

豆豉纤溶酶基因的克隆及其在枯草杆菌中的表达

齐海萍, 江洁, 胡文忠, 姜爱丽, 田密霞

(大连民族学院 生命科学学院, 生物技术与资源利用国家民委—教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600)

摘要:以实验室筛选的 UD8 豆豉芽孢杆菌的总 DNA 为模板, 应用 PCR 技术根据豆豉纤溶酶基因 DNA 序列 (GeneBank AY720895.2) 设计并合成 1 对引物, 扩增出了豆豉纤溶酶基因, 将该基因克隆到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 EC-BS8 上, 构建成表达质粒 EC-BS8, 再将其转化到枯草芽孢杆菌 Bs6 中。筛选表达菌株, 实现了豆豉纤溶酶基因在枯草杆菌中高效表达。获得重组菌纤溶酶活力高达 $9\,830\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 是出发菌株活力的 2.9 倍。经纯化 SDS-PAGE 鉴定重组豆豉纤溶酶相对分子质量为 31.0 kDa。

关键词: 豆豉纤溶酶; 基因克隆; 高效表达; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0159-03

Cloning of Douchi Fibrinolytic Enzyme Gene and Its Expression in *Bacillus subtilis*

QI Hai-ping, GANG jie, HU Wen-zhong, JIANG Ai-li, TIAN Mi-xia

(College of Life Science, Dalian Nationalities University, Education Department and National Nationality Key Lab, Dalian 116600, Liaoning, China)

Abstract: With the total DNA extracted from Bacillaceae UD8 as template, one pair of primers were designed according to DNA sequence of Douchi fibrinolytic enzyme (DFE) gene (AY720895.2) on Genbank website, to amplify DFE gene by PCR. The PCR product was inserted into expression plasmid EC-BS8, and the plasmid was transformed into the host strain *Bacillus subtilis*. DFE gene was successfully expressed in *Bacillus subtilis* and the maximum Douchi fibrinolytic enzyme level reached $9\,830\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, which was 2.9 fold higher of the initial strain. The cloned Douchi fibrinolytic enzyme purified molecular weight was 31.0 kDa with a single band from SDS-PAGE.

Key words: Douchi fibrinolytic enzyme; Gene cloning; Highly expression; *Bacillus subtilis*

豆豉纤溶酶来源于大豆发酵食品, 是一种安全性高, 溶栓效能好的新型溶栓剂^[1-4], 要将其开发为实用的溶栓剂, 提高纤溶酶的产量就变得非常关键。提高纤溶酶产量的方法通常有如下 3 种: 一是通过对野生菌种进行筛选、诱变, 选出高纤溶酶活的菌种; 二是通过发酵条件优化; 三是通过基因工程技术改造纤溶酶产生菌的基因^[5], 得到高产酶量的工程菌。其中通过基因工程技术构建溶栓酶高效表达的枯草杆菌工程菌株是解决工业化大规模生产溶栓酶的有效途径之一。该研究以枯草芽孢杆菌 (实验室筛选) 为对象克隆得到豆豉纤溶酶基因, 并实现该基因在枯草杆菌中实现高效表达, 旨在为豆豉纤溶酶开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 酶和试剂 限制性内切酶、连接酶、DNA 聚合酶和 dNTP 等均购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 菌株和质粒 豆豉纤溶酶产生菌芽孢杆菌株 UD8 (大连民族学院食品分析实验室筛选), 克隆载体 pMD18-T, 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 等购自 TaKaRa 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 培养基 种子培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 麦芽糖 15.0, 豆浆 500 mL (蛋白质浓度 40), 酵母膏 1.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0。

发酵培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 麦芽糖 15.0, 豆浆 500 mL (蛋白质浓度 40), 酵母膏 1.5, KH_2PO_4 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0, CaCO_3 4.0。

1.2 实验方法

1.2.1 芽孢杆菌的培养与总 DNA 的抽提 将枯草芽孢杆菌接种于 LB 液体培养基, 28℃ 摇床培养 24 h。收集菌体。参照文献 [5] 进行细菌总 DNA 的提取。

1.2.2 PCR 扩增 根据已发表的豆豉纤溶酶基因 DNA 序列 (GeneBank AY720895.2), 设计并合成了 1 对引物:

收稿日期: 2011-11-03

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目 (2008135)。

第一作者简介: 齐海萍 (1973-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: qhp8@sina.com.cn, qhp@dlnu.edu.cn。

P1:5'-GATGGCGTTCGGCAGAC-3';

P2:5'-GCCGGTTTTTTTATGTTTTACTGAGC-3'.

