分子伴侣共表达对重组蔗糖异构酶异源可溶性表达的影响

孙佳明， 庞 焦， 高向红， 李明玉， 王从纲*， 李宪臻

（大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连 116034）

摘要： 蔗糖异构酶（sucrose isomerase，SIase）在异麦芽酮糖的酶法制备中发挥着重要作用。为了提高重组蔗糖异构酶的可溶性表达，作者利用分子伴侣共表达策略将源自 *Klebsiella* sp. LX3 的基因 *SIase* 进行异源表达并研究了重组酶的酶学性质。利用酶切连接技术构建重组质粒 pET-24b-*SIase* 并转入大肠杆菌 *E.coli* BL21（DE3）中进行表达，发现其主要表达为包涵体。分别将携带 4 种分子伴侣蛋白基因的质粒（pKJE7、pGro7、pG-Tf2、pTf16）与含有目的基因的重组质粒在大肠杆菌 *E.coli* BL21（DE3）中共表达，筛选到最佳分子伴侣质粒 pGro7 且提高了重组 SIase 的可溶性表达水平，其酶活力为 14.8 U/mL，比未进行共表达的工程菌发酵酶活力（3.5 U/mL）有明显提高，进一步利用金属离子螯合层析技术纯化到 SIase 纯酶，酶学性质研究显示其最适反应温度为 40 ℃，最适反应 pH 为 6.0。动力学常数 K_m 为（179.10±20.65）mmol/L、k_{cat}/K_m 为（5.44±0.72）L/（mmol·s）。产物特异性研究结果显示，随反应温度的提高，产物中异麦芽酮糖和海藻酮糖比例下降，单糖比例提高。利用分子伴侣共表达策略能够提高重组 SIase 的可溶性表达水平，促进 SIase 的规模化制备和应用。

关键词： 蔗糖异构酶；异源表达；分子伴侣；酶学性质

中图分类号：Q 786　**文章编号：**1673-1689（2022）10-0104-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.010

Effect of Molecular Chaperone Co-Expression on Heterologous Soluble Expression of Recombinant Sucrose Isomerase

SUN Jiaming， *PANG Jiao*， *GAO Xianghong*， *LI Mingyu*， *WANG Conggang**， *LI Xianzhen*

(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Sucrose isomerase (SIase) plays an important role in the enzymatic preparation of isomaltulose. In this study, a *SIase* gene from *Klebsiella* sp. LX3 was expressed in *E. coli* by using the molecular chaperone co-expression system, and then purified and characterized. The *SIase* gene was cloned into pET-24b to yield the construct pET-24b-*SIase*, which was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) for expression. Unfortunately, the enzyme was expressed mainly as inclusion bodies. In order to enhance the soluble form of the enzyme, SIase was coexpressed with a molecular chaperone. Four plasmids (pKJE7, pGro7, pG-Tf2, pTf16), each carrying a molecular chaperone gene, were

收稿日期： 2021-12-01

基金项目： 辽宁省自然科学基金项目（20180550668）。

* **通信作者：** 王从纲（1988—），男，博士，讲师，硕士研究生导师，主要从事食品酶的高效表达研究。E-mail：wangcg@dlpu.edu.cn

separately introduced into *E. coli* BL21 (DE3) carrying pET-24b-*SIase* and the expression of SIase was evaluated. The plasmid pGro7 was the most effective at improving the expression of recombinant SIase as a soluble enzyme, yielding a specific activity of 14.8 U/mL for the crude cell extract compared with a mere 3.5 U/mL for the crude cell extract derived from cells harbouring only pET-24b-*SIase*. The expressed SIase was purified by affinity chromatography using Ni-NTA. The purified enzyme exhibited the maximum activity at 40 ℃ and pH 6.0. Its K_m for sucrose was(179.10±20.65) mmol/L and the k_{cat}/K_m was (5.44±0.72) L/(mmol·s). The results of the product specificity study showed that the proportion of isomaltulose and trehalulose in the products decreased and the proportion of monosaccharides increased with increasing reaction temperature. The results of this study showed that the level of soluble SIase expressed in *E. coli* could be enhanced by coexpressing the enzyme with a molecular chaperone, suggesting a potential strategy for the large-scale production of SIase and its applications.

Keywords: sucrose isomerase, heterologous expression, molecular chaperone, enzymatic properties

异麦芽酮糖(α-*D*-吡喃葡萄糖基-1,6-果糖,isomaltulose)是一种蔗糖的同分异构体,主要存在于蜂蜜、甘蔗汁中,表现出与蔗糖类似的物理化学性质,甜度约为蔗糖的50%[1-2]。然而,异麦芽酮糖是一种新型功能糖,不易被胃酸分解,在小肠中被微生物缓慢降解为葡萄糖和果糖,因此不会导致血糖浓度急速上升,同时具有较好的防龋齿活性和较长的货架期,因此适合作为蔗糖替代品用于无糖食品和保健品的生产,在功能糖行业中拥有巨大的发展前景[3-5]。此外,异麦芽酮糖还在化工领域作为生产一些表面活性剂和高分子聚合物的原材料得到广泛应用[6]。工业上主要利用基于蔗糖异构酶(sucrose isomerase,SIase)的酶催化法将蔗糖异构化为异麦芽酮糖,相比从天然物质中提取和化学法获得具有明显的优势,如专一性高、条件温和、转化过程绿色环保等[7-8]。由于当前市场对异麦芽酮糖的需求日益增长,因此规模化制备蔗糖异构酶降低异麦芽酮糖的生产成本越发受到重视,而实现重组蔗糖异构酶的高效异源表达是实现该目标的关键。

