

硫矿硫化叶菌 MTSase 和 MTHase 基因的克隆与表达

陈晓斌 林建平 金志华 岑沛霖

(浙江大学生物工程研究所 杭州 310027)

摘要: 从嗜热硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) ATCC 35092 的基因组中用 PCR 方法扩增得到编码 MTSase 和 MTHase 的基因, 分别将其插入原核表达载体 pTrc99a 中, 并转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 进行诱导表达。MTSase 和 MTHase 酶活产率达到了 31.3U/g (wet cell) 和 403U/g (wet cell)。在 75℃, pH5.0 条件下, 两酶联合作用转化淀粉生产海藻糖, 当淀粉浓度为 15%, DE 值为 10 时, 海藻糖转化率最高为 53.6%。

关键词: 麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (MTSase), 麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解脱酶 (MTHase), 海藻糖, 淀粉

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 05-0054-05

Cloning and Expression of MTSase and MTHase from *Sulfolobus solfataricus* in *E. coli*

CHEN Xiao-Bin LIN Jian-Ping JIN Zhi-Hua CEN Pei-Lin

(Institute of Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract: The genes of maltooligosyl trehalose synthase (MTSase) and maltooligosyl trehalose tetrahydrolase (MTHase) from *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 were amplified using PCR. The expression plasmids, pTrc99a-MTSase and pTrc99a-MTHase, were constructed by inserting these two DNA fragments into *E. coli* expression vector pTrc99a. The specific activity of MTSase and MTHase in *E. coli* BL21 (DE3) at optimal fermentation conditions reached 31.3U/g (wet cell) and 403U/g (wet cell), respectively. The biotransformation of partially hydrolyzed starch to trehalose catalyzed by MTSase and MTHase was carried out at 75℃ and pH 5.0. The highest yield of trehalose (ca. 53.6%) was gained when the original starch concentration was 15% (w/v) and the DE value was 10.

Key words: Maltooligosyl trehalose synthase (MTSase), Maltooligosyl trehalose tetrahydrolase (MTHase), Trehalose, Starch

海藻糖 [α-D-葡萄糖基-(1,1)-α-D-葡萄糖苷] 是一种非还原性二糖, 广泛存在于低等植物、藻类、细菌、真菌、酵母和昆虫中^[1]。海藻糖具有稳定细胞膜和蛋白质结构、抗逆保鲜的作用^[2], 可用于细菌、病毒类疫苗、蛋白质(酶)、抗体等生物制品的冷冻、干燥和保存^[3,4]。它的甜度只有蔗糖的一半, 且无还原性醛基, 因此可作为甜味剂、稳定剂和保湿剂等广泛应用于饮料、糖果等食品中。海藻糖具有保湿、防晒、防紫外线功效, 因此可作为保湿剂、洁肤剂、紫外吸收剂用于皮肤化妆品^[5]。

由于海藻糖具有独特的生物活性, 各国科学家对其生产技术进行了大量的研究。早期海藻糖主要是从酵母中提取, 成本高, 难以大规模生产, 限制了其应用。以往虽有一些酶法合成海藻糖的途径, 但由于起始物价格昂贵, 或转化率低, 均不适合工业

生产^[6]。硫化叶菌麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖海藻糖水解释酶 (MTHase) 最早是由 Kato 等人从 *Sulfolobus solfataricus* KM1 中分离纯化得到的, 它们广泛存在于硫化叶菌科 (sufolobaceae) 中, 特别是硫化叶菌属^[7]。这两种酶可以从麦芽寡糖或淀粉合成海藻糖。MTSase 主要催化分子内转糖基反应, 将淀粉还原性末端的 α -1, 4-糖苷键转化为 α -1, 1-糖苷键, 形成海藻糖末端; MTHase 主要水解与 α -1, 1-糖苷键相邻的 α -1, 4-糖苷键产生海藻糖, 并使淀粉减少两个葡萄糖单元; 这两种酶协同作用, 可以从液化淀粉连续地生成海藻糖^[8]。MTSase 和 MTHase 双酶法转化淀粉生产海藻糖, 起始物价格便宜, 转化率高, 是目前最具竞争力的海藻糖生产方法。日本已将此方法用于工业化生产, 大幅降低了海藻糖生产成本。

目前, *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 的全基因组测序已经完成, 编码 MTSase 和 MTHase 的基因序列已有报道, 而且两个酶的特性也有了较好的描述^[1,9]。MTSase 和 MTHase 的最适反应温度分别在 70℃ ~ 80℃ 和 70℃ ~ 85℃ 之间, 反应可以在高温下进行, 加快了反应速率并减少了污染, 原料转化率较高, 将它们应用于海藻糖生产具有重要的意义。

