

短双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶基因 *aga1* 在大肠杆菌中的高效表达

陆 宇 赵 晗 王勤鹏 刘巍峰 肖 敏*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve* 203) α -D-半乳糖苷酶基因(*aga1*)被克隆到大肠杆菌温度诱导表达质粒 pBV220 中,构建重组质粒 pBV_{aga1},转入大肠杆菌进行温度诱导表达,得到的重组酶 Aga1 在大肠杆菌 DH5 α 、DH10B 和 BL21 中的比活分别为 28.08、19.44 和 13.85U/mg,均高于短双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶的比活 1.76U/mg。重组质粒 pBV_{aga1} 在 *E. coli* BL21 中稳定性较好。重组酶 Aga1 蛋白亚基分子量约 67kD,最适反应温度为 45 $^{\circ}$ C,酶在 40 $^{\circ}$ C 以下稳定,60 $^{\circ}$ C 仅剩余约 5% 的酶活性,70 $^{\circ}$ C 时酶全部失活,最适反应 pH 为 4.0~4.4,酶在 pH 3.6~6.0 范围内稳定,酶对 *p*-硝基苯酚- α -半乳糖苷的 $K_m = 1.43\text{mmol/L}$, $V_{max} = 35.71\mu\text{mol}(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$,对蜜二糖的 $K_m = 261\text{mmol/L}$, $V_{max} = 63.69\mu\text{mol}(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$,酶在蜜二糖、棉子糖水体系中不显示转糖基活性。结果说明 Aga1 与已经报道的一种短双歧杆菌的 α -D-半乳糖苷酶不同,是新发现的一种短双歧杆菌的 α -D-半乳糖苷酶。

关键词 双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶 温度诱导表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)02-0241-06

双歧杆菌是人和动物肠道的重要生理性益生菌^[1-3],大量研究证实,从婴儿到成年至老年,年龄、食品结构和疾病都会导致人体肠道中双歧杆菌的数量大幅度减少。双歧杆菌益生菌或低聚糖益生元均可以用于提高人体肠道中双歧杆菌的数量,而低聚糖的稳定性和高效性明显优于益生菌,因此,近年来低聚糖类物质的研究开发成为国内外的研究热点^[4]。

目前已经研究和开发了多种低聚糖,如低聚半乳糖、低聚果糖、低聚甘露糖、低聚木糖、低聚乳果糖、乳酮糖、低聚异麦芽糖、龙胆低聚糖等。双歧杆菌产生的多种糖苷酶,可水解利用这些不可降解性低聚糖,而且其胞外糖苷酶还可降解病原菌表面的复杂多糖,阻止病原菌在肠腔内的定植^[5]。双歧杆菌的多种糖苷酶性质已得到研究,如 α 或 β -半乳糖苷酶、 α 或 β -葡萄糖苷酶、 β -呋喃果糖苷酶、甘露糖苷酶、D-木聚糖苷酶、D-木糖异构酶等^[6],并且发现了某些糖苷酶具有转糖基活性,为酶法合成低聚糖或糖基缀合物的加工提供了新的酶源^[7-9]。

α -半乳糖苷低聚糖是各类低聚糖中最为有效的双歧因子^[10,11],可用来筛选肠道细菌中的双歧杆菌^[12]。 α -D-半乳糖苷酶(α -D-galactosidase, EC3.2.1.22)也可以作为有效的双歧杆菌的鉴定依据之

一^[13,14]。目前双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶基因的报道只有 3 种:青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*) 的 AF124596、长双歧杆菌(*Bi. longum*) 的 AE014784 及短双歧杆菌(*Bi. breve*) 的 AF406640,其中研究工作较全面的是青春双歧杆菌,包括基因克隆、序列分析及酶功能等各个方面^[9,15,16],长双歧杆菌的 α -D-半乳糖苷酶基因只在其基因组序列中推测,没有见到其它方面的研究报道,短双歧杆菌的 α -D-半乳糖苷酶基因由本研究室报道,同时我们还研究了短双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶的产生、纯化及性质研究^[17-19]。本文研究短双歧杆菌(*Bi. breve*) α -D-半乳糖苷酶基因(*aga1*)在大肠杆菌中的温度诱导高效表达及重组酶性质,为双歧杆菌糖苷酶资源的开发和利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、DH10B、BL21 均为本实验室保存,质粒 pBV220 为中国预防医学科学院馈赠。*Bi. breve* 203 及其培养、保存方法参照文献 [19],*E. coli* 培养基为 LB 培养基,重组 *E. coli* 的培养和保存均使用含有氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基。温度诱导表