蔗糖异构酶主要来源于细菌,已报道的多种产蔗糖异构酶的细菌包括大黄欧文菌(*Erwinia rhapontici*)、沙雷氏杆菌(*Serratia plymuthica*)、克雷伯式杆菌(*Klebsiella* sp.)和多源发散菌(*Pantoea dispersa*)等[9]。野生菌株普遍产酶水平低,难以达到工业化生产应用的要求,如 *Erwinia rhapontici* NX-5 发酵酶活力为 1.3 U/mL[10],优化后的 *Klebsiella* sp. LX3 的发酵酶活力达到 15.12 U/mL[11]。利用原核系统对重组蛋白质进行异源表达是提高其产量的有效手段,具有生产成本低、工艺操作简便、生产效率高等多种优势。目前针对蔗糖异构酶的异源表达,采用大肠杆菌为表达宿主的研究工作最多,如源自沙雷氏杆菌(*Serratia plymuthica*)、多源发散菌(*Pantoea dispersa* UQ68J)和克雷伯式杆菌(*Klebsiella* sp.UQ14S)的蔗糖异构酶在大肠杆菌中实现了胞内表达[12-13],然而,蔗糖异构酶的可溶性表达水平很低,主要以包涵体形式表达,严重制约了蔗糖异构酶的基础研究和应用[14-15]。针对这一问题,有研究者采用融合谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase,GST)标签或高密度发酵手段在一定程度上提高了蔗糖异构酶的可溶性表达量,但改善程度仍然有限[16-18]。此外,通过优化诱导表达条件,如调整诱导剂的加入量、改变诱导温度在很多情况下对目的蛋白质在大肠杆菌中可溶性表达的提高有限,而关于蛋白质折叠的研究为提高重组蛋白质的可溶性表达提供了新思路,研究表明不同分子伴侣可以在目的蛋白质多肽链翻译后的各个阶段发挥作用,通过不同机制促进目的蛋白质正确折叠从而提高其可溶性表达水平,如通过共表达分子伴侣质粒 pGro7 使核糖核酸外切酶 R 的可溶性表达量提高了 54.50%[19]。通过比较 4 种分子伴侣质粒 pG-KJE8、pGro7、pG-Tf2、pTf16 对牛支原体膜蛋白 M1 的截断片段在大肠杆菌中表达的影响,发现分子伴侣质粒 pG-KJE8 和 pG-Tf2 能显著提高 M1 截短片段的可溶性表达[20]。目前,关于蔗糖异构酶异源高效

可溶性表达的研究工作较少,尤其是缺少利用分子伴侣共表达策略调控其可溶性表达的研究工作。

在作者前期工作中，已分离到了 *Klebsiella* sp. LX3 菌株,该菌株生产的蔗糖异构酶具有很高的蔗糖转化率(99.5%),其转化蔗糖的主产物为异麦芽酮糖,具有潜在的工业应用价值[11,16]。尽管前期工作中对该菌株表达的蔗糖异构酶通过融合 GST 标签在一定程度上改善了 SIase 的可溶性表达量，但改善程度有限,并且后续纯化需要蛋白酶切除标签和凝胶过滤层析得到纯酶[16]。同时,其他文献中也报道了多种不同来源的蔗糖异构酶可溶性表达水平较低,主要以包涵体形式表达[14-15]。因此,为了提高蔗糖异构酶的异源表达水平，作者以源自 *Klebsiella* sp.LX3 的 SIase 为研究对象，构建重组表达载体 pET-24b-*SIase*,转入大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)中进行表达，进一步将 4 种分子伴侣质粒(pKJE7、pGro7、pG-Tf2、pTf16)分别与基因 *SIase* 在大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)中共表达,通过辅助蛋白质正确折叠减少包涵体产生并促进 SIase 可溶性表达。进一步将筛选所得含有最佳分子伴侣的工程菌进行培养，利用金属离子螯合层析技术纯化可溶性 SIase，并进行酶学性质表征和产物特异性分析,从而为规模化制备 SIase 的应用基础研究提供参考,为 SIase 在工业上的大规模应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株 *E.coli* BL21(DE3)、*E.coli* DH10B、质粒 pET-28a-*SIase*:作者所在实验室保藏;卡那霉素、氯霉素、*L*-阿拉伯糖、四环素、异丙基-*β*-*D*-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-*D*-thiogalactopyranoside,IPTG)、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、Ni-NTA 6FF 琼脂糖纯化树脂、咪唑、BCA 蛋白质定量检测试剂盒:生工生物工程（上海）股份有限公司产品；分子伴侣质粒(pKJE7、pGro7、pG-Tf2、pTf16)、DNA 和蛋白质相对分子质量标准品、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase:宝生物工程（大连）有限公司产品；异麦芽酮糖:Sigma 公司产品;其他化学试剂:天津市科密欧化学试剂有限公司产品。

