

麦芽糖转糖基酶在毕赤酵母中的表达及活性分析

朱国强, 王水兴*, 黄 兰, 朱石龙

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 用 PCR 方法从 *E.coli* BL21(DE3) 中获得麦芽糖转糖基酶基因, 将该基因插入到酵母表达载体 pPIC9K 的 α 分泌信号开放阅读框的下游, 对重组质粒 pPIC9K-*MalQ* 所含的外源片段进行双向测序。将测序正确的重组质粒用内切酶 *Sal* I 线性化, 电穿孔转化到 GS115 感受态细胞中, G418 梯度筛选高拷贝转化菌及 PCR 鉴定目的基因的整合, 1% 甲醇诱导表达。经薄层色谱分析粗酶液处理的麦芽二糖溶液, 证实粗酶液具有麦芽糖转糖基酶活性。

关键词: 麦芽糖转糖基酶; 毕赤酵母; 基因重组

Expression and Activity Assay of Amylomaltase in *Pichia pastoris*

ZHU Guo-qiang, WANG Shui-xing*, HUANG Lan, ZHU Shi-long

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The gene of *MalQ* was amplified from genomic DNA of *E. coli* BL21(DE3) and subcloned into α secretion signal open reading frame of pPIC9K expression vector to obtain a recombinant plasmid pPIC9K-*MalQ*. The recombinant plasmid was verified by DNA sequence. The resultant recombinant plasmid bearing *MalQ* gene was digested by *Sal* I and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115. The cells with stable expression of amylomaltase were screened in the medium containing G418. The positive clones were induced with methanol to express amylomaltase. The activity of 4- α -glucanotransferase in the crude enzyme was validated through TLC.

Key words: amylomaltase; *Pichia pastoris*; gene recombination

中图分类号: Q786

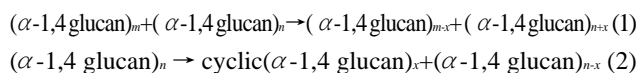
文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0258-04

麦芽糖转糖基酶(amyloamaltase)存在于古生菌^[1]、细菌^[2]及一些植物^[3-4]中, 参与麦芽糖的代谢利用^[5], 淀粉为底物生成热可逆性凝胶或环状糊精^[6]。热可逆性凝胶可以取代明胶, 有效地解决淀粉回生问题; 环状糊精具有筒状疏水内腔和亲水外表, 可以和多种疏水性客体分子形成包合物, 从而改变客体分子的水溶性、稳定性、反应性, 因此环状糊精可应用于食品、化学及医药工业。由此可见, 这两种物质都具有很好的商业应用价值。

现在工业中所用的环状糊精主要是聚合度分别为 6、7、8 的 α -、 β -、 γ - 环糊精及其衍生物, 其中以 β - 环糊精应用最为广泛。而大环糊精是指一种聚合度(指葡萄糖分子的数目)从 9 到几百不等的环状葡聚糖, 比 α -、 β -、 γ - 环糊精具有更大的筒状内腔, 包合能力更强, 可以包合多种分子质量的分子^[7], 且大环糊精具

有高水溶性。由于大环糊精可以与更多的疏水性物质形成包合物, 因而应用范围更广。麦芽糖转糖基酶是合成大环糊精的一种酶, 具有催化分子间和分子内的糖基转移作用, 反应式如下:



在反应式(2)中, 麦芽糖转糖基酶可以把直链淀粉环化成含 10~50 个葡萄糖残基的大环糊精^[8-12]。Terada 等^[10]在 *E.coli* 中成功表达了来自 *Thermus aquaticus* ATCC 33923 的麦芽糖转糖基酶基因(*MalQ* 基因), 将获得的酶作用于直链淀粉, 证实了该酶能催化分子内的糖基转移而生成大环糊精。

本研究从 *E.coli* BL21(DE3) 中克隆得到 *MalQ* 基因, 构建了毕赤酵母分泌型表达菌株, 重组菌经培养和诱导表达后, 提取粗酶液, 薄层色谱检测表明, 粗酶液具

收稿日期: 2010-08-14

作者简介: 朱国强(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: zhuguo0716@yahoo.com.cn

* 通信作者: 王水兴(1965—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: shuixingw@yahoo.com.cn

有麦芽糖转糖基酶活性,旨在为利用麦芽糖转糖基酶来制备大环糊精及应用该酶生产热可逆性凝胶提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

宿主菌与质粒: *E.coli* BL21(DE3)与 *E.coli* DH5 α 本实验室保存,毕赤酵母菌株 GS115 与质粒 pPIC9K 由南昌大学的黄国俊教授提供。

pfu DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶(*Not* I、*Eco*R I、*Sal* I) TaKaRa 公司(大连)。引物(UP 5' CGGAATTCATGGAAAGCAAACGTCTGG 3', 下划线为 *Eco*R I 酶切位点; LP 5' ATAAGAATGCGGC CGCGCATCAACCGCACTCTACT 3', 下划线为 *Not* I 酶切位点) 上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 仪器与设备

