

· 论 著 ·

嗜酸乳杆菌 β -半乳糖苷酶基因表达载体的构建与蛋白特性分析

邓红艳, 贺松, 赫兰辉

(成都大学附属医院检验科, 四川 610081)

摘要:目的 构建嗜酸乳杆菌 β -半乳糖苷酶基因表达载体并分析其表达蛋白的特性和结构。方法 从嗜酸乳杆菌 ATCC4356 中克隆 lacZ 基因并构建表达载体 pMG36e-lacZ, 并对构建后的表达载体进行鉴定和表达蛋白进行二维与三维结构分析。结果 成功构建了嗜酸乳杆菌 ATCC4356-lacZ 基因表达载体并分析出了表达的 β -半乳糖苷酶二维和三维结构图。结论 表达载体的构建和蛋白特性与结构分析结果为后续蛋白表达和酶生物学特性研究奠定了基础。

关键词: β -半乳糖苷酶类; 嗜酸乳杆菌; lacZ 基因; 蛋白特性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)19-2192-02

Construction of β -galactosidase gene expression vector and analysis of protein characteristics

Deng Hongyan, He Song, He Lanhui

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Chengdu University, Sichuan 610081, China)

Abstract: Objective To construct the β -galactosidase gene expression vector and study its protein characteristics and structure from *Lactobacillus acidophilus*. **Methods** The lacZ gene was cloned from *L. acidophilus* ATCC4356 and was inserted into recombinant vector pMG36e-lacZ, then the recombinant vector was identified and the expressed β -galactosidase was analyzed for 2D and 3D structure. **Results** Restriction enzyme digestion, PCR identification and DNA sequencing analysis confirmed that the construction of pMG36e-lacZ was successful, and the 2D and 3D structure of β -galactosidase from *L. acidophilus* ATCC4356 were got. **Conclusion** This research could provide a foundation for the subsequent research of protein expression and biological characteristics of β -galactosidase from *L. acidophilus* ATCC4356.

Key words: beta-galactosidase; *Lactobacillus acidophilus*; lacZ gene; protein characteristics

β -半乳糖苷酶又称乳糖酶,能水解乳糖生成半乳糖和葡萄糖,还能催化半乳糖苷发生转移,产生半乳糖低聚糖。因为其能水解乳糖而广泛应用于乳品工业以及用于治疗乳糖不耐受病症^[1];又因为其便捷的显色反应而普遍应用于分子生物学研究领域^[2]。因此致力于 β -半乳糖苷酶的研究可以促进分子生物学、医药以及乳品工业的发展。随着嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)NCFM 菌株基因组 DNA 测序的完成(GenBank No:CP000033)^[3]。该菌的 β -半乳糖苷酶编码基因簇及其表达也逐渐得到研究,其中就包括 lacZ 基因^[4]。随后的研究发现嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus* ATCC4356)基因组也存在 β -半乳糖苷酶基因簇,其中 lacLM 和 lacZ 都分别做了克隆表达^[5-6]。然而目前并没有 lacZ 基因表达蛋白的特性分析和结构模拟分析的文献报道。本实验以嗜酸乳杆菌 ATCC4356 基因组 DNA 为模版扩增 lacZ 基因,并对该基因表达的蛋白进行蛋白特性分析和蛋白结构模拟分析,旨在为后续蛋白表达和酶生物学特性研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 菌株和质粒 嗜酸乳杆菌 ATCC4356 购自中国科学院微生物所菌种保藏中心;质粒 pMG36e 由荷兰 Groningen 大学 J. Kok 博士惠赠;大肠杆菌(*E. coli* DH5 α)由重庆医科大学病原生物学教研室张德纯教授惠赠。

1.2 主要试剂 DNA 回收试剂盒购自 Omega 公司;基因组提取试剂盒,质粒抽提试剂盒,限制性核酸内切酶 Xba I 和 Pst I 均为 Promega 公司产品;PCR 及连接相关试剂均购自 Takara 公司;X-gal 为 Sigma 公司产品;LB 培养基购自 Oxoid 公司;MRS 培养基由本实验室配制而成。

