

# 耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质研究

龚月生<sup>1</sup>, 刘锦妮<sup>1,2</sup>, 王晶<sup>1,2</sup>, 杨明明<sup>1,2</sup>, 袁新宇<sup>3</sup>

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 武汉阳光广济医药开发有限公司, 湖北 武汉 430071;

3 湖北工业大学 生物工程学院, 湖北 武汉 430068)

**【摘要】**【目的】研究耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达, 并检测其酶学性质, 为耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的应用和工业化生产奠定基础。【方法】利用基因工程的原理和方法, 将来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)克隆到大肠杆菌 pET 表达系统(pET-28a(+)), 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达。将构建的重组菌(pET28a-*bgaB*)在含硫酸卡那霉素的液体 LB 培养基中以 IPTG 为诱导剂, 对表达产物的最适反应温度、最适反应时间、IPTG 诱导浓度、热稳定性及酶促动力学进行检测。【结果】成功构建了表达载体 pET28a-*bgaB*, 并测得耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适反应温度为 65 °C, 最适反应时间为 6 h, IPTG 的最佳诱导浓度为 1 mmol/L, 且具有良好的热稳定性; 在诱导后 6 h, 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达量占菌体总可溶性蛋白的 20%, 表达效率较高; 对透析蛋白进行蛋白质定量, 蛋白质浓度为 0.75 mg/mL, 透析蛋白的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性为 75 U/mL, 比活性为 100 U/mg; 酶促动力学研究表明, 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的反应常数为 0.398  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , 最大反应速度为 27.435  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。【结论】耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中得到成功表达, 并且在很大程度上提高了耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性。

**【关键词】**  $\beta$ -半乳糖苷酶基因; 大肠杆菌; 酶学性质

**【中图分类号】** Q786

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2008)10-0059-08

## Studies on expression and enzymatic properties of thermostable $\beta$ -galactosidase gene in *Escherichia coli*

GONG Yue-sheng<sup>1</sup>, LIU Jin-ni<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1,2</sup>, YANG Ming-ming<sup>1,2</sup>, YUAN Xin-yu<sup>3</sup>

(1 Department of Animal Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Yangguang-Guangji Medical R&D Co Lt, Wuhan, Hubei 430071, China; 3 Department of Biology Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China)

**Abstract:**【Objective】For further industrial production,  $\beta$ -galactosidas was expressed in *Escherichia coli* and its enzymatic properties were detected.【Method】The  $\beta$ -galactosidas gene(*bgaB*) was amplified from the genome of *Bacillus stearothermophilis* through polymerase chain reaction(PCR) and then cloned into *Escherichia coli* expression vector pET-28a(+). Constructed recombinant bacteria(pET28a-*bgaB*) was cultured in kanamycin sulfate liquid medium by IPTG inducer. The optimum reaction temperature, reaction time, IPTG inducer concentration, temperature thermostable experiment and enzyme kinetics were studied in our research.【Result】The optimum reaction conditions of  $\beta$ -galactosidas such as temperate, reaction time and IPTG inducer concentration were 65 °C, 6 h and 1 mmol/L respectively, inaintained good thermal stability. After been induced for 6 hours, the expression of  $\beta$ -galactosidase accounted for 20% of the cell total soluble protein and achieved a high efficiency. Dialysis protein was qualified and the concentration of

\* [收稿日期] 2007-10-12

[基金项目] 国家重点新产品计划项目(2003ED760039)

[作者简介] 龚月生(1960—),男,湖北武穴人,教授,主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: gongyuesheng@sohu.com

protein was 0.75 mg/mL, dialysis protein  $\beta$ -galactosidase enzyme activity 75 U/mL, specific activity 100 U/mg, Enzyme kinetics demonstrated the response constant 0.398  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ , the maximum reaction velocity 27.435  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ . 【Conclusion】  $\beta$ -galactosidas gene was successfully expressed in *Escherichia coli* and the activity of  $\beta$ -galactosidas was improved to a large extent.

**Key words:**  $\beta$ -galactosidas gene; *Escherichia coli*; property

$\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidas),学名为 $\beta$ -半乳糖苷半乳糖水解酶( $\beta$ -D-galactoside galactohydro-lase, EC. 3.2.1.23),俗称乳糖酶,它可以水解乳制品中的乳糖,降低乳糖的含量,提高乳制品的可消化性,同时对治疗乳糖不耐症、转移半乳糖苷具有重要作用<sup>[1-6]</sup>。

$\beta$ -半乳糖苷酶的天然来源十分丰富,包括多种植物、动物和微生物<sup>[7-9]</sup>。 $\beta$ -半乳糖苷酶存在于扁桃、杏等植物及幼小哺乳动物的小肠中,细菌、霉菌和酵母等微生物经发酵亦可产生 $\beta$ -半乳糖苷酶。由于微生物的快速生长和高效代谢等生物学特性,使微生物 $\beta$ -半乳糖苷酶成为工业化酶制剂的主要来源。国外对 $\beta$ -半乳糖苷酶的研究较早,多数研究工作主要集中在食品加工、畜牧业、制药工业及分子生物学等方面<sup>[10-12]</sup>。