以枯草芽孢杆菌总 DNA 为模板,扩增条件为:95℃ 5 min;95℃ 1 min,53℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 10 min。然后进行 DNA 的回收、消化、连接和转化。

1.2.3 表达载体的构建 操作方法参照文献[6],用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,将克隆到的豆豉纤溶酶基因从载体上切下,连接到克隆载体 pMD18-T,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ,回收启动子片段,并与同样双酶切的穿梭载体连接,构建成表达质粒 EC-BS8。

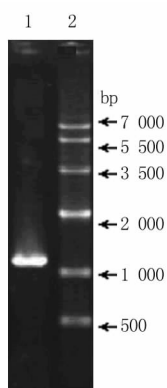
1.2.4 重组质粒 EC-BS8 在枯草杆菌表达系统中的表达、重组蛋白质的纯化及 SDS-PAGE 鉴定 原生质体法转化 EC-BS8 质粒于蛋白酶缺陷型枯草杆菌,菌株经过发酵培养筛选活力高的菌株,在发酵培养基中发酵培养 72 h,发酵液经离心,取上清液,经过超滤后,获得豆豉纤溶酶液上 Sephacryl S-200 柱。纯化^[7]后,经预处理^[8]进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.5 重组豆豉纤溶酶活力测定 根据 Astrup^[7]的方法加以改进,具体操作方法参考文献[9]。

2 结果与讨论

2.1 豆豉纤溶酶基因的 PCR 产物

以芽孢杆菌 UD(实验室筛选菌株)总 DNA 为模板,以引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,得到 DNA 片段(图 1)。经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳并割胶回收



1 为扩增到长 1 086 bp 的条带;2 为 Marker

1. The cloned *DFE* gene comprised 1 086 bp strain; 2. Marker

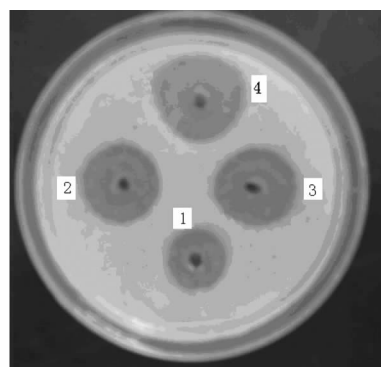
图 1 PCR 扩增豆豉纤溶酶基因的产物

Fig.1 The PCR product of *DFE* gene

后,进行酶切验证。该片段与载体 pMD18-T 连接,送宝生物工程(大连)有限公司测序。测序结果经 Genetool 序列分析表明该基因长 1 086 bp,编码 362 个氨基酸。

2.2 重组纤溶酶的活力测定

原生质体法转化 EC-BS8 质粒于蛋白酶缺陷型枯草杆菌,菌株经过发酵培养筛选活力高的菌株,在发酵培养基中发酵培养 72 h,发酵液经离心,取上清液,利用纤维蛋白平板法测定豆豉纤溶酶活性,测定结果见图 2。经过 37℃ 18 h 培养,豆豉纤溶酶活力高达 9 830 IU·mL⁻¹,其活力是出发菌株活力的 2.9 倍。



1. 出发菌株纤溶酶活; 2~4 重组菌株纤溶酶活

1. DFE activity of initial strain; 2-4. Recombinant-Douchi fibrinolytic enzyme activity

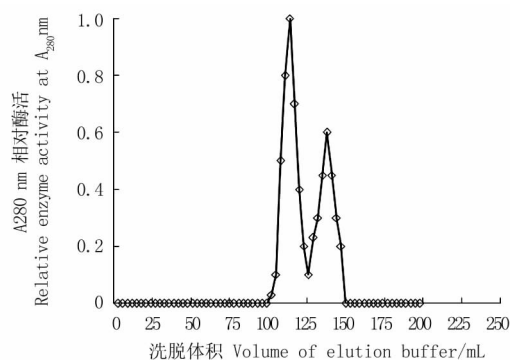
图 2 纤维蛋白平板纤溶圈

Fig.2 Fibrin plate assay for fibrinolytic activity

2.3 Sephacryl S-200 柱层析分离纯化重组豆豉纤溶酶

将经过超滤获得的纤溶酶活性组分收集浓缩,然后在 Sephacryl S-200(ϕ 1.6 \times 80 cm)上分离,在将样品上凝胶柱之前加入 5 mmol·L⁻¹ 甲苯磺酰氟(PMSF,蛋白酶抑制剂),以防止重组纤溶酶的自降解。由图 3 可知,酶液在 Sephacryl S-200 凝胶中被筛分为 2 个组分,其中分子量较大的组分具有纤溶酶活力。

