

# 泰山土壤宏基因组 DNA 中耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的克隆、表达及性质

魏萍\* 宋文刚 郝岗平

(泰山医学院基础医学部 泰安 271000)

**摘要:** 从泰山土壤宏基因组文库中发现可能的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *pwtsA*, 将其克隆到表达载体 pET30a, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。工程菌在 IPTG 诱导下高效表达可溶性的重组蛋白 PWTSA, 分子量为 57 kD, 与预期大小一致。PWTSA 能够水解 ONPG 产生 *o*-硝基酚, 酶活力为 13.6 U/mg, 确证了重组蛋白为  $\beta$ -半乳糖苷酶。PWTSA 的最适反应温度在 85°C~95°C 之间, 最适 pH 值为 6.5, 对 90°C 左右的高温有很好的耐受力。在标准反应条件下, 酶作用于底物 ONPG 的米氏常数  $K_m$  为 0.83 mmol/L。

**关键词:**  $\beta$ -半乳糖苷酶, 宏基因组, *pwtsA*, 基因表达

## Clone, Expression and Characterization of the Thermostable $\beta$ -Galactosidase from Soil Metagenomic DNA of Taishan Mountain

WEI Ping\* SONG Wen-Gang HAO Gang-Ping

(Department of Basic Medicine, Taishan Medical University, Tai'an 271000)

**Abstract:** A possible  $\beta$ -Galactosidase gene (*pwtsA*) was discovered from soil metagenomic DNA of Taishan Mountain. *PwtsA* gene was inserted into the expression vector pET30a and transferred into *E. coli* BL21(DE3). Recombinant protein PWTSA was expressed as a soluble form at high level through IPTG induction, with a molecular mass of 57 kD analyzed by SDS-PAGE. PWTSA can produce *o*-nitrophenol from *o*-nitrophenol- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), and its specific activity was determined as 13.6 U/mg. The enzymatic studies demonstrated that the recombinant protein PWTSA was a thermostable  $\beta$ -Galactosidase, its optimum temperature and pH were 85°C~95°C and 6.5 respectively. In standard assays, the  $K_m$  for ONPG was 0.83 mmol/L.

**Keywords:**  $\beta$ -Galactosidase, Metagenomic, *pwtsA*, Gene expression

$\beta$ -半乳糖苷酶(EC3.2.1.23), 又称乳糖酶, 广泛存在于各种微生物、植物及动物组织中。该酶能够

水解乳糖中的 -1,4-D-半乳糖苷键, 使其降解成为半乳糖与葡萄糖, 同时具有半乳糖苷的转移作用<sup>[1]</sup>。

$\beta$ -半乳糖苷酶可用于治疗乳糖不耐受以及加工生产低乳糖牛奶等。据统计, 全世界 70%以上的人口有不同程度的原发或继发性乳糖酶缺乏, 我国乳糖酶缺乏者占汉族成人的比例高达 75%~95.7%<sup>[2]</sup>。目前, 工业用 $\beta$ -半乳糖苷酶主要来源于多种微生物如细菌、霉菌、酵母菌及放线菌<sup>[3]</sup>。本文利用大肠杆菌表达系统高效表达了泰山土壤宏基因组研究中发现的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因 $pwtsA$ , 并进行了定性和功能研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Pyrobest DNA 聚合酶、DNA 分子量标准及蛋白分子量标准均购自 TaKaRa 公司; IPTG、氨基青霉素、卡那霉素、*o*-硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖(*o*NP- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG)购自 Sigma 公司; 黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶(商品名为乳糖酶)购自上海宝丰生化有限公司; Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司; 96 孔板、DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司。