1.3 方法

1.3.1 目的片段的获取 根据 Genbank 中已报道的嗜酸乳杆菌 ATCC4356-lacZ 基因的 DNA 序列(No. EU590652),利用 Primer Premier 5.0 设计以下引物: lacZ-P1: 5'-GCT CTA GAT AGA GGA AAT AAA ATG ACA CAA TTA TCA CG-3'; lacZ-P2: 5'-AAA ACT GCA GCT AAT TTC TCA ATA CTT GAA CAT CC-3'(下划线部分分别为 Xba I 和 Pst I 限制性核酸内切酶)^[2],PCR 引物由 Invitrogen 公司合成,扩增片段预期大小 2 020 bp。使用基因组提取试剂盒提取嗜酸乳杆菌 ATCC4356-DNA 为模版 DNA。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 130 s,共 25 个循环,再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

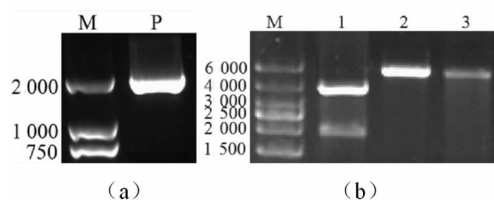
1.3.2 重组质粒 pMG36e/lacZ 的构建与鉴定 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析并纯化,纯化产物与载体 pMG36e 用 Xba I 和 Pst I 双酶切,回收后连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含红霉素(200 μ g/mL)的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后挑取蓝色菌落提取质粒进行 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定,测序由 Invitrogen 公司进行,阳性重组质粒命名为 pMG36e-lacZ,重组菌株命名为 DH5 α -lacZ。

1.3.3 嗜酸乳杆菌 β -半乳糖苷酶的特性与结构模拟分析 使用 DNA star Protean 软件对测序基因表达蛋白分析其疏水性并分析蛋白二级结构,再利用 ESyPred3D 软件进行三维结构模拟分析,分析结果用 PyMOL 软件显示及处理^[7]。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 首先对重组质粒 pMG36e-lacZ 进行 PCR 鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳显示在约 2 000 bp 处有一明显

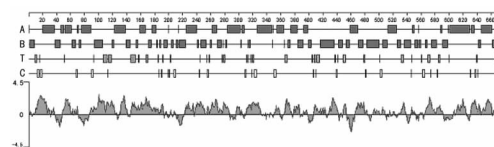
条带(图 1a)。再对重组质粒分别进行 Xba I、Pst I 单酶切和双酶切鉴定(图 1b), 鉴定结果与预期目标一致。测序结果表明, pMG36e-lacZ 中的 lacZ 基因序列与 GenBank 中公布的序列符合率达 97%。由此可见, 重组质粒构建成功。



a 为 PCR 鉴定; b 为酶切鉴定 (M: DNA-Marker; P: PCR 扩增鉴定; 1: Xba I 与 Pst I 双酶切鉴定; 2, 3: Xba I 与 Pst I 分别单酶切鉴定)。

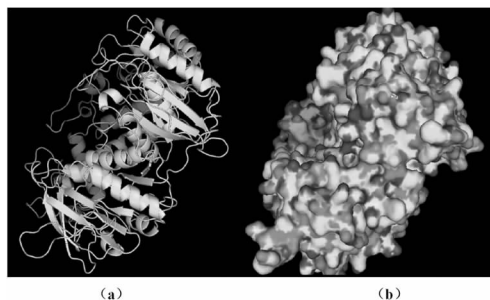
图 1 重组质粒 pMG36e-lacZ 鉴定

2.2 蛋白特性与结构模拟分析 lacZ 基因表达蛋白的疏水特性分析预测表明, 氨基酸分值最大值为 2.7, 最小值为 -1.75; 仅在 40、70、210 和 450 处有 4 个较强的疏水区, 其余部位具有多个较强的亲水区(图 2)。β-半乳糖苷酶蛋白二级结构分析结果表明, β-半乳糖苷酶蛋白 α-螺旋有 28 个区段, β-折叠区域有 44 个区段, β-转角也有 38 个区段, 无规则转曲共 28 个片段(图 2)。蛋白三维结构内部结构图和表面结构图见图 3。



