

植物乳杆菌 α -葡萄糖基转移酶基因挖掘及表达研究

谢露^{1,2}, 郭丽琼^{1,2}, 林俊芳^{1,2}, 叶志伟^{1,2}, 钟倩婷¹

(1. 华南农业大学食品学院, 食品生物技术研究所, 广东广州 510640)

(2. 广东省微生物生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510640)

摘要: α -葡萄糖基转移酶 (α -GTF) 是一类可以利用麦芽糖, 异麦芽糖, O-甲基葡萄糖苷等为底物合成低聚糖的多功能性酶, 因其功能多样性和独特性而备受关注。本文利用本团队测序的植物乳杆菌 (FMNP01) 全基因组信息, 采用生物信息学方法分析获得 α -葡萄糖基转移酶基因 (α -*gtf*), 同时根据 NCBI 中上传的乳酸菌全基因组信息中的 α -GTF 的 DNA 序列设计引物, 利用 PCR 技术分别从植物乳杆菌、干酪乳杆菌和短乳杆菌中克隆得到 3 个 α -*gtf* 基因, 其编码的氨基酸序列相似性分别为 42%、29% 和 29%; 将克隆得到的 3 个基因分别与表达载体 pET-32a 连接构建表达质粒, 转入大肠杆菌 BL21 表达宿主菌中进行诱导表达, 产物经 SDS-PAGE 分析表明, 在 75 ku 处都有一明显条带, 与预期蛋白分子量一致, 表明这 3 个基因成功获得了表达。同时对诱导剂浓度、诱导时间和温度进行优化, 可望为以后相关研究奠定了基础。

关键词: 乳酸菌; α -葡萄糖基转移酶; 基因挖掘; 原核表达

文章篇号: 1673-9078(2017)2-94-98

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.015

Gene Mining and Expression of α -glucosyltransferase from *Lactobacillus plantarum*

XIE Lu^{1,2}, GUO Li-qiong^{1,2}, LIN Jun-fang^{1,2}, YE Zhi-wei^{1,2}, ZHONG Qian-ting¹

(1. College of Food Science & Institute of Food Biotechnology, South China Agriculture University, Guangzhou 510640, China) (2. Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The α -glucosyltransferase (α -GTF) is a type of multifunctional enzyme that can synthesize oligosaccharides using maltose, isomaltose, and O-methyl glucoside as substrates, and has attracted attention because of its functional diversity and specificity. In this study, the whole genome information of *Lactobacillus plantarum* (FMNP01), which was sequenced by our team, and the bioinformatics approach were used to analyze the α -*gtf* gene obtained from *Lactobacillus*. Meanwhile, the primers were designed based on the DNA sequences of the α -*gtf* gene in *Lactobacillus*, which are listed in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Three α -*gtf* genes were cloned by polymerase chain reaction (PCR) from *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus brevis*, and the similarities of the encoded amino acid sequences were 42%, 29%, and 29%, respectively. The three obtained genes were cloned into vector pET-32a to construct the recombinant pET-32a- α -*gtf*, which were then transformed into the expression host *Escherichia coli* BL21 to induce expression. The fusion proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the results showed that there was an obvious band at 75 ku, consistent with the molecular weight of the predicted protein. The results indicated that three α -*gtf* genes were expressed successfully. Meanwhile, the inducer concentration and induction time and temperature were optimized, and this study is expected to lay the foundation for related studies in the future.

Key words: *Lactobacillus*; α -glucosyltransferase; gene mining; prokaryotic expression

α -葡萄糖基转移酶(α -glucosyltransferase, α -GTF),

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31272217, 31372116); 广东省科技计划项目 (2015030313425, 2015A030310225, 2015A020209121)

作者简介: 谢露 (1989-), 男, 硕士, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 林俊芳, 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向: 微生物与天然产物

通常称为葡聚糖蔗糖酶 (glucansucrase, GS), 属于水解酶 GH70 家族。根据生成糖苷键的特异性, α -GTF 分为 dextranase (DS)、alternansucrase (AS)、mutansucrase (MS) 和 reuteransucrase (RS) 4 类。乳酸菌中已发现的可产生 α -GTF 的种类有链球菌属 (*Streptococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc* spp)、魏斯氏菌属 (*Weissella*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*)^[1,2]。