基金项目 国家自然科学基金(30170008)

* 通讯作者。Tel 86-531-8365128; Fax 86-531-8565610; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

作者简介:陆宇(1980-),男,河南省开封市人,硕士研究生,从事双歧杆菌糖苷酶及其基因研究。E-mail: luyu@life.sdu.edu.cn

其他作者:陈忠民,钱新民

收稿日期:2004-07-12; 修回日期:2004-10-12

达采用 30℃ 培养 A2℃ 诱导表达^[20]。

1.1.2 主要试剂 : *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司 ; *pfu* DNA 聚合酶购自 Sangon 公司 ; *p*-硝基苯酚- α -D-半乳糖苷 (*p*NPGal) 和 4-甲基伞形酮- α -D-半乳糖苷 (4-MUGal) 购自 Sigma ; DEAE Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-150 购自 Amershm Pharmacia Biotech ; Gigapite K-100S 购自日本东亚合成株式会社 ; Amicon ultra PL-10 购自 Millipore ; 牛血清白蛋白购自 PIERCE ; TLC 层析板 (Silica gel 60 , No. 533) 购自 Merck。其它试剂均为分析纯。

1.2 *Bi. breve* 203 α -D-半乳糖苷酶基因 (*aga1*) 的获得

根据本室报道的 *Bi. breve* 203 α -D-半乳糖苷酶基因序列 (AF406640) , *aga1* 基因的理论 ORF 大小为 2.01kb , 位于 nt350 ~ 2359。引物设计采用 PRIMER 2.0 版。上游引物 F 的位置在 nt250 ~ 268 , 序列为 5'-AATAGAAATTCATGTTGGCGCCTGCTCT-3' , 引入 *Eco*RI 酶切位点 ; 下游引物 R 的位置在 nt2377 ~ 2393 , 序列为 : 5'-AATAGGATCCATTCGCTGTGCGCTGTG-3' , 引入 *Bam*H I 酶切位点。从 *Bi. breve* 203 提取染色体 DNA 为模板 , 进行 PCR 扩增 , 扩增的 DNA 片段大小应为 2.1kb。PCR 反应体系 (50 μ L) : 终浓度为 10ng/ μ L 的模板、1 μ mol/L 的引物、200 μ mol/L 的 dNTP , *pfu* DNA 聚合酶 2.5U , 1 \times PCR 缓冲液。反应条件 : 94℃ 5min , 94℃ 1min , 50℃ 1min , 72℃ 3min , 28 个循环 , 72℃ 10min。

1.3 α -D-半乳糖苷酶基因温度诱导表达重组质粒的构建

PCR 扩增片段经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切 , 定向连接到同样双酶切后的 pBV220 质粒上 , 构建重组质粒 pBV*aga1*。感受态细胞的制备、重组质粒的转化和重组子的筛选以及质粒的提取方法 , 按分子克隆进行^[21]。

1.4 重组酶的纯化

粗酶液的制备 : 收集新鲜培养细菌细胞 , 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤并重悬 , 0 ~ 15℃ 超声波破碎细胞 , 10000r/min 离心 30min , 上清液为粗酶液。重组酶纯化的所有过程在 4℃ 下操作。重组大肠杆菌的粗酶液来源于 1L 培养物。除了特别提出外 , 所有步骤采用 10mmol/L , pH7.0 的磷酸钾缓冲液。

