

高效表达 N-乙酰高丝氨酸内酯酶-木聚糖酶融合蛋白及其酶学性质

张美超, 曹雅男, 姚斌, 周志刚*

中国农业科学院饲料研究所, 农业部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081

摘要 【目的】构建 N-乙酰高丝氨酸内酯酶-木聚糖酶双酶活性表达毕氏酵母重组菌株, 并对经纯化的重组蛋白 SL2B 进行 N-乙酰高丝氨酸内酯酶及木聚糖酶酶学性质的研究。【方法】利用 PCR 拼接技术得到 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因 *aiiA-B546* 和木聚糖酶基因 *xynAS27cd* 融合而成的基因 *SL2b*。构建重组表达载体 pPIC9/*SL2b* 转化毕氏酵母, 筛选得到同时具有木聚糖酶和 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性的重组子, 随后对经硫酸铵沉淀、分子筛纯化后得到的重组蛋白 SL2B 进行 N-乙酰高丝氨酸内酯酶及木聚糖酶酶学性质的研究。【结果】筛选得到 N-乙酰高丝氨酸内酯酶和木聚糖酶均可高效表达活性的毕氏酵母重组菌株。纯化后的融合蛋白中 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的最适作用 pH 为 8.0, 作用温度为 30℃, 在 pH 6–11 的范围内能够稳定的存在, 在 0℃–50℃ 之间, 酶活性能够维持在 80% 以上, 且该酶对多种金属离子、化合物和中性蛋白酶都具有很好的抗性。该融合蛋白对多种底物都具有一定的降解作用, 以 3-oxo-C8-HSL 为底物时的 K_m 值为 0.05 mmol/L。木聚糖酶的最适 pH 为 6.5, 最适作用温度为 60℃, 在 pH 6–8 的范围内能够稳定的存在, 在 50℃–65℃ 之间, 酶活性能够维持在 80% 以上, 且该酶对多种金属离子、化合物和中性蛋白酶都具有很好的抗性, 以燕麦木聚糖为底物时的 K_m 值为 2.9 mg/L。在 30℃、中性条件下融合蛋白对动物(鱼)肠道环境具有很好的抗性。【结论】本实验选取的木聚糖酶基因具有一个强启动子, 可高效表达, 通过融合表达的方式带动 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的高效表达; 木聚糖酶具有易检测的优点, 通过融合表达简便 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的活性检测; 同时构建的融合蛋白 SL2B 中木聚糖酶及 N-乙酰高丝氨酸内酯酶性质与单酶相比不受影响, 在控制外源性病原菌毒性效应及缓解饲源性抗营养因子危害、维护畜禽(水产)消化道健康方面具有一定的应用前景。

关键词: 高丝氨酸内酯酶, 木聚糖酶, 融合表达, 酶学性质

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 08-1052-10

动物消化道是动物机体与外界环境相通的主要场所^[1]。近年来, 随着人们对食源性病原菌及致病机理认识的不断深入, 越来越多地发现许多病原菌

可通过消化道侵染到畜禽(水产)体内导致畜禽(水产)发病。如: 由产气荚膜梭菌引起的坏死性肠炎^[2]; 由沙门氏菌引起的鸡白痢禽伤寒和禽副伤

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260591); 中国农业科学院饲料研究所所长基金(2009); 中国博士后科学基金(20090450472)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-82106073; E-mail: zhou_zg@msn.com

作者简介: 张美超(1985–), 女, 吉林德惠人, 硕士研究生, 研究方向是农业环境微生物。E-mail: mei_chao_zhang@163.com

收稿日期: 2011-02-22; 修回日期: 2011-04-29

寒^[1]; 由副溶血孤菌引起的肠炎及鱼类肠道疾病^[3]等。这不但给畜禽(水产)养殖带来严重的经济损失同时也严重威胁了人类健康, 因此维护动物消化道健康是畜禽(水产)养殖最关键的环节。以前的研究更多着眼于对消化道菌群自身的调控, 而较少关注对外源性病原菌及饲源性抗营养因子的控制。

动物消化道病原菌主要以革兰氏阴性细菌为主^[4]。N-乙酰高丝氨酸内酯(AHLs)是一类广泛存在于革兰氏阴性细菌中调控群体感应系统(quorum sensing, QS)的信号分子。研究表明 AHLs 调控着多种革兰氏阴性病原菌致病因子的表达^[5], 通过降解 AHLs 则可阻断这类病原菌的群体感应路径, 达到控毒或减毒的目的^[2]。N-乙酰高丝氨酸内酯酶是一种可降解 AHLs 的酶, 该酶主要作用于 AHLs 的内酯环, 从而使 AHLs 失活, 成为近几年的研究热点。陈瑞东等(2010)在毕赤酵母中高效表达了芽胞杆菌来源的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因 *aiiA-B546*, 应用研究表明可以用酶制剂形式来防治(水产)养殖业中由 *Aeromonas hydrophila* 引起的疾病^[6]。

木聚糖是小麦、麸皮等畜禽(水产)饲料关键原料中的主要抗营养因子, 严重影响养殖动物的健康及生产性能, 然而其酶解产物木糖及木寡糖却可为动物提供能量及促进动物肠道双歧杆菌增殖。本实验选取的来源于链霉菌 S27(*Streptomyces* sp.) 的第十家族木聚糖酶具有 pH 稳定性好、表达量高、检测容易等优点。因此饲喂内切木聚糖酶可成功缓解木聚糖这类饲料原料抗营养因子对养殖动物的危害^[7]。

将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶与木聚糖酶混合加入畜禽(水产)饲料可能是统筹解决外源性病原菌及饲源性抗营养因子一种方式。但由于两类酶制剂分别生产存在着生产成本偏高, 因此本研究尝试将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶与木聚糖酶基因融合表达, 初步评价其酶学性质, 为综合应用评价奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体: 芽胞杆菌 B546(*Bacillus* sp., GenBank no. FJ816104), 链霉菌 S27(*Streptomyces* sp., GenBank no. EU660498) 这两株菌均由中国农业科学院饲料研究所农业部饲料生物技术重点开放

