

DCE-01 菌株果胶酯酶基因克隆与表达

成莉凤¹,李琦^{2,*},刘正初^{1,*},段盛文¹,冯湘沅¹,郑科¹,郑霞¹,程毅¹

(1.中国农业科学院麻类研究所,湖南长沙 410205;

2.湖南农业大学生物安全科学技术学院,湖南长沙 410128)

摘要:从麻类脱胶高效菌株 DCE-01 中克隆果胶酯酶基因并进行原核表达。根据全基因组测序注释结果设计引物,PCR 扩增果胶酯酶基因连接到 pEASY-E1 载体上,导入大肠杆菌进行诱导表达,采用水解圈法进行选择 and 定量分析。结果表明:克隆出全长 1107bp 的果胶酯酶基因(GenBank 登录号:KC422449),编码 368 个氨基酸;该基因表达蛋白质序列的前 26 个氨基酸为信号肽,前导蛋白的分子量约为 39.6ku,成熟蛋白为 36.9 ku,pI 为 9.1;基因工程菌株以高度酯化橘子果胶为底物的发酵液粗酶活为 1.5IU/mL,是原始菌株 DCE-01 的 22.4 倍。本研究成功发掘出果胶酯酶基因,其表达产物果胶酯酶能降解高甲氧基果胶,在低甲氧基果胶制备方面具有重要应用前景。

关键词:果胶酯酶,基因克隆,原核表达,水解圈

Cloning and expression of the pectin methyl esterase gene from DCE-01 strain

CHENG Li-feng¹,LI Qi^{2,*},LIU Zheng-chu^{1,*},DUAN Sheng-wen¹,
FENG Xiang-yuan¹,ZHENG Ke¹,ZHENG Xia¹,CHENG Yi¹

(1.Institute of Bast Fiber Crops,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Changsha 410205,China;

2.College of Biosafety Science and Technology,Hunan Agricultural University,Changsha 410128,China)

Abstract:Primers were designed by the potential pectin methyl esterase gene annotated from the whole genome sequence of DCE-01 strain,which is an efficient strain for bast fiber bio-extracting.The pectin methyl esterase gene was cloned,linked to pEASY-E1,and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3).The positive colonies were selected by the hydrolysis circles,and then their pectin methyl esterase activities were analyzed.It was resulted that the pectin methyl esterase gene (GenBank:KC422449) was 1107bp and encoded 368 amino acids.By the bioinformatics software analysis,the 26 amino acids in front of the protein sequence were signal peptide.The molecular weight of pre-PME was approximately 39.6ku,the molecular weight of mature-PME was 36.9ku,and pI was 9.1.With high methoxyl citrus pectin as substrate,the pectin methyl esterase activity secreted by the genetic engineering strain was 1.5IU/mL,22.4 times higher than that from the original DCE-01 strain.An efficient pectin methyl esterase gene had been excavated from the DCE-01 strain,and its expression product could degrade high methoxyl pectin,so it might be available for low methoxyl pectin preparation.

Key words:pectin methyl esterase;gene clone;prokaryotic expression;hydrolysis circle

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2013)15-0162-04

果胶酯酶(Pectin methyl esterase,简称 PME,EC 3.1.1.11)能水解果胶酯键,生成甲醇和带有游离羧基的果胶酸。通过二价离子(如 Ca^{2+})与游离的羧基结合,不同的果胶链可以交联,形成网状的果胶和凝胶^[1]。果胶酯酶可应用于果汁澄清^[2]、提高果蔬出汁率^[3]、改善果酱粘度^[4]等。在食品加工过程中,高甲氧基果胶(HM-pectin)只能在狭小的 pH 范围(3.0

左右)和可溶性固形物高于 55% 形成凝胶,主要用于高糖食品的生产。低甲氧基果胶(LM-pectin)只需较低的糖浓度甚至无糖条件下,就能在 Ca^{2+} 或其它二价阳离子体系中形成凝胶。为满足肥胖和糖尿病人等的需要,低酯果胶可制成低热量的食品,这使低酯果胶的需求量越来越大^[5-6]。然而,天然低酯果胶来源有限,需利用高酯果胶转化。传统的酸水解法、碱水解法均对果胶主链有不同程度的降解,导致果胶分子链缩短,而利用酶法制备低酯果胶具有专一性,明显优于其他方法得到的低酯果胶。Ishii 等用来自 *Aspergillus japonicus*^[7] 菌株的果胶酯酶成功制备低酯果胶。随着基因工程技术的发展,从微生物中克隆果胶酯酶基因,构建高效表达体系,诱导果胶酯酶表达,这是获得大量果胶酯酶的新途径之一。Heikinheimo 等^[8]从 *Erwinia chrysanthemi* B374 克隆果

