

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.2130.025

网络出版时间:2011-10-25 21:30

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.2130.025.html>

西农萨能羊凝乳酶原基因的克隆与原核表达

杨宝进^{1,2}, 卢婷婷², 张 华², 罗 军¹, 王学清¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450011)

[摘 要] **【目的】**克隆西农萨能羊凝乳酶原基因并进行原核表达,对表达产物凝乳酶原复性后进行活性检测,为西农萨能羊凝乳酶制剂的微生物发酵生产奠定基础。**【方法】**从西北农林科技大学西农萨能羊原种场新生公羔羊的皱胃组织中提取总 RNA,通过 RT-PCR 方法获得西农萨能羊凝乳酶原前体的编码序列,纯化后与 pMD-18T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109,通过双酶切和序列测定,获得了凝乳酶基因全长编码区序列。将该基因连接到原核表达载体 pET-30a 中,构建重组菌 pET-30a/Chymosin,经酶切、测序鉴定后进行凝乳酶的小量表达、大量表达、Western 杂交鉴定、纯化、复性和活性测定。**【结果】**通过 RT-PCR 方法获得了西农萨能羊凝乳酶原前体的编码序列,并构建了重组菌 pET-30a/Chymosin;通过体外原核表达获得了西农萨能羊凝乳酶原,将酶原进行复性后测得重组菌酶活力为 93.2 U/mL。**【结论】**利用西农萨能羊凝乳酶原基因,通过构建原核表达载体和体外表达可以得到凝乳酶原,通过蛋白纯化和复性可得到有活性的凝乳酶。

[关键词] 西农萨能羊;凝乳酶;原核表达载体

[中图分类号] TS252.1;S872

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)12-0039-05

Cloning and prokaryotic expression of preprochymosin cDNA of Xinong Saanen Goat

YANG Bao-jin^{1,2}, LU Ting-ting², ZHANG Hua², LUO Jun¹, WANG Xue-qing¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011, China)

Abstract: **【Objective】**The research was done to clone and prokaryotic express the preprochymosin cDNA of Xinong Saanen Goat, and test the activity of recombinant protein after renaturation. **【Method】**Preprochymosin cDNA was obtained from total RNA isolated from the abomasum of Xinong Saanen Goat by RT-PCR method. The purified RT-PCR products and pMD-18T vector were ligated and transformed into host strain *E. coli* JM109. The full length of Chymosin gene and pET-30a vector were ligated and the recombinant plasmid pET-30a/Chymosin was constructed successfully. The recombinant was identified, expressed *in vitro*, then purified and the activity performed. **【Result】**Preprochymosin cDNA was obtained by RT-PCR method and the recombinant plasmid pET-30a/Chymosin was constructed. Recombinant protein preprochymosin of Xinong Saanen was obtained by Prokaryotic expression *in vitro*, the enzyme activity tested after renaturation was 93.2 U/mL. **【Conclusion】**Preprochymosin gene can be obtained by constructing recombinant plasmid and expressing *in vitro*. Activity tests showed that the enzyme which was obtained according to purification and renaturation of preprochymosin had milk-clotting activities.

Key words: Xinong Saanen Goat; chymosin; prokaryotic expression vector

* [收稿日期] 2011-05-31

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目 (0624030009)

[作者简介] 杨宝进(1963—),男,河南新野人,教授,在职博士,主要从事动物产品开发利用研究。E-mail:baojiny@sina.com

干酪富含蛋白质、脂肪、维生素、矿物质及其他生物活性物质,具有非常高的营养价值,在欧美国家膳食中占有重要地位,目前我国生产很少,但伴随着国内干酪需求量的增加进口量迅速增加,干酪的生产必将成为我国未来乳品工业的重要产业之一^[1]。生产干酪的凝乳酶来源比较广泛,可以从动物、植物、微生物中得到,由于可宰杀小牛逐年递减,而其他动物胃蛋白酶和微生物蛋白酶存在着专一性不强、凝乳活性和分解活性比值低、对热稳定、乳中残留量高等问题,常常引起干酪产量降低,风味不佳^[2-3],而利用基因工程技术生产凝乳酶可以避免上述缺陷^[4]。相对于较常见的牛凝乳酶,应用山羊凝乳酶制作的羊奶干酪具有明显的价格优势,开发重组山羊凝乳酶对山羊奶的加工生产具有重要意义,但目前尚未见利用基因工程生产山羊凝乳酶的报道。

