

链霉菌 ZG0429 的分类鉴定与链霉亲和素的分离纯化研究

张 蕾, 刘春琴, 高智慧, 曹 宇, 白 钢*

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘 要: 从土壤中筛选得到 1 株高产链霉亲和素的放线菌 ZG0429, 根据形态观察、培养特征、生理生化鉴定以及 16S rRNA 序列分析, 初步判定该菌株为链霉菌属中的淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*)。经发酵 ZG0429 的链霉亲和素产量可达 201.0 mg/L。进一步采用硫酸沉淀和凝胶过滤层析纯化, 链霉亲和素的回收率为 76.87%, 纯度可以达到 97.03%。该方法简单易行, 成本低廉, 可得到高产量、高纯度、高活性的目的蛋白, 为链霉亲和素发酵产品的大规模纯化提供了依据。

关键词: 链霉亲和素, 淡紫灰链霉菌, 分类鉴定, 分离纯化

中图分类号: Q936, Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0007-04

链霉亲和素 (Streptavidin) 作为一种非糖基化的中性蛋白质, 于 1963 年首次从阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 培养液中发现并分离得到^[1]。由于链霉亲和素与生物素分子的结合具有高亲和力、强特异性、多级放大以及可行使桥联作用等特征, 使得生物素-链霉亲和素系统在低成本纯化、高灵敏度检测以及其它方面具有十分重要的实用价值^[2]。目前开发出的可与链霉亲和素特异性可逆结合的链霉亲和素结合肽标签 (Strep-标签), 又有力地推动了真核细胞表面展示技术, 以及蛋白质之间相互作用等方面的研究^[3]。鉴于阿维丁链霉菌产生链霉亲和素的能力有限, 链霉亲和素已先后在大肠杆菌^[4]、苏云金芽孢杆菌^[5]等细菌中成功地获得表达。但以包涵体形式的表达, 也带来了表达蛋白溶解性较差, 易于聚集, 天然活性降低等弊端^[6], 因此筛选高产链霉亲和素的菌株显得十分必要。

本实验室从自然界中筛选得到 1 株高产链霉亲和素的菌株 ZG0429, 经过形态观察, 生理生化特征检测以及 16S rRNA 相似性比较, 初步判定为淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*)。通过对该菌株产生链霉亲和素分离纯化的研究, 得到高产量、高纯度、高活性的目的蛋白, 为进一步产业化生产链霉亲和素奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 本实验室从辽宁、天津、河北、河

南、云南等地采集的 111 个土样中得到 920 株放线菌, 其中产链霉亲和素的菌株有 16 株, 高产菌株 3 株。本实验选择 ZG0429 菌株为出发菌株进行研究。

1.1.2 培养基: ①种子培养基成分: 每升含可溶性淀粉 10g、天冬酰胺 7g、蛋白胨 2g、酵母粉 0.5g、 $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.1g、 $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, pH 8.0。②发酵培养基成分: 每升含葡萄糖 35g、牛肉膏 4g、酵母粉 1.8g、蛋白胨 3g、NaCl 11g、 $CaCO_3$ 6.5g, pH 8.5。100kPa, 灭菌 20min。所用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自北京鼎国生物工程公司; PCR 引物由北京三博远志生物有限责任公司合成; 活化生物素 (sulfo-NHS-LC-BiotinEZ-Link™) 购自 Pierce 公司; 牛血清白蛋白 (BSA), 辣根过氧化物酶, 邻苯二胺 (OPD), 3', 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 和链霉亲和素标准品购自 Sigma 公司。菌株形态观察使用 FEI 公司 ESEM Quanta 200 扫描电子显微镜; PCR 扩增使用 Biometra 公司的 T-gradient PCR thermocycler; 链霉亲和素的含量和纯度的测定分别使用 BIOTECH 公司的 ELX800 型酶标仪和岛津公司的高效凝胶排阻色谱 (HPSEC) 系统。

1.2 菌株 ZG0429 的鉴定

1.2.1 形态特征: 采用高氏 1 号平板培养基进行埋片培养, 28℃ 培养 5d。取埋片用 2.5% 戊二醛固定 12h 后, 用 pH 7.2 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 转入 1% 锇酸溶液中固定 1h, 再用上述缓冲液漂

