

王彪, 智倩, 薛永常. 壳聚糖酶基因片段的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 12-14.

壳聚糖酶基因片段的克隆及序列分析

王彪, 智倩, 薛永常

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

摘要:由 GenBank 上发布的壳聚糖酶基因编码区序列设计 PCR 扩增引物, 从笔者所在实验室已筛选的 1 株具有降解壳聚糖功能的芽孢杆菌中克隆得到壳聚糖酶基因片段, 将该片段与 pMD20-T 载体连接后转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 测序并与 NCBI 上已发布的芽孢杆菌属壳聚糖酶编码区序列进行比对分析。结果表明, 该片段与来自糖苷水解酶 46 家族中的 *Bacillus circulans* MH-K1 和 *Bacillus ehimensis* EAG1 的壳聚糖酶编码区序列同源性分别为 71.75% 和 75.93%; 与糖苷水解酶 8 家族中的 *Bacillus* sp. No. 7-M 的壳聚糖酶编码区序列同源性为 87.73%。初步推断该片段为类似壳聚糖酶基因片段。

关键词:壳聚糖酶基因; 克隆; 序列分析; 同源性

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0012-03

壳聚糖酶(chitosanase EC 3.2.1.99)可以催化壳聚糖中糖苷键的水解, 并生成壳寡糖^[1]。在日常生活中, 壳寡糖被广泛应用在医药^[2]、保健品^[3]、食品^[4]等方面。目前, 国内外已报道的壳聚糖酶产生菌主要包括细菌(*Bacillus*、*Myxobacter*、*Enterobacter*)^[5-7]、放线菌(*Streptomyces*、*Nocardioideis*)^[8-9]等。

根据国内外现有报道, PDB 数据库中公布了 3 种已测定三级结构的壳聚糖酶, 其中 2 种来自芽孢杆菌属, 分别为 *Bacillus* sp. K17 和 *Bacillus circulans* MH-K1。有关非专一性降解酶对壳聚糖的降解也曾引起过很多学者的兴趣, 如脂肪酶^[10]、纤维素酶^[11]和蛋白酶^[12]。本研究从大连周边海域的海泥中筛选出 1 株壳聚糖酶产生菌 W-2, 测定 16S rDNA 序列, 并进行了鉴定, 克隆基因组 DNA 中壳聚糖酶基因片段, 测序并进行序列分析, 为进一步研究该壳聚糖酶蛋白的表达和结构分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、克隆载体和酶 壳聚糖降解菌 W-2 由笔者所在实验室在大连周边海域海泥中筛选获得。菌株 *Escherichia coli* DH5 α 由笔者所在实验室保藏; 克隆载体 pMD20-T Vector、*Taq* DNA polymerase、*T₄* DNA Ligase、*EcoR* I、*Hind* III 购自宝生物工程大连有限公司。

1.1.2 主要培养基 活化培养基: 葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 0.2 g/L、酵母膏 0.1 g/L、海水 600 g/L, 121 °C 灭菌 20 min; LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母膏 5 g/L、NaCl 10 g/L, pH 值 7.0, 121 °C 灭菌 25 min。

1.2 试剂与仪器

Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自杭州博日科技

有限公司; 超薄琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒小提试剂盒, 购自天根生化科技北京有限公司; TP600PCR 仪, 日本 TaKaRa 公司生产; ES-315 高压蒸汽灭菌锅, 日本 TOMY 公司生产; Himac CR-21G 高速冰冻离心机, 日本日立公司生产; NUAIRE 6382E-85 °C 超低温冰柜, 日本日立公司生产; 凝胶成像系统, 美国 UVP 公司生产。

1.3 16S rDNA 的扩增和测定

利用在 TaKaRa 公司合成的细菌 16S rDNA 扩增通用引物 27F 和 1492R, 以 W-2 菌株基因组 DNA 为模板, 用 PCR 仪进行扩增。将扩增产物送至宝生物工程大连有限公司测序后用 NCBI 在线进行 Blast 比对, 用 ClustalX2.0 和 MEGA5.0 构建系统发育树。