西农萨能羊的凝乳酶原前体 cDNA 有 1 292 个碱基,编码 381 个氨基酸,包含 1 段由 16 个氨基酸组成的信号序列和 1 段由 42 个氨基酸组成的酶原序列,分子质量为 40 777 u,在酸性条件下自身催化形成由 323 个氨基酸组成的有活性的成熟凝乳酶,分子质量为 35 622 u^[5]。西农萨能羊体格高大、产奶量高、适应性强、遗传稳定,因此具有良好的产奶性能。本研究对西农萨能羊凝乳酶原基因进行了克隆和原核表达,以期得到具有凝乳活性的西农萨能羊凝乳酶可溶性的融合蛋白,为进一步实现凝乳酶制剂的微生物发酵生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌种

pMD18-T 克隆质粒,购自宝生物工程有限公司;pET-30a 表达质粒和大肠杆菌 BL21、JM109,购自河南省生物技术公司。

1.2 工具酶和主要试剂

限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、蛋白分子量标准、DNA 分子量标准,均为宝生物工程有限公司产品。

缓冲液 A(透析蛋白用):50 mmol/L KH_2PO_4 , 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl,用 KOH 调 pH 至 11;缓冲液 B(透析蛋白用):50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA,用 1 mol/L HCl 调 pH 至 8.0。

1.3 西农萨能羊凝乳酶原基因的克隆

取西北农林科技大学西农萨能羊原种场新生 5

d 的公羔羊,手术法采集皱胃组织,提取总 RNA,根据 GenBank 上已发表的西农萨能羊凝乳酶原基因序列(EF199763),利用 Primer 5.0 软件设计引物 P1、P2, P1 序列为:5'-GGAATTCCATATGCCCA GATCCAAGATGAG-3', P2 序列为 5'-CCG GAA-TTCGCAGAAAGACAACATTTA-3',引物由宝生物工程有限公司合成, P1 和 P2 下划线部分分别为 *Nde* I 和 *Eco* R I 酶切位点。以提取的 RNA 为模板,用 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 扩增,扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,用试剂盒回收目的片段,送宝生物工程有限公司进行测序。将测序结果与已发表的西农萨能羊凝乳酶原序列进行比对,将该序列连接到克隆载体 pMD18-T 中,转化到 DH5 α 感受态细胞中保存,得到重组质粒 pMD 18-T/chymosin。

1.4 原核表达载体的构建

根据 GenBank 报道的西农萨能羊凝乳酶原基因序列设计引物 P3、P4, P3 序列为 5'- G GAA TTC CAT ATG AGG TGT CTT GTG GTG -3', P4 序列为 5'- A TCC CTC GAG GAT GGC TTT GGC CAG -3', P3 和 P4 序列中的下划线部分分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。引物由宝生物工程有限公司合成,退火温度为 60 ℃。以 pMD 18-T/chymosin 为模板, P3、P4 为引物进行扩增, PCR 体系为:0.25 $\mu\text{mol/L}$ P3 1 μL , 0.25 $\mu\text{mol/L}$ P4 1 μL , pMD 18-T/chymosin 1 μL , 10 $\times$ EX-*Taq* Buffer 2.5 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , ddH $_2$ O 18 μL , EX-*Taq* 0.5 μL 。反应程序为:94 ℃预变性 5 min;然后 94 ℃变性 1 min, 60 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 100 s, 72 ℃延伸 5 min, 30 次循环。将 PCR 产物进行电泳鉴定并回收,回收产物用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收酶切产物,与经同样双酶切处理的 pET-30a 质粒用 T4 连接酶进行连接,构建表达载体,对其进行双酶切鉴定,将阳性重组表达载体命名为 pET-30a/Chymosin。

