

土壤磷酸酯酶基因的筛选、克隆及酶学性质分析

刘悦¹, 覃炎峰², 李荷^{1*}

(广东药学院 基础学院, 广东 广州 510006)

摘要: 利用宏基因组学的方法构建红树林土壤宏基因组文库, 然后采用以三丁酸甘油酯为底物的功能筛选法对文库进行磷酸酯酶基因的筛选, 并对磷酸酯酶基因进行克隆及酶学性质分析。经筛选获得 1 个具有酯水解活性的阳性克隆子, 该克隆子含有 1 个 1 545 bp 的 ORF, 可编码 514 个氨基酸, 命名为 *phop1545*。该基因表达的蛋白属于新的酯水解酶类亚家族, 其分子质量约为 57 kD。该磷酸酯酶的最适 pH 值为 5.5, 温度为 56 °C, 表明该酶为酸性磷酸酯酶且耐高温。

关键词: 红树林土壤; 宏基因组文库; 磷酸酯酶; 克隆; 表达; 酶学性质

中图分类号: Q7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)03-0070-05

Screening, Cloning and Enzymatic Characterization of Phosphohydrolase from Soil

LIU Yue¹, TAN Yan-feng², LI He^{1*}

(School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A metagenome library of mangrove soil was generated, and a new phosphohydrolase gene from the mangrove soil was screened and cloned, the sequence, phylogeny and enzymatic properties were analyzed. One clone with lipolytic activity was obtained from the metagenome library, which contained a 1 545 bp open reading frame (ORF), encoded a protein of 514 amino acids, and named as *phop1545*. The molecular mass of Phop1545 protein was about 57 kD. The optimum pH of Phop1545 was 5.5, and the optimum temperature was 56 °C, indicating that Phop1545 is acid phosphatase and has tolerance to high temperature.

Key words: mangrove soil; metagenome library; phosphoesterases; cloning; expression; enzymatic characterization

磷酸酯酶通常是指能够催化正磷酸酯化合物水解的一类水解酶。根据其作用时所需氢离子浓度值的不同可分为碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase, AP)和酸性磷酸酯酶(acid phosphatase, AcPase)两大类。研究表明, 当大多数植物受到低磷营养胁迫时, 植株叶片、茎、根甚至是全株的磷酸酯酶活性都会显著提高^[1]。在植物所需的大量元素中, 磷是土壤中最容易被稀释和最不易移动的营养, 但是大部

分磷与 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 等结合成难溶性磷酸盐, 致使 95% 以上的磷成为植物不可利用的无效形式^[2]。据估计, 全世界范围内大约有 43% 的耕地缺磷^[3]。土壤有机磷对土壤肥力和植物营养有重要的影响, 其对植物的作用越来越受关注。因此, 研究植物磷酸酯酶及其在低磷环境中的诱导分泌机制对于植物低磷营养性状的遗传改良和挖掘土壤有机磷资源具有重要意义。

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 广东省科技厅项目(2012B01030002)

作者简介: 刘悦(1987-), 女, 安徽阜阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 微生物与分子生物学。E-mail: gzliuyue2012@163.com

* 通讯作者: 李荷(1968-), 女, 黑龙江绥化人, 教授, 博士, 主要从事微生物水解酶及分子生物学方面的研究。

E-mail: lihe32@163.com

近年来,从环境微生物中发掘新型生物催化剂已成为研究热点,然而环境中的微生物大部分是不可培养的。目前,已知微生物菌株仅占环境微生物总量的7%左右,大大限制了新型生物催化剂的开发和利用^[4]。而宏基因组学利用非培养的分子生物学技术,对某一特定生境中的全部微生物遗传物质总和进行系统研究,从而避开传统工艺的限制^[5]。宏基因组学已经广泛应用于各种环境中新型生物催化剂的筛选^[6]。目前,关于红树林土壤中磷酸酯酶的研究十分缺乏,而从非培养微生物中研究磷酸酯酶的报道更是少见。为此,本研究以红树林土壤这一特殊生境为样本,构建了宏基因组文库,通过功能筛选的方法从文库中筛选出新型磷酸酯酶基因进行克隆,并对其表达蛋白的酶学性质进行初步探索,为后期的工业改造提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为深圳福田红树林自然保护区的植物根泥,于-20℃保存。

