

芝田硫化叶菌麦芽寡糖基海藻糖合酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达*

陈 炜¹ 刘 莉¹ 孙培钰¹ 金 城²

(¹中国科学院微生物研究所 酶学研究室 北京 100080)

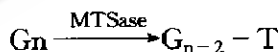
(²中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

摘 要:用 PCR 方法从芝田硫化叶菌中扩增了编码一种新酶,即麦芽寡糖基海藻糖合酶(MTSase)的基因,扩增的 2.2kb DNA 插入到原核表达载体 pBV220 中,构建成重组质粒 pSBGT1。pSBGT1 中 MTSase 基因在大肠杆菌中得到表达。SDS-PAGE 分析表达产物 MTSase 蛋白的分子量约为 74kDa,同核苷酸序列测定所推导的值相符。表达产物占细胞总蛋白约 4.4%。pSBGT1 产生的重组酶作用于淀粉部分水解物,使 DE 值降低,得到非还原糖或低还原糖。

关键词:麦芽寡糖基海藻糖合酶,芝田硫化叶菌,基因的克隆和表达,大肠杆菌

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2000) 01-0057-61

麦芽寡糖基海藻糖合酶(maltooligosyl trehalose synthase, MTSase)是近年来在细菌和古菌中发现的一种新型分子内转糖基酶,能将淀粉或淀粉部分水解物(大于三个葡萄糖基)还原末端的 α -1,4 葡萄糖苷键转化为 α -1,1 葡萄糖苷键,生成具海藻糖末端结构的产物^[1~3],是一种新型非还原糖形成酶。



Gn 为聚合度 $n(n>3)$ 的麦芽寡聚糖, $\text{G}_{n-2} - \text{T}$ 为麦芽寡糖基海藻糖, -T 为海藻糖基。

上述得到的麦芽寡糖基海藻糖可经麦芽寡糖基海藻糖海藻糖基水解酶(maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, 也称新型 α -淀粉酶),水解得到海藻糖和比初始底物少两个葡萄糖基的麦芽寡糖^[1,4,5],故是酶法合成海藻糖的新途径。

淀粉经淀粉酶部分水解得到不同 DE 值的麦芽糊精,广泛应用于食品和轻工等领域。这种麦芽糊精有还原末端,具有还原性,能与蛋白质和氨基酸反应,在食品保存中容易变褐、变质。麦芽寡糖基海藻糖合酶与麦芽糊精反应,将还原末端的 α -1,4 葡萄糖苷键转化为 α -1,1 葡萄糖苷键,生成非还原糖(non-reducing saccharides)或低还原糖(less-reducing saccharides)。这种具海藻糖基末端结构的糊精,由于其非还原性,不与氨基酸或蛋白质反应,故能延长食品、药品和化妆品的保质期,并不断扩大应用领域。它能降低麦芽糊精的 DE 值而不降低麦芽糊精的长度,这种非还原性和低还原性糊精较目前广泛使用的麦芽

* 北京市自然科学基金课题(5982010),微生物资源国家重点实验室课题(981024)

刘 莉为内蒙古大学生命科学院 1996 级硕士研究生,孙培钰为中国科技大学生物系毕业实习生

作者简介:陈 炜(1943-),女,沈阳市人,中国科学院微生物研究所副研究员,主要从事分子生物学和生物化学的研究

收稿日期:1998-12-28, **修回日期:**1999-05-07

糊精有很多的优点^[6]。海藻糖(trehalose)是两个葡萄糖残基由 α -1, 1 键连接的非还原二糖, 广泛存在于微生物、植物和昆虫中, 对各种生物大分子和生物膜有保护作用, 可以保护细胞免受干旱、冷冻和渗透压的变化而造成的伤害。在植物体内与抗旱、抗逆及植物的隐生现象相关。海藻糖可用作微生物冷冻干燥制品、疫苗、多种药品、化妆品及食品的稳定剂和保护剂, 其用途和潜在用途十分广泛。它主要是从酵母中提取, 成本高、售价高, 难以大规模生产, 限制了其应用。以往虽有一些酶法合成海藻糖的途径, 但或者由于起始物的价格昂贵, 或者由于转化率低, 均不适合工业生产^[7]。而上述新途径以淀粉为原料, 酶法制备海藻糖, 起始物价格便宜, 转化率高, 很有应用前景。日本已将该方法用于生产。