1.4.1 硫酸铵沉淀 重组大肠杆菌的粗酶液用 20% ~ 40% 饱和度的硫酸铵沉淀 , 4℃ 过夜后 , 沉淀溶于适量缓冲液中 , 透析备用。

1.4.2 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析 : 将上述样品上柱 (1.5cm \times 15cm) , 以 0 ~ 2mol/L NaCl 的缓冲液梯度洗脱 , 酶活出现在大约 1.5mol/L NaCl 的洗脱缓冲液中 , 合并具有酶活的洗脱液 , 80% 饱和度的硫酸铵沉淀后 , 溶于少量缓冲液中 , 透析备用。

1.4.3 Gigapite K-100S 柱层析 : 将上述样品上柱 (1.5cm \times 30cm) , 以 0 ~ 200mmol/L , pH7.0 的磷酸钾缓冲液梯度洗脱 , 酶活出现在大约 150mmol/L 的磷酸钾洗脱缓冲液中 , 合并具有酶活的洗脱液 , 用 Amicon ultra PL-10 浓缩并除盐 , 为部分纯化样品。

1.4.4 Sephadex G-150 柱层析 : 将部分纯化样品上柱 (1.5cm \times 90cm) , 以含有 100mmol/L NaCl 的缓冲液洗脱。本实验中没有得到具有酶活的蛋白质峰。

1.5 α -D-半乳糖苷酶活力测定

2mmol/L *p*NPGal、50mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.5) 和适当稀释的酶液共 0.18mL , 37℃ 反应 10min 后 , 加入 1.05mL 0.2mol/L pH10.5 硼酸钠缓冲液终止反应 , 测定 OD_{400} (对硝基苯酚的摩尔消光系数 17700) 。活力单位定义 : 每分钟从 *p*NPGal 底物中水解释放 1 μ mol 的硝基苯酚的糖苷酶为一个酶活单位 (U) 。

1.6 蛋白质含量的测定

采用 Bradford 测定法^[21] , 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.7 TLC 薄板层析

糖样品 (10 ~ 30 μ g) 点样 TLC 层析板 , 展层剂 (正丁醇 : 乙醇 : 水 = 5 : 3 : 2) 展开后 , 雾喷显色剂 (20% H₂SO₄、0.5% 3,5-二羟基甲苯水溶液) , 140℃ 加热烘烤约 10min 至糖斑点显色。

2 结果

2.1 重组质粒 pBV*aga1* 的构建

PCR 扩增得到的 DNA 片段长度约为 2.1kb , 与预计的大小相符。双酶切后与载体 pBV220 (3.6kb) 连接 , 得到质粒 pBV*aga1*。对 pBV*aga1* 进行酶切验证 , 结果证明质粒构建成功。

2.2 α -D-半乳糖苷酶基因在 *E. coli* 中的表达

将重组质粒 pBV*aga1* 分别转化 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* DH10B 和 *E. coli* BL21。将重组菌株过夜培养物 , 按 1% 接种量接于含 Amp 100 μ g/mL 的 LB 液体培养基 , 30℃ 培养至 $OD_{600} = 0.5$ 时 A2℃ 诱导 5h , 收集细胞后制备粗酶液并测定 α -D-半乳糖苷酶活力和蛋白含量 , 计算酶的比活。表 1 结果显示重组质

粒 pBV_{agal} 在 3 株大肠杆菌中均得到温度诱导高效表达,粗酶液中 α -D-半乳糖苷酶的比活均高于 *Bi. breve* 203,其中在 *E. coli* DH5 α /pBV_{agal} 中的比活为 28.08 U/mg,是 *Bi. breve* 203 酶比活的 16 倍。

表 1 不同大肠杆菌中重组 α -D-半乳糖苷酶的比活

Strains	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	
	<i>Bi. breve</i> 203	BL21	DH5 α	DH10B
	/pB Vagal	/pB Vagal	/pBV agal	
Specific activity of α -galactosidase (U/mg)	1.76	13.85	28.08	19.44