$\beta$ -半乳糖苷酶作用的最适温度、pH值和相对分子质量等理化性质随乳糖酶来源的不同而有很大差异,其中之一就是热稳定性不同。目前,商品化的乳糖酶来自酵母菌,它是一种常温水解酶,热稳定性较差,而来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶具有良好的热稳定性,研究表明,其最适作用温度为55 $^{\circ}\text{C}$ ,70 $^{\circ}\text{C}$ 处理30 min酶活性保留80%<sup>[13-16]</sup>。但是工业化生产耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶面临2个难题:一是酶活力太低,二是嗜热脂肪芽孢杆菌最适生长温度为55 $^{\circ}\text{C}$ ,培养比较困难。为解决这一问题,本研究采用基因工程的方法构建重组菌株,并把耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)克隆到常温菌株中,以提高耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶活性、降低培养难度,以期耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶的应用和工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种与质粒 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)及表达载体 pET-28a(+),均由武汉阳光广济医药开发有限公司保存;质粒 pDL 由俄亥俄州立大学杆菌保藏中心(BGSC)惠赠;大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3)和表达载体 pET-28a(+))均购自 Novage 公

司;克隆载体 pGEM-T Vector system 购自 Promega 公司。

1.1.2 生化试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、基因组 DNA 提取试剂盒及 PCR 用试剂均购自 Promega 公司;蛋白分子量标准 perfection protein<sup>TM</sup>、蛋白质定量测定试剂盒(BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒)均购自 Novagen 公司;DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自 OMEGA 公司;邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷(ONPG, cat # N1127)、邻硝基苯酚(ONP, cat # 35966)和抗生素均购自 Sigma 公司。

1.1.3 PCR 引物 根据 GenBank 中 *bgaB* 基因的序列(GenBank 登陆号:1023317)设计上、下游引物:

上游引物:5'-GGGAATTCATGAATGTGT-TATCCTC-3',

下划线碱基为内切酶 *EcoR* I 识别位点;

下游引物:5'-ATA GCGGCCGCAACGAGACT-TCTCTA-3',

下划线碱基为内切酶 *Not* I 识别序列。

### 1.2 *bgaB* 基因编码片段的 PCR 扩增

PCR 反应体系:10 $\times$ La *Taq* DNA 聚合酶 buffer(2 U/ $\mu\text{L}$ )2.5  $\mu\text{L}$ ,上游引物(10 pmol/L)2.0  $\mu\text{L}$ , dNTPs(2 mmol/L)2.0  $\mu\text{L}$ ,下游引物(10 pmol/L)2.0  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板(100 ng/ $\mu\text{L}$ )2.0  $\mu\text{L}$ ,MgCl<sub>2</sub>(25 nmol/L)2.0  $\mu\text{L}$ ,La *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu\text{L}$ ,总体积 25  $\mu\text{L}$ 。

PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 30 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 1.3 *bgaB* 基因原核表达载体的构建

回收耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)编码区片段,在扩增片段的5'端引入限制性内切酶识别位点 *EcoR* I,3'端引入限制性内切酶 *Not* I 的识别序列。将该扩增片段克隆到 pBluskm 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 位点间,得到中间载体 pBluskm-*bgaB*,电转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$ (DE3)感受态细胞中,提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行酶切鉴定,再用 *EcoR* I 和 *Sac* I 消化中间载体 pBluskm-*bgaB*,回收 2 kb 的

*bgaB* 基因片段。将回收产物克隆到 pET-28a(+) 表达载体, 构建了 *bgaB* 融合质粒 pET28a-*bgaB* (pGJ347), 电转化到 *E. coil* BL21(DE3) 感受态细胞

中, 将重组菌命名为 GJ347, 重新提取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Sac* I 进行酶切鉴定和测序鉴定, 由 Stratagaty 公司合成(图 1)。

