

# 适冷海洋细菌交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) MB-1 内切葡聚糖酶基因的克隆和表达

游银伟 汪天虹\*

(山东大学生命科学学院 微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** :从黄海深海海底淤泥中筛选出一株产纤维素酶的适冷革兰氏阴性杆菌 MB-1,克隆和分析了 MB-1 的 16S rDNA 序列(GenBank 接受号 :AY551321),经鉴定为交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas*),命名为 *Pseudoalteromonas* sp. MB-1。克隆了该菌适冷内切葡聚糖酶基因 *celA*(GenBank 接受号 :AY551322),并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21 中进行了表达。重组 *E. coli* 菌体破碎后,获取上清液,其中融合蛋白 GST-CelA 浓度约为 78.5mg/L。分析了融合酶 GST-CelA 的性质,其最适反应温度为 35°C,最适反应 pH 值为 7.2,为中性适冷酶。实验结果为交替假单胞菌低温纤维素酶的基础理论和应用研究奠定了基础。

**关键词** 海洋适冷酶,交替假单胞菌,内切葡聚糖酶,融合蛋白表达

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)01-0142-03

交替假单胞菌属<sup>[1]</sup>(*Pseudoalteromonas*)是 1995 年根据 16S rDNA 序列的特点从交替单胞菌属(*Alteromonas*)中分离出来的一个新属,目前已知的交替假单胞菌都是从海洋和湖泊中分离得到的,大部分是适冷菌<sup>[2]</sup>,最适生长温度在 15°C 左右。

由于低温酶在低温时具有较高催化活性,使之在生产上可以部分的缓解能源危机问题<sup>[3]</sup>,因此有着良好的应用前景。纤维素酶系包括 3 种成员,即内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(EG),外切葡聚糖纤维二糖水解酶(CBH)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC)<sup>[4]</sup>。纤维素酶在酿酒、饲料、食品加工等行业中有着广泛的用途<sup>[5]</sup>。本文对海洋细菌 MB-1 从分子水平进行了菌株鉴定,克隆和表达了其适冷内切葡聚糖酶基因,并对重组融合酶的性质进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 酶和试剂** :*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;低分子量蛋白质 Marker 购自上海西巴斯生物技术开发有限公司。其它均为分析纯生化试剂。

**1.1.2 菌株和质粒** :大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  和 BL21 以及 pUCm-T 载体均为上海 Sangon 产品;表达质粒 pGEX-4T-1 为 Promega 公司产品。MB-1 为本实验室从黄海深海海底淤泥中分离出的 1 株革兰氏阴性杆状细菌。

### 1.2 PCR 扩增 16S rDNA

按文献<sup>[6]</sup>提取细菌 DNA。

参照 Weisburg 等<sup>[7]</sup>(1991)报道,采用细菌 16S rDNA 的通用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。引物序列为 P1 :5'-CCG

GATCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';P2 :5'-CGGGATCCTACGCTACCTGTGTTACGACT-3'。反应体系(50 $\mu$ L) :10 $\times$  buffer 5 $\mu$ L,模板 1 $\mu$ L,200 $\mu$ mol/L dNTP,2U *Taq* 酶,引物 P1 和 P2 各 0.1 $\mu$ mol/L。反应条件 :97°C 5min,94°C 1min,51°C 1min,72°C 2min,30 个循环,72°C 10min。

扩增产物回收后,连接到 pUCm-T 载体上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。在含有 100mg/L Ampicilin 的麦康凯琼脂平板上培养后挑选白色菌落,提取阳性转化子所含质粒,通过酶切和 PCR 双重验证,将正确的重组质粒命名为 pT-16S rDNA。

