

马奶酒样乳杆菌乳糖酶 *LacZ* 基因的克隆, 原核表达及活性分析

何熹^{1,2}, 耿伟涛¹, 韩宁², 王艳萍^{1*}

1(天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津, 300457)

2(齐鲁工业大学 生物工程学院, 山东 济南, 250353)

摘要 从开菲尔粒(Kefir)中分离出1株马奶酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3), 具有较高的乳糖酶活性, 以此菌株为材料, 从其基因组中克隆得到 *LacZ* 型乳糖酶基因, 该基因全长 2007 bp, 编码 669 个氨基酸。随后将该基因插入原核表达载体 pET-32a 中转入大肠杆菌 BL21(DE3) 进行过量表达, 获得了其重组蛋白, 纯化后分析了该重组蛋白的乳糖水解活性特点。结果显示, 此蛋白在 50 ℃, pH 7.0 时乳糖水解活力最高, 并在 30~55 ℃, pH 5.0~9.0 的范围仍能保持 50% 以上的酶活力, 具有良好的工业应用潜力。

关键词 β -半乳糖苷酶; 基因克隆; 原核表达

乳糖酶(lactase) 又称 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase) 或 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β -D-galactoside galcato-hydrolase, EC, 3.2.1.23), 可催化乳糖分解为1分子葡萄糖和1分子半乳糖, 同时还具有半乳糖苷的转移作用^[1]。该酶在乳品加工工业中可利用乳糖酶分解牛乳等乳制品中的乳糖, 生产低乳糖乳制品供乳糖不耐受人群食用。而且该酶还能降解冰淇淋中的乳糖, 减少乳糖在低温条件下因溶解度下降而析出。此外, 利用乳糖酶的半乳糖苷转移作用生产的低聚半乳糖也已经开始投放市场, 因低聚半乳糖(Galactooligosaccharides, GOS) 能被肠道内双歧杆菌利用, 可做为很好的益生元使用^[2]。

根据氨基酸序列相似度, 国际生物化学与分子生物学联盟(IUBMA) 将已发现的各种糖基水解酶分成了133个家族, 分别命名为GH1—GH133家族。其中GH1, GH2, GH35以及GH42家族中均有乳糖酶存在。按照组成的蛋白亚基种类, 乳糖酶可分为2种类型, 一种由相同亚基构成的, 即 *LacZ* 型, 一般以同源四聚体形式存在, 例如大肠杆菌的 *LacZ* 型乳糖酶^[3]。另一种为异源二聚体, 即 *LacLM* 型, 由大小2个不同亚基组成^[4]。目前在工业上使用的乳糖酶制剂虽然活性较高, 但其作用温度往往局限在常温条件, 限制了它的应用。

开菲尔粒(Kefir) 是一种来自西藏和高加索地区的由多种微生物(大部分是乳酸菌) 所构成的用于生产发酵乳的发酵剂^[5]。本实验室从中分离获得1株乳糖酶活性较高的马奶酒样乳杆菌 ZW3(*Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3), 并进行了基因组测序, 在GenBank 中的注册号为CP002764.1。本研究以该菌株为材料, 克隆了其乳糖酶 *LacZ* 基因, 并在大肠杆菌中进行了过量表达, 纯化后经 X-Gal 初步检测发现具有乳糖酶水解活性, 随后进一步对其最适酶活条件进行了分析, 为将来进一步工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒

1.1.1 菌种

马奶酒样乳杆菌 ZW3 (*Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3), 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 及 *E. coli* BL21(DE3) 均由天津科技大学发酵食品与益生菌资源开发实验室保存。

1.1.2 质粒

pEasy-blunt 载体购于北京全金生物技术有限公司, pET30 α 由天津科技大学发酵食品与益生菌资源开发实验室保存。

1.2 试剂材料

细菌基因组提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒、DNA 分子量标准 DM5000、Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司; 限制性内切酶、DNA 聚合酶、T₄

第一作者: 博士研究生(王艳萍为通讯作者, E-mail: ypwang40@163.com)。

收稿日期: 2015-10-28, 改回日期: 2016-01-04

连接酶、异丙基硫化- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 购自大连宝生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 马奶酒样乳杆菌 ZW3 基因组 DNA 的提取
参照试剂盒说明书。

1.3.2 乳糖酶 *LacZ* 基因全长克隆与测序

根据 ZW3 基因组数据库中 *LacZ* (Gi:35947332) 核酸序列, 设计该基因的上下游引物, (下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点)。分别是:

F: 5'-GGATCCATGACACAACTTTAACACGC-3'

R: 5'-CTCGAGCTATTTAACCACAACTTGCAC-3'

以基因组 DNA 为模板使用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 反应。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物与 pEASY-blunt 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆并送金唯智公司测序, 测序正确的阳性克隆命名为 pEASY-blunt-*LacZ*。

1.3.3 原核表达载体的构建及鉴定

在 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点将 *LacZ* 基因全长连入原核表达载体 pET30a, 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21, 挑选阳性克隆并测序。

