

文章编号: 100025013(2008)040563204

改进 RBB 染色法初步筛选 几丁质酶基因 *chiA* 的表达

贺淹才, 刘爱花, 柴思捷, 刘治江

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 对 RBB(Remazol Brilliant Blue) 底物染色方法进行产几丁质酶细菌的酶活性筛选, 应用几丁质胶体平板诱导表达的筛选取得好的效果. 粘质沙雷氏菌几丁质酶基因 *chiA* 在 *E. coli* 中的异源表达过程: 首先从质粒 pMD18OT-*chiA* (DH5A) 中切出含粘质沙雷氏菌几丁质酶基因 *chiA* 的片段, 将其插入到表达载体 pETQ22b(+) 内, 构建成几丁质酶表达质粒 pETQ*chiA*. 然后, 转化进入 DH5A 感受态细胞内, 鉴定正确后将 pETQ*chiA* 质粒转入 BL21(DE3)pLysS 中进行表达, 并进行初步筛选.

关键词: RBB 底物染色; 几丁质酶基因 *chiA*; 粘质沙雷氏菌; 表达

中图分类号: Q 556⁺.903

文献标识码: A

几丁质酶(Chitinase) 是一类糖基水解酶, 可降解不溶性的几丁质而生成 NO₂ 乙酰氨基葡萄糖和几丁寡糖. 对几丁质酶的研究, 能够开发和利用可再生资源几丁质, 生产高附加值的几丁寡糖, 不能缓解现今面临的陆地资源匮乏问题, 还能增加经济效益^[1]. 几丁质酶的生产主要是靠筛选产高酶活的几丁质酶的细菌产生, 或者利用已有的几丁质酶的基因进行几丁质酶的分子进化, 改造几丁质酶的活性, 生产几丁质酶. 表型观察选择是目前全世界最普遍采用的初步筛选产几丁质酶细菌的方法, 它利用底物显色反应, 根据水解圈筛选突变体^[2]. 该方法优点是筛选速度快, 而缺点是具有很大的局限性, 不能定量, 而且其对蛋白质特性中的微小变化不灵敏. 为了提高胶体几丁质平板上几丁质酶的检测灵敏度, Gomez 等^[3] 于 2004 年研究出染料 RBB (Remazol Brilliant Blue) 染色进行几丁质酶检测, 但尚未发现国内外其他学者对产几丁质酶采用这种方法. 本文对该方法作了一些改进, 并应用改进的 RBB 染色方法, 对几丁质胶体平板进行诱导表达的筛选.

1 材料与方法

1.1 菌种质粒及试剂来源

粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) A TCC14041, 购于中国科学院微生物研究所, 是产几丁质酶基因 *chiA* 来源的菌株; *E. coli* DH5A, 中国科学院遗传与发育生物学研究所吴乃虎教授惠赠; *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 华侨大学材料科学与工程学院林毅博士惠赠; 质粒 pETQ22b(+), 华侨大学材料科学与工程学院方柏山教授惠赠; 质粒 pMD18OT Simple(辽宁省大连 Takara 公司). 上述原始菌株均保存于 - 70 ℃, 体积分数为 20% 的甘油 LB(Luria-Bertani) 培养基中. 重组菌株保存于 - 70 ℃, 体积分数为 8% 的甘油 LB 培养基中.

1.2 RBB 染色胶体几丁质的制备

取 100 目过筛粉状几丁质 10 g, 在冰浴加入到 100 mL 的浓盐酸中, 充分搅拌约 30 min 后静置于 4 ℃ 的冰箱内. 24 h 后取出, 边搅拌边加入到装有 3 L 水的烧杯中, 静置. 待胶态几丁质自行沉降分层后,

收稿日期: 20071216

作者简介: 贺淹才(1949), 男, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学的研究. E-mail: yche@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

吸去上清液,再加入蒸馏水,搅拌,测 pH 值,静置.如此反复操作 7~8 次,并用单层纱布过滤以除去较大的颗粒,直至溶液 pH 值达到 6.4.

RBB 染料(Remazol Brilliant Blue,德国 sigma 公司),参照文[3]方法作了改进.具体操作如下:将 100 mL 质量分数为 1%的胶体几丁质与 100 mL 质量分数 0.5%的 RBB 溶液混合,所得到的悬浮液在沸水浴中煮沸 60 min,使染料与胶体几丁质充分结合.然后,真空抽滤获得胶状染色物质,并用热水冲洗至滤液无色,获得的胶状蓝色物质存储于 4 e,待配培养基时使用.

