

极端嗜热古菌 *Pyrococcus horikoshii* 几丁二糖脱乙酰酶的克隆、 表达及性质研究

刘 波,倪金凤,申玉龙*

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要 利用 PCR 扩增技术从极端嗜热古菌 *Pyrococcus horikoshii* 中得到预测为几丁二糖脱乙酰酶的基因(Dac_{ph}, PH0499) 将其克隆入表达质粒 pET15b,并在 *E. coli* BL21-codonPlus(DE3)-RIL 中表达获得可溶的 Dac_{ph} 重组蛋白(31.6kDa),TLC 分析证明 Dac_{ph} 能够脱去 N-乙酰氨基葡萄糖及几丁二糖的一个乙酰基,并与氨基葡萄糖苷酶(BglA_{ph}) 共同作用水解几丁二糖生成氨基葡萄糖,从而被命名为一种几丁二糖脱乙酰酶。与 *Pyrococcus horikoshii* 中外切氨基葡萄糖苷酶等共同作用,Dac_{ph} 可能在嗜热球古菌独特的几丁质降解途径中起重要作用。

关键词 掘越氏热球菌;Dac_{ph};几丁二糖脱乙酰酶

中图分类号:Q556;Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)02-0255-04

几丁质是自然界第二大类有机物质,其降解是自然界中营养物质循环利用的重要过程^[1]。最近有研究证实,在古菌中糖类与氨基酸等有机物质的合成与降解途径与真核生物和细菌相比有许多特异之处^[2]。2003 年日本 Tanaka 等^[3]通过对嗜热古菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 中发现的一种外切氨基葡萄糖苷酶(Exo-β-D-Glucosaminidase)的研究,进一步发现并鉴定了与其相关的几丁二糖脱乙酰酶(Diacetylchitobiose Deacetylase)^[4],结合该古菌双功能域几丁质酶(Chitinase)的研究结果^[5,6],提出在该古菌中存在一种新的几丁质降解途径^[4]。然而这一途径在古菌中存在的普遍性,以及其降解几丁质机理的细节仍需要进一步研究。

掘越氏热球菌(*Pyrococcus horikoshii*) 生存于冲绳岛附近海底约 1395 米火山口,发现并报道于 1998 年。其最适生长温度为摄氏 95 ~ 105℃,分类上属广古菌^[7]。该菌的完整基因组已测序^[8],同源比对显示,在其基因组中具有一组非常保守的 ORF,无论基因的大小还是排列方式与 *T. kodakaraensis* KOD1 中几丁质代谢相关基因均具有相似性^[9],因此我们推测在 *P. horikoshii* 中可能存在相似的几丁质降解途径。本文首次将 *P. horikoshii* 基因组中该途径的几丁二糖脱乙酰酶 Dac_{ph} 基因在大肠杆菌中进行表达及纯化,并对其性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与培养基:克隆与表达质粒载体 pET15b、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α、BL21-codonPlus(DE3)-RIL 均为本实验室保存;LB 培养基:每升含 Tryptone 10g, Yeast extract 5g, NaCl 10g, 氨苄青霉素浓度为 100mg/L, 氯霉素浓度为 34mg/L。

1.1.2 酶和引物:限制性内切酶、DNA 连接试剂盒、Probest™ DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品;引物由上海博亚生物公司合成。

1.2 PCR 引物设计及扩增反应

P. horikoshii 基因组 DNA 由日本工业技术院产业综合研究所 Ikuo Matsui 博士赠送。根据 *P. horikoshii* 基因组序列,设计一对引物:上游引物为 5'-TCCACCTCATATGCTAGGTATGAAAGTTCAACACGATGG-3', 划线部分为 *Nde* I 酶切位点;下游引物为 5'-TGTTCGCTGTCGACTAAAATTCTATCTCAAAGGTTTCCCTGTCGTGCC-3', 划线部分为 *Sal* I 酶切位点。以全基因组序列为模板进行扩增,100μL 反应体系:模板 0.5μL(25ng), dNTP(25mmol/L) 0.5μL,引物(100μmol/L)各 0.5μL,10 × 缓冲液 10μL,Probest™ DNA 聚合酶(5U/μL) 0.5μL,超纯水 87.5μL。PCR 反应条件:94℃ 5min,94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,

基金项目:国家基础研究计划项目(2004CB719604),国家自然科学基金(30570012,30470386)