Gene Amp PCR system 2400 型 PCR 扩增仪 美国 PE 公司; FR-2000 凝胶成像系统 上海夏日科技有限公司; DYY-III 型稳压电泳仪 北京六一仪器厂; Bio-Rad 电转仪 Bio-Rad 公司。

1.3 方 法

1.3.1 PCR 扩增 *MalQ* 基因

根据 GenBank 中报道的 *E.coli* BL21(DE3)的 *MalQ* 基因序列,用 Olig6.0 软件设计带有与 pPIC9K 的 MCS 上相同酶切位点的引物,并以 *E.coli* BL21(DE3)基因组 DNA 为模板,扩增 *MalQ* 基因。PCR 扩增程序: 98℃ 5min; 98℃ 10s, 60℃ 5s, 72℃ 2.5min, 共 30 个循环; 72℃ 10min。

1.3.2 pPIC9K-*MalQ* 重组质粒的构建

将 PCR 产物和 pPIC9K 质粒用 *Eco*R I 及 *Not* I 双酶切,琼脂糖电泳回收纯化,用 T₄ DNA ligase 进行连接反应,连接产物热休克转化菌 *E.coli* DH5 α , 培养于氨苄青霉素的 LB 平板上,挑取阳性克隆子,提取质粒,酶切鉴定含有 *MalQ* 基因的重组子送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.3.3 酵母菌的转化和高拷贝整合菌株的筛选

在 80 μ L 酵母 GS115 感受态细胞中加入用 *Sal* I 线性化的重组质粒 DNA 10 μ L(约 5~20 μ g),迅速加入冰预冷的 0.2cm 电击杯中,在冰上放置 5min,根据所使用装置推荐的酿酒酵母参数进行电击,迅速加入 1mL 预冷的山梨醇,将内容物转移至灭菌的 1.5mL 离心管中,取 200 μ L 涂布于 MD 平板,30℃ 培养至克隆产生。再将 MD 平板上生长的阳性克隆分别转种至 G418 质量浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0g/L 的 YPD 平板上,在高质量浓度 YPD-G418 平板上生长的菌落为高拷贝整合菌株^[13]。

1.3.4 高拷贝整合菌株的 PCR 鉴定

挑取高拷贝整合单菌落接种于 10mL YPD 培养基中,30℃ 培养 18h,采用反复冻融法^[14]制备酵母 PCR 模板,用 UP 和 LP 引物进行 PCR 扩增,PCR 条件与 1.3.1 节相同。

1.3.5 工程菌株的诱导表达

将 PCR 鉴定为阳性的菌株,接种于 25mL BMGY 培养基中,28℃、200r/min 培养至 OD_{600nm} 为 5~6,4000r/min 离心收集菌体,加入 20mL BMGY 重悬培养,每隔 2h 加入终体积分数为 1% 的甲醇诱导表达。

1.3.6 酶活力测定

采用葡萄糖氧化酶法测定酶活,10 μ L 反应液加入 1mL 葡萄糖测定试剂盒工作液,37℃ 水浴 15min 后,于 505nm 波长处测定吸光度,参照葡萄糖含量-吸光度标准曲线可求酶活,具体操作见葡萄糖测定试剂盒说明书(上海荣盛生物技术有限公司)。

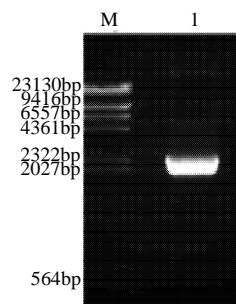
1.3.7 TLC 分析糖基转移酶活性

取粗酶液 100 μ L 加入到 900 μ L 1g/100mL 的麦芽二糖溶液中,37℃ 温育 30min,100℃ 水浴 5min 灭酶活,12000r/min 离心 5min,上清用 TLC 分析,以正丁醇-乙酸-蒸馏水(体积比 5:4:11)为展开剂,浓硫酸-乙醇(体积比 1:1)为显色剂,喷雾显色剂后,120℃ 烘烤 10min。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增 *MalQ* 基因

经 PCR 扩增,电泳验证获得约 2.1kb 的基因片段,与目的基因片段大小一致,结果见图 1。



M. λ -Hind III digest DNA Marker; 1. PCR 产物。

图 1 目的片段 PCR 扩增结果(目的片段约 2.1kb)