1.4 目的基因片段的克隆

1.4.1 引物的设计 根据 NCBI 核酸数据库中已发布的芽孢杆菌属壳聚糖酶(D10624、AB008788、AB051574、AB051575、EU924147、JQ425408)编码区保守序列设计引物 P₁: 5'-TTGGCATTA CTTTGCTGTTT-3'; P₂: 5'-TTGGCATTA CTTTGCTGTTT-3'。

1.4.2 目的基因片段扩增与回收 以菌株 W-2 基因组 DNA 为模板进行扩增。选定温度为 40~60 °C 进行退火温度初步优化, 最终确立扩增体系: 10 × *Taq* reaction buffer 2 μL, dNTP(2.5 mmol/L)、P₁(10 μmol/L) 和 P₂(10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板(30~60 ng/μL) 1 μL, *Taq* DNA polymerase (5.0 U/μL) 0.2 μL, 补充 ddH₂O 使反应体系总体积为 20 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min, 扩增反应 30 个循环(94 °C 变性 30 s, 46.4 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s), 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因片段用超薄琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收。

1.5 重组质粒的构建

将回收的基因片段与克隆载体 pMD20-T 进行连接, 构建重组质粒, 转化至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中, 经蓝白斑筛选后挑选阳性克隆子进行菌落 PCR 鉴定。提取质粒并进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切以及 *EcoR* I 单酶切检验。将重组质粒送至宝生物工程大连有限公司进行测序, 并使用

收稿日期: 2013-01-10

作者简介: 王彪(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为基因工程。

E-mail: polony2008@163.com。

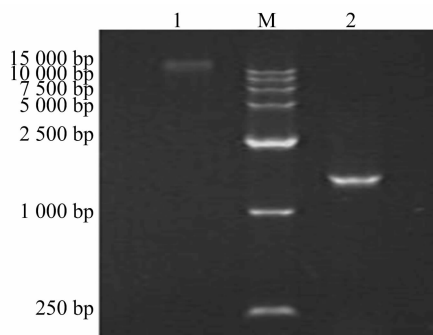
通信作者: 薛永常, 博士, 教授, 研究方向为分子生物学。E-mail: xueych@dlpu.edu.cn。

相关软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖降解菌 W-2 的鉴定

经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,提取的菌株 W-2 基因组 DNA 和以该 DNA 为模板,利用 16S rDNA 扩增通用引物 27F、1492R 扩增的片段均条带单一且清晰(图 1)。扩增产物经测序,并在 NCBI 网站上用 Blast 程序进行序列同源性比对之后,确定目的菌株为芽孢杆菌属。用 MEGA5.0 构建系统进化树(图 2),确定目的菌株 W-2 为芽孢杆菌属,与苏云金杆菌亲缘关系较近。



M—DL15000 marker;1—W-2基因组DNA;2—16S rDNA扩增片段

图1 W-2菌株基因组DNA和16S rDNA扩增电泳

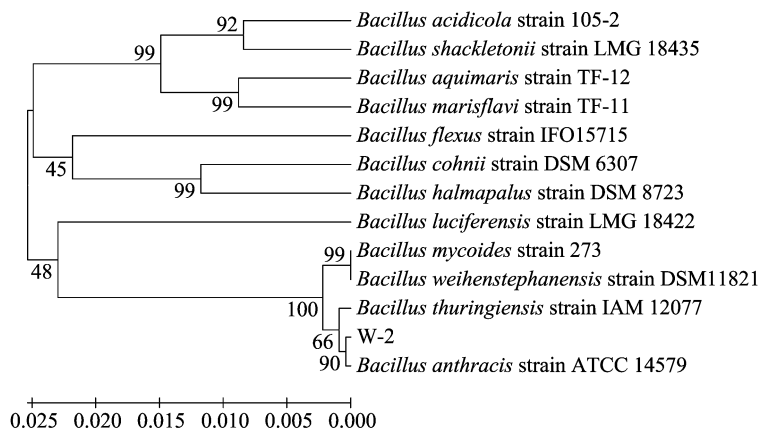
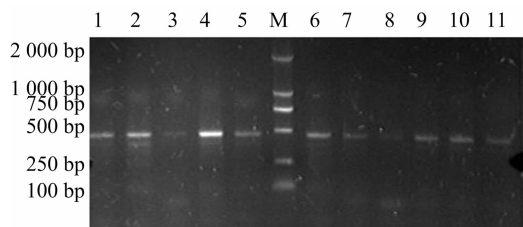


