

植酸酶基因在家蚕 - 杆状病毒表达系统中的表达 及其酶学特性

王文兵^{1,3} 姚 斌² 肖庆利¹ 季 平¹ 汪生鹏¹ 何家禄¹ 吴祥甫^{3*}

¹(中国农业科学院蚕业研究所农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 镇江 212018)

²(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

³(上海生物化学与细胞研究所, 上海 200031)

摘 要 将从黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* 963 克隆并经改造后的植酸酶基因在昆虫 - 杆状病毒表达系统中表达, SDS-PAGE 电泳检测蚕体和蛹的表达量分别达到 1.43 g/L 血淋巴液和 1.90 g/L 血淋巴液。酶活性测定结果表明, 在蚕体和蛹的表达活性分别为 4.67×10^8 u/L 血淋巴液和 5.99×10^8 u/L 血淋巴液。该酶活性的最适温度范围为 50 ~ 60 °C, 最适 pH 值为 5.5 ~ 5.0 和 2.5。研究表明杆状病毒系统表达的植酸酶具有耐酸性和抗高温的特性, 可以用于生产饲用植酸酶。

关键词 植酸酶, 昆虫-杆状病毒表达系统, 表达, 酶学特性

中图分类号 Q789.3R373 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)01-0112-04

植物性饲料中 2/3 的磷是与植酸结合在一起的, 不能为单胃动物(猪、鸡等)利用, 使整个日粮养分利用率降低^[1]。植酸一直被认为是饲料中的抗营养因子。植酸酶能水解植酸, 释放出磷, 提高植物性饲料中磷的利用率, 并减少动物粪便中的有机磷造成的环境污染^[2-4]。植酸酶存在于微生物、植物和某些动物细胞中, 但适合于在饲料中使用的植酸酶主要存在于微生物中^[2,3]。植酸酶的饲喂效果已广泛地得到证实^[1,4]。

昆虫-杆状病毒表达系统创建于 80 年代。Smith^[5]等在 1983 年首先报道了用 AcNPV(*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus) 作载体在 sf 细胞中高效表达了 β -干扰素, 其后多种蛋白得到了表达^[6]。该表达系统因具有安全性好, 表达效率高, 表达的产物能进行加工修饰等优点, 成为当今基因工程四大表达系统之一^[6]。作者将黑曲霉(*Aspergillus niger*)的植酸酶基因在家蚕 - 杆状病毒系统中进行了表达, 并研究了表达产物的酶学特点, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

植酸酶基因的质粒 pYY-01 由中国农业科学院饲料研究

所姚斌博士构建^[7], 转移质粒 pBacPAK8、载体病毒 Bm-BacPAK6、大肠杆菌 TG1 和 BmN 细胞由本实验室保存, Nick Translation 试剂盒、T4DNA 连接酶、限制酶及其他试剂购自于 GIBCO BRL 公司, 检测无机磷含量的分光光度计为岛津 UV-260 型, 供试家蚕品种为 JY1。

1.2 重组转移质粒的构建

植酸酶基因两端为 *EcoR* I 位点, 基因全长约为 1.5 kb, 在 ATG 后 570 bp 处有 *Bam* H I 位点。以 *EcoR* I 酶切带有植酸酶基因的 pYY-01 质粒, 分离植酸酶基因片段, 并以 *EcoR* I 酶切杆状病毒表达系统的转移质粒 pBacPAK8, 用 T4 DNA 连接酶连接基因片段和载体, 连接液转化大肠杆菌 TG1, 用 *Bam* H I 和 *EcoR* I 酶切鉴定植酸酶基因以正确的方向插入到 pBacPAK8 质粒中。质粒 DNA 的快速和大量抽提参照文献 [8]。