注: A 为 α-螺旋区段; B 为 β-折叠区段; T 为 β-转角区段; C 为无规则转曲; O 为疏水特性。

图 2 β-半乳糖苷酶蛋白二级结构及疏水特性分析



注: a 为内部三维结构; b 为表面三维结构。

图 3 β-半乳糖苷酶蛋白三维结构分析

3 讨论

β-半乳糖苷酶是一种糖苷水解酶, 能水解半乳糖苷类化合物中的 β-1,4-D-半乳糖苷键, 还能转移半乳糖苷生成低聚半乳糖, 在生物利用碳水化合物营养中起着重要的作用, 一直是科学研究热点之一, 目前已经在乳品工业、农业、保健品工业和分子生物学领域得到了广泛而深入的研究和应用。如在乳制品

工业中水解牛奶中的乳糖生产低乳糖牛奶和回收利用乳清中的乳糖; 在保健食品业中生产益生元低聚半乳糖和乳清糖浆等促进人体健康; 在医疗行业中制备肠溶片, 治疗乳糖不耐受等^[8]; 在分子生物学领域还被作为克隆报告基因、转染报告基因、研究启动子效能和研究表达调控等。

在本实验过程中, 构建后的重组菌株 DH5α-lacZ 在筛选平板上长出蓝色菌落, 初步表明 β-半乳糖苷酶表达载体构建成功, 这是借鉴蓝白筛选转化子的思路来筛选克隆菌株, 通过后续 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序鉴定都证明表达载体构建成功和此方法能成功筛选出阳性克隆菌株。通过对表达蛋白疏水特性分析结果提示, 嗜酸乳杆菌 ATCC4356-lacZ 基因表达的 β-半乳糖苷酶蛋白有多个较强的亲水区, 表明其水溶性很好。蛋白二级结构和三级结构分析提示其含有较多的 α-螺旋, 蛋白质中肽键上的酰胺氢和羰基氧既能形成内部 α-螺旋内的氢键, 也能与水分子形成氢键, 与蛋白质的疏水特性分析结果相一致。尽管目前关于 β-半乳糖苷酶基因的研究非常深入, 但其蛋白特性和酶学特性以及进一步的应用还有待于更深入的研究, 本实验的结果也为后续蛋白表达和酶生物学特性研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Chen W, Chen H, Xia Y, et al. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*[J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91(5): 1751-1758.
- [2] 贺松, 龚芳红, 张德纯, 等. 嗜酸乳杆菌 β-半乳糖苷酶基因的克隆及其作为食品级筛选标记的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(5): 777-782.
- [3] Altermann E, Russell WM, Azcarate MA, et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(11): 3906-3912.
- [4] Nguyen TH, Splechtna B, Yamabhai M, et al. Cloning and expression of the beta-galactosidase genes from *Lactobacillus reuteri* in *Escherichia coli*[J]. *J Biotechnol*, 2007, 129(4): 581-591.
- [5] 潘渠, 李晋川, 丛延广, 等. 嗜酸乳杆菌 ATCC4356 菌株同源二聚体 β-半乳糖苷酶的克隆表达[J]. *微生物学报*, 2008, 48(10): 1339-1343.
- [6] 潘渠, 胡福泉, 陈恬, 等. 嗜酸乳杆菌推定的 β-半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的功能性表达[J]. *成都医学院学报*, 2009, 4(2): 86-90.
- [7] Lambert C, Leonard N, De Bolle X, et al. ESpred3D: Prediction of proteins 3D structures[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(9): 1250-1256.
- [8] Montalto M, Curigliano V, Santoro L, et al. Management and treatment of lactose malabsorption[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 187-191.

(收稿日期: 2011-06-23)

