

烟曲霉菌壳聚糖酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

梁东春 左爱军 郭 刚 张镜宇*

(天津市内分泌研究所 天津 300070)

摘 要 根据 GenBank 中发布的烟曲霉菌壳聚糖酶(*Aspergillus fumigatus* chitosanase, EC3.2.1.132)基因序列人工合成 8 条 DNA 长链及 4 条引物链。DNA 链的设计上在不改变壳聚糖酶氨基酸组成的前提下选择大肠杆菌使用频率高的密码子。PCR 拼接法扩增壳聚糖酶基因并克隆入 pGEM-T easy 载体进行序列分析,进一步亚克隆入表达载体 pGEX-3X。重组质粒 pGEX-Csn 转化 *E. coli* DH5 α IPTG 诱导表达,亲和层析及 Factor Xa 酶解纯化重组 Csn。所得重组壳聚糖酶具有降解壳聚糖的生物活性,其活性受温度及 pH 值的影响。

关键词: 壳聚糖酶基因,克隆,表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)04-0539-04

几丁质(Chitin)又名甲壳素、壳多糖,作为蟹、虾等甲壳类的外骨骼及蘑菇等菌类的细胞壁构成成分,是自然界中储量仅次于纤维素的多糖。壳聚糖(Chitosan)为 Chitin 脱乙酰化的产物,溶解性较 Chitin 有很大提高。壳寡糖(Chito-oligosaccharide)则是壳聚糖进一步降解的产物,具有较低的分子量,呈水溶性,非常容易被人体吸收,作为一种功能性低聚糖,具有杀菌、抗肿瘤、调节人体免疫等功效,在医药、食品等领域中有着广泛的应用前景^[1]。

目前自壳聚糖制备壳寡糖的方法主要有化学降解法及酶解法。化学降解法寡糖得率低,产物分离困难,而且对环境污染严重。酶解法则具有反应条件温和,寡糖得率高,不造成环境污染等优点^[2]。降解壳聚糖的酶可分为专一性酶和非专一性酶,非专一性酶主要包括溶菌酶、脂肪酶、蛋白酶等,其具体作用机制尚不清楚。壳聚糖酶(Chitosanase, Csn)为 70 年代发现的一种可高效、专一水解壳聚糖的酶,分布于从细菌、真菌、病毒到植物的广泛生物群中。目前,国内已有多家实验室开展了利用细菌、真菌等微生物生产壳聚糖酶的工作^[3,4]。野生型产酶菌株的筛选工作复杂,Csn 的产生也不稳定,往往需要于培养基中添加壳聚糖才能够诱导工程菌合成壳聚糖酶。如何高效、稳定的生产壳聚糖酶是其应用上的关键问题,为此,本文尝试进行了以基因工程方法生产壳聚糖酶的研究。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和试剂

质粒 pGEX-3X、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为实验室保存,克隆载体 pGEM-Teasy 购自 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为美国 MBI 公司产品;分子量 5 万的壳聚糖(脱乙酰度 80%)、氨基葡萄糖购自美国 Sigma 公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 购自大连 TaKaRa 生物技术有限公司;Glutathione Sepharose 4B column, Factor Xa 购自美国 Pharmacia 公司。所需引物自行设计,上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 PCR 拼接法扩增烟曲霉菌壳聚糖酶基因

1.2.1 壳聚糖酶基因片段的扩增:根据 GenBank (AJ607393)所发布的烟曲霉菌壳聚糖酶基因序列,合成 8 条 100bp 左右的 DNA 单链(a1, a2, a3, a4, b1, b2, b3, b4)及 4 条引物链(L1, L2, L3, L4)。其中, L1 序列组成为 5'-CAggATCCACAAgggAAAATgTTCCAAg-3', L4 为 5'-gggAATTCCTATgCTTTCAAAC-3', 分别含有限制性内切酶 *Bam*H I 及 *Eco*R I 识别位点。以 ddH₂O 溶解 DNA 单链至 1.0 μ mol/L, 引物链至 4.0 μ mol/L。按图 1 所示方式进行 PCR 拼接,反应管 A 中加入 a1 ~ a4 各 1.0 μ L, 10 \times PCR buffer 5.0 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 4.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1U, ddH₂O 补充体积至 50.0 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min;