* 通讯作者。Tel/Fax 86-22-23508371, E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

作者简介: 张 蕾 (1983 -), 女, 北京人, 硕士研究生, 从事放线菌分类鉴定及发酵研究。E-mail: leihengqin@mail.nankai.edu.cn

收稿日期: 2006-04-27, 接受日期: 2006-05-31, 修回日期: 2006-06-28

洗3次,经50%、70%、90%和100%乙醇梯度脱水,置醋酸异戊酯中20min,取出,临界点干燥,喷金后于扫描电子显微镜下观察菌体形态特征。

1.2.2 培养特征和生理生化特性 依据《链霉菌鉴定手册》^[7]和《放线菌分类基础》^[8]中推荐的常用微生物鉴定方法观察并记录菌株的培养特征与生理生化特性。

1.2.3 16S rRNA 序列分析 放线菌 ZG0429 基因组 DNA 的提取采用微波快速提取法^[9],并以此为模版进行 PCR 扩增。16S rRNA 扩增用 PCR 引物 (Primer A: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'; Primer B: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 扩增条件: 95℃ 5min, 94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 延伸 80s, 进行 30 个循环; 72℃ 10min。PCR 产物测序由北京三博远志生物有限责任公司完成。将所测得的 16S rRNA 序列与 GenBank 数据库中的 16S rRNA 序列进行相似性比较分析,并利用 DNAMAN 5.0 软件绘制系统发育进化树。

1.3 放线菌 ZG0429 的发酵培养

放线菌 ZG0429 在高氏 1 号平板上, 28℃ 生长 7d。挑取单菌落接种于摇瓶种子培养基培养 1d, 以 1% 的接种量接入 50mL 发酵培养基 28℃ 培养 10d。

1.4 链霉亲和素的分离纯化

将链霉亲和素产生菌 ZG0429 的发酵液于 8000r/min 离心 10min, 取上清液, 加入饱和硫酸至终浓度 80%, 放置 4h, 12000r/min 离心 20min。将沉淀溶解于无菌水中进行 Sephadex G-50 凝胶过滤层析 (30cm × 1.6cm), 用蒸馏水洗脱, 检测流出液中链霉亲和素的活性。合并活性峰, 用聚乙二醇 20000 浓缩后进行 Sephadex G-200 凝胶过滤层析 (60cm × 2.3cm), 收集合并含有链霉亲和素的活性峰, 并对其含量、纯度和活性进行鉴定。

1.5 链霉亲和素的含量测定

1.5.1 Lowry 法测定蛋白含量 按文献^[10]进行。

1.5.2 ELISA 法定量测定链霉亲和素 取 10μg/mL 生物素化兔 IgG 抗体于酶标板各孔中, 37℃ 放置 2h, 包被酶标板。封闭后, 分别加入系列稀释的链霉亲和素样品溶液 100μL, 室温反应 30min 后, 充分振荡洗涤 5 次, 加入 2000 倍稀释的生物素化辣根过氧化物酶 100μL, 室温反应 30min。清洗后, 加入 OPD 底物溶液 100μL, 反应 10min, 加入 1mol/L H₂SO₄ 50μL 终止反应, 于 490nm 处测定吸光度。

1.6 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

SDS-PAGE 参照 Laemmli 方法^[11]采用 8% 分离胶

和 4% 浓缩胶, 并用考马斯亮蓝 R-250 染色。为了保证链霉亲和素的结合活性, 先将电泳胶放入 1% Triton X-100 溶液中浸泡 1h 除去 SDS, 再转移至硝酸纤维素膜上, 用生物素化辣根过氧化物酶反应后, 以 DAB 底物显色进行免疫印迹分析^[12]。

1.7 HPSEC 分析

采用高效液相排阻层析 (HPSEC) 系统对链霉亲和素的纯度进一步分析。色谱柱: TSK-GEL G2000SWXL (30cm × 7.8mm), 进样体积 20μL。流动相: PBS (0.02mol/L 磷酸缓冲液, 0.15mol/L NaCl, pH 7.4) 流速 0.8mL/min, 检测波长 280nm, 柱温 25℃。