* 通讯作者。Tel:86-531-88362928;E-mail:lyulshen@sdu.edu.cn

作者简介:刘 波(1976-)男,山东省济南市人,博士研究生,主要从事古菌分子生物学方面的研究。E-mail:zertdfgg@126.com

收稿日期:2005-08-01;接受日期:2005-10-18;修回日期:2005-12-09

30 个循环。

1.3 重组质粒的构建

Dac_{ph} 基因的 PCR 产物用 *Nde* I 和 *Sal* I 两种酶切后连接到经同样酶切的 pET15b 上, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 筛选重组质粒, 经双酶切及测序验证后将其命名为 pET15b- Dac_{ph} 。

1.4 基因的诱导表达与蛋白质的纯化

将重组质粒 pET15b- Dac_{ph} 转化 *E. coli* BL21-codonPlus(DE3)-RIL。带有重组质粒的表达菌在 5mL 含 100mg/L 氨苄青霉素和 34mg/L 氯霉素的 LB 液体培养基中进行过夜培养, 然后按 1:100 的体积比转接到 500mL 上述液体培养基中继续培养至 $OD_{600} = 0.5$, 加入 0.05mmol/L IPTG 于 37°C 继续培养 3h, 4°C 8000r/min 离心 15min, 收集细胞后将细胞在含 50mmol/L Tris-HCl 和 50mmol/L NaCl 的缓冲液 (pH 8.0) 中重悬, 然后超声处理以使细胞壁裂解。将裂解液 10000r/min 离心 30min 后弃去沉淀, 上清液经 85°C 处理 30min 后再离心 (10000r/min, 30min) 去除热不稳定蛋白沉淀物, 从而得到粗酶液。将粗酶液继续过镍亲和层析柱得到纯化的酶蛋白。

1.5 Dac_{ph} 的酶活检测

分别以壳二糖与几丁二糖 (0.2mol/L, 各 200 μ L) 为底物, 加入纯化的氨基葡萄糖苷酶 ($BglA_{ph}$), 实验结果另文发表 [5 μ L (630ng)], 70°C 反应一定时间后硅胶薄层层析分析反应产物。展层剂为正丁醇: 甲醇: 氨水: 水 = 5:4:2:1 (V/V/V/V), 以茚三酮 (特异性地对氨基糖显色) 为显色剂分析壳二糖降解产物, 以苯胺二苯胺为显色剂分析几丁二糖降解产物, 80°C 10min 烘干, 显色后分析反应产物 [3]。以苯胺二苯胺为显色剂 (展层剂同上), 分别以 GlcNAc 和 GlcNAc₂ 为底物 (0.2mol/L, 各 200 μ L), 加入纯化的 Dac_{ph} 5 μ L (500ng); 再以几丁二糖为底物, 加入纯化的氨基葡萄糖苷酶 $BglA_{ph}$ 与 Dac_{ph} 各 5 μ L, 75°C 反应一定时间后硅胶薄层层析分析反应产物。

2 结果和分析

2.1 Dac_{ph} 基因序列分析

根据 *P. horikoshii* 与 *T. kodakaraensis* 基因组中保守的 ORF 序列 [8,9] (图 1), 以预测的 Dac_{ph} 基因 (PH0499) 序列做 PSI-Blast, 发现以下 3 种热球古菌具有较高的相似序列: *P. furiosus* (PF0345) (88%); *P. abyssi* (PAB1341) (79%); *T. kodakaraensis* (*Tk-Dac*) (59%)。 Dac_{ph} 基因全长 819bp, 预测全长为 272

个氨基酸序列, 编码分子量大小为 31.6kDa 的蛋白。在 NCBI 进行序列分析, Dac_{ph} 属于 LmbE 蛋白家族 (Pfam02585, COG2120)。基因数据库 (DDBJ) 中登录号为 BA000001。

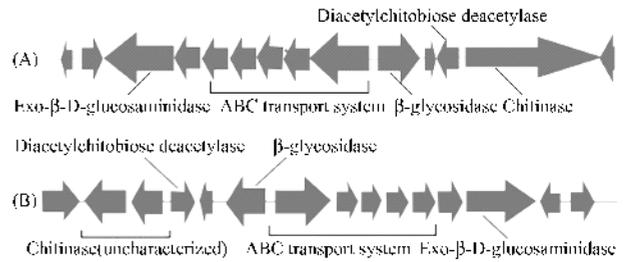


图 1 嗜热古菌 *T. kodakaraensis* (A) 和 *P. horikoshii* (B) 中与几丁质代谢相关的保守基因簇

Fig. 1 Conserved gene cluster of hyperthermophilic archaeon *T. kodakaraensis* (A) and *P. horikoshii* (B) involving in chitin degradation.