实验室保存; 报告菌株 *Agrobacterium tumefaciens* KYC 55(pJZ372) (pJZ384) (pJZ410) 由南京农业大学朱军教授馈赠; 毕赤酵母 GS115 本实验室保存、大肠杆菌 Trans-I 和 pEASY-T3 载体购自北京全式金生物公司、pPIC9 载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基: YPD 培养基, 用于酵母菌的培养; BMGY 培养基和 BMMY 培养基, 用于诱导酵母表达; MD 培养基, 用于重组子的筛选^[6]; ATmm 培养基^[8], 用于 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活测定。

1.1.3 主要试剂和仪器: 燕麦木聚糖、胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、蛋白酶 K、枯草杆菌蛋白酶、胶原蛋白酶、C4-HSL、C6-HSL、C7-HSL、C8-HSL、C10-HSL、C12-HSL、C14-HSL、3-oxo-C6-HSL、3-oxo-C8-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-oxo-C12-HSL、3-oxo-C14-HSL、3-hydroxy-C12-HSL 和 3-hydroxy-C14-HSL 购自 Sigma 公司。内切酶都购自 TaKaRa 公司, 连接酶购自 Invitrogen 公司, 去糖基化酶 *Endo* H 购自 NEB 公司; 其他试剂均系进口分装或国产分析纯。本研究使用的主要仪器有: ÅKTA FPLC 蛋白纯化系统(Amersham pharmacia biotech); PCR 仪(Techna 公司); SDS-PAGE 系统(Amersham pharmacia biotech); 基因导入仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 融合基因 *SI2b* 的拼接

设计引物 *xynAS27-F*: 5'-CTTGAATTCGCCGA GAGCAGCTCG-3'; *L2-R*: 5'-AGAGCCGCCGCCGCGGAGTCCGTCGAGGACG-3' (上游引物引入 *Eco*R I 酶切位点), 用于从链霉菌 S27 基因组中扩增木聚糖基因 *xynAS27cd*。PCR 采用 50 μ L 反应体系, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

设计引物 *L2-F*: 5'-GGCGGCGGCGGCTCTATGA CAGTAAAGAAGC-3'; *SL2B-YR*: 5'-CGGACTAG TCTATATATACTCTGGGAAC-3' (下游引物引入 *Spe* I 酶切位点), 用于从芽胞杆菌基因组中扩增 N-乙酰基高丝氨酸内酯酶基因 *aiiA-B546*。PCR 采用 50 μ L 反应体系, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

以 *xynAS27cd* 和 *aiiA-B546* 为模板, 用 *xynAS27-F* 和 *SL2B-YR* 引物进行 overlap PCR, 得到 PCR 产物即为融合基因 *SI2b*。PCR 采用 50 μ L 反应体系, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 到 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将得到的 PCR

产物参照文献[9]的方法连接 pEASY-T3 后转化 Trans-I 进行测序。

1.3 融合蛋白的高效表达及纯化

1.3.1 pPIC9/*Sl2b* 表达载体的构建^[10]: 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切融合基因 *Sl2b* 和质粒 pPIC9 分别胶回收后进行连接,热击转化 Trans-I 验证、测序、获得重组载体 pPIC9/*Sl2b* 电击转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞,涂布 MD 平板。

1.3.2 融合蛋白 SL2B 在酵母中的高效表达: 挑取单克隆接种于 3 mL BMGY 培养液中,30℃ 振荡培养 48 h;1844 × g 离心 15 min 去上清,加入 1 mL BMMY 培养液继续诱导 48 h。将培养液 10625 × g 离心 5 min,收集上清液(含融合蛋白 SL2B),检测木聚糖酶的活性。

1.3.3 阳性重组子中 N-乙酰高丝氨酸内酯酶表达水平的测定: (1) 采用琼脂平板扩散法检测 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活力^[11]。在 ATmm 固体培养基平板中加入终浓度为 27 μg/mL 的 X-gal,将平板中的固体培养基划分成平行的 0.8 cm × 6 cm 的长条,长条之间宽度 0.4 cm,用移液枪在长条的一端分别点上 10 μL 已知浓度的 3-oxo-C8-HSL 信号分子,用牙签从长条的另一端开始,每间隔 0.4 cm 点上报告菌 KYC55。随着信号分子沿培养基的扩散,报告菌接触到信号分子后生成的 β-半乳糖苷酶与 X-gal 反应,生成蓝色沉淀。实验表明,加入 3-oxo-C8-HSL 物质质量(y)与扩散距离(x)成指数关系,其计算公式为: $y = 0.00000652 \times e^{0.348x}$; $e = 2.718281828459045$, 计算 3-oxo-C8-HSL 的消耗量。在 30℃ 下 1 min 分解 1 nmol 3-oxo-C8-HSL 所需的酶量被定义为一个酶活单位。其它 AHLs 信号分子依照此方法做标准曲线,用来测定 AHLs 的浓度。(2) N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性检测,取 20 μL 蛋白液加入 179 μL 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 8.0)和 1 μL 1 mg/mL 的 3-oxo-C8-HSL 混合摇匀,30℃ 温育 30 min 后,加入 50 μL 10% SDS 水溶液终止反应,得到反应液;对照为加入 SDS 水溶液终止反应后再加入 20 μL 热灭活酶液。将 10 μL 反应液(对照液)滴至胶条上,30℃ 培养 24 h 后计数变蓝点数,计算距离,按酶活计算公式计算待测溶液的酶活。

1.3.4 阳性重组子中木聚糖酶表达水平的测定: 参照文献[7]方法进行。

1.3.5 融合蛋白的分离、纯化: 将得到的融合蛋白

上清液用硫酸铵沉淀的方法进行浓缩。12470 × g 离心 15 min 收集 80% 硫酸铵饱和度的蛋白沉淀。分别检测 N-乙酰高丝氨酸内酯酶和木聚糖酶的性质。再将检测到双酶活的蛋白采用 Hiprep 16/60 sephacryls-100 High Resolution 分子筛纯化后进行双酶活性检测。最后将检测到双酶活性的融合蛋白溶液进行 SDS-PAGE 检测。

