

水生栖热菌 FL-03 海藻糖合酶基因的克隆及真核表达

刘俊梅, 聂海彦, 郑微微, 胡耀辉*
(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 通过基因工程技术合成海藻糖合酶 *Tres* 全基因, 插入到毕赤酵母菌表达载体 pPICZ α 中。电转化毕赤酵母菌 GS115 后, 经 Zeocin 抗性筛选阳性菌株。用 PCR 和全基因测序鉴定目的基因的表达。通过诱导表达目的蛋白, 并以 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定。成功地构建了 pPICZ α -*Tres* 重组质粒, 并证明目的基因已整合于毕赤酵母菌的基因组。

关键词: 海藻糖合酶; *Tres* 全基因; 基因克隆; 真核表达

Cloning and Eukaryotic Expression of Trehalose Synthase Gene from *Thermus aquaticus* FL-03

LIU Jun-mei, NIE Hai-yan, ZHENG Wei-wei, HU Yao-hui*
(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The full-length trehalose synthase gene (*Tres*) was synthesized by genetic engineering and inserted into the *Pichia* expression vector pPICZ α . The expression vector carrying *Tres* gene was transformed into the competent cells of *Pichia* GS115 by means of electroporation, and Zeocin resistance screening was then performed to find positive strains. PCR and gene sequencing were used to identify the expression of the target gene. The expressed protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The results suggested that the recombinant plasmid pPICZ α -*Tres* was successfully constructed and that the target gene had been integrated into the *Pichia* genome.

Key word: trehalose synthase; *Tres* gene; gene cloning; eukaryotic expression

中图分类号: TQ925.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0267-04

海藻糖(Trehalose, α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside)是一种由两个葡萄糖分子以 α - α 糖苷键结合的非还原性双糖, 它的分子式是 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$, 相对分子质量为378.33, 化学性质非常稳定, 在细菌、酵母、真菌、昆虫、藻类中均发现有海藻糖存在。当细胞处于饥饿、干燥、高渗透压、脱水等胁迫环境时, 海藻糖能有效地保护细胞内酶的生物活性, 从而提高这些生物的抗逆性, 对这一现象的深层次研究表明, 海藻糖可以对生物膜、蛋白质和核酸等生物大分子发挥保护作用, 从而使富含这种奇妙化合物的生命体对外界的恶劣环境表现出独特的生物学特性^[1]。同时海藻糖安全无公害, 它作为一种绿色食品添加剂已陆续通过美国和欧盟的认证。

而从水生栖热菌中分离得到的海藻糖合酶具有热稳定性好, 最适作用温度高(60℃)的特点, 所以在工业化生产过程中可以避免杂菌污染。同时, 因为从底物到产物只经过一次酶的催化, 反应简单, 并且底物价格低廉, 因此, 该酶适合于应用到海藻糖的工业化生产中^[2]。但是, 水生栖热菌中海藻糖合酶酶活力低, 且分离过程比较复杂, 成本很高。因此将水生栖热菌 *Tres* 基因进行克隆并将其在毕赤酵母中表达, 构建出高产海藻糖合酶基因的工程菌株, 从而简化海藻糖合酶的生产工艺, 进一步降低海藻糖的生产成本, 为海藻糖合酶在海藻糖的规模化、工业化生产中的应用提供参考。

1 材料与方法

收稿日期: 2010-09-14

基金项目: 国家科技部成果转化基金项目(2007GB2B10072); 分子酶工程教育部重点实验室平台基地建设项目(20100419)

作者简介: 刘俊梅(1973—), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为功能性食品与生物反应器。E-mail: spring430817@163.com

*通信作者: 胡耀辉(1951—), 男, 教授, 学士, 研究方向为功能性食品与生物反应器。E-mail: huyaohui@163.vip.com

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

水生嗜热菌 FL-03(*Thermus aquaticus*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、大肠杆菌 DH5 α 及表达载体 pPICZ α 均为吉林农业大学功能性食品和生化实验室保存;克隆载体 pMD18-*T-simple* 购自 TaKaRa 公司。

