

解肝磷脂土地杆菌(*Pedobacter heparinus*) 源唾液酸醛缩酶基因的 异源表达及其活性研究

郭娟,曹翠,李玉泉,刘丽*,Josef Voglmeir*

(南京农业大学食品科学技术学院,糖组学与糖生物工程实验室,江苏南京 210095)

摘要:为发掘新型唾液酸醛缩酶,使其在大肠杆菌中得到高效表达,本研究首次从菌株 *Pedobacter heparinus* 中克隆疑似编码唾液酸醛缩酶的 PhNeuLy3300 基因片段,并构建可自主表达异源蛋白的组成型表达载体 pRSF-EM5。在此基础上将克隆的目的基因分别导入该 pRSF-EM5 载体和常用的诱导型载体 pET-30a,构建重组质粒 pET30a-PhNeuLy3300 和 pRSF-EM5-PhNeuLy3300,经大肠杆菌表达系统异源表达目的蛋白,并进一步对两种重组蛋白酶进行电泳分析和活性研究。结果表明:编码唾液酸醛缩酶的基因片段全长为 945 bp,共编码 314 个氨基酸残基;聚丙烯酰胺凝胶电泳显示两种重组蛋白表观分子量约为 36.4 kDa,纯化后的 pET30a-PhNeuLy3300 重组蛋白浓度为 3.29 mg/mL,证明经异源表达获得了两种重组目的蛋白酶;活性研究显示两种重组唾液酸醛缩酶均能在 1 h 内催化 N-乙酰神经氨酸生成 N-乙酰甘露糖胺,证明两种重组蛋白酶均具有较高的活性。

关键词:唾液酸醛缩酶,诱导型启动子,组成型启动子,大肠杆菌表达,活性鉴定

Heterologous Expression and Activity Study of a Novel Sialic Acid Aldolase Gene Derived from *Pedobacter heparinus*

GUO Juan, CAO Cui, LI Yu-quan, LIU Li*, Josef Voglmeir*

(Glycomics and Glycan Bioengineering Laboratory in Jiangsu Province, College of
Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to develop a new type of sialic acid aldolase and express it effectively in *Escherichia coli*, the gene PhNeuLy3300 putatively encoding sialic acid aldolase from *Pedobacter heparinus* was cloned. A constitutive pRSF-EM5 vector containing self-initiating promoters was constructed. The cloned sialic acid aldolase gene was transferred into the constitutive vector pRSF-EM5 and another commonly used inducible vector pET-30a to construct the recombinant plasmids pRSF-EM5-PhNeuLy3300 and pET30a-PhNeuLy3300, respectively. The constructs were heterologously expressed in *E. coli*, further electrophoretic analysis and activity studies were performed on the two recombinant proteases. The results showed that the gene fragment encoding sialic acid aldolase was 945 bp and encodes a total of 314 amino acid residues. Polyacrylamide gel electrophoresis showed that the apparent molecular weight of the two recombinant proteins was about 36.4 kDa. Bradford method measured that the concentration of purified pET30a-PhNeuLy3300 recombinant protein was 3.29 mg/mL, which proved that two recombinant proteases were obtained by heterologous expression. The activity studies showed that both recombinant sialic acid aldolases can catalyze N-Acetylneuraminic acid to produce the N-Acetylmannosamine within 1 h, which means that both recombinant proteases have high activity.

Key words: sialic acid aldolase; inducible promoter; constitutive promoter; expression in *E. coli*; activity identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)05-0136-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.023

引文格式:郭娟,曹翠,李玉泉,等.解肝磷脂土地杆菌(*Pedobacter heparinus*)源唾液酸醛缩酶基因的异源表达及其活性研究[J].食品工业科技,2019,40(5):136-143.

收稿日期:2018-07-03

作者简介:郭娟(1993-),女,硕士研究生,研究方向:糖生物学,E-mail:2015108005@njau.edu.cn。

*通讯作者:刘丽(1972-),女,研究员,研究方向:食品营养糖组学、功能糖生物学,E-mail:lichen.liu@njau.edu.cn。

Josef Voglmeir(1979-),男,教授,研究方向:糖科学,E-mail:josef.voglmeir@njau.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金(31471703)。

唾液酸是一类含九个碳原子的羧基化单糖酰化衍生物的总称^[1],通常位于糖蛋白、神经节苷脂及多糖胺等寡糖链末端,其主要形式包括游离的唾液酸、唾液酸衍生物及聚唾液酸^[2]。唾液酸作为重要的生物信息传递分子在生物体内有着十分重要的生物学功能^[3]。

唾液酸醛缩酶又称 N-乙酰神经氨酸裂合酶^[4],是唾液酸及其类似物代谢途径中的关键酶,能催化 N-乙酰甘露糖胺(ManNAc)和丙酮酸生成 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)的可逆羟醛加成反应,调控唾液酸的合成^[5]。唾液酸醛缩酶多发现于微生物体内,例如大肠杆菌(*E.coli*)、产气荚膜梭菌(*C.perfringens*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、变形杆菌(*Proteus*)及微球菌(*Micrococcus*)等^[6]。目前已发掘了 *E.coli* 源及流感嗜血杆菌源唾液酸醛缩酶,但市面上可购买的唾液酸醛缩酶种类仍然有限,同时价格较高,因此有必要开发新的来源的唾液酸醛缩酶。解肝磷脂土地杆菌(*Pedobacter heparinus*)是一种从土壤中分离得到的革兰氏阴性好氧菌^[7],其全基因组信息已经公布,但关于 *Pedobacter heparinus* 源的唾液酸醛缩酶至今未见相关报道。由于唾液酸醛缩酶在该野生型菌株中为诱导酶,即通常生理状态下不进行表达或者酶量较低,只有以价格昂贵的唾液酸作为诱导剂时才能进行大量表达^[8],因此实现该酶的大量异源重组表达是大量获得该酶的必要途径。