1.4 N-乙酰高丝氨酸内酯酶抗动物(鱼)肠液的研究

将饱食 1 h 后的鲤鱼麻醉后取肠道,用 pH 7.5、0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液冲洗肠道外部。将肠道剪开,用无菌刀片将肠道粘液轻轻刮到 pH 7.5、0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液中,分装于 1.5 mL 的 Ep 管中,3000 × g 离心 3 min 取上清,得到鱼肠液。将 SL2B 酶液与鱼肠液混合(1:10, v/v),30℃ 处理 1 h,将混合液作为待测溶液分别测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性和木聚糖酶酶活性。以信号分子 3-oxo-C8-HSL 为底物, pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲液,反应温度为 30℃ 条件下测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性;以 1% 的燕麦木聚糖为底物, pH 6.5、0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲液,反应温度为 60℃ 条件下测定木聚糖酶活性。

1.5 融合蛋白表达量与 N-乙酰高丝氨酸内酯酶单酶表达量的比较

在 30℃ 条件下以信号分子 3-oxo-C8-HSL 为底物, pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲液,处理 30 min 后分别测定融合表达及单独表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的酶活力。

1.6 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶学性质的研究

1.6.1 最适 pH 值: 在 30℃ 以信号分子 3-oxo-C8-HSL 为底物,分别在: pH 5.0、0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液; pH 6.0 - pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液; pH 8.5、0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液; pH 9.0、pH 10.0、0.1 mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液中测定融合蛋白的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活。以最高酶活力为 100%,各个 pH 下的酶活力与最高活力的比值作为相对酶活力。

1.6.2 最适温度: 相同条件,分别在 0℃、10℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、50℃、60℃ 和 70℃ 下测定融合蛋白的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活。以最高酶活力为 100%,各个温度下的酶活力与最高活力的比值作为相对酶活力。

1.6.3 pH 稳定性: 将浓缩的纯酶液在 30℃ pH 5.0、0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液; pH 6.0 - pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液; pH 9.0 - pH 12.0、0.1 mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液中处理 1 h。再将处理后的溶液作为待测溶液,最适条件下检测融合蛋白的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活。以最高酶活力为 100%,各个 pH 下的酶活力与最高活力的比值作为相对酶活力。

1.6.4 温度稳定性: 在 50℃ 下, pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液中将酶液分别保温 2、5、10、15、20、30、60 min 后,再将处理后的溶液作为待测溶液在最适条件下测定融合蛋白的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活。以最高酶活力为 100%,各个时间处理后溶液的酶活力与最高活力的比值作为相对酶活力。

1.6.5 金属离子抗性: 在反应体系中,分别加入不同的金属离子或化学试剂 (K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Li^+ 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、EDTA、 β -mercaptoethanol 和 SDS,终浓度为 1 mmol/L 或 10 mmol/L)。未加化合物的酶活力作为 100%,其它各个处理的酶活力与最高活力的比值作为该体系的相对酶活力。

1.6.6 中性蛋白酶抗性: 用 Tris-HCl 将胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、蛋白酶 K、枯草杆菌蛋白酶 A、胶原蛋白酶配成 1 mg/mL 的溶液;再将融合蛋白 SL2B 溶液分别与蛋白酶溶液混合 (10:1, w/w),在 30℃ 条件下保温不同时间 (0、10、20、30 或 60 min) 后取样,作为待测溶液在最适条件检测 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活。将 0 min 时刻待测溶液的酶活力作为 100%,其它各个时刻待测溶液的酶活力与 0 min 时刻待测溶液的活力比值作为该体系的相对酶活力。

1.6.7 底物多样性: 在 30℃、pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液条件下。分别以 0.25 mmol/mL 的 C4-HSL、C6-HSL、C7-HSL、C10-HSL、C12-HSL、C14-HSL、3-oxo-C12-HSL、3-oxo-C14-HSL、3-hydroxy-C14-HSL、0.05 mmol/mL 的 C8-HSL、3-oxo-C6-HSL、3-oxo-C8-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-hydroxy-C12-HSL 作为底物,检测融合蛋白溶液的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶活。

1.6.8 动力学测定: 在酶促反应的最适条件下,以 1 mg/mL 3-oxo-C8-HSL 为底物,依次在酶促反应的 1、2、3、5、10、15、20、30 min 时终止反应,测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性,计算出酶促反应的一级反应

时间。再根据测定的一级反应时间,确定测定 K_m 值及 V_{max} 的反应时间为 10 min。用不同浓度的信号分子 3-oxo-C8-HSL (10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005 mg/mL) 为底物,在最适条件下测定酶活性,计算相应的反应速度,利用米氏方程双倒数法求得 K_m 值及 V_{max} 。

1.6.9 比活力测定: 比活力单位的定义为:每毫克酶蛋白所含的酶活力单位。通过考马斯亮蓝法 G-250 试剂测定样品酶液中的蛋白含量,同时最适温度下测得重组酶的酶活,由此得到酶的比活。

1.7 木聚糖酶酶学性质的研究

操作方法参照文献 [7] 方法进行。

1.8 活性检测一致性分析

分别取 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μ L 酶液,在 30℃ 条件下以信号分子 3-oxo-C8-HSL 为底物, pH 8.0、0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲液,处理 30 min 后分别测定 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的酶活力;在 60℃ 条件下以 1% 的燕麦木聚糖为底物, pH 6.5、0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲液保温 10 min 后分别测定木聚糖酶的酶活力。再根据所测定的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的酶活力值和木聚糖酶的酶活力值寻找两者之间的线性关系。

2 结果

2.1 融合蛋白重组子的获得

2.1.1 融合蛋白基因的获得: 从链霉菌 S27 和芽胞杆菌 B546 的基因组中分别扩增得到约 900 bp 木聚糖基因 *xynAS27cd* 和约 750 bp N-乙酰高丝氨酸内酯酶基因 *aiiA-B546*,将其 PCR 拼接获得约 1.7 kb 的融合基因 *Sl2b*。(图 1)

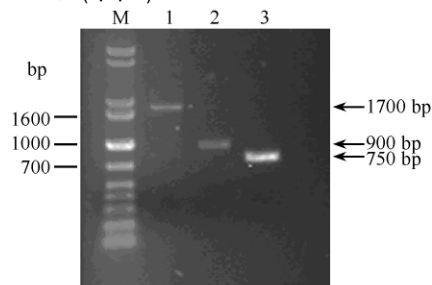


图 1 融合基因电泳图

Fig. 1 Electrophoresis graph of fusion gene *Sl2B*. M: 1 kb plus DNA marker; 1, fusion gene *Sl2B*; 2, xylanase gene *xynAS27cd*; 3, N-acyl-homoserine lactonase gene *aiiA-B546*.