1.5 融合蛋白的表达和检测

将阳性重组菌接种于 LB 固体培养基(含卡那霉素 50 $\mu\text{g/mL}$)中, 37 ℃培养过夜,挑取单个菌落接种于 LB 液体培养基中, 200 r/min 振荡培养至 OD $_{600}$ 为 0.6~1.0 时,加入 IPTG(终浓度为 1 mol/L)诱导表达,加入 IPTG 和 LB 培养基的比例为 1:1 000,每隔 2 h 收集 1 次菌液样品,筛选出高表达量的克隆,同时以未诱导的菌液为阴性对照。将阳性重组菌接于 3 mL Kan LB 中摇至 OD $_{600}$ 为

1.6,按 1:1 000 比例接种于 750 mL 培养基中,在 30 ℃、200 r/min 的摇床中培养过夜,加入新鲜培养基 1 250 mL 后分装,每瓶 1 000 mL,然后向各瓶加入 1 mol/L IPTG 500 μL,37 ℃诱导 6 h,提取蛋白并进行 Western 杂交检测^[6]。

1.6 凝乳酶原的制备、纯化和复性

将大量诱导的菌液进行离心(5 000 r/min,10 min),取沉淀超声破碎(功率 900 W,间隔时间为 5 s,破碎 99 次),再次离心(10 000 r/min,10 min),取沉淀即得到包涵体。若沉淀量很多,则需要再次超声。用磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L,pH=7.8)溶解包涵体,用体积分数 1%的 triton-X100 洗涤后再用 1 mol/L NaCl 洗涤,混匀后加入 3 倍体积的尿素,混匀。离心(5 000 r/min,10 min)后取上清,过滤即得到变性后的蛋白溶液。用 30 g/L 硫酸镍进行亲和层析,填充料选择 Chelating Sepharose™ Fast Flow。先分别用尿素和盐酸胍洗 1 遍柱子,之后将目的蛋白过柱使之结合到柱子上,再加入尿素清洗层析柱。然后依次加入 20,50 和 300 mmol/L 咪唑洗脱蛋白,用 SDS-PAGE 法选择咪唑洗脱液的浓度,该浓度下的蛋白洗脱液即为纯化的目的蛋白,将纯化的目的蛋白用 500 g/L 硫酸铵沉淀后,立即复性或-20 ℃保存。将上述蛋白用 4 mL 含 8 mol/L 尿素、pH 为 11 的缓冲液 A 溶解,室温放置 1 h,再用 1 mol/L HCl 调 pH 至 8.0,1 h 后用缓冲液 B 透析过夜(4 ℃,避光),中间更新透析液 2 次。将透析液 pH 调至 2,室温放置 2 h 后调 pH 至 6.3,冰浴 1

h 后离心(5 000 r/min,10 min)取上清,即为有活性的蛋白酶^[7]。

用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,以标准蛋白的质量浓度为横坐标 X,以各浓度蛋白在波长 595 nm 处的吸光度值 A_{595} 为纵坐标 Y,绘制标准曲线,根据测定管吸光度值在标准曲线上对应的位置得到样品的蛋白浓度。配制 100 g/L 的脱脂乳 5 mL,于 35 ℃下保温 5 min。加入 0.5 mL 质量浓度为 10 g/L 的酶液,迅速混合均匀,准确记录从开始到乳液凝固的时间 $t(s)$,将 40 min 凝结 1 mL 100 g/L 脱脂乳的酶量定义为 1 个索氏单位^[8],按“酶活力= $[(5 \times 2\ 400)/(0.5 \times t)] \times$ 稀释倍数”计算酶的活力。