LB 液体培养基:10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母粉、10 g/L NaCl,pH 7.2;LB 固体培养基为在 LB 液体培养基中加入 15 g/L 琼脂;LLB 培养基:10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母粉、5 g/L NaCl,pH 7.2。Buffer A 缓冲液:0.5 mol/L 氯化钠、50 mmol/L 磷酸二氢钠-氢氧化钠,pH 8.0;Buffer B 缓冲液:0.5 mol/L 氯化钠、50 mmol/L 磷酸二氢钠-氢氧化钠、0.03 mol/L 咪唑,pH 8.0;Buffer C 缓冲液:0.5 mol/L 氯化钠、50 mmol/L 磷酸二氢钠-氢氧化钠、0.05 mol/L 咪唑,pH 8.0;Buffer D 缓冲液:0.5 mol/L 氯化钠、50 mmol/L 磷酸二氢钠-氢氧化钠、0.10 mol/L 咪唑,pH 8.0;Buffer E 缓冲液:0.5 mol/L 氯化钠、50 mmol/L 磷酸二氢钠-氢氧化钠、0.20 mol/L 咪唑,pH 8.0。

1.2 仪器与设备

Milli-Q 超纯水过滤系统:美国密理博 Millipore 公司产品;HITACHI-CR21GⅢ超速冷冻离心机:日立(中国)有限公司产品;TGL-16 高速台式冷冻离心机:湘仪离心机仪器有限公司产品;通用型垂直电泳仪：上海生工生物科技有限公司产品;Infinite F50 酶标仪：瑞士帝肯 Tecan 公司产品;PCR 仪、电转仪:德国 Eppendorf 公司产品;NanoVue Plus 超微量紫外分光光度计、ImageQuant LAS4000 凝胶成像分析系统:美国通用电气(中国)有限公司产品;高效液相色谱分析仪（Agilent Technologies 1260 Infinity):美国安捷伦科技公司产品;超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;紫外分光光度计:上海元析仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 SIase 表达工程菌的构建 为了便于重组 SIase 的分离纯化,并且尽可能减少在 SIase 中引入额外的氨基酸残基,作者以所在课题组前期构建的携带源自 *Klebsiella* sp.LX3 的 *SIase* 基因的质粒 pET-28a-*SIase* 为模板（*SIase* 基因存在于 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点之间），通过 PCR 扩增和酶切连接技术将 *SIase* 基因扩增并插入到 pET-24b 载体的 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点之间,从而在 SIase 的 C 端引入组氨酸标签,并且 N 端不会引入多余的氨基酸残基。首先设计引物进行 PCR 扩增含酶切位点的 *SIase* 基因片段。上游引物 F:5′-GAGTGATC CATATGGCACCATCCTTGAATCAGGATATTCACG-3′,下游引物 R:5′-CTACTGCTCGAGCCGCAGCTTA TACACACCTGCC-3′，其中下划线标识分别为限制性核酸内切酶QuickCut™ *Nde* Ⅰ和 QuickCut™ *Xho* Ⅰ的识别位点。PCR 反应体系为:5×Prime STAR® HS

Buffer 10 μL,DNTP 4 μL,上游引物 2 μL,下游引物 2 μL,模板质粒加入 2 μL,PrimeSTAR® HS Polymerase 0.5 μL,灭菌双蒸水补至 50 μL。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒进行回收。将回收得到的 PCR 产物和 pET-24b 载体用 QuickCut™ *Nde* I 和 QuickCut™ *Xho* I 进行双酶切。酶切反应体系为 PCR 胶回收产物 1 000 ng,10× Green Buffer 2 μL,QuickCut™ *Nde* I 和 QuickCut™ *Xho* I 各 1 μL,灭菌双蒸水补至 20 μL,质粒载体 1 000 ng,10×Green Buffer 2 μL,QuickCut™ *Nde* I 和 QuickCut™ *Xho* I 各 1 μL,灭菌双蒸水补至 20 μL;酶切反应条件为 37 ℃反应 30 min。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离后利用 DNA 胶回收试剂盒回收线性化载体质粒和目的基因片段,继续用连接酶进行连接反应。将连接产物热转化至 *E.coli* DH10B 感受态细胞,涂布于含终质量浓度为 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板上。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定,筛选到的阳性单克隆送吉林省库美生物科技有限公司进行测序,测序正确的重组质粒命名为 pET-24b-*SIase*,将其转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中得到工程菌。

1.3.2 分子伴侣与 SIase 共表达工程菌的构建 分别将 4 种分子伴侣质粒 pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16(见表 1)转入 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中,利用含有终质量浓度为 30 μg/mL 氯霉素的平板筛选阳性克隆,并且再次将含有分子伴侣的重组菌制备成感受态细胞,转入 pET-24b-*SIase* 质粒,涂布于含有氯霉素和卡那霉素的平板进行筛选,得到同时含有分子伴侣质粒和 pET-24b-*SIase* 质粒的工程菌。

