

α 1,6-葡聚糖酶基因的克隆及在毕赤酵母中的表达

钟丽娟, Bw egendaho Damien, 陈龙军, 凌雪萍, 何 宁, 卢英华*

(厦门大学化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 根据朱黄青霉(*Penicillium minioluteum* HF4) α 1,6-葡聚糖酶的基因序列, 人工合成 α 1,6-葡聚糖酶基因并将其插入毕赤酵母(*Pichia pastoris*) 表达载体 pPICZaA, PCR 和双酶切验证结果均表明成功构建了重组质粒 pPICZaA-Dex. 重组质粒经 *Sac*I 线性化后整合到毕赤酵母 X33 基因组中进行表达. 摇瓶发酵表明, 重组毕赤酵母经甲醇诱导 120 h 产酶活力达到最高值 29.2 U/mL, SDS-PAGE 结果显示在 67 ku 附近有明显的条带, 与 α 1,6-葡聚糖酶理论分子质量相符合.

关键词: α 1,6-葡聚糖酶; 朱黄青霉; 毕赤酵母

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)01-0093-04

葡聚糖(dextran)是D-吡喃葡萄糖的聚合物, 主要通过 α 1,6糖苷键, 以及少量的 α 1,2, α 1,3 和 α 1,4糖苷键连接. 葡聚糖由于其良好的生物相容性被广泛用于医疗领域, 如做成葡聚糖胶囊控制药物释放^[1], 特定分子质量的葡聚糖溶液还可用作代用血浆^[2]等. 但是葡聚糖也有很多副作用, 如: 在制糖工业中, 葡聚糖使糖汁粘度增高导致过滤困难, 蔗糖的结晶效率降低, 形成针状晶体, 降低离心分离过程中糖蜜的清除效率, 使糖的精炼质量下降; 葡聚糖还会使饮料产生絮状物, 使糖果变形, 精糖的葡聚糖含量指标规定不超过 20×10^{-6} ^[3,5]; 同时, 食物中的葡聚糖会与唾液中的糖蛋白形成牙菌斑, 进而导致龋齿^[6,7]. α 1,6-葡聚糖酶(α 1,6-dextranase, EC3.2.1.11) (67 ku) 通过水解葡聚糖中的 α 1,6糖苷键, 把葡聚糖分解成小分子的葡萄糖、低聚异麦芽糖、异麦芽糖, 从而降低糖液的粘度, 缩短煮沸和蒸发时间, 提高结晶效率和净化器的效率, 提高糖的质量^[3,5]; 通过 α 1,6-葡聚糖酶的水解作用控制葡聚糖的大小, 可以满足医疗领域对血浆的需求; 使用添加了 α 1,6-葡聚糖酶的牙膏, 可以预防龋齿和牙菌斑的形成^[8]. 因此, 近年来, α 1,6-葡聚糖酶受到了研究人员的重视. 然而, 由于其主要为真菌表达产物^[2], 天然菌株的产酶量满足不了实际应用的要求, 因此, 利用基因工程技术构建高效表达 α 1,6-葡聚糖酶的重组菌株, 对提高酶的产量具有重要意义.

朱黄青霉(*Penicillium minioluteum* HF4)是一种能够合成 α 1,6-葡聚糖酶的真菌, 然而其产酶量很低, 不适于直接用于工业生产. 毕赤酵母(*Pichia pastoris*) 不仅具有大肠杆菌繁殖快、易于培养、遗传操作简单和易于工业化生产等原核生物的特点, 还具有真核生物基因表达调控和蛋白修饰功能, 如糖基化、蛋白磷酸化等, 避免了产物形成包涵体, 活性降低等问题; 再者, 毕赤酵母还具有醇氧化酶基因 AOX1 启动子, 可以严格控制外源基因的表达; 此外, 毕赤酵母自我分泌的蛋白极少, 同时其表达质粒 pPICZaA 具有编码 α 信号肽、6 $\times$ his 标记的基因以及 Zeocin 抗性基因, 不仅可以高效分泌表达外源蛋白, 而且有利于目的蛋白的纯化^[9]. 因此, 将朱黄青霉 α 1,6-葡聚糖酶基因(Dex) 导入毕赤酵母高效表达体系, 有望获得具有大规模工业生产价值的重组菌株. 本研究以朱黄青霉为出发菌, 以 pPICZaA 为表达载体, 通过基因克隆技术, 在毕赤酵母中成功表达 α 1,6-葡聚糖酶基因.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 本实验室保存; 毕赤酵母 X33, 本实验室保存; 质粒 pPICZaA, 购于 Invitrogen 公司.