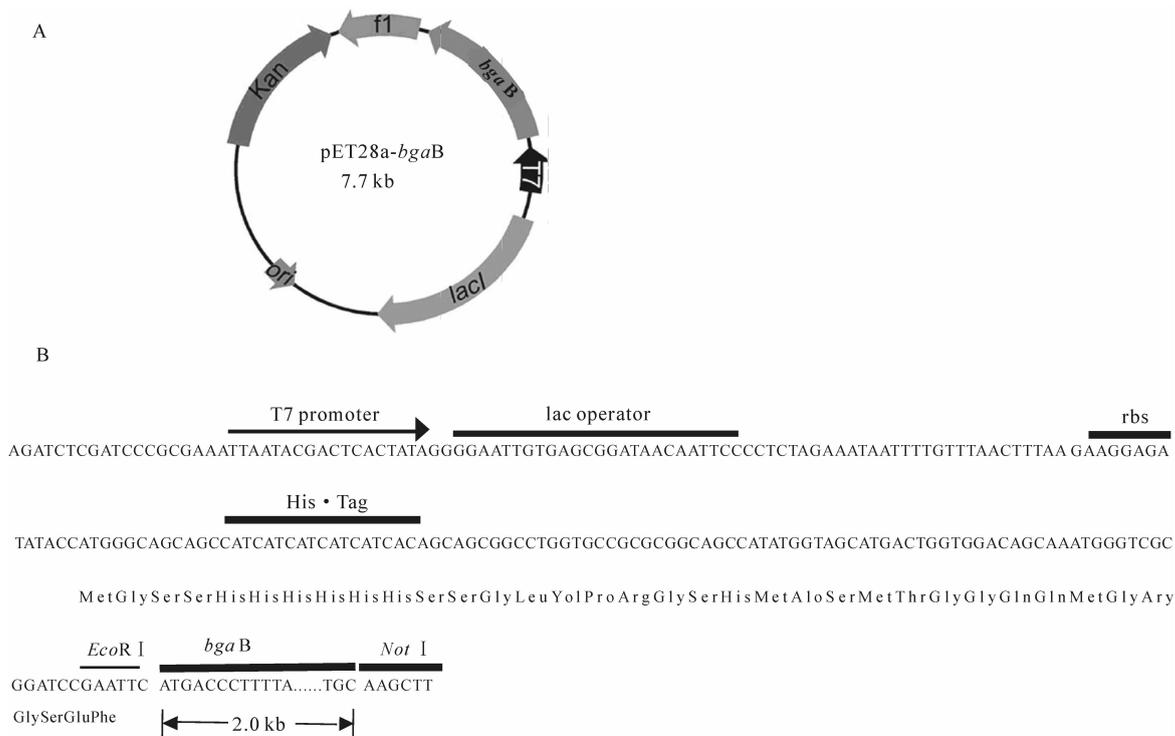


图 1 pET28a-*bgaB* 质粒图谱(A)和基因表达盒的序列示意图(B)

Fig. 1 The map for pET28a-*bgaB*(A) and *bgaB* expression region(B)

#### 1.4 IPTG 浓度对诱导表达的影响

挑取含 pET28a-*bgaB*(BL21(DE3)) 的重组菌 GJ347 单菌落, 接种到含硫酸卡那霉素(终质量浓度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的液体 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养后。按体积比 1 : 50 将培养物接种到含硫酸卡那霉素的 30 mL 液体 LB 培养基中(250 mL 三角瓶), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、225 r/min 恒温摇床培养至  $\text{OD}_{595}$  为 0.8 时, 在无菌状态下分别加入 0.5, 1, 3 和 5 mmol/L 终浓度的 IPTG 进行诱导, 分别在 1, 2, 4, 6, 8 h 取样, 收集菌体和上清液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 测定耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。

#### 1.5 耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶的 SDS-PAGE 及分离纯化

收集重组菌 GJ347 诱导表达 2, 4, 6, 8 h 后的菌液, 离心 30 min(4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min), 弃上清液, 用磷酸缓冲液悬浮洗涤 2 次, 离心 10 min(4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min), 收集上清液, -70  $^{\circ}\text{C}$  冻融 2 次, 在冰上超声破碎, 离心 20 min(4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min), 收集上清液, 按 1 : 1 与上样缓冲液混合, 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮兰染色 20

min 后脱色 18 h, 观察蛋白表达量。

耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的纯化采用  $\text{Ni}^{2+}$  树脂亲和层析法<sup>[17-19]</sup>。将  $\text{Ni}^{2+}$  树脂填充于 1 mL 注射器中, 注射器下端用脱脂棉封口,  $\text{Ni}^{2+}$  树脂两端填充石英沙; 装填好的  $\text{Ni}^{2+}$  树脂亲和层析柱用 10 倍柱体积的去离子水洗涤, 然后用 5 倍柱体积的平衡液平衡; 将处理好的待纯化蛋白上柱, 流速为 5 倍柱体积/h; 然后用平衡液洗涤, 流速 5 倍柱体积/h, 用蛋白核酸紫外检测仪即时检测, 并收集洗脱液, SDS-PAGE 检测。

#### 1.6 耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶性质的测定

1.6.1 酶活性的测定 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性定义: 55  $^{\circ}\text{C}$  每分钟催化 ONPG 生成 1  $\mu\text{mol}$  ONP 的酶量, 为一个酶活单位(U)。参考文献[20-22]的方法并略作改进: 分别配制 30, 50, 75, 100, 150, 200 和 250  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 ONP 标准液。取 2 mL 待测菌液离心 1 min(4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min), 沉淀重悬于 2 mL 的 Z Buffer (60 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 mmol/L β-巯基乙醇, pH 7.0)。将悬液适当稀释(10 或 100 倍), 取 200 μL 稀释液, 加入 1.4 mL Z Buffer、10% Triton X-100 和 10 mg/mL 溶菌酶各 20 μL, 混匀, 37 °C 温育 30 min, 加入 4 mg/mL 的 ONPG 200 μL; 55 °C 反应 15 min, 加入 1 mL 1 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应; 反应液离心 3 min(4 °C、10 000 r/min), 取上清液, 在 420 nm 测定吸光值 OD<sub>420</sub>, 得到 ONP 浓度 C(μmol/L), 按下式计算待测菌液的酶活性(U/mL) = C × 10<sup>-4</sup> × 稀释倍数 × 15/反应时间。

