

植物乳杆菌 ST-III 胆盐水解酶的表达及其酶活力分析

任婧¹, 姚晶^{1,2}

(1. 光明乳业研究院 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)ST-III 4种胆盐水解酶(BSHs)的编码序列(*bsh* 1~4), 将其克隆至表达载体 pET-28b(+)上, 在原核系统进行表达, 并对其酶活力进行测定, 结果发现4种BSHs的酶活力分别为29.00、20.49、24.90、21.13 U/mL。同时BSH1比其他3种BSHs表现出更高的水解能力。

关键词: 植物乳杆菌; 胆盐水解酶; 表达; 酶活力

Expression and Activity Analysis of Bile Salt Hydrolases from *Lactobacillus plantarum* ST-III

REN Jing¹, YAO Jing^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technical Center of Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China;
2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In vertebrates, bile salt hydrolysis plays an essential role in fat metabolism. Bile salts are synthesized in the liver. In the small intestine, glycine or taurine are de-conjugated from bile salts by the enzyme bile salt hydrolase (BSH, EC 3.5.1.24) from intestinal microbes, which reduces the serum cholesterol level. In this study, four predicted bile salt hydrolase (*bsh*) genes from *Lactobacillus plantarum* ST-III were cloned into pET-28b(+) vector and expressed in *Escherichia coli*. The hydrolysis activity of these enzymes was 29.00, 20.49, 24.90 U/mL and 21.13 U/mL, respectively.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; bile salt hydrolase; expression; enzyme activity

中图分类号: Q939.117

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0165-04

目前, 高血压、冠心病等心血管疾病已成为人类的“头号杀手”, 血清中高水平的胆固醇则是诱发心血管疾病的重要因素^[1]。大量研究发现, 经常食用某些含有益生菌(主要是乳酸菌)的发酵制品有助于血清胆固醇含量的降低^[2]。这些食物中都含有一种有效降低胆固醇含量的酶——胆盐水解酶。胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH, EC 3.5.1.24)是微生物生长、繁殖过程中产生的一种代谢物, 它能够水解结合态牛磺胆酸盐和甘氨酸胆酸盐, 将其转变成氨基酸和游离胆酸, 从而能够有效降低血清中胆固醇的含量。经BSH酶作用后产生的去结合型胆盐比结合型胆盐重吸收效率低, 导致大量的去结合型胆盐从粪便中排出, 使体内需要消耗更多的胆固醇, 重新合成胆酸盐来弥补损失, 从而逐步使血清胆固醇水平降低^[3-4]。正因为如此, 对于能够产BSHs微生物尤其是乳酸菌, 使得人们不断的深入研究^[5-7]。本实验利用分子生物学实验技术, 克隆植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)ST-III 4种BSHs的编码片段, 并在原核系统

进行表达, 以期为进一步研究此株益生菌的BSHs生物学性质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与试剂

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) ST-III、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top 10、BL21(DE3)为本实验室保存; 质粒 pET-28b(+) 德国 Novagen 公司; 质粒 pMD19-T 日本 TaKaRa 公司。

Probest DNA 聚合酶、T4 连接酶、相关限制性内切酶以及 DNA Marker 日本 TaKaRa 公司; 胆盐 美国 Sigma 公司; 抗生素、蛋白质 Marker、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、质粒小提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司; SDS-PAGE 试剂盒 上海迪生生物公司; 甲醇、TC 为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2011-09-03

基金项目: 国家“973”计划项目(2010CB735705); 上海市科学技术委员会科研计划项目(09DZ2251400)

作者简介: 任婧(1980—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为乳酸菌分子生物学。E-mail: renjing@brightdairy.com

1.2 仪器与设备

凝胶成像仪 美国 Bio-Rad 公司; 600 HPLC 仪、在线脱气仪、2996 紫外检测器、Novopak C₁₈ 柱(3.9mm × 150mm, 4 μm) 美国 Waters 公司。