2.1.2 重组表达载体的构建: 将融合基因 *SL2b* 和质粒 pPIC9 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切后回收连接构建 pPIC9/*SL2b* 重组质粒。

2.1.3 融合蛋白的表达: pPIC9/*SL2b* 用 *Bgl* II 酶切线性化后转化毕赤酵母 GS115, 在 MD 平板上筛选得到 200 个转化子, 将这 200 个转化子分别用酵母管进行诱导后测定其木聚糖酶和 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性。

2.1.4 融合蛋白阳性重组子的筛选: 200 个转化子中有 73 个转化子具有木聚糖酶和 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性。选取其中 4 个木聚糖酶活性较高的转化子(编号分别为 No. 47、82、83、92) 分别进行摇瓶诱导。而后测定其木聚糖酶和 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活力。测定结果表明: 其木聚糖酶活力分别为 50.68、53.74、60.56、56.57 U/mL; N-乙酰高丝氨酸内酯酶活力分别为 0.28、0.30、0.35、0.32 U/mL。因此根据测定结果选取 No. 83 为融合蛋白的重组菌株, 命名为 SL2B。

2.2 融合蛋白的分离和纯化

融合蛋白 SL2B 经硫酸铵沉淀和分子筛分离纯化后, SDS-PAGE 图谱表明 SL2B 的分子量约为 64 kDa, 比理论分子量略大。SL2B 去糖基化处理后在 60 kDa 处有一条单带 (SL2B-1), 与理论分子量一致。因此推测 SL2B 在毕氏酵母中表达的时候进行了糖基化修饰(图 2)。

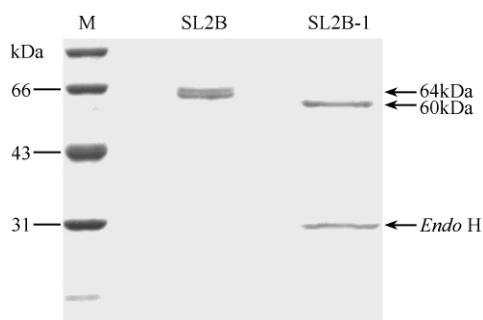


图 2 SDS-PAGE 检测融合蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE of fusion protein detection. Lanes: M, protein molecular mass standards; SL2B, the purified recombinant SL2B; SL2B-1, the deglycosylated SL2B with *Endo* H.

2.3 N-乙酰高丝氨酸内酯酶抗动物(鱼)肠液的研究

与鱼肠液混合前, 融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性为 (0.35 U/mL), 木聚糖酶活

力为 (60.56 U/mL)。与鱼肠液混合处理后, SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶保持 60% 以上的酶活 (0.23 U/mL); 木聚糖酶活力几乎没有损失 (56.73 U/mL)。表明 SL2B 在鱼肠液中较稳定。

2.4 融合蛋白表达量与 N-乙酰高丝氨酸内酯酶单独表达量的比较

结果表明: 融合蛋白的表达量为 0.35 ± 0.014 U/mL, N-乙酰高丝氨酸内酯酶单独的表达量为 0.33 ± 0.005 U/mL。

2.5 N-乙酰高丝氨酸内酯酶酶学性质的测定

2.5.1 融合蛋白 SL2B 中 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的 pH 值与温度: 测定结果表明, 该酶在 pH 5.0 - 10.0 范围内具有活性, 其中 pH 8.0 为最适 pH 值, 在 pH 6.5 - 8.0 的范围内保持 80% 以上的酶活。(图 3-A); 该酶在 0°C - 70°C 范围内有酶活。其中 30°C 为作用的最适温度, 温度高于 60°C 时仍有 30% 左右的酶活。(图 3-B); 该酶在 pH 范围为 pH 6.0 - 11.0 间都很稳定, 可以保持 80% 以上的酶活(图 3-C); 该酶在 50°C 下很稳定, 酶活几乎没有损失(图 3-D)。

2.5.2 金属离子及相关化学试剂的抗性: 融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶测定结果表明 SDS、 Ag^+ 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 对 SL2B 的酶活具有不同程度的抑制作用, 其中 SDS、 Cr^{3+} 、 Cu^{2+} 对酶活的抑制作用随离子浓度提高增强, 其余离子或化学试剂对酶活没有显著影响(表 1)。

2.5.3 中性蛋白酶抗性: 融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶剩余酶活分别为 96.28% (胰蛋白酶), 98.16% (α -糜蛋白酶), 76.08% (蛋白酶 K), 81.29% (枯草芽孢杆菌蛋白酶 A), 97.30% (胶原蛋白酶), 表明融合蛋白 SL2B 对多种蛋白酶都具有较强的抗性(图 4)。

2.5.4 底物多样性: 融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的酶活力测定结果分别为 C7-HSL (1.897 U/mL)、C8-HSL (1.287 U/mL)、C10-HSL (11.188 U/mL)、3-oxo-C8-HSL (1.454 U/mL)、3-oxo-C10-HSL (9.696 U/mL)、3-oxo-C12-HSL (3.082 U/mL)、3-oxo-C14-HSL (312.399 U/mL)、3-hydroxy-C12-HSL (5.219 U/mL); 同时对 C4-HSL、C6-HSL、C14-HSL 也具有一定的降解作用, 但对 3-oxo-C6-HSL、C12-HSL、3-hydroxy-C14-HSL 降解作用不明显。