α -GTF 可用于低聚糖的合成,低聚糖是由 2~10 个单糖通过糖苷键聚合而成的一大类糖,因其对益生菌的增殖作用现已广泛的应用于食品与饲料中。自 Koepsell 等^[3]发现 α -GTF 可以合成低聚糖以来,新型的低聚糖不断的产生,如近来龙胆二糖^[4]、D-甘露糖^[5]或糖类衍生物^[6]相继被葡糖基化而更适应工业需求。此外,在体系中存在多元醇或黄酮类等易被 α -GTF 识别的受体物质,如水杨醇^[7],葡萄糖基可被转移到这些受体物质上进而葡糖基化。一些受体物质被糖基化后,其稳定性、溶解性和生物活性等显著增加^[8]。GTF 具有功能的多样性和独特性,相关的生物工程研究也随之展开,而获得其功能基因也成了首要的问题。鸟枪法^[9],设计简并引物^[10]等传统的基因克隆方法的使用,已成功从蜡样芽孢杆菌^[11]、假丝酵母^[11]、变形链球菌^[12]和乳酸菌^[13]等中克隆出 *gtf* 基因。

国外发达国家对于功能性低聚糖的研究开始较早,新型功能的低聚糖逐步被投放市场,已形成产业化,国内虽一直紧跟其后,但依然存在差距。现代生物技术与传统生产工艺相结合,简化工艺流程,减少污染,增大经济效益,而生产过程中生物酶类所对应的功能基因的挖掘是基因工程中最基本但首要解决的问题。传统方法常以单一研究对象,随机性较强,结果难以预测。随着测序技术的发展,基于对全基因组测序结果的生物信息学分析来进行功能基因挖掘开始成为充分利用生物遗传资源的重要手段,因其简单快捷的特点逐渐取代上述传统获得功能基因的途径。

本研究对本实验室筛得的植物乳杆菌全基因组测序结果进行生物信息学分析,进而通过基因预测获得 α -GTF 基因,同时从 NCBI 上传的乳酸菌全基因组序列中查找出 α -GTF 基因,构建其大肠杆菌表达系统进行功能预测,旨在以乳酸菌全基因组信息为对象,挖掘其中可合成新型低聚糖的 α -GTF 基因,为低聚糖的进一步利用打下基础;同时对这一方法进行功能基因

的挖掘的可行性进行探讨,为为后来研究者提供研究参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

乳酸菌菌株:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* FMNP01)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)均由本团队自主筛选所得。大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 和表达菌株 BL21 由华南农业大学生物技术研究所天然产物实验室保存。表达载体 pET-32a 由中山大学生命学院刘玉焕教授惠赠。pMD18-T 购于 TaKaRa。

1.1.2 试剂

琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒、质粒快速提取试剂盒为 TIANGE 公司产品。限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和蛋白质 Marker 于 TaKaRa 公司购买。其他一般试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 α -葡萄糖基转移酶基因的挖掘

利用本团队测序的植物乳杆菌(*L. plantarum*) FMNP01 全基因组基因信息^[14],使用 SOAPdenovo 短序列组装软件对全基因组信息的 reads 进行组装,对比回组装获得的 Contig 数据,再根据 reads 的 paired-end 和 overlap 关系,对组装结果进行局部组装和优化。利用 Glimmer 3.0 软件对组装好的序列进行基因预测,得到基因组上潜在的基因序列。采用 GO 注释和 NR 库注释相结合的办法对预测基因进行注释,从中获得结果为 *a-gtf* 的基因序列。

1.2.2 α -葡萄糖基转移酶基因 *a-gtf* 的克隆

表 1 α -GTF 基因克隆的引物序列

Table 1 Primer sequences of *a-gtf* genes

序列	引物
<i>a-gtf-pla</i>	P1: 5'-CCGGAATTCATGTATTATTTTGTGAATACCAGC-3'
	P2: 5'-AAGCTTTCATCGCTGTGTTGCCCC-3'
<i>a-gtf-bre</i>	P3: 5'-GAGCTCATGTTTTATTTTATTAATGAAT-3'
	P4: 5'-AAGCTTTTAAAATGAGGTTTTTCAGAT-3'
<i>a-gtf-cas</i>	P5: 5'-GAATTCATGTATTATTTTAAAATGAT-3'
	P6: 5'-GAGCTCCTAATCAACATGCTC-3'