1.3.4 融合蛋白的诱导表达及纯化

将含有 *LacZ* 基因全长的阳性克隆接种于 50 μ g/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 然后按 1:50 接种量进行扩大培养, 至 OD₆₀₀ 值约为 0.5, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 27 °C 继续振荡培养 4 h 以诱导蛋白的表达。蛋白纯化方法参照 (Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒) 说明书。用 SDS-PAGE 电泳检测纯化产物, 分离胶浓度为 12%。

1.3.5 乳糖酶活性检测

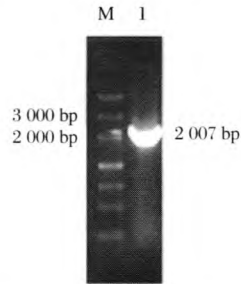
采用赵华梅^[6]的方法测定乳糖酶活力, 并测定其在不同温度、pH 条件下的相对活力, 相对活力为在不同条件下乳糖酶活力与其最佳活力值的比值。

2 结果与分析

2.1 *LacZ* 基因的克隆

根据马奶酒样乳杆菌 ZW3 基因组数据库 (GenBank: CP002764) 的 Wang 0296 核苷酸序列设计引物, 以 ZW3 基因组为模板进行 PCR 扩增, 得到 1 条长 2007bp 的基因片段 (图 1), 符合预期大小。推测

该基因编码的产物具有 669 个氨基酸, 蛋白分子质量为 75 kDa。将产物回收纯化, 连接到 pEasy-blunt 载体上并对重组分子进行测序, 结果表明扩增出的基因序列与基因组中的原序列完全一致。经双酶切重组质粒 pEasy-blunt-*LacZ* 后连入原核表达载体 pET30a, 转化大肠杆菌 DE3, 挑选阳性克隆, 经测序鉴定, 构建重组分子 pET30a-*LacZ* 的阅读框正确。将其序列通过 NCBI 进行分析, 确定该基因编码的蛋白属于糖基水解酶第 42 家族, 即 GH42 中的 *LacZ* 型 β -半乳糖苷酶。



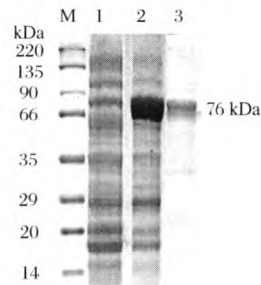
M-分子量标准 DM5000; 1-扩增的 *LacZ* 基因

图 1 *LacZ* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR product of *LacZ* gene

2.2 重组蛋白的表达与纯化

原核表达阳性菌经 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L) 诱导 4 h 后, 对细胞粗提物进行 SDS-PAGE 电泳检测 (图 2)。结果显示: 与对照菌株 (pET-30a) 相比, 原核表达菌 (pET-30a-*LacZ*) 在相对分子质量 76 kDa 附近出现 1 条新带, 进一步对诱导后的菌体进行超声波破碎, 经纯化后得到高纯度蛋白, 通过 SDS-PAGE 电泳检测其相对分子量与预期的融合蛋白分子量一致。



M-蛋白分子量标准; 1-pET30a 空质粒转化子诱导后的总蛋白;

2-pET-30a-*LacZ* 转化子诱导后的总蛋白; 3-纯化后蛋白

图 2 *LacZ* 蛋白的表达与纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of *LacZ* gene expression in *E. coli*

2.3 重组蛋白的乳糖水解酶活力检测

将 pET-30a-*LacZ* 接种到含有 X-Gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D 半乳糖苷) 的培养基中, 菌落呈现蓝色

(图3),初步验证其具有乳糖水解酶活性。而对照菌株(pET-30a)则仍然为白色。将菌体收集后经超声波破碎,测定重组蛋白在不同温度,pH条件下的乳糖相对水解活力(图4和图5)。结果显示,重组蛋白在50℃时酶活力最高,在30~55℃时能保持50%以上的活力。其最适pH是7.0,但在5.0~9.0这个pH范围内,依然具有较高活性。