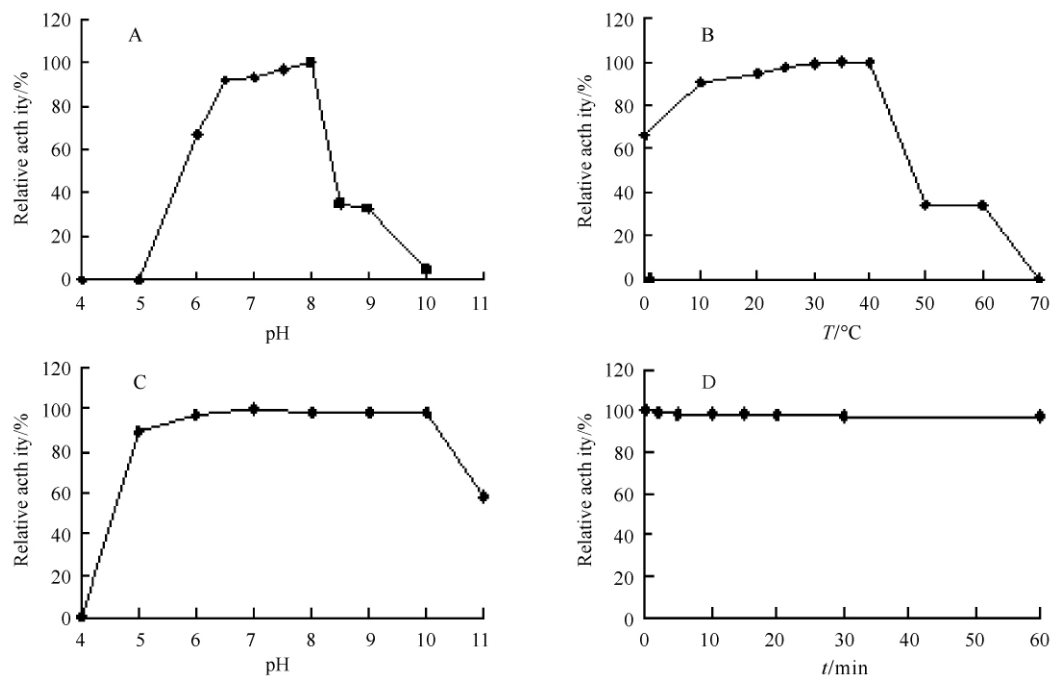


图 3 SL2B 中 N-乙酰高丝氨酸内酯酶性质

Fig. 3 The N-acyl-hohoserine lactonase characterization of SL2B. A. The optimum pH value of the N-acyl-homoserine lactonase; B. The optimum temperature of the N-acyl-homoserine lactonase; C The pH stability of N-acyl-homoserine lactonase; D The temperature stability of N-acyl-homoserine lactonase at 50°C .

表 1 N-乙酰高丝氨酸内酯酶对相关化学试剂的抗性

Table 1 Effect of relevant chemical ions and reagents to N-acyl-homoserine lactonase

Reagent	1 mmol/L	10 mmol/L	Reagent	1 mmol/L	10 mmol/L
Na ⁺	99.10	99.10	Mn ²⁺	98.10	97.22
K ⁺	98.10	98.10	Zn ²⁺	98.10	98.84
Ca ²⁺	98.10	98.10	Pb ⁺	98.10	98.10
Li ⁺	98.10	98.10	SDS	65.97	0.00
Co ²⁺	98.10	98.10	Ag ⁺	0.00	0.00
Cr ³⁺	96.17	0.00	Hg ²⁺	29.79	29.79
Ni ⁺	98.10	98.10	Fe ²⁺	98.10	98.10
Cu ²⁺	50.94	41.27	β-mercaptoethanol	99.47	98.84
Mg ²⁺	98.10	97.22	EDTA	98.10	98.84

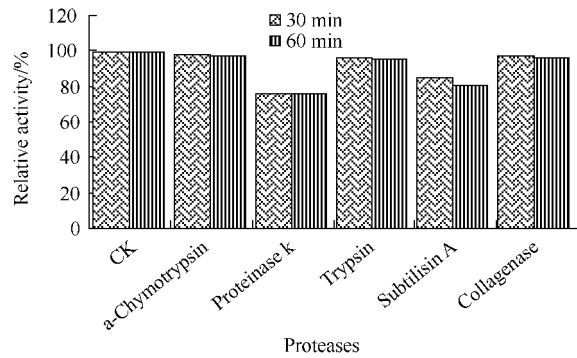


图 4 N-乙酰高丝氨酸内酯酶中性蛋白酶抗性

Fig. 4 The resistance of the N-acyl-homoserine lactonase to proteases.

2.5.5 动力学测定: 融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶动力学的测定结果为 $V_{\max} = 10.02 \text{ nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ $K_m = 0.050 \text{ mmol/L}$ 。

2.5.6 比活力测定: 测定结果表明, 融合蛋白 SL2B 中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的比活力为 4.52 U/mg 。

2.6 木聚糖酶学性质的测定

2.6.1 融合蛋白 SL2B 中木聚糖酶的 pH 值与温度: 测定结果表明, SL2B 在 pH 3.0-pH 10.0 范围内具有活性, 其中 pH 6.5 为作用的最适 pH 值, 在 pH 6.0 - pH 8.0 的范围内保持 80% 以上的酶活。(图

5-A) ;该酶在 40℃ - 70℃ 范围内有酶活性 ,其中 60℃ 为作用的最适温度 ,当温度高于 70℃ 时仍有 30% 左右的酶活。(图 5-B) ;该酶在 pH 范围为 pH

6.0 - pH 8.0 间都很稳定 ,可以保持 80% 以上的酶活力(图 5-C) ;该酶在 50℃ 下比较稳定 ,在 50℃ 处理 1 h 可以保持 70% 以上的酶活(图 5-D) 。