2 结果

2.1 菌种的分离与筛选

从采集的 111 个土样中分离得到了 920 株放线菌, 采用 ELISA 法筛选得到具有链霉亲和素分泌活性的菌株 16 株, 其中 ZG0429 的链霉亲和素产量最高并且分泌活性稳定。因此, ZG0429 菌株被选用于进一步的研究工作。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态特征 ZG0429 菌株在高氏 1 号培养基上气生菌丝发达, 呈淡紫灰色。显微镜观察可见 (图

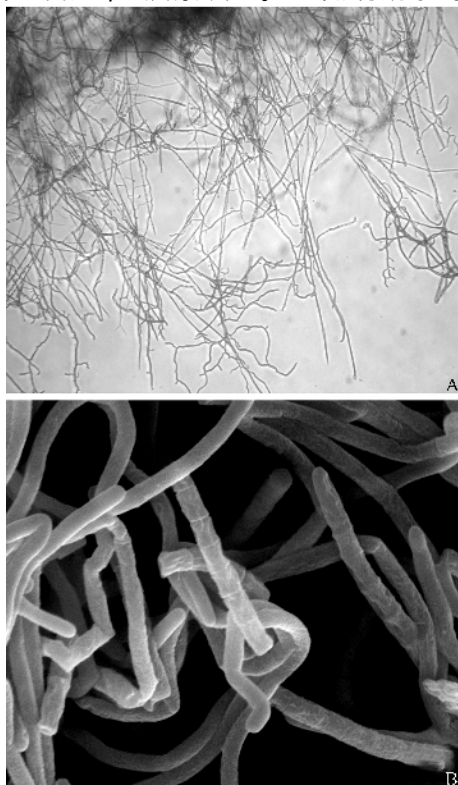


图 1 ZG0429 的显微镜照片 (250 ×) (A) 和扫描电镜照片 (20000 ×) (B)

Fig. 1 ZG0429 in microscope (250 ×) (A) and in Scanning Electron

1-A) 孢子丝较直, 20000 倍电镜下观察气生菌丝体形成孢子链, 孢子圆柱形, 成串生长, 呈竹节状, 表面光滑无刺(图 1-B)。

2.2.2 培养特征: ZG0429 菌株在高氏合成 1 号琼脂中气生菌丝淡紫色, 基内菌丝麦秆黄色; 马铃薯浸汁琼脂中气生菌丝豆蔻紫色, 基内菌丝褐色; 淀粉琼脂中气生菌丝淡紫色, 基内菌丝杏仁黄色; 察氏琼脂中气生菌丝紫色, 基内菌丝白色; 葡萄糖天门冬素琼脂中气生菌丝灰白色, 基内菌丝黄色。可见 ZG0429 菌株气生菌丝和基内菌丝颜色变化均不明显, 但在同种培养基上气生菌丝和基内菌丝之间颜色变化较大, 且在土豆培养基上产生褐色的可溶性色素, 而在其他培养基上无色素产生。

2.2.3 生理生化特性: ZG0429 能使淀粉水解、明胶液化、牛奶酪化和凝固, 产生黑色素; 不产生硫化氢, 不水解纤维素; 可利用葡萄糖、木糖、果糖、甘露糖、山梨糖、半乳糖和甘露醇作为碳源生长, 不利用鼠李糖、蔗糖、肌醇和棉子糖。

2.2.4 16S rRNA 全序列的相似性比较和系统发育分析: ZG0429 菌株的 16S rRNA 核酸序列全长为 1513bp。将所测序列与 GenBank 数据库中的相关种进行比较, 构建以 16S rRNA 全序列为基础的系统发育树。如图 2 所示, ZG0429 菌株与链霉菌属 (*Streptomyces*) 同源性都很高, 其中与淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) 具有 99.01% 的相似性而与