1.3 重组病毒的筛选

重组转移质粒和线性化 BmPAK6 病毒共转染 BmN 细胞, 操作过程参照文献 [9]。

1.4 Dot blot 筛选重组病毒

以蓝白斑筛选重组病毒, 重组病毒为白斑。挑取覆盖白色病毒斑的琼脂糖凝胶块, 分别溶于适量的 TC-100 培养基

收稿日期 2002-08-26, 修回日期 2002-10-22。

基金项目 国家 863 高技术项目基金资助 (No. 102-11-02-06)。

* 通讯作者。Tel: 86-21-64374430; Fax: 86-21-64338357; E-mail: xfwu@sunm.shenc.ac.cn

王文兵 现在江苏大学工作; 季平 现在苏州大学工作。

中取上清液感染培养在 96 孔板中的细胞(内含 1.5×10^4 cells/孔) 27℃ 培养 3d 后,吸取培养液并保存,每孔中加入 200 μ L 0.5 mol/L NaOH 裂解细胞,5min 后加入 50 μ L 10 mol/L NH_4Ac 中和,作 Dot blot,进行三轮纯化,Dot blot 技术参照文献 [8]。

1.5 Southern blot 鉴定重组病毒

Dot blot 的阳性克隆经感染 BmN 细胞扩增后,于 25 000r/min 离心 1.5h,收集病毒粒子。病毒粒子 DNA 的抽提参照文献 [9] 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I, *Sma*I 单酶切病毒 DNA,于 8 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,并将 DNA 转印到 NC 膜上,作 Southern-blot。

1.6 植酸酶基因在蚕体和蛹体中的表达

重组病毒以 10^9 PFU/L 注射到 5 龄起蚕和蛹体中,每头注射 5 μ L,以 BmPAK6 病毒作为对照。采集不同时期的血样,测定其表达量,收集表达量最高时期的血样,稀释后测定酶学性质和作 SDS-PAGE 电泳,上样量为 10 μ L 血淋巴液。用 BIO-RAD Molecular analyst 软件分析蛋白质的表达量,表达量为除去了对照该区域蛋白质后的绝对值。

1.7 表达产物活性的测定

植酸酶活性单位的定义为 37℃,pH 5.50 条件下,每分钟从植酸钠中释放出 1 nmol 无机磷所需的酶量为 1 个单位。测定方法为将 0.1 mL 酶液(酶液可稀释,以同体积双蒸水为对照)加入到 0.9 mL 反应液中(内含 1mmol/L 植酸钠的 0.25 mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH5.5)于 37℃ 恒温水浴 30min,然后加入 2 mL 显色剂显色,显色剂为 50 mL 中含 3.66 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的钼酸铵溶液,配制方法为 2.5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 8 mL H_2SO_4 用双蒸水稀释至 250 mL。在分光光度计 750 nm 处测定吸光值,根据磷酸盐比色标准曲线得到释放出的磷酸盐量,计算出酶活力^[10,11]。

1.8 酶学性质的测定

酶活性的测定及酶学性质的测定的试样均为以 5 头蚕的蚕血混合为一个样品,每一个处理收集 3 个样品,测定时每个样品重复 3 次,结果中的数据为平均值。

2 结果

2.1 重组转移质粒的构建

大量抽提含植酸酶基因的质粒 pYY-01DNA,用 *Eco*RI 酶切后分离植酸酶基因 DNA,与同样酶切的 pBacPAK8 质粒连接后转化大肠杆菌 TG1,在固体 LB 培养基上挑取单菌落,快速抽提质粒 DNA 进行酶切鉴定,*Eco*R I 单酶切有 1.5 kb 的条带,*Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切有近 570 bp 和 1 kb 的条带,证明植酸酶基因以正确的方向插入到转移质粒中。

2.2 重组病毒的获得

含植酸酶基因的转移质粒 DNA 和线性化 BmPAK6 病毒共转染 BmN 细胞后,观察细胞的变化,当细胞变圆,膨大时,证明细胞已受感染。用感染的病毒液经蓝白斑分离重组病毒株,进一步在 96 孔板用 X-gal 鉴定获得的重组病毒,选用培养液不变色的病毒株。这样的病毒株经扩大培养后,抽取