图3 重组菌在X-Gal培养基中的显色反应

Fig.3 The color reaction of recombinant bacteria in X-Gal medium

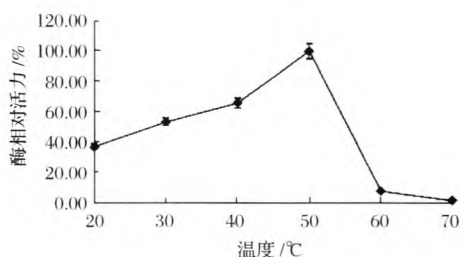


图4 重组蛋白β-半乳糖苷酶最适温度范围

Fig.4 Optimal temperature of the recombinant β-galactosidase holoenzyme

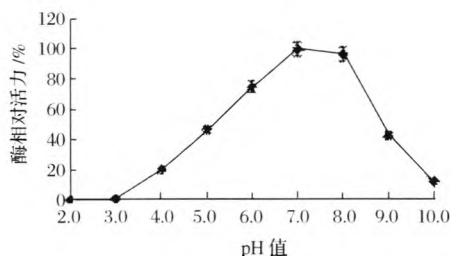


图5 重组蛋白β-半乳糖苷酶最适pH范围

Fig.5 Optimal pH of the recombinant β-galactosidase holoenzyme

3 讨论

乳糖酶的工业生产方法主要是微生物发酵法,在已投放市场的乳糖酶产品主要来源于真核生物克鲁维酵母,由于其产生的乳糖酶可通过胞外分泌,因此在生产中易于提取。可是该乳糖酶适应的条件比较狭窄,乳糖酶最佳作用温度是在室温条件下,最适pH值6.0~7.0,这就限制了在生产中的应用。本研究

通过大肠杆菌表达系统构建的乳糖酶菌株,产生的乳糖酶属于胞内酶,在最适条件下,当发酵液OD₆₀₀值接近1.0时,经测量此时发酵原液中β-半乳糖苷酶活力为2.90 U/mL,要低于毕赤酵母等真核表达系统中发酵液中乳糖酶活力^[7],造成活力偏低的主要原因可能是由于以下几种原因:首先是由于细胞破碎效果不好,造成大量酶蛋白还位于细胞内,酶蛋白不能完全释放,从而影响了发酵液中的游离酶的含量;其次是细菌培养液浓度的差异,当发酵液浓度OD₆₀₀值在0.5~0.6时测得的乳糖酶活力为0.96 U/mL,此时的酶蛋白量表达量为10.1 μg/mL,当OD₆₀₀达到浓度最高的1.2时的发酵液中的酶蛋白含量则达到30.6 μg/mL,乳糖酶活力也增加了3倍;此外乳糖酶的来源不同,其氨基酸组成差异也会造成了酶水解活力的不同,这是第3个原因。不过与酵母等真核生物中的乳糖酶相比,本研究中的乳糖酶基因来自于从开菲尔粒(Kefir)分离的1株马奶酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3),Kefir粒是一种来自西藏和高加索地区的由多种微生物(大部分是乳酸菌)所构成的用于生产发酵乳的发酵剂,其主要碳源来自于乳品中的乳糖,在发酵乳的生产过程中,Kefir中的多种微生物处于一个温度、pH值不断变化的环境中,形成了一套能适应不同条件的乳糖酶系统,因此Kefir为我们提供了丰富的乳糖酶资源。同时鉴于Kefir具有无毒安全的特性,如果能以其为研究对象,从中分离并克隆出了相关的乳糖酶基因,构建了高效的乳糖酶表达体系,就能制备出可在不同温度和pH条件下能够保持较高的活力的乳糖酶系列产品。相信在解决了细胞破碎,酶提取等工艺问题后,通过该方法生产的乳糖酶能在乳制品、医药生产、食品加工等产业中能够得到更加广泛的运用。

参 考 文 献

- [1] HUSAIN Q. β-galactosidases and their potential applications: a review [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2010, 30(1): 41-62.
- [2] ANA R M, MARTA C M, ANTONIA M, et al. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2012, 28(2): 164-169.
- [3] MATTHEWS B W. The structure of *E. coli* β-galactosidase [J]. Comptes Rendus Biologies, 2005, 328(6): 549-556.
- [4] NUYEN T H, SPLECHTNA B, KTAŠTEVA S, et al.

- Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 269 (1):136 - 144.
- [5] GARROTE G L, ABRAHAM A G, ANTONI G L D. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains[J]. Journal of Dairy Research, 2001, 68(4):639 - 652.
- [6] 赵华梅,王曼霞,牟志春,等. 乳糖酶制剂活力测定方法的研究[J]. 食品科技, 2010(4):240 - 242.
- [7] 张伟,范云六,姚斌. 亮白曲霉乳糖酶基因在毕赤酵母中的高效分泌表达及酶学性质研究[J]. 微生物学报, 2007, 37(5): 34 - 35

Cloning, expression and characterization of *LacZ* gene from *Lactobacillus kefiranofaciens*

HE Xi^{1,2}, GENG Wei-tao¹, HAN Ning², WANG Yan-ping^{1*}

1(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

2(College of Bioengineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China)

ABSTRACT A *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 with high lactase activity was isolated from Kefir in our laboratory. Using *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 as material, a *LacZ* type of lactase gene was cloned from ZW3 genome, and the full-length of this gene encoding 669 amino acids was 2007 bp. The gene was then inserted into the pET-32a vector and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The lactose hydrolysis activity of this recombinant protein was analyzed after purification. The results showed that the optimum temperature and pH for hydrolyzation of the recombinant protein was 50 °C, pH 7.0. In the range of 30 ~ 55 °C and pH 5.0 ~ 9.0, the recombinant protein still maintained more than 50% of the enzyme activity, which exhibited a good potential for industrial applications.

Key words β -galactosidase; gene cloning; prokaryotic expression