表 1 携带分子伴侣质粒信息

Table 1 Information of plasmids harboring different molecular chaperons

质粒	伴侣蛋白	启动子	诱导剂	抗性
pGro7	GroES-GroEL	araB	*L*-Arabinose	Cm
pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	araB	*L*-Arabinose	Cm
pG-Tf2	GroES-GroEL-Tig	Pzt-1	Tetracyclin	Cm
pTf16	Tig	araB	*L*-Arabinose	Cm

1.3.3 SIase 的诱导表达 挑取含有 *SIase* 基因的阳性单克隆接种于 5 mL 含终质量浓度为 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 培养 14 h 得到种子液。将种子液以 1%(体积分数)比例转入含 50 μg/mL 卡那霉素的 LLB 液体培养基中进行扩大培养,37 ℃、200 r/min 培养至菌体 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,在 16 ℃、200 r/min 条件下培养 20 h 进行诱导表达。共表达工程菌需要进行分子伴侣与 SIase 的分别诱导,首先挑取共表达工程菌的阳性单克隆接种于 5 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素和 30 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中,于 37 ℃、200 r/min 培养 14 h 得到种子液。将种子液以 1%(体积分数)比例转入含 50 μg/mL 卡那霉素和 30 μg/mL 氯霉素的 LLB 液体培养基中,同时加入诱导剂 10 μg/mL 的四环素(pG-Tf2)或 500 μg/mL *L*-阿拉伯糖(pGro7、pKJE7、pTf16)以诱导分子伴侣表达,继续在 37 ℃、200 r/min 培养至菌体 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,在 16 ℃、200 r/min 条件下培养 20 h 进行诱导表达。将未进行和进行了共表达的工程菌分别于 8 000 r/min、5 min 条件下离心收集菌体细胞,加入 Buffer A 缓冲液重悬,在冰水浴中超声破碎(功率 500 W,破碎 5 s,间隔 3 s,破碎 30 min),10 000 r/min 离心 15 min 分离可溶性上清液和沉淀组分,之后取 20 μL 可溶性上清液与 5 μL 5×上样缓冲液混合,将破碎后沉淀用 Buffer A 缓冲液重悬后取 20 μL 与 5 μL 5×上样缓冲液混合,上述样品经沸水处理 5 min 后分别吸取 10 μL 上清液样品和 5 μL 沉淀样品加至胶孔中进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.4 重组 SIase 的分离纯化 将筛选到含最佳分子伴侣质粒的工程菌进行诱导表达,于 8 000 r/min、5 min 条件下离心收集菌体细胞,加入 Buffer A 缓冲液重悬,在冰水浴中超声破碎(功率 500 W,破碎 5 s,间隔 3 s,破碎 30 min),10 000 r/min 离心 15 min 分离可溶性上清液和沉淀组分。由于重组 SIase 的 C 端带有组氨酸标签,因此利用金属离子螯合层析法进行纯化。将可溶性上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后与提前用 Buffer A 缓冲液平衡的 Ni-NTA 6FF 琼脂糖纯化树脂结合,流量为 1 mL/min。之后分别用 10 倍柱体积的 Buffer A 缓冲液、Buffer B 和 Buffer C 缓冲液进行洗杂。最后利用 Buffer D 和 Buffer E 洗脱目的蛋白质。将纯化得到的不同组分取 20 μL 与 5 μL 5×上样缓冲液混合,经沸水处理 5 min 后分别吸取 10 μL 进行 SDS-PAGE 检测,纯化得到的目的蛋白质 SIase 经透析处理后进行蛋白

质浓度测定和酶学性质表征。蛋白质浓度采用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒测定。

1.3.5 SIase 酶活力的测定 100 μL SIase(0.08 mg/mL)的酶液与 400 μL 含 40 g/L 蔗糖的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L ,pH 6.0)混匀,于特定温度下水浴反应 15 min,之后将样品经 100 ℃沸水处理 15 min 终止反应。将含有反应产物的混合物于 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后利用 HPLC 进行检测。色谱柱为 Hypersil APS-2 氨基柱,流动相为含有 80%(体积分数)乙腈的水溶液,流量为 1.0 mL/min。酶活力单位的定义:以蔗糖为底物,每分钟释放 1 μmoL 异麦芽酮糖所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.3.6 温度对 SIase 酶活力的影响 取 100 μL 含 0.08 mg/mL SIase 的酶液与 400 μL 含 40 g/L 蔗糖的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L,pH 6.0)混匀。分别在 20、25、30、35、40、45、50、55、60 ℃水浴反应 15 min,之后经灭酶处理后利用 HPLC 检测反应产物中的异麦芽酮糖并进一步计算酶活力。相对酶活力定义为以测定的最高酶活力为 100%计算所得比值为相对酶活力。

1.3.7 pH 对 SIase 酶活力的影响 取 100 μL 含 0.08 mg/mL SIase 的酶液分别与 400 μL 含 40 g/L 蔗糖的 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混匀。在最适温度条件下水浴反应 15 min,之后经灭酶处理后利用 HPLC 检测反应产物中的异麦芽酮糖并进一步计算酶活力。相对酶活力定义为以测定的最高酶活力为 100%计算所得比值为相对酶活力。