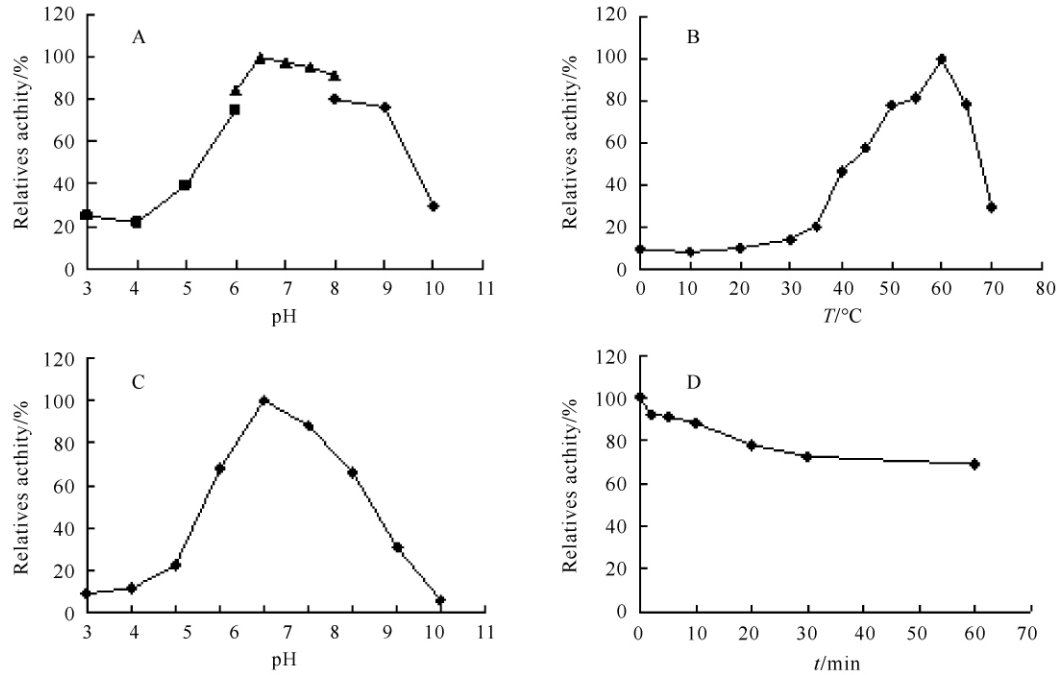


图 5 SL2B 中木聚糖酶性质

Fig. 5 The xylanase characterization of SL2B. A. The optimum pH value of the xylanase; B. The optimum temperature of the xylanase; C. The pH stability of xylanase; D. The temperature stability of xylanase at 50℃ .

2.6.2 金属离子及相关化学试剂的抗性: 在 1 mmol 的浓度下 ,Hg²⁺、SDS、Ag⁺、对该酶酶活力有不同程度的抑制作用 ,而 Fe²⁺ 对该酶的酶活力有一定程度的促进作用。在 10 mmol 的浓度下 ,除

上述 3 种金属离子外 Cu²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺ 对该酶也有明显抑制作用 ,而 Cr³⁺、β-巯基乙醇 (β-mercaptoethano) 则对该酶的酶活力有不同程度的促进作用(表 2) 。

表 2 木聚糖酶对相关化学试剂的抗性

Table 2 Effect of relevant chemical ions and reagents to xylanase

Reagent	1 mmol/L	10 mmol/L	Reagent	1 mmol/L	10 mmol/L
Na ⁺	89.3	90.1	Mn ²⁺	98.1	97.2
K ⁺	87.9	90.5	Zn ²⁺	90.7	91.1
Ca ²⁺	89.8	94.2	Pb ⁺	90.8	78.5
Li ⁺	84.8	85.7	SDS	5.9	0.0
Co ²⁺	88.6	89.2	Ag ⁺	83.7	9.2
Cr ³⁺	88.9	125.6	Hg ²⁺	0.0	0.0
Ni ⁺	88.6	90.3	Fe ²⁺	116.7	84.5
Cu ²⁺	63.9	41.2	β-mercaptoethanol	123.6	175.7
Mg ²⁺	94.7	106.8	EDTA	98.1	98.8

2.6.3 底物多样性及对不可溶性底物的降解作用: SL2B 中的木聚糖酶可以利用燕麦木聚糖 (60.56 U/mL) 和桦木木聚糖为底物 (49.93 U/mL) ,对不可溶性底物的降解作用的测定

以对可溶性木聚糖底物的降解活性作为 100% 。测定结果表明: 该酶对不可溶性木聚糖的降解只有 20.2% 。且只有 20% 左右的酶量可以结合在微晶纤维素上。

2.6.4 动力学测定: 以 1% 的燕麦木聚糖为底物, 该融合蛋白中木聚糖的动力学的测定结果为 $V_{\max} = 21190 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, $K_m = 2.9 \text{ mg/L}$ 。

2.7 活性检测一致性分析

在一定梯度范围内分别测定 SL2B 中 N-乙酰高丝氨酸内酯酶和木聚糖酶的酶活力。结果表明: 两者之间由于活性测定方法不同, 导致活性测定在一定范围内存在较大的差异因此在用等体积的融合酶液测定两种酶活力时这两者之间不成线性关系(图 6)。

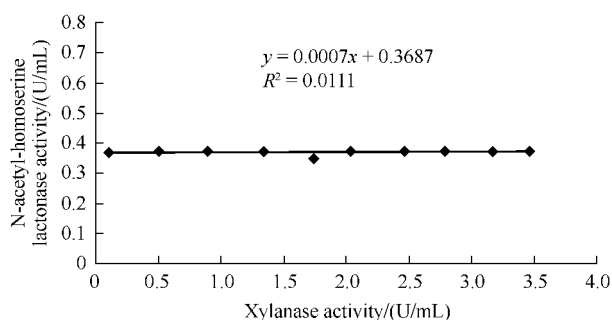


图 6 活性检测一致性分析

Fig. 6 The consistency analysis of N-acetyl-homoserine lactonase and xylanase.

