

# 灰树花海藻糖合成酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

徐志祥 李 刚 王震宇 李宝健\*

(中山大学生命科学院 基因工程国家教育部重点实验室 广州 510275)

**摘 要** 海藻糖主要作用是作为生物体的结构组分、以及保护生物膜和保护蛋白质。在灰树花中,海藻糖在干重中所占比例最高可达到 15%~17%,说明灰树花合成海藻糖的能力很强。将灰树花海藻糖合成酶基因克隆,并在大肠杆菌表达系统里表达。表达量为 190mg/L。通过活性测定,证明在大肠杆菌中表达的海藻糖合成酶具有酶活性。结合基因工程和酶工程方法,为合成海藻糖的研究提供了新的方向。

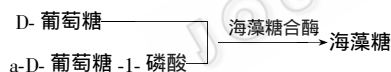
**关键词** 灰树花,海藻糖合成酶基因,蛋白表达

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)04-0540-03

灰树花(*Grifola frondosa*)又称贝叶多孔菌、千佛菌、栗子蘑、麻栗窝菌、重菇、叶状奇果菌、莲花菌等,在日本俗称舞茸。它隶属于真菌门(Eumycota)担子菌亚门(Basidiomycotina)非褶菌目(Aphyllphorales)多孔菌科(Polyporaceae)多孔菌属(*Polyporus*)<sup>[1]</sup>。

海藻糖(Trehalose)是一种稳定的非还原性双糖,由两个吡喃葡萄糖分子以 1,4 糖苷键连结而成<sup>[2]</sup>。它的主要作用是作为生物体的结构组分、以及保护生物膜和保护蛋白质。海藻糖在食品、保健、生物制品、精细化工等领域中有很广阔的应用前景,而且有很大的市场需求量。据报道,灰树花海藻糖在干重中所占比例最高达到 15%~17%,这说明灰树花合成海藻糖的能力很强<sup>[3]</sup>。

在担子菌(Basidiomycete)灰树花(*Grifola frondosa*)中,海藻糖是由海藻糖合酶(Tsase)催化合成,合成途径为<sup>[4]</sup>:



海藻糖应用前景广阔,目前海藻糖主要是通过生物提取和发酵的方式生产,但生产成本较为昂贵<sup>[6]</sup>。若能找到廉价的生产方法,将获得较好的经济效益。酶法生产海藻糖是最近几年发展的新方法,其研究刚开始起步。

大肠杆菌表达系统具有产量高、菌体生长速度快、操作容易、成本低的优点<sup>[7]</sup>。本研究拟通过 RT-PCR 方法从摇瓶培养的灰树花总 RNA 中克隆海藻糖合成酶基因,并通过其在大肠杆菌中的表达和酶活性测定,探索一种新型的低成本的合成海藻糖方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌种和质粒** 灰树花(*Grifola frondosa*) pBV220 载体、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌种由本室保存。

**1.1.2 主要试剂** 本实验所用限制性内切酶、Ex Taq 酶、分子

量标准购自 TaKaRa 公司, T4 DNA Ligase、Agarase 购自 New England Biolab。其他试剂为国产或者进口分析纯试剂。大肠杆菌蔗糖磷酸化酶由本室通过大肠杆菌表达后纯化获得。

### 1.2 灰树花菌丝体总 RNA 提取

参照文献 5 的方法进行。

### 1.3 RT-PCR

根据 Yoshida 等<sup>[4]</sup>报道的序列设计了一对引物,引物 1 5'-CCGAATTCATGGCTCCTCCACCAG-3',引物 2 5'-GCTCTAGATC-CCTGCACATGCAGTTC-3'。按照 TaKaRa 公司试剂盒说明书调制反应液。把反应液加入 RT 反应液中,混匀,加入 20~40  $\mu$ L 矿物油,稍稍离心一下。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 90s,循环 28 次,72 $^{\circ}$ C 10min。取 5  $\mu$ L 反应液加入 1  $\mu$ L DNA 上样缓冲液进行检测,1%琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE,电压 30~50V。