1.2 方法

1.2.1 红树林土壤宏基因组 DNA 的提取及纯化 参考文献^[7]中的方法提取红树林土壤宏基因组 DNA,然后用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。采用OMEGA公司的DNA Extraction Kit回收并纯化所提取的土壤基因组DNA。

1.2.2 红树林土壤宏基因组文库的构建及质量评估 采用不同的内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Pst*I、*Eco*R I 对纯化后的红树林土壤基因组DNA进行不完全酶切及酶切时间的优化,最终确定 *Bam*H I 作为基因组DNA的最佳限制性内切酶。对纯化后的基因组DNA用 *Bam*H I 酶切5 h,回收2~8 kb的DNA片段。回收后的基因组片段与载体 pUC118/*Bam*H I(BAP)用 Fermentas T4 DNA Ligase 于22℃连接2 h。连接产物加入0.7倍体积异丙醇混匀,-20℃沉淀过夜。14 000 r/min 离心20 min,弃上清,用80%的乙醇洗涤1次,14 000 r/min 离心,收集管中沉淀,室温晾干。加入10 μL 灭菌的超纯水重悬连接产物。取5 μL 纯化好的连接产物与100 μL *E. coli* DH5α 感受态细胞在2 500 V 电压下电击,电击后立即加入500 μL 46℃预热的SOC培养液,于37℃的摇床上180 r/min 孵育45 min。取适量培养物涂布于LB固体平板上(100 μg/mL Amp、0.1 mmol/L IPTG

和40 μg/mL X-gal),37℃倒置培养过夜。次日随机挑取20个阳性克隆子于5 mL 液体LB培养基(含100 μg/mL Amp)中,过夜培养后采用OMEGA公司的Plasmid Mini Kit提取质粒,用 *Bam*HI对质粒进行酶切,然后电泳检测文库插入片段的大小及多样性。

1.2.3 磷酸酯酶基因的筛选及其序列、系统进化分析 挑取白色克隆子,点板于三丁酸甘油酯筛选(100 μg/mL Amp、1% tributyrin、1% arabic gum)平板上,37℃培养2~3 d,观察菌落周围是否有水解圈。若有水解圈可确定有磷酸酯酶活性。挑选具有水解圈的克隆子,提质粒,酶切验证后送质粒到Invitrogen公司进行序列测定。采用ORF Finder 和BLAST对所测序列进行ORF及同源性分析,再用MEGA 4 软件进行进化分析。

1.2.4 磷酸酯酶基因的PCR扩增和纯化 根据引物设计原则,设计磷酸酯酶基因的上游引物 phop154F: 5'-CGGAATTCATGACAAT-GGGCGAAGAACGAAAAATAACAGGCG-3',下游引物 phop154R: 5'-CCCAAGCTT TCATC-GAGCTCGGTACCCGGGGAT-3'。在上下游引物中分别加入了 *Eco*R I 和 *Hind* III 2个酶切位点及相应的保护碱基。引物由Invitrogen公司合成。以包含磷酸酯酶基因的pUC118-基因组质粒为模板,利用高保真酶 Prime STAR™ Max Premix 进行PCR扩增。扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳后用OMEGA胶回收试剂盒回收、纯化。

1.2.5 磷酸酯酶表达体系的构建及重组菌株的表达 利用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 分别对原核表达载体 pET-32a 及磷酸酯酶基因的PCR产物进行双酶切,37℃酶切10 h。用OMEGA胶回收试剂盒纯化酶切产物。采用T4 DNA Ligase 对双酶切处理的pET-32a及PCR产物进行连接,连接产物导入 *E. coli* BL21 感受态细胞。随机挑取转化子经培养后,提取其质粒并双酶切验证。挑取酶切验证正确的转化子于37℃摇床中培养,当OD₆₀₀达到0.8左右时,加入IPTG,使其终浓度为1 mmol/L,30℃诱导表达16 h。培养好的发酵液离心后收集菌体,去离子水洗涤菌体3次,涡旋振荡至菌体悬浮,冰浴条件下超声破碎菌体细胞10 min,4℃下14 000 r/min 离心5 min,收集上清即得粗酶液。取适量粗酶液进行SDS-PAGE分析。