我们用芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*) B12 的细胞提取物作用于可溶性淀粉后, 有海藻糖生成。芝田硫化叶菌是嗜热嗜酸古细菌, 最适生长温度 80℃ 左右, 最适生长 pH 值 3.5, 生长缓慢, 难于培养, 不适合工业生产。为此我们将芝田硫化叶菌 B12 的麦芽寡糖基海藻糖合酶和新型 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中克隆和表达。本文报道芝田硫化叶菌麦芽寡糖基海藻糖合酶(也称葡糖基海藻糖产生酶)基因在大肠杆菌中克隆和表达的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

供体菌芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*) B12 染色体 DNA 为本所黄力先生惠赠。

质粒 pBV220 为中国预防医学科学院张智清先生等人构建^[8], 是含 P_{RPL} 启动子的原核表达载体, 可表达外源基因, 产生非融合蛋白。

受体菌大肠杆菌 DH5 α , TG1, XLI-Blue, JM109 为本实验室保存。

限制性内切酶、T4DNA 连接酶和 TaqDNA 聚合酶等工具酶及核酸和蛋白质分子量标准等分别购自华美公司、上海生工公司、Promega 公司和 Sigma 公司等。

测定酶活用的底物麦芽五糖为日本林原生物化学研究所 Kazuhiko Maruta 先生惠赠。

淀粉部分水解物为北京酱油厂淀粉糖生产车间产品。

1.2 培养基、培养条件及热诱导表达条件

基本按文献[9]进行。

1.3 分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析

参照文献[10]进行。

1.4 酶活力测定方法

用 Somogyi^[11]-Nelson^[12]方法测定, 测定反应溶液中残留的麦芽五糖。反应液含 1% 麦芽五糖, 50mmol/L 醋酸钠盐缓冲液, pH 值 5.5, 反应温度 60℃。一个酶活力单位为每分钟转变 1 μ mol 麦芽五糖为麦芽三糖基海藻糖的酶量。

2 结果和讨论

2.1 含麦芽寡糖基海藻糖合酶基因重组质粒的构建

序列分析表明, 芝田硫化叶菌 B12 麦芽寡糖基海藻糖合酶基因^[13]同硫矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*) KM1 的相应基因^[14]的序列有很高的同源性, 参照相应核苷酸序

列,设计和合成了用于扩增芝田硫化叶菌 B12 麦芽寡糖基海藻糖合酶结构基因的 PCR 引物:

上游引物 5'GACGAATTTCATGATAATAGGCACATATAG 3'

下游引物 5'TGTCTGCAGTTCCTCCCTTTTTTCAGT 3'

上游引物 5'端含 *Eco*RI 位点,下游引物 5'端含 *Pst*I 位点。

以芝田硫化叶菌染色体 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件为:94℃,50s;45℃,50s;72℃,110s,30 个循环。电泳检测扩增产物约 2.2kb(图 1-A),与预期大小一致。

载体 pBV220 和 PCR 扩增产物分别用 *Eco*RI 和 *Pst*I 双酶切,芝田硫化叶菌麦芽寡糖基海藻糖合酶结构基因内有一个 *Eco*RI 位点,距上游起始密码子约 0.5kb 处,2.2kb 的 PCR 产物酶切后为 0.5kb 和 1.7kb 两个片段(图 1-B)。电洗脱回收上述 0.5kb、1.7kb 及 pBV220 双酶切后的 3.7kb 三个 DNA 片段。首先将 pBV220/*Eco*RI/*Pst*I 与 1.7kb DNA 连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选有正确插入的重组质粒,再用 *Eco*RI 酶切,与上述回收的 0.5kb DNA 连接,得到上述三个 DNA 片段连接的质粒,用酶切、PCR 和酶活测定方法筛选到有正确插入的质粒,称 pSBGT1。