1.3.8 SIase 的动力学参数测定 分别以不同浓度的蔗糖溶液(8、16、32、40、80、160、200、320、400、640 mmol/L)为底物进行蔗糖异构酶活力的测定。反应条件为:最适温度和最适 pH 反应条件下,水浴反应 15 min。反应结束后将样品经 100 ℃沸水灭酶 15 min,将离心得到的上清液经 0.22 μm 滤膜处理后进行 HPLC 检测分析。利用 GraphPad Prism5.0 基于 Michaelis-Menten 方程进行非线性拟合得到动力学参数 K_m、V_{max},计算得到 k_{cat}、k_{cat}/K_m。

1.3.9 SIase 的产物特异性分析 取 100 μL 含 0.08 mg/mL SIase 的酶液与 400 μL 含 40 g/L 蔗糖的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L,pH 6.0)混匀,分别在 30、35、40 ℃下水浴 12 h 进行转化反应,之后将反应样品经 100 ℃沸水灭酶处理,10 000 r/min 离心 15 min 得到的上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,之后进行 HPLC 检测。

2 结果与分析

2.1 SIase 在 *E.coli* BL21(DE3)中的重组表达

首先以作者所在实验室保存携带 *SIase* 基因的 pET-28a 表达载体为模板,利用 PCR 技术扩增得到含酶切位点的 *SIase* 基因,与 pET-24b 载体质粒用 QμickCut™ *Nde* I 和 QμickCut™ *Xho* I 双酶切分别获得有黏性末端的 *SIase* 基因片段和线性化载体质粒,之后用 T4 DNA 连接酶进行连接反应并转化进入 *E.coli* DH10B 感受态细胞,利用终质量浓度为 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板筛选得到单菌落用于菌落 PCR 鉴定。利用 pET 系列载体的 T7 通用引物进行菌落 PCR 鉴定,如图 1 所示,结果显示 PCR 产物在 1 500~2 250 bp 处存在单一条带,与 pET-24b-*SIase* 预期扩增条带 1 896 bp 位置一致,表明其为阳性克隆。将验证正确的菌液送吉林省库美生物科技有限公司进行基因测序和进一步比对,表明 pET-24b-*SIase* 表达载体构建成功。



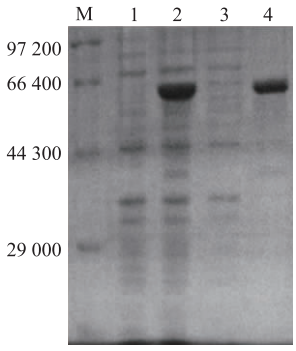
1:pET-24b-*SIase*;M:DNA Marker。

图 1 转化重组质粒工程菌的菌落 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR amplification for identification of gene engineering bacteria transformed with recombinant plasmid

将重组质粒 pET-24b-*SIase* 转化至 *E.coli* BL21(DE3)中获得工程菌,对重组工程菌在 16 ℃、诱导剂 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 条件下诱导表达 20 h。收集菌体经超声破碎后通过离心分离获得可溶性目的蛋白质上清液和不溶性沉淀,利用 SDS-PAGE 进行检测。如图 2 所示,经诱导后在约 66 400

处出现与 SIase 理论相对分子质量 68 140 相符的目的条带，这与源自 *P. dispersa* UQ68J、*K. pneumoniae* NK33 -98 -8、*E. rhapontici* NX -5、*S. plymuthica* AS9 的蔗糖异构酶在大肠杆菌中异源表达的相对分子质量相近[10,12-13,21]。并且 SIase 主要以包涵体形式存在于不溶性沉淀组分中，表明利用原核表达系统对 SIase 进行异源可溶性表达存在一定困难。



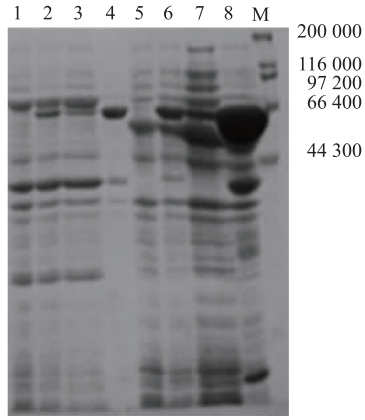
M：蛋白质 Marker；1~4：*E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase* 诱导前全菌、诱导后全菌、破碎后上清液、破碎后沉淀。

图 2　重组 SIase 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2　Analysis of recombinant proteins of SIase by SDS-PAGE