1.6.2 最适反应温度的测定 将纯化的蛋白液稀释 100 倍, 在 5 个刻度管中依次加入 200 μL 稀释液, 1.4 mL Z Buffer、20 μL Triton X-100、400 μL ONPG(4 mg/mL), 分别在 55, 65, 75, 85 和 95 °C 测定酶活性。

1.6.3 最适反应时间的测定 采用 0.4 和 1 mmol/L 的 IPTG 2 个诱导梯度对耐热 β-半乳糖苷酶进行诱导, 分别在加入 IPTG 后 2, 4, 6, 8 h 取样, 测定酶活性。

1.6.4 热稳定性的测定 将纯化的蛋白液分别在 65, 75, 85, 95 和 105 °C 孵育 60 min, 测定酶活性。

1.6.5 酶促动力学的测定 将耐热 β-半乳糖苷酶的浓度分别稀释成 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% 和 0.5%, 按照酶活测定的方法, 将质量浓度分别为 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL 的 ONPG 底物同粗酶液以 9:1 的比例混合, 50 °C 水浴 5 min 后, DNS 终止反应, 煮沸, 定容至 10 mL, 测定酶活性。

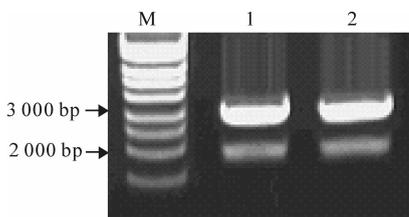


图 3 pBluskm-*bgaB* 的酶切鉴定结果

M. DNA Marker SM0393; 1, 2. 质粒 pBluskm-*bgaB*

Fig. 3 Enzyme digest plasmid of pBluskm-*bgaB*

M. DNA Marker SM0393; 1, 2. Plasmid pBluskm-*bgaB*

## 2.3 IPTG 浓度对诱导表达的影响

IPTG 的诱导结果(图 5)表明, 在诱导的起始阶段, 高浓度 IPTG 的诱导效果较低浓度好, 但随着诱导时间的增加, 低浓度 IPTG 逐渐显示出优势, 其中以 1 mmol/L 终浓度的 IPTG 效果最好, 诱导 6 h 后耐热 β-半乳糖苷酶活性达到 82 U/mL。这可能是

## 2 结果与分析

### 2.1 *bgaB* 基因的 PCR 扩增

由图 2 可知, PCR 扩增的 *bgaB* 基因片段长度为 2 000 bp 左右, 与预期结果一致。

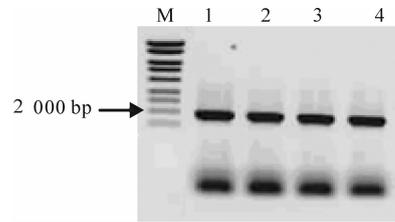


图 2 *bgaB* 基因的 PCR 扩增结果

M. DNA Marker SM0393; 1~4. PCR 产物

Fig. 2 PCR amplification of *bgaB*

M. DNA Marker SM0393; 1~4. PCR product

### 2.2 重组质粒 pBluskm-*bgaB* 和 pET28a-*bgaB* 的鉴定结果

用内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 对重组质粒 pBluskm-*bgaB* 进行双酶切, 得到长度为 3 000 bp 和 2 000 bp 的 2 个片段(图 3); 用内切酶 *EcoR* I 和 *Sac* I 对重组质粒 pET28a-*bgaB*(pGJ347) 进行双酶切, 得到长度为 7 700 bp 和 2 000 bp 的 2 个片段(图 4), 与预期结果相一致, 说明重组质粒构建成功。测序结果显示, *bgaB* 基因与 6-His 标签序列对框融合, 读码框正确, 与 NCBI GenBank 中嗜热脂肪芽孢杆菌 β-半乳糖苷酶基因的序列一致, 再次证明重组质粒构建成功。

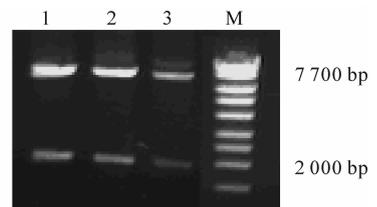


图 4 pET28a-*bgaB* 酶切鉴定结果

1~3. 质粒 pGJ347; 4. DNA Marker SM0393

Fig. 4 Enzyme digest plasmid of pGJ347

1~3. Plasmid pGJ347; 4. DNA Marker SM0393

由于高浓度的诱导物使外源蛋白表达过快, 影响了细胞自身的生长, 导致诱导后期耐热 β-半乳糖苷酶的分量不及低浓度的理想。因而, 选择 1 mmol/L 终浓度的 IPTG 对耐热 β-半乳糖苷酶进行诱导表达。