2.3 质粒稳定性的研究

参照文献 [22] 方法,对重组质粒 pBV_{agal} 在 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* DH10B 和 *E. coli* BL21 中的稳定性进行研究。

从平皿中挑一重组菌单菌落接入 2mL LB 培养基 (Amp100 μ g/mL) 中,30 $^{\circ}$ C 过夜培养后,取 20 μ L 接种不含 Amp 的 LB 培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养 12h,如此转接 3 次,即使菌体在无 Amp 的 LB 培养基中持续生长 48h。最后在细菌生长到 OD₆₀₀ = 0.5 时,42 $^{\circ}$ C 热诱导 5h,诱导前后分别取样,涂于不含 Amp 的 LB 平板上,再分别从每个平板中取 100 个菌落点种于含 Amp 的 LB 抗性平板上,计算每份样品中的菌落对 Amp 的抗性百分数。

表 2 结果显示重组质粒 pBV_{agal} 在 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* DH10B 中稳定性较差,无 Amp 的 LB 培养 4 代共 48h 后温度诱导 5h,抗性菌落分别只有 4% 和 44%;而在 *E. coli* BL21 中稳定性较好,同样实验条件下抗性菌落占 80%,可以满足无抗生素选择压力下大规模生产的要求。

表 2 重组质粒 pBV_{agal} 在不同宿主菌中的稳定性 (%)

Strains	Time of inducement/h	
	0	5
<i>E. coli</i> BL21/pBV _{agal}	92	80
<i>E. coli</i> DH5 α /pBV _{agal}	80	4
<i>E. coli</i> DH10B/pBV _{agal}	86	44

2.4 重组酶的纯化

本实验采用 *E. coli* BL21/pBV_{agal} 进行重组酶纯化的研究。粗酶液经硫酸铵沉淀、DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析、Gigapite K-100S 柱层析及 Amicon ultra PL-10 浓缩分离后,部分纯化样品进一步进行 Sephadex G-150 凝胶过滤层析时,没有得到具有酶活

性的蛋白峰,结果说明重组酶的活性状态分子量大小不均一。部分纯化样品 SDS-PAGE 结果(图 1)显示样品还没有得到完全的纯化,有一条蛋白主带,相应于温度诱导高效表达的蛋白带,分子量约为 67kD。部分纯化过程中酶的比活、蛋白含量的变化以及酶的得率见表 3。

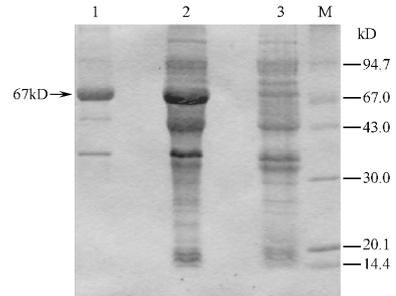


图 1 重组酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of recombinant α -D-galactosidase from recombinant *E. coli* BL21/pBV_{agal}

1. Partial purified recombinant enzyme; 2. Cell-free extract of *E. coli* BL21/pBV_{agal} induced; 3. Cell-free extract of *E. coli* BL21/pBV_{agal} non-induced; M. Molecular marker.

表 3 重组 α -D-半乳糖苷酶的纯化过程

Step	Total protein /mg	Specific activity (U/mg)	Total activity /U	Yield /%
Cell-free extract	95.05	13.85	1316.44	100.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ (20-40%) fractionation	16.46	32.75	539.34	41.15
DEAE Sepharose Fast Flow column chromatography	2.24	72.74	163.14	12.38
Gigapite K-100S column chromatography	0.18	96.52	17.34	1.32

2.5 重组酶酶学性质

SDS-PAGE 结果显示图 1,分子量约 67kD 的蛋白质温度诱导得到高效表达,其占粗酶液总蛋白含量由诱导前的 8.0% 提高到 23.7%,在部分纯化样品中该蛋白质是一条主带,其含量占样品总蛋白的 67.5%,因此可以认为是重组酶蛋白。重组酶粗酶液和部分纯化样品 37 $^{\circ}$ C 与 4-MUGal 反应 10min 后,365nm 下观察到强烈荧光。Native gradient PAGE 后进行 4-MUGal 活性染色,胶中没有显示出集中的活性染色荧光带,荧光有弥散分布的现象。部分纯化样品 Native gradient PAGE 后考马斯亮蓝染色,也没有显示出相应于 67kD 整数倍数的蛋白带。结果说明重组酶的活性状态分子量大小不均一。