病毒 DNA,分别用 *Bam*H I, *Eco*R I 和 *Sma*I 单酶切。由于植酸酶基因中,ATG 上游附近及下游 570bp 处各有一个 *Bam*H I 酶切位点,因此,用 *Bam*H I 酶切后的重组病毒 DNA 应将植酸酶基因分解成 570bp 和一个较大的 DNA 片段;在植酸酶基因的两端分别有 *Eco*R I 位点,用 *Eco*R I 酶切后的重组病毒 DNA 应产生一个完整的植酸酶基因片段;植酸酶基因中没有 *Sma*I 位点,用 *Sma*I 酶切应产生一个大于 1.5kb 的片段。Southern-blot 的结果显示,这三种酶切的病毒 DNA 与植酸酶基因的探针杂交,分别生产两条、一条和一条阳性带(见图 1),证明植酸酶基因已转入病毒基因组上,获得了含植酸酶基因的重组杆状病毒 Bm-pBacPAK6(PA2)。



图 1 植酸酶基因片段为探针检测重组病毒 DNA 中的植酸酶基因的存在

Fig. 1 DNA of recombinant virus Bm-pBacPAK6(PA2) was used to detect the gene of phytase inserted into Bm-pBacPAK6 virus by Southern blot (the fragment of phytase gene as probe)

There are two recognizing sites of *Bam*H I at near atg and 570bp downstream of atg, respectively; when DNA of recombinant virus Bm-pBacPAK6(PA2) was digested with *Bam*H I, the phytase gene would appear in 570bp and a larger fragments. There are two recognizing sites of *Eco*R I at N-terminal and C-terminal ends of the gene, when DNA of recombinant virus was digested with *Eco*R I, the phytase gene would appear in a fragment of 1.5kb length. 1. Bm-pBacPAK6(PA2) full length DNA; 2. Marker(λ DNA digested with *Eco*R I and *Hind* III); 3. Bm-pBacPAK6(PA2) DNA digested with *Sma*I; 4. Bm-pBacPAK6(PA2) DNA digested with *Eco*R I; 5. Bm-pBacPAK6(PA2) DNA digested with *Bam*H I.

2.3 植酸酶的活性测定

根据磷酸盐的标准曲线,分别测得蚕体、蛹的植酸酶表达活性为 4.67×10^8 u/L 血淋巴液, 5.99×10^8 u/L 血淋巴液。SDS-PAGE 电泳显示蚕幼虫和蛹体的表达量分别为 1.43 g/L 血淋巴液和 1.90 g/L 血淋巴液(见图 2' → 所示)。

2.4 植酸酶基因在家蚕幼虫体内不同时间的表达量的变化

感染 72h 后测到活性,96 ~ 120h 酶活性较高。120h 以后,虫体逐渐死亡,酶活性下降(见图 3)。

2.5 本系统表达的植酸酶的酶学性质

2.5.1 米氏常数的测定:用双倒数法测得植酸酶的 K_m 值为 0.77。

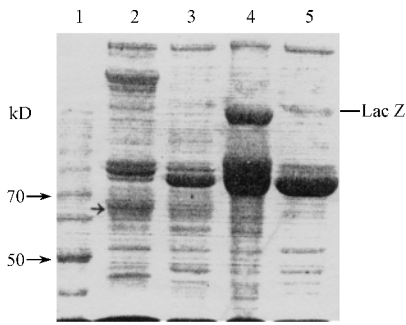


图2 SDS-PAGE 检测植酸酶在家蚕幼虫和蛹体内的表达

Fig. 2 Expression of phytase gene in silkworm larvae and pupae was detected by SDS-Polyacrylamide Gel Analysis, using parental virus which contains lac Z gene as a control

10 μ L lysates of haemolymph of each sample were loaded into the gel.