收稿日期:2013-01-23 * 通讯联系人,+ 同为第一作者。

作者简介:成莉凤(1981-),女,在读博士,助理研究员,研究方向:微生物基因工程与分子生物学;

李琦(1983-),男,在读博士,研究方向:微生物分子生物学。

基金项目:国家高技术发展计划(2006AA02Z249);国家麻类产业技术体系建设专项(CARS-19-E24)。

表1 菌株与载体
Table 1 Strains and plasmid

菌株或载体	主要特性	来源
DCE-01	麻类脱胶高效菌株	本项目组分离与保存
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Omp T, hsdSB (rB ⁺ mB ⁻) gal, dcm (DE3) 等	购自 Novagen 公司
pEASY-E1	T7/lac, Amp ⁺ , N 端 6 × His 等	购自 TransGen 公司

胶酯酶基因,在 *Bacillus subtilis* 中进行表达,获得了没有外源酶污染的果胶酯酶。Kitamoto 等^[9] 从 *Aspergillus oryzae* KBN616 克隆果胶酯酶基因 (*pmeA*),在黑曲霉中进行超量表达,其果胶酯酶用于降解大豆果胶,制备豆酱^[9]。本研究拟从麻类脱胶高效菌株 DCE-01 克隆果胶酯酶基因 (*pme*),构建原核表达体系,并验证果胶酯酶的部分功能,为丰富果胶酯酶基因来源和加速果胶酯酶的工业化应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株与载体 见表1;橘子果胶 (DE≥85%)、钯红染料 Sigma 公司;高保真聚合酶 KOD plus ver2.0、*Sac* I、rTaq、dNTPs TOYOBO 公司;UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 上海生工公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、多功能 DNA 纯化回收试剂盒 Biotke 公司;DNA Marker III Tiangen 公司;其他常规生化试剂 均为分析纯,国药集团;改良肉汤培养基^[10] \LB 培养基^[11]。

413M/BS97MyCycler PCR 仪 美国 BioRad 公司;3-15 型冷冻离心机 德国 Sigma 公司;DYY-12 型电泳仪 北京六一仪器厂;HI9025 型便携式 pH 计 Romania HANNA 公司;SPX-250B 型生化培养箱 上海博讯公司;RH-Q 型全温振荡器 江苏金坛仪器制造有限公司;LDZX-50KBS 型不锈钢立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;BCM-1000 型超净工作台 苏州真田洁净设备有限公司;RO-200型超纯水仪 台湾艾柯公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养 DCE-01 菌种的活化方法:从本项目组保存的固体斜面保藏菌挑取一环 DCE-01 菌种接种到 5mL 改良肉汤培养基,充分悬匀,35℃ 静置培养 5~6h。稀释涂布固体改良肉汤培养基,35℃ 静置培养 18~20h,分离单菌落。挑选优良单菌落接种于 5mL LB 培养基,35℃,180r/min 培养 15~18h,供基因组 DNA 提取或其他用途。

pEASY-E1-*pme*-BL 的诱导产酶:挑选 *pme* 基因插入正确的转化子接种到含 100μg/mL 氨苄青霉素钠盐的 5mL LB 培养基,37℃,220r/min 过夜培养。取 0.5mL 菌液接种到含 100μg/mL 氨苄青霉素钠盐的 50mL LB 培养基中,37℃,220r/min 培养。当 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右,添加 IPTG 至终浓度 1mmol/L,25℃,120r/min 诱导 21h。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 参照 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (No. SK1201) 说明书进行。

1.2.3 *pme* 基因的扩增 根据 DCE-01 菌株基因组 DNA 序列预测的果胶酯酶基因 Q6D243 用软件 Primer premier 5 设计引物。

针对载体 pEASY-E1 的正向引物 F₁: 5' TCGAGCTCCATGTGTATGTTAAAAACGATCTCAGG 3' (*Sac* I 酶切位点),反向引物 R₁: 5' TTATGCGGCCGCTCAGGGGACTGTCGGCGT 3' (*Not* I 酶切位点)。引物由上海生工合成。

以 DCE-01 菌株基因组 DNA 为模板,用 F₁-R₁ 引物扩增 Q6D243 基因,其产物暂定名为 *pme*。扩增体系参照 KOD 试剂说明书。扩增条件:95℃ 4min;94℃ 30s,55℃ 30s,68℃ 1.5min,共 35 个循环;72℃ 10min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。