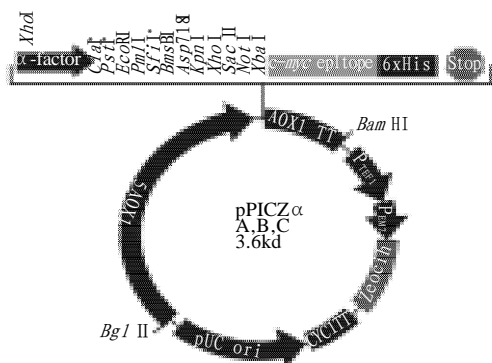


图1 pPICZ α 表达载体

Fig.1 Map of pPICZ α A expression vector

1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I、T4DNA 连接酶 大连宝生物工程公司;DNA 凝胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒 TaKaRa 公司;琼脂糖、焦磷酸二乙酯 (DEPC) Promega 公司。

1.1.3 培养基与裂解缓冲液

LB 低盐液体培养基:在 950mL 去离子水中加入:胰化蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 5g,摇动容器直至溶质溶解,用 5mol/L NaOH 调 pH7.0,用去离子水定容至 1L,在 0.1034MPa 高压下蒸汽灭菌 20min。YEPD 复合培养基:酵母提取物 10g、蛋白胨 20g、葡萄糖 20g,加水至 1000mL。毕赤酵母诱导表达培养基 (BMMY)由上海杰美基因药科技有限公司提供。

裂解缓冲液:20mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、10mmol/L EDTA(pH 8.0)、5.0g/L Triton X-100。

1.1.4 引物

依据 GeneBank 发表的海藻糖合酶序列(登录号: D86216)和真核表达载体 pPICZ α 的多克隆位点设计引物,上游引物:5'-CCGCTCGAGAAAAGAATGGACCCCCTCTGGTACAAGGA-3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点);下游引物:5'-GCTCTAGACTAGGCTTTTC CGGCCTTGGCCT-3'(下划线为 *Xba* I 酶切位点),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增目的基因 *Tres*

以水生栖热菌 FL-03 基因组 DNA 为模板,采用高保真 Prime STARTMHS 聚合酶扩增目的片段。第一轮 PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s;55 $^{\circ}$ C 45s;72 $^{\circ}$ C 3min;30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min;第二轮 PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s;55 $^{\circ}$ C 45s;72 $^{\circ}$ C 3min;35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30min,琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。AT 连接后,转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 α ,筛选到的阳性克隆测序正确后,获得重组质粒 pMD18-*T-simple-Tres*。

1.2.2 构建海藻糖合酶真核表达载体

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pMD18-*T-simple-Tres* 和表达载体 pPICZ α ,回收目的基因片段。将回收的目的基因片段和表达载体 pPICZ α 用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接 16h,转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 α ,筛选到的阳性克隆测序正确后,获得载体 pPICZ α -*Tres*,其中阳性克隆的筛选标记抗生素为 Zeocin。

1.2.3 毕赤酵母电转化及重组菌的筛选鉴定

按照 Invitrogen 公司提供的毕赤酵母操作手册制备毕赤酵母 Gs115 感受态细胞^[3]。将表达质粒 pPICZ α -*Tres* 电击转化到感受态 Gs115 酵母菌中,电击结束,取 200 μ L 转化液涂布于含抗生素 Zeocin(100 μ g/mL)的 YPDS 平板上,于 28~30 $^{\circ}$ C 温箱中培养 2~3d。挑取单个菌落接种于 5mL BMGY 液体培养基中,于 28~30 $^{\circ}$ C、250~300r/min 振荡培养 2~3d。离心回收菌体,提取酵母菌基因组 DNA 作 PCR 鉴定。

1.2.4 海藻糖合酶基因融合和蛋白的诱导表达

选取鉴定正确的工程菌置于 BMGY 培养基中过夜培养,离心弃上清,菌体重悬于诱导培养基 BMMY 中使 OD_{600nm} 为 1~1.5,每 24h 补加甲醇至终体积分数为 0.5%,诱导表达 72h,每 24h 取 1mL 菌液,5000r/min 离心 5min,收集菌体沉淀。向菌体沉淀中加入裂解缓冲液 100 μ L 和等体积的玻璃珠,剧烈振荡 1min,冰浴 1min,重复 15 次,4 $^{\circ}$ C、12000r/min 高速离心收集上清液,上清液进行 12% 分离胶的 SDS-PAGE 电泳。对上述粗酶液分别进行蛋白质 SDS-PAGE 电泳以检测表达情况,同时以没进行诱导的菌液作为阴性对照。蛋白样品上样前先加入等体积的 2 \times SDS-PAGE 样品处理液在沸水浴中煮 5min,10000 \times g 离心 3min 后取上清液上样。采用恒压 200V,电泳 45min 左右结束。用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.5 海藻糖合酶 Western blotting 分析^[3]