1.3 提取质粒并酶切

利用 pMD18OT Simple(2 692 bp, TaKaRa 公司产品)为克隆载体,将几丁质酶基因 chiA 与克隆载体构建成为重组克隆载体,命名为 pMDQchiA.转化扩增及酶切鉴定正确后,回收 chiA.利用 pETQ2b(+)为表达载体与 chiA 重组,命名为重组表达质粒 pETQchiA.操作如下:从- 70 e 冰箱里取出保存的菌,挑取少许于 LB 培养基(氨苄青霉素(AMP)为 75 mg# L⁻¹)中,在 37 e,250 r # min⁻¹下过夜振荡培养 12 h^[4],用质粒提取试剂盒提取菌液的质粒.

(1) 限制性双酶切反应体系 1 12~ 16 LL 待酶切 DNA 样品,2 LL 的 10 倍 K 缓冲液,1 LL 的 Hind 0,1 LL 的 BamH I,加灭菌水至终体积 20 LL .(2) 限制性单酶切反应体 1 12~ 16 LL 待酶切质粒,2 LL 的 10 倍 K (H) 缓冲液,1 LL 的 Hind 0,加灭菌水至终体积 20 LL.

上述两个体系置于 30 e (或 37 e) 下反应 2~ 3 h,对 pETQchiA 进行酶切鉴定进而回收 chiA 目的基因.加入 2.2 LL 的 10 倍上样缓冲液使反应终止,再通过质量分数为 1%琼脂糖凝胶电泳分析酶切效果,回收目的片段.

1.4 转化感受态细胞鉴定筛选

将构建好的重组表达质粒 pETQchiA 转化到宿主 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞中,涂布于加有 100 mg # L⁻¹氨苄青霉素(AMP)的 LB 平板上,倒置于 30 e 的培养箱中过夜培养.隔日挑取单菌落穿刺接种于除了加有 100 mg # L⁻¹氨苄青霉素外,还分别含有 1 mol # L⁻¹ IPTG (异丙基硫代DIDO半乳糖苷)和不含 IPTG 的胶体几丁质平板(或 RBB 染色胶体几丁质平板),倒置于 30 e 的避光培养箱中,直至出现水解圈,挑取菌落鉴定并保藏.

1.5 琼脂糖凝胶电泳

(1) Marker 样.1.5 LL 的 Marker+ 3.5 LL 的 ddH₂O+ 1 LL 的 6 倍上样缓冲液.(2) 扩增产物样.20 LL 反应体系+ 4 LL 的 6 倍上样缓冲液.电泳时间为 40~ 60 min,电压为 100 V.电泳后凝胶放在溴化乙锭(EB)染色液中染色 2 min,紫外拍照,观察条带的位置是否正确.

1.6 几丁质酶酶活的测定方法

将培养液在 4 e,8 kr # min⁻¹下离心 10 min,取 100 LL 上清液,用 pH 值为 6.6 的 Mcllvaincs 缓冲液补足体积至 500 LL,再加入 500 LL 质量分数为 1%的胶体几丁质,于 50 e 温水浴 1h,采用 3,5O二硝基水杨酸(DNS)比色定还原糖法测定.将反应物离心去沉淀,取 0.5 mL 上清液与 0.5 mL 的 DNS 试剂,混匀,沸水浴 5 min 后,立即冷却至室温,补加 4 mL 蒸馏水,混匀,测波长为 540 mm 下的吸光值.

2 结果与讨论

2.1 RBB 染色水解圈比较

将改进的 RBB 染色胶体几丁质平板与传统几丁质平板进行水解圈大小比较,如图 1 所示,结果表明,改进的 RBB 染色胶体几丁质平板水解圈明显,肉眼判别非常清晰.将传统几丁质平板上具有较小水解圈的菌落再穿刺培养到改进后的 RBB 染色胶体几丁质平板上,出现水解圈的时间大大缩短.传统的几丁质平板上肉眼可清楚判别的水解圈出现的时间为 42~ 58 h^[5],而改进的 RBB 染色胶体几丁质平板则只需要 24~ 30 h,并且水解圈要大些.