1.3 *bsh* 片段的扩增

参照 4 种 *bsh* 的 CDS 序列(GeneBank 登录号分别为: NP_786739、NP_783921、NP_786598、AL935259), 设计 PCR 引物分别为: F1: G GAA TTC CAT ATG ATG TGT ACT GCC ATA ACT TAT C; R1: CCG CTC GAG TTA GTT AAC TGC ATA GTA TTG TG; F2: G GAA TTC CAT ATG ATG TGC ACT AGT CTA ACT TAT ACA AA; R2: CCG CTC GAG TTA ATG GGC CGC TGG CAA; F3: G GAA TTC CAT ATG ATG TGT ACT AGT TTA ACG ATT CA; R3: CCG CTC GAG TTA GTT TGC TAA CCG GAA C; F4: G GAA TTC CAT ATG ATG TGT ACC AGC TTA ACT TAT CTT G; R4: CCG CTC GAG TCA ATC GGC AGG AAA GAG GT, 均由美国 Invitrogen 生命技术公司合成。PCR 体系为: 模板 1 μL, 上下游引物各 0.5 μL, dNTP Mix 2 μL 10 × PCR buffer 2.5 μL, ddH₂O 18.2 μL。PCR 条件为: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 90s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带。

1.4 重组表达质粒 pET-28-*bsh* 的构建

建立连接体系, 将已纯化的目的基因片段在 T4 连接酶的作用下连接至 pMD19-T 载体上, 连接体系、连接条件参考 T4 连接酶说明书。采用 CaCl₂ 法制备感受态细胞, 并进行转化。通过蓝白斑筛选阳性克隆, 并进行 PCR 鉴定及测序鉴定, 测序工作由美国 Invitrogen 生命技术公司完成。抽提含有正确 CDS 的重组质粒 pMD 19-*bsh*, 与表达质粒 pET-28b(+)进行双酶切, 酶切体系参照限制性内切酶说明书, 回收纯化酶切产物, 进行过夜连接。连接产物转化至 *E. coli* Top 10 中, 涂布于含有硫酸卡那霉素的 LB 平板上 37℃ 培养 16h, 筛选阳性克隆并进行鉴定。

1.5 目的蛋白的诱导表达与酶活测定

取鉴定为正确克隆的过夜培养液, 接种至 200mL 硫酸卡那霉素终浓度为 100 μg/mL 的 LB 培养基中, 接种量为 2%, 培养温度 37℃, 摇床振荡速率为 200r/min, 恒温培养至 OD_{600nm} 为 0.5~0.6, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 1mmol/L 继续诱导培养 2h, 4000r/min 离心 20min, 收集上清, 按上清液与甲醇体积比 2:1 加入甲醇, 4℃ 放置 1h, 然后 4℃、10000r/min 离心 15min, 将沉淀溶解于 1mL 50mmol/L NaAc、1mmol/L EDTA 的缓冲液中。用 SDS-PAGE 法定性检测目的蛋白; 在等量样品与定量的结合胆盐为反应底物, 以结合胆盐的减少量为酶活力

指标, 37℃ 水浴 30min, 加入 500 μL 流动相以终止反应, 0.45 μm 膜过滤后, 通过高效液相色谱法, 测定反应液中结合胆盐的剩余量, 通过计算得出粗酶液中 BSH 的酶活力^[8]。酶活力单位定义如下: 37℃、pH5.4、1min 内转化 1nmol 底物的酶量为一个酶活单位(U)。酶活力计算公式如下:

$$\text{酶活力}/(\text{U/mL}) = \frac{a-b}{a \times \text{酶液体积/mL}} \times \text{底物物质的量} \times \frac{1}{30}$$

式中: a 为空白对照组峰面积除以溶剂峰面积的百分比; b 为样品组峰面积除以溶剂峰面积的百分比。

其中目的蛋白含量采用 Bradford 法^[9]测定。HPLC 色谱条件: 流动相: 甲醇与水体积比 60:40, 流动相流速为 1.0mL/min, 紫外检测波长 205nm, 进样量 15 μL。峰面积用 Millennium 32 软件计算。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的 PCR 筛选及酶切鉴定

挑取转化了重组质粒 pET-28-*bsh* 的大肠杆菌单菌落过夜培养, 并以其菌液作为扩增模板, 进行 PCR 鉴定, PCR 产物片段约 1kb, 与目的片段大小相符, 如图 1 所示, 经酶切鉴定及测序结果比对, 证明连接片段正确, 即成功构建了表达载体 pET-28-*bsh* 1~4。

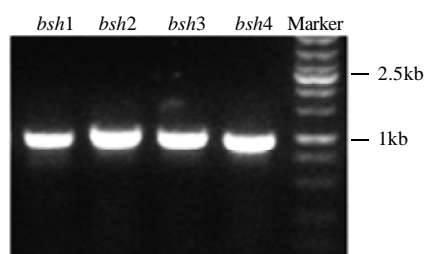
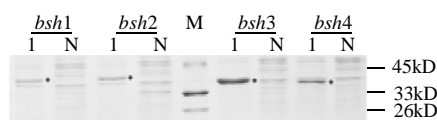