1.1.2 工具酶和试剂盒

*Eco*RI, *Not*I, *Sac*I, *Taq* 酶, T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa(大连)有限公司.

收稿日期: 2010-05-19

基金项目: 科技部科研院所技术开发研究专项资金(NCSTE-2007-JKEG-023)

* 通信作者: ylu@xmu.edu.cn

质粒小量提取试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒均购自广州东盛生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

质粒 DNA 的提取参考广州东盛生物科技有限公司质粒小量提取试剂盒说明书。

1.2.2 朱黄青霉 *Dex* 基因的获得

根据美国专利数据库(专利号: 5637491)中所报道朱黄青霉 HF4 的 *Dex* 基因序列^[10], 人工合成 *Dex* 基因的合成委托上海英骏生物技术有限公司。

1.2.3 *Dex* 基因的扩增

根据 *Dex* 的基因序列设计下列引物: 上游引物(P1): 5'-TCGCGAATTCATGGGCACTACGAATA-ATACCCA-3', 下游引物(P2): 5'-ATCTGCGGCCGCGGAAACCTGGAAATGTCCTTATT-3'。下划线处为引入的限制性酶切位点, P1 带 *EcoRI* 酶切位点, P2 带 *NotI* 酶切位点。引物委托上海英骏生物技术有限公司合成。以人工合成的 *Dex* 基因为模板 PCR 扩增 *Dex* 基因, 预期目的片段大小约为 2 000 bp。PCR 反应条件为: 95 °C, 4 min; 94 °C, 1 min; 56 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 循环 30 次; 72 °C, 10 min。

1.2.4 pPICZαA-*Dex* 载体的构建

PCR 扩增产物及载体 pPICZαA 用 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切, 在质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳分别回收相应的条带, 用 T4 连接酶 16 °C 过夜连接, 反应体系为 1 μL 10× T4 连接酶缓冲液, 1 μL T4 DNA 连接酶, 4 μL *Dex* 基因, 1 μL pPICZαA, 3 μL 蒸馏水。CaCl₂ 法转化大肠杆菌 DH5α, 涂布于含有 Zeocin(25 μg/mL) 的 LB 平板上, 37 °C 培养 16 h, 筛选阳性克隆。CaCl₂ 转化方法参考文献[11]。

1.2.5 毕赤酵母分泌表达系统的构建

选取正确重组子, 提取其质粒 DNA 经 *SacI* 酶切后线性化, 用电转化法转入毕赤酵母 X33 感受态细胞, 用含 Zeocin(100 μg/mL) 的 YPD(yeast extract peptone dextrose medium) 平板筛选, 获取外源 *Dex* 基因成功整合插入毕赤酵母 X33 染色体的重组菌株。电转化方法参考文献[11]。

1.2.6 重组酵母的培养

将重组酵母接种于 25 mL BMGY 培养基(10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 13.4 g/L YNB, 0.4 mg/L 生物素, 体积分数为 1% 的甘油)中, 28 °C, 200 r/min 培养 24 h。

1.2.7 重组酵母的诱导表达

培养液于 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 把菌体加入到 50 mL 诱导培养基 BM MY(10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 13.4 g/L YNB, 0.4 mg/L 生物素, 体积分数为 0.5% 的甲醇, pH 6.0) 中, 28 °C, 200 r/min 诱导培养 144 h。每隔 24 h 取样 500 μL, 并补加体积分数为 5% 的甲醇 500 μL, 使总体积保持不变。

1.2.8 *Dex* 酶活性测量方法

利用 DNS 法^[12]测定还原糖的含量来计算 α-1, 6 葡聚糖酶的活性, 酶活力单位(U)定义为在 40 °C、pH 5.5 条件下, 每分钟催化底物葡聚糖 T 2000 水解产生 1 μmol 还原糖所需的酶量。