将凝胶过滤得到的纤溶酶活性组分合并、浓缩,最后得到纯化酶溶液。重组纤溶酶溶液的 SDS-PAGE 图谱呈现单一电泳带(图 4),相对分子质量为 31.0 kDa。

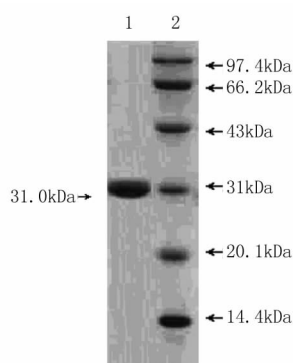


色谱柱($\phi 1.6 \times 80$ cm),洗脱缓冲液:PBS, pH 7.4;洗脱流速: $0.24 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长:280 nm。

Chromatograph column($\phi 1.6 \times 80$ cm), Elution buffer: PBS, pH 7.4; Elution velocity: $0.24 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Detective wave: 280 nm.

图3 豆豉纤溶酶在 Sephacryl S-200 分离

Fig.3 Sephacryl S-200 Chromatography of DCFE



1. 重组豆豉纤溶酶; 2. 标准分子量蛋白

1. rDFE; 2. Protein marker

图4 重组豆豉纤溶酶 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of rDFE expressed by *B. subtilis*

3 结 论

设计并合成 1 对引物,以筛选的来自实验室 UD8 豆豉芽孢杆菌的总 DNA 为模板,扩增出豆豉纤溶酶基因,将该基因克隆到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 EC-BS8 上,构建成表达质粒 EC-BS8,再将其转化到枯草芽孢杆菌 Bs6 中。获得重组菌纤溶酶活力高达 $9\,830 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,是出发菌株活力的 2.9 倍。重组豆豉纤溶酶经纯化 SDS-PAGE 鉴定

其相对分子质量为 31.0 kDa。

参考文献

- [1] Sumi H, Banba T, Kishimoto N. Strong pro-urokinase activators proved in Japanese soybean cheese natto[J]. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology, 1996, 43 (10) : 1124-1127.
- [2] Urano T, Ihara H, Umemura K, et al. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type I[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 : 24690-24696.
- [3] 刘宇峰,王金英,孙岸弢,等. 豆豉纤溶酶保健功能食品的研制[J]. 大豆通报, 2000 (2) : 22-23. (Liu Y F, Wang J Y, Sun A T, et al. Development of Douchi fibrinolytic enzyme functional food [J]. Soybean Bulletin, 2000 (2) : 22-23.
- [4] 段智变,江江湖,张书霞,等. 纳豆激酶粗制液对家兔溶血栓作用及其机制研究[J]. 营养学报, 2003, 25 (1) : 46-51. (Duan Z B, Jiang H H, Zhang S X, et al. Studies on fibrinolytic function of Nattokinase and its mechanism [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2003, 25 (1) : 46-51.)
- [5] 吕美云,张新,陆云华. 豆豉纤溶酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (6) : 2270-2271. (Lu M Y, Zhang X, Lu Y H. Cloning of Douchi fibrinolytic enzyme gene and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36 (6) : 2270-2271.)
- [6] 刘成君,黄庆,赵莲,等. 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒载体 pSUGV4 的构建[J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2001, 38 (2) : 243-246. (Liu C J, Huang Q, Zhao L, et al. Construction of a *Escherichia coli*-*Bacillus subtilis* shuttle vector PSUGV4 [J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2001, 38 (2) : 243-246.)
- [7] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1952, 40 : 346-351.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 齐海萍,钱和,王璋,等. 淡豆豉纤溶酶的分离纯化[J]. 中国调味品, 2005 (11) : 21-27. (Qi H P, Qian H, Wang Z, et al. The purification of Douchi fibrinolytic enzyme from Douchi [J]. China Condiment, 2005 (11) : 21-27.)