

重组褐藻胶裂解酶表达体系的构建及诱导条件优化

郝瑶¹, 李恒^{1*}, 龚劲松¹, 蒋敏¹, 许正宏^{2,3}, 史劲松^{1*}

(1. 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:目的 对褐藻胶裂解酶基因 *aly-cob* 进行外源表达, 并优化诱导条件以实现褐藻胶裂解酶的高效表达。方法 以产褐藻胶裂解酶菌株 *Cobetia* sp. WG-007 为出发菌株, 对克隆得到的褐藻胶裂解酶基因进行稀有密码子改造, 构建重组质粒 pET-28a(+)-*aly-cob*, 在宿主 *Escherichia coli* BL21 pLysS 中进行诱导表达, 对发酵培养基、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、诱导温度、诱导时机、诱导浓度及诱导时间进行系统优化以提高酶活。结果 构建了重组菌 *E. coli* BL21 pLysS/pET-28a(+)-*aly-cob*, 最适培养基为 SB 培养基, 最佳诱导条件为 OD₆₀₀ 为 1.0 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 在 22 °C 下诱导 24 h 后酶活可达 2 403.93 U/mL。结论 成功对优化后的褐藻胶裂解酶基因 *aly-cob* 进行外源表达, 经诱导表达条件优化后酶活为野生菌酶活的 15 倍, 更具有工业化应用的潜力。

关键词:褐藻胶裂解酶; 外源表达; 诱导条件优化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2018)03-0227-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2018.0227

Expression System Construction of Recombinant Alginate Lyase and Optimization of Induction Conditions

HAO Yao¹, LI Heng^{1*}, GONG Jin-song¹, JIANG Min¹, XU Zheng-hong^{2,3}, SHI Jin-song^{1*}

(1. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 3. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Wuxi, 214122, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To express the optimized alginate lyase gene *aly-cob* exogenously and optimize the expression conditions to achieve the high expression of alginate lyase. **METHODS** The alginate lyase gene from *Cobetia* sp. WG-007 was used to carry out rare codon modification, the recombinant plasmid pET-28a(+)-*aly-cob* was constructed and induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) in *Escherichia coli* BL21 pLysS. Then medium components and the induction temperature, induction time, final concentration and adding time of IPTG was optimized to improve enzyme activity. **RESULTS** The recombinant *E. coli* BL21 pLysS/pET-28a(+)-*aly-cob* was constructed, the alginate lyase was induced by IPTG, and the optimum induction conditions were determined as follows: SB medium was the optimum medium, when the OD₆₀₀ value of bacterial reached 1.0, IPTG was added with its final concentration was 0.1 mmol/L, and after inducing for 24 h at 22 °C, the enzyme activity reached to 2 403.93 U/mL. **CONCLUSION** The optimized alginate lyase gene *aly-cob* is successfully expressed in *E. coli* BL21 pLysS and the expression conditions are optimized. The optimized enzyme activity is 15 times of wild-type enzyme activity, which is more favorable for industrial application.

KEY WORDS: alginate lyase; exogenous expression; induction condition optimization

我国是世界上利用海藻最早且最为广泛的国家之一,早在 2 000 多年前,海藻的药用价值就已在《神农本草经》等古籍中记载。随着社会的发展,海藻加工及其高值化利用成为我国海洋资源综合利用的重要领域。褐藻胶是褐藻中的重要成分,其酶解产物褐藻寡糖具有抗肿瘤、抗凝血、增强免疫力、保

护神经、促进生长等多种生理活性,在现代健康制品中的作用日益显著^[1-2]。褐藻胶裂解酶是制备褐藻寡糖的有力工具,因其独特的生物学功能已逐渐发展成为一种重要的新型海洋生物酶,并将广泛应用于医学、食品及一些生产领域的研究。

褐藻胶裂解酶通过 β 消去反应将大分子褐藻胶

收稿日期: 2018-03-05

基金项目: 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2016022-19); 江苏省重大科技成果转化项目(BA2015006); 四川省重点研发计划项目(2017JZ0043); 国家海洋公益性行业科研专项经费项目(201305007)