目前应用最为广泛的蛋白酶异源表达系统为大肠杆菌表达系统^[9]。在该系统中,启动子是决定基因表达水平的关键因素之一,对目的基因的表达载体构建及表达调控等极为重要^[10]。启动子是一段能够识别 RNA 聚合酶的 DNA 序列,通过指导模板同全酶结合,来启动目的基因的转录^[11]。大肠杆菌表达系统中能发挥作用的启动子种类较多,根据其调控方式的不同可分为诱导型启动子和组成型启动子^[12]。其中,诱导型启动子需添加诱导剂才能够调控目的基因的表达,如 T7·lac 启动子需以乳糖类似物作为诱导剂,该类型启动子的优点是能够掌握酶的表达时间和水平^[13]。最近的研究报道中,已有不少学者选用组成型启动子来调控外源基因的表达,该类型的启动子能够在细胞开始生长时就自主表达异源蛋白酶,无需添加诱导剂,具有调控方式更为简便、操作成本低等优点^[14]。

针对大肠杆菌表达系统中两种启动子各有优势的特点,本研究先以大肠杆菌表达载体 pRSFDuet-1 为骨架,设计插入组成型启动子,合成组成型表达载体。再以细菌属 *Pedobacter heparinus* 作为目标菌株,将其拟编码唾液酸醛缩酶的基因 PhNeuLy3300 进行扩增,并构建至上述含组成型启动子的表达载体及含诱导型启动子的商业表达载体 pET-30a,分别以诱导型启动子和组成型启动子对 *Pedobacter heparinus* 源唾液酸醛缩酶进行体外异源表达,旨在以较为经济、简易的表达条件得到重组唾液酸醛缩酶。其中,将含诱导型启动子的 pET-30a 商业载体表达所得的唾液酸醛缩酶进一步纯化及活性测定,以期得到能运用于后续体外酶学特性研究的纯酶,通过对组成

型表达载体表达所得的粗酶进行酶活验证,为唾液酸醛缩酶在大肠杆菌体内合成唾液酸的应用奠定基础,同时也为重组蛋白的表达提供一种新型、高效、方便的表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 *Pedobacter heparinus* (DSM 2366) 德国 (DSMZ) 微生物与细胞保藏中心;基因克隆菌株 Top10(经抗噬菌体改后造命名为 BMMach1 T1)和大肠杆菌表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 北京天根生化科技有限公司;pGH-T 克隆载体 上海捷瑞公司;pET-30a 和 pRSFDuet-1 表达载体 Novagen 公司;组成型调控基因序列 EM5 和 PCR 扩增引物 由本实验室设计后交南京金斯瑞 (genescrypt) 公司合成;rTaq DNA 聚合酶 Takara 公司;T4 DNA 连接酶、去磷酸化酶 FastAP 以及限制性核酸内切酶 Nde I、Xho I Thermo Scientific 公司;异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 北京索莱宝科技有限公司;卡那霉素 (50 μg/mL) 和氨苄青霉素 (100 μg/mL) 南京寿德生物科技有限公司;AxyPrep DNA 回收试剂盒和 AxyPrep 质粒提取试剂盒 Axygen 公司;基因测序 南京金斯瑞 (genescrypt) 公司。

Hema9600 基因扩增仪 珠海黑马医学仪器有限公司;501 蓝盾可见光凝胶透射仪 厦门致善生物科技股份有限公司;ZF-A 型紫外透射反射分析仪 上海骥辉科学分析仪器有限公司;TS-8S 脱色摇床 其林贝尔仪器制造有限公司;ZQZY-CT 振荡培养箱 上海知楚仪器有限公司;DYY-7C 型电泳仪 北京市六一仪器厂;数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;Multiskan FC 型酶标仪 Thermo Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原核表达载体 pRSF-EM5 的设计合成 首先利用 SnapGene 软件分析具有不同抗性基因标签的表达载体图谱,获取各类抗性基因(杀稻瘟菌素、氯霉素、链霉素、卡那霉素及潮霉素等)的调控序列,根据 Neutral network promoter prediction 及 Vector NTI (V10.0) 等软件工具的分析,认为可以其为组成型启动子设计组成型基因调控序列 (EM5) 模块。该模块由 5 组酶切位点 (Nde I/Xho I、EcoR I/Pme I、Kpn I/Spe I、Sac I/Mfe I 及 Bgl II/Avr II) 与各启动子相互串联形成相对独立的表达盒,并在序列最前面引入 Nco I 酶切位点。设计的 EM5 序列交由南京金斯瑞公司合成,再经 Nco I、Avr II 双酶切后,连接至商业载体 pRSFDuet-1,即定向改造得到新的组成型原核表达载体 pRSF-EM5。

1.2.2 绿色荧光蛋白在 pRSF-EM5 载体中的表达 为检测改造后的载体 pRSF-EM5 能否由组成型启动子启动并完成异源蛋白的自主表达,将编码绿色荧光蛋白的基因 (GFP) 两端分别添加限制性内切酶位点 Nde I/Xho I、EcoR I/Pme I、Kpn I/Spe I、Sac I/Mfe I、Bgl II/Avr II,经聚合酶链式反应 (PCR) 扩增后,分别连接至 pRSF-EM5 载体,再将连接产物

表2 绿色荧光蛋白基因 PCR 引物序列
Table 2 Primers for PCR amplification of GFP genes

酶切位点	引物名称	引物序列
Nde I/Xho I	GFP 基因前引物	CATATGGTGAGCAAGGGCGAGG
	GFP 基因后引物	CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
EcoR I/Pme I	GFP 基因前引物	GAATTCATGCTGAGCAAGGGCGAGG
	GFP 基因后引物	GTTTAAACTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Kpn I/Spe I	GFP 基因前引物	GGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
	GFP 基因后引物	ACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Sac I/Mfe I	GFP 基因前引物	GAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
	GFP 基因后引物	CAATTGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Bgl II/Avr II	GFP 基因前引物	AGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGG
	GFP 基因后引物	CCTAGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG

热激转化至大肠杆菌感受态细胞 (BMMach1 T1 细胞) 中, 利用 PCR 法筛选重组转化子, 最后利用 Axygen 质粒提取试剂盒提取阳性菌落质粒并导入 *E.coli* BL21 (DE3) 细胞。其中 PCR 反应体系如表 1 所示, PCR 各引物序列如表 2 所示, PCR 程序设置为: 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 循环 35 次, 72 ℃ 10 min。挑取适量含重组 GFP 基因的 *E.coli* BL21 (DE3) 菌株于 5 mL LB 培养基中, 30 ℃、200 r/min 培养表达 20 h。待表达完成后, 12000 r/min 离心收集菌体, 于蓝光板上观察菌体颜色。

表1 绿色荧光蛋白基因 PCR 反应体系
Table 1 PCR amplification reaction system of GFP genes

反应体系组分	体积(μL)
rTaq DNA 聚合酶	12.5
GFP 基因前引物(10 mmol/L)	0.5
GFP 基因后引物(10 mmol/L)	0.5
GFP DNA 模板(100 ng/μL)	1
吐温 20	0.5
去离子水	10

1.2.3 *Pedobacter heparinus* 唾液酸醛缩酶基因扩增 通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库比对, 从 *Pedobacter heparinus* 基因组中筛选到疑似编码唾液酸醛缩酶的基因序列, 命名为 PhNeuLy3300。利用软件 Primer Premier5 设计其 PCR 扩增引物, 并在引物的 5' 端分别引入 Nde I、Xho I 限制性内切酶位点。前引物 F: 5'-CATATGATGACGATGCAAAAATT AGAA-3', 后引物 R: 5'-CTCGAGTTATTGTGAAGTG CTGACGC-3'。PCR 反应体系如表 3 所示, 其具体扩增程序为: 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 循环 35 次, 72 ℃ 10 min。*Pedobacter heparinus* 基因组 DNA 根据 Mahuku^[15] 等报道的方法进行提取。以基因组 DNA 为模板进行目的基因的 PCR 扩增, 扩增所得产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测分析, 并利用 Axygen DNA 回收试剂盒进行切胶回收。

1.2.4 重组表达载体的构建 回收的 DNA 片段经 T4 DNA 连接酶作用, 连接至 pGH-T 克隆载体上, 再将重组质粒转化至 BMMach1 T1 细胞中, 使用蓝白斑

表3 唾液酸醛缩酶基因 PCR 反应体系
Table 3 PCR amplification reaction system of PhNeuLy3300

反应体系组分	体积(μL)
rTaq DNA 聚合酶	12.5
PhNeuLy3300 前引物(10 mmol/L)	0.5
PhNeuLy3300 后引物(10 mmol/L)	0.5
PhNeuLy3300 DNA 模板(100 ng/μL)	1
吐温 20	0.5
去离子水	10

法筛选重组转化子^[16], 并挑取白色单菌落以 M13 通用引物进行 PCR 法鉴定。利用 Axygen 质粒提取试剂盒对阳性菌落进行质粒抽提, 得到的质粒经 Nde I、Xho I 限制性内切酶进行双酶切, 酶切后的 DNA 片段在 T4 DNA 连接酶的作用下, 分别连至经相同酶切处理的 pET-30a 和 pRSF-EM5 表达载体上。再将连接产物转化至 BMMach1 T1 细胞中, 并利用 PCR 法筛选重组转化子, 得到的阳性菌落分别送至公司进行测序, 得到构建成功的重组质粒 pET-30a-PhNeuLy3300 和 pRSF-EM5-PhNeuLy3300。

1.2.5 唾液酸醛缩酶的异源表达和纯化 提取重组质粒 pET-30a-PhNeuLy3300 和 pRSF-EM5-PhNeuLy3300, 转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 细胞内。分别挑取单菌落于 5 mL 含卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 培养基中过夜培养, 然后接种至 400 mL LB 培养基中进行扩大培养。其中含重组质粒 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 的菌液于 30 ℃、200 r/min 条件下培养表达 20 h, 含重组质粒 pET-30a-PhNeuLy3300 的菌液于 37 ℃、200 r/min 条件下培养直至菌液浓度达到 OD₆₀₀ 为 0.5~0.7, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 转 18 ℃ 继续诱导表达 20 h。

4 ℃、4000 r/min 离心收集菌体, 利用 10 mL 细胞裂解液 (100 mmol/L 氯化钠, 1% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100), 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF)) 将菌体沉淀重悬。将含重组质粒 pET-30a-PhNeuLy3300 的裂解液经超声进行细胞破碎, 4 ℃、12000 r/min 离心收集上清, 再利用镍亲和层析柱 (Ni-NTA) 进行纯化。纯化柱经 5 倍柱体积的平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L 氯化钠, pH8.0) 平衡后上样, 再由 10 倍柱

体积的结合缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L 氯化钠, pH8.0) 冲洗去除非特异性结合的蛋白, 最后用 10 mL 体积的洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L 氯化钠, 500 mmol/L 咪唑, pH8.0) 洗脱目标蛋白, 280 nm 波长检测洗脱液, 收集重组蛋白酶。

将重组蛋白 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 细胞裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 以不含目的重组质粒的 *E.coli* BL21 (DE3) 细胞裂解液为对照, 分析重组蛋白的表达水平。另取 pET-30a-PhNeuLy3300 诱导前后、上清和纯化后样品进行 SDS-PAGE, 以分析不同载体中重组酶的表达水平及纯化情况。其中, 分离胶电泳电压均为 100 V, 浓缩胶电泳电压均为 80 V。并使用 Bradford 法的蛋白定量试剂盒, 以牛血清蛋白(BSA) 绘制标准曲线, 测定纯化后的 pET-30a-PhNeuLy3300 重组蛋白酶浓度, 具体操作按说明书进行。

