苏后菌液 2 μ L, 上述设计引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 无菌双蒸水 31 μ L, 其余条件和程序参照 1.4.2。扩增产物经 1%凝胶电泳检测后切下含有目的条带的凝胶, 使用 OMEGA 试剂盒进行凝胶回收 DNA。回收产物以 *Bam*H I/*Xho* I 为酶切位点与 pET-28a(+)载体进行双酶切后转入到 *Escherichia coli* BL21(DE3)中, 在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板中筛选阳性转化菌株, 提取质粒进行测序鉴定。

1.5.2 *PhoA* 蛋白的原核表达及纯化

将测序成功的阳性菌株低温(16 °C)诱导表达 18 h 后, 在 4 °C、6 000 \times g 条件下离心 5 min 收集菌体, 将菌体用 10 mL 浓度为 0.05 mol/L、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液重悬, 使用超声破碎机进行超声破碎(功率 25%, 工作 5 s, 间隔 5 s, 工作时长 20 min), 将破碎菌体在 4 °C、12 000 \times g 条件下离心 10 min, 得到 ALP 粗制酶液, 将粗制酶液使用 Ni Focurose FF (IDA)进行纯化, 纯化后目的蛋白经 SDS-PAGE 鉴定后, 使用 Pierce[™] 考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒测定纯化蛋白的浓度。

1.6 碱性磷酸酶 *PhoA* 酶学性质的鉴定

1.6.1 *PhoA* 最适 pH 的测定

分别配制 pH 8.0、8.5、9.0、9.5、9.8、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0 的 10%乙二醇胺溶液, 分别加入终浓度 1 mg/mL 的 *p*-NPP, 溶解后作为底物备用。将 1.5.2 中纯化的蛋白液稀释到 500 ng/mL, 取 100 μ L 蛋白液与 50 μ L 底物, 置于 37 °C 下反应 20 min, 加入 50 μ L 终止液(0.5 mol/L NaOH), 在 405 nm 处测定 OD 值。

1.6.2 PhoA 底物最适孵育温度的测定

固定最适 pH 条件, 其他条件不变, 重复上述方法, 加入底物后分别置于 55、60、65、70、75 和 80 °C, 反应 20 min, 加入 50 μ L 终止液, 在 405 nm 处测定 OD 值。

1.6.3 不同浓度金属离子对 PhoA 活性的影响

在 37 °C 条件下固定最适 pH 条件, 在底物中分别加入终浓度为 0–25 mmol/L 的 Mg^{2+} 、0–7 mmol/L Ca^{2+} 和终浓度为 0–0.7 mmol/L 的 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 与 500 ng/mL 的蛋白液反应 20 min, 加入 50 μ L 终止液, 在 405 nm 处测定 OD 值。

1.6.4 PhoA 在 37 °C 条件下的最大反应速率 V_{max} 、米氏常数 K_m 和催化常数 k_{cat} 的测定

配制 pH 9.8 的 *p*-NPP 底物, 浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mmol/mL 的底物, 加入 50 ng 重组酶, 在可控温多功能酶标仪下控温 37 °C, 自动测定不同底物浓度下每分钟底物生成物的浓度, 共测定 20 min。结合吴梅芬等^[15]、席宏波等^[16]的酶促反应计算方法计算 ALP 的酶促反应速率, 以底物浓度为横坐标, 反应速率为纵坐标, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 计算 PhoA 的最大反应速率 V_{max} 、米氏常数 K_m 和催化常数 k_{cat} 。

1.6.5 PhoA 在最适条件下酶比活的测定

酶活力单位的定义: 1 个酶活力单位表示在最佳反应条件下, 每分钟水解 *p*-NPP 产生 1 μ mol 对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol, *p*-NP)所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U); 酶比活=酶活力(U)/蛋白质质量(mg)。

标准曲线的绘制: 用 10% 二乙醇胺缓冲液分别配制浓度为 5、10、15、20、25、30 μ mol/L 的 *p*-NP, 在 405 nm 处测定 OD 值, 绘制标准曲线。