从注释结果中查找 *a-gtf* 序列(AGL962, 1546 bp, 命名为 *a-gtf-pla*)以及在 Genbank 数据库中报道的短乳杆菌 *a-gtf* 序列(AP012167.1, 1524 bp, 命名为

a-gtf-bre)和干酪乳杆菌 *a-gtf* 序列(FM177140.1, 1560 bp, 命名为 *a-gtf-cas*)进行引物设计,如表 1。用上述 3 对引物,以三者基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,

体系为 50 μ L。程序为：94 $^{\circ}$ C，5 min；94 $^{\circ}$ C，30 s；退火温度分别为 57.3、44.8 和 48.8 $^{\circ}$ C，30 s；72 $^{\circ}$ C、100 s；循环 35 次，72 $^{\circ}$ C、10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。引物由上海捷瑞生物工程公司合成。

回收目的片段，将片段与 pMD18-T 连接。连接产物转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞，菌液涂布与 LB 固体平板上(含 Amp⁺ 100 μ g/mL)。37 $^{\circ}$ C 培养 15 h 后挑取单菌落，验证阳性克隆。将阳性克隆送至华大基因测序。

1.2.3 大肠杆菌重组表达载体构建

将克隆载体和表达载体 pET-32a(+)双酶切，分别回收目的基因片段和载体框架，用 T4 DNA 连接酶按 1:8 的比例连接 16 h，产物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。通过筛选与鉴定，获得重组菌株 BL21/pET32a- *α -gtf*。

1.2.4 重组大肠杆菌的诱导表达

将鉴定正确的重组菌株 BL21/pET32a- *α -gtf*，涂布到 LB 固体平板上，37 $^{\circ}$ C 培养过夜，挑单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，按 1:100 的比例接种到 50 mL 含 Amp⁺ 的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养 2.5 h，使菌液 OD 值达到 0.8，加入 IPTG 至终浓度为 1 mM，30 $^{\circ}$ C 诱导表达 3 h，离心收集菌体，破碎，分别对全菌液、菌体破碎上清和菌体破碎沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 α -葡萄糖基转移酶的表达条件优化

按 1.2.3 方法，使 IPTG 终浓度为 0.8、0.6、0.4、0.2 mM，在 30 $^{\circ}$ C 条件下诱导 3 h。选择合适 IPTG 浓度，分别在温度为 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C；时间为 1 h、2 h 和 3 h 的条件下诱导。SDS-PAGE 电泳分析破碎后沉淀与上清液活性检测。

1.2.6 α -葡萄糖基转移酶活性检测

采用蒽酮硫酸法对重组 α -GTF 蛋白进行生物活性测定，加入不同浓度的蔗糖与重组 GTF 蛋白在 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min，OD₆₃₀ 下测定吸光值，灭活 GTF 蛋白作为参照组。

2 结果与讨论

2.1 α -葡萄糖基转移酶基因的挖掘

使用 SOAPdenovo 短序列组装软件对 *Lactobacillus plantarum* FMNP01 全基因组信息进行处理后的 reads 进行组装成为 Contig，再根据相对位置关系组装成为更长的 Scaffold，经过注释后共获得 8 个注释为 *α -gtf* 的序列。基因序列 Blast 结果显示均与 *L.plantarum* ST-III 中的 *α -gtf* 序列相似度为 100%，但

均为直接提交未经验证的序列。利用 COBALT 将与多株链球菌和肠膜明串珠菌的 GTFa 催化活性区域序列进行比对，显示具有共同氨基酸保守序列 KSGIEHAEMKRL，如图 1，同时与 *α -gtf-bre* 和 *α -gtf-cas* 的相似性分别为 42%和 29%。利用 MEGA 5.1 对所选序列构建系统发生树，如图 2，GTF-pla 与 GTF-cas 较近缘，与同源比对结果一致，进化距离分别约为 0.555 和 0.696，且进化速率与二者的不同。CDD 分析氨基酸序列比对结果显示，保守区域氨基酸与 GtfA 有较高同源性，都属于 GT-1 型超级家族，PredictProtein 分析也表明三者氨基酸序列具有相同的二级结构。