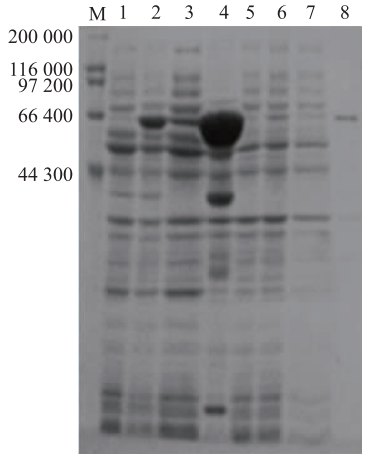
2.2　不同分子伴侣对 SIase 可溶性表达的影响

分子伴侣能分别或通过协同作用参与蛋白质的折叠过程，有利于促进蛋白质正确折叠和可溶性表达[22-23]。为提高 SIase 的异源可溶性表达水平，通过引入不同分子伴侣质粒实现不同分子伴侣与 SIase 的共表达，以探究利用分子伴侣共表达策略提高 SIase 可溶性表达的可行性。将重组质粒 pET-24b-*SIase* 分别转化至含有 4 种不同分子伴侣质粒的 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞中，构建出含有分子伴侣质粒(pGro7、pKJE7、pG-Tf2、pTf16)的共表达工程菌 *E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase*，进一步发酵培养并利用诱导剂 *L*-阿拉伯糖或四环素和 IPTG 诱导表达，收集菌体经超声破碎后获得上清液和不溶性沉淀，利用 SDS-PAGE 进行检测。结果如图 3 所示，含有分子伴侣质粒 pGro7 和 pG-Tf2 的菌体破碎上清液中，可溶性 SIase 的含量明显提高，其中共表达分子伴侣质粒 pGro7 改善效果最好。因此，结果表明利用共表达分子伴侣策略能促进 SIase 的可溶性表达，并且筛选到最佳分子伴侣质粒 pGro7，摇瓶发酵酶活力为 14.8 U/mL，相比未进行共表达的工程菌发酵酶活力 3.5 U/mL 有明显提高，并且与已报道 *Erwinia rhapontici* NX-5 菌株发酵酶活力 1.3 U/mL 和 *Erwinia* sp. D12 经培养基优化的发酵酶活力 10.84 U/mL 有一定程度的提高，与优化发酵后的 *Klebsiella* sp.LX3 的发酵酶活力为 15.12 U/mL 相近，从而为进一步系统优化发酵条件打下了基础[10-11,22]。目前大肠杆菌中主要存在 3 种分子伴侣组，其中 DnaK-DnaJ-GrpE 和 TF 因子在新生肽链的早期折叠阶段保护其免于错误折叠和聚集，GroES-GroEL 主要协助部分折叠的多肽链克服折



M：蛋白质 Marker；1~4：*E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase*/pKJE7诱导前全菌、诱导后全菌、破碎后上清液、破碎后沉淀；5~8：*E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase*/pGro7诱导前全菌、诱导后全菌、破碎后上清液、破碎后沉淀。

(a)



M：蛋白质Marker；1~4：*E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase*/pG-Tf2诱导前全菌、诱导后全菌、破碎后上清液、破碎后沉淀；5~8：*E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase*/pTf16诱导前全菌、诱导后全菌、破碎后上清液、破碎后沉淀。

(b)

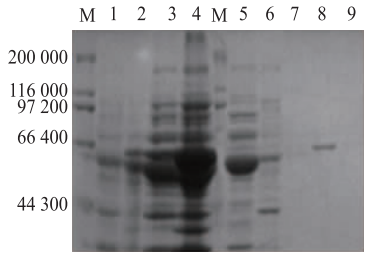
图 3　分子伴侣与 SIase 共表达工程菌的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of engineered bacteria co-expressing molecular chaperones and SIase

叠动力学屏障[23-24]。同时,pG-Tf2 分子伴侣组除表达 GroES、GroEL 外还表达 TF 因子，但相比 pGro7 并未产生更好的效果。因此,结果表明影响 SIase 正确折叠和可溶性表达的关键在于部分折叠的多肽链跨越动力学屏障存在困难,这为后续进一步提高 SIase 的异源可溶性表达提供了研究思路。

2.3 重组 SIase 的分离纯化和酶学性质

由于重组 SIase 的 C 端带有组氨酸标签，因此利用 Ni-NTA 6FF 琼脂糖纯化树脂对含有分子伴侣质粒 pGro7 的 *E.coli* BL21(DE3)/pET-24b-*SIase* 工程菌细胞破碎上清液中的重组 SIase 进行纯化,结果如图 4 所示,利用含有 30、50 mmol/L 的咪唑的缓冲液有效除去了杂蛋白质,并且利用含 100 mmol/L 咪唑的缓冲液成功纯化到 SIase。本研究中采用分子伴侣共表达策略有效提高了 SIase 的可溶性表达水平,从而实现了用金属离子螯合层析法一步纯化到纯酶，而已报道研究中采用融合 GST 标签改善 SIase 的可溶性表达,后续纯化需要蛋白酶切除标签和凝胶过滤层析才能得到纯酶[16]。因此,本研究中在提高 SIase 可溶性表达的同时简化了其分离纯化步骤,为针对 SIase 的基础研究提供了更加简便的方法。



M：蛋白质 Marker;1~4:*E.coli* BL21 (DE3)/pET-24b-*SIase*/pGro7 诱导前全菌、诱导后全菌、破碎后上清液、破碎后沉淀;5~9:流穿液,30、50、100、200 mmol/L 咪唑洗脱样。

图 4 SIase 纯化的 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis results of SIase purification