图2 W-2菌株的系统发育树

2.2 目的基因片段的 PCR 扩增

以 W-2 菌株基因组 DNA 为模板,加入引物 P_1 、 P_2 进行退火温度优化。选择其中 11 个温度经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,大多在 500 bp 处有单一较亮的条带,与预期目的片段大小一致;第 4 泳道扩增产物条带较亮且稳定,因此,将退火温度选定为 46.4 °C(图 3)。



M—DL2000 marker;1~11—退火温度由左到右依次为40、41、42、44、46.4、48.8、51.2、53.6、56、58、59 °C

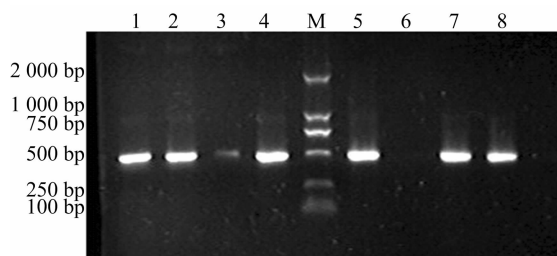
图3 退火温度优化电泳

2.3 重组质粒的构建和筛选

将回收的 DNA 片段与 pMD20-T 载体进行连接,并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,经蓝白斑筛选,挑取部分白斑处菌落进行菌落 PCR 鉴定。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 4),看出所有泳道均出现与目的条带大小一致的单一一条带,且无拖尾现象。其中第 1、2、4、5、7、8 泳道亮度较强,初步验证了所取白色菌落为阳性克隆株。

2.4 阳性重组质粒的鉴定

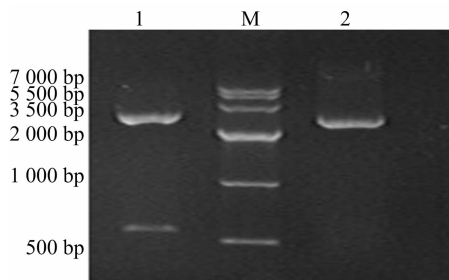
将 2 号菌株 B-2 接种于液体 LB 培养基中,过夜振荡培



M—DL2000 marker;1~8—菌落PCR扩增结果

图4 菌落PCR电泳图谱

养 10 h,摇床转速 150 r/min。用质粒小提试剂盒对上述 B-4 菌的新鲜培养液进行质粒抽提,并将该重组质粒进行 *EcoR* I/*Hind* III 的双酶切(图 5),经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到了 500 bp 左右的片段,与克隆目的片段大小相近,进一步证明了目的片段插入了 pMD20-T 载体中。



M—DNA markerIV;1—*EcoR* I/*Hind* III 的双酶切产物;2—重组质粒

图5 重组质粒酶切电泳

2.5 氨基酸序列测定及分析

将单菌落 B-2 的过夜新鲜 LB 培养液用质粒小提试剂盒抽提,提取产物送至宝生物工程大连有限公司进行氨基酸序列测定,得到 479 bp 的正向插入序列。

将目的片段序列与核酸数据库中已发布的 11 个芽孢杆菌属壳聚糖酶编码区全序列进行比对,构建 NJ 进化树(图 6),发现目的片段 B-2f 与来自糖苷水解酶 46 家族中的 *Bacillus circulans* MH-K1 和 *Bacillus ehimensis* EAG1 的壳聚糖酶编码区序列同源性分别为 71.75% 和 75.93%;与糖苷水解酶 8 家族中的 *Bacillus* sp. No. 7-M 的壳聚糖酶编码区序列同源性为 87.73%。初步推断目的片段与糖苷水解酶第 8 族中的芽孢杆菌属壳聚糖酶最为相近。