3 讨论

我们通过对融合蛋白 SL2B 中 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的性质测定结果与 Chen 等^[6]测定的单酶测定结果相比, 具有相同的最适 pH, 但融合蛋白中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶在 10℃ - 40℃ 温度范围内酶活力保持 90% 以上而单酶的测定结果表明在 0℃ - 30℃ 温度范围内酶活力保持 90% 以上。温度稳定性测定结果表明, 融合蛋白中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶在 50℃ 条件下保温 1 h 后酶活几乎没有损失但单酶在保温 1 h 后酶活剩余 60% 左右。因此融合蛋白中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶较单酶相比热稳定性更好一些。pH 稳定性及蛋白酶抗性上与单酶相比没有明显的区别, 金属离子抗性测定结果与单酶测定结果基本一致, SDS、 Ag^+ 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 这五种金属离子对酶活性有明显的抑制作用。底物多样性测定与单酶相比又多测定了 C7-HSL、3-oxo-C10-HSL、3-oxo-C12-HSL、3-oxo-C14-HSL、3-hydroxy-C12-HSL、C4-HSL、C14-HSL、3-hydroxy-C14-HSL 等 8 种底物。在共同测定的 6 种底物中对 C12-HSL

的降解作用明显比单酶低, 其余的与单酶大致相似。上述测定结果表明将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶与木聚糖酶融合表达后, N-乙酰高丝氨酸内酯酶在表达量及酶学性质方面都没有受到较大的影响。

本实验选取融合表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶与邱健等^[11]报道的原核表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶相比具有较好的热稳定性、对多种金属离子 (Fe^{2+} 、 Pb^+ 、 Ca^{2+} 等) 及中性蛋白酶具有较强的抗性。这可能与该融合蛋白中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶自身的蛋白结构有关也可能是因为真核表达后将蛋白进行了糖基化修饰而对其酶学性质产生了一定影响^[12]。该融合蛋白中的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶另一优点是具有广谱的底物多样性可以降解多种信号分子, 这为将其应用于多种革兰氏阴性病原菌的生物防治奠定了理论基础。

木聚糖酶作为环保型饲料添加剂广泛应用于畜牧(水产)业, 具有改善畜禽(水产)消化道功能, 降低食糜粘度和抗营养性, 提高饲料利用率和减少环境污染等特点^[7]。本实验选用内切-1, 4-β-D-木聚糖酶, 简称木聚糖酶, 其水解产物中 85% 为木二糖, 木二糖能够刺激肠道益生菌双歧杆菌 (*Bifidobacteria*) 的生长, 从而抑制致病菌的生长繁殖和促进营养的吸收^[13]。

通过对融合蛋白 SL2B 中木聚糖酶性质与 Li 等^[7]测定的单酶性质测定结果相比发现, 两者具有相同的最适 pH 及温度, 但融合蛋白中的木聚糖酶在 pH 3.0 时仍然有 10% 左右的酶活力, 同时在 pH 10.0 时也剩余 30% 左右的酶活力。且该融合蛋白中的木聚糖酶在 70℃ 时剩余酶活力仍有 30% 以上, 而单酶的测定结果表明在 70℃ 时剩余酶活力不足 10%。因此融合蛋白中的木聚糖酶较单酶具有更宽的 pH 及温度作用范围; 融合蛋白中木聚糖酶的 pH 稳定性为 pH 6.0 - 8.0, 而单酶在 pH 5 - 10 的范围内都稳定; 温度稳定性、金属离子抗性、底物作用多样性的测定结果与原酶基本一致。上述结果表明将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶与木聚糖酶融合表达后, 木聚糖酶的酶学性质与原酶相比没有受到较明显的影响。本实验选用的木聚糖酶在 pH 中性条件下有较好的稳定性且在低温条件下也可以发挥一定的酶活性, 研究中还发现该融合蛋白对鱼肠液具有一定的抗性, 由此分析可得, 如将该融合蛋白应用于水体环境细菌性病害的防治, 可产生潜在的应用价值。

毕赤酵母表达系统与丝状真菌表达系统都为上

世纪 80-90 年代发展起来的优良的真核表达系统。由于这两种系统较原核生物及其它真核生物表达系统有众多优点,已被广泛地用于外源蛋白的表达^[4]。本实验构建的融合蛋白中两个基因都是来源于原核生物,而丝状真菌表达系统对非丝状真菌蛋白的表达量尚不理想甚至根本不表达^[15],因此本实验选用毕赤酵母表达系统进行高效表达。

通过研究发现该融合蛋白与其他报道的共表达^[16]相比具有融合表达不断裂的优点,即可以同时高效表达双酶活性,而且与单酶相比活性没有受到影响。这是由于在构建该融合蛋白时选用恰当的 linker 连接使得该融合蛋白具有上述优点。因此该融合蛋白的成功构建为构建其他共表达载体提供思路,也为将其应用于其他融合表达载体的构建奠定了基础。

本实验中选取木聚糖酶与 N-乙酰高丝氨酸内酯酶融合表达初衷是构建具有双酶活性的基因工程菌以增强其在实际中的应用价值,此外还在于尝试通过融合蛋白中木聚糖酶易检测的优点间接检测 N-乙酰高丝氨酸内酯酶活性,这样可将 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的检测时间从 24 h^[11] 缩短至 15 min^[7],而且还可以降低其检测成本,尤其在大规模、高通量筛选融合子的过程中可大大提高筛选效率。但实验结果表明,将融合蛋白中的双酶分别进行酶活测定时虽然融合蛋白中木聚糖酶与 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的酶活力成一定的正相关性但两者之间不能构建成理想中的线性关系,原因是由于目前国内外对 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的检测方法及酶活力计算方法的研究还不够深入,没有统一的酶活检测及计算方法,本实验选用目前使用较多的利用对信号分子敏感的报告菌株进行检测的检测方法^[11,17-18];而木聚糖酶选 DNS 法。因为两种酶活采用了不同的测定及计算方法,使之酶活力在一定范围内不成线性关系。因此该融合蛋白虽然可以在大规模高通量筛选的过程中大大减少工作量,但还不能达到通过计算木聚糖酶的活性间接计算 N-乙酰高丝氨酸内酯酶的活性。