1. 10 kD protein marker (Gibco); 2. Expression of phytase gene in silkworm pupae; 3. Expression of phytase gene in silkworm larvae; 4. Silkworm larvae infected with Bm-pBacPAK6 containing lac Z gene; 5. Healthy silkworm larvae

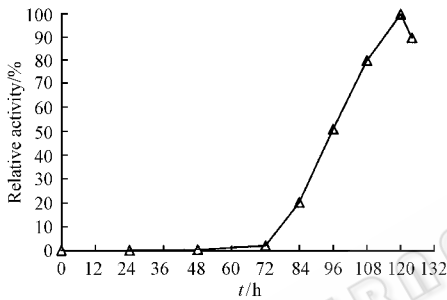


图3 家蚕幼虫感染病毒后体内不同时期的植酸酶活性

Fig. 3 The enzymic activity of phytase expressed in silkworm larvae at different time point after infection.

2.5.2 温度对植酸酶活性的影响: 植酸酶活性最适的反应温度范围为 50~60 $^{\circ}$ C, 超过 60 $^{\circ}$ C 后, 酶的活力下降(见图 4)。

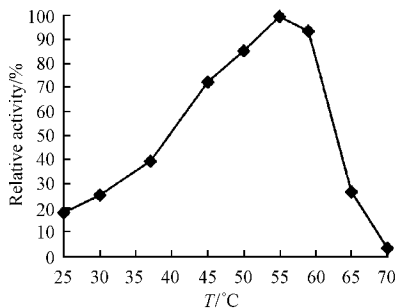


图4 温度对植酸酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on phytase activity

2.5.3 pH 值对植酸酶活力的影响: pH 值在 5.0~5.5 之间, 酶活力最高, 大于 6.0 后, 酶活力下降很快, 7.0 以上则完全失活, pH 值低于 5.0 时, 酶活力逐渐下降, 至约 3.7 时, 达到最低值, 随 pH 值的下降, 酶活力又逐渐回升, 至 pH 值 2.5 时

达到峰值, 之后又逐渐下降(见图 5)。

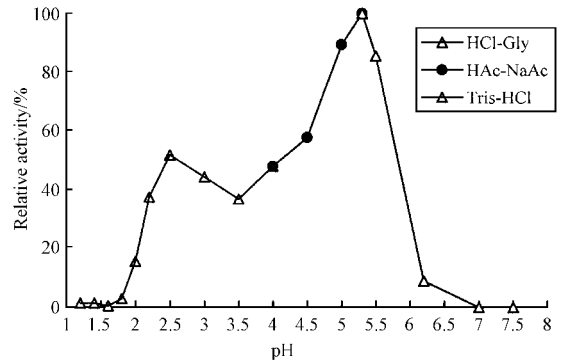


图5 pH 对植酸酶活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on phytase activity

3 讨论

杆状病毒表达系统自建立以来, 因其具有独特的优点而受到重视。杆状病毒的宿主域窄, 主要感染鳞翅目昆虫。家蚕是该目的代表种。对家蚕杆状病毒感染家蚕的记录可以追溯到 12 世纪, 但并没有出现有关家蚕杆状病毒对人类健康危害的报道, 携带植酸酶基因的家蚕杆状病毒必须通过穿刺的方法接种家蚕, 在体外病毒很容易失活, 不会造成污染; 家蚕的幼虫、蛹和蛾均可入药和食用, 因此利用家蚕生产人用、动物用蛋白产品的安全性好^[6]。由于昆虫细胞对蛋白的后加工体系更接近脊椎动物, 表达的蛋白的活性高。我国有悠久的养蚕历史, 全国各地均有蚕业基地和相关研究单位, 对蚕的研究相当深入。因此, 以家蚕作为生物反应器, 是具有我国特色的一个重要发展方向。