图 1 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of recombinant plasmid

2.2 目的蛋白的诱导表达



1. 诱导表达; N. 空白对照; M. 标准蛋白 Marker。

图 2 目的蛋白的可溶性表达

Fig.2 Detection of BSH expression in *E. coli*

表达菌株在 37℃ 的温度条件下经 IPTG 诱导 2h, 离心收集上清, 再经 1h 醇沉, 并用 1mL 缓冲液溶解沉淀, 即为粗酶液。取相同量的粗酶液进行 SDS-PAGE 检测,

结果如图2所示,在约36kD处出现了诱导表达的蛋白条带,与文献[10]报道大小相符,证明目的基因在宿主菌中成功表达,并分泌至胞外,其中**bsh3**编码的蛋白BSH3的表达量较高,**bsh4**编码蛋白BSH4次之。

2.3 目的蛋白的酶活力

将所提取的粗酶液,在保证与空白对照蛋白含量相同的情况下分别加入至含有结合胆盐底物的反应体系中进行底物特异性反应,反应结束后,利用HPLC对各胆盐底物的减少量进行测定,如图3所示。通过计算,得出4种BSH1~4的酶活力分别为29.00、20.49、24.90、21.13U/mL。可以看出,BSH1比其他3种BSHs表现出更高的水解能力。