综上所述,本实验构建的融合蛋白在表达时具有不断裂、可以同时表达双酶活性的优点,同时该融合蛋白表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯酶对多种金属离子及中性蛋白酶都具有较高抗性;表达的木聚糖酶在 pH 中性范围内也具有较好的稳定性,可为将其应用于畜禽(水产)养殖中细菌性病原菌的生物

防治及缓解饲料中抗营养因子危害奠定了理论基础;此外融合蛋白可以高效表达双酶活性且具有较好的热稳定性,因此可将其作为基因工程菌应用于工业生产。

参考文献

- [1] Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 1996, (2): 216-234.
- [2] 辜新贵,王启军,许小成. 家禽肠道健康和疾病控制. 饲料博览(技术版) [*Feed Review(Technology)*] 2010, 8: 41-43.
- [3] 杨振泉,焦新安. 副溶血弧菌毒力因子及其致病机理研究进展. 中国人兽共患病学报(*Chinese Journal of Zoonoses*) 2008, 24(11): 1070-1073.
- [4] 田辉. 肠道致病菌群体感应研究进展. 世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology*) 2007, 15(8): 879-884.
- [5] 张力群,田涛,梅桂英. 群体感应淬灭——防治植物细菌病害的新策略. 中国生物防治(*Chinese Journal of Biological Control*) 2008, 26(23): 241-247.
- [6] Chen Rd, Zhou Zg, Cao Yn, Bai Yg, Yao B. Research High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories* 2010, 39: 2-40.
- [7] Li N, Shi Pj, Yang Pl, Wang Yr, Luo Hy, Bai Yg, Zhou Zg, Yao B. A xylanase with high pH stability from *Streptomyces* sp. S27 and its carbohydrate-binding module with/without linker-region-truncated versions. *Applied Microbiology Biotechnology* 2009, 83: 99-107.
- [8] Tempe J, Petit A, Holsters M, Montagu M, Schell J. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74: 2848-2849.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京: 科学出版社, 1998: 509-514.
- [11] 邱健,李承光,贾振华,张霞,马宏,宋水山. 酰基高丝氨酸内酯酶 SS 10 的酶学特性及其抗软腐病功能的初探. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*) , 2007, 37(6): 629-636.
- [12] Kwon KS, Yu MH. Effect of glycosylation on the stability of alpha1-antitrypsin toward urea denaturation and

- thermal deactivation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1335: 265-272.
- [13] Moure A, Gullón P, Domínguez H. Advances in the manufacture purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 2006, 41: 1913-1923.
- [14] 郑光宇. 真核生物表达系统研究进展. 喀什师范学院学报(*Journal of Kashgar Teachers College*), 2004, 25(6): 33-36.
- [15] 姜天一, 朱平. 丝状真菌异源蛋白表达系统研究进展. 生物技术通讯(*Letters In Biotechnology*), 2007, 18(6): 1050-1053.
- [16] 王海燕, 秦浚川, 王敖全, 唐国敏. 黑曲霉酸性 α -淀粉酶基因和糖化酶基因对工业酒精酵母的整合及其共表达. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(4): 483-486.
- [17] Dong YH, Xu JL, Li XC, Zhang LH. AiiA, a novel enzyme inactivates acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the Natlional Academy of Sciences* 2000, 97: 3526-3531.
- [18] Lu X, Yuan Y, Xue XL, Zhang GP, Zhou SN. Identification of the Critical Role of Tyr-194 in the Catalytic Activity of a Novel N-Acyl-Homoserine Lactonase from Marine *Bacillus cereus* Strain Y2. *Current Microbiology* 2006, 53: 346-350.

High expression and characterization of N-acyl-homoserine lactonase-xylanase recombinant protein

Meichao Zhang, Yanan Cao, Bin Yao, Zhigang Zhou*

Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract [Objective] The fusion protein SL2B with both xylanase and N-acyl-homoserine lactonase activities was expressed in *Pichia pastoris*. Characterization of the purified xylanase and N-acyl-homoserine lactonase fusion protein SL2B was investigated. **[Methods]** The fusion gene *sl2b* was amplified from the N-acyl-homoserine lactonase gene *aiiA-B546* and the xylanase gene *xynAS27cd* via overlap PCR technique. After the recombinant vector pPIC9/*sl2b* was transformed into *P. pastoris*, transformants with both xylanase and N-acyl-homoserine lactonase activity were screened. The purified SL2B was obtained with ammonium sulfate precipitation and molecular sieve. Both N-acyl-homoserine lactonase and xylanase activities of SL2B were characterized. **[Results]** The purified SL2B showed that the xylanase had optimal pH and temperature at pH 6.5 and 60°C, respectively. The enzyme was stable between pH 6.0 and 8.0, retained over 80% enzyme activity between 50 and 65°C. It resisted various neutral proteases and chemical reagents. With oat spelt xylan as substrate, the K_m value of SL2B was 2.9 mg/L. The N-acyl-homoserine lactonase had optimal pH and temperature at pH 8.0 and 30°C, respectively. The enzyme was stable between pH 4.0 and 10.0, retained over 80% enzyme activity between 0 and 50°C. It resisted various neutral proteases and chemical reagents. The fusion protein can hydrolyze many N-acyl homoserine lactones substrates. With N-(3-oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone as substrate, the K_m value of SL2B was 0.050 mmol/L. **[Conclusion]** High level expression is achieved by fusing N-acyl-homoserine lactonase to the xylanase.

Keywords: fusion expression, enzymatic properties, n-acyl-homoserine lactonase

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the Ministry of Science and Agriculture Science and Technology fund projects (2010GB23260591), by the Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences Fund (2009) and by the China Postdoctoral Science Foundation (20090450472)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-82106073; E-mail: zhou_zg@msn.com

Received: 22 February 2011 / Revised: 29 April 2011