### 1.3 PCR 扩增内切葡聚糖酶基因

根据 GenBank 报道的 *Pseudoalteromonas haloplanctis celG* 基因序列和 *Pseudoalteromonas* sp. DY-3 *celX* 基因序列设计扩增内切葡聚糖酶基因 *celA* 的引物 P3 和 P4。引物序列为 P3 :5'-CGGACGGGATCCTCAGGAAATACGATGAATAA-3'(含 *Bam*H I 酶切位点);P4 :5'-GCCTCGCTCGAGTATAAAACGTGCTTAA TTAC-3'(含 *Xho* I 酶切位点)。反应体系(50 $\mu$ L) :10 $\times$  buffer 5 $\mu$ L,模板 3 $\mu$ L,200 $\mu$ mol/L dNTP,2U *Taq* 酶,引物 P3 和 P4 各 0.1 $\mu$ mol/L。反应条件 :97°C 5min,94°C 1min,55°C 1min,72°C 2min,30 个循环,72°C 10min。

扩增产物回收后,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,回收小片段,连接到经同样双酶切的表达载体 pGEX-4T-1 上,转化 *E. coli* BL21,在含有 100mg/L Ampicilin 的 LB 平板上培养后,随机挑选菌落,提取质粒进行验证,将验证正确的重组质粒命名为 pGEX-*celA*。

### 1.4 DNA 序列分析

由上海博亚生物技术有限公司进行测序,在 NCBI 上分析序列同源性。

\* 通讯作者。Tel 86-531-8366118 ;E-mail :wth@life.sdu.edu.cn

作者简介 游银伟(1976-)男,河南洛阳人,硕士。现工作单位是山东省农业科学院高新技术研究中心。E-mail :yyw30000@163.com

收稿日期 2004-06-17,修回日期 2004-11-05

### 1.5 融合蛋白的表达及性质分析

将重组 *E. coli* BL21(pGEX-celA) 和对照菌株 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1) 分别接种于含有 100mg/L Ampicilin 的 LB 液体培养基中, 37°C 过夜培养, 按 1% 接种量转接于含 Ampicilin 的 40mL 新鲜培养基, 37°C 培养至 OD 值为 0.8 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 5mmol/L, 对照菌株 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1) 继续在 37°C 下诱导培养, 而重组 *E. coli* BL21(pGEX-celA) 则转入 18°C 下诱导培养<sup>[8]</sup>。4h 后低温离心收集菌体, 菌体重悬于 4mL 含 0.5mmol/L EDTA 和 0.1mmol/L PMSF 的 0.2mol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液 (pH5.8) 中, 冰浴中进行超声波破碎, 离心收集上清液, 取 30 $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 检测。

参照王沁等<sup>[9]</sup>报道的方法测定融合酶 GST-CelA 的酶活性。

## 2 结果和分析

### 2.1 16S rDNA 序列的 PCR 扩增

以细菌 MB-1 染色体 DNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增, 得到 1.5kb 左右的片段。将该片段克隆到 pUCm-T 载体, 测序结果表明该扩增片段为 1515bp。在 NCBI 进行 BLAST, 结果显示它与交替假单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 16S rDNA 序列同源性可达 99%。结合 MB-1 的形态学特征, 将其鉴定为交替假单胞菌属的一个种, 命名为 *Pseudoalteromonas* sp. MB-1。目前大部分交替假单胞菌都是从海水中分离到的, 绝大部分是适冷菌, 最适生长温度在 15°C 左右, MB-1 的特征与它们相吻合。

将 *Pseudoalteromonas* sp. MB-1 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行了同源比较, 比对结果用 ClustalW 在线绘制了系统发育树。结果表明 *Pseudoalteromonas* sp. MB-1 与 *P. issachenkonii* 的进化关系最近。

### 2.2 内切葡聚糖酶基因 *celA* 序列的 PCR 扩增

以 *Pseudoalteromonas* sp. MB-1 染色体 DNA 为模板, 以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增, 得到 1.5kb 左右的片段。将该片段克隆到 pGEX-4T-1 表达载体上, 测序结果表明该扩增片段为 1507bp。在 NCBI 进行 BLAST, 结果表明它与 *Pseudoalteromonas haloplantis* 的 *celG* 基因和 *Pseudoalteromonas* sp. DY-3 的 *celX* 基因同源性均在 93% 以上, 证明克隆到正确的基因。将该基因命名为 *celA*, 将构建的融合型表达质粒命名为 pGEX-celA。