作者简介: 郝瑶(1992-),女,硕士研究生。*通信作者: 李恒,女,副教授,主要从事生物制药研究, E-mail: liheng@jiangnan.edu.cn; 史劲松,男,教授,主要从事生物制药研究, E-mail: shijs@163.com

降解为低分子褐藻寡糖或单糖,但其深入的降解机制研究不多^[3]。目前已有超过 50 种褐藻胶裂解酶被发现,主要来源于细菌,其中只有较少的褐藻胶裂解酶基因被克隆和表达,且表达水平普遍较低^[4]。近年来,国内对褐藻胶裂解酶的研究大都集中于对产褐藻胶裂解酶菌株的筛选上,但野生菌株对生长条件的要求较高,普遍存在产酶量低、酶活不高等问题,限制了应用研究的深入^[5]。随着现代生物技术的发展,获取褐藻胶裂解酶的基因并在合适的宿主体系中大量表达,成为推动褐藻寡糖高值化应用及海藻资源利用的有效途径。

Cobetia sp.产褐藻胶裂解酶的报道较少且普遍酶活较低,其中仅一种来源于 *Cobetia* sp.的褐藻胶裂解酶基因被成功表达,酶活仅 30 U/mL。本实验室前期筛得一株产褐藻胶裂解酶菌株 *Cobetia* sp. WG-007,对其进行发酵条件优化后酶活可达 160.7 U/mL^[6],该酶是一种嗜盐性双功能裂解酶^[7]。本研究对来源 *Cobetia* sp. WG-007 的褐藻胶裂解酶基因进行克隆表达,构建基因工程菌,进而优化诱导条件提高产酶,以期提升其工业化应用的潜力。

1 材料

1.1 试剂

pET-28a(+)表达质粒、菌株 *E.coli* JM109 和 *E.coli* BL21 pLysS 均由作者实验室保存。

酵母提取物、蛋白胨购自 OXOID 公司;海藻酸钠、DNS、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)等试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Premix TaqTM DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、QuickCut *Bam* H I、QuickCut *Hind* III 限制性内切酶等试剂均购自大连宝生物有限公司。

1.2 仪器

PCR 仪 C1000TM Thermal Cycler(BIO-RAD 公司);高速冷冻离心机 Himac CR22GII(日本日立公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);紫外可见分光光度计 UV-1800(上海美谱达公司);Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Labsystems 公司)。

2 方法

2.1 重组褐藻胶裂解酶工程菌的构建

2.1.1 褐藻胶裂解酶基因的扩增 上游引物:5'-CGGGATCCATGCGTAACACCCGTGTGC-3'(斜体部分为 *Bam* H I 酶切位点);下游引物:5'-CCCAAGCTTTTATTATTGAATTTTGCCGCTC

-3'(斜体部分为 *Hind* III 酶切位点),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,以 *Cobetia* sp. WG-007 基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s;58 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 1 min;共 30 个循环,最后 72 °C 终延伸 10 min。将扩增出的目的片段连接到克隆载体 pMD19-T,转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中,挑单菌进行 PCR 验证,阳性克隆送至上海睿迪生物科技有限公司进行测序。根据大肠杆菌表达体系的密码子使用频率分析所得基因序列,对位点 62V,80S,97S,221K,222R,245I,300A,321N 进行稀有密码子改造,得到褐藻胶裂解酶基因 *aly-cob*。

2.1.2 重组菌的构建 用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* III 分别酶切目的基因序列 *aly-cob* 和质粒 pET-28a(+),用 T4 连接酶连接后转化至 *E. coli* BL21 pLysS 中。挑取单菌落进行液体培养后抽提重组质粒,对其进行 PCR 验证,并使用 *Bam* H I 和 *Hind* III 进行双酶切验证。

2.2 重组酶的表达及酶活测定

2.2.1 重组菌的诱导表达 将构建好的重组菌按 1%的接种量接入液体 LB(含卡那霉素和氯霉素)中,37 °C 培养至 OD₆₀₀ 达 0.8 左右,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导后,将发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清。菌体用 PBS 洗去残留发酵液,重悬后进行超声破碎,然后离心取上清。利用 DNS 法测定发酵上清和破碎上清中的褐藻胶裂解酶活性。

