

文章编号:1673-1689(2007)06-0069-05

耻垢分枝杆菌海藻糖合成酶基因 TreS 的克隆 及其在大肠杆菌中的表达

李镭^{1,2}, 丁宏标², 余晓斌¹, 乔宇²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100081)

摘 要: 耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)在环境胁迫下具有合成海藻糖的能力^[1-2]。实验采用 PCR 的方法, 克隆了来源于耻垢分枝杆菌的一段核苷酸序列, 与已报道的海藻糖合成酶有 60% 以上同源性, 推测该基因的编码产物具有海藻糖合成酶的活性, 为进行其功能验证而在大肠杆菌中进行了表达。目的蛋白以可溶性蛋白为主, 约占细胞可溶性总蛋白 48%, 为目前相关报道的最高值。经活性测定, 表达的重组酶无需复性, 能够催化麦芽糖生成海藻糖, 在 20 ℃ 反应 20 h 对麦芽糖的转化率可达 61%, 具有较高的应用价值。

关键词: 耻垢分枝杆菌; 海藻糖合成酶; 克隆; 表达

中图分类号: Q 814

文献标识码: A

Cloning and Expression of TreS Gene from *Mycobacterium smegmatis* in *Escherichia coli*

LI Lei^{1,2}, DING Hong-biao², YU Xiao-bin¹, QIAO Yu²

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, WuXi 214122, China; 2. Feed Research Institute, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Trehalose synthase catalyzes the reversible interconversion of maltose and trehalose (1-O- α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside). An trehalose synthase gene, TreS from *Mycobacterium smegmatis*, has been cloned by PCR. The sequence encoding TreS was inserted into vector pET30a and introduced into the host *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. A high yield of the active recombinant TreS, 48% of total protein, was obtained by IPTG induction. A novel protein band of 68kDa was detected by SDS-PAGE analysis. It was found that the optimum reaction time for recombinant TreS about 20h. Higher conversion yield was observed between 4 ℃~30 ℃, and, more than 61% conversion yield was obtained at 20 ℃. The addition of 1mM divalent metal ions such as Ba²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, did not further increase the enzyme activity, However Cu²⁺ strongly inhibited the enzyme activity.

Key words: *Mycobacterium smegmatis*; trehalose synthase; cloning; expression

收稿日期: 2006-05-30.

基金项目: 国家 863 计划项目(2005AA246010); 国际科技合作重点项目(2005DFA31070).

作者简介: 李镭(1978-), 男, 浙江台州人, 微生物基因工程技术硕士研究生.

通讯作者: 丁宏标(1966-), 男, 江苏盐城人, 教授, 博导, 主要从事饲料生物技术研究.

Email: dinghongbiao@mail. cass. net. cn

海藻糖(Trehalose)分子是由两个吡喃环葡萄糖以1,1-糖苷键连接而成,分子内不存在游离的半缩羟基,是一种稳定的非还原性二糖。海藻糖无色无嗅,具有很强的热稳定性、酸稳定性和化学稳定性,对蛋白质、核酸、细胞膜等活体成分有很强的稳定作用,在生物体受到外界压力(干燥、冻结、渗透压等)时具有保护作用^[3-4],因此在生物制品、食品、药品、作物育种及精细化工等领域有着广泛的应用前景^[5-6]。早期的商品化海藻糖主要是从酵母细胞中提取,收率低且成本高,限制了海藻糖的广泛应用。近年来在许多微生物中发现了海藻糖的合成酶系,酶法合成海藻糖正逐步成为海藻糖工业化生产的新途径^[7-9],利用基因工程方法克隆和表达重组海藻糖合成酶也成为研究的新热点。

海藻糖在生物体内具有多种合成途径,其底物和酶系也各有不同。其中 TreS 一步催化途径以麦芽糖为底物,通过分子内转糖基作用把 α, α -1,4糖苷键连接的麦芽糖转化为 α, α -1,1糖苷键连接的海藻糖^[10-11]。该催化过程既不消耗高能物质,也不依赖磷酸,而且底物麦芽糖目前生产技术成熟,价格低廉,与成品海藻糖相比有较大的价格空间。因此,利用海藻糖合成酶以麦芽糖为原料生产海藻糖是一条极有工业化前景的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 耻垢分枝杆菌 CGMCC 1.2621 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 和表达载体 pET30a 为 Merk 公司产品;pGEM-T Vector 为 Promega 公司产品;大肠杆菌 Top10 为 Invitrogen 公司产品。