图 1 氨基酸序列对比分析

Fig.1 Comparison of amino acid sequences

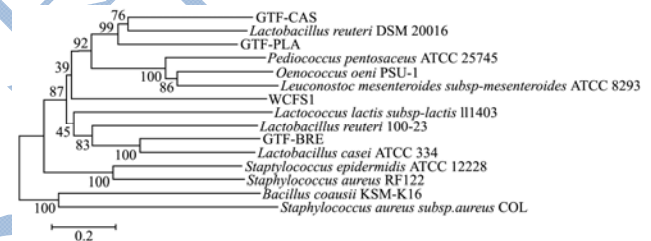


图 2 系统发育树构建

Fig.2 Phylogenetic tree of GTF-A

2.2 α -葡萄糖基转移酶基因克隆质粒构建

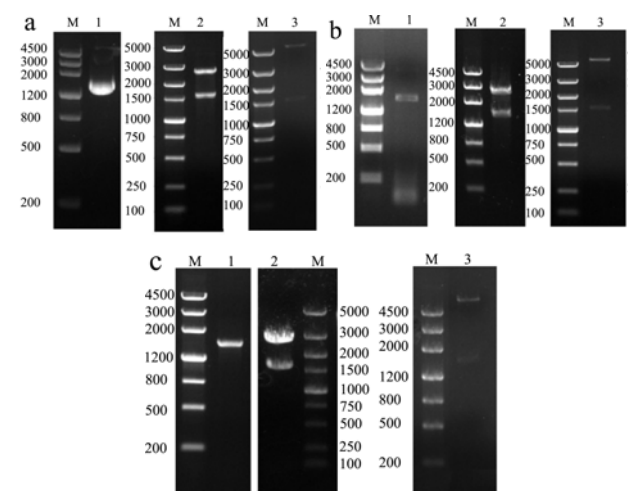


图 3 *α -gtf* 基因克隆和表达质粒鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmids pMD18-T- *α -gtf* and pET-32a- *α -gtf*

注: M 表示 Marker; a 表示 PCR 产物; b 表示 pMD18-T- α -gtf 双酶切; c 表示 pET-32a- α -gtf 双酶切。

以表 1 中的 3 对引物, 通过 PCR 扩增 α -gtf 基因, 1%琼脂糖凝胶电泳, 结果分别如图 3 中条带 1 所示, 显示长度约为 1500 bp 的单一 DNA 条带, 与设计的目的片段长度都相符。连接 PMD18-T 构成的质粒 α -gtf-T 进双酶切后分别形成 2 条带, 如条带 2 所示, 结果与目的条带大小一致。 α -gtf-pla 测序结果比对显示与 *L.plantarum* ST-III 的 α -gtf 基因序列 (gb|CP002222.1|) 相似度 100%, α -gtf-bre 和 α -gtf-cas 与 NCBI 上挑选的模板序列相似度 100%, 表明已成功克隆得到三种乳杆菌的 α -gtf 序列。

2.3 大肠杆菌重组表达载体构建

将回收的 α -gtf 基因片段和载体 pET-32a 片段以特定的比例进行连接后, 转化至相应的宿主 *E.coli* DH5 α 中进行转化, 挑取转化子并提取质粒进行双酶切验证。重组质粒 pET32a- α -gtf 经双酶切后, 都可得到 5900 bp 和 1550 bp 左右的两条带, 由图 3 中条带 3 可知, 目的片段已经正确连接至质粒 pET-32a 中, 同时测序结果表明 pET32a- α -gtf 重组质粒构建成功。

2.4 重组大肠杆菌的诱导表达

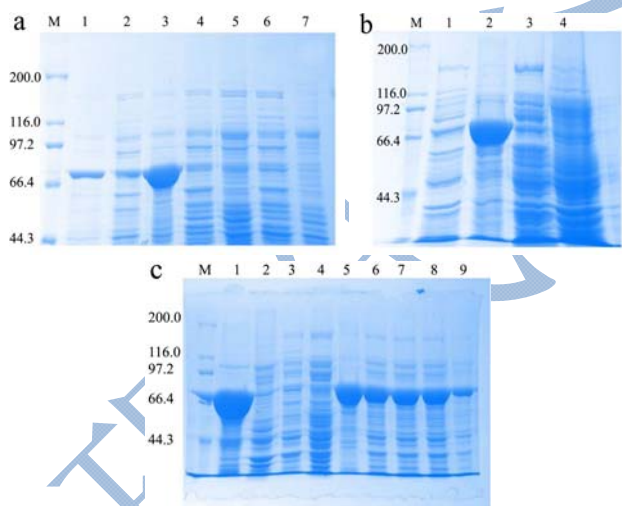


图 4 α -GTF 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of α -GTF proteins