2.2 Dac_{ph} 基因的扩增和表达质粒 pET15b- Dac_{ph} 的构建

以全基因组序列为模板, PCR 扩增得到与预期大小相符的目的片段 (819bp)。构建好的重组质粒 pET15b- Dac_{ph} 经双酶切分析, 并进行 DNA 测序证明。结果显示, 克隆的 Dac_{ph} 基因与预期产物 (PH0499) 一致, 表明重组质粒构建正确。

2.3 重组蛋白的表达与纯化

将过镍亲和层析柱纯化得到的酶蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定出一条约 31kDa 的条带 (图 2), 与预测的 Dac_{ph} 的分子量相符, 表明 Dac_{ph} 蛋白经镍亲和层析柱已纯化。

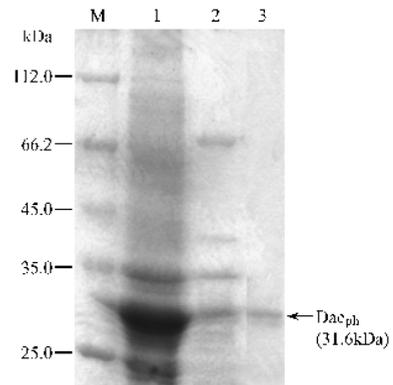


图 2 Dac_{ph} 蛋白在 *E. coli* BL21-codonPlus (DE3)-RIL 中的表达与纯化

Fig. 2 Expression and purification of Dac_{ph} in *E. coli* BL21-codonPlus (DE3)-RIL. M, Marker; 1, Crude extract; 2, Crude extract after heat incubation (30min at 85°C); 3, Purified enzyme after nickel column purification (Novagen).

2.4 Dac_{ph} 的酶性质鉴定

了一种外切氨基葡萄糖苷酶 BglA_{ph} (PH0511), 如图 3 所示, 它能将壳二糖(单体为氨基葡萄糖)水解, 生成氨基葡萄糖(图 3-A), 而对几丁二糖(单体为 N-乙酰氨基葡萄糖)没有水解作用(图 3-B), 其作用机制是将还原性一端具有 GlcN 的几丁类有机物脱去 GlcN。根据在 *T. kodaka-raensis* 中的研究, Dac_{ph} 基因很可能具有脱乙酰酶的活性。如图 4 所示, Dac_{ph} 能将 N-乙酰氨基葡萄糖脱去乙酰基生成氨基葡萄糖(图 4-A, 泳道 3), 同时水解几丁二糖生成介于 N-乙酰氨基葡萄糖与氨基葡萄糖层析点位置之间的产物(图 4-B, 泳道 3), 说明 Dac_{ph} 对几丁二糖具有部分脱乙酰基的作用, 生成 GlcN-GlcNAc。而在 BglA_{ph} 和 Dac_{ph} 的

共同作用下, 水解几丁二糖生成氨基葡萄糖(图 5, 泳道 3)。结合上述试验结果, 可以得出以下作用过程: Dac_{ph} 能够将几丁二糖先脱去乙酰基, 生成部分脱乙酰化的 GlcN-GlcNAc, 然后在 BglA_{ph} 的作用下生成 GlcNAc 与 GlcN, 最后 Dac_{ph} 将 GlcNAc 再脱去乙酰基从而生成最终产物氨基葡萄糖, 因此 Dac_{ph} 可鉴定为几丁二糖脱乙酰酶。

3 讨论

在对 Dac_{ph} 诱导表达时我们发现 IPTG 浓度高时, 目的蛋白在细胞内大量表达, 但在粗酶液中未能得到可溶的目的蛋白, 降低 IPTG 浓度至 0.05mmol/L 时才能得到相对较多的 Dac_{ph}。分析认为 Dac_{ph} 在细胞内大量表达, 但大部分形成包涵体, 降低诱导浓度使 Dac_{ph} 在胞内正确折叠、修饰或组装可使其在胞内以较多的可溶形式存在^[10]。