以 *p*NPGal 为酶反应底物,于不同的温度下(20~70℃)用常规方法测定相对酶活,求得酶反应的最适温度是 45℃。于不同的温度下将酶保温 30min 后,再用常规方法测定并计算相对酶活,显示酶在 40℃ 以下稳定,50℃ 时剩余约 80% 的酶活,温度大于 50℃ 后酶活急剧下降,60℃ 仅剩余约 5% 的酶活性,70℃ 时酶全部失活。

用 pH 2.25~3.8 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 3.5~6.0 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 5.5~8.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 8.0~10 硼酸-氢氧化钠缓冲液分别配制酶反应体系,用常规方法测定并计算相对酶活,结果显示酶反应的最适 pH 为 4.0~4.4。酶在不同 pH 的缓冲液中 4℃ 过夜后,用常规方法测定相对酶活,结果表明酶在 pH 3.6~6.0 范围内稳定。

Hg⁺、Cu²⁺、Ag⁺ (各 1mmol/L) 和 PCMB (0.01mmol/L) 强烈抑制酶活性, Co²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺ (各 1mmol/L) EDTA 和 DTIC (各 10mmol/L) 对酶活性无抑制,酶对 *p*NPGal 的 $K_m = 1.43\text{mmol/L}$, $V_{max} = 35.71\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$; 酶对蜜二糖的 $K_m = 261\text{mmol/L}$, $V_{max} = 63.69\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。

将重组酶分别与棉子糖和蜜二糖 37℃ 混合进行反应,取不同时间的反应样品进行 TLC 薄板层析分析酶反应产物。图 2 结果显示,重组酶的水解产物随时间增加而逐渐增多,在 24h 反应过程中没有发现转糖基产物,说明该酶在水解 α -D-半乳糖苷键的过程中不存在转糖基活性。

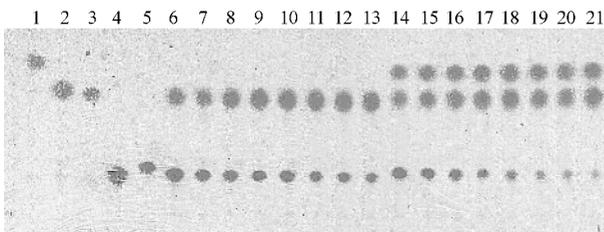


图 2 重组酶水解蜜二糖、棉子糖的反应产物

Fig.2 Reaction products after hydrolysis of melibiose or raffinose by recombinant α -D-galactosidase

1. Glucose; 2. Galactose; 3. Sucrose; 4. Raffinose; 5. Melibiose; 6~13. Raffinose with the enzyme for 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 18h and 24h, respectively; 14~21. Melibiose with the enzyme for 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 18h and 24h, respectively.