1.2.6 磷酸酯酶的底物特异性检测 在45℃、pH值7.8条件下,取400 μL反应液[10 μL粗酶液、1 mmol/L底物、1%乙腈、40 mmol/L B-R 酸缓冲液

(pH 值 7.8)] 45 °C 反应 20 min, 每个反应设 3 个平行试验和 1 个空白对照试验。底物分别为对硝基苯酚乙酸酯(C2)、对硝基苯酚丁酸酯(C4)、对硝基苯酚己酸酯(C6)、对硝基苯酚辛酸酯(C8)、对硝基苯酚癸酸酯(C10)、对硝基苯酚月桂酸酯(C12)、对硝基苯酚豆蔻酸酯(C14)、对硝基苯酚棕榈酸酯(C16)。测定磷酸酯酶水解不同碳链的酶活性, 以相对酶活性做图, 观察其底物特异性。

1.2.7 磷酸酯酶的酶学性质研究

1.2.7.1 温度对酶活性的影响 pH 值 7.8 时, 先测定温度为 4、30、40、50、60、70 °C 时磷酸酯酶水解对硝基苯酚丁酸酯的活性, 然后再缩小温度区间, 并在该区间内间隔 0.2 °C 取值, 逐步确定最适温度。

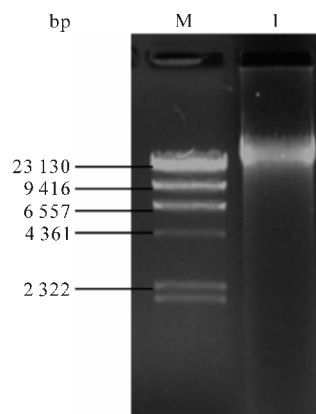
1.2.7.2 pH 值对酶活性的影响 温度 56 °C 时, 先测定 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 时磷酸酯酶水解对硝基苯酚丁酸酯的活性, 然后再缩小 pH 值区间, 并在该区间内间隔 0.5 取值, 逐步确定最适 pH 值。

2 结果与分析

2.1 红树林土壤宏基因组 DNA 的提取及文库构建

如图 1 所示, 提取的红树林土壤宏基因组 DNA 主

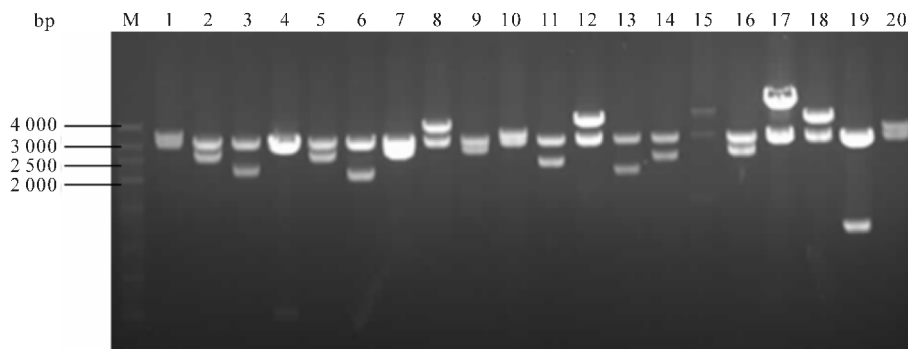
要集中在 23 kb 以上, 且较少降解, 满足构建宏基因组文库的需要。



M, λ DNA/*Hind* III DNA Marker;
1. 未纯化的红树林土壤宏基因组 DNA

图 1 红树林土壤宏基因组 DNA 的电泳结果

蓝白斑平板显示转化情况良好, 红树林土壤宏基因组文库约含 50 000 个阳性克隆子, 随机挑取 20 个阳性克隆子进行质粒提取、*Bam*H I 酶切验证。结果如图 2 所示, 有 19 个克隆子含有插入片段, 表明该宏基因组文库阳性克隆率非常高, 载体自连情况较少, 连接率高达 95%, 插入片段平均大小约 3.5 kb, 且文库基因片段的多样性较好, 文库质量符合后期筛选要求。