1.1.2 主要试剂 Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、X-gal 及 IPTG 均为 TaKaRa 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司;DNA 相对分子质量标准 DL2 000 和 1 kb DNA Ladder 购自天根生化科技有限公司;麦芽糖及海藻糖标准品购自北京化学试剂公司;薄层色谱(TLC)预制板购自 Merk 公司;其余试剂为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 耻垢分枝杆菌总 DNA 的提取 将活化的菌种转接至营养肉汁液体培养基中(蛋白胨 10 g/L,牛肉提取物 3 g/L,氯化钠 5 g/L,pH 7.0),30℃摇床 210 r/min 培养 24 h,取 1.5 mL 培养液离心收集菌体,参照文献^[12]提取总 DNA。

1.2.2 分子生物学操作 质粒的抽提、转化参照分子克隆实验指南,酶切反应、连接反应、DNA 片段回收等操作均参照产品说明书。

1.2.3 基因克隆和重组表达载体构建 根据 GeneBank 公布的序列(gi:118168627)设计引物,下划线部分分别为酶切位点 Nde I 和 EcoR I。

上游引物 MsF: 5'-CATATGGAGGAGCA-CACGCAGGGCAG-3'

下游引物 MsR: 5'-GAATTCTCATTGCT-GCGCTCCCGGTTC-3'

PCR 条件为:94℃预变性 4 min,然后 94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 2 min,完成 30 个循环后 72℃延伸 3 min。

PCR 扩增产物加 A 后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片断,与 T 载体连接,转化大肠杆菌 Top10,菌落 PCR 筛选阳性克隆,送样测序。

经测序验证后小量提取质粒,用 Nde I 和 EcoR I 双酶切质粒及表达载体 pET30a,分别回收目的片断,连接后转化大肠杆菌 Top10,挑取阳性克隆提质粒,转化表达宿主菌 BL21(DE3)pLysS。

1.2.4 重组菌的诱导表达 挑取重组菌单菌落到 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL,氯霉素 34 μ g/mL),37℃振荡过夜。按照 1%的接种量转接至 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL,氯霉素 34 μ g/mL),37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导 5 h 后离心收集菌体。

1.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 分析 取发酵液 1.5 mL 离心收集菌体,加入 300 μ L 去离子水重悬菌体,超声破碎,12 000 r/min 离心后取上清,加入等体积 2×上样 Buffer,沸水浴 5 min,取 25 μ L 点样。浓缩胶及 8 g/dL 分离胶的配制参照文献^[13]。

1.2.6 重组酶的活力测定 取发酵液 1.5 mL 离心收集菌体,加入 100 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液 300 μ L 重悬菌体,超声破碎,4℃离心后取上清液,与等体积的质量分数 30%的麦芽糖溶液混和,37℃振荡反应 20 h,沸水浴 5 min 终止反应。

1.2.7 薄层色谱(TLC)法检测 离心收集反应液的上清液,稀释 10 倍后点样,点样量 2 μ L,在展开剂(V(正丁醇):V(吡啶):V(水)=5:5:1)中展开,取出晾干,用喷雾器均匀地喷上显色剂(质量分数 98%的 V(硫酸):V(甲醇)=1:4),置于 105℃烘箱 10 min 使其显色。

1.2.8 离子色谱(IC)法检测 离心收集反应液的上清液,稀释 1 000 倍进样。离子色谱为 DIONEX

2 500,柱子:CarboPac PA-100,流动相:体积比为 70:30 的 100 nmol NaOH 和 500 nmol NaAC,体积流量 1.0 mL/min,进样量 10 μL。

根据标样及待测样品的峰面积(A)计算出待测样品中海藻糖的含量,计算公式如下:

$$w_{\text{样品}} = \frac{A_{\text{样品}}}{A_{\text{标样}}} \times c_{\text{标样}} \times \text{进样稀释倍数}$$