### 1.2 菌株和质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3)、pUC18 质粒均为本实验室保藏; pET30a 质粒为 Novagen 公司产品。

### 1.3 土壤基因组 DNA 提取及宏基因组文库的构建

在泰山海拔 400 m、800 m 及 1200 m 的高度采集土壤样本, 土壤基因组 DNA 提取根据参考文献[4]进行。粗提后的土壤基因组 DNA 利用低熔点琼脂糖凝胶电泳检测并纯化。*Sau*3A I 酶切纯化的土壤基因组 DNA, 蔗糖密度梯度(10%~40%, *W/V*)离心后收集 2 kb 以上的 DNA 片段与 *Bam*H I 酶切回收的 pUC18 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。收集白色克隆到 96 孔板, -80 $^{\circ}$ C 冻存。随机挑选白色克隆进行酶切验证转化效率。

### 1.4 $pwtsA$ 基因的扩增与克隆

根据获得的 $pwtsA$ 基因序列, 设计引物 P1: 5'-GCCATATGATGCTCCAGAACAGTTG-3'和 P2: 5'-GCCTCGAGGATTATTCGGCTCAGCTT-3', 在引物两端分别加入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。以获得的重组克隆 pWTSA 为模板 PCR 扩增  $pwtsA$  基因。反应体

系( $\mu$ L): 10 $\times$ Pyrobest Buffer II 5  $\mu$ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, P1(20  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, P2 (20  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, 重组克隆 pWTSA 质粒 DNA (10 pg/ $\mu$ L)1  $\mu$ L, Pyrobest DNA Polymerase 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA 胶回收试剂盒回收。回收 *Nde* 和 *Xho* 双酶切 PCR 产物并与 *Nde* 和 *Xho* 双酶切质粒 pET30a 的回收产物连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3)。挑选重组克隆进行 *Nde* 和 *Xho* 双酶切验证后进行 DNA 序列测定。

### 1.5 重组蛋白 PWTSA 的诱导表达和纯化

将重组质粒转化大肠杆菌表达宿主菌 BL21 (DE3)感受态细胞, 挑选转化子提取质粒进行酶切鉴定后, 挑取重组菌接种于 5 mL 含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 次日以 1%的接种量分别接种于 200 mL 含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基培养至  $OD_{600}$ =0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 6 h。收集诱导表达的工程菌, 进行超声波破碎菌体并进行 SDS-PAGE 电泳分析。

重组蛋白 PWTSA 的纯化按照 Rapid Affinity Purification Kit 说明书结合 pET System Manual 进行。

### 1.6 蛋白质含量的检测

采用 Lowry 法<sup>[5]</sup>。

### 1.7 重组蛋白 PWTSA 的定性及酶活力测定

以 ONPG 为底物, 通过检测  $OD_{420}$  值判断 PWTSA 是否能够水解 ONPG 产生 *o*-硝基酚 (ONP), 进而确定重组蛋白 PWTSA 是否为  $\beta$ -半乳糖苷酶。具体实验操作按照文献[6]进行, 酶活单位定义为 1 min 内水解底物 ONPG 产生 ONP 的微摩尔数。

## 2 结果

### 2.1 $\beta$ -半乳糖苷酶基因( $pwtsA$ )的发现与分析

按照材料与方 法 1.3 构建了泰山土壤宏基因组文库(资料未给出)。在对随机挑选的克隆 pWTSA 测序时发现在大约 3 kb 的插入片段中有一个 1479 bp 的完整 ORF, 将其命名为  $pwtsA$  基因。序列分析表明  $pwtsA$  基因编码的蛋白与多种古生菌来源的  $\beta$ -半乳糖苷酶具有较高同源性: 与来自 *Pyrococcus woesei* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[6]</sup> (GenBank 登录号: AAB97862)

具有 72% 的一致性和 77% 的相似性; 来自 *Pyrococcus abyssi* 的  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[7]</sup> (GenBank 登录号: CAB49848) 具有 55% 的一致性和 69% 的相似性; 来自 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 的  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[8]</sup> (GenBank 登录号: BAD85950) 具有 42% 的一致性和 57% 的相似性。 *pwtsA* 基因已经在 GenBank 注册, 登录号为 EU294509。