1.2.6 唾液酸醛缩酶的活性测定 重组唾液酸醛缩酶的活性通过酶标仪进行测定。以 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac, 400 μmol/L) 为底物, 与辅酶 I(NAD⁺, 2 mmol/L)、磷酸钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH6.5)、N-乙酰甘露糖胺脱氢酶(ManNAc Dehydrogenase, 10 mU) 混合后加入 384 孔酶标板, 最后分别加入纯化后的 pET-30a-PhNeuLy3300 重组蛋白酶(纯酶, 25 μL) 和 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 细胞裂解液(粗酶, 25 μL), 立即放入酶标仪内, 在 340 nm 波长处进行实时检测(每 20 s 读数 1 次(s), 共读数 700 次, 温度 37 ℃)。以不含 Neu5Ac 或不含目的重组蛋白酶的组分为阴性对照, 其中不含底物的体系以等体积去离子水替代 Neu5Ac, 其余组分均保持不变, 不含目的重组蛋白酶的体系以等体积大肠杆菌细胞裂解上清液(原菌株不含表达目的重组蛋白酶的质粒) 替代, 其余组分均保持不变。

1.3 数据处理

实验中蛋白酶浓度的测定及重组酶活测定每组重复三次, 采用 Microsoft Excel 2016 软件进行数据整理与曲线图的绘制, 应用 Adobe Illustrator CS5 软件辅助作图。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的改造

商业载体 pRSFDuet-1 为大肠杆菌蛋白双基因表达载体, 含两个多克隆位点, 即该载体由两个 T7·lac 启动子起始转录, 因此在大肠杆菌表达系统中需添加 IPTG 作为诱导剂才能表达异源目标蛋白^[17]。为使 pRSFDuet-1 载体免受诱导剂影响, 自主表达外源蛋白, 本实验设计了组成型调控序列 EM5 模块。如图 1 所示, 该模块由表达抗性基因杀稻瘟菌素、氯霉素、链霉素、卡那霉素及潮霉素的调控序列和 5 组克隆位点相互串联组成, 并于各组克隆位点前引入 ATG 碱基, 序列总长为 544 bp。其中抗性基因的调控序列能够作为组成型启动子自主启动插入的目的基因的表达, 5 组酶切位点 Nde I/Xho I、EcoR I/Pme I、Kpn I/Spe I、Sac I/Mfe I 及 Bgl II/Avr II 可作为多克隆位点同时插入 5 种目标蛋白基因, 为多基因共表达的实现提供基础。

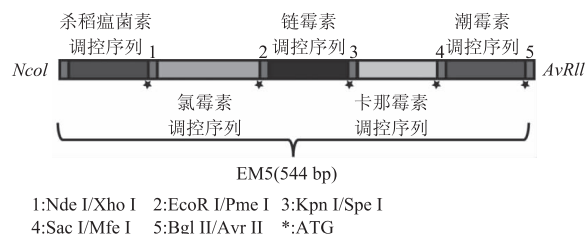


图 1 组成型调控序列 EM5 的设计

Fig.1 Design of constitutive regulatory gene sequence EM5

EM5 模块与 pRSFDuet-1 载体的整合位点如图 2 所示, 组成型调控序列(EM5, B) 替换了原载体上的多克隆位点序列(MCS1-MCS2, A), 并保留了原载体上第一个 T7·lac 启动子和核糖体结合位点(Ribosome Binding site, RBS)。根据设计, 改造后的 pRSF-EM5 载体理论上可在大肠杆菌表达系统中同时自主表达 5 种目的蛋白, 不需添加诱导剂。

2.2 绿色荧光蛋白的表达

鉴于编码绿色荧光蛋白基因序列较短, 构建载体方便^[18], 因此可将绿色荧光蛋白基因克隆至 pRSF-EM5 载体中, 检测改造后的组成型载体是否能够

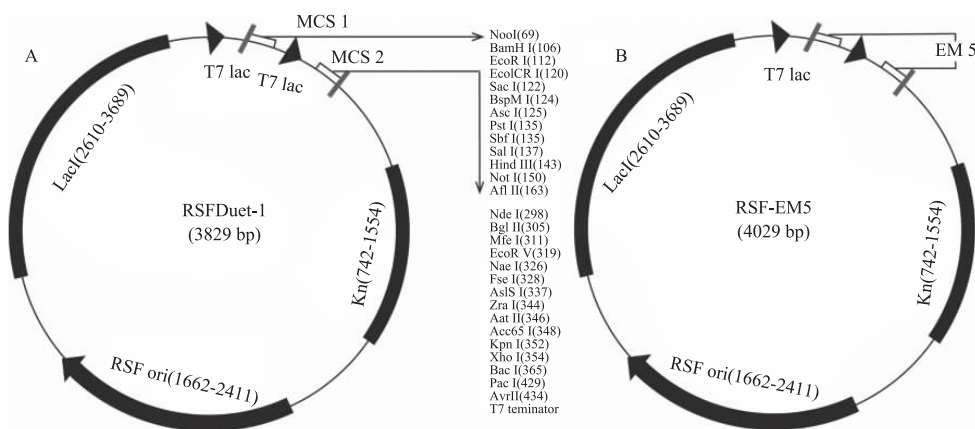


图 2 商业载体 pRSFDuet-1 与组成型调控序列的整合

Fig.2 Integration of pRSFDuet-1 vector and constitutive regulatory gene sequence

注: A: 商业载体 pRSF-Duet1 图谱; MCS: 多克隆位点; B: 组成型表达载体图谱。

自主表达绿色荧光蛋白,以验证改造后的新载体的功能。

由于 EM5 的序列设计有 5 组可用于插入目的基因,因此本研究将绿色荧光蛋白基因分别构建至 pRSF-EM5 载体上 Nde I/Xho I、EcoR I/Pme I、Kpn I/Spe I、Sac I/Mfe I、Bgl II/Avr II 等 5 个克隆位点进行重组表达。重组绿色荧光蛋白的表达结果如图 3 所示:5 组含重组绿色荧光蛋白质粒的菌体沉淀均能在蓝光下发出较强的绿色荧光,而不含该重组绿色荧光蛋白质粒的菌体则无明显可见光,证明设计合成的组成型启动子能被大肠杆菌宿主识别,改造后的载体 pRSF-EM5 能够在无诱导剂存在的条件下,自主表达插入的外源目的蛋白,从而证明组成型启动子的表达载体构建成功,且每一个克隆位点都具有正常功能,可以单独用于外源基因的插入和表达。除此以外,该载体可以同时承载多个能够自主启动表达的克隆位点,因此可用于进行多个基因共表达的尝试。