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(50233020)

* 通讯作者。Tel: 86-22-23542731; E-mail: zhangjingyu2000@eyou.com

作者简介:梁东春(1972-),男,北京人,副研究员,博士,研究方向为生化及分子生物学。Tel: 86-22-23374555; E-mail: liangdongchun1225@263.net

收稿日期: 2004-12-17; 修回日期: 2005-01-28

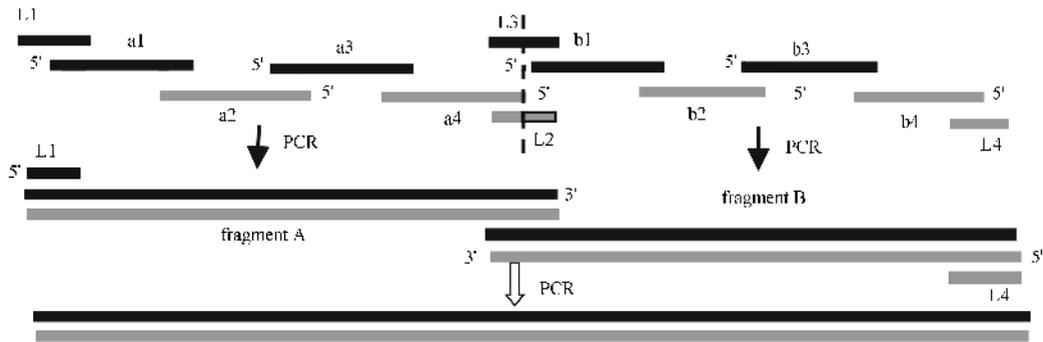


图1 壳聚糖酶基因的 PCR 拼接

Fig.1 PCR connection of complete chitinase gene

■ Complementary DNA sequence ; ■ and ■ Identical DNA sequence.

94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 10个循环后加入 L1、L2 各 2.0 μ L, 以上述条件再进行 32 个循环; 72℃ 延伸 5min。反应管 B 中以 b1~b4 替代 a1~a4, L3、L4 替代 L1、L2, 其余组成及反应方式同反应管 A。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 回收片段 A、B。

1.2.2 全壳聚糖酶基因扩增: PCR 体系组成为 10 \times PCR buffer 5.0 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 4.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1U, 回收的片段 A、B 各 1.0 μ L, L1、L4 各 2.0 μ L, ddH₂O 补充体积至 50.0 μ L, PCR 循环反应条件同上。产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收备用。

1.3 壳聚糖酶基因的克隆

以质粒 pGEM-Teasy 为载体, 与回收的 PCR 产物直接进行连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。挑取单菌落提取质粒, *Eco*R I 酶切筛选重组子, 对重组质粒 pGEM-T-Csn 进行序列分析。

1.4 表达型重组质粒 pGEX-Csn 的构建及在大肠杆菌中的表达

以限制性内切酶 *Eco*R I 及 *Bam*H I 处理重组质粒 pGEM-T-Csn 及表达载体 pGEX-3X, 回收所需 DNA 条带进行连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切筛选重组子。接种含重组质粒 pGEX-Csn 的大肠杆菌 DH5 α 至 LB 液体培养基中, IPTG 诱导表达。收集菌体, 超声碎菌后离心分离上清及沉淀。以梯度浓度的尿素洗涤沉淀, 溶解包涵体于 8mol/L 的尿素溶液中, 水稀释复性。复性液对 PBS 透析 48h, 透析后的复性液对 Glutathione Sepharose 4B 进行亲和层析纯化, 纯化产物(重组融合蛋白 GST-Csn)进行 SDS-PAGE 鉴定。重组 GST-Csn 经 Factor Xa 蛋白酶切处理后再次亲和层析去除担体蛋白 GST。