将蛋白液稀释到 50 ng/mL, 取 100 μ L 蛋白液与 50 μ L 饱和底物在最适条件下进行反应,

在 405 nm 处测定 OD 值, 代入标准曲线中计算出生成的产物浓度后测得酶比活, 最后的结果取 3 组平行实验的平均值。

1.7 用鲎试剂检测 PhoA 对 LPS 的去磷酸化作用

将 LPS 冻干粉末使用灭菌超纯水配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液, 将 20 μ g 重组 PhoA 加入到 200 μ g 的 LPS 溶液中(注: LPS 与酶的量与 1.8 中每只小鼠的用量相当), 并依据 1.6 确定的条件调整溶液的 pH 值和 Mg^{2+} 浓度, 在 37 °C 下反应 6 h。然后, 参考鲎试剂使用说明书步骤配制内毒素标准溶液, 以标准无热源内毒素检查用水做阴性对照, 内毒素标准溶液做阳性对照, 分别检测 LPS 在 PhoA 对其降解前后的鲎试剂凝集活性。

1.8 去磷酸化 LPS 对小鼠的致病性作用

取 18 只 ICR 雌性小鼠(20–22 g/只), 分为 3 组, 每组 6 只。对照组 A: 将致死剂量 LPS 按照小鼠体重进行小鼠腹腔注射(10 mg/kg); 空白对照组 B: 将纯化后的 PhoA 蛋白液按照小鼠体重进行小鼠腹腔注射(1 mg/kg); 实验组 C: 将 LPS 与纯化后的 PhoA 蛋白在 37 °C 下反应 6 h 进行小鼠腹腔注射(LPS 10 mg/kg, PhoA 1 mg/kg), 72 h 后观察小鼠存活率。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选及鉴定结果

在有机磷筛选培养基中分离有机质丰富的土壤环境样品中细菌, 通过形态学观察鉴定, 挑选约 240 株疑似枯草芽孢杆菌细菌进行酶活测定, 结果显示 14 株菌酶活较高, 选取初筛酶活最高的菌株 35-16-1, 在筛选培养基中菌株 35-16-1 菌落呈污白色(图 1A), 形状似菜花状, 菌落表面粗糙皱缩不透明; 革兰氏染色呈阳性, 菌体两端钝圆, 呈短杆状(图 1B)。

以 35-16-1 菌液为模板, 采用 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增后, 电泳结果显示在 1 500 bp 处有与预期符合的目的条带, 将其测序结果进行 BLAST 后, 显示与枯草芽孢杆菌有 99% 以上的相似度, 将序列使用 MAGA 5.0 构建系统发育树, 如图 2 所示, 结果显示与 *Bacillus subtilis* 在同一分支, 与其余常见 9 种芽孢杆菌不处于同一分支, 判定菌株 35-16-1 为枯草芽孢杆菌, GenBank 登录号为 PP256342.1。

2.2 碱性磷酸酶 *phoA* 基因克隆及原核表达结果

2.2.1 *phoA* 基因克隆结果

以菌株 35-16-1 菌液为模板扩增其碱性磷酸酶 *phoA* 基因, 扩增产物经琼脂糖核酸电泳鉴定后显示在约 1 300 bp 处有一与预期相符的条带。经 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切, 与 pET-28a(+) 载体连接后转入 *E. coli* BL21(DE3), 得到重组质粒 pET-28a(+)-*phoA*。重组质粒经 *Bam*H I/*Xho* I



图 1 菌株 35-16-1 的菌落形态(A)和革兰氏染色镜检结果(100×) (B)

Figure 1 Colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain 35-16-1 (100×).