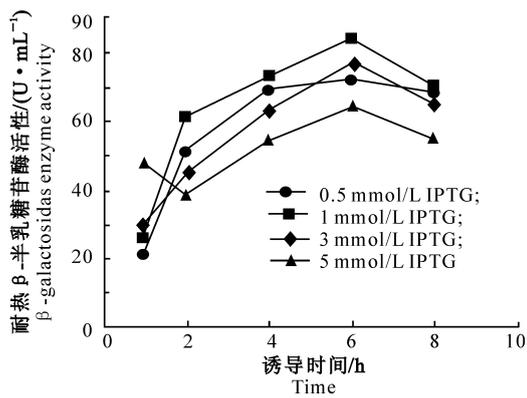


图 5 IPTG 浓度对重组菌(GJ347)诱导表达的影响

Fig. 5 Effect of the IPTG concentration on the expression induction of GJ347

## 2.4 耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶的诱导表达

电泳结果(图 6)表明,重组菌 GJ347 的蛋白粗提物在 70 ku 附近有一明显的特异性条带,对照菌的蛋白粗提物在该位置无明显条带。耐热  $\beta$ -半乳糖

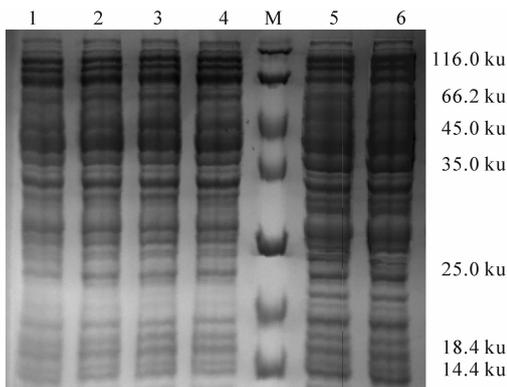


图 6 重组菌 GJ347 表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

1~4. IPTG 诱导 2,4,6,8 h 的 GJ347 蛋白粗提物;

M. Unstrained Protein Molecular Weight

Marker # SM0431;5~6. 对照

Fig. 6 Expression protein analysis by SDS-PAGE

1-4. Protein extraction substance of GJ347; M. Unstrained Protein Molecular Weight Marker # SM0431; 5-6. The contrapose

## 2.6 耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶的酶学性质

2.6.1 最适反应温度 由图 8 可知,在 65 °C 时耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性最高,55 °C 时酶活性次之,而 75,85 和 95 °C 时,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性显著降低,75 °C 时大约为 65 °C 时酶活的 1/6。因此,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶最适反应温度为 65 °C。

2.6.2 最适反应时间 对 GJ347 的诱导结果(图 9)表明,在诱导后的 2 至 6 h,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性增长较快,而在 6 h 后酶活性明显下降,这是因为

苷酶相对分子质量的理论计算值为 66 ku,本试验表达的重组蛋白氨基端融合了 36 个氨基酸残基,约 4 ku,重组蛋白相对分子质量应为 70 ku,与预期结果一致,表明重组蛋白被成功表达。经凝胶扫描分析(Gene genius, GeneTools from synGene),在诱导后 6 h,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达量占菌体总可溶性蛋白的 20%,表达效率较高。

## 2.5 耐热 $\beta$ -半乳糖苷酶的纯化

电泳结果(图 7)表明,对含 pET28a-bgaB(BL21 (DE3))的重组菌 GJ347 的蛋白粗提物进行纯化、透析(用 Z Buffer(不含  $\beta$ -巯基乙醇)在室温透析过夜),SDS-PAGE 电泳检测,在 70 ku 附近有一明显的特异性条带,这与报道中 bgaB 蛋白大小一致。用蛋白质定量测定试剂盒对透析蛋白进行蛋白质定量,结果显示,蛋白质量浓度为 0.75 mg/mL,透析蛋白的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性为 75 U/mL,比活性为 100 U/mg。

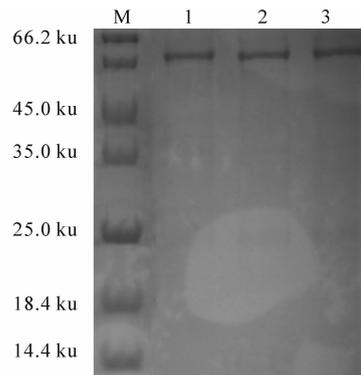


图 7 重组菌 GJ347 纯化产物的 SDS-PAGE 电泳结果

M. Unstrained Protein Molecular Weight

Marker # SM0431;1~3. GJ347 的纯化产物

Fig. 7 SDS-PAGE of purified protein

M. Unstrained Protein Molecular Weight Marker # SM0431;

1-3. Purified protein of GJ347

随着诱导时间的延长,菌体产酶逐渐饱和,表达产物增加会明显抑制细菌内基因的继续表达,使蛋白表达量降低。因此,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适反应时间为 6 h。