3 讨论

低聚糖类物质在肠道细菌中可选择性刺激双歧杆菌的生长,其中分子中含有 α -D-半乳糖苷键的 α -

D-半乳糖苷低聚糖如蜜二糖(Melibiose)、棉子糖(Raffinose)和水苏糖(Stachyose)最为有效。这类低聚糖分子中的 α -半乳糖苷键专一性地为 α -半乳糖苷酶水解。研究发现人源双歧杆菌中广泛存在 α -半乳糖苷酶,但目前见报道的只有青春双歧杆菌(*Bi. adolescentis*)和短双歧杆菌(*Bi. breve*)的 α -半乳糖苷酶得到研究。1999 年 Leder S 等提纯了 *Bi. adolescentis* DSM20083 的 α -半乳糖苷酶,是一个分子量为 344kD 的均一四聚体。4-MUGal 活性染色的结果证明,分子量为 145kD 酶的二聚体也具有酶活性^[15]。同年 Van Laere 等^[7]报道了该酶在蜜二糖、棉子糖和水苏糖的水解体系中具有转糖基活性,并对蜜二糖水解释体系中合成的三糖和四糖进行了结构分析,说明新生成的半乳糖苷键是 α -D-Gal-(1→6)键,且合成的三糖能特异性的刺激双歧杆菌的生长。同年 Broek 等人进一步克隆了 *Bi. adolescentis* 的 α -半乳糖苷酶基因,在大肠杆菌中得到了高效表达,重组酶在水解蜜二糖和水苏糖的反应体系中仍具有转糖基活性^[9]。2000 至 2001 年,本室详细报道了 *Bi. breve* 203 的 α -半乳糖苷酶的产生、纯化及性质,*Bi. breve* 203 的粗酶液在 Native gradient PAGE 电泳后,活性染色观察只有一条活性荧光带,分子量约为 156kD,粗酶液纯化后的酶蛋白单亚基分子量约为 79kD^[19]。

本文研究短双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶基因 *aga1* 在大肠杆菌中的温度诱导高效表达。根据基因 *aga1* 的核苷酸序列分析,*Aga1* 酶蛋白的理论 ORF 为 2.01kb,由 669 个氨基酸残基组成,理论分子量为 74.2kD。本文结果表明,基因 *aga1* 在大肠杆菌中温度诱导高效表达后的重组酶 *Aga1* 的亚基分子量约为 67kD,不是理论值 74.2kD。用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析 *Aga1* 氨基酸序列,在 N-端没有发现可能存在的信号短肽序列,因此我们推测基因 *aga1* 的真正起始位点不是在理论 ORF 的第一个 ATG,而是在第三个 ATG,其理论分子量是 67.95kD。该推测已经通过其它的实验得到了证明:在大肠杆菌中采用基因 *aga1* 的 C-端 6His-tag 标记表达,利用亲和层析提纯了重组酶,其分子量大小与本论文的结果一致,而且标记表达的纯酶其 N-端氨基酸序列分析结果与理论 ORF 中第三个 ATG 开始的氨基酸序列完全相符(结果未在本论文显示)。

E. coli BL21/pBV_{aga1} 温度诱导后,粗酶液的比活为 13.85U/mg,该样品和部分纯化样品(比活

96.52U/mg 37°C 与 4-MUGal 反应 10min 后 365nm 下都显示出强烈荧光,但是在 Native gradient PAGE 电泳后的活性染色中,胶中却没有显示出集中的活性染色荧光带,荧光有弥散分布的现象。部分纯化样品在 Sephadex G-150 分子筛柱层析过程中,也没有对应于酶活的蛋白质峰出现。这些结果都说明重组酶 Aga1 的活性状态分子量大小不均一,蛋白质亚基似没有一种稳定的聚合状态。根据 *Bi. breve* 203 粗酶液的活性染色,只能观察到一种分子量为 156kD 的双亚基 α -D-半乳糖苷酶的结果^[18,49]可以推断,Aga1 酶蛋白或者不存在粗酶液中,或者其活性状态的分子量不均一,在 *Bi. breve* 203 中可能是一个不溶性的细胞蛋白质,存在于细胞膜或者细胞壁等位置。

重组酶 Aga1 和已经报道的 *Bi. breve* 203 的双亚基 α -D-半乳糖苷酶(以下记为 Aga2)除了活性状态和亚基分子量大小的不同,在其它性质上也表现出不同。转糖基活性方面,在棉子糖、蜜二糖的水解体系中,重组酶 Aga1 只表现出水解活性,没有转糖基活性,24h 反应过程中没有转糖基产物出现。但是同样反应条件下,Aga2 却在蜜二糖或棉子糖的水解体系中显示出转糖基活性,其反应体系中存在新的转糖基寡糖产物(图 3)。在温度稳定性和 pH 对