2.2.2 褐藻胶裂解酶的酶活测定 在改良 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法^[8]上稍作调整:反应体系为 0.1 mL 酶液加入 0.9 mL 1%海藻酸钠溶液,45 °C 酶解 20 min,其他条件一致。1 个酶活力单位(U)定义为:1 mL 酶液在上述条件下反应,每 1 min 产生 1 μg 还原糖所需的酶量。

2.3 重组菌诱导条件优化

2.3.1 培养基对产酶的影响 分别选择 LB、SB、2×YT、SOB 以及 SOC 培养基,在相同条件下进行诱导产酶,诱导 24 h 后测定酶活及 OD₆₀₀,以确定适合于重组菌产酶的培养基。各种培养基配方如下:

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 10;pH=7.0;SB 培养基(g/L):蛋白胨 32,酵母粉 20,NaCl 5;pH=7.0;2×YT 培养基(g/L):蛋白胨 16,酵母粉 10,NaCl 5,pH=7.0;SOB 培养基:蛋白胨 20 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 0.5 g/L,KCl 2.5

mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L; pH = 7.0; SOC 培养基: 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 2.5 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, 葡萄糖 20 mmol/L; pH = 7.0。

2.3.2 诱导温度对产酶的影响 其他发酵诱导条件一致, 将重组菌分别置于 22、25、28、31、34、37 °C 下诱导 24 h 后测定酶活及 OD₆₀₀。对发酵液上清、破碎上清及破碎沉淀处理后进行 SDS-PAGE, 分析在不同诱导温度下蛋白表达情况。

2.3.3 诱导时机对产酶的影响 将重组菌分别培养至 OD₆₀₀ 为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 时添加 IPTG 进行诱导, 其他发酵诱导条件一致, 诱导 24 h 后测定酶活及 OD₆₀₀ 以确定最适诱导时机。

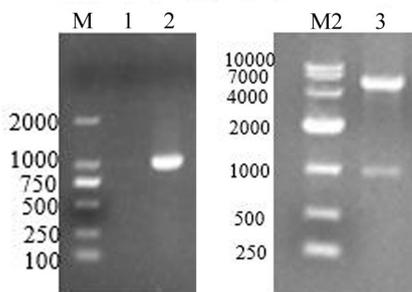
2.3.4 IPTG 浓度对产酶的影响 其他发酵诱导条件一致, 向培养基中分别加入终浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导产酶, 诱导 24 h 后测定酶活及 OD₆₀₀ 以确定诱导时最适的 IPTG 浓度。

2.3.5 诱导时间对产酶的影响 其他发酵诱导条件一致, 将重组菌分别诱导 6、12、18、24、30、36 h 后测定酶活及 OD₆₀₀ 以确定最适诱导时间。

3 结果

3.1 重组褐藻胶裂解酶工程菌的构建

将目的基因连接到质粒 pET-28a(+), 对重组质粒依次进行 PCR 和双酶切验证。如图 1 所示, PCR 验证时在 1 000 bp 处扩增出明显条带, 且双酶切得到长度分别为 5.3 kb 和 1 kb 左右的 2 个片段, 证明重组质粒及重组菌构建成功。将此重组质粒命名为 pET-28a(+)-*aly-cob*, 重组菌命名为 *E. coli* BL21 pLysS/pET-28a(+)-*aly-cob*。



注: M. DL2000 DNA marker; 1. 阴性对照 (PCR 反应未加模板);
2. *aly-cob* 的 PCR 产物; M2. DL10000 DNA marker;
3. BamH I 和 Hind III 双酶切 pET-28a(+)-*aly-cob*

图 1 重组质粒 PCR 及双酶切验证

3.2 重组酶的表达及酶活测定

发酵 24 h 后测定酶活, 阴性对照 (空载重组菌)