2.6.3 热稳定性 结果(图 10)显示,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性随着温度的升高而降低,在同一温度时,酶活性随反应时间的延长而降低。在 95 °C 下反应 60 min 后,酶活性为 3.11 U/mL,表明耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶有良好的热稳定性。

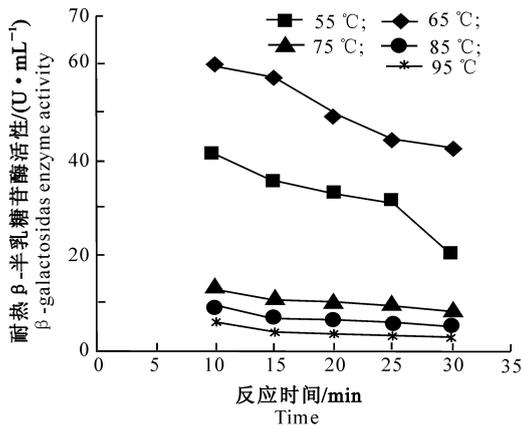


图 8 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶最适反应温度的确定

Fig. 8 The optimum response temperature of  $\beta$ -galactosidas

2.6.4 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的酶促动力学 结果(图 11)显示,当反应时间相同时,底物浓度越大,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性越高。根据酶活及不同反应的初速度  $V$ ,按 Lineweaver-Burk 作图法(图 12)求米氏常数  $K_m$  和  $V_{max}$ 。直线回归方程为  $Y = -0.3984X + 27.435$ ,  $R^2 = 0.9429$ ,从  $x$  轴和  $y$  轴的截距可求得耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的  $K_m$  为  $0.398 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ,  $V_{max}$  为  $27.435 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。 $K_m$  值与文献[23-24]报道的相当,其他  $\beta$ -半乳糖苷酶以 ONPG 为底物时  $K_m$  值一般在  $0.1 \sim 14.3$ 。

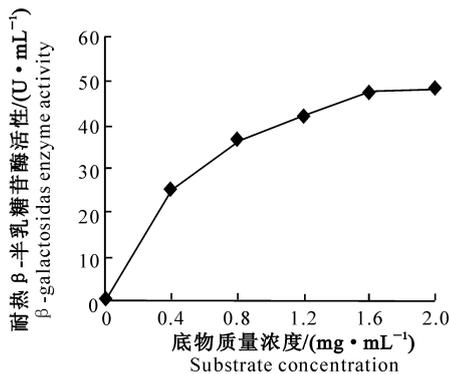


图 11 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶底物质量浓度的确定

Fig. 11 The substrate concentration of  $\beta$ -galactosidas

### 3 讨论

$\beta$ -半乳糖苷酶基因由于具有来源方便、稳定、产物易于检测、不影响其他蛋白表达等优点被广泛应用于基因研究的各个方面。 $\beta$ -半乳糖苷酶作为胞内酶或胞外酶存在于不同种类微生物体内外。目前,

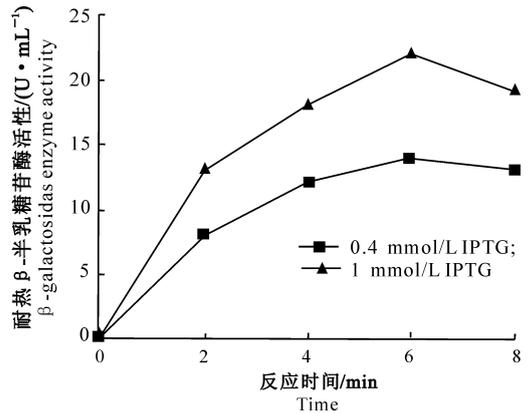


图 9 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶最适反应时间的确定

Fig. 9 The optimum response time of  $\beta$ -galactosidas

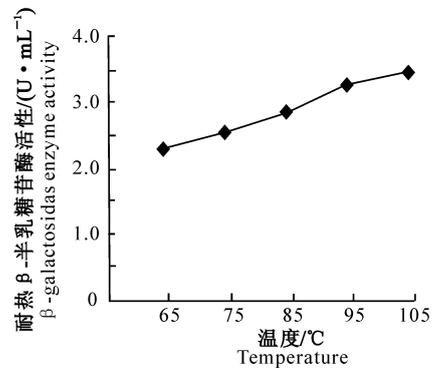


图 10 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶热稳定性的确定

Fig. 10 The thermal stability of  $\beta$ -galactosidas

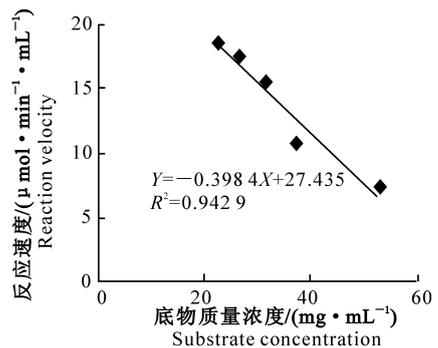


图 12 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶反应速度与底物质量浓度的确定

Fig. 12 Relationship between rate of  $\beta$ -galactosidas enzyme reaction and substrate concentration