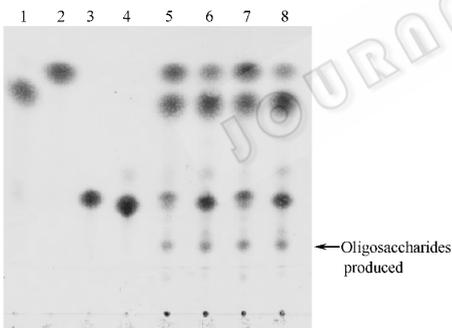


图 3 *Bi. breve* 203 的 α -D-半乳糖苷酶在蜜二糖、棉子糖反应体系中的转糖基活性

Fig.3 Reaction products formed after transgalactosylation of melibiose or raffinose by α -D-galactosidase from *Bi. breve* 203

1. Galactose; 2. Glucose; 3. Melibiose; 4. Raffinose; 5 and 7. Melibiose with enzyme for 12 h and 24 h, respectively; 6 and 8. Raffinose with enzyme for 12 h and 24 h, respectively.

酶的影响等方面,Aga1 在 60°C 仅剩余约 5% 的酶活性,而 Aga2 在 60°C 还具有 80% 的酶活性;Aga1 最适反应 pH(4.0~4.4)和 pH 稳定性(3.6~6.0)均在酸性范围内,明显较 Aga2 的最适反应 pH(5.5~6.5)和 pH 稳定性(5.5~9.5)偏向酸性;Aga1 对天然底物蜜二糖的亲合性较差,其 K_m 为 261mmol/L,远远大于 Aga2 的 K_m (2mmol/L)^[18,49]。

综合以上分析和比较我们可以看出,本文研究的 *Bi. breve* 203 α -D-半乳糖苷酶基因 *aga1* 所对应的 α -D-半乳糖苷酶 Aga1 与已经报道的同一种菌的一种 α -D-半乳糖苷酶(Aga2)在分子量、转糖基活性以及其它部分酶性质上都不同,是新发现的一种 *Bi. breve* 203 的 α -D-半乳糖苷酶,因此 *Bi. breve* 203 中至少存在 2 种 α -D-半乳糖苷酶。有关 Aga2 的基因克隆和进一步的研究工作目前正在积极开展。

致谢 感谢 Hidehiro Kumagai 教授(Laboratory of Applied Molecular Microbiology, Kyoto University)提供短双歧杆菌(*Bi. breve* 203)。

参 考 文 献

- [1] Mitsuoka T. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 1984, (1):11-28.
- [2] Tuohy K M, Probert H M, Smejkal C W, et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today*, 2003, 8:692-700.
- [3] Chen D L, Hashimoto K, Uda Y. *In vitro* digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food and Chem Toxicol*, 2004, 42:351-357.
- [4] 金城. 糖生物学:基因组学和蛋白质组学的延伸. 世界科技研究与发展, 2001, 2:31-34.
- [5] 戴德银, 卢海波, 胡露, 等. 肠道微生态活菌制剂应用进展. 成都医药, 2002, 28(6):371-372.
- [6] 盛清凯, 姚惠源. 低聚糖对肠道菌群的调节机理. 动物科学与动物医学, 2002, 19(2):35-38.
- [7] Van Laere K M, Hartemink R, Beldman G, et al. Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 α -galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(5):681-688.
- [8] Nunoura N, Ohdan K, Yano T, et al. Purification and characterization of β -D-glucosidase (β -D-fucosidase) from *Bifidobacterium breve* clb acclimated to cellobiose. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(2):188-193.
- [9] Broek LAM van den, Ton J, Verdoes J C, et al. Synthesis of α -galacto-oligosaccharides by a cloned α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnol Lett*, 1999, 21:441-445.
- [10] Yazawa K, Imai K, Tamura Z. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by Bifidobacteria. *Chem Pharm Bull*, 1978, 26:3306-3311.
- [11] Tazawa K, Tamura Z. Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 1982, 1:39-44.
- [12] Minami Y, Yazawa K, Nakamura K, et al. Selectivity of utilization of galactosyl-oligosaccharides by Bifidobacteria. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33:710-714.
- [13] Chevalier P, Roy D, Ward P. Detection of *Bifidobacterium* spp. by enzymatic methods. *J Appl Bacteriol*, 1990, 689-674.