M, DL4000 DNA Marker; 1—20. 随机挑选的 20 个阳性克隆子

图 2 20 个随机克隆子的质粒酶切结果

2.2 磷酸酯酶基因的筛选及其序列、系统进化情况

采用以三丁酸甘油酯为底物的功能筛选法对构建的红树林土壤宏基因组文库进行初筛, 从文库中筛选出 1 株有明显水解圈的克隆子, 初步确定其具有酯水解活性。测序所得 pUC118 中的插入片段全长 6 181 bp, 经 NCBI 中的 ORF Finder 分析, 插入片段中含有 1 个磷酸酯酶基因, 全长 1 545 bp, 可编码 514 个氨基酸, 该基因命名为 *phop1545*, 其编码的蛋白命名为 Phop1545。将该基因提交到 GenBank 上, 登录号为 KF767096。经 NCBI 的 BLAST

软件分析, *Phop1545* 与已报道的磷酸酯酶 *Cyclobacterium marinum* DSM 745 (YP 004776312.1) 同源性最高, 为 31%。采用 MEGA 软件对 *Phop1545* 与已知酯水解酶类的进化关系做进一步的分析, 结果显示 *Phop1545* 属于新的酯水解酶类亚家族(图 3), 其丰富了酯水解酶类的基因文库。

2.3 磷酸酯酶基因 *phop1545* 的克隆及表达

图 4 显示, 以 pUC118-基因组为模板, 利用引物 *phop1545*-F/*phop1545*-R 扩增 *phop1545*, 得到 1 条明显的特异性 DNA 条带, 与预期基因大小一致。

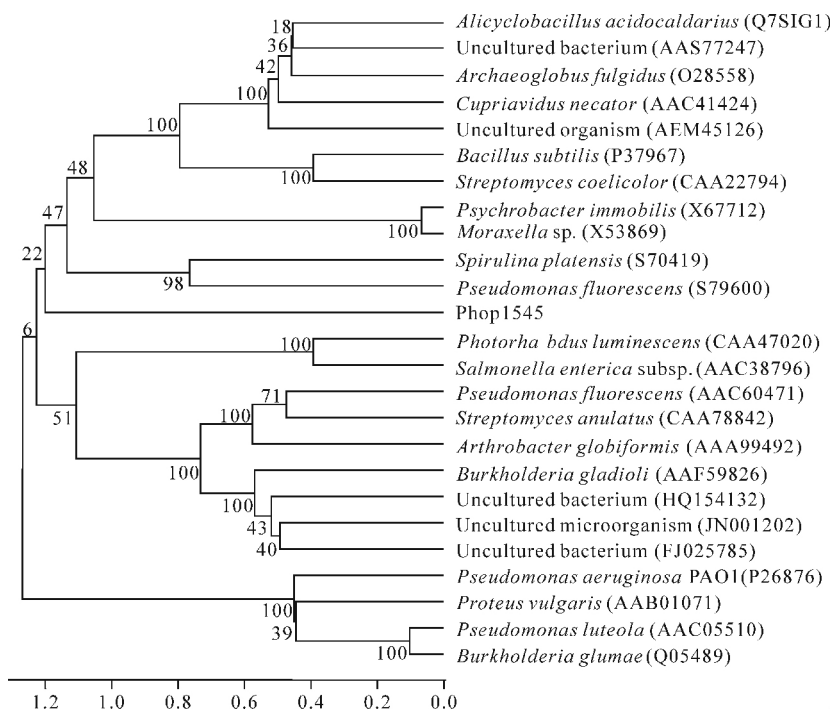
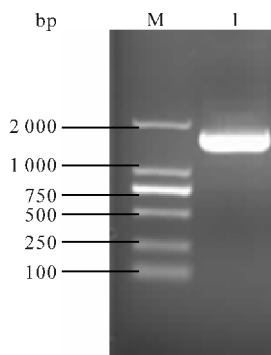