植酸酶具备饲料添加剂的营养价值和环境的保护作用等特点, 其应用潜能巨大, 相关研究开展得较为活跃。由于天然产酶菌株的表达量普遍较低, 难以获得大量产品, 生产成本高, 利用基因工程方法生产植酸酶是一个解决途径。通过植酸酶基因在家蚕-杆状病毒表达系统中的表达, 检测到的表达活性与姚斌^[11]等报道的在酵母系统中表达的植酸酶活性大致相同。对表达产物的酶活性研究表明, 该产物有较高的抗酸性和耐高温等特性, 很适合作为饲料添加剂。该系统的生产投入较简单, 产品无需后处理而可直接添加到饲料中, 因此, 利用家蚕-杆状病毒表达系统生产的植酸酶有开发的实用价值。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Nelson T S. The utilization of phytase phosphorus by poultry—a review. *Poult Sci*, 1967, **46**: 862–871
- [2] Nelson T S, Shieh T R, Wodzinski R J *et al.* The availability of phytase phosphorus in soya bean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult Sci*, 1968, **47**: 1842–1848
- [3] Nelson T S, Shieh T R, Wodzinski R J *et al.* Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J Nutr*,

- [4] Abul H J , Donna M G. Extracellular Phytase from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 : purification and characterization. *Prep Biochem* , 1987 , **17** (1) : 63 - 91
- [5] Smith G E , Summers M D , Fraser M J. Production of human beta interferon in insect cell infected with baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* , 1983 , **3** : 2156 - 2165
- [6] Lü H S (吕鸿声). Molecular biology of insect viruses. Beijing : China Agricultural Sciencetech Press , 1998
- [7] YAO B (姚斌) , ZHANG C Y (张春义) , WANG J H (王建华) *et al.* Isolation of *Aspergillus niger* 963 with phytase activity and cloning its phytase gene phy A2. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报) , 1998 , **6** (1) : 1 - 7
- [8] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular cloning : A Laboratory Manual* . 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [9] Summers M D , Smith G E. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 , 1987
- [10] Ullah A H. *Aspergillus ficuum* phytase : partial primary structure , substrate selectivity , and kinetic characterization. *Prep Biochem* , 1988 , **18** (4) : 459 - 471
- [11] YAO B (姚斌) , FAN Y L (范云六). Molecular biology and gene engineering of phytase. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2000 , **16** (1) : 1 - 5

Expression of Phytase Gene in *Bombyx Mori*

WANG Wen-Bing^{1,3†} YAO Bin² XIAO Qing-Li¹ JI Ping^{1,‡} WANG Sheng-Peng¹ HE Jia-Lu¹ WU Xiang-Fu^{3*}

^{1,3}(Key Laboratory of Silkworm Biotechnology , Ministry of Agriculture , Zhenjiang 212018 , China)

²(Feed Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Beijing 100081 , China)

³(Institute of Biochemistry and Cell Biology , Shanghai Institute of Biological Sciences , Shanghai 200031 , China)

Abstract Phytase gene of *Aspergillus niger* 963 was cloned into baculovirus transfer vector. DNA of the recombinant vector was co-transfected with Bm-BacPAK6 DNA into *BmN* cells , and recombinant virus was selected by plaque assays. The recombinant virus was identified by Dot blot and Southern-blot with the specific probe for phytase gene. Phytase gene was expressed in silkworm larvae and pupae. The expression product was 1.43 g/L haemolymph for silkworm larvae and 1.90 g/L haemolymph for pupae , respectively. The enzymic characteristics of phytase expressed in baculovirus-expression system were studied in this paper.

Key words phytase , expression , baculovirus , characteristics

Received : 08-26-2002

This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D Project of China (No. 102-11-02-06) .

* Corresponding author. Tel : 86-21-64374430 ; Fax 86-21-64338357 ; E-mail : xfwu@summ.shcnc.ac.cn

† Who is working in Institute of life sciences , University of Jiangsu.

‡ Who is working in University of Suzhou.