硫化叶菌最适生长温度较高, 生长缓慢, 难于培养, 不适合工业生产, 因此, 需要构建合适的外源基因表达体系。本文克隆并表达了 *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35092 的 MTSase 和 MTHase 基因, 并对双酶联合转化淀粉生产海藻糖进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

Sulfolobus solfataricus ATCC 35092 的基因组购于 ATCC; *E. coli* BL21 (DE3), 质粒 pTrc99a 为实验室保藏; Taq DNA polymerase, T4 DNA 连接酶, 限制性核酸内切酶, dNTP mixture, PMD-18-T vector 试剂盒, 购于 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒购于 Qia-gen 公司; 麦芽六糖购于 Sigma 公司; BAN480L 中温 α -淀粉酶、复合糖化酶 (Novo Nordisk)。

1.2 方法

1.2.1 培养条件: 重组大肠杆菌培养使用 LB 培养基 (Amp 浓度 100 μ g/mL), 37℃ 培养至 OD_{600} 约 0.6, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 28℃ 诱导培养 16h 后收获。

1.2.2 引物设计和 PCR 扩增: 根据 MTSase 和 MTHase 的基因序列^[1] 设计上下游引物, 引物序列见表 1。PCR 扩增参数: 94℃ 预变性 10min; 循环 30 次: 94℃, 30s, 50℃, 30s, 72℃, 2min; 最终延伸: 72℃, 10min; 4℃ 保存。

表 1 MTSase 和 MTHase PCR 引物序列

酶	上游引物	下游引物
MTSase	5' -ggcccatggtcatgataataggcacatatag-3'	5' -caagcttgatctgagtaaatgcatatct-3'
MTHase	5' -gcgtcatgacgtttgcttataaaatag-3'	5' -cccggatcctaaagtattataaagca-3'

1.2.3 重组表达质粒的构建^[10]: (1) pTrc99a-MTHase 的构建: PCR 产物经纯化回收, 连接到 PMD-18-T vector 上, 用 *Nco*I、*Hind*III 双酶切, 回收 2.2kb 大小的片断, 连接到经 *Hind*III、*Nco*I 双酶切的 pTrc99a 质粒上; (2) pTrc99a-MTHase 的构建: PCR 产物经纯化回收, 连接到 PMD-18-T vector 上, 用 *Pag*I、*Bam*HI 双酶切后, 回收 1.6kb 大小的片断, 连接到经 *Nco*I 和 *Bam*HI 双酶切的 pTrc99a 质粒上。

1.2.4 MTSase 和 MTHase 粗酶液的制备: 将重组菌株诱导培养后的发酵液离心 (5,000r/min) 10min, 收集细胞, 重悬于 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 超声破胞, 离心 (12,000r/min, 30min) 收集上清液。将上清液 75℃ 加热 10min, 离心 (12,000r/min, 30min) 后, 将上清液 75℃ 加热 30min, 再次离心 (12,000r/min, 30min) 后, 上清液即为粗酶液。

1.2.5 酶活测定: (1) MTSase 酶活测定: 将麦芽六糖溶于 50mmol/L pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液中, 配成 5.05mmol/L 的溶液。取 0.5mL 该溶液, 加入 5 μ L MTSase 粗酶液, 75℃ 反应 30min, 100℃ 沸水中煮 10min 终止反应。加入糖化酶糖化 24h, HPLC 测定溶液中海藻糖的含量。MTSase 的酶活单位定义为每分钟转化 1 μ mol 麦芽六糖生成麦芽四糖基海藻糖所需的酶量。通过最终海藻糖的生成量代替麦芽四糖基海藻糖的生成量来计算 MTSase 的酶活。(2) MTHase 酶活测定: 取 0.5mL 上述麦芽六糖溶液, 加入 10 μ L MTSase 粗酶液, 75℃ 反应 2h, 沸水中煮 10min 终止反应。待溶液冷却后, 加入 2 μ L MTHase, 75℃ 反应 15min, -20℃ 保存。HPLC 测定糖化液中海藻糖的含量。MTHase 的酶活单位定义为每分钟水解 1 μ mol 麦芽四糖基海藻糖生成海藻糖所需的酶量。

1.2.6 不同浓度和 DE 值淀粉溶液的制备: 将一定量的可溶性淀粉溶于 50mmol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0), 配成 10%、15% 和 20% 的悬液, 80℃ 分散糊化 10 min, 加入 α -淀粉酶 100U/(g 淀粉), 50℃ 下反应 0、5、10、15、20、25 min 后取出, 120℃ 灭活 α -淀粉酶^[11], DNS 法测定其 DE 值。