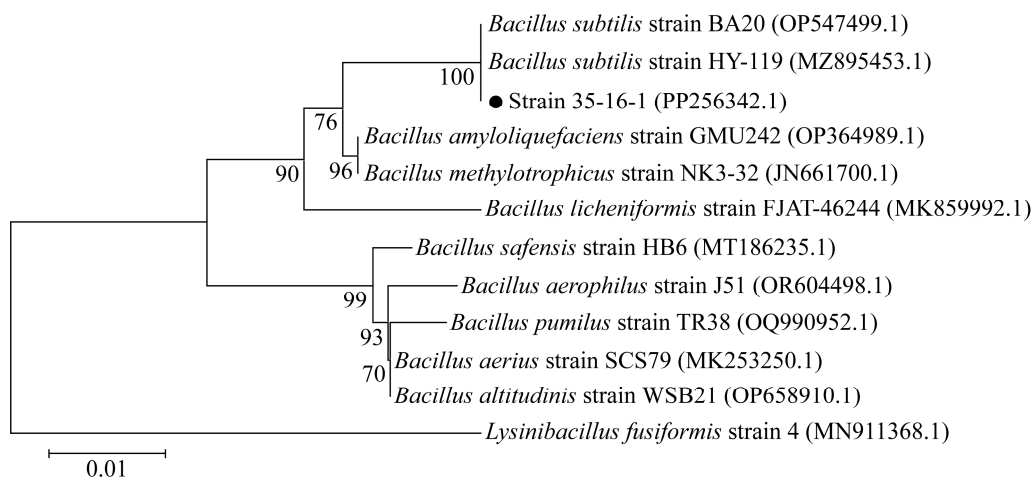


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 35-16-1 系统发育树 分支点上的数值代表系统发育树 bootstrap 值; 分支长度代表标尺为 0.01 的进化距离; 括号中的序号为 GenBank 登录号

Figure 2 Phylogenetic tree of strain 35-16-1 based on 16S rRNA gene sequence. The numerical values on the branching points represent the bootstrap values of the phylogenetic tree; The branch length represents the evolutionary distance with a scale of 0.01; The serial number in parentheses is the GenBank accession number.

双酶切后经过凝胶电泳鉴定, 得到 5 000 bp 左右的空载体片段和 1 300 bp 的目的基因片段, 如图 3 所示, 重组质粒构建正确, 测序后获得编码蛋白基因已上传至 GenBank, 登录号为 PP240937.1, 其推导的氨基酸序列与收录在 GenBank 中的 *phoA* 的相似性为 98.15%–100.00%。

2.2.2 PhoA 蛋白的原核表达及纯化结果

将重组质粒转入到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 低温诱导表达破碎后得到粗酶液, 并进行蛋白纯化, 经 SDS-PAGE 鉴定后, 表达后蛋白和纯化后蛋白均得到与预期 53.1 kDa 相符的条带(图 4)。纯化后的 PhoA 蛋白经 PierceTM 考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒测得浓度为 161 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 碱性磷酸酶 PhoA 酶学性质鉴定结果

2.3.1 PhoA 最适 pH 的测定结果

将浓度为 500 ng/mL 的蛋白液分别在 pH 8.0、8.5、9.0、9.5、9.8、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0 的底物下进行反应, 结果显示 pH 8.0–9.8 时 PhoA 酶活性逐渐升高, pH 9.8 时酶活性到

达顶峰, 随着 pH 增大, 酶活性降低, 因此 PhoA 最适 pH 9.8 (图 5)。

2.3.2 PhoA 底物最适孵育温度的测定结果

将浓度为 500 ng/mL 的蛋白液加入 pH 9.8 的底物后分别置于 55、60、65、70、75 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 20 min 后, 结果显示, 在 55–70 $^{\circ}\text{C}$

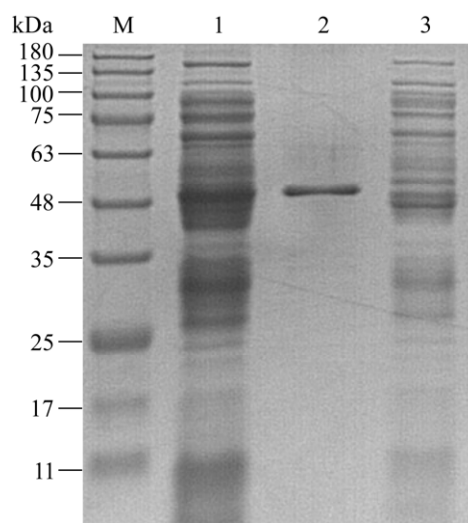


图 4 PhoA 原核表达和纯化后 SDS-PAGE 图
M: Protein marker; 1: PhoA 粗酶液; 2: 纯化后的 PhoA; 3: pET-28a(+)空载体