依据序列相似性, Dac_{ph} 属于 LmbE 蛋白家族 (Pfam02585, COG2120)。而已经报道的真菌与昆虫的几丁质脱乙酰酶、根瘤菌几丁寡糖脱乙酰酶属于多糖脱乙酰酶家族 (Pfam01522, COG0726), 细菌 GlcNAc6P 脱乙酰酶属于酰胺水解酶家族 (Pfam01979, COG1820)^[4]。而且 Dac_{ph} 氨基酸序列与 LmbE 蛋白家族中的 N-乙酰氨基葡萄糖磷脂酰肌醇脱乙酰酶、2-脱氧- α -D-吡喃型葡萄糖甘脱乙酰酶也无较高的相似性, 说明这种脱乙酰酶可能具有独特的作用机制^[4]。进一步研究 Dac_{ph} 对几丁质类有机物质的水解作用, 从而揭示其在几丁质代谢过程中的作用是我们进一步的工作。同时, 迄今对脱乙酰酶的结构分析很少, 对 Dac_{ph} 三维结构以及催化结构域与催化残基的进一步研究对深入了解其结构与功能的关系具有重要的意义。

已经报道的古菌许多有机物代谢的途径与真核生物与原核生物相比有许多特异之处^[11]。如前所述, 在 *T. kodakaraensis* KOD1 中存在一种新的几丁质降解途径, 而且这种途径在极端热球古菌中可能是保守的。本研究结果表明在热球菌 *P. horikoshii* 中 Dac_{ph} 具有与 *T. kodakaraensis* KOD1 中几丁二糖脱乙酰酶相同的催化性质, 因此使这种推测有了进一步的依据。我们已经从中鉴定了外切 β -D-氨基葡萄糖苷酶(待发表), 进一步鉴定在 *P. horikoshii* 中几丁质降解的所有酶系, 从而最终阐明该古菌的几丁质降解途径是今后研究方向。

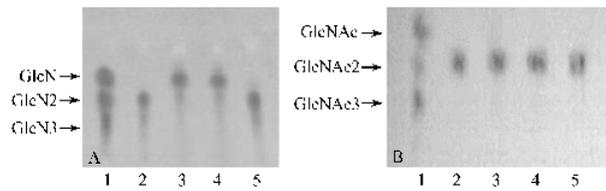


图 3 BglA_{ph} 对壳二糖及几丁二糖的水解

Fig.3 The hydrolytic activity of BglA_{ph} towards GlcN2 and GlcNAc2. A: GlcN2 as the substrate. Ninhydrin reagent was used for staining. B: GlcNAc2 as the substrate. Aniline diphenylamine reagent was used for staining. 1. GlcNAc1-3 standards; 2. Before the reaction; 3. Reaction for 1 hour; 4. Reaction for 2 hours; 5. Control without enzyme.

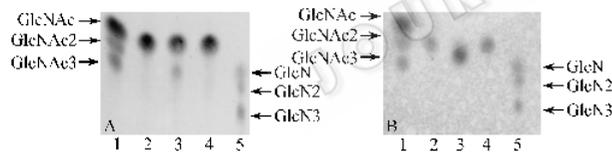


图 4 Dac_{ph} 对 N-乙酰氨基葡萄糖及几丁二糖的水解

Fig.4 The hydrolytic activity of Dac_{ph} towards GlcNAc and GlcNAc2. A: GlcNAc as the substrate. B: GlcNAc2 as the substrate. 1. GlcNAc1-3 standards; 2. Before the reaction; 3. Reaction for 2 hours; 4. Control without enzyme; 5. GlcN1-3 standards. Aniline diphenylamine reagent was used for staining.

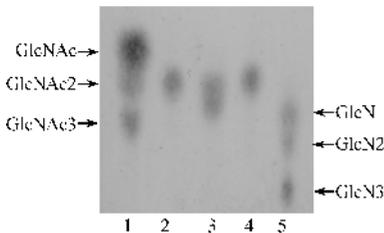


图 5 Dac_{ph} 及 BglA_{ph} 协同作用对几丁二糖的水解作用

Fig.5 The concerted reaction of Dac_{ph} and BglA_{ph} in the degradation of GlcNAc2. 1. GlcNAc1-3 standard; 2. Before the reaction; 3. Reaction for 2 hours; 4. Control without enzyme; 5. GlcN1-3 standards. Aniline diphenylamine reagent was used for staining.