1.2.4 表达体系的构建 对 *pme* PCR 产物进行加 A 处理。加 A 反应体系为:10 × buffer 2μL, rTaq 酶 0.5μL, dNTPs 3μL, MgCl₂ 1μL, PCR 产物 13.5μL。72℃ 保温 30min,回收 *pme* 加 A 产物后,与 pEASY-E1 进行连接 (图 1),导入到 *E.coli* BL21 (DE3),通过含有 100μg/mL 氨苄青霉素钠盐的 LB 平板对重组子进行筛选。基因工程常规操作按照《分子克隆实验指南》第三版进行^[11]。

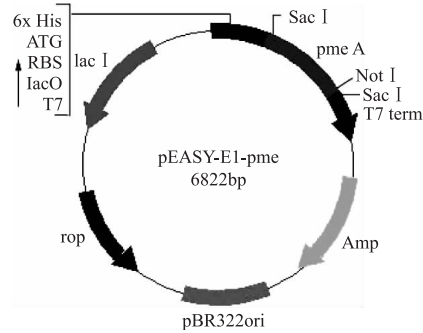


图1 重组表达质粒的物理图谱

Fig.1 Physical map of the recombinant expression plasmid

1.2.5 果胶酯酶活力测定 果胶酯酶活力测定:用 pH6.0 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液配制 5mg/mL 的橘子果胶溶液。取 10mL 0.5% 果胶溶液,40℃ 水浴平衡 5min,加入 2mL 适当稀释的酶液,40℃ 保温 30min 后,煮沸终止反应,用 0.02mol/L NaOH 滴定产生的羧基基团。以煮沸灭活的酶液做相同的处理作阴性对照。酶活力单位定义为:底物每分钟释放出 1μmol 羧酸所需的酶量为一个酶活力单位 (以 IU 表示)^[7,12]。

果胶酯酶平板检测法:在 1% 琼脂糖凝胶的基础上添加 0.5% 橘子果胶,充分溶解后,倒入培养皿,待充分凝固后打孔。将 5μL 粗酶液点入孔中,40℃ 保温 30min,在平皿表面倒入一层 0.1% 钯红染液,室

温显色 10min,倒掉上清液,观察透明圈^[13-14]。

1.2.6 胞外粗酶液制备 取发酵成熟的培养液,5000r/min,4℃离心 5min,上清即为胞外粗酶液。

1.2.7 生物信息学软件分析 采用 SignalP 4.1 在线预测信号肽: <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface?jobid=signalp,50E40EF517DFA598&opt=none>

采用 PSORTb version 3.0 蛋白质定位: <http://www.psort.org/psortb/results.pl>

采用 InterProScan version4.8 预测蛋白质的功能域: http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_iprscan/toolresult.ebi?tool=iprscan&jobId=iprscan-I20130102-110054-0597-11574488-pg

2 结果与分析

2.1 *pme* 基因扩增

以 DCE-01 菌株基因组 DNA 为模板,用 F₁-R₁ 引物扩增果胶酯酶基因,其产物命名为 *pme*。经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,目的片段略小于 1.2kb(图 2),与预期片段 Q6D243 大小(1107bp)相符。

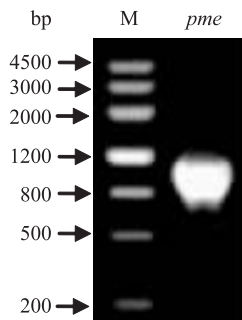


图 2 *pme* 基因扩增

Fig.2 Amplification of *pme* gene

注:*pme*:PCR 扩增产物;M:DNA marker III。

2.2 重组子构建与检测

采用 *Sac* I 单酶切(图 3,泳道 1)和菌落 PCR 扩增(图 3,泳道 2)方法对阳性克隆子 pEASY-E1-*pme* 所含目的基因片段同时进行检测,其大小均接近 1.2kb,即两种方法均验证其插入片段正确。

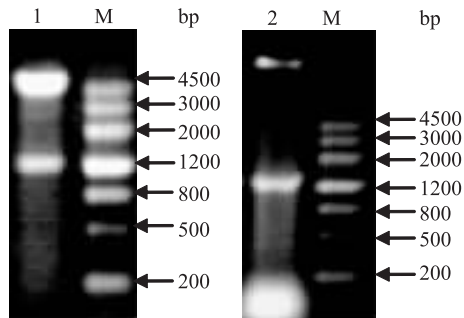


图 3 重组子检测

Fig.3 Recombinant detection

注:泳道 1:pEASY-E1-*pme* *Sac*I 酶切;

泳道 2:pEASY-E1-*pme*-BL 菌落 PCR;M:DNA marker III。

将验证后的重组子进行测序,获得与 DCE-01 基因组序列预测到的 *pme* Q6D243 完全一致的 *pme*

基因序列(GenBank 登录号:KC422449)。全长 1107bp,编码 368 个氨基酸。前导蛋白分子量为 39.6ku,成熟蛋白分子量为 37.6ku,pI 为 9.1。将翻译成的蛋白序列进行 blastp 比对,该酶含有 Pectinesterase superfamily,与 *Erwinia* sp.等亲缘关系接近的果胶酯酶一致性大于 90%,与 *Pectobacterium* sp.、*Glaciecola* sp.、*Caldicellulosiruptor* sp.等亲缘关系较远的果胶酯酶一致性为 35%~71%(表 2)。InterProScan 预测到该蛋白序列的第 196~205 位氨基酸(ISGTVDVFIFG)为活性部位。

表 2 与部分微生物来源的果胶酯酶一致性比较

Table 2 Identity of PME's from partial microorganism

蛋白质序列号	菌株来源	一致性 (%)
YP_003003438.1	<i>Dickeya zeae</i> Ech1591	95
YP_003884111.1	<i>Dickeya dadantii</i> 3937	97
POC1A8.1	<i>Erwinia chrysanthemi</i> B374	97
AFI89239.1	<i>Pectobacterium</i> sp. SCC3193	71
CBX73542.1	<i>Yersinia enterocolitica</i> W22703	59
NP_671051.1	<i>Yersinia pestis</i> KIM10 +	56
ZP_12469317.1	<i>Vibrio cholerae</i> HE48	56
ZP_10487273.1	<i>Enterobacter radicincitans</i> DSM 16656	51
ZP_11345176.1	<i>Glaciecola arctica</i> BSs20135	47
YP_004480430.1	<i>Marinomonas posidonica</i> IVIA-Po-181	42
YP_006748347.1	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	40
ZP_05430240.1	<i>Clostridium thermocellum</i> DSM 2360	37
YP_004022874.1	<i>Caldicellulosiruptor kronotskyensis</i> 2002	35

2.3 果胶酯酶的诱导

取发酵粗酶液,点种于果胶酯酶平板,孵育、染色后观察水解圈(图 4),测定水解圈直径(表 3)。由图 4 和表 3 可知:阴性对照 CK1、CK2 均无明显水解圈;PME-2 产生的水解圈最大,依次为 PME-5 和 PME-1;PME-3、PME-4、PME-6 无明显水解圈。在该条件下,可以定性地认为 PME-2 菌株产果胶酯酶的酶活力高。

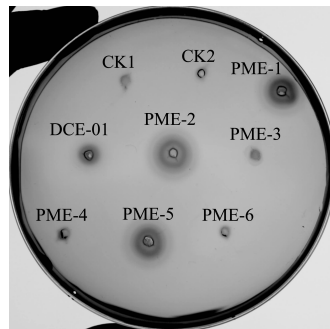


图 4 平板半定量法检测果胶酯酶活力

Fig.4 Semi-quantitative analysis

of pectin methyl esterase by hydrolysis circles

注:CK1, CK2 为 pEASY-E1-control-BL 胞外粗酶液,作阴性对照;DCE-01 为原始菌株的胞外粗酶液;

PME-1~6 分别为带有 *pme* 基因的不同基因工程菌株的发酵粗酶液。

表3 不同粗酶液产生的水解圈比较
Table 3 Comparison of hydrolysis circles produced by different crude pectin methyl esterase

酶液编号	水解圈直径 (mm)	酶液编号	水解圈直径 (mm)
CK1	0	PME-3	0
CK2	0	PME-4	0
DCE-01	2.1	PME-5	5.0
PME-1	4.8	PME-6	0
PME-2	5.4		

取成熟的发酵液 PME-2, 准确测定胞外果胶酯酶活力, 其粗酶活为 1.5IU/mL, 是原始菌株 DCE-01 (0.067IU/mL) 的 22.4 倍。

3 结论

3.1 本研究从麻类脱胶高效菌株 DCE-01 中克隆到一种全长 1107bp 的果胶酯酶基因 (*pme A*), 编码 368 个氨基酸; 该基因表达蛋白质序列的前 26 个氨基酸为信号肽, 前导蛋白的分子量约为 39.6ku, 成熟蛋白为 36.9ku, pI 为 9.1。基因工程菌株以高度酯化橘子果胶 (DE ≥ 85%) 为底物的发酵液粗酶活为 1.5IU/mL, 是原始菌株 DCE-01 的 22 倍。

3.2 一般来说, 天然微生物产果胶酯酶的同时也产果胶解聚酶, 其发酵的粗酶液水解果胶酯键的同时也会在果胶主链的 α-1, 4-糖苷键发生水解作用或消去作用, 缩短果胶主链。本研究从天然微生物中克隆出果胶酯酶基因, 重新构建基因工程菌株, 能够克服天然微生物同时产多种果胶酶干扰特定工业加工过程。同时, 根据他人采用毕赤酵母^[15]、芽孢杆菌^[16]、黑曲霉^[17] 等研究结果, 如果更换高效表达体系, 也许能进一步提高果胶酯酶的产量。

3.3 雷激等^[18] 明确了内源果胶酯酶制备低甲氧基果胶的工艺条件, 制备的果胶甲氧基含量为 51.93%, 符合低甲氧基果胶标准, 果胶得率为 2.46%。焦云鹏等人^[19] 采用明胶作载体和戊二醛作交联剂制备固定化果胶酯酶, 使酶的温度稳定性、贮存稳定性和操作稳定性都明显增强, 促进该酶的应用。本研究的后续工作可以进一步尝试果胶酯酶应用于橘皮渣、苹果渣等天然果胶加工, 选择合适的食品加工工艺。

参考文献

[1] Vanburen J P. The chemistry of texture in fruits and vegetables [J]. Journal of Texture Studies, 1979, 10(1): 1-23.
[2] Wicker L, Ackerley J L, Corredig M. Clarification of juice by thermolabile valencia pectinmethylesterase is accelerated by cations [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(14): 4091-4095.

(上接第 161 页)

展 [J]. 食品科学, 2010, 31(23): 439-446.
[9] García P, Madera C, Martínez B, et al. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents [J]. J Dairy Sci, 2009, 92

[3] Duvetter T, Sila D N, Buggenhout S V, et al. Pectins in processed fruit and vegetables: part I - stability and catalytic activity of pectinases [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009, 8(2): 75-85.
[4] 周鹏, 俞中. 应用果胶甲酯酶改善番茄酱的粘度 [J]. 食品工业科技, 2003, 24(5): 29-30.
[5] 雷激, 李中柱, 易彪, 等. 内源果胶酯酶制备低甲氧基果胶的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 46-51.
[6] 张庆坤, 雷激, 张大凤. 果胶酯酶制备低酯果胶的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 243-246.
[7] Ishii S, Kiho K, Sugiyama S, et al. Low - methoxyl pectin prepared by petinesterase from *Aspergillus japonicus*. Journal of Food Science, 1979, 44(2): 611-614.
[8] Heikinheimo R, Hemilä H, Pakkanen R, et al. Production of pectin methylesterase from *Erwinia chrysanthemi* B374 in *Bacillus subtilis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 35(1): 51-55.
[9] Kitamoto N, Okada H, Yoshino S, et al. Pectin methylesterase gene (*pmeA*) from *Aspergillus oryzae* KBN616: its sequence analysis and overexpression, and characterization of the gene product [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1999, 63(1): 120-124.
[10] Liu Z C, Duan S W, Sun Q X, et al. A rapid process of ramie bio- degumming by *Pectobacterium* sp. CXJZU - 120 [J]. Textile Research Journal, 2012, 82(15): 1553-1559.
[11] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
[12] Kertesz Z I. Pectic enzymes [J]. Methods in Enzymology, 1955, 1: 158-162.
[13] Brühlmann F, Kim K S, Zimmerman W, et al. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers [J]. Applied Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 2107-2112.
[14] 武莹浣, 叶汉英. 果胶酶微生物筛选和酶活测定方法研究 [J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 57-60.
[15] 葛英亮. 樱桃番茄中果胶酯酶的基因克隆及在毕赤酵母中表达的初步研究 [D]. 成都: 西华大学 2007.
[16] Liu Y H, Chen G Q, Wang J L, et al. Efficient expression of an alkaline pectate lyase gene from *Bacillus subtilis* and the characterization of the recombinant protein [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(1): 109-115.
[17] Nguyen Q Khanh, Edeltraud Ruttkowskia, Kirsten Leidingera, et al. Characterization and expression of a genomic pectin methyl esterase - encoding gene in *Aspevgillus niger* [J]. Gene, 1991, 106(1): 71-77.
[18] 雷激, 李中柱, 易彪, 等. 内源果胶酯酶制备低甲氧基果胶的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2006, 5: 46-51.
[19] 焦云鹏, 王志民, 蒋长兴. 固定化果胶酯酶的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(8): 137-140.

(7): 3019-3026.
[10] Bueno E, García P, Martínez B, et al. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard - type cheeses [J]. Int J Food Microbiol, 2012, 158(1): 23-27.