1.5 重组壳聚糖酶的活性测定

BCA 法(以 BSA 为标准物)对纯化后的重组 Csn

进行蛋白定量。取适量重组 Csn 加入到 1mL 0.5% 壳聚糖乙酸溶液(pH5.4)中, 作用 15min, 煮沸 5min 中止反应, DNS 法测定反应液中还原糖浓度^[5](以氨基葡萄糖(NAG)作标准曲线)。一个酶活力单位(U)定义为 37℃、pH5.4 时, 每分钟释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量。所得重组 Csn 的活性以比活性的方式(U/ μ g)进行表征。同时测定溶菌酶的壳聚糖降解活性作为对照。

1.6 温度和 pH 值对重组 Csn 酶活性的影响

1.6.1 pH 值的影响: 配置不同 pH 值的底物缓冲液(0.05mol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH4.0~5.5), 0.05mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH6.0~9.0))。以不同 pH 值的缓冲液配置 0.5% 的壳聚糖底物溶液, 取 1mL 底物溶液于 37℃ 保温 5min 后加入适量重组 Csn, 按上述方法计算酶活性。将 pH5.4 时的酶活性定义为 100%, 不同 pH 值条件下的酶活性表示为与之比较后的相对活性。

1.6.2 温度的影响: 以 pH5.4 的乙酸缓冲液配置 0.5% 的壳聚糖底物溶液, 取 1mL 底物溶液于不同温度(25~65℃)保温 5min 后, 加入适量重组 Csn, 于各自保温温度中进行酶解反应。将 37℃ 时的酶活性定义为 100%, 不同温度条件下的酶活性表示为相对活性。

2 结果

2.1 壳聚糖酶基因的 PCR 扩增

以所合成的长单链 DNA 为模板成功扩增出与预期大小相符的两条 340bp 左右的 DNA 条带 A 及 B。对 DNA 片段 A、B 进行拼接后得到了 630bp 与全长壳聚糖酶基因大小相符的 DNA 条带。

2.2 壳聚糖酶基因的克隆

质粒 pGEM-T easy 多克隆位点的两端各有一限制性内切酶 *Eco*R I 的识别位点。经 *Eco*R I 酶切鉴

定筛选出重组质粒 pGEM-Csn, DNA 序列分析证实所克隆的壳聚糖酶基因与预期相符 (GenBank: AY787804)。所克隆的序列中对野生型壳聚糖酶基因中的某些碱基进行了定点突变,其中 a21 突变为 t, c264 突变为 g, c297 突变为 g, c309 突变为 g, t438 突变为 g, c447 突变为 g, c459 突变为 g, c495 突变为 g。突变后的密码子并未改变氨基酸编码,但其在在大肠杆菌中的使用频率较原密码子为高。

2.3 重组壳聚糖酶的表达和纯化

经诱导表达,上清及沉淀中均可见目的蛋白条带,目的蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中。经凝胶扫描分析,目的蛋白占沉淀中总蛋白的 63.8%。经包涵体处理及亲和层析纯化后可得到大小约为 46kD 的重组 GST-Csn (图 2)。该重组蛋白经 Factor Xa 处理后水解为 GST 及大小约为 23kD 的重组 Csn (图 3),再一次亲和层析纯化后即得重组 Csn 纯品,蛋白质定量表明重组 Csn 的产率可达 120mg/L 培养基。

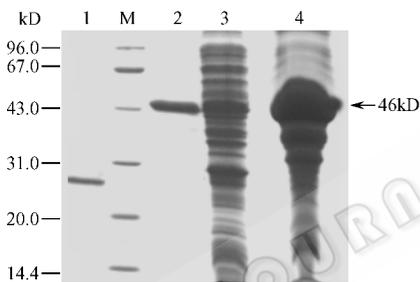


图 2 重组 GST-Csn 的诱导表达及纯化

Fig.2 Expression and purification of recombinant GST-Csn
M. Protein MW marker; 1. Purified GST; 2. Purified GST-Csn; 3. Supernatant of cell lysis 4. Precipitation of cell lysis.