将重组 SIase 纯酶透析后进行酶学性质表征。通过检测 SIase 在 20~60 ℃的酶活力以确定最适温度。结果如图 5 所示,SIase 在 20~40 ℃下酶活力随温度的升高而增加,在 40 ℃表现出最高酶活力,其中在 30~50 ℃下具有超过 70%的相对酶活力,高于 50 ℃后酶活力迅速下降,这一性质与已报道重组蔗糖异构酶的最适温度主要在 30~50 ℃相似[10,12]。

测定了在 pH 4.0~8.0 的酶活力,结果如图 6 所示，在 pH 5.0~6.5 时 SIase 具有 80%以上的相对酶活力,其中在 pH 6.0 时具有最高酶活力,而 pH 低于 5.0 和高于 6.5 时,酶活力迅速降低。在最适反应条件下测定 SIase 的比活力为(317.6±15.6) U/mg。

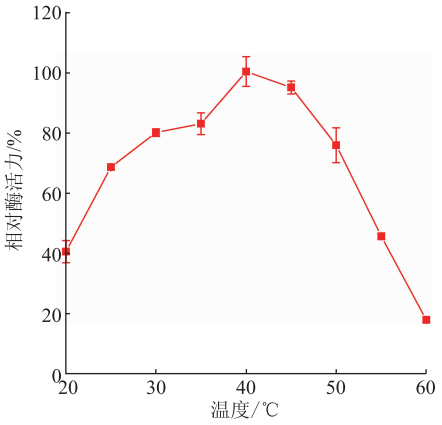


图 5 温度对 SIase 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on enzymatic activity of SIase

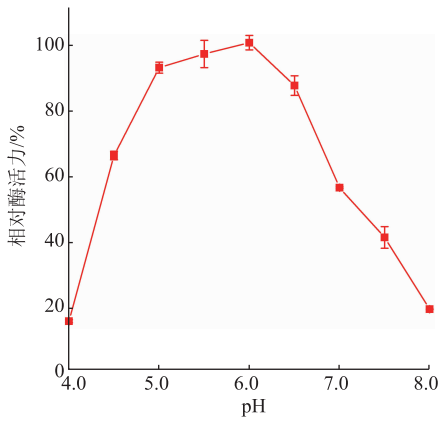


图 6 pH 对 SIase 酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH on enzymatic activity of SIase

在最适反应条件下测定重组 SIase 对不同浓度底物蔗糖的催化反应初速度，基于 Michaelis-Menten 方程进行非线性拟合得到动力学参数。结果如表 2 所示，重组 SIase 对底物蔗糖的 K_m 为(179.10±20.65) mmol/L、V_{max} 为 (13 497.0±620.7) μmol/(L·min)、k_{cat} 为 (974.4±129.0) s^{-1},k_{cat}/K_m 为(5.44±0.72) L/(mmol·s)。

表 2 SIase 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of SIase

名称	K_m/(mmol/L)	V_{max}/(μmol/(L·min))	k_{cat}/s^{-1}	(k_{cat}/K_m)/(L/(mmol·s))
SIase	179.10±20.65	13 497.0±620.7	974.4±129.0	5.44±0.72

2.4 重组 SIase 的产物特异性分析

采用 HPLC 检测了重组 SIase 的蔗糖转化率为 98%,与文献报道不同来源的蔗糖异构酶的蔗糖转化率(99.0%~99.7%)相近[10-11,25],对 30、35、40 ℃下 SIase 转化蔗糖的反应产物中不同糖组分的含量进行检测,并计算产物中各组分相对含量,结果如表 3 所示。随着温度提高,重组 SIase 转化产物中异麦芽酮糖和海藻酮糖比例下降,单糖比例提高,与已报道的重组 SIase 表现出类似的随温度提高的产物组成变化[16,21]。

表 3 不同温度下 SIase 催化糖产物组分的分析

Table 3 Analysis of the catalytic products compositions of sucrose isomerase at different temperatures

名称	不同温度下产物中各组分相对含量/%		
	30 ℃	35 ℃	40 ℃
异麦芽酮糖	62.00±0.64	61.03±0.26	57.52±0.30
海藻酮糖	32.81±0.51	30.36±0.17	29.23±0.07
葡萄糖+果糖	5.19±0.14	8.61±0.09	13.24±0.25

3 结 语

作者将源自 *Klebsiella* sp. LX3 的 SIase 在大肠杆菌中进行异源表达,针对其主要以包涵体表达的问题,通过比较 4 种不同分子伴侣共表达系统对重组 SIase 可溶性表达的影响,筛选到最佳分子伴侣质粒 pGro7,并以此为基础利用金属离子螯合层析技术纯化到了 SIase 纯酶。重组 SIase 转化蔗糖的主产物为异麦芽酮糖,其最适温度为 40 ℃、最适 pH 为 6.0。动力学参数 K_m 为(179.10±20.65) mmol/L、V_{max} 为(13 497.0 ±620.7) μmol/(L·min)、k_{cat} 为(974.4±129.0) s^{-1}、k_{cat}/K_m 为(5.44±0.72) L/(mmol·s)。综上,作者利用分子伴侣共表达策略提高了 SIase 的异源可溶性表达水平,为针对其高效表达的进一步研究工作提供了必要的理论基础和实验依据。但需要注意的是,蔗糖异构酶作为一种食品酶制剂,在大肠杆菌中表达存在一定安全隐患,因此后续工作可以参考本研究中采用的分子伴侣共表达策略,利用食品安全级微生物构建高效异源表达系统,促进蔗糖异构酶在食品工业中的规模化制备和应用。

参考文献:

[1] LIU L,BILAL M,LUO H,et al. Studies on biological production of isomaltulose using sucrose isomerase:current status and future perspectives[J]. **Catalysis Letters**,2021,151(7):1868-1881.