商业用酶源一般认为,酵母(如乳酸克鲁维斯酵母、脆壁克鲁维酵母)最为安全,另一种为黑曲霉。但  $\beta$ -半乳糖苷酶在原始菌株中的分泌量太低,难于提取,因此将原始菌株中的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因提取出来,用 PCR 技术克隆,在其他菌株中进行高效表达,已成为目前获得大量  $\beta$ -半乳糖苷酶的有效途径。

刘爱兵<sup>[25]</sup>以乳酸克鲁维斯酵母(*Kluyveromyces lactis*)菌株 k528 的基因组 DNA 为模板,用 *Tap* Plus 酶 PCR 扩增  $\beta$ -半乳糖苷酶基因,获得重组质粒 T1549,经 *Sna*B I、*Not* I 双酶切, $\beta$ -半乳糖苷酶基因插入到表达载体 pET-30a(经 *Eco*R V、*Not* I 双酶切)中构建重组表达质粒 pETlac4,将 pETlac4 电击转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,经酶活测定,较酶源菌产生的酶活提高 1.5 倍。王元火等<sup>[26]</sup>将环状芽孢杆菌中的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因经 PCR 扩增、*Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切后克隆在 pUC19 上,再经 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切后与表达质粒 pKK223-3(经 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切)连接,转化到大肠杆菌 JM109;表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶  $K_m$  较原始酶小 285 倍、 $V_{max}$  较原始酶大 5.4 倍,原始酶在环状芽孢杆菌的表达量为 20.98 U/mL,而在大肠杆菌中的表达量提高到 33.102 U/mL。

本研究将来源于嗜热脂肪芽孢杆菌的耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(*bgaB*)成功克隆到大肠杆菌 pET 表达系统(pET-28a(+)),并在大肠杆菌 BL21(DE3)中得到高效表达。以 IPTG 为诱导剂,测得耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的最适反应温度为 65 °C,最适反应时间为 6 h,IPTG 的最佳诱导浓度为 1 mmol/L,酶促动力学研究表明,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶的反应常数为 0.398  $\mu$ mol/mL,最大反应速度为 27.435  $\mu$ mol/(min·mL)。1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后,耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶活性达到 82 U/mL,比活性为 100 U/mg。

## [参考文献]

- [1] 高秀容,马力,叶华,等.  $\beta$ -半乳糖苷酶的研究进展 [J]. 生物技术通报,2005,3:18-21.  
Gao X R, Ma L, Ye H, et al. Research advancement of  $\beta$ -galactosidase [J]. Biotechnology Bulletin, 2005, 3: 18-21. (in Chinese)
- [2] 卜建斌,云战友,邢黎明,等.  $\beta$ -半乳糖苷酶的应用及固定化 [J]. 农产品加工学报,2006,2:4-7.  
Bu J B, Yun Z Y, Xing L M, et al. Application and immobilization of  $\beta$ -galactosidase [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2006, 2: 4-7. (in Chinese)
- [3] 李玉强,王昌禄,顾小波,等.  $\beta$ -半乳糖苷酶的研究与进展 [J]. 中国食品添加剂,2001,2:30-34.  
Li Y Q, Wang C L, Gu X B, et al. Research application of  $\beta$ -galactosidase [J]. China Food Additives, 2001, 2: 30-34. (in Chinese)
- [4] 陈朋,韩跃武,胡先望,等. 产  $\beta$ -半乳糖苷酶酵母菌株 15D 产酶条件研究 [J]. 食品工业科技,2005,12:73-75.  
Chen P, Han Y W, Hu X W, et al. Studies the conditions for production of  $\beta$ -galactosidase by the yeast 15D [J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 12: 73-75. (in Chinese)
- [5] 汪川,张朝武,刘衡川,等. 两株保加利亚乳杆菌产  $\beta$ -半乳糖苷酶条件的优化及酶活力测定 [J]. 中国微生物学杂志,2006,18(3):161-163.  
Wang C, Zhang Z W, Liu H C, et al. Optimizing the conditions of  $\beta$ -galactosidase producing and determining of enzyme activities of two strains of *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2006, 18(3): 161-163. (in Chinese)
- [6] 王红妹,肖敏,李正义,等. 转基因  $\beta$ -半乳糖苷酶产生菌筛选和鉴定及酶催化生成低聚半乳糖 [J]. 山东大学学报,2006,41(1):133-139.  
Wang H M, Xiao M, Li Z Y, et al. Screening and identification of  $\beta$ -galactosidase-producing microorganism and enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides using its transgalactosylation [J]. Journal of Shandong University, 2006, 41(1): 133-139. (in Chinese)
- [7] 秦燕,宁正祥,胡新宇,等.  $\beta$ -半乳糖苷酶的应用研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报,2000,31(6):595-599.  
Qin Y, Ning Z X, Hu X Y, et al. Advance of application and research in  $\beta$ -galactosidase [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2000, 31(6): 595-599. (in Chinese)
- [8] Patrick M, Nina A, Catherine C, et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3  $\beta$ -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* [J]. Protein Expression and Purification, 2004, 38: 248-257.
- [9] Julieta M S, Iván C, Maria A P. Effect of partitioning equilibria on the activity of  $\beta$ -galactosidase in heterogeneous media [J]. Biophysical Chemistry, 2005, 118(2): 69-77.
- [10] Ladero M, Ferrero R, Vian A, et al. Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(5): 505-513.
- [11] Poluri E, Gomedhikam J P, Kota M K, et al. Development and screening of high producing  $\beta$ -galactosidase activity by clones of CHO-K1 cell line [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(1): 103-106.
- [12] Ladero M, Ruiz G, Vian A, et al. Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2: Comparison to the free enzyme [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31(1): 14-24.
- [13] 葛佳佳,陈卫,张灏,等. 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 无锡轻工大学学报,2002,21(3):296-298.  
Ge J J, Chen W, Zhang H, et al. Expression of thermostable  $\beta$ -galactosidase gene in *E. coli* [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2002, 21(3): 296-298. (in Chinese)
- [14] 张灏,夏雨,傅晓燕,等. 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *bgaB* 在枯草芽孢杆菌中的整合表达 [J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(3):1-5.  
Zhang H, Xia Y, Fu X Y, et al. Integration and expression of a thermostable  $\beta$ -galactosidase gene *bgaB* in *Bacillus subtilis*