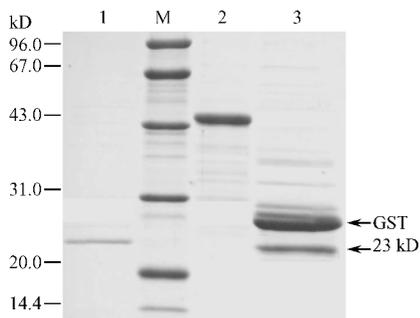


图 3 重组 Csn 的纯化

Fig.3 Purification of recombinant Csn
M. Protein MW marker; 1. Purified Csn 2. GST-Csn 3. Factor Xa digested GST-Csn.

2.4 重组壳聚糖酶的活性测定

测定所得重组壳聚糖酶的比活性为 3200U/mg, 而溶菌酶的降解壳聚糖比活性仅为 5U/mg。重组

Csn 对壳聚糖的降解能力远高于可非特异降解壳聚糖的溶菌酶。

2.5 温度和 pH 值对重组 Csn 酶活性的影响

重组 Csn 的活性受温度及 pH 值的影响,其活性在 pH5.4 及反应温度为 50℃ 时活性最高。

3 讨论

壳聚糖酶可高效降解壳聚糖,颇具经济价值。芽孢杆菌、真菌、青霉菌等多种微生物均能产生壳聚糖酶,当前壳聚糖酶的制备也多是采用由自然界中筛选出产酶微生物,培养后自培养基中加以纯化的方法。壳聚糖酶(Csn)基因在天然菌株中并非持续表达,往往需要环境中存在壳聚糖的存在,才能诱导 Csn 基因的表达。做为产酶工程菌这种天然菌株并不理想。本文克隆了壳聚糖酶基因,并进一步构建了表达载体,希望利用基因工程手段获得稳定的产酶工程菌。所克隆的 Csn 基因为烟曲霉菌壳聚糖酶基因(*Aspergillus fumigatus* Csn gene),该基因的表达产物可高效降解壳聚糖,即可水解壳聚糖中的 GlcNAc-GlcN 糖苷键也可水解 GlcN-GlcN 糖苷键^[6]。

在 Csn 基因的获得上,国外研究机构多采用以 DNA 探针自产酶菌株的 DNA 或 cDNA 文库中调取的方式,所需费用高且实验步骤繁琐^[7]。国内则还未见有关 Csn 基因克隆的报道,所得产酶菌株之 Csn 基因序列均不清楚。因此,无法以 PCR 或 RT-PCR 的方法扩增 Csn 基因。本文根据 GenBank 中所发布的烟曲霉菌壳聚糖酶基因序列,人工合成多条 DNA 单链再通过 PCR 进行拼接,短时间内即完成了烟曲霉菌壳聚糖酶基因的克隆。同时,在 DNA 单链的合成过程中还可对基因进行人为的改造,即在不改变 Csn 氨基酸残基组成的前提下,选取大肠杆菌喜好的密码子以获得重组蛋白的高效表达。烟曲霉菌在密码子的使用上与大肠杆菌区别不大,因此实验中只对野生型壳聚糖酶基因中少数的密码子进行了改造。若进行某些高等真核基因的表达时,则可对基因进行大幅度的改造,优势会更为明显。本文选用融合型表达质粒 pGEX-3X 作为表达载体,其不仅可诱导高效表达重组融合蛋白且所表达的融合蛋白纯化方便,经亲和层析及因子 Xa 酶解即可获得重组目的蛋白纯品。在因子 Xa 酶解过程中如反应条件控制不严格可发生非特异性蛋白水解,且发生部位多位于重组目的蛋白内。由图 3 可见,虽然经因子 Xa 酶解后,重组 Csn 的含量明显少于担体蛋白 GST,但以简易的摇瓶培养方式其产率仍可达 120mg/L。培