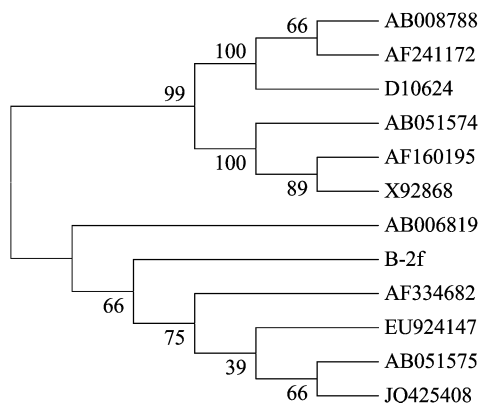


图6 目的片段序列与芽孢杆菌属其他壳聚糖酶基因的 NJ 进化树分析

利用 Primer Premier 5.0 将已测序的目的基因片段翻译成氨基酸序列为:MNGKNNIFTCFEDIPFTR YLKNHSSLPGA YYNKGEITGDMGFKPLGVSCFLLMVLRINTNTVNVPIHF LCWRNCIWATCLNCYFTHIFHIWERFIHFSSLPGGYYVKGEI TCTSAVINRRNFYTFFFKLNTNFIMYDGMFKTA。该序列含 148 个氨基酸,并且在上述拟表达序列中发现与 *Bacillus* sp. No. 7-M 基因中编码壳聚糖酶的氨基酸序列部分片段有较大的相似性(图 7)。进一步推断目的片段与糖苷水解酶第 8 族中的芽孢杆菌属壳聚糖酶相近。

RYLKNDLSSLPGGYYVKGEITGDADGFKPLGT
RYLKNDHSSLPGGYYNKGEITGDMGFKPLGV

图7 目的片段的氨基酸序列与 *Bacillus* sp.No.7-M 中编码壳聚糖酶的氨基酸序列片段比对

3 讨论

由于细菌自身的特殊性,使得来自芽孢杆菌属中不同菌株的壳聚糖酶编码区序列同源性可能相对较低。如来自糖苷水解酶第 8 族的 *Bacillus* sp. No. 7-M (AB051575) 和糖苷水

解酶 46 族的 *Bacillus circulans* MH-K1 (D10624),两者编码区序列一致性为 48.52%;同样来自糖苷水解酶 46 家族中的 *Bacillus circulans* MH-K1 (D10624) 和 *Bacillus amyloliquefaciens* (AB051574),两者编码区序列一致性也只有 56.54%。初步推断本试验从目的菌株中克隆得到的基因片段为壳聚糖酶基因片段。

参考文献:

- [1] Kakiyama K, Fujita T, Kuroshima K, et al. Purification and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus ehimensis* EAG1 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(3): 383-385.
- [2] Jeon Y J, Park P J, Kim S K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor [J]. Carbohydrate Polymer, 2001, 44(1): 71-76.
- [3] Suzuki S. Immunopotentiating function of N-acetylchitooligosaccharides and chitooligosaccharides [J]. Nihon Nogeikagaku Kaishi, 1988, 62(8): 1241-1242.
- [4] Chen X E, Xia W S, Yu X B. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. [J]. Food Research International, 2005, 38(3): 315-322.
- [5] Yeon J C, Kim E J, Piao Z, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4522-4531.
- [6] Shimono K, Shigeru K, Tsuchiya A, et al. Two glutamic acids in chitosanase A from *Matsubacter chitosanotabidus* 3001 are the catalytically important residues [J]. Biochemical Journal, 2002, 131(1): 87-96.
- [7] Yamasaki Y, Hayashi I, Ohta Y, et al. Purification and mode of action of chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1 [J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1993, 57: 444-449.
- [8] Masson J Y, Denis F, Brzezinski R. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases [J]. Gene, 1994, 140(1): 103-107.
- [9] Sakai K, Katsumi R, Isobe A, et al. Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *Nocardia orientalis* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1991, 1097: 65-72.
- [10] Muzzarelli R A A. Depolymerization of methyl pyrrolidinone chitosan by lysozyme [J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 19: 29-34.
- [11] Einosuki M, Fumiko Y, Hiroyuki K. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8 [J]. Carbohydrate Research, 1993, 239: 227-237.
- [12] Yalpani M, Pantaleone D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis [J]. Carbohydrate Research, 1994, 256: 159-175.