参 考 文 献

- [1] Andronopoulou E , Vorigas C. Purification and characterization of a new hyperthermostable , allosamidin-insensitive and denaturation-resistant chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus* . *Extremophiles* , 2003 , **7** : 43 – 53 .
- [2] Verhees C , Kengen S , Tuininga J , *et al.* The unique features of glycolytic pathways in Archaea . *Biochem J* , 2003 , **375** : 231 – 246 .
- [3] Tanaka T , Fukui T , Atomi H , *et al.* Characterization of an exo- β -D-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 . *J Bacteriol* , 2003 , **185** : 5175 – 5181 .
- [4] Tanaka T , Fukui T , Fujiwara S , *et al.* Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and exo-beta-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 . *J Biol Chem* , 2004 , **279** : 30021 – 30027 .
- [5] Tanaka T , Fujiwara S , Nishikori S , *et al.* A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 . *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 5336 – 5344 .
- [6] Tanaka T , Fukui T , Imanaka T. Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 . *J Biol Chem* , 2004 , **279** : 35629 – 35635 .
- [7] Gonzalez J , Masuchi Y , Robb F , *et al.* *Pyrococcus horikoshii* sp. nov. , a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough . *Extremophiles* , 1998 , **2** : 123 – 130 .
- [8] Kawarabayasi Y , Sawada M , Horikawa H , *et al.* Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium , *Pyrococcus horikoshii* OT3 . *DNA Research* , 1998 , **5** : 55 – 76 .
- [9] Fukui T , Atomi H , Kanai T , *et al.* Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes . *Genome Research* , 2005 , **15** : 352 – 363 .
- [10] Kaper T , Heusden H , Loo B , *et al.* Substrate specificity engineering of β -mannosidase and β -glucosidase from *Pyrococcus horikoshii* by exchange of unique active site residues . *Biochemistry* , 2002 , **41** : 4147 – 4155 .
- [11] Gaasterland T. Archaeal genomics . *Current Opinion in Microbiology* , 1999 , **2** : 542 – 547 .

Cloning , expression and biochemical characterization of a novel diacetylchitobiose deacetylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*

LIU Bo , NI Jin-feng , SHEN Yu-long*

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

Abstract : Chitin is the second most abundant organic compound in nature and the degradation of this biomass is an important process in the recycling of nutrients in the environments. Several biodegradation pathway of chitin have been classified in eukaryotes and bacteria, and a unique chitin degradation pathway was proposed according to recent studies on hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. In the genome of *Pyrococcus horikoshii*, several ORFs show high homology to the chitin-degrading related genes from *T. kodakaraensis*, therefore *P. horikoshii* is likely to have the same chitin degrading pathway as that of *T. kodakaraensis*. In order to further characterize the novel chitin degrading pathway in thermophilic archaea, a diacetylchitobiose deacetylase from *P. horikoshii* (Dac_{ph}) was studied in the present study. Dac_{ph} belongs to the LmbE-like protein family and the amino sequence is not related to the other deacetylases studied before (except that in *T. kodakaraensis*). The gene (Dac_{ph} , PH0499) from the hyperthermophilic archaeon *P. horikoshii* was amplified by polymerase chain reaction, cloned into expression vector pET15b, and expressed in *E. coli* BL21-codonPlus²-DE3-RIL. A soluble fraction of Dac_{ph} (31.6kDa) was obtained as shown by SDS-PAGE. TLC analysis showed that Dac_{ph} is able to deacetylate one acetyl group of $GlcNAc_2$ and $GlcNAc$. By the concerted reaction with the Exo- β -D-Glucosaminidase ($BglA_{ph}$), it is also able to convert $GlcNAc_2$ into $GlcN$. It is concluded that PH0499 is a diacetylchitobiose deacetylase. By reaction together with Exo- β -D-Glucosaminidase in *P. horikoshii*, Dac_{ph} probably plays a key role in the new chitin degradation pathway in hyperthermophilic archaea (the genera *Thermococcus* and *Pyrococcus*).

Keywords : *Pyrococcus horikoshii* ; Dac_{ph} ; Diacetylchitobiose deacetylase

Foundation items : National Basic Research Program of China (2004CB719604) ; National Natural Science Foundation of China (30570012 , 30470386)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-531-88362928 ; E-mail : yulgshen@sdu.edu.cn

Received : 1 August 2005 / Accepted : 18 October 2005 / Revised : 9 December 2005