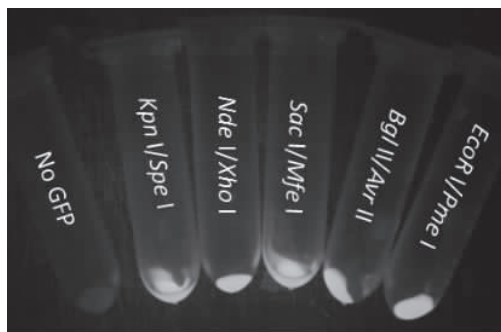


图3 重组载体上绿色荧光蛋白自主表达

Fig.3 Constitutive expression of GFP with constructed recombinant vector

2.3 目的基因克隆及序列比对

利用生物信息学同源比对的方法,从 *Pedobacter heparinus* (DSM2366) 基因组中找到疑似编码唾液酸缩酶的基因,并命名为 PhNeuLy3300,基因为全长 945 bp。通过 PCR 扩增获得了该完整基因,双酶切后分别与含诱导型启动子的 pET-30a 及含组成型启动子的 pRSF-EM5 表达载体连接构建建成重组质粒,对质粒进行目标基因序列的 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳验证了插入基因片段的大小,如图 4 所示, pET30a-PhNeuLy3300 及 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 的 DNA 片段均为单一条带且与预期的理论基因大小一致,证明插入片段正确。

测序结果表明克隆得到的重组 pET30a-PhNeuLy3300 基因及重组 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 基因均与 *Pedobacter heparinus* 基因序列匹配。如图 5、图 6 所示,完整开放阅读框全长 945 bp,共编码 314 个氨基酸残基,且 pET30a-PhNeuLy3300 带有 C-端组氨酸标签,而 pRSF-EM5 载体不带组氨酸标签,也即 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 无 C-端组氨酸标签。两组测定序列与 GeneBank 公布的相应序列同源性均为 100%,证明插入片段即为目的基因片段,重组质粒构建成功。

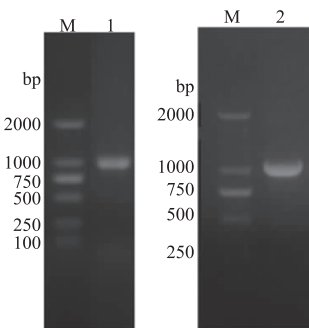


图4 PhNeuLy3300 基因 PCR 结果

Fig.4 PCR result of PhNeuLy3300 genes

注:M:DNA 分子质量标准(bp),1:pET30a-PhNeuLy3300 基因,2:pRSF-EM5-PhNeuLy3300 基因。

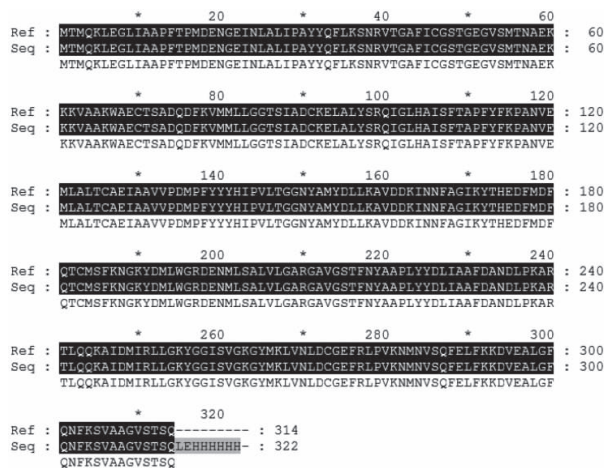


图5 pET30a-PhNeuLy3300 酶基因的测序比对结果

Fig.5 Comparison result of pET30a-PhNeuLy3300 genes

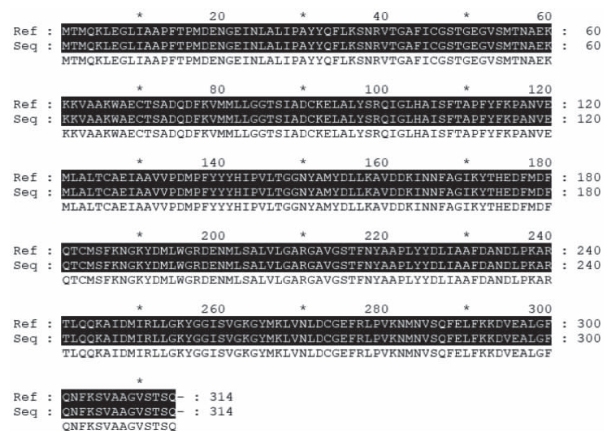


图6 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 酶基因的测序比对结果

Fig.6 Comparison result of pRSF-EM5-PhNeuLy3300 genes

2.4 重组蛋白的表达和纯化

含重组质粒 pET30a-PhNeuLy3300 的大肠杆菌经 IPTG 诱导前后菌体、裂解所得上清液和镍亲和层析柱纯化组分的 SDS-PAGE 分析结果如图 8(A) 所示。通过比较 IPTG 诱导前后菌体的蛋白样品,可见诱导后菌体在分子量 30~40 kDa 左右具有一明显增强条带,且裂解上清液和纯化后的样品在相同位置都具有信号,应为所表达重组蛋白 PhNeuLy3300,其表观分子量与理论分子量 36.4 kDa 相符合,表明重