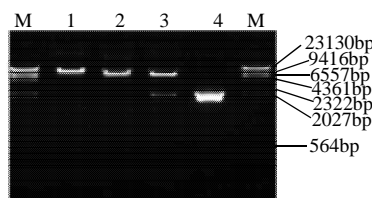
Fig.1 PCR amplification of *MalQ* gene

2.2 pPIC9K-*MalQ* 重组质粒的获得及电泳验证

将 PCR 产物和 pPIC9K 质粒用 *Eco*R I 及 *Not* I 双酶切,琼脂糖电泳回收纯化,用 T₄ DNA ligase 进行连接反应,连接产物热休克转化菌 *E.coli* DH5 α , 培养于氨苄青霉素的 LB 平板上。

挑取氨苄青霉素平板上的阳性克隆质粒,双酶切得到两条条带,一条与目的片段大小相符,另一条与质粒 pPIC9K 分子质量相符,由此可以初步判断获得了阳

性重组质粒。将酶切验证正确的阳性克隆送上海生工测序, 测序结果经 BLAST 比对, 与 GenBank 中报道的 *E.coli* BL21(DE3) *MalQ* 基因的同源性为 100%。重组质粒双酶切结果见图 2。



M. λ -Hind III digest DNA Marker; 1. 重组质粒单酶切; 2. pPIC9K 质粒单酶切; 3. 重组质粒双酶切; 4. PCR 产物。

图 2 阳性重组质粒双酶切分析

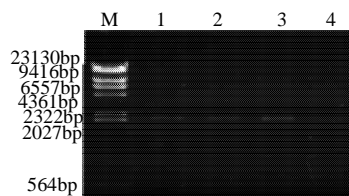
Fig.2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pPIC9K-*MalQ*

2.3 GS115 的转化和高拷贝整合菌株的筛选

Sal I 线性化的 pPIC9K-*MalQ* 质粒转化 GS115 感受态细胞, 在 MD 平板上培养 3d, 共得到 47 个 His⁺ 转化菌落, 与空载体的转化效率没有明显差别。将 pPIC9K-*MalQ* 转化的 His⁺ 菌落、空载体转化菌和 GS115 逐个点种至不同质量浓度的 YPD-G418 平板上, 在 0.25g/L YPD-G418 的平板上所有 His⁺ 菌生长无差异, GS115 生长缓慢; 而当 G418 质量浓度在 0.5、1.0、2.0g/L 时, GS115 不生长, His⁺ 菌生长速度出现差异; 4.0g/L 的 YPD-G418 平板上无 His⁺ 菌生长。在 2.0g/L 的 YPD-G418 平板上共得到 4 个生长速度较快的大菌落, 估计是高拷贝菌株。

2.4 PCR 鉴定高拷贝整合菌株

挑取在 2.0g/L YPD-G418 平板上生长的 4 个菌落, 经原位 PCR 验证, 均扩增得到分子质量为约 2.1kb 大小的片段, 表明 *MalQ* 基因已成功整合到毕赤酵母的染色体中, PCR 结果见图 3。



M. λ -Hind III digest DNA Marker; 1~4. 重组酵母菌 PCR 鉴定结果。

图 3 PCR 鉴定目的基因的整合

Fig.3 PCR identification of target gene integration

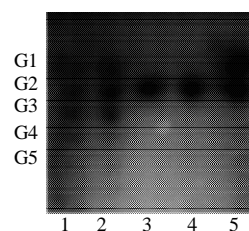
2.5 酶活力测定

一个酶活力单位定义为在如下反应条件中每分钟产生 1 μ mol/L 的葡萄糖所需的粗酶液量。于 900 μ L 1g/100mL

的麦芽二糖溶液中加入 100 μ L 粗酶液, 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 反应结束后沸水浴 10min 灭活酶, 反应产生的葡萄糖采用葡萄糖氧化酶法测定, 得粗酶液的酶活为 118U。

2.6 麦芽糖转糖基酶活性分析

用 1g/100mL 的麦芽糖与粗酶液在 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 经高速离心处理, 上清经薄层分析, 结果见图 4, 可以看出当以麦芽糖为底物时, 由基因工程菌诱导表达得到的粗酶液能够将糖基转移生成葡萄糖、麦芽三糖、四糖、五糖, 证明粗酶液具有麦芽糖转糖基酶活性。



1、2. 重组酵母表达上清液与麦芽糖反应; 3. 灭活的表达上清与麦芽糖反应; 4. 阳性对照; 5. 葡萄糖和麦芽糖; G1. glucose; G2. maltose; G3. maltotriose; G4. maltotetraose; G5. maltopentaose。