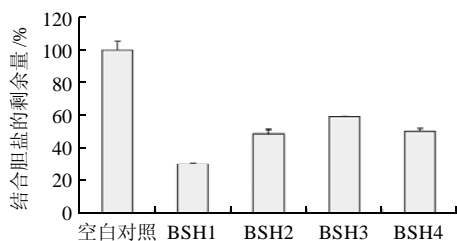


图3 4种BSHs的胆盐水解能力

Fig.3 Bile salt hydrolysis activity of the four BSHs

2.4 蛋白结构分析

STIII BSH1	(1)	NCIALITQSYN--NYFGNFTVISTYNEVNTITP--KYRLMFRKVENL	50
STIII BSH2	(1)	NCISLTITVNSHGQHLARNDVDFETRINMPE--HYRSTGLDGMFT	
STIII BSH3	(1)	NCISLTITVNSHGQHLARNDVDFETRINMPE--HYRSTGLDGMFT	
STIII BSH4	(1)	NCISLTITVNSHGQHLARNDVDFETRINMPE--HYRSTGLDGMFT	
Consensus	(1)	NCISLTITVNSHGQHLARNDVDFETRINMPE--HYRSTGLDGMFT	
STIII BSH1	(48)	HYAICITADVES--YPLVYANNECLCICDNEAGYADYKKVD-ADKV	100
STIII BSH2	(49)	TYGFCACGRLEN--HEIFEGVNECVSINNYFENHAIYOPHSDCKI	
STIII BSH3	(51)	HSFVTCGRLEN--GVIFEGVNECVSINNYFENHAIYOPHSDCKI	
STIII BSH4	(50)	QYALCGGRLPDHFKAELHAGGDEGLVCEGLYHAYENATOPQVNOI	
Consensus	(51)	YAIIGAGRLN H IF DGVNE GLSIALYFFGHADY QSNADKI	
STIII BSH1	(95)	NITFELIPILGQFSGVREVKHIGQLNLDNINFSQOL-PLSGLHLVA	150
STIII BSH2	(96)	DLAGEDVAVVGGKITVADLRKRVQVQLISSTAEILN-ETPGLHFIIS	
STIII BSH3	(98)	NLAGHEVLNIGLVNVCSTAEICERIALDVHCAAPLLN-IVVGLHFIIS	
STIII BSH4	(100)	NLTQALHAGCHERDVAAVIADLPVNLVSGSUGDDTGVFGLHFIIS	
Consensus	(101)	NLTQALHAGCHERDVAAVIADLPVNLVSGSUGDDTGVFGLHFIIS	
STIII BSH1	(144)	DRC-ESVLEGVKEGKIYDNPVGLTNPFDYQFNPQNGFALNS--	200
STIII BSH2	(145)	DITGEIVALEPTSGKRLMNPVGLTNPFDYQFNPQNGFALNS--	
STIII BSH3	(147)	DRCSTVLELENDGVHYHNPVGLTNPFDYQFNPQNGFALNS--	
STIII BSH4	(150)	DAH-TSALVPTGCFETAGFVNTNTEVLSHCHORRDNFGLVSNQI	
Consensus	(151)	DRCSTVLELENDGVHYHNPVGLTNPFDYQFNPQNGFALNS--	
STIII BSH1	(191)	TPQNSFSEKVDLSYSGHGLGLGLDLSSTFVRAATKINSLPQTE	250
STIII BSH2	(193)	EPRLNKTINYOPCSGCTGALGLGDDYTSISRTATVLEKHVAOVPAIT	
STIII BSH3	(195)	PHSRQVGDHTVNFPGCTGALGLGDDYTSISRTATVLEKHVAOVPAIT	
STIII BSH4	(199)	TTATROAAQHVICTKCE-----LSSGPIPTDTHIALPRGTPQAP-	
Consensus	(201)	TPSRQAMV DTSFGPGTALGLGDDYTSISRTATVLEKHVAOVPAIT	
STIII BSH1	(241)	SGSVSCFPHILCSVFOCKGLCEVTDGKYEVNITSSCCDNDKGYVYRTYE	300
STIII BSH2	(243)	TDIVNLLCHDNDATIFEGKAVANGCATYFDRSYNDLNNQYALELYE	
STIII BSH3	(245)	AEAVNALSHHNDGVEIKGVKQDNGTPTDPL-GRATDSNNECFATYHCEYA	
STIII BSH4	(242)	QQVPTTRDQDQGLHEDPRHLISHNTHRCCLITLATHEFFIMRT	
Consensus	(251)	SDSVN LFHILNSVEIFPKGAKH NGSHDVT YRSYNDLN TYTN PVE	
STIII BSH1	(291)	N-ECQNSVSDHEHLD-TTELISYVLRSEAQYTVAVN-----	347
STIII BSH2	(293)	NFQVTCQDMDTDELEKQVLELYVLGRTPINQVLTPTDVAATLFAAH-	
STIII BSH3	(295)	D-QTITRVEITPALTMT-AAQTEFELKITQFPLAN-----	
STIII BSH4	(292)	T-GHEQLTITPENATTWRTEYLFAD-----	
Consensus	(301)	N G IQRVSLTPELLT TPIEFPLKST QF LLN	

图4 4种BSHs氨基酸序列比对结果

Fig.4 Alignment of the amino acid sequences of the four BSHs

根据报道^[11],催化胆盐水解需要5个保守的氨基酸

催化位点。通过比对植物乳杆菌这4种BSHs的氨基酸序列,如图4所示。这4种BSHs均含有此5个保守氨基酸催化位点,即第2位的半胱氨酸(cysteine)、18位的精氨酸(arginine)、21位的天冬氨酸(aspartic acid)、175位的天冬酰胺(asparagine)、228位的精氨酸(arginine)。

3 讨论

BSHs通常为肠道内生长微生物的代谢产物,该酶可催化结合胆盐分解为脱结合胆盐和游离氨基酸,由此表现出潜在的降胆固醇效果引起人们广泛的关注。本实验通过采用PCR技术从植物乳杆菌ST-III基因组中扩增出胆盐水解酶相关基因**bsh1**~4,成功构建了高效表达载体pET28b-**bsh1**~4,并在原核表达系统中成功表达出可溶目的蛋白。4种BSHs的表达量有一定差异,其中BSH3的表达量较高,BSH4次之,BSH1和BSH2较少,这可能是由于BSH3较其他3种BSHs具有更特殊的蛋白结构更易于细胞的表达及分泌,或者其宿主菌中**bsh3**基因拷贝数高,所以导致了BSH3的表达量较高。

对于BSH酶活力的测定有多种方法,如放射性同位素法、分光光度法、HPLC法等,而HPLC法由于其“三高一广一快”的特点,即高压、高效、高灵敏度,应用范围广,分析速度快,在进行微量测定时得到广泛的应用^[8,12-13]。通过HPLC法对胆盐剩余量的测定,可以计算出BSHs的酶活力,从中可以发现,4种BSHs均表现一定胆盐水解活性,其中BSH1的酶活力高于其他3种BSHs,这与Lambert等^[10]的研究表明*Lactobacillus plantarum* WCFS1中发现了4个胆盐水解酶活性相关基因**bsh1**~4,**bsh1**编码蛋白对胆盐水解酶起主要作用这一结论相符。而表现出的水解能力的差异则可能源于4种BSHs蛋白结构的差异。随着对其基因组学和蛋白质组学的进一步研究分析,4种BSHs表达量不同及其水解能力的差异必将得以阐明。