Figure 4 SDS-PAGE of PhoA after prokaryotic expression and purification. M: Protein marker; 1: PhoA crude enzyme solution; 2: Purified PhoA; 3: pET-28a(+) empty vector.

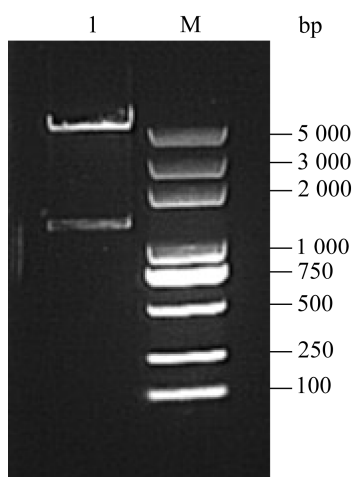


图 3 重组质粒 pET-28a(+)-*phoA* 的双酶切鉴定
Figure 3 Double restriction-enzyme digestion identification of pET-28a(+)-*phoA* recombinant plasmid. 1: pET-28a(+)-*phoA*. M: DL5000 DNA Marker.

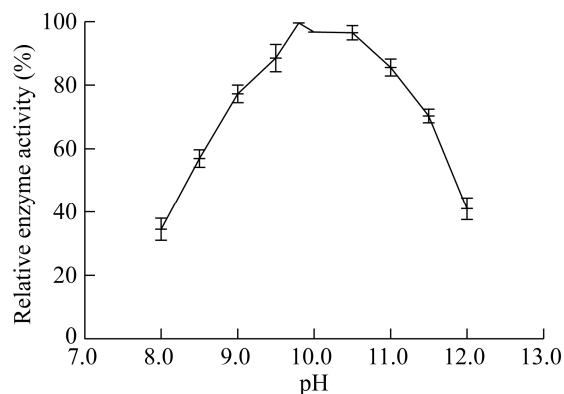


图 5 PhoA 的最适反应 pH
Figure 5 The optimum reaction pH of PhoA.

时, 酶活逐渐升高, 在 70 °C 处达到顶峰, 超过 70 °C 时酶活逐渐降低, 因此 PhoA 最适温度为 70 °C (图 6)。

2.3.3 不同浓度金属离子对 PhoA 活性的影响结果

在 pH 9.8 的底物中分别加入不同浓度的金属离子, 加入浓度为 500 ng/mL 的蛋白液反应后, 结果如图 7 所示, Mg^{2+} 对 PhoA 呈激活作用, 且当 Mg^{2+} 浓度为 14 mmol/L 时, 激活作用最大, Ca^{2+} 对 PhoA 呈抑制作用, K^+ 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 对其无影响。

2.3.4 最大反应速率 V_{max} 、米氏常数 K_m 、催化常数 k_{cat} 和酶比活测定结果

在不同浓度下测定酶促反应速度, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 拟合曲线的线性回归方程为 $y=0.0052+0.0133x$ ($r^2=0.9946$), 计算 V_{max} 为 179.86 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 米氏常数 K_m 为 2.38 mmol/L, 催化常数 k_{cat} 为 246.83 s^{-1} , 酶比活为 6 550.00 U/mg。

2.4 LPS 在用 PhoA 去磷酸化后的活性检测

将购置的 LPS 配制成 1 mg/mL, 鲎试剂凝集检测表明其 LPS 活性约为 2.00×10^6 EU/mg, 用 PhoA 对 LPS 去磷酸化后, 其活性约为 6.12×10^5 EU/mg, 活性降低约 69.4%。