2 结果与分析

2.1 西农萨能羊凝乳酶原基因的克隆

以提取自西农萨能羊原种场新生羊皱胃的总 RNA 为模板扩增凝乳酶原基因,结果扩增得到约 1 300 bp 的目的片段(图 1),与理论值大小一致。RT-PCR 序列比对结果显示,西农萨能羊凝乳酶原基因序列与 GenBank 上已报道的山羊(GenBank 号:AY389343)、绵羊(GenBank 号:X53037)、牛(GenBank 号:J00002)相应基因核苷酸序列的同源性分别为 99.41%,98.74%和 95.29%。将该凝乳酶原基因与克隆基因连接为重组克隆载体 pMD 18-T/chymosin 并进行扩增,结果(图 2)表明,重组体大小与理论值一致。

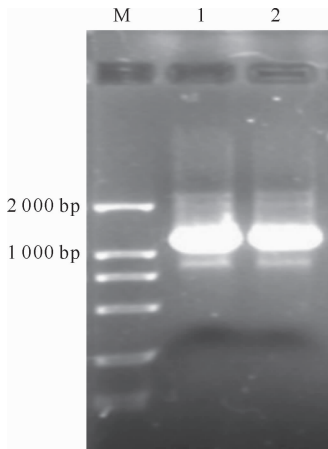


图 1 西农萨能羊凝乳酶原 cDNA 的 PCR 扩增结果
M, DL2000 核酸标准;1,2. PCR 扩增结果
Fig.1 Result of RT-PCR Xinong Saanen Goat preprochymosin cDNA amplification
M, DL2000 DNA Marker;
1,2. The products of objective gene by PCR

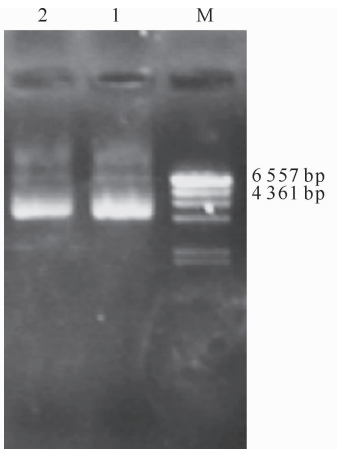


图 2 西农萨能羊凝乳酶原基因的克隆结果
M, λ-Hind III 核酸标准;
1,2. pMD 18-T/chymosin 重组克隆载体
Fig.2 Cloning of Xinong Saanen Goat preprochymosin cDNA
M, λ-Hind III digest;1,2. pMD 18-T/chymosin plasmid

2.2 原核表达载体 pET-30a/Chymosin 的酶切鉴定

对重组的表达载体 pET-30a/Chymosin 进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,结果(图 3)获得了长度

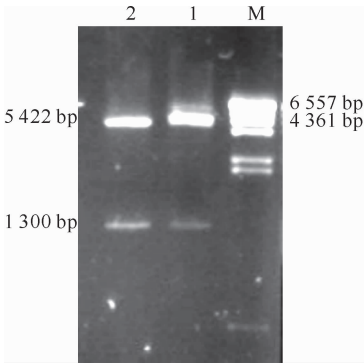


图 3 重组质粒 pET-30a/chymosin 的 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

M. λ -*Hind* III 核酸标准;1,2. pET-30a/Chymosin 重组表达载体的双酶切结果

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-30a/chymosin by digested with *Nde* I and *Xho* I

M. λ -*Hind* III digest;1,2. Products of recombinant plasmid pET-30a/Chymosin by digested

2.3 重组凝乳酶原蛋白的表达

图 4 结果显示,未加 IPTG 诱导剂的菌液没有明显的目的条带,而加 IPTG 后有目的条带产生,说明 IPTG 的诱导可以大大增加蛋白的表达量。由图 5 可知,表达的凝乳酶原蛋白在沉淀中以包涵体形

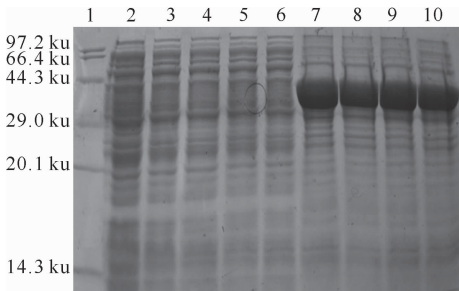


图 5 IPTG 诱导时间对重组凝乳酶原蛋白表达的影响

1. 蛋白质分子量标准(低);2. 空菌;3~6. 分别为诱导 2,4,6,8 h 的上清;7~10. 分别为诱导 2,4,6,8 h 的沉淀

Fig. 5 Effect of IPTG on recombinant protein preprochymosin expression by different time