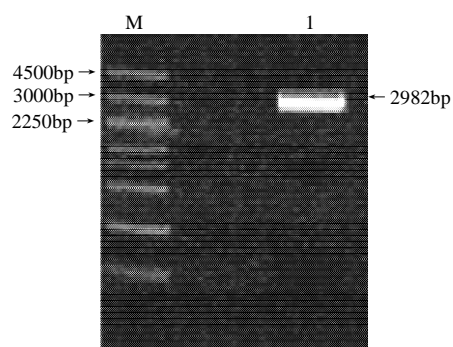
阳性菌株表达产物经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白质转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜)上,用封闭液室温封闭 2h,PBS 洗膜 3 次,在加入以 1:1000 稀释的鼠抗 6 \times His 单克隆抗体室温反应过夜,同上洗膜,再以相应的 1:500

稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 再次洗膜, 最后经 3,3'-二氨基苯联胺(DAB)底物显色液显色分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取及其扩增

获得水生栖热菌 FL-03 染色体基因组 DNA, 并以其为模板, PCR 扩增出约 2.9kb 的特异性片段(图 2), 大小与理论预测相符。



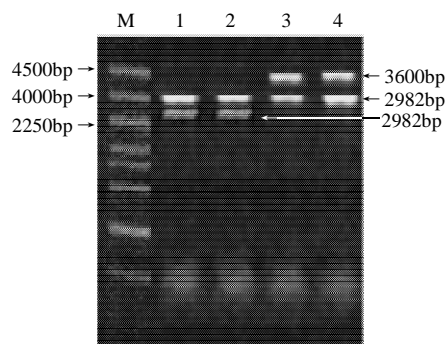
M. 250bp DNA Ladder Marker; 1. PCR 扩增的 DNA 片段。

图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

2.2 重组表达质粒的构建及鉴定

将扩增得到的目的基因纯化后, 进行 TA 克隆, 随机挑取单个白色菌落, 接种于 LB 培养基中(含 Amp 100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12h。收集菌体, 提取重组质粒, 用 *Xba* I、*Xho* I 进行双酶切鉴定(图 3)。同时重组质粒经菌液 PCR(图 4), 进一步测序显示, 插入表达载体的基因片段与 GeneBank 发表的海藻糖合酶序列(登录号: D86216.1)同源性达 99%, 编码氨基酸序列完全一致。

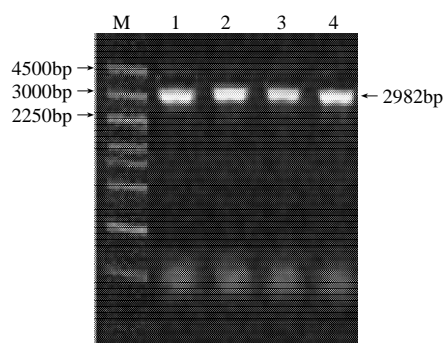


M. 250bp DNA Ladder Marker; 1~2. pMD

18-*T-simple-Tres*; 3~4. pPICZ α -*Tres*。

图 3 重组质粒 pMD18-*T-simple-Tres* 和 pPICZ α -*Tres* 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzyme digestion based identification of recombinant plasmids pMD18-*T-simple-Tres* and pPICZ α -*Tres*



M. 250bp DNA Ladder Marker; 1~2. pMD

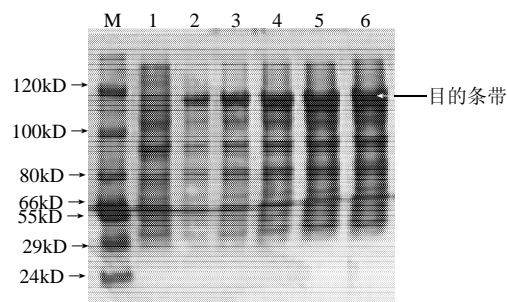
18-*T-simple-Tres*; 3~4. pPICZ α -*Tres*。