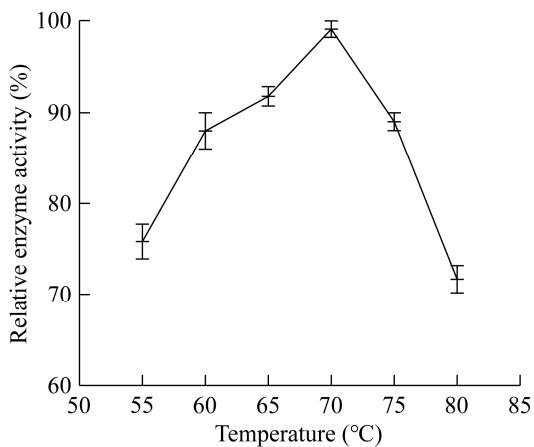


图 6 PhoA 的最适反应温度

Figure 6 The optimum reaction temperature of PhoA.

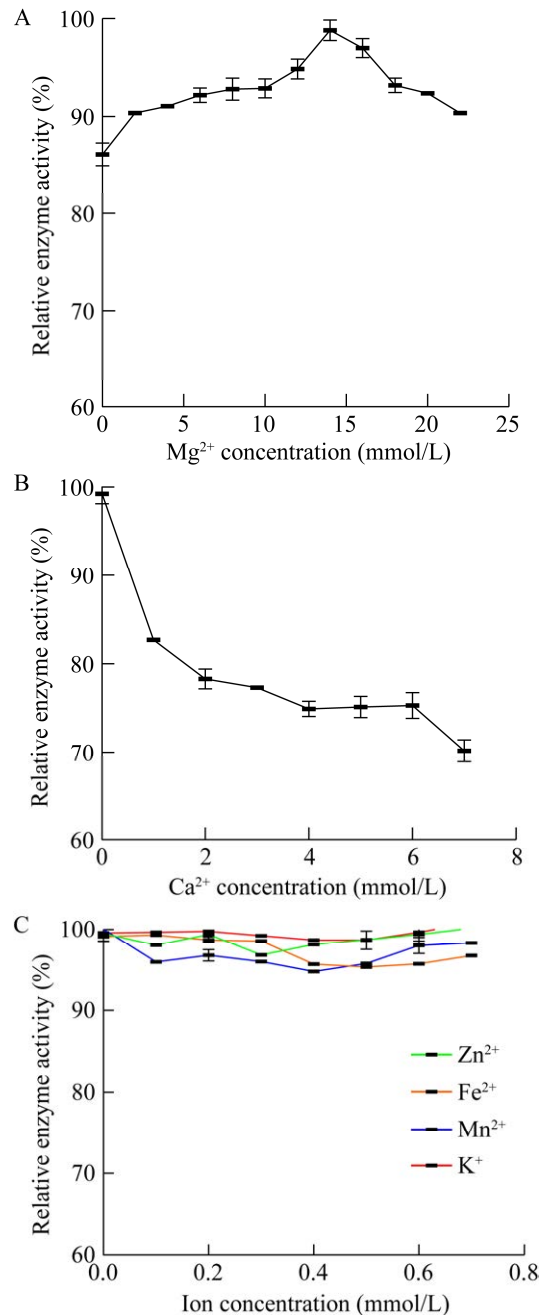


图 7 不同浓度金属离子对 PhoA 酶活性的影响

Figure 7 Effect of different concentrations of metal ions on the activity of PhoA enzyme.