[2] LINA B A R,JONKER D,KOZIANOWSKI G. Isomaltulose (palatinose):a review of biological and toxicological studies[J]. **Food and Chemical Toxicology**,2002,40(10):1375-1381.

[3] ROGER P A,FREDERIC D,EMMANUEL O A,et al. Industrial manufacture of sugar-free chocolates:applicability of alternative sweeteners and carbohydrate polymers as raw materials in product development[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2013,32(2):84-96.

[4] 滕菲,肖华,王宁鹤,等. 蔗糖异构酶突变菌株的构建及其应用研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(17):143-147.

[5] 尤新. 异麦芽酮糖(帕拉金糖)的功能与应用[J]. 食品工业科技,2013,34(23):44-46.

[6] LICHTENTHALER F W,SIEGFRIED P. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry[J]. **Comptes Rendus Chimie**,2004,7(2):65-90.

[7] 耿梦华,陈晟,吴敬,等. 吸附交联法固定化蔗糖异构酶及其在异麦芽酮糖制备中的应用[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(4):104-110.

[8] 唐文竹,陈放,李宪臻. 蔗糖异构酶催化生产异麦芽酮糖研究进展[J]. 微生物学通报,2012,39(9):1314-1322.

[9] MU W,LI W,WANG X,et al. Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2014,98(15):6569-6582.

[10] LI S,CAI H,QING Y,et al. Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for isomaltulose hyperproduction[J]. **Applied Biochemistry & Biotechnology**,2011,163(1):52-63.

[11] LI X,ZHAO C,AN Q,et al. Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2010,95(3):521-527.

[12] DUAN X,CHENG S,AI Y,et al. Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed

mutagenesis[J]. **The Public Library of Science One**,2016,11(2):1-16.
[13] WU L G,BIRCH R G. Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2005,71(3):1581-1590.
[14] ZHANG F,CHENG F,JIA D X,et al. Characterization of a recombinant sucrose isomerase and its application to enzymatic production of isomaltulose[J]. **Biotechnology Letters**,2020,42:1-9.
[15] ZHANG P,WANG Z P,LIU S,et al. Overexpression of secreted sucrose isomerase in *Yarrowia lipolytica* and its application in isomaltulose production after immobilization[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2018,121:97-103.
[16] ZHANG D,LI X,ZHANG L H. Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3:gene cloning and characterization and engineering of thermostability[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2002,68(6):2676-2682.
[17] 刘军彤,吴敬,陈晟. 分散泛菌蔗糖异构酶在大肠杆菌中的表达及发酵优化[J]. 生物工程学报,2016,32(8):1070-1080.
[18] 程胜,段绪果,吴敬. 重组蔗糖异构酶的制备及应用条件优化[J]. 食品与发酵工业,2015,41(5):41-47.
[19] 李轲,李站胜,韩双艳. 分子伴侣共表达对核糖核酸酶 R 可溶性表达的影响[J]. 现代食品科技,2019,35(11):93-99.
[20] 王艳芳,周雅坪,张新竹,等. 四种分子伴侣促进牛支原体膜蛋白在大肠杆菌中可溶性表达研究[J]. 中国农业大学学报,2018,23(12):75-83.
[21] AROONNUAL A,NIHIRA T,SEKI T,et al. Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2007,40(5):1221-1227.
[22] KAWAGUTI H Y,BUZZATO M F,SATO H H. Isomaltulose production using free cells:optimisation of a culture medium containing agricultural wastes and conversion in repeated-batch processes[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2007,34(4):261-269.
[23] ELLIS R J. The molecular chaperone concept[J]. **Seminars in Cell Biology**,1990,1(1):1-9.
[24] HARTL F U,HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol:from nascent chain to folded protein[J]. **Science**,2002,295(5561):1852-1858.
[25] KRASTANOV A,YOSHIDA T. Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2003,30(10):593-598.

科　技　信　息

美国 EPA 指定全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)为危险物质

2022 年 9 月 7 日，美国发布 G/TBT/N/USA/1915 号 TBT 通报，根据 1980 年修订的《综合环境反应、赔偿和责任法》(CERCLA),美国国家环境保护局(EPA)提议将全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS),包括其盐类和结构异构体,指定为危险物质。CERCLA 授权颁布法规,将释放到环境中可能对公众健康或福利或环境造成重大危险的元素、化合物、混合物、溶液和物质指定为危险物质,以减少人类对这些永久化学品的接触。

[信息来源]江苏省技术性贸易措施信息平台.美国 EPA 指定全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)为危险物质[EB/OL]. (2022-9-9). http://www.tbtguide.com/c/mypt/gwxw/511913.jhtml