未检测到酶活, 重组菌胞外酶活为 209.15 U/mL, 胞内酶活为 809.63 U/mL。由此可见, 在 LB 培养基中重组酶主要分泌在胞内。

3.3 重组菌诱导条件优化

3.3.1 培养基对产酶的影响 首先对重组菌 *E. coli* BL21 pLysS/pET-28a(+)-*aly-cob* 的培养基进行优化, 结果如图 2 所示, 重组菌在 LB、2×YT、SOB 以及 SOC 培养基中主要以胞内酶的形式存在, 且酶活相对较低; 而在 SB 培养基中主要以胞外酶的形式存在, 且胞外酶活可达 1 539.74 U/mL。所以最终选择 SB 培养基作为重组菌诱导产酶的最适培养基。

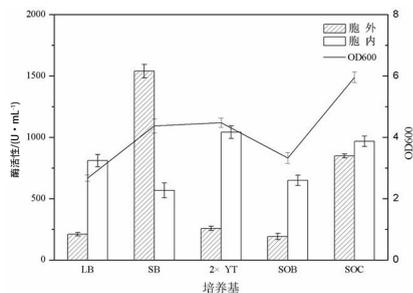


图 2 培养基对菌体生长及产酶的影响

3.3.2 诱导温度对产酶的影响 由图 3 可知, 重组菌最适诱导温度为 22 °C, 此时胞外酶活最高, 为 1 562.28 U/mL。进一步采用 SDS-PAGE 分析重组酶的表达情况, 如图 4 所示, 22 °C 诱导条件下, 发酵液上清中可见清晰的蛋白条带, 蛋白表达量较高; 随着诱导温度的上升, 发酵液上清中的蛋白条带逐渐淡化, 而细胞破碎沉淀中的蛋白条带则逐渐加深。这可能是因为过高的诱导温度影响了重组酶的正确折叠, 导致了大量包涵体的形成。由此可见, 诱导温度过高会抑制蛋白的可溶性表达。

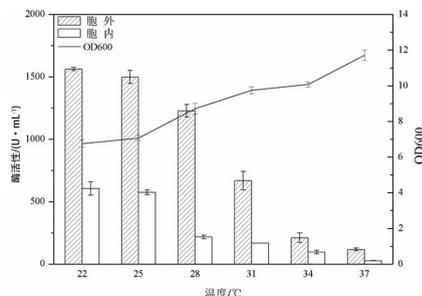
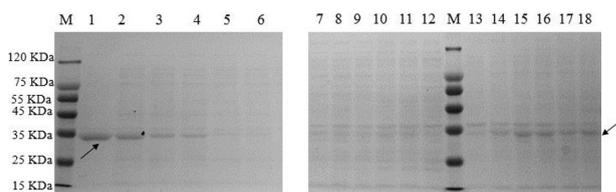


图 3 诱导温度对菌体生长及产酶的影响

3.3.3 IPTG 浓度对产酶的影响 由图 5 可以看出, 在不添加 IPTG 时, 重组菌基本不产酶, 由此推测重组菌为严格诱导型菌株; 当 IPTG 添加浓度为 0.1 mmol/L 时, 重组菌诱导产酶最高, 胞外酶活可

达 2 360.79 U/mL; 过高的 IPTG 浓度则会抑制菌体生长从而降低酶活性。



注: M. 低分子量蛋白质 Marker; 泳道 1~6 分别为 22、25、28、31、34、37 °C 下诱导发酵上清; 泳道 7~12 分别为 22、25、28、31、34、37 °C 下诱导细胞破碎上清; 泳道 13~18 分别为 22、25、28、31、34、37 °C 下诱导细胞破碎沉淀; 箭头所示为重组酶。

图 4 诱导温度对重组蛋白表达的影响

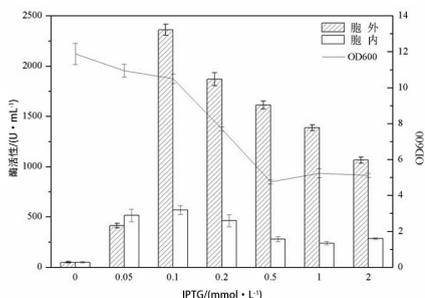


图 5 IPTG 浓度对菌体生长及产酶的影响

3.3.4 诱导时机对产酶的影响 由图 6 可以看出, 在重组菌发酵液的 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.4 时, 诱导时机的选择对酶活无显著影响。其中, 在 OD₆₀₀ 为 1.0 时开始诱导的胞外酶活最高, 为 2 386.93 U/mL, 所以选择 OD₆₀₀ 在 0.6~1.0 的代谢相对旺盛的对数生长期菌体进行重组蛋白的诱导表达。此时的菌体生长迅速, 代谢旺盛, 有利于重组蛋白的表达。