图 4 pMD18-*T-simple-Tres* 和 pPICZ α -*Tres* 的 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of recombinant plasmids pMD18-*T-simple-Tres* and pPICZ α -*Tres*

2.3 海藻糖合成酶的诱导表达及 Western blotting 鉴定

重组有 *Tres* 基因的酵母菌株 Gs115 诱导表达后经 SDS-PAGE 可检测到一个大小约 110kD 的蛋白质, 这与 *Tres* 的相对分子质量大小相符, 作为对照, 整合有空质粒的酵母细胞诱导表达后, 未检测到相应大小的条带(图 5)。

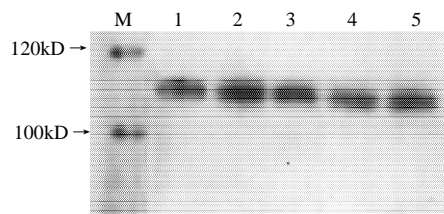


M. protein Marker; 1. 未诱导的重组质粒; 2~6.

诱导时间分别为 12、24、36、48、60h。

图 5 不同时间诱导表达目的蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expressed protein at different time points of induction



M. protein Marker; 1~5. 表达蛋白。

图 6 表达海藻糖合酶的 Western blotting 分析

Fig.6 Western blotting analysis of expressed trehalose synthase

利用抗鼠 6 \times His 单克隆抗体对表达产物进行 West-

ern blotting 鉴定, 发生特异反应的蛋白带与 SDS-PAGE 中特异表达带相一致(图 6), 从而证明 *Tres* 基因与表达载体实现了 α -factor 标签在酵母菌株 Gs115 中的融合表达。

3 讨 论

目前来源于 *Thermobifidafusca*、*Thermus aquaticus* ATCC 33923、*Picrophiustorridus*、*Pseudomonas stutzeri*、*Mycobacterium smegmatis* ATCC14468、*Thermuscaldophilus* GK24 等的海藻糖合酶基因均已在大肠杆菌中实现表达^[4-5], 但由于原核表达系统产量低、纯化困难, 对真核蛋白不能进行翻译后加工和修饰, 尤其是难以除尽内毒素原, 因此本研究采用新型外源蛋白质表达系统——巴斯德毕赤酵母表达系统进行表达^[6]。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种单细胞真核生物, 其基因工程菌近年来已被广泛用于商业化生产各种外源蛋白。毕赤酵母表达系统是近年来公认的最有效的新型外源蛋白真核基因表达系统之一, 已有多种外源蛋白在该宿主系统中获得成功表达^[7-8], 潜力巨大。与其他表达系统相比, 该系统表达外源蛋白除了具有真核系统的蛋白质翻译后修饰^[9](信号肽的剪切、糖基化修饰、蛋白折叠)等特点, 还具有高表达、高稳定、高分泌、

高密度发酵、容易大规模生产等优点, 因此该表达系统对于新型酶种的开发具有重大意义。

参考文献:

- [1] 陈红漫, 祝令香, 董志扬. 酿酒酵母海藻糖 6-磷酸合成酶基因克隆及植物表达载体的构建[J]. 微生物学报, 2001, 41(1): 54-58.
- [2] TSUSAKI K, NISHIMOTO T, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC 33923[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1334: 28-32.
- [3] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E. 精编分子生物学实验指南[M]. 黄培堂, 译, 3 版. 北京: 科学出版社, 2007.
- [4] 张树珍, 郑学勤, 林俊芳, 等. 海藻糖合酶基因的克隆及转化甘蔗的研究[J]. 农业生物技术学报, 2000(8): 385-388.
- [5] TSUSAKI K, NISHIMOTO T, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1996, 1290 (1): 1-3.
- [6] 隋少飞, 陈松林. 巴氏毕赤酵母表达系统的特点及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2004(3): 1-4.
- [7] 吴秀丽, 岳明, 丁宏标. 海藻糖合酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1067-1072.
- [8] 易绍萱, 吴军人. CTLA-4 胞外区 cDNA 的克隆及 Ig 融合蛋白表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(9): 834-837.
- [9] CREGG J M, VEDVICK T S, RASCHKE W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*[J]. Nature Biotechnology, 1993, 11: 905-910.