底物染色可使产几丁质酶细菌筛选测定操作更快捷方便.常用的染色剂为天青(Azure)、RBB (Remazol Brilliant Blue)等染料.在通常的酶反应条件下,因非酶解作用而释放出 RBB 的数量极小,使得结果准确性高.本实验改进了 Gomez 的方法,去除了实验中的化学试剂,仅靠物理方法使胶体几丁质与 RBB 染料之间发生共价结合,形成 CCCRBB.制备的 CCCRBB 染色效果很好,也不易脱色,且不存在

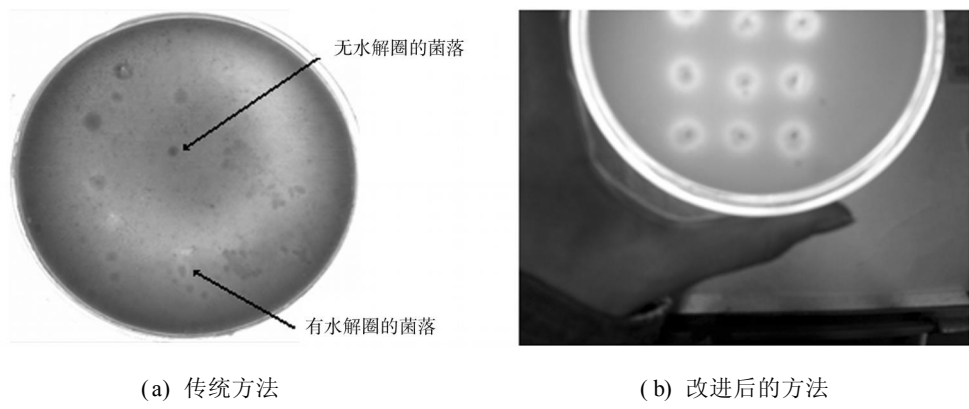


图 1 RBB 染色水解圈比较

Fig. 1 Comparison between the RBB dyeing method and the traditional hydrolyzed zone
其他重金属盐离子干扰细菌的生长. 染色的胶体几丁质平板与没有染色的胶体几丁质平板相比, 可观察到的水解圈的时间较早, 也比较明显, 有利于相对快速的筛选和菌种的保藏.

2.2 几丁质酶基因 *chiA* 的表达

粘质沙雷氏菌的 *chiA* 是一种胞外几丁质酶, 按降解几丁质的作用方式其分属于内切几丁质酶. 目前, 已从多种粘质沙雷氏菌(如 QMB1446, KCTC2172, ATCC27117 等)中克隆出该基因, 并进行了结构分析及异源表达, 但是对此基因的表达调控了解的并不是很清楚. 本实验从构建的克隆载体 pMD*OchiA* 入手, 通过酶切和连接作用将目的基因亚克隆到表达载体 pET*O2b*(+) 上, 构建重组表达质粒 pET*OchiA*. 然后, 把 pET*OchiA*(DH5A)转化到宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 中进行异源表达.

2.3 酶切质粒及表达载体的构建

对 pMD*OchiA* 质粒进行双酶切并回收 *chiA* 基因. 电泳结果显示酶切正确且质粒浓度很高, 如图 2 (a)所示. 对质粒载体 pET*O2b*(+) 进行双酶切, 电泳回收. 酶切后回收纯化的目的 DNA 片段, 纯化的目的 DNA 与质粒在 T4DNA 连接酶的作用下连接, 构建表达质粒 pET*OchiA*. 在此基础上, 继续采用改进的 RBB 染色方法结合酶活测定方法用于筛选产生几丁质酶的菌落.

2.4 转化后的酶切质粒鉴定

从转化子中抽出质粒 pET*OchiA*, 并用 *Hind* III 单酶切及用 *Bam*HI, *Hind* III 双酶切鉴定. 在用 *Bam*HI, *Hind* III 两种限制性内切酶鉴定重组表达质粒 pET*OchiA* 时, 采用同时酶切. 尽管两种限制性内切酶的最适酶切温度不同, 即 *Bam*HI 是 30 e, 而 *Hind* III 是 37 e, 但是 *Bam*HI 在 37 e 也表现同样的酶活性, 因而选用 37 e 作为酶切的反应温度. 酶切反应的缓冲液参照 Takara 公司的限制性酶使用说明书选用 10 倍 K 缓冲液, 因为在缓冲液中 *Bam*HI 的相对活性为 100%, 而 *Hind* III 的相对活性为 200%. 经过多次的酶切实验证明, 该双酶切反应体系稳定, 如图 2(b) 所示.

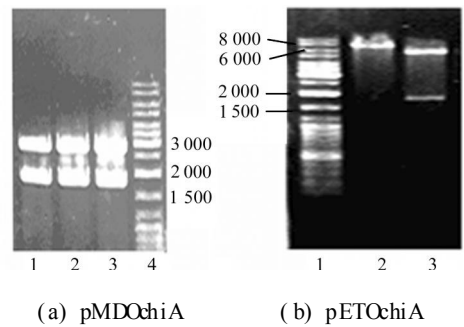


图 2 酶切后电泳结果

Fig. 2 The results of the plasmid after enzyme digesting and electrophoresis

目的基因被亚克隆到 pET 质粒载体上, 受噬菌体 T7 强启动子控制, 其表达需要宿主细胞提供的 T7RNA 聚合酶才能进行诱导. *E. coli* DH5A 中不含有编码 T7RNA 聚合酶的基因, 因此被亚克隆到 pET 质粒载体上的目的基因在 DH5A 中不会表达.