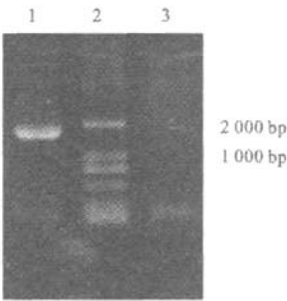
$$\text{转化率} = \frac{m_{\text{产物海藻糖}}}{m_{\text{底物麦芽糖}}} \times 100\%$$

$$\text{相对转化率} = \frac{\text{转化率}}{\text{最高转化率}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 TreS 表达载体的构建

以耻垢分枝杆菌总 DNA 为模板,MsF 和 MsR 为引物进行 PCR 扩增,得到约 1 800 bp 的 DNA 片断,与目的基因大小相符。将扩增得到的 DNA 片断回收后与 T 载体连接,转化大肠杆菌 Top10,经测序正确后小量提取质粒,用 Nde I 和 EcoR I 双酶切质粒及表达载体 pET30a,连接后转化大肠 Top10,菌落 PCR 验证阳性克隆,命名为 MS-T31-30A32。



1. PCR products of TreS gene; 2. DNA marker DL2000; 3. Negative control

图 1 海藻糖合成酶基因 TreS 的克隆
Fig.1 Cloning of trehalose synthase gene TreS

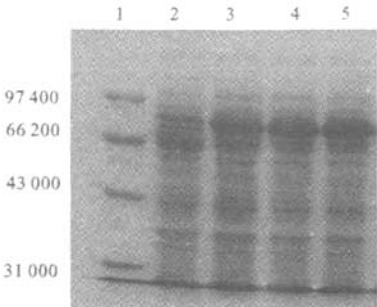
2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

诱导产物的 SDS-PAGE 分析如图 2 所示,在 68 000 处出现特异条带,相对分子质量大小与理论值相符。

2.3 重组酶活性测定与性质研究

重组酶与底物麦芽糖反应后进行 TLC 分析,结果如图 3 所示,热灭活后的重组酶与麦芽糖反应后的产物中只有麦芽糖,而重组酶与麦芽糖反应后的产物中不仅有麦芽糖,还有海藻糖,说明重组酶具有将麦芽糖转化为海藻糖的能力,其具有海藻糖

合成酶的活性。



1. Protein marker; 2. Total protein of BL21(DE3)pLysS with plasmid MS-T31-30A32 not induced by IPTG; 3,4,5. Total protein of BL21(DE3)pLysS with plasmid MS-T31-30A32 induced by IPTG

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 Analysis of recombinant TreS by SDS-PAGE



1. maltose with recombinant TreS; 2. maltose with recombinant TreS steamed; 3. maltose standard; 4. trehalose standard

图 3 重组酶转化产物的 TLC 分析
Fig. 3 TLC analysis of the reaction products of recombinant TreS

重组酶与底物麦芽糖反应后进行 IC 分析,结果如表 1 所示,其中表 1(a)是标准样品,表 2(b)是待测样品。

表 1 重组酶催化产物的离子色谱分析
Tab.1 IC analysis of the reaction products of recombinant TreS

序号	保留时间/min	名称	峰高	峰面积	相对峰面积	样品浓度	峰分离类型
1	1.93	海藻糖	182.083	45.382	54.94	n. a.	BMb
2	3.03	1	28.517	4.193	5.08	n. a.	bMb
3	3.50	2	2.510	0.348	0.42	n. a.	bMB
4	4.10	3	2.174	0.470	0.57	n. a.	BMb *
5	7.97	麦芽糖	67.880	32.203	38.99	n. a.	bMB
Total:			283.165	82.596	100.00	0.000	

(a)