注: a 表示 α -GTF-pla; M 表示 Marker; 1 表示诱导全菌液; 2 表示诱导上清; 3 表示诱导沉淀; 4 表示未诱导上清; 5 表示未诱导沉淀; 6 表示空 PET-32a 载体上清; 7 表示空 PET-32a 载体沉淀。b 表示 α -GTF-bre; 1 表示诱导沉淀; 2 表示诱导上清; 3 表示未诱导上清; 4 表示未诱导沉淀。C 表示 α -GTF-cas; 1 表示诱导沉淀; 2 表示诱导上清; 3 表示未诱导上清; 4 表示未诱导沉淀; 5 表示复性后; 6 表示 0.8 mM IPTG; 7 表示 0.6 mM; 8 表示 0.4 mM; 9 表示 0.2 mM。

将成功构建的 3 个重组质粒 pET32a- α -gtf 转入 *E.coli* BL21 中, 挑取单菌落摇瓶诱导培养。收集菌体破碎离心取上清, 上清经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 结果如图 4。3 种蛋白预测大小分别为 58.3 ku、58.2 ku 和 58.6 ku, 加上 6 个 His 标签, 大小与图中条带大小一致, 约为 75 ku。由此可说明 α -GTF 酶在 *E.coli* BL21 中得到了成功表达。但表达的蛋白大量出现在破碎的菌体沉淀中, 上清中量极少, 可见形成了不溶性包涵体。对上清液和沉淀进行酶活检测, 显示无活性。

2.5 α -葡萄糖基转移酶的诱导表达条件优化

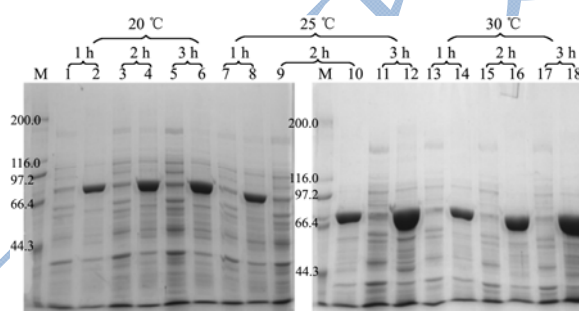


图 5 α -GTF-pla 诱导条件优化

Fig.5 Optimization of induction conditions for α -GTF-pla expression

包涵体的形成原因是多方面的, 通常与发酵条件有关和基因结构有关, 故采用对发酵时间、温度和诱导剂浓度优化的方式来减少包涵体的产生。选择 α -GTF-pla 对其诱导条件进行优化。在摇瓶诱导培养过程中, 使 IPTG 终浓度为 0.8、0.6、0.4 和 0.2 mM, 在 30 °C 条件下诱导 3 h, 破碎后沉淀 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 结果如图 4c 条带 6~9 所示。当 IPTG 浓度为 0.2 mM 时, 虽仍有包涵体生成, 相比其它浓度生成的量较少, 故在 IPTG 浓度为 0.2 mM 的条件下进行诱导时间和温度的优化, 分别在温度为 20 °C、25 °C 和 30 °C; 时间为 1 h、2 h 和 3 h 的条件下诱导。SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果如图 5 所示。3 个温度下分别的诱导 1 h、2 h 和 3 h, 蛋白质大量仍存在破碎沉淀中, 形成包涵体。对上清液和沉淀进行酶活检测, 低温短时间诱导依然不能获得可溶性活性蛋白。利用 PredictProtein 对三条氨基酸序列进行二级结构预测, 无二硫键及脯氨酸键等特殊结构, 故包涵体的形成和缺少折叠相关的酶类可能性较小。为获得 α -GTF 的可溶性表达, 下一步研究可尝试增加融合标签以增强其溶解性和运转信号传导^[12]。

