

嗜酸热硫化叶菌麦芽寡糖基海藻糖合酶基因的克隆和表达

王 辉¹ 陈 炜¹ 吴 襟^{1*} 金 城²

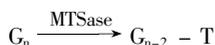
¹(中国科学院微生物研究所 酶学研究室 北京 100080)

²(中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

关键词 麦芽寡糖基海藻糖合酶,嗜酸热硫化叶菌,基因的克隆和表达,大肠杆菌

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0339-03

麦芽寡糖基海藻糖合酶(Maltodigosyltrehalose synthase; MTSase)是近年来在一些微生物中发现的新型分子内糖苷转移酶,能将淀粉或淀粉部分水解物(大于3个葡糖基)的糖链还原末端的 α -1,4糖苷键转化为 α -1,1糖苷键,生成具海藻糖末端结构的产物^[1],如下所示:



G_n 为聚合度 n ($n > 3$)的麦芽寡糖, $G_{n-2} - T$ 为麦芽寡糖基海藻糖, $-T$ 为海藻糖基。

MTSase和麦芽寡糖基海藻糖海藻糖基水解酶(Maltooligosyl trehalosetrehalohydrolase, MTHase)联合作用于麦芽寡糖,可以得到海藻糖(Trehalose)和比初始糖链少2个葡糖基的麦芽寡糖,这是酶法合成海藻糖的新途径^[1]。海藻糖是由2个葡萄糖残基经 α -1,1糖苷键缩合而成的非还原二糖,广泛存在于微生物、植物和昆虫中,对各种生物大分子和生物膜具有非特异性保护作用,与生物的抗旱、抗逆及隐生现象密切相关。海藻糖可用作微生物冷干制品、疫苗、多种药品、化妆品及食品的稳定剂和保护剂^[2],其潜在用途十分广泛。

我们已经克隆和表达了芝田硫化叶菌(*Sulfolobus shibatae*)的MTSase基因^[3],但其酶活力不高,所以我们换用了嗜酸热硫化叶菌 ATCC49426 作为目的基因供体。本文报道该菌的 MTSase 基因(简称为 GT)在大肠杆菌中的克隆和表达。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pBV220 为张智清等人构建^[4]。辅助质粒 pUBS520^[5]为德国 Mattes R 教授惠赠。受体菌大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。限制酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶等工具酶及核酸和蛋白质分子量标准等分别购自华美公司、上海生工公司等。

1.2 方法

细菌培养用的 LB 培养基配制方法及分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析,参照文献^[6]进行。培养基中的氨

苄青霉素和卡那霉素的浓度都为 100 μ g/mL。重组菌株的培养温度为 30 $^{\circ}$ C,培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时左右调节温度为 42 $^{\circ}$ C 开始诱导,诱导时间为 4h。摇床转速为 250r/min。酶活力测定方法,参照文献^[3]进行。

辅助质粒 pUBS520 转入受体菌方法:将重组菌株用文献^[6]的方法制成感受态细胞,转入 pUBS520 质粒,然后用氨苄青霉素和卡那霉素的双抗性培养基筛选出双抗性的重组菌株,再用酶切检测的方法鉴定。

2 实验结果

2.1 重组质粒 pBV220-GT 的构建

杂交实验表明,嗜酸热硫化叶菌 ATCC49426 的基因组同嗜酸热硫化叶菌 ATCC33909 的基因组有很高的序列同源性^[7],参照后者的 MTSase 基因序列,设计合成了如下引物:

上游 5'AGA GAATTC ATG ATA TCA GCA ACC TAC AG 3'

下游 5'TTA GTCGAC ATTA CAT TCT AAC TAG TAT CC 3'

上游引物含 EcoRI 位点,下游引物含 SalI 位点,终止密码子改为终止能力强的 TAAT。

以嗜酸热硫化叶菌 ATCC49426 的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1min,54 $^{\circ}$ C 退火 1min,71 $^{\circ}$ C 延伸 2min,30 个循环,71 $^{\circ}$ C 后保温 10min。电泳检测扩增产物约 2.2kb,与预期结果相符。将该片段纯化、酶切,与载体 pBV220 相连后,转入大肠杆菌 DH5 α ,用酶切检测的方法筛选出含重组质粒的菌株 DH5 α (pBV220-GT),如图 1。重组质粒的图谱见图 2。