此外, DH5A 转化效率高, 且质粒产量高, 所以适合用于保存带有目的基因的 pET 载体. 因此, 当表达载体 pET*OchiA* 构建好后, 先将其转化到感受态 *E. coli* DH5A 中保存, 保存的甘油体积分数不要超过 8%, 否则重组质粒载体容易突变或丢失. 当需要诱导目的基因表达时, 才从扩培的重组 DH5A 中抽提质粒并转化感受态为 BL21(DE3)pLysS, 继而诱导表达目的基因, 结合改进的 RBB 染色方法和酶活测定方法, 以获得产几丁质酶 *chiA* 酶活力比较高的 *E. coli* 菌株.

鉴定过的阳性转化子送由北京奥科公司测序, 得到 *chiA* 编码基因, 并将该基因的完整编码区成功

提交到国际 Gene Bank 数据库, 获得的登陆号为 DQ493896; Gi94963129.

2.5 诱导表达的几丁质酶酶活

以转入 pETQ22b(+) 空质粒的 *E. coli*, BL21(DE3) pLysS 为对照菌, 在初步优化的诱导条件(诱导剂 IPTG 的浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导温度为 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 转速为 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 诱导时间为 6 h) 下, 测得的胞外几丁质酶的活性是 $25.34 \text{ Lkat} \cdot \text{L}^{-1}$, 比活力为 $56.51 \text{ Lkat} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$. 对照菌、出发菌株的几丁质酶的活性在同样的测定条件下, 测不出来, 可以当作 0.

3 讨论

在通常的酶反应的条件下, 因非酶解作用而释放出 RBB 的数量极小, 使得结果准确性高. 由于 CCO RBB 胶状的特性, 比起固体几丁质染色的底物(Chitin Azure) 来说, 其反应速度要快很多. 尽管 RBB 的价格较贵, 但其可以再生重复利用. 由于 CCO RBB 对微生物无毒害作用, 其还可以直接加入到培养基中, 作为胞外几丁质酶检测的底物. 经该方法制备的 CCO RBB 染色效果很好, 不易脱色, 且不存在其他的重金属盐离子干扰细菌的生长. 所观察到的水解圈的时间较早, 也比较明显, 有利于进行相对快速的筛选, 同时有利于菌种的保藏. 在几丁质酶活性测定中, 酶活不是很高, 可能是宿主对该酶的信号肽的识别并不是很好而造成的^[6], 且文中所测定的酶是未经纯化后的酶. 虽然没有得到高酶活的理想的菌株, 但是成功的实现了诱导表达.

参考文献:

- [1] CHEN H C, CHANG C C, MAU W J, et al. Evaluation of NOacetylchitooligoOsaccharides as the main carbon sources for the growth of intestinal bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 209(1) : 53056.
- [2] UWE T B, JOSEF A, HARTMUT H M. Directed evolution of an esterase: Screening of enzyme libraries based on pHIndicators and a growth assay[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7(6) : 21602173.
- [3] GOMEZ R M, ROJAS A L I. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR, a useful substrate to select chitinolytic microOrganisms and to evaluate chitinases[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(2) : 2130219.
- [4] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [5] 贺淹才, 刘爱花, 张荣奎, 等. 嗜麦芽窄单胞菌产生的几丁质酶的特性[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2008, 29(2) : 240249.
- [6] ROBBINS P W, ALBRIGHT C, BENFIELD B. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase(chit2 nas063) in *Escherichia coli* [J]. Bio Chem, 1988, 263(3) : 4430447.

Improved RBB Dyeing Method Screen Bacteria of Expression of Chintinase ChiA

HE YanCai, LIU AiChua, CHAI SiQie, LIU ZhiQiang

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Remazol brilliant blue (RBB) dyeing method was improved and used to screen and induce chintinas0producing bacteria in colloidal chitin medium of plat0culture. It got useful results. In order to express *Serratia marcescens* chitinase gene chiA in *E. coli* chiA fragment from *Serratia marcescens* was isolated from the plasmid pMD0chiA(DH5A) and insert2ed into the expression vector pETQ22b(+), yielding the expression plasmid pETOchiA. Then the plasmid pETOchiA was transferred into *E. coli* DH5A, the gene was identified, it expressed in BL21(DE3) pLysS, and primary screening was done.

Keywords: remazol brilliant blue; chitinase gene chiA; *Serratia marcescens*; expression

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)