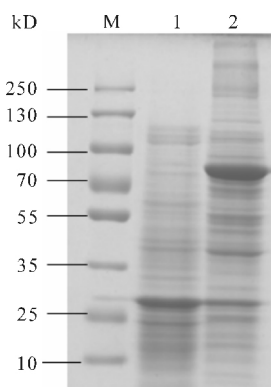
图 3 Phop1545 与亲缘性较近蛋白的系统进化树



M, DL2000 DNA Marker;
1. 基因的 PCR 扩增产物

图 4 *phop1545* 基因的 PCR 扩增产物

图 5 显示,将 *phop1545* 基因亚克隆至表达载体 pET-32a 后,转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞,



M, Protein MW Marker; 1. 未添加诱导剂 IPTG 的表达结果; 2. 添加诱导剂 IPTG 的表达结果

图 5 *phop1545* 表达蛋白产物的 SDS-PAGE 分析

经 IPTG 诱导表达,在 75 kD 处有明显的诱导带,即蛋白分子量为 57 kD,与理论预测大小一致。

2.4 磷酸酯酶 Phop1545 的底物特异性

如图 6 所示,Phop1545 对 C2—C16 的对硝基苯酚酯有不同的水解活性,其中对对硝基苯酚丁酸酯(C4)水解活性最高,其次是对硝基苯酚己酸酯(C6)。

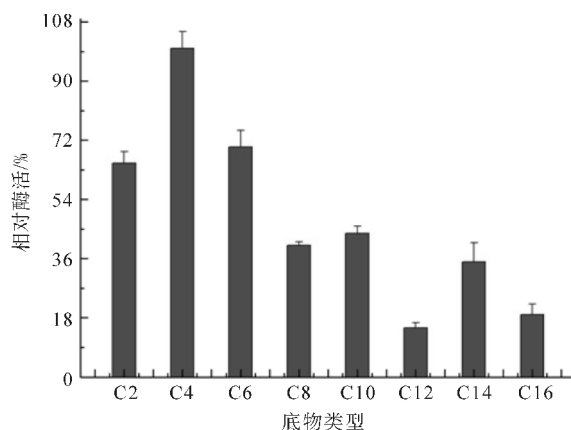


图 6 Phop1545 的底物特异性

2.5 磷酸酯酶 Phop1545 的酶学性质

2.5.1 温度 从图 7 可以看出,随着温度的升高,磷酸酯酶 Phop1545 活性逐渐上升,且在 56 °C 时达到最大值,因此该酶的最适温度为 56 °C,且在温度为 40~65 °C 时,酶活性仍在 50% 以上,说明该酶比较耐高温。

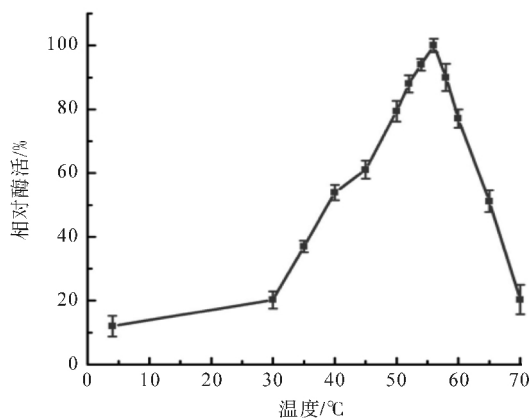


图 7 温度对 Phop1545 活性的影响

2.5.2 pH 值 如图 8 所示,当 pH 值小于 5.5 时,Phop1545 活性随着 pH 值的升高而增加;pH 值达到 5.5 时,酶活性最高;之后随着 pH 值的升高,酶活性逐渐降低;pH 值为 9.0 时,该酶几乎失去活性。根据磷酸酯酶的分类,可以将 Phop1545 归为酸性磷酸酯酶。