2.2 优化了外源基因 5'和 3'端的重组质粒 pBV220-GT'的构建

2.2.1 引物的设计:由于 DH5 α (pBV220-GT)的表达水平不高,所以对目的基因的 5'和 3'端序列进行改造,用军事医学科学院的软件 GOLDKEY2.0 进行分析和辅助设计^[8]。设计引物时考虑到(1)密码子的偏好性,在不改变蛋白质一级结构的前提下,将该基因的 5'和 3'端的大肠杆菌使用频率极低的密码子改为使用频率高的密码子(2)mRNA 的二级结构,采用基于螺旋区随机堆积的 RNA 二级结构预测方法进行优

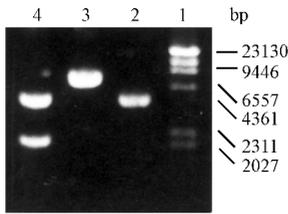


图1 重组质粒 pBV220-GT 的酶切鉴定

Fig.1 Restriction endonuclease characterization of recombinant plasmid pBV220-GT

1. λ DNA/*Hind*III marker 2. pBV220/*Eco*R I 3. pBV220-GT/*Eco*R I
4. pBV220-GT/*Eco*R I + *Sal* I

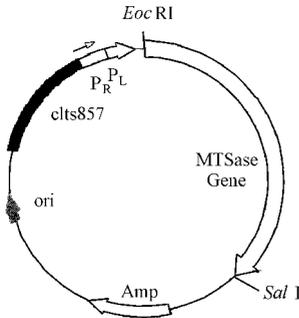


图2 重组质粒 pBV220GT 的图谱

Fig.2 Map of recombinant plasmid pBV220-GT

化。最终设计的引物如下：

上游 5'-AGA GAATTC ATG ATC TCT GCA ACC TAC CGT TTA CAG TTA AAT 3'

下游 5'-TTA GGATCC ATTA CAT GCG AAC CAG GAT GCG AGG TAG CTC ATT AAT 3'

上游引物含 *Eco*R I 位点,下游引物含 *Bam*H I 位点。加黑的碱基是被改变了的碱基。

2.2.2 目的基因的扩增:以嗜酸热硫化叶菌 ATCC49426 的基因组 DNA 为模板进行扩增,由于引物核苷酸改变较多,PCR 扩增出很多杂带,所以采用二步扩增法。首先,用上下游不改变的引物扩增出 2.2kb 的片段,纯化后以此为模板,用改造过的上下游引物进行 PCR 扩增,得到优化了 5'和 3'端的目的基因并测序。

2.2.3 优化了外源基因 5'和 3'端的重组质粒 pBV220-GT' 的构建将优化了 5'和 3'端的目的基因 *GT'* 酶切后,与载体 pBV220 相连,转入大肠杆菌 DH5 α ,用酶切检测的方法筛选出含重组质粒的菌株 DH5 α (pBV220-GT')如图 3。

2.3 辅助质粒 pUBS520 的引入

向重组菌株 DH5 α (pBV220-GT')中引入了 pUBS520,得到重组菌株 DH5 α (pBV220-GT'/pUBS520)。酶切鉴定如图 3 的 5 号样品:*Eco*R I + *Bam*H I 双酶切 pBV220-GT'/pUBS520 为 3 条带 2.2kb 3.6kb 5.4kb(pUBS520 上无 *Eco*R I 切点,5.4kb 即为该质粒的单酶切线性片段)。

2.4 酶活力的测定

培养诱导重组菌株 DH5 α (pBV220-GT') DH5 α (pBV220-GT') DH5 α (pBV220-GT'/pUBS520),测得酶活分别为 10u/g、19.8u/g 和 21.1u/g(wet cell),较原来芝田硫化叶菌表达的

MTSase 酶活水平 3.75u/g(wet cell)均有显著提高。

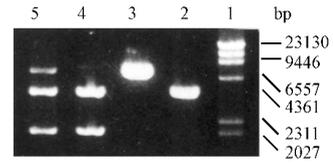


图3 重组质粒 pBV220-GT' 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction endonuclease characterization of recombinant plasmid pBV220-GT'

1. λ DNA/*Hind*III marker 2. pBV220/*Eco*R I ;
3. pBV220-GT'/*Eco*R I 4. pBV220-GT'/*Eco*R I + *Bam*H I ;
5. pBV220-GT' + pUBS520/*Eco*R I + *Bam*H I