## 2.2 *pwtsA* 基因的克隆及表达载体的构建

以质粒 pWTSa 为模板 PCR 扩增 *pwtsA* 基因, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测与预期片段大小一致。 *Nde* 和 *Xho* 双酶切 PCR 产物, 并与 *Nde* 和 *Xho* 双酶切质粒 pET30a 连接, 转化受体菌 *E. coli* BL21(DE3)。得到的重组质粒经 *Nde* 和 *Xho* 双酶切得到与 PCR 产物大小一致的片段, 序列测定结果与在 GenBank 注册序列完全一致, 重组质粒命名为 pETA。PCR 产物电泳和重组质粒的酶切分析结果见图 1。

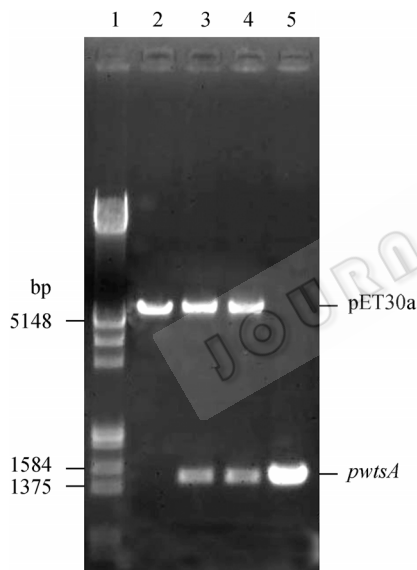


图 1 重组质粒 pETA 的酶切验证图

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of plasmid pETA

1: DNA 分子量标准 ( $\lambda$ DNA/*EcoR* I + *Hind* III); 2: pET30a/*Nde* I + *Xho* I 酶切产物; 3, 4: pETA/*Nde* I + *Xho* I 酶切产物; 5: *pwtsA* 基因 PCR 产物

1: Marker ( $\lambda$ DNA/*EcoR* I + *Hind* III); 2: pET30a/*Nde* I + *Xho* I; 3, 4: pETA/*Nde* I + *Xho* I; 5: PCR product of *pwtsA*

## 2.3 重组蛋白 PWTSA 的诱导表达和纯化

重组菌株经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳分析显示, 与对照菌株大肠杆菌 BL21/pET-30a 相比, 在约 57 kD 处出现一条与预期表达蛋白大小一致的条带(图 2, 列 2 和 3)。超声波破碎诱导表达的工程菌, 收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明

重组蛋白大部分以可溶形式存在。重组蛋白 C 末端含有 6 个组氨酸标签, 采用镍柱亲和层析进行纯化, 将纯化后的蛋白命名为 PWTSA。电泳分析显示 PWTSA 为单一条带, 大小与预期相符(图 2, 列 4)。

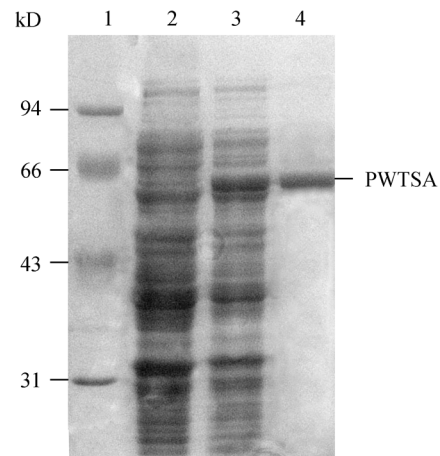


图 2 重组表达蛋白 PWTSA 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of protein of PWTSA

1: 蛋白质标准; 2: BL21/pET-30a 对照菌全菌体; 3: BL21/pETA 重组菌全菌体; 4: 亲和层析纯化后的重组蛋白

1: Protein molecular weight markers; 2: BL21/pET-30a; 3: BL21/pETA; 4: The protein purified with affinity chromatography