序号	保留时间/min	名称	峰高	峰面积	相对峰面积	样品浓度	峰分离类型
1	1.57	n.a.	0.871	0.103	0.16	n.a.	BMB
2	1.93	n.a.	117.069	27.729	43.24	n.a.	bMb
3	2.53	n.a.	1.066	0.116	0.18	n.a.	bMB
4	3.00	n.a.	1.975	0.265	0.41	n.a.	BMB
5	4.03	n.a.	6.270	1.136	1.77	n.a.	BMB
6	7.77	鼠李糖	62.554	32.046	49.98	44.761	BMB
7	13.80	n.a.	0.182	0.106	0.16	n.a.	BMB
8	18.63	n.a.	2.956	2.621	4.09	n.a.	BMB
Total:			192.941	64.122	100.00	44.761	

(b)

从表1(a)中可以看出,标准样品中海藻糖的出峰时间是1.93 min,峰面积为45.382;从表1(b)中可以看出,待测样品中海藻糖的出峰时间是1.93 min,峰面积为27.729;已知标样浓度,根据标样及待测样品的峰面积可以计算出待测样品中海藻糖的含量。

$$w_{\text{样品}} = \frac{27.729}{45.382} \times 0.015\% \times 1000 = 9.16\%$$

$$\text{转化率} = \frac{9.16\%}{15\%} \times 100\% = 61\%$$

同法测得其他样品。同时,对重组酶性质进行了初步研究(见图4~7)。

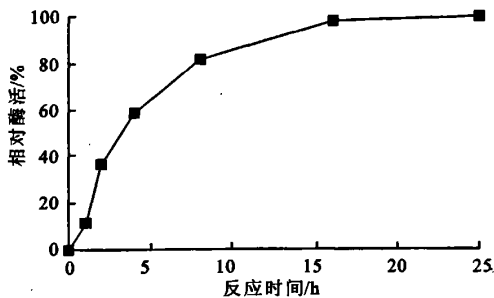


图4 转化率随时间变化曲线

Fig. 4 Optimum reaction time for recombinant TreS

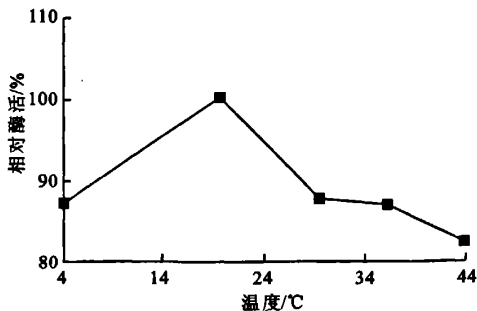


图5 温度对重组酶合成活力的影响

Fig. 5 Optimum temperature of recombinant TreS

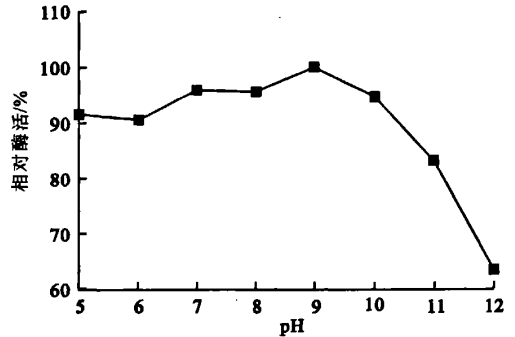


图6 pH对重组酶合成酶活的影响

Fig. 6 Optimum pH for recombinant TreS

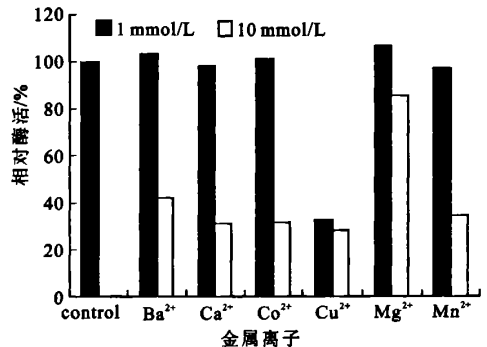


图7 金属离子对重组酶合成酶活的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on recombinant TreS