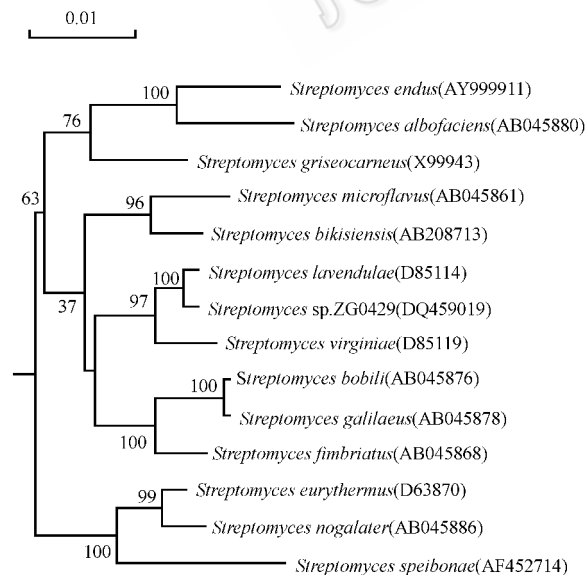


图 2 依据 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationships among reference strains and experimental strains based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 1% sequence divergence.

维几尼亚链霉菌 (*Streptomyces virginiae*) 的相似性为 98.61%。结合形态学特征、培养特征和生理生化特征分析, 将菌株 ZG0429 的分类地位确定为链霉菌属淡紫灰链霉菌。并将 ZG0429 菌株的 16S rRNA 碱基序列提交 GenBank, 登记号: DQ459019。

2.3 链霉亲和素的分离纯化

以上述培养条件对链霉菌 ZG0429 进行发酵培养, 取发酵液 50mL, 经由硫酸沉淀、Sephadex G-50 脱盐和 Sephadex G-200 柱层析得到纯化 37.59 倍的链霉亲和素。如表 1 所示, 其活性收率和纯度分别达到 76.87% 和 96.38%。SDS-PAGE 和免疫印迹分析结果表明, 在分子量为 61.0kDa 处出现单一活性蛋白质条带(图 3)。由 HPSEC 的结果确证(图 4), 纯度可达到 97.03%, 与经过三步纯化后的链霉亲和素纯度测定结果基本一致。

表 1 发酵液中链霉亲和素的纯化

Purification step	Protein (mg/L)	Streptavidin (mg/L)	Recovery (%)	Purity (%)	Purification factor
Supernatant	2740.0	201.0	/	2.6	/
Ammonium sulfate precipitation	2446.0	189.3	94.2	7.7	3.0
Sephadex G-50	293.5	177.0	88.1	60.3	23.5
Sephadex G-200	160.3	154.5	76.9	96.4	37.6

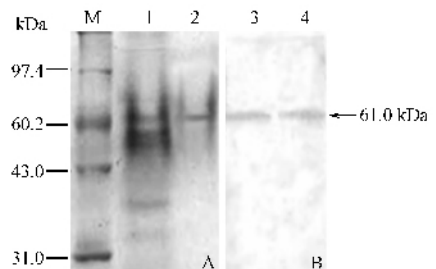


图 3 SDS-PAGE (A) 和免疫印迹分析 (B)

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blot analyse (B). M: protein marker; 1 and 3: ferment productions; 2 and 4: purified productions.

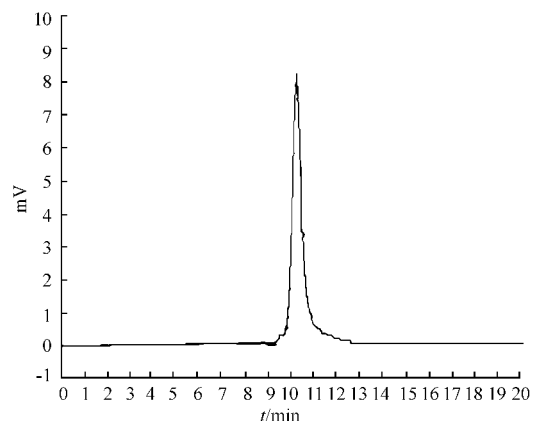


图 4 链霉亲和素纯化产物的 HPSEC 分析

Fig. 4 HPSEC analyse of purified streptavidin.