## 2.4 重组蛋白 PWTSA 的定性及相关酶学性质研究

**2.4.1 重组蛋白 PWTSA 的定性:** 按照与其同源性最高的 *Pyrococcus woesei*  $\beta$ -半乳糖苷酶的反应条件<sup>[6]</sup>, 在温度为 85°C、pH 为 6.6 的反应体系中测定 PWTSA 水解 ONPG 的能力。研究发现 PWTSA 能够水解 ONPG 产生 o-硝基酚, 确证了重组蛋白 PWTSA 为  $\beta$ -半乳糖苷酶。在标准反应条件下, 酶活力为 13.6 U/mg。黑曲霉来源的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶对照品在上述反应条件下酶活力较低, 仅为 1 U/mg 左右, 当反应温度降到 60°C 时酶活力达到最大, 约 14 U/mg, 与重组蛋白 PWTSA 在 85°C 反应时活力相当。说明重组蛋白 PWTSA 为耐热的  $\beta$ -半乳糖苷酶, 与黑曲霉来源的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶相比, 具有更好的温度耐受性。

**2.4.2 酶反应的最适温度:** 在不同温度下测定 PWTSA 酶活力, 取黑曲霉来源的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶为对照, 结果如图 3, 重组蛋白 PWTSA 的最适反应温度在 85°C~95°C 之间。100°C 时酶活力稍有下降, 但仍维持在最高活力水平的 95% 左右。对照品的最适反应温度在 45°C~65°C 之间。

**2.4.3 酶反应的最适 pH 值:** 以黑曲霉来源的耐热

$\beta$ -半乳糖苷酶为对照, 在不同 pH 值下测定 PWTSA 酶活力, 结果如图 4。PWTSA 作用的 pH 值范围大, 在 pH 值为 5~8 时总体活性在 60% 以上, 最适 pH 值在 6.5 左右。黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶对照品的最适 pH 值为 4.5~5。

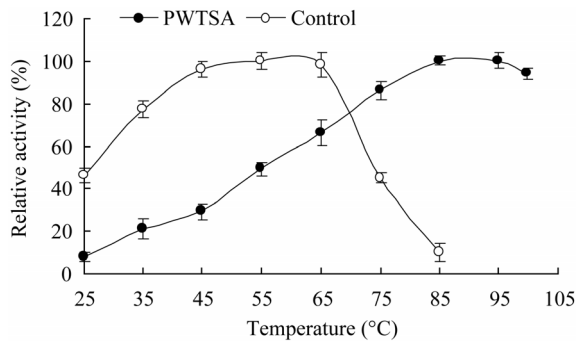


图 3 PWTSA 的最适温度

Fig. 3 The optimum temperature of  $\beta$ -Galactosidase encoding by *pwtSA*

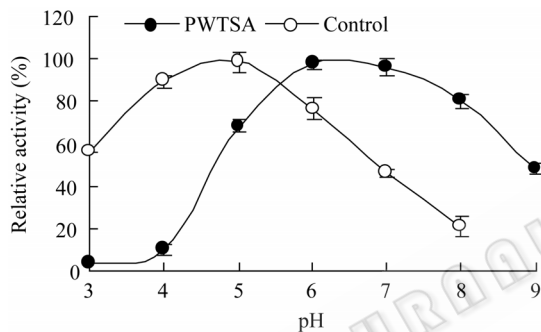


图 4 PWTSA 的最适 pH 值

Fig. 4 The optimum pH of  $\beta$ -Galactosidase encoding by *pwtSA*

**2.4.4 酶的热稳定性研究:** 将 PWTSA 与黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶对照品分别在 80°C、90°C、100°C 和 110°C 保温 1 h~4 h, 取不同温度和不同保温时间处理后的酶进行酶促反应。以不经过保温的酶活力为 100%, 结果如图 5。PWTSA 在 80°C 保温 4 h, 酶活力基本不变, 保持在 99% 以上; 在 90°C 保温 4 h, 仍保持了 90% 以上的活力; 在 100°C 保温 4 h, 活力下降 50% 以上; 在 110°C 保温 2 h 后酶活力基本完全丧失。黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶对照品在 90°C、100°C 和 110°C 保温 0.5 h 后检测不到酶活力, 在 80°C 保温 1 h 酶活力下降 70% 以上, 保温 2 h 后酶活力基本完全丧失。