2.5 去磷酸化 LPS 对小鼠的致病性作用

对照组 A: 小鼠腹腔注射处理的 LPS 在 12 h 后集体出现精神沉郁、扎堆炸毛现象、眼角分泌红色脓性分泌物, 且 72 h 后 6 只小鼠逐渐全

部死亡；空白对照组 B：小鼠无任何发病现象，且全部存活；实验组 C：小鼠腹腔注射处理的 LPS 在 12 h 后，轻微发病，出现精神沉郁现象，48 h 后 1 只小鼠死亡，剩余 5 只小鼠逐渐康复直至痊愈，存活率 83.3% (图 8)。

3 讨论与结论

本研究通过借鉴以前的方法^[17]利用有机磷筛选培养基筛选产 ALP 细菌，以 *p*-NPP 为底物测定所有单菌落的酶活性，通过形态学观察鉴定，在约 240 株疑似枯草芽孢杆菌中进行酶活测定，通过酶与底物 *p*-NPP 的显色反应初步筛选出显色明显且测定 OD_{405} 值较高的菌落。从约 240 株疑似枯草芽孢杆菌中共筛选到 14 株产高酶活 ALP 的枯草芽孢杆菌，对这些菌株的 *phoA* 基因进行原核表达后得到酶液。SDS-PAGE 分析表明各个基因的表达水平基本一致，因此我们将酶液通过倍比稀释与底物作用后进行显色反应，以初步确定各重组 PhoA 酶活性的相对高低。结果发现 14 个重组酶各酶之间的活性相差极大：其中有 3 个重组 PhoA 的酶活最高(包括本研究中的酶，序列测定表明 3 个 *phoA* 的基因序列一致)；有 8 个重组 PhoA 酶活高低不一；

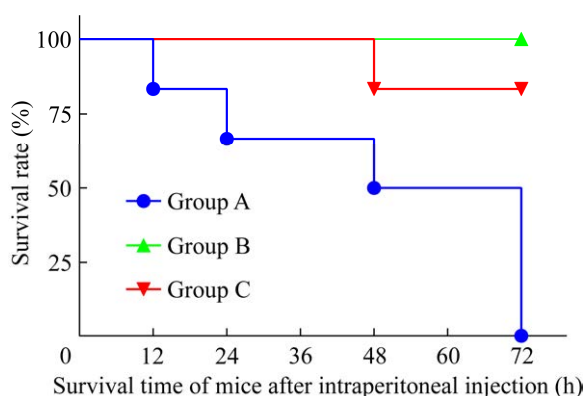


图 8 三组小鼠腹腔注射 72 h 后存活率

Figure 8 The survival rate of three groups of mice after intraperitoneal injection for 72 h.

另有 3 株重组蛋白未稀释粗酶液也测定不到酶活性。单菌落酶活性很高但重组 PhoA 蛋白酶活性相差极大。本研究的 PhoA 在枯草芽孢杆菌中是分泌表达的，其表达量相对于很多天然的细菌酶类来说可以称得上高表达，但绝对表达量并不高，因此本实验选用大肠杆菌作为表达系统进行表达，得到了远比枯草芽孢杆菌本身表达量高得多的碱性磷酸酶 PhoA。本次重组的枯草芽孢杆菌碱性磷酸酶 PhoA 蛋白的 k_{cat} 值为 246.83 s^{-1} ，是野生型大肠杆菌 PhoA (EAP) 的 k_{cat} 值 (65 s^{-1} ^[18]) 的 3.82 倍，并且此酶热稳定性较好，在 37 °C 放置 12 h 后仍能维持较高的酶活性，虽然酶活性在 70 °C 时最高，但这一温度下酶活性保持的时间并不长，在 30 min 后即明显下降。因此，我们在降解 LPS 的实验中温度选择了 37 °C。

枯草芽孢杆菌是应用较为广泛的益生菌，其不仅能改善动物生长性能对维持动物肠道生态平衡也发挥着重要作用。人们对其保健作用进行了大量的研究，发现其保健作用是多方面的，如维持肠道菌群平衡、帮助消化、提高免疫力和分泌抗菌物质。内毒素为革兰氏阴性菌的细胞壁成分，在环境中广泛存在，据报道饲料中有存在内毒素过高的情况^[13]，PhoA 具有降解内毒素的作用，因此，具有高酶活性 PhoA 的枯草芽孢杆菌，其 ALP 对其保健作用应该具有一定的作用，值得对此进行进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 叶兵兵, 杨玲玲, 刘锐兰, 陈雪, 赖世林. 枯草芽孢杆菌在畜禽养殖应用中的研究进展[J]. 饲料研究, 2023, 46(6): 142-145.
YE BB, YANG LL, LIU RL, CHEN X, LAI SL. Research progress on application of *Bacillus subtilis* in livestock and poultry breeding[J]. Feed Research, 2023, 46(6): 142-145 (in Chinese).
- [2] 刘帅, 熊云霞, 孙铝辉, 王丽. 枯草芽孢杆菌在猪生产中的应用及其作用机制的研究进展[J]. 动物营养