组质粒 pET30a-PhNeuLy3300 可在大肠杆菌表达系统中经 IPTG 诱导进行表达,经镍柱纯化可得到纯度较高的重组蛋白。由改良型 Bradford 试剂盒测定,所得蛋白浓度-吸光度标准曲线如图 7 所示,根据相同条件下待测蛋白样品的吸光值以及样品稀释倍数,计算出 pET30a-PhNeuLy3300 重组蛋白浓度为 3.29 mg/mL。

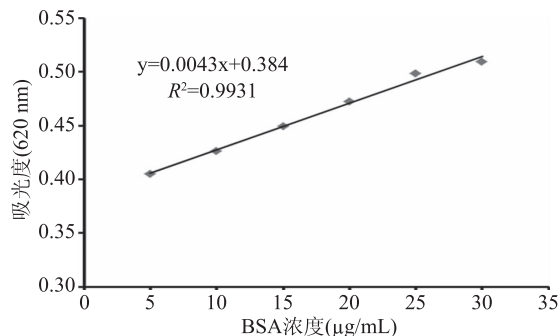


图 7 蛋白质浓度标准曲线

Fig.7 Standard curve of protein concentration

注:BSA:牛血清蛋白

含重组质粒 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 的大肠杆菌在无诱导剂添加的条件下进行培养,裂解菌体所得上清液的 SDS-PAGE 分析结果如图 8 (B) 所示。

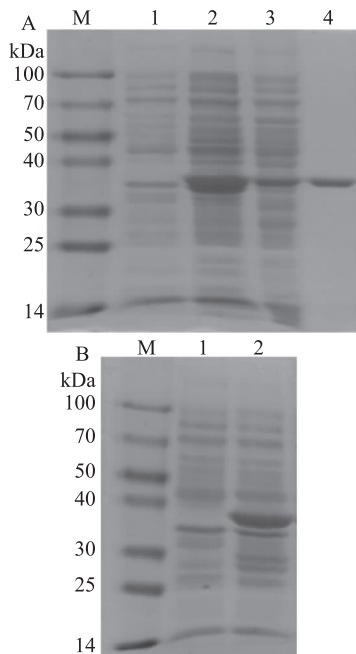


图 8 PhNeuLy3300 酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig.8 SDS-PAGE electrophoresis of recombined PhNeuLy3300

注:(A) pET30a-PhNeuLy3300 重组蛋白酶 SDS-PAGE 电泳图。M:蛋白分子量标准(kDa);1:IPTG 诱导前菌体;2:IPTG 诱导后菌体;3:细胞裂解液上清;4:镍亲和层析柱纯化后蛋白。(B) pRSF-EM5-PhNeuLy3300 重组蛋白酶 SDS-PAGE 电泳图。M:蛋白分子量标准(kDa);1:细胞裂解液上清(原菌株不含 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 质粒);2:细胞裂解液上清(原菌株含 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 质粒)。

通过与不含目的重组质粒的大肠杆菌上清液进行比较,可见含重组质粒 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 的菌体在分子量 30~40 kDa 左右具有一增加的蛋白条带,且表观分子量与目的蛋白理论分子量 36.4 kDa 相吻合,即为所表达的重组蛋白 PhNeuLy3300,表明重组质粒 pRSF-EM5-PhNeuLy3300 可在大肠杆菌表达系统中经组成型启动子作用进行自主表达。

2.5 重组唾液酸醛缩酶的活性研究

唾液酸醛缩酶可以催化可逆的唾液酸裂解生成 N-乙酰-甘露糖胺与丙酮酸的反应,故可利用从 Neu5Ac 转化为 N-乙酰-甘露糖胺的酶促反应检测 PhNeuLy3300 酶的活性。N-乙酰-甘露糖胺的检测则由 N-乙酰-甘露糖胺脱氢酶完成。N-乙酰-甘露糖胺脱氢酶能将 N-乙酰-甘露糖胺氧化,同时将 NAD^+ 还原成 NADH, NADH 在紫外 340 nm 下可检测吸光值。故可通过酶标仪验证是否有 NADH 生成从而间接检测重组 PhNeuLy3300 酶是否有活性。

活性检测结果如图 9 所示, pRSF-EM5-PhNeuLy3300 粗酶(细胞裂解液)催化底物 Neu5Ac 的反应(组 1), 1 h 内 340 nm 处吸光值快速增加且达到最大值;当 pET30a-PhNeuLy3300 纯酶与底物 Neu5Ac 同时存在时(组 2), 340 nm 处吸光值明显升高,但反应速率相对缓慢, 3 h 后 340 nm 处的吸光值达到最大;而反应中不含底物 NeuAc(组 3), 或不含重组 PhNeuLy3300 酶时(组 4), 340 nm 处吸光值没有增加;表明 N-乙酰-甘露糖胺脱氢酶不能以 Neu5Ac 为底物进行反应,可判断经诱导型和组成型启动子表达所得的唾液酸醛缩酶 PhNeuLy3300 均具有较好的活性。

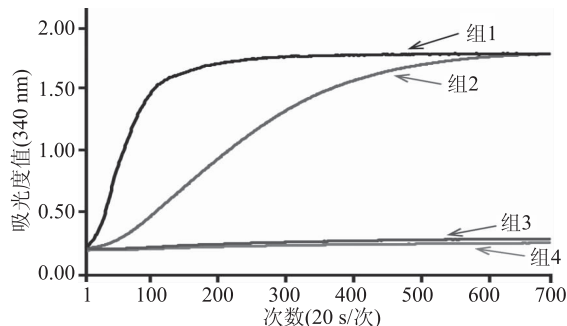


图 9 重组 PhNeuLy3300 酶活性检测图

Fig.9 Enzyme activity detection of PhNeuLy3300

注:组 1: pRSF-EM5-PhNeuLy3300 重组蛋白酶的活性检测;组 2: pET30a-PhNeuLy3300 重组蛋白酶的活性检测;组 3: 不含底物 Neu5Ac 的活性检测反应;组 4: 不含 PhNeuLy3300 目的重组酶的活性检测反应。