1.2.7 淀粉浓度及 DE 值对海藻糖转化率的影响: 按照各 30U/g 淀粉的量, 将 MTSase 和 MTHase 粗酶液加入到不同浓度及 DE 值的淀粉溶液中, 混匀后 75℃ 水浴反应 72h。加入糖化酶糖化, HPLC 测定海藻糖含量。海藻糖转化率 = 糖化液中海藻糖总量 (g) \div 原料液中淀粉的量 (g) \times 100%。

1.2.8 HPLC 方法: HPLC 分析方法在 Waters 液相系统上进行: Waters 515 HPLC Pump, Waters 2410 Refractive Index Detector, Waters Carbohydrate Analysis column (4.6 \times 300mm); 流动相为乙腈: 水 = 80: 20; 流速: 0.8mL/min; 温度: 室温。

2 结果与讨论

2.1 基因扩增与测序

PCR 扩增得到的 MTSase 基因大小约为 2.2kb, MTHase 基因大小约为 1.6kb, 测序结果证明 PCR 产物的序列与文献 [3] 报道的一致。

2.2 重组表达质粒的鉴定

pTrc99a-MTSase 经 *Hind* III、*Nco* I 双酶切和 pTrc99a-MTHase 经 *Bam* HI 单酶切的电泳图分别为图 1A 和图 1B。结果表明 MTSase 和 MTHase 基因已分别正确插入表达质粒 pTrc99a 中。

2.3 表达产物 SDS-PAGE 分析

BL21 (DE3) / pTrc99a-MTSase 诱导表达的 SDS-PAGE 图谱 (图 2), 将诱导培养后的菌液离心沉淀后超声破碎, 利用目的表达产物的热稳定性^[9], 将破胞液 75℃ 加热 10min, 以转化空载体为对照, 对热处理后的可溶蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果, pTrc99a-MTSase 转化 BL21 (DE3) 的泳道比空载体转化的 BL21 (DE3) 在约 86kD 处明显地多出一条带, 与文献 [1] 报道的 MTSase 的分子量一致。

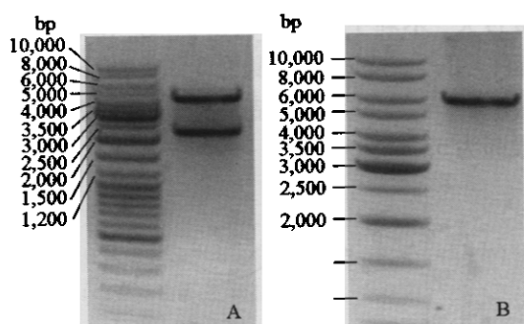


图1 重组表达质粒酶切后的琼脂糖凝胶电泳

A pTrc99a-MTSase digested with *Hind* III and *Nco* I, B pTrc99a-MHSase digested with *Bam* HI

BL21 (DE3) / pTrc99a-MHSase 诱导表达的 SDS-PAGE 图谱 (见图3), 从电泳图上可以看出, 在不加 IPTG 诱导剂的情况下, MTHase 只有微弱的泻漏表达, 而加入 IPTG 诱导剂的情况下, MTHase 实现了高水平表达, 重组蛋白表达量达 25%。由图3的结果可知 MTHase 的分子量约为 64kD, 与文献 [1] 报道的一致。

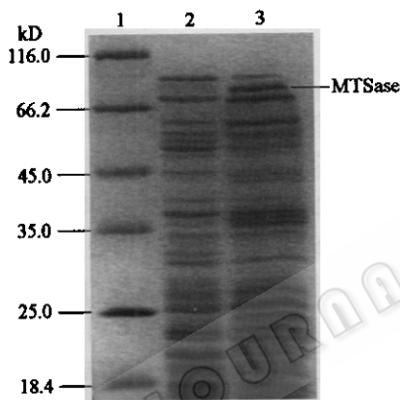


图2 BL21 (DE3) / pTrc99a-MTSase 诱导表达的 SDS-PAGE 图谱

1 Protein marker, 2 Soluble proteins of BL21 (DE3) / pTrc99a after heat treatment, 3 Soluble proteins of BL21 (DE3) / pTrc99a-MTSase after heat treatment