### 1.4 大肠杆菌表达和产物纯化

挑取细菌转化子单菌落,接种于含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养基中,30 $^{\circ}$ C 200r/min 振荡过夜,次日按 10%接种量转接于适当体积(500mL 三角瓶中装液 50mL 为宜)含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 培养基中,30 $^{\circ}$ C 200r/min 振荡培养 2~3h 至 OD<sub>600</sub> 约为 0.3~0.8 时,将温度迅速升至 42 $^{\circ}$ C,并在此温度下水浴振荡培养数小时,离心收集菌体。

产物纯化:将诱导表达后的菌体悬于适量的菌体裂解液中,经超声波破碎后,4 $^{\circ}$ C 8000g 离心 5min,收集沉淀。沉淀反复用包涵体洗液 I 和 II 洗涤,4 $^{\circ}$ C 8000g 离心 5min,收集洗涤后的沉淀。

### 1.5 包涵体的复性

将 8mol/L 尿素溶解的包涵体溶液(浓度约为 2~3mg/mL)在 4 $^{\circ}$ C 下缓慢滴加 10 倍体积的复性缓冲液,放置过夜。

### 1.6 海藻糖纸层析

在长 25cm 宽 3cm 的层析滤纸条上,于起始线(起始线距滤纸末端 5cm)上用毛细管点样,斑点直径不得超过 5mm。点

基金项目 广州市科委重大科技攻关资助项目(2001-Z-006-01)

\* 通讯作者。Tel: 86-20-84035179 E-mail: lsbrc12@zsu.edu.cn

作者简介 徐志祥(1975-)男,江西波阳人,博士,从事药用真菌的发酵工程和分子生物学研究。E-mail: xuzhixiang123@163.net

收稿日期 2003-09-08,修回日期 2004-01-06

样量约为 100μg。样品吹干后,置于展开剂[正丁醇:丙酮:水:醋酸为 10:6:6:2(V/V)]中,室温下展开到前沿距起始线 18cm 时取出。自然风干后,在滤纸条上均匀喷上 A 液 AgNO<sub>3</sub> 的水-丙酮饱和溶液,水:丙酮为 1:20(V/V)]晾干后,再均匀喷上 B 液 1g NaOH 晶体溶于 100mL 乙醇水溶液中,乙醇:水 1:1(V/V)]并将滤纸条于暗处放置 10min,底色为棕黄色,根据是否有棕黑色斑点确定海藻糖的有无。

1.7 表达产物的活性测定

1mL 反应液(300mol/L 蔗糖,300mol/L 葡萄糖,10mol/L 磷酸)中加入溶于 MES pH 6.5 缓冲液中的海藻糖合成酶和蔗糖磷酸化酶各 1μL(浓度约为 1μg/μL),于 37℃反应 24h,取 30μL 做纸层析分析,通过显色反应确定酶的活性。

2 结果和分析

2.1 灰树花海藻糖合成酶基因的克隆

利用 RT-PCR 方法从灰树花总 RNA 中扩增出了一个大约 2.2kb 左右的片段。将片段连接到 pMD-T 载体上(命名为 pMD-T-TR),进行测序。从灰树花 RNA 中扩增的片段全长 2199bp,编码 732 个氨基酸,根据 DNASIS 软件分析,同已经报道的日本灰树花海藻糖合成酶基因序列相比,有 98.5% 的碱基相同,而氨基酸序列则有 99.2% 的相似性。

2.2 海藻糖合成酶基因大肠杆菌表达载体的构建

将连接到 T 载体上的海藻糖酶基因用 EcoRI 和 BamHI 双酶切切下,和双酶切后的 pBV220 质粒连接,连接后的质粒命名为 pBV220-TR。

2.3 海藻糖合成酶基因的表达

将 42℃ 诱导表达的海藻糖合成酶基因转化子,每小时取样,做蛋白电泳分析(图 1)。

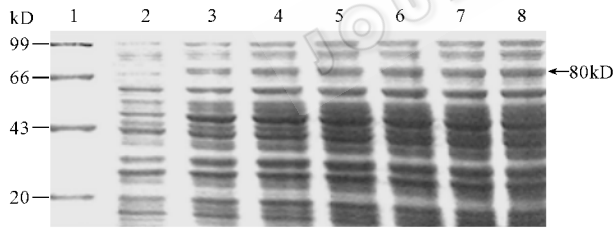


图 1 不同时间表达的海藻糖合成酶 SDS-PAGE 分析  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of trehalose synthase expressed in different time  
1.Low molecular weight marker;2.Protein sample without induction, culture time is 4 hour;3~8.1~6 hour induction at 42℃, samples were taken at 1h intervals.