3 讨论

发掘新型唾液酸醛缩酶、构建其工程菌,可有效提高唾液酸醛缩酶的异源表达量,免去其在野生型菌株中表达所必需的诱导剂 N-乙酰神经氨酸,解决在应用研究中市售商品酶来源稀缺等问题。在过去的二十年里,成千上万的微生物基因组序列已被测出。对这些基因数据进行系统分析,利用基因工程技术克隆并构建重组蛋白酶表达体系,是得到新型

唾液酸醛缩酶最简单高效的途径^[19]。

本论文利用 NCBI 等相关网站和软件,对一些酶的基因数据进行分析,在基因序列比对的基础上,从来自土壤中的 *Pedobacter heparinus* 细菌中获得了唾液酸醛缩酶基因片段。据相关资料显示,*Pedobacter heparinus* 俗称肝素黄杆菌^[20],一般生长于土壤中,该菌种最适生长环境温度为 25~30℃^[21],其作为唾液酸醛缩酶基因的供体菌极易获得。此外,文献报道 Dietrich 及其同事曾从 *Pedobacter heparinus* 细菌中发现其他与糖代谢密切相关的酶,如软骨素酶、肝素合成酶、硫酸酯酶、硫代酰胺酶等^[22],且这些酶在实际的糖合成应用中都具有较高的价值,证实 *Pedobacter heparinus* 菌株可以作为研究糖代谢途径相关酶的重要基因库^[23]。本文是首次从 *Pedobacter heparinus* 基因组中克隆表达得到了一种新的具有较高活性的唾液酸醛缩酶,丰富了该酶的资源。后续将进一步开展对该酶的生物酶学特性以及实际应用效果的研究,为该酶的开发利用打下基础。

在构建重组蛋白酶的工程菌过程中,选择合适的表达载体作为骨架尤其关键。表达载体的核心则是启动子,其直接影响目的基因表达方式的经济性以及重组蛋白的表达水平。在大肠杆菌系统中,应用较多的是带有 lac/trc/tac 以及 T7 启动子的系列表达载体^[24],其中 pET 系列载体是该类载体的典型代表。本研究中也选择了以含有 T7·lac 启动子的 pET-30a 为载体,构建重组唾液酸醛缩酶表达体系,实验结果证明该重组体系仅需以廉价的 IPTG 为乳糖类似物诱导剂即可表达获得浓度较高的重组唾液酸醛缩酶,载体 C 端带有的组氨酸标签也解决了目前野生型菌株中低量唾液酸醛缩酶难以分离纯化等问题。但随着基因工程技术的发展,通常需要表达载体能够进一步满足更经济、更简便的调控方式的需要,因此组成型启动子的研究应用越来越广泛。国内杜丽琴等人曾报道过从宏基因文库中克隆出组成型启动子构建至 T-载体中^[25],成功利用构建的含组成型的启动子表达出了具有活性的淀粉酶,但其组成型启动子的筛选步骤繁琐,得到阳性克隆子的成功率低,且该改造后的载体只含有单个多克隆酶切位点。本研究则以启动抗性基因表达的调控序列为组成型启动子,对商业载体 pRSF-Duet1 进行改造,方法简易可行。构建的重组质粒 pRSF-EM7-PhNeuLy3300 在无任何诱导剂添加的情况下成功表达出了具有活性较强的唾液酸醛缩酶,大大降低了唾液酸醛缩酶的表达成本。

本文只利用该改造的 pRSF-EM5 载体进行了唾液酸醛缩酶的表达。实际上本研究改造后的载体理论上能同时独立自主表达 5 种蛋白酶,并在本实验室开展的大肠杆菌体内合成糖胺聚糖的研究中成功实践了两种基因的共表达。该研究将编码 UDP-葡萄糖异构酶及 β -1,4 半乳糖基转移酶的基因同时串接至 pRSF-EM5 载体上,使其在大肠杆菌表达系统中自主表达,并以大肠杆菌体内糖代谢中的 UDP-葡萄糖为底物,同时外源补给 pNP-木糖受体,在其共表达的两种重组酶作用下,于大肠杆菌体内检测到了

合成的 pNP-木糖-半乳糖,即 pRSF-EM5 载体可于同一宿主菌株中同时表达两种目的蛋白酶且兼具活性。总而言之,该组合型表达载体的成功构建进一步提供了组成型启动子在多基因共表达的实现过程中的可能性,为生物体内多酶法的合成途径奠定了基础。

4 结论

本文通过对商业载体 pRSF-Duet1 进行定向改造,合成了可自主表达多种外源蛋白的 RSF-EM5 载体,利用 PCR 法成功获得了 *Pedobacter heparinus* 菌株中参与合成唾液酸的唾液酸醛缩酶基因,该基因长度约为 945 bp。同时采用基因工程技术将该唾液酸醛缩酶基因分别连至大肠杆菌 pET 30a 载体及 RSF-EM5 载体,成功构建了两种重组唾液酸醛缩酶质粒。经大肠杆菌表达系统进行异源表达后,发现两种重组质粒均能有效表达目的蛋白酶,其分子量大小与预期相符,且具有较高的催化活性。目前课题组正在研究该酶的酶学特性及其在生物体内合成唾液酸的应用,以期进一步探索该酶的实用价值。