利用 Primer5.0 分析 *celA*, 结果显示该序列编码 492 个氨基酸, 推导的蛋白质理论分子量为 53kD 左右。利用自动蛋白质同源建模服务器 (SWISS-MODEL) 建模了 CelA 的三维结构。建模结果表明 CelA 包含两个大的结构域, 即催化结构域和底物结合结构域, 通过蛋白质序列比对, CelA 和 *Pseudoalteromonas haloplantis* 的 CelG 同源性高达 94%, 而根据 Violot 等<sup>[10]</sup> (2003) 的报道, CelG 由催化结构域、底物结合结构域和链接区组成, 其催化结构域属于糖基水解酶家族的第 5 族, 因此判断 CelA 的催化结构域同样属于糖基水解酶家族的第 5 族。结合 CelA 同源建模结果, 判断其 1~27 氨基酸序

列为信号肽, 28~328 氨基酸序列为催化结构域, 329~427 氨基酸序列为链接区, 428~492 氨基酸序列为底物结合结构域。

### 2.3 融合蛋白 SDS-PAGE 检测

从 SDS-PAGE 结果 (图 1) 可见经 IPTG 诱导 4h 后, 对照菌株 *E. coli* BL21(pGEX-4T-1) 表达出了 26kD 的 GST 对照蛋白, 重组菌株 *E. coli* BL21(pGEX-celA) 表达出了 79kD 左右的融合蛋白 GST-CelA, 与理论值相符合。用软件 BandScan4.50 分析 SDS-PAGE 电泳图, 结果表明: 在上清液中, 融合蛋白 GST-CelA 的浓度约为 78.5mg/L。

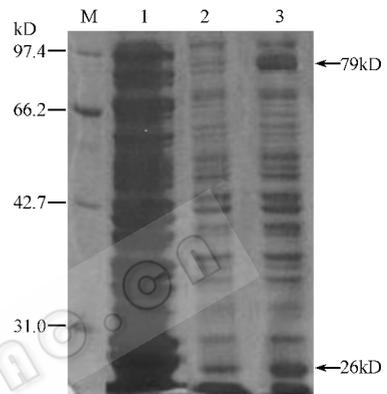


图 1 GST-CelA 在 *E. coli* BL21 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of GST-CelA expression in *E. coli* BL21  
M. Low molecular weight marker; 1. GST expression after induce; 2. GST-CelA expression before induce; 3. GST-CelA expression after induce.

### 2.4 融合蛋白性质分析

融合酶 GST-CelA 酶活测定结果表明, 其最适反应温度为 35°C, 仍然是适冷酶, 最适反应 pH 值为 7.2, 是中性酶, 而且 pH 在 4~8 之间变化比较小, 说明它对酸碱性的变化不敏感。

## 3 讨论

交替假单胞菌所产酶大部分都是适冷酶。目前从交替假单胞菌中纯化得到的酶主要有琼脂糖酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、蛋白酶、DNA 连接酶等<sup>[11-15]</sup>, 这些酶的最适反应温度在 30°C 左右, 比中温酶低 20°C 左右, 因此在实际生活中使用这些低温酶是一条很有效的节省能源的途径<sup>[8]</sup>。

