

深海沉积物宏基因组文库中产蛋白酶克隆的 筛选及性质分析*

郭巧玲¹ 杨祥胜² 赵晶³ 曾润颖^{3**}¹漳州职业技术学院 漳州 363000²厦门大学生命科学学院 厦门 361005³国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005

摘要 提取东太平洋深海沉积物宏基因组DNA, 构建了未培养微生物宏基因组文库. 该文库平均插入片段30 kb以上, 含有7 000个克隆, 含外源DNA总长度约为210 Mb. 从文库中筛选到18个产胞外蛋白酶的克隆, 16S rRNA分析表明, 它们分别来源于假单胞菌(*Pseudomonas*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)和弧菌(*Vibrio*) 3个菌属. 根据活性大小及来源菌株的16S rRNA序列比较, 选择10个蛋白酶进行酶学性质分析, 结果表明, 它们的最适作用pH值在7~10之间, 最适作用温度在10~40 °C之间. 其中Pro20蛋白酶最适作用温度最低, 为10 °C; Pro1蛋白酶具有最适作用温度低(20 °C)、pH耐受性好、热稳定性较好等特性, 具有良好的应用开发潜力. 图6 参16

关键词 深海沉积物; 宏基因组文库; 蛋白酶; 低温酶

CLC Q785 : Q936 : Q178.533

Screening and Characterization of Protease from Metagenomic Library of Deep Sea Sediment*

GUO Qiaoling¹, YANG Xiangsheng², ZHAO Jing³ & ZENG Runying^{3**}¹Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, Fujian, China²School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China³Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration of China, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract Metagenomic cosmid library, containing 7 000 clones with more than 30 kb inserts and covering about 210 Mb metagenomic DNA of uncultured microorganisms from the deep sea sediment of east Pacific, was constructed, and 18 independent clones expressing protease activity were isolated from the library. The analysis of 16S rRNA showed that these proteases originated from *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Vibrio*, respectively. Ten proteases were selected for further study based on the comparison of their activities and 16S rRNA sequence. The results indicated that the optimal pH and temperature for their activities ranged between 7~10 and 10~40 °C, respectively. The Pro20 protease had the lowest optimal temperature at 10 °C. The Pro1 protease had better potential for exploitation owing to some virtues including high activity at low temperature, better resistant for high pH and temperature. Fig 6, Ref 16

Keywords deep sea sediment; metagenomic library; protease; cold-adapted enzyme

CLC Q785 : Q936 : Q178.533

微生物是酶制剂的重要来源, 迄今为止, 已从包括真菌、细菌、古菌、噬菌体等微生物中获得了大量的酶, 其中有些酶已经投入应用^[1, 2]. 但普通酶在许多实际生产条件下无法保持其活性, 因此在高温、低温等特殊条件下具有活性的极端酶受到重视^[3~5]. 海洋蕴藏着丰富的微生物资源, 其中大部分仍未得到认识与研究, 尤其是在深海、极地等极端海洋环境中, 这些微生物成为筛选新型极端酶的资源宝库. 传统的微生物酶筛选方法是通过对人培养的方法, 但自然界中的

微生物仅有不到1%可以在现有的技术下得到培养, 这大大限制了新酶的筛选和开发. 近年来, 宏基因组技术在该领域中得到了越来越多的应用. 该技术通过直接提取环境样品中混合微生物宏基因组DNA, 利用可培养的宿主细菌构建宏基因组文库, 通过各种筛选方法来获得能产生活性代谢产物的目的克隆. 目前, 已经有一些从宏基因组文库中获得酶基因的报道, 包括纤维素酶^[6]、几丁质酶^[7]、淀粉酶^[8]、酯酶^[9]、脂肪酶^[10]等, 这些酶基因大多数是从土壤和海水样品所构建的宏基因组文库中得到的. 我们也从南极深海沉积物的宏基因组DNA中得到了低温脂肪酶基因^[11]. 这些研究说明宏基因组技术已成为从环境中寻找新酶基因的有效手段.