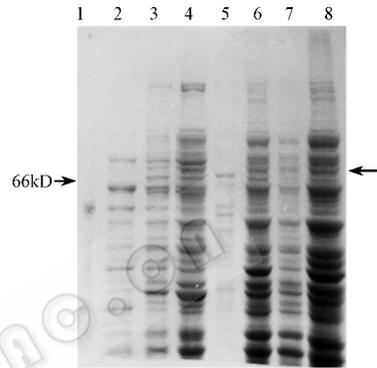


图4 重组菌株的 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE results of recombinant strains

1. 66kD molecular weight marker 2. Supernate of DH5 α (pBV220) after 70 $^{\circ}$ C disposal of 0.5h 3. Supernate of DH5 α (pBV220-GT') after 70 $^{\circ}$ C disposal of 0.5h 4. Supernate of DH5 α (pBV220-GT') after 70 $^{\circ}$ C disposal of 0.5h 5. Precipitation of DH5 α (pBV220-GT') 6. DH5 α (pBV220-GT') 7. DH5 α (pBV220-GT') 8. DH5 α (pBV220-GT'/pUBS520)

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将培养诱导的重组菌细胞经超声破碎并离心后的上清液和沉淀部分进行 SDS-PAGE 分析,分别为图 4 中的 2、3、4、5 号样品 6、7、8 号样品为全菌体蛋白。根据嗜酸热硫化叶菌 ATCC49426 的 MTSase 基因序列,推测其酶蛋白的分子量为 84.7kD,蛋白带的位置如箭头所示。与 2 号相比 3 号在该处有一明显蛋白带,根据分子量标准曲线推算与预期值一致,估计为表达的 MTSase。4 号和 5 号样品分别为 DH5 α (pBV220-GT')破菌离心后的上清与沉淀,两者比较可见表达的 MTSase 产物中含有一定量的不溶性包涵体。凝胶经紫外扫描计算后,可知重组菌株 DH5 α (pBV220-GT') DH5 α (pBV220-GT) DH5 α (pBV220-GT'/pUBS520)目的蛋白 MTSase 的表达量分别占全菌蛋白的 4.7%、1.9%、4.5%,这也说明了该基因的上下游改造提高了目的蛋白的表达,但辅助质粒的引入效果不明显。

3 讨论

嗜酸热硫化叶菌是嗜热嗜酸古细菌,最适生长温度 80 $^{\circ}$ C 左右,最适生长 pH 值 3.5,生长缓慢,难于培养,不适合工业生产。而构建一个合适的古菌外源表达系统,高效率地去表

要研究热点。但至目前,在几个常用的表达系统中,古菌基因的表达水平都难尽人意,这是因为古菌基因与其它原核及真核生物的基因有着显著差别,它常含有数量较大的稀有密码子。如 ATCC49426 的 MTSase 基因序列(已被测序,另文报道)有 2163 个碱基,编码 720 个氨基酸(G+C)含量为 31%。序列分析表明,该基因的密码子偏性与大肠杆菌基因的明显不同,其中 43.57% 的密码子在大肠杆菌中的使用频率在 5% 以下,特别是 TTA、ATA、AGA、GGA 这 4 个在大肠杆菌中偏性为 1% 或 0 的密码子,竟占了 MTSase 基因的 17.46%。而通过以上实验结果表明,改变 MTSase 5' 和 3' 端的稀有密码子为常用密码子,并优化这两端的 mRNA 二级结构,有助于提高该基因在大肠杆菌中的表达水平。

辅助质粒 pUBS520 含有 argU 基因,此基因的转录产物是对大肠杆菌稀有密码子 AGA 和 AGG 专一的 tRNA,华子春等^[10]曾用 pUBS520 有效提高了人粒细胞-巨嗜细胞集落刺激因子在大肠杆菌中的表达,并认为 argU 基因编码的 tRNA^{Arg} 既可能是翻译的限制因素之一,也可能在染色体和质粒复制过程中起作用。MTSase 基因含 AGA 和 AGG 分别为 3.05% 和 0.97%,所以向重组菌株中引入 pUBS520,希望能够进一步提高目的基因的表达量。但结果并不理想,这可能是由于该基因中还含有一些制约表达的关键稀有密码子并有待改造。此外,该 MTSase 基因在嗜酸热硫化叶菌的基因组中,与 MTHase 及一个脱支酶(Debranching enzyme)的基因位于同一个操纵子上,构成一个基因簇,按 MTHase、脱支酶、MTSase 的顺序排列。而该基因位于这个基因簇的末位,可能受硫化叶菌中某种特殊机制的调控才能高水平地表达^[11]。因此该基因的高表达还有待于今后进一步全面深入地研究。