- 学报, 2022, 34(4): 2105-2113.
- LIU S, XIONG YX, SUN LH, WANG L. Research progress of application of *Bacillus subtilis* as feed additive in pigs production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(4): 2105-2113 (in Chinese).
- [3] APPLEBURY ML, COLEMAN JE. *Escherichia coli* alkaline phosphatase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(2): 308-318.
- [4] DABICH D, NEUHAUS OW. Purification and properties of bovine synovial fluid alkaline phosphatase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1966, 241(2): 415-420.
- [5] ZWAIG N, MILSTEIN C. The amino acid sequence around the reactive serine residue in alkaline phosphatase of *Serratia marcescens*[J]. The Biochemical Journal, 1964, 92(2): 421-422.
- [6] WEISS MJ, HENTHORN PS, LAFFERTY MA, SLAUGHTER C, RADUCHA M, HARRIS H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(19): 7182-7186.
- [7] COLEMAN JE, GETTINS P. Alkaline phosphatase, solution structure, and mechanism[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1983, 55: 381-452.
- [8] TORRIANI A. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*[J]. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 1990, 12(8): 371-376.
- [9] HULETT FM. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 1996, 19(5): 933-939.
- [10] BINA JE, NANO F, HANCOCK RE. Utilization of alkaline phosphatase fusions to identify secreted proteins, including potential efflux proteins and virulence factors from *Helicobacter pylori*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 148(1): 63-68.
- [11] POELSTRA K, BAKKER WW, KLOK PA, HARDONK MJ, MEIJER DK. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification[J]. Laboratory Investigation, 1997, 76(3): 319-327.
- [12] BURKEY TE, SKJOLAAS KA, MINTON JE. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract[J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(4): 1493-1501.
- [13] 张吉鹏. 内毒素的生物活性及其对猪的危害[J]. 猪业科学, 2020, 37(11): 134-137.
- ZHANG JK. The bioactivity of Endotoxin and its harm to the pigs[J]. Swine Industry Science, 2020, 37(11): 134-137 (in Chinese).
- [14] LI C, MA DX, ZHOU HC, ZHANG MM, AN LY, WANG Y, WU CC. Effects of different doses lipopolysaccharides on the mucosal barrier in mouse intestine[J]. Research in Veterinary Science, 2020, 133: 75-84.
- [15] 吴梅芬, 王晓岗, 刘亚菲, 许新华. 适用于本科教学的新酶促反应动力学实验研究[J]. 实验技术与管理, 2015, 32(11): 170-173.
- WU MF, WANG XL, LIU YF, XU XH. Research on a novel kinetics experiment of enzyme-catalyzed reaction presented for undergraduate teaching[J]. Experimental Technology and Management, 2015, 32(11): 170-173 (in Chinese).
- [16] 席宏波, 杨琦, 尚海涛, 郝春博. 菲降解菌的降解特性及酶促反应动力学研究[J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 169-176.
- XI HB, YANG Q, SHANG HT, HAO CB. Biodegradation characteristics and enzymatic reaction kinetics of phenanthrene-degrading bacteria[J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6): 169-176 (in Chinese).
- [17] 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 MX, LIAO HY, ZHENG J, HE JF, CAO K, YU XL. 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 (in Chinese).
- [18] MULLER BH, LAMOURE C, Le DU MH, 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: a European Journal of Chemical Biology, 2001, 2(7/8): 517-523.