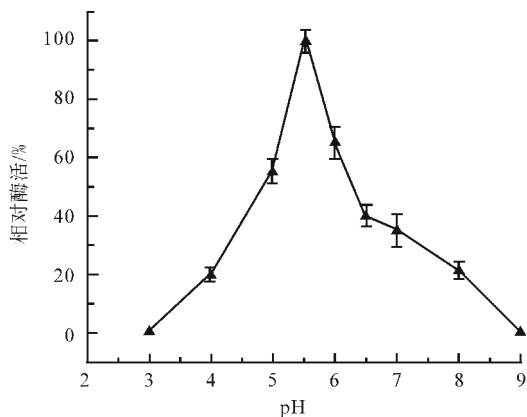


图 8 pH 值对 Phop1545 活性的影响

3 讨论

虽然宏基因组学已经广泛应用于发掘新型基因,且目前已从土壤宏基因组文库中获得大量新基因和新型生物活性物质,但运用宏基因组技术筛选新型功能基因时仍存在很多问题。比如采用功能性筛选方法时,存在不能高通量筛选的技术限制。本研究从构建的含 50 000 个克隆子的红树林土壤宏基因组文库中仅筛选到 1 个新型磷酸酯酶基因。Jiménez 等^[8]从构建的含 20 000 个克隆子的森林土壤宏基因组文库中筛选到 1 个脂肪酶克隆子。Bunterngsook 等^[9]从含 15 000 个克隆子的泥炭沼泽土壤宏基因组文库中也只筛选到 1 个新型脂肪酶基因。汤熙翔等^[10]从深海宏基因组文库的克隆子发酵物中,筛选到 3 个具有细胞毒性的克隆子,筛选概率约为万分之一。

本研究通过构建土壤宏基因组文库筛选到 1 个新型磷酸酯酶基因 *phop1545*,对 Phop1545 与已报道的酯水解酶类的进化关系做进一步分析表明,该基因属于新的酯水解酶类亚家族。后期加入 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 分析显示表达的磷酸酯酶蛋白相对分子质量约为 57 kD,与预测相符。通过对磷酸酯酶 Phop1545 酶学性质的初步探究,该重组蛋白最适反应温度为 56 °C,最适反应 pH 值为 5.5,推断该重组蛋白为酸性磷酸酯酶,耐高温,更具有工业应用价值。酸性磷酸酯酶是植物和土壤中的一种重要的水解酶,研究植物磷酸酯酶及其在植物磷营养胁迫条件时的诱导分泌机制对于植物的种植和育种方面有重要导向作用和功能应用。依靠植物本身分泌的酸性磷酸酯酶很难矿化充足的有机磷以满足植物生长,必要时需要外源的酸性磷酸酯酶,如现在的有机化肥中就添加了酸性磷酸酶,促进植物对土壤中磷的充分利用,以满足植物生长需要。目前酸性磷酸酯酶的生产尚未产业化,性质优良的酸性磷酸酯酶的发掘是一个需要解决的关键问题。本研究下一步工作将对该基因的诱导表达条件进行优化,并对其酶学性质进行更深入的分析,以期获得稳定性更好的酶,为将来实现规模化工业生产提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 李传保,龚守富.植物体内酸性磷酸酶研究进展[J].信阳农业高等专科学校学报,2005,15(3):88-89.
- [2] 李立芹.植物低磷胁迫适应机制的研究进展[J].生物学通报,2011,46(2):13-16.
- [3] 刘建中,李振声,李继云.利用植物自身潜力提高的生物有效性[J].生态农业研究,1994,2(5):16-23.
- [4] 尤忠毓,柳志强,郑裕国.新生物催化剂的筛选与开发[J].基因组学与应用生物学,2009,28(6):1229-1236.
- [5] 陈旭玉,周亚奎,郑服丛.宏基因组技术构建土壤宏基因组文库研究进展[J].广东农业科学,2008(1):32-34,52.
- [6] 阎冰.宏基因组克隆——微生物活性物质筛选的新途径[J].微生物学通报,2005,32(1):113-117.
- [7] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(2):316-322.
- [8] Jiménez D J, Montaña J S, Álvarez D, et al. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28(1):361-370.
- [9] Bunterngsook B, Kanokratana P, Thongaram T, et al. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a peat-swamp forest soil metagenome[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(9):1848-1854.
- [10] 汤熙翔,易志伟,李宁,等.深海宏基因组文库克隆子发酵产物的生物活性筛选[J].中国生物工程杂志, 2011, 31(6):58-63.