从图 1 可以看出,经 42℃ 诱导的大肠杆菌转化子与未诱导的相比,在 80kD 位置附近有特异性表达的条带,与文献中报道的灰树花海藻糖合成酶的大小相近。经光密度积分扫描分析,第 4 个小时的表达量为最大,达到总蛋白的 12%。从蛋白电泳图可以看出,在 42℃ 诱导期间,整个菌体的蛋白表达量系统地增加,这可能是因为菌体在高温情况下生长的原因,也可能是海藻糖合成酶的表达所造成的。

2.4 海藻糖合成酶包涵体的纯化

将诱导表达 4h 的大肠杆菌 DH5α/pBV220-TR 超声波破碎,收集到的沉淀为粗制包涵体,反复用包涵体洗液 I 和 II 洗涤,可洗去细胞碎片和大部分杂蛋白,包涵体的洗涤纯化

过程如图 2 所示。

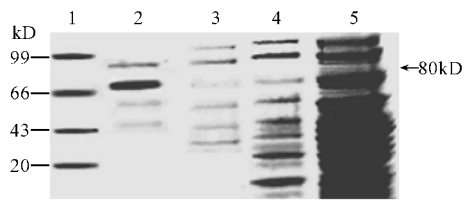


图 2 海藻糖合成酶包涵体洗涤纯化过程  
Fig.2 The washing process of inclusion body of trehalose synthase  
1.Protein marker;2.Trehalose synthase inclusion body after washing and purification;3.Supernatant after washing with inclusion body solution II;4.Supernatant after washing with inclusion body solution I;5.Protein sample after induction for 4 hours.

经光密度积分扫描分析,洗涤后的包涵体约占总蛋白的 68.6%。1000mL 发酵液约得到 15g 湿菌体,经超声破碎和洗涤纯化后,得到 0.62g 精制包涵体,其中蛋白质含量为 45.3%,目标蛋白量约为 0.19g。将包涵体复性,复性后的蛋白做下一步的活性测定研究。

2.5 表达产物的活性测定

由灰树花海藻糖合成酶合成途径可知,海藻糖合成酶需要 D-葡萄糖和 α-D-葡萄糖-1-磷酸作为反应底物。在大肠杆菌中,蔗糖磷酸化酶能将蔗糖分解为果糖和 α-D-葡萄糖-1-磷酸。因此在灰树花海藻糖合成酶的酶活测定中,我们采用葡萄糖和蔗糖为合成原料,并在反应液中加入大肠杆菌蔗糖磷酸化酶。纸层析分析结果如图 3 所示。

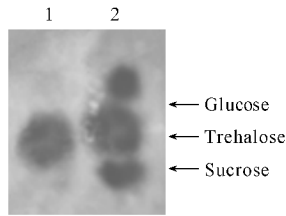


图 3 纸层析法分析反应结果  
Fig.3 Paper chromatography of the reaction mixture.  
1.Standard sample of trehalose;2.Synthesized trehalose.

通过纸层析定性分析,在反应液中检测到了海藻糖的存在。证明在大肠杆菌中表达的海藻糖合成酶具有合成海藻糖的活性。

3 讨论

海藻糖合成酶在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在。本研究采用超声破碎的方法裂解菌体,加入包涵体洗液洗涤可获得较为纯净的包涵体。包涵体中除了含有重组蛋白之外,还含有细菌杂蛋白以及核酸等成分。在包涵体洗涤剂中添加 Triton X-100、尿素、高浓度 NaCl,可以进一步除去杂质。采用这种方法,通过大肠杆菌表达的海藻糖合成酶纯度达到 70% 左右。本研究采用稀释法对包涵体进行复性。将 8mol/L 尿素溶解的包涵体溶液(浓度约为 2~3mg/mL)在 4℃ 下缓慢滴加 10 倍体积的复性缓冲液,放置过夜。复性率约为 15% 左右。