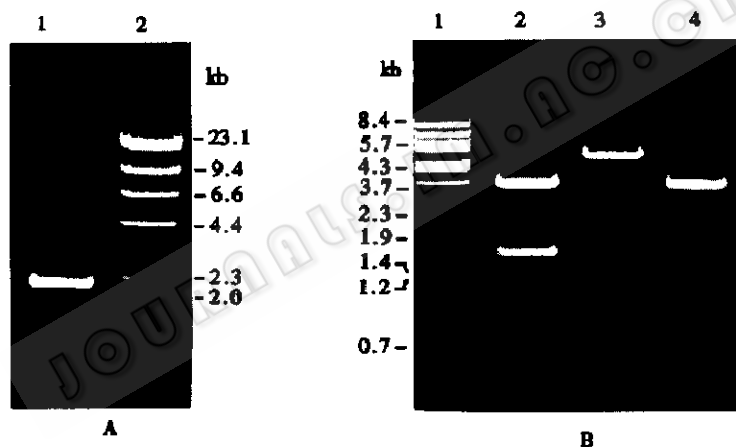


图 1 重组质粒 pSBGT1 构建过程及质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pSBGT1

A. 1. PCR product (2.2kb); 2. λ DNA/*Hind*III;

B. 1. λ DNA/*Bst*E II; 2. pSBGT/*Eco*RI/*Pst*I; 3. pSBGT/*Eco*RI; 4. pBV220/*Eco*RI/*Pst*I.

2.2 酶活力测定

重组质粒 pSBGT1 转化受体菌大肠杆菌 DH5 α 、XL1-Blue、JM109 和 TG1,接种含氨苄青霉素的 LB 培养基,30℃ 培养至对数中期,42℃ 热诱导 4 h,将菌体超声波破碎细胞,离心后取上清液测定酶活,每 100mL 发酵液的菌体中,pSBGT1 在上述四个受体菌中的表达的酶活分别为 1.5、1.26、0.44 和 0.56 单位。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

DH5 α (pSBGT1)培养和热诱导 4 h 后,离心取样,将菌体直接加到 SDS-PAGE 上样缓冲液中,100℃ 煮沸 5min,离心,电泳。考马斯亮兰 R-250 染色,脱色,样品 DH5 α (pSBGT1)比 DH5 α (pBV220)在约 74 kD 处多一蛋白带(图 2),与硫矿硫化叶菌 KM1 葡

糖基海藻糖产生酶大小^[15]相近。也与我们从芝田硫化叶菌麦芽寡糖基海藻糖合酶 DNA 核苷酸序列所推导出的氨基酸的序列的大小相符。凝胶电泳经岛津 CS-930 扫描仪扫描, 表明表达的 MTSase 酶蛋白占细胞总蛋白约 4.4% (图略)。

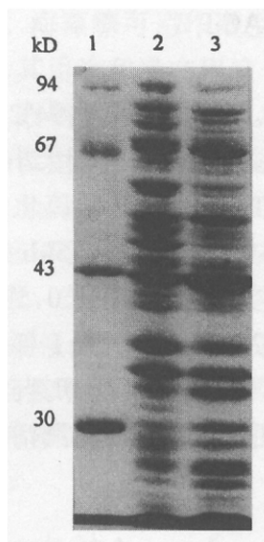


图 2 重组质粒 PSBG1 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant plasmid pBSGT1 expression protein