1. Rotein MW Marker(Low);2. Lank control;3—6. Supernatant for 2,4,6,8 h, respectively;7—10. Deposit for 2,4,6,8 h, respectively

2.4 重组凝乳酶原蛋白的纯化与活性测定

从图 7 可以看出,用 300 mmol/L 咪唑的洗脱效果最好,目的条带最清晰并且杂条带最少,因此该浓度咪唑洗脱得到的蛋白为目的蛋白。以标准蛋白的质量浓度为横坐标, A_{595} 为纵坐标,绘制的标准曲

分别为 5 422 和 1 300 bp 的 2 个片段,其长度与预期值一致。

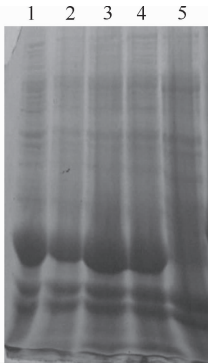


图 4 重组凝乳酶原蛋白的诱导表达

1~4. 加入 IPTG 诱导表达的蛋白;

5. 未加入 IPTG 诱导表达的蛋白

Fig. 4 Expression of recombinant protein preprochymosin

1—4. Expression products induced by IPTG;

5. Expression products without IPTG

式存在;IPTG 的诱导时间对蛋白的表达没有太大影响,因此表达时间不是诱导的关键因素。将表达 6 h 的菌液提取蛋白进行 Western 分析,结果(图 6)显示,所得蛋白为目的蛋白。

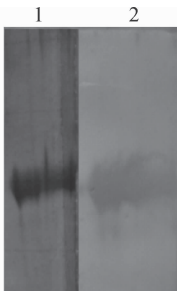


图 6 重组凝乳酶原蛋白的 Western 杂交分析

1. 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳;2. 重组蛋白 Western 杂交

Fig. 6 Recombinant protein preprochymosin by Western blot analysis

1. Recombinant protein by SDS-PAGE;

2. Recombinant protein by Western blot analysis

线如图 8 所示。将试验所测样品的 A_{595} 值代入图 8 的方程中,计算得复性后凝乳酶蛋白的质量浓度为 0.55 g/L。加入凝乳酶后 4 282 s 奶开始凝固,测得其活力为 93.2 U/mL。

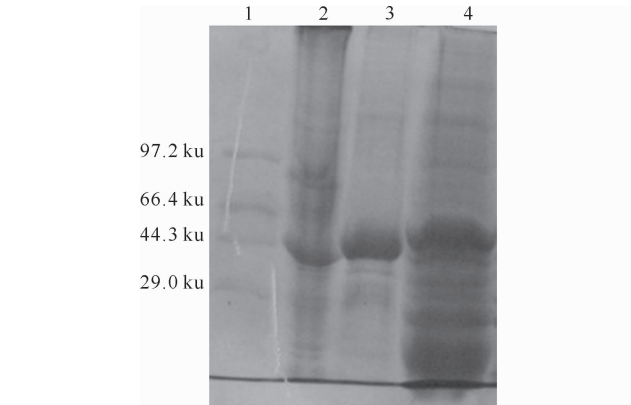


图 7 重组凝乳酶原蛋白的纯化

1. 蛋白质分子量标准(低);

2~4. 分别为 50,300,20 mmol/L 咪唑洗脱物

Fig. 7 Purification result of recombinant protein preprochymosin

1. Protein MW Marker(Low); 2—4. The products being cleaned up by 50,300,20 mmol/L imidazole elution, respectively

3 讨 论

基因工程凝乳酶价格低廉,来源稳定,美国有 70% 的乳酪是由转基因微生物生产的凝乳酶制造的。我国的酶制剂与发达国家存在很大差距,在经济全球化的大背景下,我国未来的凝乳酶生产,特别是基因工程凝乳酶的生产,将在酶制剂工业中占有很大比例^[9-11]。