纸层析和薄层层析都具有设备简单、操作易行的特点,

均为海藻糖定性分析的常规方法。由于纸层析  $R_f$  值重现性较薄层层析好,故更适用于海藻糖的定性分析。本研究采用纸层析法分析海藻糖。通过纸层析定性分析,在反应液中都检测到了海藻糖的存在。说明在大肠杆菌中表达的海藻糖合成酶具有合成海藻糖活性。利用葡萄糖和蔗糖这两种廉价的原料,结合基因工程和酶工程方法,为海藻糖研究提供了新的思路。下一步将通过表达参数的优化提高海藻糖合成酶的表达产量,可进一步降低海藻糖合成的成本。

#### 参 考 文 献

[ 1 ] 徐锦堂. 中国药用真菌学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997, 707 - 717.

- [ 2 ] 杉本利行. 糖类新资源的开发现状和应用. 食品工业, 1994, 34 - 38.
- [ 3 ] 罗明典. 微生物生产海藻糖及其应用前景. 微生物学通报, 1996, 23(4): 252 - 254.
- [ 4 ] Yoshida M, Nakamura N, Horikoshi K. Production of trehalose by adual enzyme system of immobilized maltose phosphorylase and trehalos ephosphorylase. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22: 71 - 75.
- [ 5 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 6 ] 于春燕. 海藻糖研究进展. 青岛大学学报, 2000, 13(2): 55 - 59.
- [ 7 ] 吴 丹, 仇华吉, 童光志. 几种表达系统的比较. 生物技术通报, 2002, 2: 30 - 34.

## Cloning and Expression of *Grifola frondosa* Trehalose Synthase Gene in *Escherichia coli*

XU Zhi-Xiang LI Gang WANG Zhen-Yu LI Bao-Jian\*

( Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China )

**Abstract:** Trehalose is a structural components of living organisms, and serves the function of protecting biological membranes and proteins. The dry weight of trehalose in *Grifola frondosa* can reach up to 15% ~ 17%, indicating a strong ability to synthesize trehalose by trehalose synthase in the organism. *Grifola frondosa* trehalose synthase gene were cloned and expressed in *Escherichia coli*, trehalose synthase expression level reaching 190mg/L. The activity assay indicates that the enzyme expressed in bacteria possesses biological activity. This study has provided a new way for the enzymatic synthesis of trehalose.

**Key words:** *Grifola frondosa*, Trehalose synthase, Protein expression

Foundation item: Key Science and Technology Project of Guangzhou Science Commission( 2001-Z-006-01 )

\* Corresponding author. Tel: 86-20-84035179; E-mail: lsbr12@zsu.edu.cn

Received date: 09-08-2003

## 奥林巴斯(北京)销售服务有限公司宣告成立

在整个亚洲地区,中国市场无疑是发展最为迅猛的市场之一。为了在持续扩大的中国市场上增加内窥镜和生物显微镜的销售,奥林巴斯株式会社(社长:菊川刚)合并了中国本地销售代理商,在北京设立了服务子公司“奥林巴斯(北京)销售·服务有限公司”[ Olympus( Beijing ) Sales & Service Co., Ltd. ],并已于 2004 年 7 月 1 日正式开始营业。

奥林巴斯进入中国市场已有 40 年的历史。过去,内窥镜和生物显微镜一直是通过在中国的代理店进行销售和服务。此次将中国代理店纳入旗下,实现了奥林巴斯向直接进行销售、服务、市场开拓的经营体制的转变。奥林巴斯(北京)销售服务有限公司将以 400 名员工、24 家分支机构为事业起点,逐步进行规模的扩大,预计在 3 年后的 2006 年度,奥林巴斯的销售业绩将由 2003 年度的约 50 亿日元增长至约 220 亿日元。通过对仪器的维修检验等市场技术支持服务来加强同用户的直接接触,通过优质、高效的服务使用户对奥林巴斯产品的满意度进一步提高。同时,奥林巴斯还将积极开展旨在扩大中国市场的中长期营销活动,以期为中国医疗及科学研究的发展作出自己应有的贡献。