图 4 薄层分析酶促反应液

Fig.4 TLC analysis of enzymatic reaction mixture

3 讨 论

麦芽糖转糖基酶是作用于淀粉生产热可逆性凝胶和环状糊精关键酶制剂, 在食品、化工及医药行业具有很好的开发前景。麦芽糖转糖基酶具有催化分子内的糖基转移作用, 使直链淀粉环合生成大环糊精, 近年来, 越来越多的科学家利用麦芽糖转糖基酶的这一作用, 开展大环糊精的制备研究。但该酶在微生物和一些植物中的含量很低, 直接提取该酶都难以满足研究和应用的要求, 必须通过基因工程技术来表达该酶。一些麦芽糖转糖基酶基因已在大肠杆菌中得到表达, 以大肠杆菌作为宿主表达麦芽糖转糖基酶, 虽然发酵时间短, 表达水平较高, 但表达产物通常以包涵体的形式存在^[15], 无活性, 不利于工业化生产。本实验首次采用毕赤酵母表达麦芽糖转糖基酶, 毕赤酵母作为真核生物, 不仅具有其他高等真核表达系统的许多优点, 如蛋白加工、折叠、翻译后修饰等, 且操作时与 *E.coli* 及酿酒酵母同样简单, 通过将麦芽糖转糖基酶基因插入到含有 AOX1 基因启动子和 α 分泌信号肽的毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 转化入表达宿主菌 GS115, G418 梯度筛选转化菌, 从而得到整合了多拷贝基因的工程菌, 甲醇诱导表达, 表达产物可以直接分泌到培养液中, 经薄层色谱分析, 证实培养液具有麦芽糖转糖基酶活性。因毕赤酵母只分泌很少的自身蛋白, 所以分泌的外源蛋白

是培养基中蛋白的主要成分,有利于蛋白的纯化,比大肠杆菌融合表达的蛋白纯化更加方便,因此利用毕赤酵母表达麦芽糖转糖基酶,为工业化生产和纯化该酶提供了极大的方便,也为大环糊精的制备打下了基础。

参考文献:

- [1] JEON B S, TAGUCHI H, SAKAI H, et al. 4- α -glucanotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*-enzyme purification and characterization, and gene cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*[J]. Eur J Biochem, 1997, 248(1): 171-178.
- [2] GODA S K, EISSA O, AKHTAR M, et al. Molecular analysis of a *Clostridium butyricum* NCIMB 7423 gene encoding 4- α -glucanotransferase and characterization of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 1997, 143(10): 3287-3294.
- [3] JONES G, WHELAN W J. The action pattern of D-enzyme, a transmaltodextrinylase from potato[J]. Carbohydrate Research, 1969, 9(4): 483-490.
- [4] YOSHIO N, MAEDA I, TANIGUCHI H, et al. Purification and properties of D-enzyme from malted barley[J]. J Jpn Soc Starch Sci, 1986, 33: 244-252.
- [5] LU Yan, THOMAS D S. The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells[J]. Planta, 2004, 218: 466-473.
- [6] KAPER T, EUVERINK G J W, DIJKHUIZEN L, et al. Exploring and exploiting starch-modifying amylomaltases from thermophiles[J]. Biochemical Society Transaction, 2004, 32(2): 279-282.
- [7] ENDO T, ZHENG Meiyang, ZIMMERMANN W. Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins[J]. Aust J Chem, 2002, 55: 39-48.
- [8] TAKAHA T, YANASE M, TAKATA H, et al. Potato D-enzyme catalyzes the cyclization of amylose to produce cycloamylose, a novel cyclic glucan[J]. J Biol Chem, 1996, 271: 2902-2908.
- [9] TAKAHA T, YANASE M, TAKATA H, et al. Cyclic glucans produced by the intramolecular transglycosylation activity of potato D-enzyme on amylopectin[J]. Biochem & Biophys Res Comm, 1998, 247(2): 493-497.
- [10] TERADA Y, FUJII Y, TAKAHA T, et al. *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amylomaltase gene cloning and expression and enzyme characterization: production of cycloamylose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 910-915.
- [11] YANASE M, TAKATA H, TAKAHA T, et al. Cyclization reaction catalyzed by glycogen debranching enzyme (EC 2.4.1.25/EC 3.2.1.33) and its potential for cycloamylose production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4233-4239.
- [12] TERADA Y, SANBE H, TAKAHA T, et al. Comparative study of the cyclization reactions of three bacterial cyclomaltodextrin glucanotransferases [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1453-1460.
- [13] LIN Xijin, XU Wentao, HUANG Kunlun, et al. Cloning, expression and characterization of recombinant elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2009, 63: 69-74.
- [14] 尉海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较[J]. 天津医药, 2003, 31(5): 270-272.
- [15] PEIST R, SCHNEIDER-FRESENIUS C, BOOS W. The maltT-dependent and maltZ-encoded maltodextrin glucosidase of *Escherichia coli* can be converted into a dextrinyltransferase by a single mutation[J]. Biological Chemistry, 1996, 271(18): 10681-10689.