培养基,总酶活性近 40 万单位。且优化纯化条件后此产率可进一步提高。而天然产酶菌株的壳聚糖酶产量仅为数 10 个活性单位/L 培养基^[5]。此外,在研究过程中还进行了产酶菌株传代稳定性的实验,即将工程菌连续传代 20 代,第 20 代菌株的表达效率——即重组 Csn 占菌体总蛋白的比例较第一代无明显变化。综上所述,本文成功完成了重组壳聚糖酶在大肠杆菌中的表达,所构建的工程菌较以往筛选所得的天然产酶菌株相比具有培养方便、表达稳定、酶产量高的优点,更适于产业化生产的需要。

参 考 文 献

[1] 竺国芳,赵鲁杭. 几丁聚糖和壳聚糖的研究进展. 中国海洋药物 2000, 1: 43 - 46.

- [2] 向 华,蔡妙颜,郭祀远. 壳低聚糖的制备与应用. 生命的化学 2001, 2(2): 165 - 167.
- [3] 王 艳,周培根,王平平,等. 产壳聚糖酶菌株的初步筛选. 中国微生态学杂志 2003, 15(5): 259 - 260.
- [4] 葛正红,曾 嘉. 青霉菌产壳聚糖酶的分离纯化及性质研究. 中国医药工业杂志 2002, 33(8): 378 - 381.
- [5] 李风平,何 潇,鲍晓明. 壳聚糖酶产生菌的筛选及其酶解产物的初步研究. 山东大学学报(理学版) 2003, 38(1): 96.
- [6] Cheng C Y, Li Y K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 32(3): 197 - 203.
- [7] Zhang X Y, Dai A L, Kouji Kuroiwa, et al. Cloning and characterization of a chitosanase gene from Koji mold *Aspergillus oryzae* strain IAM 2660. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(4): 977 - 981.

Cloning and expression of an *Aspergillus fumigatus* chitosanase gene

LIANG Dong-chun ZUO Ai-jun GUO Gang ZHANG Jing-yu*

(*Institute of Endocrinology of Tianjin, Tianjin 300070, China*)

Abstract: According to published DNA sequence of *Aspergillus fumigatus* chitosanase (Csn) gene, 8 long single DNA strands each about 100bp and 4 DNA primers were designed and synthesised. By PCR, 8 DNA strands were connected into a complete chitosanase gene of 624bp. This chitosanase gene was not identical with its wild type, some point mutations were introduced into its DNA sequence by special design of those 8 DNA strands. These mutations did not change amino acid composition of the chitosanase, however, the codons were changed into *E. coli* favorites. The Csn gene was cloned into plasmid pGEM-Teasy and verified by DNA sequence analysis. Thereafter, Csn gene was subcloned into a fusion-protein expressing vector pGEX-3X. Recombinant plasmid pGEX-Csn was transformed into *E. coli* DH5 α and the transformant was induced expressing with 0.5mmol/L IPTG. Expressing product was analyzed by SDS-PAGE, fusion protein GST-Csn was purified by affinity chromatography. By factor X a digestion GST-Csn was cleaved and GST was taken out by another chromatography. The biological activity of recombinant chitosanase (rCsn) was also detected, as a result the recombinant Csn had a strong ability of degrading chitosan, which was much higher than lysozyme. Its chitosan-degradation activity could be influenced by pH and temperature.

Key words: Chitosanase gene, Cloning, Expression

Foundation item: Key Project of Chinese National Natural Science Fund(50233020)

* Corresponding author. Tel 86-22-23374555; E-mail: zhangjingyu2000@eyou.com

Received date: 12-17-2004