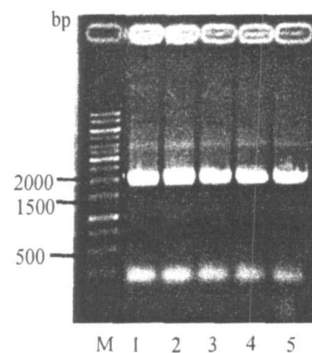
1.2.9 *Dex* 的 SDS-PAGE 分析

将重组毕赤酵母诱导培养于 50 mL BM MY 培养基中, 培养 120 h, 取培养液于 4 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清 90 μL 于 10 μL 10× 上样缓冲液混合均匀, 沸水中煮 5 min, 取 10 μL 进行 SDS-PAGE。分离胶浓度 12% (质量分数), 浓缩胶浓度 5% (质量分数), Bio-Rad 电泳仪电泳, 电压 120 V, 电泳 90 min。银染观察。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增 *Dex* 基因

以人工合成的 *Dex* 基因为模板, 利用引物 P1、P2 进行扩增 *Dex* 基因。扩增产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示在 2 000 bp 左右出现特异性条带(图 1), 与预期目的片段大小一致。



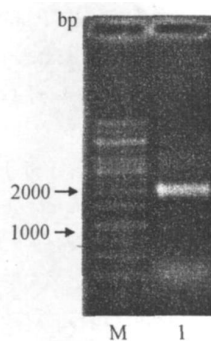
Lane M. DNA Marker; Lane 1~ 5. Product of PCR.

图 1 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

2.2 pPICZαA-*Dex* 分泌表达载体的构建

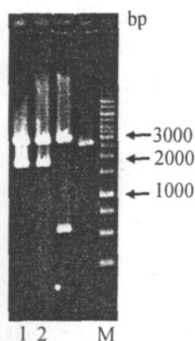
PCR 扩增获得的 *Dex* 基因及 pPICZαA 载体用



Lane M, 1 kb Marker; Lane 1, PCR product of pPICZ α A-Dex.

图2 pPICZ α A-Dex PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of pPICZ α A-Dex



Lane M, 1 kb Marker; Lane 1~2, pPICZ α A-Dex digested by *EcoRI* 和 *NotI*.

图3 pPICZ α A-Dex 双酶切鉴定

Fig. 3 Restriction identification of pPICZ α A-Dex

EcoRI 和 *NotI* 双酶切回收后连接, 转入大肠杆菌 DH5 α , 利用含有 Zeocin (25 μ g/L) 的 LB 平板上筛选出阳性克隆. 提取质粒通过 PCR 验证和 *EcoRI*、*NotI* 双酶切验证, 均得到了约 2000 bp 的条带(图2, 3), 证明 *Dex* 基因已经成功连接到 pPICZ α A 载体上, 将所得到的重组质粒命名为 pPICZ α A-Dex.

2.3 重组毕赤酵母产酶诱导表达

提取质粒 pPICZ α A-Dex 经 *SacI* 酶切线性化后, 电转化转入毕赤酵母 X33 感受态细胞, 利用含 Zeocin (100 μ g/mL) 的 YPD 平板筛选出重组毕赤酵母. 对电转化筛选出的 7 株重组毕赤酵母进行诱导表达, 筛选出来一株产酶活力最高的重组酵母菌, 其产酶曲线如图4所示. 从图4可知, 在摇瓶发酵中, 经甲醇诱导 120 h 时酶活力达到最大值 29.2 U/mL.

2.4 SDS-PAGE 分析

2.3 中摇瓶发酵的样品, 离心取上清进行 SDS-PAGE, 由图5可知, 在约 66.2 ku 附近有明显的条带, 与预期 α 1,6-葡聚糖酶大小一致, 表明朱黄青霉

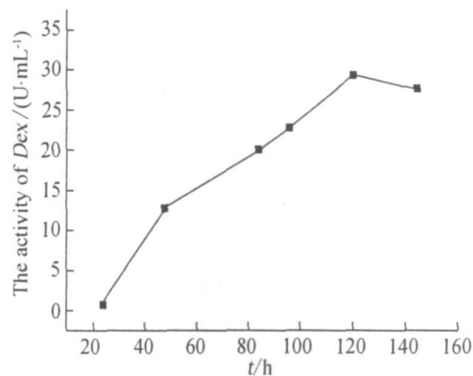
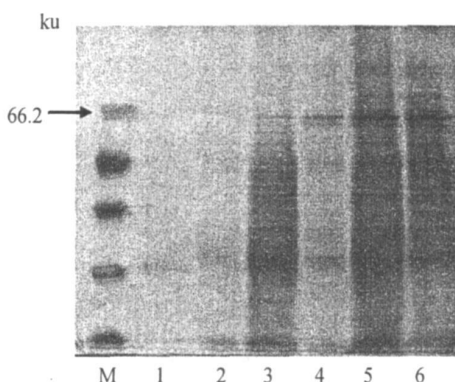