**2.4.5 酶作用于 ONPG 的米氏常数及最大反应速度:** 测定  $K_m$  的方法是在一系列底物(ONPG)浓度下进行酶促反应, 以取得各相应的反应速度( $V$ ), 然后

根据这些数据用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法( $1/V$  对  $1/S$ )求  $K_m$ , 结果见图 6。PWTSA 作用于 ONPG 的米氏常数  $K_m$  为 0.83 mmol/L, 最大反应速度  $V_{max}$  为 100 U/mg; 黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶对照品作用于 ONPG 的米氏常数  $K_m$  为 2.18 mmol/L。

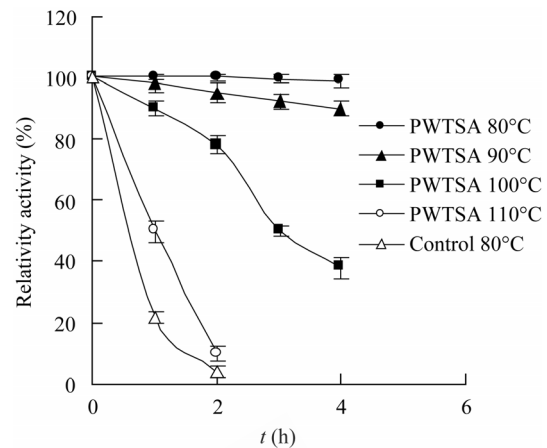


图 5 PWTSA 的热稳定性研究

Fig. 5 The thermostability of PWTSA

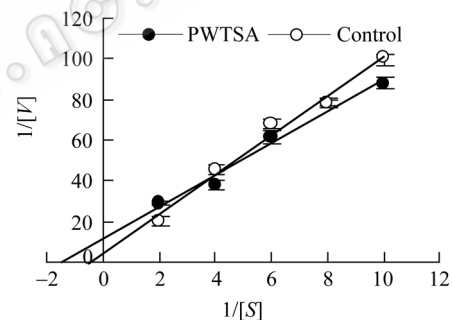


图 6 PWTSA 米氏常数的测定

Fig. 6  $K_m$  of  $\beta$ -Galactosidase encoding by *pwtSA*

**2.4.6 金属离子和巯基化合物对酶活力的影响:** 二价金属离子和巯基化合物的浓度分别为 1 mmol/L 和 10 mmol/L, 对 PWTSA 及黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶对照品酶活力的影响见表 1。Mg<sup>2+</sup>对酶活力有一定的促进作用; Cu<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>对酶活力有显著的抑制作用, Ni<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对酶活力基本无影响。巯基保护剂二硫苏糖醇和谷胱甘肽对酶活力有显著的促进作用,  $\beta$ -巯基乙醇对酶活力基本无影响。Cu<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>对 PWTSA 的抑制作用明显低于黑曲霉来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶对照品。

### 3 讨论

本研究在泰山土壤宏基因组研究中发现了新基因 *pwtSA*, 序列分析结果显示该基因编码的蛋白可

表 1 金属离子和巯基化合物对酶活力的影响  
Table 1 Influence of metal ions and thiol compounds on  $\beta$ -galactosidase activity

金属离子 Metal ion	PWTSA 酶活力 Activity of PWTSA (%)	黑曲霉来源的 $\beta$ - 半乳糖苷酶活力 Activity of $\beta$ -galactosidase from <i>Aspergillus niger</i> (%)	巯基化合物 Thiol compounds	PWTSA 酶活力 Activity of PWTSA (%)	黑曲霉来源的 $\beta$ - 半乳糖苷酶活力 Activity of $\beta$ -galactosidase from <i>Aspergillus niger</i> (%)
None	100	100	None	100	100
Ni <sup>2+</sup>	96	88	$\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -Mercaptoethanol)	106	100
Ca <sup>2+</sup>	98	99	二硫苏糖醇 (Dithiothreitol)	160	145
Mg <sup>2+</sup>	126	112	谷胱甘肽 (Glutathione)	132	122
Cu <sup>2+</sup>	62	46			
Co <sup>2+</sup>	86	96			
Zn <sup>2+</sup>	71	48			