- [14] Min H K , Lee S K , Kang K H . Detection of bifidobacteria by α -galactosidase activity. *J Korean Agric Chem Soc* , 1993 , **36** (3) :191 - 196 .
- [15] Leder S , Hartmeier W , Marx S P . α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr Microbiol* , 1999 , **38** :101 - 106 .
- [16] Garro M S , de Giori G S , de Valdez G F , et al . α -D-Galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum* . *Lett Appl Microbiol* , 1994 , **19** :16 - 19 .
- [17] 肖敏,刘树峰,钱新民,等.短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve* 203) α -D-半乳糖苷酶的诱导合成及部分酶性质研究. *山东大学学报(自然科学版)* 2000a , **35** (1) :108 - 115 .
- [18] Xiao M , Tanaka K , Qian X , et al . High-yield production and characterization of α -galactosidase from *Bifido-bacterium breve* grown on raffinose. *Biotechnol Lett* 2000 , **22** (9) :747 - 751 .
- [19] 肖敏,刘树峰,朱崇日,等.短双歧杆菌 α -D-半乳糖苷酶的纯化及性质. *中华微生物学和免疫学杂志* , 2001 , **21** (3) :307 - 311 .
- [20] 张智清,姚立红,侯云德,等.含 $P_{R}P_L$ 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报* , 1990 , **6** (2) :111 - 116 .
- [21] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992 , 16 - 70 .
- [22] 陈炜,何秉旺,张建华,等.短芽孢杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. *微生物学报* , 1997 , **37** (4) :271 - 275 .
- [23] Wakarchuk W W , Kilburn D G , Miller R C , et al . The preliminary characterization of the β -Glucosidase of *Cellulomonas fimi* . *J Gen Microbiol* , 1984 , **130** :1385 - 1389 .

High expression of α -D-galactosidase gene (*agal*) of *Bifidobacterium breve* 203 in *Escherichia coli*

LU Yu ZHAO Han WANG Qin-peng LIU Wei-feng XIAO Min*

(State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan 250100 , China)

Abstract : α -D-galactosidase gene (*agal*) of *Bifidobacterium breve* 203 was cloned into temperature expression vector pBV220 and transformed into *E. coli* . The recombinant plasmid pBVagal was induced to express with temperature. The specific activities of recombinant enzyme Aga1 in *E. coli* DH5 α , *E. coli* DH10B and *E. coli* BL21 were 28.08 U/mg , 19.44 U/mg and 13.85 U/mg , respectively. The recombinant plasmid pBVagal is more stable in *E. coli* BL21. The molecular weight of Aga1 as determined by SDS-PAGE was about 67 kD. The optimum pH of Aga1 was pH 4.0 ~ 4.4 , and it was stable between pH 3.6 and 6.0 (kept at 4 $^{\circ}$ C overnight). The optimum temperature of Aga1 was 45 $^{\circ}$ C , and it was stable below 40 $^{\circ}$ C (incubated for 30min). K_m -values for *p*-nitrophenyl- α -galactopyranoside (*p*NPGal) and melibiose were calculated with 1.43mmol/L and 261mmol/L , respectively. No transgalactosylation activity was found when Aga1 hydrolyzed melibiose or raffinose. The results suggest that Aga1 is much different from reported α -D-galactosidase from *Bi. breve* 203. Aga1 is another kind of α -D-galactosidase in the same bifidobacteria strain.

Key words : Bifidobacteria , α -D-galactosidase , Temperature inducible expression

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30170008)

* Corresponding author. Tel 86-531-8365128 ; Fax 86-531-8565610 ; E-mail : minxiao@sdu.edu.cn

Other authors : CHEN Zhong-min , QIAN Xin-min

Received date 07-12-2004