4 结论

目前多种微生物中胆盐水解酶已得到纯化和分离,如乳杆菌、双歧杆菌、肠球菌、梭状芽孢杆菌、类杆菌和链球菌等^[14],也有越来越多的学者利用基因工程技术,将有关编码胆盐水解酶的基因转入到适当的宿主菌中进行诱导和表达,以获取高产量的酶蛋白质产品,来进行其相关性质的研究。在益生菌中,很多菌与胆盐水解酶相关的基因仅有一到两个,如OH等^[15]发现*Lactobacillus acidophilus* PF01发现一段**bsh**基因并成功在大肠杆菌中异源表达成功;Kim等^[16]将*Bifidobacterium bifidum*中的**bsh**克隆表达后发现它与其他类双歧杆菌编码**bsh**的基因不同,是一单顺反子,而部分植物

乳杆菌虽然含 *bsh1*，却没有胆盐水解的能力^[17]，因此要对各自 BSHs 的功能进行深入研究，必须分别构建每个 *bsh* 基因的独立克隆体系。本实验利用 PCR 获得了 *L.plantarum* ST-III 菌株的 4 种 *bsh* 的基因片段，分别构建了 4 个 BSHs 的原核表达系统，并检测了 4 种 BSHs 的可溶性表达，结果显示目的条带的大小与预期相符。最后利用 HPLC 法测定了 4 种 BSHs 的胆盐水解能力，结果发现这 4 种 BSHs 均有一定的胆盐水解能力，其中 BSH1 相对其他 3 种胆盐水解酶，其胆盐水解能力较高。这些工作为 BSHs 相关性质的深入研究，以及新型降胆固醇药物的开发奠定了基础。

参考文献：

- [1] LIM S M, IM D S. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(2): 178-186.
- [2] 王玉文, 刘慧, 李平兰, 等. 产胆盐水解酶乳酸菌的分离、鉴定及降解胆固醇机理的初步研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 215-218.
- [3] BINDER H J, FILBURN B, FLOCH M. Bile acid inhibition of intestinal anaerobic organism[J]. Am J Clin Nutr, 1975, 28(2): 119-125.
- [4] RIDLON J M, KANG D J, HYLEMON P B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria[J]. J Lipid Res, 2006, 47(2): 241-259.
- [5] TANAKA H, DOESBURG K, IWASAKI T, et al. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity[J]. J Dairy Sci, 1999, 82: 2530-2535.
- [6] BATEUP J M, MCCONNELL M A, JENKINSON H F, et al. Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(3): 1147-1149.
- [7] COLEMAN J P, HUDSON L L. Cloning and characterization of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Clostridium perfringens*[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(7): 2514-2520.
- [8] CORZO G, GILLILAND S E. Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts[J]. J Dairy Sci, 1999, 82(3): 466-471.
- [9] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [10] LAMBERT J M, BONGERS R S, de VOS W M, et al. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(15): 4719-4726.
- [11] BEGLEY M, HILL C, GAHAN C G. Bile salt hydrolase activity in probiotics[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(3): 1729-1738.
- [12] LUNDEEN S G, SAVAGE D C. Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100[J]. J Bacteriol, 1990, 172(8): 4171-4177.
- [13] STELLWAG E J, HYLEMON P B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*[J]. Biochem Biophys Acta, 1976, 452(1): 165-176.
- [14] KIM G B, LEE B H. Biochemical and molecular insights into bile salt hydrolase in the gastrointestinal microflora: a review[J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2005, 18: 1505-1512.
- [15] OH H K, LEE J Y, LIM S J, et al. Molecular cloning and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus acidophilus* PF01[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(3): 449-456.
- [16] KIM G B, MIYATOMO C M, MEIGHEN E A, et al. Cloning and characterization of the bile salt hydrolase genes(*bsh*) from *Bifidobacterium bifidum* strains[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(9): 5603-5612.
- [17] MOSER S A, SAVAGE D C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *Lactobacilli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8): 3476-3480.