- [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2003, 22 (3): 1-5. (in Chinese)
- [15] 陈卫, 张灏, 葛佳佳, 等.  $\beta$ -半乳糖苷酶重组大肠杆菌诱导表达条件的研究 [J]. 乳业科学与技术, 2002, 3: 1-4.  
Chen W, Zhang H, Ge J J, et al. Studies on induction conditions of recombinant *Escherichia coli* encoding  $\beta$ -galactosidase [J]. Science and Technology of Milk, 2002, 3: 1-4. (in Chinese)
- [16] 陈卫, 葛佳佳, 张灏, 等. 半乳糖苷酶基因在大肠杆菌中过量表达及 IPTG 诱导条件 [J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21 (5): 492-495.  
Chen W, Ge J J, Zhang H, et al. Overexpression of  $\beta$ -galactosidase gene *bgab* in *Escherichia coli* and studies on IPTG induction [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2002, 21(5): 492-495. (in Chinese)
- [17] Paolo S, Silvana T, Laura G, et al. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP. 10 proteins for detection of mycobacterium tuberculosis infection [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8): 3469-3474.
- [18] Mustafa A S, Cockle P J, Shaban F, et al. Immunogenicity of mycobacterium tuberculosis RD1 region gene products in infected cattle [M]. Clin Exp Immunol, 2002, 130(1): 37-42.
- [19] Lowrie D B, Silva C L. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination [J]. Vaccine, 2000, 18 (16): 1712-1716.
- [20] Mateo C, Abian O, Guisan J M, et al. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polythylenimine composites [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 68(1): 98-105.
- [21] 钱嘉, 译. 酶的测定方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.  
Qian J, Translation. Measure and method of enzyme [M]. Beijing: Light Industry Press of China, 1992. (in Chinese)
- [22] 韩冲. 一株产  $\beta$ -半乳糖苷酶酵母菌株的选育研究 [J]. 食品工业科技, 2002, 8: 33-35.  
Han C. Studies the conditions of  $\beta$ -galactosidase by the yeast [J]. Science and Technology of Food Industry, 2002, 8: 33-35. (in Chinese)
- [23] 陈少欣. 嗜热脂肪芽孢杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖的过程工程研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2001.  
Chen S X. Studies on composition galactooligosaccharide process of the thermostable  $\beta$ -galactosidase from *B. stearothermophilus* [D]. Shanghai: Doctor Paper of East China University of Science and Technology, 2001. (in Chinese)
- [24] 陈卫. 嗜热脂肪芽孢杆菌耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶基因克隆、表达和酶学性质的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2003.  
Chen W. Studies on gene expression and properties of the thermostable  $\beta$ -galactosidase from *B. stearothermophilus* [D]. Wuxi: Doctor Paper of Jiangnan University, 2003. (in Chinese)
- [25] 刘爱冰. 乳酸克鲁维斯酵母乳糖酶基因的克隆、表达及酶学性质分析 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2004: 8-40.  
Liu A B. Cloning and expression of the lactase gene from *Kluyveromyces lactis* and analysis of lactase properties [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2004: 8-40. (in Chinese)
- [26] 王元火, 姚斌, 袁铁铮, 等. 环状芽孢杆菌乳糖酶基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质分析 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(1): 83-88.  
Wang Y H, Yao B, Yuan T Z, et al. Expression of *Bacillus circulans* lactase gene in *E. coli* and properties of expressed lactase [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11 (1): 83-88. (in Chinese)