本文采用 18°C 诱导的方法在中温菌 *E. coli* BL21 中表达了低温酶基因 *celA*。虽然融合酶 GST-CelA 表达量不高, 但是其最适反应温度仍然是 35°C, 保持了低温酶的特性。因此, 可以通过优化培养条件或者换用不同的表达载体和宿主菌来提高酶的表达量, 开拓其在工农业生产中的应用。目前只有少数低温酶在生产上得到大规模应用, 可见低温酶在产业化的过程中存在一些问题尚待解决, 但低温酶的应用前景良好。本文结果为研究交替假单胞菌低温纤维素酶的适冷机理, 以及进一步的应用研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Gauthier G ,Gauthier M ,Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas* ,*Shevanella* and *Moritella* using genes coding for small- subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera , *Alteromonas* ( emended ) and *Pseudoalteromonas* gen. nov. and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* ,1995 **45**( 4 ) :755 – 761 .
- [ 2 ] Morita R Y. Psychrophilic bacteria. *Bact Rev* ,1975 **39** :144 – 167 .
- [ 3 ] 李祖义 陈颖 金晶. 适冷酶 :性能与应用. 工业微生物 , 2003 **33**( 33 ) :36 – 43 .
- [ 4 ] 陈冠军 秦梦华 曲音波,等. 纤维素酶脱墨机理的研究进展. 生物工程进展 ,2001 **21**( 3 ) :17 – 22 .
- [ 5 ] 杨艳 任健 谢明杰,等. 纤维素酶酿酒酵母工程菌的研究进展. 微生物学杂志 ,1997 **17**( 4 ) :45 – 49 .
- [ 6 ] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E ,等. 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 ,2001 .
- [ 7 ] Weisburg W G ,Barns S M ,Pelletier D A ,et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bac* ,1991 **173**( 2 ) :697 – 703 .
- [ 8 ] Feller G ,Bussy O L ,Gerday C. Expression of psychrophilic genes in mesophilic hosts :assessment of the folding state of a recombinant alpha amylase. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** :1163 – 1165 .
- [ 9 ] 王沁 赵学慧. 黑曲霉( *Aspergillus niger* ) 纤维素酶系中内切  $\beta$ -葡聚糖酶性质的研究. 微生物学报 ,1993 **33**( 6 ) :439 – 445 .
- [ 10 ] Violot S ,Haser R ,Sonan G , et al. Expression , purification , crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Acta Crystallogr D Biol* 2003 **59**( 7 ) :1256 – 1258 .
- [ 11 ] Vera J , Alvarez R , Murano E , et al. Identification of a marine agarolytic pseudoalteromonas isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64**( 11 ) :4378 – 4383 .
- [ 12 ] Bakumina I Y , Sova V V , Nedashkovskaya O I , et al. Alpha-galactosidase of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701. *Biochemistry ( Mosc )* ,1998 **63**( 10 ) :1209 – 1215 .
- [ 13 ] Chen X , Sun C , Zhang Y , et al. Effects of different buffers on the thermostability and autolysis of a cold-adapted protease MCP-01. *J Protein Chem* ,2002 **21**( 8 ) :523 – 527 .
- [ 14 ] Fernandes S , Geueke B , Delgado O , et al. Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium :purification , characterization and application for lactose hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol* ,2002 **58**( 3 ) :313 – 321 .
- [ 15 ] Georgette D , Jonsson Z O , Van Petegem F , et al. A DNA ligase from the psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* gives insights into the adaptation of proteins to low temperatures. *Eur J Biochem* , 2000 **267**( 12 ) :3502 – 3512 .

## Cloning and expression of endoglucanase of marine cold-adapted bacteria *Pseudoalteromonas* sp. MB-1

YOU Yin-wei WANG Tian-hong\*

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

**Abstract** : The cold-adapted gram-negative rod bacterium MB-1 which could secret cellulase was screened from mud of the bottom of the Huanghai. According to the sequence of 16S rDNA , this bacterium screened was identified as one species of *Pseudoalteromonas* and was named as *Pseudoalteromonas* sp. MB-1. The gene *celA* encoding cold-adapted endoglucanase was cloned and then jointed to pGEX-4T-1 to construct expression plasmid pGEX-*celA* which was expressed in *E. coli* BL21. Analysis to the supernatant of *E. coli* sonicate revealed that the concentration of GST-Ce1A was about 78.5mg/L. Properties of the fusion enzyme of GST-Ce1A including the optimum temperature at 35°C and the optimum pH about 7.2 showed that this fusion enzyme still belonged to cold-adapted enzyme and neutral enzyme. The result lays solid base for the fundamental theory and application research on cold-adapted cellulase from *Pseudoalteromonas* sp. MB-1.

**Key words** : Marine cold-adapted enzyme , *Pseudoalteromonas* , Endoglucanase , Fusion protein expression

\* Corresponding author. Tel 86-531-8366118 ,E-mail :wth@life.sdu.edu.cn

Received date : 06-17-2004