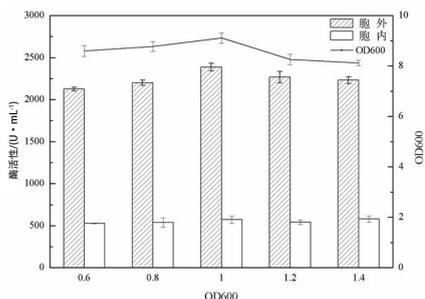


图 6 诱导时机对菌体生长及产酶的影响

3.3.5 诱导时间对产酶的影响 由图 7 可以看出, 重组菌在 22 °C 诱导时菌体生物量持续增加; 产酶量在诱导初期随诱导时间的延长而不断升高, 在 24 h 后上升趋势逐渐趋于平缓。综合考虑发酵周期及成本等因素, 最终选择 24 h 作为最佳诱导时间, 此时胞外酶活可达 2 403.93 U/mL。

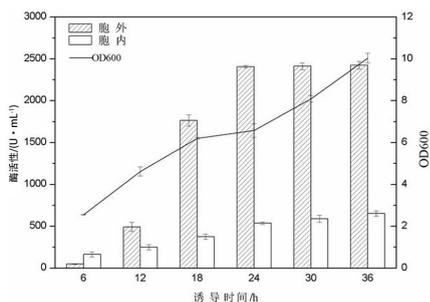


图 7 诱导时间对菌体生长及产酶的影响

4 讨论

伴随海洋资源的利用以及健康产业的发展, 褐藻胶裂解酶的开发应用日益受到关注。其中 *Cobetia* sp. 所产褐藻胶裂解酶大多具有嗜盐的特征, 除本实验室筛选得到的 *Cobetia* sp. WG-007^[6] 外, 还有 *Cobetia amphilecti*^[9] 和 *Cobetia* sp. NAP1^[10] 等菌株陆续得到报道, 但产酶量均偏低。*Cobetia* sp. NAP1 的褐藻胶裂解酶基因 *algC-pl7* 已在 *E. coli* BL21(DE3) 中得到表达, 但重组酶为胞内酶且表达量较低, 酶活仅 30 U/mL, 推测其原因, 可能是来源于海洋细菌的褐藻胶裂解酶基因 *algC-pl7* 与表达体系 *E. coli* BL21(DE3) 适配性较差, 影响了蛋白的表达; 或是培养基的成分和比例不利于菌体生长和产酶。

本研究以进一步提高褐藻胶裂解酶的活力与应用性能为出发点, 采用基因工程手段, 对克隆得到的 *Cobetia* sp. WG-007 褐藻胶裂解酶基因进行稀有密码子改造以提升基因表达的适配性, 得到优化的产酶基因 *aly-cob*, 进而构建了重组菌 *E. coli* BL21 pLysS/pET-28a(+)-*aly-cob*, 并对重组菌的诱导条件进行了优化。分析重组酶酶活的影响因素可以发现, 培养基与诱导温度对重组酶的表达具有显著影响, 主要影响了重组酶的表达行为以及酶的活性。

IPTG 作为一种强诱导剂不能被菌体代谢, 可持续发挥诱导作用, 所以少量 IPTG 就可以起到很好的诱导效果。诱导时间影响重组菌的产酶水平, 时间过短则不能诱导彻底, 而时间过长又会提高发酵成本, 甚至造成菌体自溶及蛋白降解而导致酶活降低等现象。优化后的诱导产酶条件为, 选取 SB 培养基, 在诱导温度 22 °C、菌液 OD₆₀₀ 1.0 时, 添加 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 24 h, 重组褐藻胶裂解酶胞外酶活最高可达 2 403.93 U/mL, 是野生菌酶活^[7] 的 15 倍, 得到了大幅提升。(下转 324 页)