参考文献

- [1] Wasik B R, Barnard K N, Parrish C R. Effects of sialic acid modifications on virus binding and infection [J]. Trends in Microbiology, 2016, 24(12): 991-1001.
- [2] Lenman A, Liaci A M, Liu Y, et al. Polysialic acid is a cellular receptor for human adenovirus 52 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(18): E4264-E4273.
- [3] Hai W, Goda T, Takeuchi H, et al. Specific recognition of human influenza virus with PEDOT bearing sialic acid-terminated trisaccharides [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(16): 14162.
- [4] Chen Q, Lei H, Xi C, et al. A sialic acid aldolase from *Peptoclostridium difficile* NAP08 with 4-hydroxy-2-oxo-pentanoate aldolase activity [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2016, 92: 99-106.
- [5] Dean S M, Greenberg W A, Wong C H. Recent advances in aldolase-catalyzed asymmetric synthesis [J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2010, 349(8-9): 1308-1320.
- [6] 李春, 戚晓熙, 杨鹤, 等. N-乙酰神经氨酸醛缩酶基因在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 中国食品学报, 2015, 15(8): 71-77.
- [7] Huang J, Li J, Cao M, et al. *Cumulibacter manganitolans* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a manganese mine [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2017, 66(12): 2646-2652.
- [8] Brockamp H P, Kula M R. *Staphylococcus carnosus* aldolase as catalyst for enzymatic aldol reactions [J]. Tetrahedron Letters, 1990, 31(49): 7123-7126.
- [9] 苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16-23.
- [10] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102

(36):12678-12683.

[11] Lloret - Llinares M, Mapendano C K, Martlev L H, et al. Relationships between PROMPT and gene expression [J]. Rna Biology, 2016, 13(1): 6-14.

[12] Marshall L, Sagmeister P, Herwig C. Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: promoter systems and genetic constraints [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101(2): 501-512.

[13] Brautaset T, Lale R, Valla S. Positively regulated bacterial expression systems [J]. Microbial Biotechnology, 2010, 2(1): 15-30.

[14] Ruth C, Glieder A. Perspectives on synthetic promoters for biocatalysis and biotransformation [J]. Chembiochem, 2010, 11(6): 761-765.

[15] Mahuku G S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 22(1): 71-81.

[16] Picaud S, Olsson M E, Brodelius M, et al. Cloning, expression, purification and characterization of recombinant (+) -germacrene D synthase from *Zingiber officinale* [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2006, 452(1): 17-28.

[17] Kang H, Ye M B, Bahk Y Y. Expression and purification of human farnesoid X receptor - ligand binding domain as soluble form using a dual cistronic expression vector [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 23(3): 322-328.

[18] Kotay S, Chai W, Guilford W, et al. Spread from the sink to the patient: In situ study using green fluorescent protein (GFP) -

(上接第 135 页)

[11] 袁景环, 贡汉生, 孟祥晨. 苯乳酸的抗菌作用及其抗菌机理的初步研究 [J]. 食品工业, 2009(5): 14-17.

[12] 董世雷, 刘伟, 谢秀芝, 等. 抗菌肽及其应用前景概述 [J]. 浙江农业学报, 2011(6): 1274-1281.

[13] 孙涛, 周可鹏, 谢晶, 等. 黄原胶寡糖对野油菜黄单胞菌抑菌性能的研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 91-94.

[14] Munoz G I, Thurnheer T, Bartolome B, et al. Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(20): 4731-4737.

[15] Xing K, Chen X G, Kong M, et al. Effect of oleoyl - chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(1): 17-22.

[16] Hong J, Guan W T, Jin G, et al. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry [J]. Microbiological Research, 2015, 170: 69-77.

[17] Li L R, Shi Y H, Su G, et al. Selectivity for and destruction of *Salmonella typhimurium* via a membrane damage mechanism of a cell - penetrating peptide ppTG20 analogue [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012, 40(4): 33-343.

[18] 周伟. 植物乳杆菌素的纯化及其对单核细胞增生李斯特

expressing *Escherichia coli* to model bacterial dispersion from hand - washing sink - trap reservoirs [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83: 03327-03316.

[19] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. Postepy Biochem, 2006, 52(4): 448-456.

[20] 马小来, 姚君斐, 袁勤生. 肝素黄杆菌菌种保存方法的研究 [J]. 食品与药品, 2006, 8(4): 39-42.

[21] Payza A N, Korn E D. Bacterial degradation of heparin [J]. Nature, 1956, 177(4498): 88-89.

[22] Dietrich C P, Silva M E, Michelacci Y M. Sequential degradation of heparin in *Flavobacterium heparinum*. Purification and properties of five enzymes involved in heparin degradation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1973, 248(18): 6408-6415.

[23] Zhou Z, Jiang F, Wang S, et al. *Pedobacter arcticus* sp. nov., a facultative psychrophile isolated from Arctic soil, and emended descriptions of the genus *Pedobacter*, *Pedobacter heparinus*, *Pedobacter daechungensis*, *Pedobacter terricola*, *Pedobacter glucosidilyticus* and *Pedobacter lentus* [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2012, 62(8): 1963-1969.

[24] 任增亮, 堵国成, 陈坚, 等. 大肠杆菌高效表达重组蛋白策略 [J]. 中国生物工程, 2007, 27(9): 103-109.

[25] 杜丽琴, 陆坚, 谭慧敏, 等. 宏基因组文库中的组成型启动子在大肠杆菌中的克隆 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(6): 1013-1018.

氏菌作用机理 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.

[19] Hong J, Guan W, Jin G, et al. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry. [J]. Microbiological Research, 2015, 170: 69-77.

[20] 刘佳欣, 文震, 涂志红, 等. 三维荧光光谱法测定红酒中白藜芦醇的含量 [J]. 食品工业科技, 2013(2): 72-74.

[21] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法主编. 生物化学(上册) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 513-522.

[22] 刘雪, 王静楠, 陈文学, 等. 柠檬烯对铜绿假单胞菌的抑菌活性及其机理 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 1-5.

[23] Wang C J, Chang T, Yang H, et al. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2015, 47: 231-236.

[24] Garcia G L, Geeraerd A H, Mast J, et al. Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment [J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 541-549

[25] Weeks M E, Nebeson C G, James D C, et al. Monitoring changes in nisin susceptibility of *Listeria monocytogenes* Scott a as an indicator of growth phase using FACS [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(1): 43-55.