大肠杆菌在基因克隆试验中最为常见,Uchiyama 等^[12]首次在大肠杆菌中尝试凝乳酶生产,他们首先从犊牛皱胃黏膜层中纯化出凝乳酶 mRNA,应用小麦细菌系统在体外成功表达凝乳酶原。表达载体 pET 系统是在大肠杆菌中表达重组蛋白的首选,其是利用大肠杆菌 T7 噬菌体转录系统进行表达的载体。本研究将凝乳酶原基因克隆到原核表达载体 pET-30a 中,构建重组质粒,使之在大肠杆菌中有效表达,通过复性后剪切为具有明显凝乳活性的凝乳酶,该研究为凝乳酶的工业化生产奠定了基础。但是在研究过程中尚存在一些问题,如在凝乳酶原复性的过程中,还存在着复性率不高^[13]、酶活较低等问题,这些问题可以通过基因改造及优化表达载体和纯化条件来解决^[14]。

[参考文献]

[1] Wang Y P,Cheng Q L,Zaheer Ahmed,et al. Purification and partial characterization of milk-clotting enzyme extracted from glutinous rice wine mash liquor [J]. Korean Journal of Chemi-

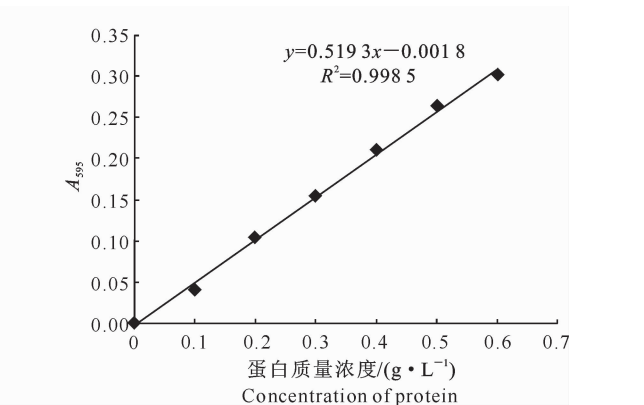


图 8 凝乳酶蛋白浓度- A_{595} 标准曲线

Fig. 8 Standard curve of concentration of recombinant protein- A_{595}

cal Engineering,2009,26(5):1313-1318.

[2] Braun I,Kunath H. Investigations on biochemical properties of milk-clotting emzymes [J]. Die Nahrung, 1988, 32 (4): 375-381.

[3] Zhen F,Zhang L W,Han X. Codon optimization of the calf prochymosin gene and its expression in *Kluyveromyces lactis* [J]. World J Microbiol Biotechnol,2010,26:895-901.

[4] Yu P L. Production of chymosin for the dairy industry by recombinant DNA technology [J]. Australasian Biotechnology, 1994,4:19-23.

[5] Yang B J,Wang X Q,Luo J,et al. Cloning and sequence analysis of preprochymosin cDNA of Xinong Saanen milk goat [J]. Life Science Journal,2007,4(2):64-69.

[6] 奥斯伯 F M,布伦特 R,金斯顿 R E,等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京:科学出版社,1999.

Ausubel F M,Brent R,Kingston R E,et al. Short protocols in molecular biology [M]. Beijing: Science Press,1999. (in Chinese)

[7] 张治洲,张渝英,杨开宇. 碱性条件下溶解包涵体提高凝乳酶原复性率的机制 [J]. 中国科学,1997,27(2):103-108.

Zhang Z Z,Zhang Y Y,Yang K Y. Mechanism in improving the renaturation rate of preprochymosin by dissolving inclusion body under alkalescence condition [J]. Science in China, 1997, 27(2):103-108. (in Chinese)

[8] Robinson R K. Modern dairy technology [J]. Applied Sciency-pud,1996,24:66-68.

[9] Zhang Y,Zhou Wei,Liu N,et al. Expression of calf prochymosin gene in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol,1991,7(3):195-200.