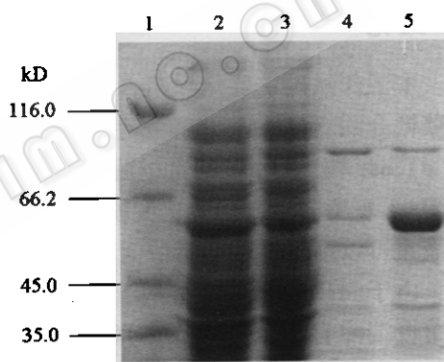


图3 BL21 (DE3) / pTrc99a-MHSase 诱导表达的 SDS-PAGE 图谱

1 Protein marker, 2 Total cellular proteins (with IPTG induction), 3 Crude cell-free extract (with IPTG induction), 4 Soluble proteins after heat treatment (without IPTG induction), 5 Soluble proteins after heat treatment (with IPTG induction)

2.4 酶活力的测定

对重组菌株 BL21 (DE3) / pTrc99a-MTSase、BL21 (DE3) / pTrc99a-MTHase 的粗酶液进行酶活测定, 其酶活分别为 31.3U/g (wet cell) 和 400U/g (wet cell), 较原来 *S. solfataricus* ATCC 35092 酶活表达水平 [MTSase 0.1U/g (wet cell), MTHase 0.3U/g (wet cell)^[7]] 均有显著提高。

2.5 MTSase 和 MTHase 联合作用转化淀粉生产海藻糖

图4为 MTSase 和 MTHase 联合作用转化淀粉生产海藻糖时, 淀粉浓度和 DE 值与海藻糖产率之间的关系。浓度为 10% 或 15% 的淀粉溶液, 控制 DE 值在 8~12 之间, 有利于海藻糖的合成。而淀粉浓度为 20% 时, 海藻糖的转化率急剧下降, 因为过高的

淀粉浓度使溶液的粘度过大,不利于酶分子自由扩散。由于 MTSase 和 MTHase 只对聚合度 3 及以上的底物起作用,当底物聚合度为 3 时, MTHase 相对活性极低^[8],因此 DE 值越高,底物的理论转化率越低。实验结果发现,当淀粉浓度为 15%, DE 值为 10 时,海藻糖的转化率最高为 53.6%。

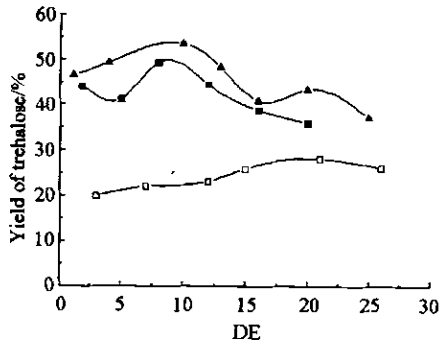


图4 不同浓度及 DE 值对海藻糖转化率的影响
 □—淀粉浓度 10%, ▲—淀粉浓度 15%, ■—淀粉浓度 20%

3 结论

本工作从硫矿硫化叶菌 (*S. solfataricus*) ATCC 35092 的基因组中得到麦芽寡糖基海藻糖合酶 (MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖水解酶 (MTHase) 基因,构建了两株分别产 MTSase 和 MTHase 的重组菌株,实现了这两种酶在大肠杆菌中的表达。对 MTSase 和 MTHase 双酶联合作用转化淀粉生产海藻糖进行了初步研究,利用经过热处理纯化的粗酶液,可以高效的转化淀粉生产海藻糖,为以淀粉为原料酶法生产海藻糖打下基础。

由于 MTSase 酶基因的密码子偏爱性与高表达的大肠杆菌基因明显不同,其中大肠杆菌极端稀有密码子 AGA/AGG、AUA、CUA、GGA 总数占了该基因密码子总数的 16%,极大的限制了该基因在大肠杆菌中的表达水平,表达水平远不能满足工业生产所需的要求,因此该酶在大肠杆菌中的高水平表达还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Pascale D, Sasso M P, Lemia I D, *et al.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, 11 (4): 777 ~ 786.
- [2] 戴秀玉,程萍,周坚,等. 微生物学通报, 1995, 22 (2): 102 ~ 104.
- [3] Nielsen K. J Immunoassay, 1995, 16 (2): 183 ~ 197.
- [4] Camilo C, Shevanti S, Madan T, *et al.* Biotechnology, 1992, 10 (9): 1007 ~ 1011.
- [5] 张玉华,凌沛学,籍保平. 食品与药品, 2005, 7 (3): 8 ~ 13.
- [6] 陈炜,何秉旺. 微生物学通报. 1998, 25 (3): 164 ~ 166.
- [7] Kato M, Miura Y, Kettoku M, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60 (3): 546 ~ 550.
- [8] Kato M. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1999, 6 (3): 223 ~ 233.
- [9] Fang T Y, Hung X G, Shih T Y, *et al.* Extremophiles, 2004, 8 (4): 335 ~ 343.
- [10] J 萨姆布鲁, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 34 ~ 36.