能为 $\beta$ -半乳糖苷酶。通过对该基因的克隆及表达验证了其编码的产物为 $\beta$ -半乳糖苷酶, 研究显示C末端的组氨酸标签对酶活力基本无影响, 在标准反应条件下, 酶活力为 13.6 U/mg, 比Daabrowski S<sup>[6]</sup>和Wanarska M<sup>[9]</sup>等人在*Pyrococcus woesei*发现的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶高 1 倍以上。酶学性质研究结果证明 *pwtsA* 编码的 $\beta$ -半乳糖苷酶对高温有较大的耐受性, 90°C 保温 4 h 仍保持 90% 以上的活力; 在 pH 值为 5~8 时总体活性在 60% 以上; 对已报道<sup>[10]</sup>的显著抑制 $\beta$ -半乳糖苷酶活力 Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 有较好的耐受, 在这两种离子存在下, 仍保留 60% 以上活力。这些特性为该酶的进一步应用奠定了基础。

目前商业用酶一般源自酵母和霉菌, 但 $\beta$ -半乳糖苷酶在这些原始菌株中的分泌含量低, 采用简单的硫酸铵沉淀、离子交换层析及羟基磷灰石层析等难以提取到纯度较高的蛋白。细菌和古细菌来源的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶产量低, 且分离步骤繁琐<sup>[6]</sup>。本研究利用 PCR 技术克隆了土壤微生物来源的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因并在大肠杆菌中进行高效表达, 利用镍柱亲和层析一步纯化得到纯度较高的蛋白, 与前述纯化路线相比具有明显优势; 不足之处是分离纯化成本较高, 限制了它的产业化生产。

本研究利用宏基因组研究方法, 避开了传统的微生物纯培养, 直接从土壤样品混合微生物中提取基因组 DNA, 发现了 $\beta$ -半乳糖苷酶的功能基因 *pwtsA* 并对其蛋白功能进行了系统研究。目前正在对泰山土壤宏基因组文库进行功能筛选, 这些研究对探索泰山土壤中的微生物新资源必将起到积极的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Wanarska M, Kur J, Pladzyk R, *et al.* Thermostable *Pyrococcus woesei* beta-D-galactosidase--high level expression, purification and biochemical properties. *Acta Biochim Pol*, 2005, **52**: 781-787.
- [2] 汪 川, 张朝武, 刘衡川, 等. 两株保加利亚乳杆菌产 $\beta$ -半乳糖苷酶条件的优化及酶活力测定. *中国微生物学杂志*, 2006, **18**(3): 161-163.
- [3] 高秀容, 马 力, 叶 华, 等.  $\beta$ -半乳糖苷酶的研究进展. *生物技术通报*, 2005, **3**: 18-20.
- [4] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316-322.
- [5] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1): 265-275.
- [6] Daabrowski S, Sobiewska G, Maciuńska J, *et al.* Cloning, expression, and purification of the His(6)-tagged thermostable beta-galactosidase from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and some properties of the isolated enzyme. *Protein Expr Purif*, 2000 **19**(1): 107-112.
- [7] Cohen GN, Barbe V, Flament D, *et al.* An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol Microbiol*, 2003, **47**(6): 1495-1512.
- [8] Fukui T, Atomi H, Kanai T, *et al.* Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res*, 2005, **15**(3): 352-363.
- [9] Wanarska M, Kur J, Pladzyk R, *et al.* Thermostable *Pyrococcus woesei* beta-D-galactosidase--high level expression, purification and biochemical properties. *Acta Biochim Pol*, 2005, **52**(4): 781-787.
- [10] 魏东芝, 陈少欣, 王筱兰, 等. 嗜热脂肪芽孢杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶的性质. *微生物学通报*, 2001, **28**(1): 18-22.