3 结语

实验中采用PCR的方法,以耻垢分枝杆菌基因组DNA为模板,克隆出约1.8 kb的海藻糖合成酶基因TreS,将其插入表达载体pET30a中,并转化大肠杆菌BL21(DE3)pLysS获得重组基因工程菌,经IPTG诱导表达得到约68 000的目的蛋白质,占细胞总蛋白质的48%,其中绝大部分为可溶性蛋白质。经酶活测定,诱导表达的重组海藻糖合成酶无需复性即具有活性,以15%麦芽糖(终质量分数)为底物合成海藻糖,最高转化率可达61%。

以25 h时的转化率为100%基准,其他值与其相比得出相对转化率。随着反应时间的延长转化率逐渐提高,在0~5 h转化率呈线性快速增长,随后开始减缓,在20 h左右以后反应趋于平衡。

随后进行的酶学性质实验得出,反应温度从4℃升高到20℃转化率也随之升高,而当温度超过20℃时转化率随温度的升高而降低,说明重组酶在低温时转化率较高,20℃时转化率最高。氨基酸序列分析显示,海藻糖合成酶基因中含有α-淀粉酶的多个保守序列^[12-13]。可能较高的反应温度导致α-淀粉酶活力升高,把部分底物水解为葡萄糖,从而降

低了海藻糖的转化率,离子色谱检测到产物中含有较多葡萄糖的结果也证实了这一点(数据未列出)。

在 pH 7~10,重组酶对底物有较高的转化率,当 pH>10 时,酶活力迅速下降,说明该重组酶在中性及弱碱性条件下具有较高的活性。

1 mmol/L 的 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对

酶活影响不大,其中 Mg^{2+} 对酶活有促进作用, Cu^{2+} 对酶活有明显的抑制作用。10 mmol/L 的 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶有强烈抑制,10 mmol/L 的 Mg^{2+} 对酶有微弱抑制。因此,在催化体系中应该适当控制微量元素,对提高酶活会有一定的促进作用。

参考文献(References):

- [1] Wolf A, Kramer R, Morbach S. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(4): 1119-1134.
- [2] Mladen T, Corinna K, Oskar Z, et al. Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition[J]. *Microbiology*, 2003, 149: 1659-1673.
- [3] Silva Z, Alarico S, Nobre A, et al. Osmotic adaptation of *thermus thermophilus* RQ-1: lesson from a mutant deficient in synthesis of trehalose[J]. *J Bacterial*, 2003, 185: 5943-5952.
- [4] Ribeiro M J, Leao L S, Morais P B, et al. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 75: 245-251.
- [5] Alan D E, Pan Y T, Irena P, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule[J]. *Glycobiology*, 2003, 13: 17-27.
- [6] Kato M, Miura Y, Kettoku M, et al. Purification and characterization of new trehalose producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archae *sulfolobus solfataricus* KM1[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60: 546-550.
- [7] Richards A B, Krakowka S, Dexter L B, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40: 871-898.
- [8] Waiter B, Sun W, Stefan H, et al. Composition and functional analysis of the *saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(50): 33311-33319.
- [9] Pan Y T, Koroth E V, Jourdian W J, et al. Trehalose synthase of *mycobacterium smegmatis*: purification, cloning, expression, and properties of the enzyme[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(21): 4259-4269.
- [10] Koén A L, De S, Anthony W, et al. Three pathways for trehalose biosynthesis in *mycobacteria*[J]. *Microbiology*, 2000, 146: 199-208.
- [11] Tsusaki K, Nishimoto T, Nakada T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *pimelobacter* sp. R48 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1290(1): 1-3.
- [12] 王绍校, 吴襟, 高春霄, 等. 海藻糖微生物酶法合成机制的研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 36-40.
WANG S X, Wu J, Gao C X, et al. Study on synthesis of trehalose by a novel microbial enzymatic system[J]. *Microbiology*, 2003, 30(2): 36-40. (in Chinese)
- [13] 陆阳, 袁其朋. 玫瑰微球菌海藻糖合成相关酶基因的克隆和序列分析[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2006, 33(2): 28-32.
LU Y, Yuan Q P. Cloning, expression and sequence analysis of a cluster of genes encoding a new trehalose-producing enzyme from *italics Micrococcus roseus* QS412[J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology: Natural Science Edition*, 2006, 33(2): 28-32. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)