致谢 本所黄力先生提供嗜酸热硫化叶菌 ATCC49426 的基因组 DNA,并对本工作给予多方面的支持。日本林原生物化学研究所 Kazuhiko Maruta 先生赠送麦芽五糖。德国 Institute für Industrielle Genetik 的 Mattes R 教授赠送 pUBS520 质粒。军

事医学科学院的李伍举、吴加金两位先生帮助设计了引物,在此一并感谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Masaru KATO, Yutaka MIURA, Masako KETTOKU *et al.* Reaction mechanism of a new glycosyltrehalose-producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KMI1. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(5): 921 ~ 924
- [2] Masaru KATO, Yutaka MIURA, Masako KETTOKU *et al.* Purification and characterization of new trehalose-producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KMI1. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(3): 546 ~ 550
- [3] CHEN W(陈炜), LIU I(刘莉), SUN P Y(孙培钰) *et al.* Cloning and expression of maltotriose trehalose synthase from *Sulfolobus shibatae* in *E. coli*. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), 2000, **40**(1): 57 ~ 61
- [4] ZHANG Z Q(张智清), YAO L H(姚立红), HOU Y D(侯云德). Construction and application of a high level expression vector containing P_RPL promoter. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 1990, **6**(2): 111 ~ 115
- [5] Ulrich Brinkmann, Ralf E Mattes, Peter Buckel. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene*, 1989, **85**: 109 ~ 114
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed, Beijing Science Press, 1993
- [7] Kazuo KOBAYASHI, Masaru KATO, Yutaka MIURA *et al.* Gene analysis of trehalose-producing enzymes from hyperthermophilic archaea in *Sulfolobales*. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(10): 1720 ~ 1723
- [8] LI W J(李伍举), WU J J(吴加金). Quantitative analysis on expression level of foreign gene in pBV220. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 1997, **13**(2): 126 ~ 132
- [9] LI W J(李伍举), WU J J(吴加金). Relationship between secondary structure of foreign genes carried by pBV220 vector and expression levels. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), 1996, **7**(4): 149 ~ 151
- [10] HUA Z Q(华子春), WANG H S(王惠生), DONG Q(董晨) *et al.* Study on enhancement of the expression level of hGM-SF in *E. coli* by argU gene. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 1995, **40**(2): 175 ~ 178
- [11] Kazuhiko Maruta, Hitoshi Mitsuzumi, Tetsuya Nakada, *et al.* Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, **1291**: 177 ~ 181

Cloning and Expression of Maltotriose-trehalose Synthase from *Sulfolobus acidocaldarius* in *Escherichia coli*

WANG Hui¹ CHEN Wei¹ WU Jin^{1*} JIN Cheng²

¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

²(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract The gene of MTSase (maltotriose-trehalose synthase) from *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC49426 was amplified by PCR. The primers were designed according to the published sequence of homologous gene from *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909. This gene was inserted into the plasmid pBV220 and the resultant recombinant plasmid pBV220-GT was transformed to *E. coli* DH5 α . The activity of recombinant enzyme was about 10u/g (wet cell). In order to improve the expression level of target protein, some nucleotides in the 3' and 5' of the gene were modified to optimize the second structure of mRNA by PCR amplification using the new primers devised according to the biosoftware GOLDKEY2.0. As a result, the activity of recombinant enzyme increase to 19.8u/g (wet cell). Then, the helping plasmid pUBS520 which carried the gene encoding the tRNA of rare codons AGG and AGA was transformed to the recombinant strain. But it took little effect.

Key words maltotriose-trehalose synthase (MTSase), *Sulfolobus acidocaldarius*, cloning and expression, *E. coli*

Received: November 15 2000

This work was supported by Grant from Natural Science Foundation of Beijing(5982010) and Foundation of State Key Laboratory of Microbial Resources(981024).

* Corresponding author. Tel 86-10-62587206; Fax 86-10-62560912; E-mail: wujin@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn