

葡萄糖脱氢酶融合表达载体的构建^{*}

戴锦程, 韩 菲, 王 岩, 戴 榴, 周丽萍 (江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏镇江 212013)

【摘要】 目的 为方便葡萄糖脱氢酶的纯化, 构建葡萄糖脱氢酶融合表达载体。**方法** 通过聚合酶链反应 (PCR) 从枯草杆菌基因组中扩增葡萄糖脱氢酶基因, 与源序列比较分析后连接到融合表达载体 pET22b, 导入 JM109 诱导表达, 测定葡萄糖脱氢酶酶液比活力。**结果** 构建的葡萄糖脱氢酶融合表达载体中目的基因序列与枯草杆菌来源的该基因序列相同, 且粗提酶液比活力高达 375 U/mg。**结论** 运用分子生物学技术获得葡萄糖脱氢酶基因, 成功构建了葡萄糖脱氢酶的融合表达载体, 为酶的后续纯化工作提供了条件。

【关键词】 葡糖脱氢酶; 基因表达; 枯草杆菌; 聚合酶链反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 02. 003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)02-0133-02

Construction of fusion expression vector of glucose dehydrogenase^{*} DAI Jin-cheng, HAN Fei, WANG Yan, DAI Liu, ZHOU Li-ping (College of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

【Abstract】 Objective To facilitate the purification of glucose dehydrogenase and to construct fusion expression vector of glucose dehydrogenase. **Methods** Glucose dehydrogenase gene was amplified from the genome of *Bacillus subtilis* by PCR amplification, then compared sequence analysis with the source. Using the fusion expression vector pET22b with the glucose dehydrogenase gene, to introduce JM109 to induce expression and to determine the enzyme specific activity. **Results** The target gene from constructed glucose dehydrogenase gene fusion expression vector was the same as the source gene, and the crude enzyme specific activity was up to 375 U/mg. **Conclusion** The glucose dehydrogenase gene is gotten by using molecular biology techniques, and the fusion expression vector with the glucose dehydrogenase gene is successfully constructed, which provides the conditions for the purification of the enzyme.

【Key words】 Glucose dehydrogenase; gene expression; subtilisin; polymerase chain reaction

葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 能特异催化葡萄糖和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (磷酸) [NAD(P)⁺] 生成葡萄糖酸内酯和 NAD(P)H。在过去几年中, 以该反应为基础而制造的生物传感器和生物芯片^[1-3], 生产的高纯度低聚果糖和葡萄糖酸钙, 以及生物合成的手性醇等技术都取得了令人瞩目的进展^[4]。GDH 是芽孢杆菌属细菌体内与芽孢形成有关的酶, 在形成芽孢时被诱导生成, 是 D-核糖生物合成途径中的限制性酶。科学家们已经提取并纯化了蜡状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌及枯草芽孢杆菌的 GDH, 并分析了它们的生物学特性。对枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌不同菌株的 GDH 基因也已被克隆和序列分析^[5]。从目前的文献来看, 国外对 GDH 的开发研究虽然早在 80 年代后期就开始, 但因重组 GDH 活力较低, 没有方便的纯化方法, 且在该项目的研究中, 影响生化产品价格的因素首当其冲的是分离与纯化过程, 其费用通常占生产成本的 50%~70%, 有的甚至高达 90%。分离步骤多、耗时长, 往往成为制约生产的“瓶颈”。本研究构建 GDH 融合表达载体, 为酶的高效表达和快速纯化提供条件。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 JM109 和质粒 pET22b、枯草芽孢杆菌 WB600 菌株为本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒、胶回收试剂盒、DNA 限制酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量 Marker 均购自 TaKaRa 公司 (中国扬州代理), IPTG (异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)、NAD(P)⁺、葡萄糖、质粒提取试剂来自本实验室。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.3 主要培养基及溶液 LB 培养基 (1% 蛋白胨、0.5% 酵母膏、1% NaCl) 用于细菌培养; 发酵培养基 (1% 蛋白胨、3% 酵母膏、1% NaCl); 固体培养基 (1% 蛋白胨、0.5% 酵母膏、1% NaCl、1.5% 琼脂粉)。培养基苄青霉素终浓度 100 μg/mL。

1.1.4 主要设备 PCR 仪 (ABI 2700), 凝胶成像系统 (Gene Genius BIO IMAGING SYSTEM), 蛋白电泳仪 (Bio Rad), 低温冷冻离心机, 超声破碎仪, 酶活性半自动测定仪。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增和载体 pETGDH 构建 根据文献提供的枯草杆菌 (*B. subtilis*) 的 GDH 基因 (gi: 2632694) 的 DNA 序列设计并合成引物。上游引物: 5' GCATATGTATATGTATC-CGGATTTA 3'; 下游引物: 5' CCAAGCTTACCGCGCCT-GCCTGG 3'。上游引物设计了 Nde I 酶切位点, 下游引物设计了 Hind III 酶切位点。扩增条件: 预热 94 °C 2 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 58 °C 30 s, 复性 72 °C 1 min, 35 个循环; 延伸 72 °C 5 min。PCR 产物利用 Nde I / Hind III 双酶切后克隆到载体

^{*} 基金项目: 江苏大学第八批学生科研立项资助项目 (自然科学类) (08A031)。

pET22b, 转化至 JM109 感受态细胞, 经筛选确定阳性克隆、测序。

1.2.2 GDH 的诱导表达 挑取工程菌 pETGDH/JM109 菌落接种于涂有 Amp 的固体培养基中, 37 °C 震荡培养过夜。以 1:100 的比例转接到 50 mL LB 培养基中, 37 °C 培养至对数生长期, 加入 IPTG (终浓度为 0.5 mmol/L), 30 °C 振荡约 4 h, 取培养液离心 (10 000 r/min, 4 °C、5 min) 收集菌体, 用 pH 7.4、0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬, 在超声破碎仪上超声破碎 (120 W 条件下工作 5 s、暂停 5 s, 20 次)、离心 (5 000 r/min, 4 °C、10 min), 取上清液半自动化测酶活力。

1.2.3 GDH 活力测定方法 葡萄糖 + NAD(P)⁺ → 葡萄糖酸内酯 + NAD(P)H, NAD(P)H 在 340 nm 处有特异吸收峰。酶活力单位定义: 37 °C 条件下, 每分钟催化生成 1 μmol/L 的 NAD(P)H 的酶量定义为一个国际单位 (U)。酶活性 (U/L) = $\Delta A / \min \times 10^6 / \epsilon \times 1 / d \times V_t / V_s$ 。其中: $\Delta A / \min$ 表示每分钟吸光度的净变化值; V_t 表示反应液总体积; V_s 表示样品体积; d 表示比色池光径 (1 cm); ϵ 表示摩尔吸光度 (6.22 × 10⁶)。配制 100 mmol/L 的葡萄糖、10 mmol/L 的 NAD(P), 半自动化测酶活力。按酶活性动力学测定要求^[6], 将相关参数输入生化分析仪。检测时, 取酶液 10 μL、葡萄糖溶液 (终浓度为 100 mmol/L) 400 μL、NAD(P)⁺ 溶液 (终浓度为 2 mmol/L) 100 μL, 摇匀后立即吸入仪器, 延滞时间 15 s, 测定时间 60 s, 温度 37 °C, 波长 340 nm。

2 结 果

2.1 pET22b-GDH 构建及测序 以枯草芽孢杆菌 WB200 菌株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增目的基因, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 750 bp 的片段 (如图 1)。PCR 产物经回收纯化, 产物和载体 22 bp 分别利用 Nde I 和 Hind III 双酶切连接到载体 22 bp, 转化到大肠杆菌 JM109, 提取质粒酶切验证并测序。测序结果与报道的枯草杆菌来源的 GDH 序列相同。

注: 1 表示 DL2000; 2 表示 PCR 产物 1; 3 表示 PCR 产物 2。

图 1 PCR 产物

2.2 GDH 的诱导表达和酶活力测定 将 pETGDH/JM109 进行 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h^[7], 菌体破碎离心后取上清液测定粗酶的活力高达 375 U/mg。10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果如图 2。结果显示, 重组质粒转化菌与对照相比较, 在 31.5 × 10³ 处有一深染带蛋白表达明显增强, 该蛋白即为 GDH 基因表达产物。

注: 1 表示低分子质量蛋白质 Marker; 2, 5 表示空载体转化菌 pET22b (JM109) 表达蛋白; 3, 6 表示宿主菌 JM109 表达蛋白; 4, 7 表示重组菌 pETGDH (JM109) 表达蛋白。

图 2 GDH 粗提液 SDS-PAGE 结果

3 讨 论

GDH 是短链还原酶家族中的一个重要成员, 在芽孢杆菌属细菌生成芽孢的过程中产生, 并在芽孢的生成过程中起一定作用。GDH 在食品和医药方面有极好的应用前景, 目前国内完全依赖进口, 价格高。1962 年, Bach 和 Sadoff 首次研究了蜡状芽孢杆菌的 GDH, 但鉴于当时的条件没能深入研究。1991 年, Hilt 等构建了枯草芽孢杆菌 GDH 基因的表达载体 Pr17, 并转入大肠杆菌中, 使 GDH 得以表达。但重组酶活力低, 没有方便的纯化方法, 限制了 GDH 在工业上的应用。

本实验是以枯草芽孢杆菌基因组为模板, 通过 PCR 获得目的基因, 与载体 pET22b 连接构建 GDH 的融合表达载体。实验结果显示融合表达载体产酶量较高, 为后续最佳提纯方法的确定提供了条件, 可以大大节约生产成本。相信在不久的将来必将能满足社会生产的需求, 使该酶的实际应用范围得到更大的扩充。

参考文献

- [1] Bilen H, Kilicaslan A, Akcay G, et al. Performance of glucose dehydrogenase (GDH) based and glucose oxidase (GOX) based blood glucose meter systems at moderately high altitude[J]. J Med Engin Technol, 2007, 31(2): 152-156.
- [2] Zhang M, Mullens C, Gorski W. Coimmobilization of dehydrogenases and their cofactors in electrochemical biosensors[J]. Analyst Chem, 2007, 79(6): 2446-2450.
- [3] Wang J, Chatrathi MP, Ibanez A, et al. Glucose biochip: dual analyte response in connection to two precolumn-enzymatic reactions[J]. Analyst, 2001, 126(8): 1203-1206.
- [4] 唐江涛, 覃益民. 葡萄糖脱氢酶高产工程菌的构建及融合蛋白的一步纯化[J]. 工业微生物, 2008, 38(1): 41-44.
- [5] 姜旭淦, 周丽萍. 葡萄糖脱氢酶连续监测法的研究[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2004, 14(6): 536-538.
- [6] 周新, 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 40-46.
- [7] 徐军, 周丽萍. 葡萄糖脱氢酶基因的重组和表达研究[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(2): 81-82.