3 讨论

自 1963 年 Stapley 等采用肉汤培养基培养阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 发现链霉亲和素以后, 国内外学者对其性质和应用进行了大量的研究^[2], 但研究对象均局限于产量较低的菌株的生物学研究^[13]。本实验室从土壤中分离得到的链霉菌 ZG0429 菌株作为研究的出发菌株, 经菌种鉴定, 包括形态和培养特征、生理生化试验以及 16S rRNA 序列的同源性比较, 确认 ZG0429 为淡紫灰链霉菌。目前, 国内外大规模发酵生产链霉亲和素的出发菌株多为阿维丁链霉菌, 有关淡紫灰链霉菌的此类报道较少。

本文使用含有葡萄糖、牛肉膏、酵母粉等成分的培养基发酵培养 ZG0429, 经发酵条件优化链霉亲和素产量可以达到 201.0 mg/L, 高于报道菌株发酵生产链霉亲和素的 40~70 mg/L^[13, 14]。其天然产物的高产量为其后续的纯化工作提供了物质基础。

目前链霉亲和素的纯化工艺相对成熟, 国内外对其分离普遍采用离子交换层析^[14]和亲和层析^[13]等方法。1980 年, Hofmann 等首次采用偶联有亚氨基生物素的 Sepharose 4B 亲和纯化链霉亲和素^[15], 现在已有多家公司出售该产品的亲和层析柱, 以及采用磁性微球纯化链霉亲和素, 虽然上述操作简便快速, 纯化产物纯度高, 但是由于价格昂贵, 色谱柱体积有限, 一般很难应用于产业化制备链霉亲和素。本实验室采用自行改进的链霉亲和素纯化方法, 通过硫酸铵沉淀, Sephadex G-50 和 Sephadex G-200 层析三步可分离得到高纯度高活性的目的蛋白。该方法简单易行, 为链霉亲和素发酵产品的大规模纯化提供了依据。

参 考 文 献

- [1] Stapley EO, Mata JM, Miller IM, et al. Antibiotic MSD-235. I. Production by *Streptomyces avidinii* and *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1963, **16**(1): 20-27.
- [2] Schettters H. Avidin and streptavidin in clinical diagnostics. *Biomolecular engineering*, 1993, **16**(1-4): 73-78.
- [3] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 2003, **20**(5): 523-533.
- [4] Gallizia A, de Lalla C, Nardone E, et al. Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 1998, **14**(2): 192-196.
- [5] Wu SC, Hassan Qureshi M, Wong SL. Secretory production and purification of functional full-length streptavidin from *Bacillus subtilis*. *Protein expression and purification*, 2002, **24**(3): 348-356.
- [6] Pahler A, Hendrickson WA, Kolks MA, et al. Characterization and crystallization of core streptavidin. *The journal of biological chemistry*, 1987, **262**(29): 13933-13937.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975.
- [8] 阮继生. 放线菌分类基础. 北京: 科学出版社, 1977.
- [9] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, **30**(4): 82-84.
- [10] Lowry OH, Rosenbrough NH, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, 1951, **193**(1): 265-275.
- [11] Lamli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**(259): 680-685.
- [12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1995.
- [13] 刘丽, 闫振权, 王秀芳, 等. 分泌链霉亲和素菌株的筛选及所产链霉亲和素性质的研究. *河北医科大学学报*, 2001, **22**(5): 257-261.
- [14] Bayer EA, Ben-Hur H, Gitlin G, et al. An improved method for the single-step purification of streptavidin. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 1986, **13**(2): 103-112.
- [15] Hofmann K, Wood SW, Brinton CC, et al. Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1980, **77**(8): 4666-4668.

Research on the classification of *Streptomyces* strain ZG0429 and purification of streptavidin

ZHANG Lei, LIU Chun-qin, GAO Zhi-hui, CAO Yu, BAI Gang*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Actinomycete strain ZG0429 with high production of streptavidin was isolated from soil samples. Based on the results of morphological, physiological, chemotaxonomic characteristics and 16S rRNA analysis, strain ZG0429 was placed within the genus *Streptomyces* and identified as the species *Streptomyces lavendulae*. The production reached 201.0 mg/L under our fermentation conditions. With the effective system of ammonium-sulfate deposition and gel filtration chromatography, streptavidin was successfully purified from the culture supernatant with an overall recovery of 76.87% and purity of 97.03%. This study illustrates an effective and inexpensive method to produce the aimed protein with favorable yield, high purity and desirable activity, so it provides a valuable reference for the large-scale industrial production and isolation of streptavidin.

Keywords: streptavidin; *Streptomyces lavendulae*; classification and characterization; isolation and purification

* Corresponding author. Tel/Fax 86-22-23508371; E-mail: gangbai@nankai.edu.cn