3 结论

α -GTF 因其功能的独特性和多样性在饲料、食品和医药等工业领域有着广泛的应用前景, 相关的生物工程的研究也随之展开。本研究通过对本实验室植物乳杆菌全基因组测序结果进行基因功能挖掘, 以及在 NCBI 中上传的干酪乳杆菌和短乳杆菌全基因组序列中获得 α -gtf 基因序列, 采用 PCR 技术成功从三种乳酸杆菌中克隆获得 3 个 α -gtf 基因, 其核酸序列都与 NCBI 中同种菌株序列相似度为 100%, 说明该基因在进化过程中较为保守, 与菌株生长密切相关, 而不同种间同源性较低, 虽都为同一家族, 可能合成不同糖苷键。三段氨基酸保守序列比对分析结果显示与 GTFA 催化活性区有较高的同源性。GTFA 和其他糖基转移酶在结构上有较高的相似度, 克隆得到的 α -gtf 基因因其 N 端的催化活性区, 具有催化蔗糖水解的活性, 能够催化蔗糖产生葡聚糖。表明通过对全基因组序列的生物信息学分析可获得含特定保守区域的功能基因。将克隆片段连接到表达载体 pET-32a, 并在 *E.coli* BL21 中成功进行诱导表达。SDS-PAGE 分析表达产物表明蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中, 对表达条件优化以及结构分析表明, α -GTF 包涵体形成的原因最主要的原因是大肠杆菌 pET 系统表达速率过快, 形成的蛋白来不及折叠形成活性的空间结构, 同时表达的速度远远快于宿主转运蛋白的速度, 导致大量聚集形成不溶性包涵体。

参考文献

- [1] Tiekink M, Kaditzky S, Valcheva R, et al. Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(3): 692-702
- [2] Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, et al. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria [J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11(9): 675-685
- [3] Koepsell H J, Tsuchiya H M, Hellman N N, et al. Enzymatic synthesis of dextran acceptor specificity and chain initiation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1953, 200(2): 793-801
- [4] Côté G L. Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness [J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(2): 187-190
- [5] Côté G L, Cormier R S, Vermillion K E. Glucansucrase acceptor reactions with D-mannose [J]. *Carbohydrate Research*, 2014, 387: 1-3
- [6] Richard G, Morel S, Willemot R, et al. Glucosylation of α -butyl- and α -octyl-D-glucopyranosides by dextransucrase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* [J]. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(9): 855-864
- [7] Yoon S, Fulton D B, Robyt J F. Enzymatic synthesis of two salicin analogues by reaction of salicyl alcohol with *Bacillus macerans* cyclomaltodextrin glucanyltransferase and *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextransucrase [J]. *Carbohydrate Research*, 2004, 339(8): 1517-1529
- [8] André I, Potocki-Véronese G, Morel S, et al. Sucrose-utilizing transglucosidases for biocatalysis [J]. *Topics in Current Chemistry*, 2010, 294(294): 25-48
- [9] Jorasch P, Wolter F P, Zähringer U, et al. A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1, 2-diacylglycerol: expression of ypfP in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products [J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(2): 419-430
- [10] Solaiman D K Y, Liu Y, Moreau R A, et al. Cloning, characterization, and heterologous expression of a novel glucosyltransferase gene from sophorolipid-producing *Candida bombicola* [J]. *Gene*, 2014, 540(1): 46-53
- [11] Ko J H, Kim B G, Joong-Hoon A. Glycosylation of flavonoids with a glycosyltransferase from *Bacillus cereus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 258(2): 263-268
- [12] 汪林, 储冰峰, 王成龙, 等. IPTG 诱导变形链球菌葡糖基转移酶可溶性表达及活性初步测定 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2010, 8(2): 94-97
WANG Lin, CHU Bing-feng, WANG Cheng-long, et al. IPTG induction of the soluble catalytic region of *S.mutans* expression and activity assay [J]. *Chinese Journal of Geriatric Dentistry* March, 2010, 8(2): 94-97
- [13] Kralj S, van Geel-Schutten G H, Dondorff M M G, et al. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains [J]. *Microbiology*, 2004, 150(11): 3681-3690
- [14] LI Xue-Fei, LIAO Xue-Yi, LIU Yong-Feng, et al. Complete genome sequence of probiotic *Lactobacillus plantarum* strain FMNP01, isolated from mango fruit [J]. *Genome Announc*, 2014, 2(6): 1207-1214