图4 重组毕赤酵母产酶曲线

Fig. 4 The curve of enzyme activity of reconstructed *Pichia pastoris*



Lane M, Marker; Lane 1. 24 h; Lane 2. 48 h; Lane 3. 84 h; Lane 4. 96 h; Lane 5. 120 h; Lane 6. 144 h.

图5 重组毕赤酵母表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE result of the product of reconstructed *Pichia pastoris*

Dex 基因在毕赤酵母 X33 中得到表达, 并且随着发酵时间的延长, 产酶量增加, 与产酶曲线变化一致.

3 结 论

随着人们对糖类物质质量和数量要求的提高, 以及医疗领域对代用血浆需求的增大, α 1,6-葡聚糖酶日益受到人们的重视, 提高 α 1,6-葡聚糖酶的产量和质量也成为国内外研究的热点. α 1,6-葡聚糖酶主要为真菌的胞内产物, 产量低而且不容易分离纯化. 本文成功构建了 pPICZ α A-Dex 分泌表达载体, 并以毕赤酵母 X33 为宿主表达了 α 1,6-葡聚糖酶. 筛选得到的重组菌株在摇瓶中发酵, 随着发酵时间的延长, 产酶量增加, 经甲醇诱导 120 h 时酶活力达到最大值 29.2 U/mL. 另外, 对重组菌培养基优化以及对 α 1,6-葡聚糖酶学性质的研究工作正在进行中, 有望提高 α 1,6-葡聚糖酶的质量和产量, 以满足工业化的要求.

参考文献:

- [1] Mehvar Reza. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents [J]. Journal of Controlled Release, 2000, 69(1): 1-25.
- [2] Lee J M, Fox P F. Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1985, 7(11): 573-577.
- [3] Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1881-1894.
- [4] Ramon L Sidebotham. Dextran [J]. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 1974, 30: 371-444.
- [5] Chen Lin, Zhou Xiangshan, Fan Weimin, et al. Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkey* dextranase in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 58: 87-93.
- [6] Pleszczynska M, Szczodrak J, Rogalski J, et al. Hydrolysis of dextran by *Penicillium notatum* dextranase and identification of final digestion products [J]. Mycological Research, 1997, 101(1): 69-72.
- [7] Roca H, Garcia B, Rodriguez E, et al. Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1996, 12: 1187-1200.
- [8] Marotta M, Martino A, De Rosa A, et al. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes [J]. Process Biochemistry, 2002, 38(1): 101-108.
- [9] 罗竞红, 游自立. 巴斯德毕赤酵母表达系统在外源基因表达中的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2007, 3: 75-79.
- [10] Campana H R, Garcia Garcia B M, Delgado Boada J M, et al. Dextranase enzyme, method for its production and DNA encoding the enzyme: United States, 5637491 [P]. 1997 06 10.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Lorenz Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.

Cloning of a Recombinant Dextranase and Its Expression in *Pichia pastoris*

ZHONG Lirjuan, Bwegendaho Damien, CHEN Longjun, LING Xueping,
HE Ning, LU Yinghua*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The α 1,6 dextranase gene was amplified from a synthetic α 1,6 dextranase gene derived from *Penicillium minioluteum* HF4 and was inserted into plasmid pPICZ α A. The recombinant plasmid named pPICZ α A-Dex was identified by PCR and enzyme digestion, and was then electroporated into *Pichia pastoris* X33. The recombinant *Pichia pastoris* X33 was induced to express the dextranase using methanol. The enzyme activity reached 29.2 U/mL after 120 h of induction. The size of the recombinant α 1,6 dextranase is approximately 67 ku analyzed by SDS-PAGE, which is consistent with the theoretical molecular weight.

Key words: α 1,6 dextranase; *Penicillium minioluteum*; *Pichia pastoris*