1. Protein molecular weight markers;
2. DH5α(pBSGT1); 3. DH5α(pBV220)

2.4 重组 MTSase 降低淀粉部分水解物 DE 值的初步研究

用 DNS 方法^[16]测定淀粉部分水解物还原性, 取 DE 值分别为 12 和 20 的糊精, 用 pH 值 5.5 的 50mmol/L 醋酸缓冲液配成 10% 浓度, 每克糊精加 3 单位的重组酶 MTSase, 58℃ 反应 24h, 测定 DE 值分别为 4.2 和 13.5。表明重组 MTSase 能降低淀粉部分水解物的 DE 值。

本工作从芝田硫化叶菌 B12 得到麦芽寡糖基海藻糖合酶基因, 在大肠杆菌中克隆和表达。用重组菌株产生的酶作用于淀粉部分水解物可降低 DE 值。此外, 用重组 MTSase 和从芝田硫化叶菌 B12 得到的新型 α-淀粉酶重组酶作用直链淀粉和淀粉部分水解物有海藻糖生成 (数据另文发表), 为以淀粉为原料酶法生产非还原糖和海藻糖打下基础。

致谢 本所黄力先生提供芝田硫化叶菌 B112 染色体 DNA, 并对本工作给予多方面的支持。日本林原生物化学研究所 Kazuhiko Marusta 先生赠送麦芽五糖。在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Maruta K, Nakada T, Kubota M, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(10):1829~1834.
- [2] Maruta K, Nakada T, Kubota M, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(12):2210~2214.
- [3] Kato M, Miura Y, Kettoku M, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(5):921~924.
- [4] Maruta K, Nakada T, Mitsuzumi H, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(12):2215~2218.
- [5] Kato M, Miura Y, Kettoku M, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(5):925~928.
- [6] Takahiko M, Takashi S, Toshiyuki S, et al. *Pat Appl EP 069107A1*.
- [7] 陈 炜, 何秉旺. *微生物学报*, 1998, **25**(3):164~166.
- [8] 张智清, 姚立红, 侯云德. *病毒学报*, 1990, **6**(2):111~116.
- [9] 陈 炜, 何秉旺, 张建华, 等. *微生物学报*, 1997, **37**(4):270~275.
- [10] I. 萨姆布鲁, E.F 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [11] Somogyi M. *J Biol Chem*, 1952, **195**:19.
- [12] Nelson N. *J Biol Chem*, 1944, **153**:375~380.
- [13] 陈 炜, 孙培钰, 王 辉. 第八届全国生物化学学术会议论文集. 北京: 化学工业出版社, 1998. 292~294.
- [14] Kobayashi K, Kato M, Miura Y, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(11):1882~1885.
- [15] Kato M, Miura Y, Kettoku M, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(3):546~550.

[16] Miller G L. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3):426.

CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING MALTOLOGOSYL TREHALOSE SYNTHASE FROM *SULFOLOBUS SHIBATAE* IN *E. COLI*

Chen Wei¹ Liu Li¹ Sun Peiyu¹ Jin Cheng²

(¹ Laboratory of Enzymology Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science,
Beijing 100080)

(² State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese
Academy of Science, Beijing 100080)

Abstract: 2.2 kb DNA fragment encoding a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase (MTSase) was amplified from *Sulfolobus shibatae* by using PCR technique. The amplified 2.2kb DNA fragment was inserted into an expression vector, pBV220, to yield the recombinant plasmid pSBGT1. MTSase gene in pSBGT1 was expressed in *E. coli*. The molecular weight of expressed MTSase detected by SDS-PAGE was about 74kD, which is conformed with that deduced from nucleotide sequence. The expressed MTSase protein accounted for about 4.4% of the total cell protein. The MTSase from transformants containing pSBGT1 is capable of decreasing DE value, forming non-reducing or less-reducing saccharides when allowed to act on reducing partial starch hydrolysates.

Key words: Maltooligosyl trehalose synthase, *Sulfolobus shibatae*, Gene cloning and expression, *E. coli*

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自 2000 年 40 卷第 1 期开始扩版,双月刊,每册 112 面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部