蛋白酶是一类非常重要的工业用酶, 在洗涤、食品、纺织、制革、医药等各个工业领域都能得到应用. 与普通的中温蛋白酶相比, 低温蛋白酶在低温下具有较高的催化效率, 具

收稿日期: 2008-05-26 接受日期: 2008-10-24

*国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(No. 2007AA091407)、中国大洋矿产资源研究开发协会(COMRA)项目(No. DYXM-115-02-2-04)和福建省自然科学基金项目(No. 2006J0365)资助 Supported by the National High-tech R & D Program of China (“863” Program, No. 2007AA091407), the Project of China Ocean Mineral Resources R & D Association (COMRA) and the Provincial Natural Science Foundation of Fujian, China (No. 2006J0365)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn)

有广泛的应用,例如在洗涤业中可使日常的洗涤节省大量能源消耗,在食品工业中可以在不破坏食品品质的情况下进行蛋白制品的加工.但在利用宏基因组筛选新蛋白酶方面,由于蛋白酶对宿主细胞具有毒害作用,因此目前成功的报道很少.深海常年的低温环境、动物尸体的沉积等都使其成为筛选低温蛋白酶的良好来源.本文通过构建深海沉积物宏基因组文库,从中获得了产低温蛋白酶的克隆,对其来源菌株的多样性进行了分析,并对其所产酶的性质进行了研究.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

SuperCos 1 Cosmid Vector kit和Gigapack III XL Packaging Extract购自Stratagene公司;T₄ DNA连接酶购自TaKaRa公司.样品为采用多管采样器采集自东太平洋5 378 m深的海底沉积物(157°24'E, 19°30'N).样品采集后保存于-20 °C,带回实验室在无菌超净台内去除表层后进行分装,转移至-80 °C保存.

1.2 宏基因组DNA提取及文库构建

沉积物总DNA提取方法采用原位裂解法,参照文献[12]略加修改.在5 g样品中加入核酸提取缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 100 mmol/L Na₂-EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L Na₃PO₄缓冲液(pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB]和蛋白酶K(终浓度200 μg/mL),并加入溶菌酶(终浓度1 mg/mL)和2% SDS,混合均匀,于摇床中50 °C低速振荡过夜;裂解液经13 000 r/min离心5 min后,在上清液中加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液抽提,将上层水相移入新的离心管,用0.3 mol/L醋酸钠(pH 5.2)和2倍体积的预冷的无水乙醇进行沉淀,将沉淀溶解于1 mL重蒸水,所得溶液即为DNA粗提液,于-20 °C保存.采用脉冲电泳对DNA大小进行检测,并回收相应的片段进行宏基因组文库构建.宏基因组文库的构建参照试剂盒说明书进行,主要步骤如下:采用脉冲电泳对所提取的宏基因组DNA进行电泳(电压:450 V,脉冲时间:0.8 s,电流:110~120 mA,时间:3~4 h),电泳结束后切下大小在30~45 kb之间的目的DNA,用低熔点琼脂糖酶进行回收.回收后的DNA补平后与试剂盒所提供的pWEB::TNC Cosmid载体连接.连接产物与包装蛋白进行包装后,加入500 μL噬菌体稀释液混匀,并加入25 μL氯仿后于4 °C保存.以10 μL已包装的Cosmid为单位,分批次转染宿主菌*E. coli* EPI 100-T1,并涂布于LB(含200 μg/mL Amp)的培养基上进行培养,取适量新鲜LB培养基加入培养皿,用涂布棒将菌株全部刮下来,加入甘油(终浓度20%),分装保存于-70 °C.

1.3 产酶克隆筛选及酶液制备

取10 μL保种的文库,用LB培养基进行扩大培养,培养液经稀释后涂布于筛选培养基(含1% NaCl, 1.5%脱脂奶粉, 0.5%酵母膏, 1.5%琼脂粉, 100 μg/mL氨基青霉素)上,以插入空载Cosmid质粒的宿主菌做为阴性对照,于30 °C条件下培养16 h以上.将形成透明圈的阳性克隆接种于LB液体培养基中,于30 °C培养至D_{600 nm}值约为0.8后加入灭菌的脱脂奶粉至终浓度为1%,继续培养8 h后离心,取上清液用滤纸片法转接到固体筛选培养基上进行产胞外蛋白酶能力的进一步验证.剩余的上清液经硫酸铵沉淀,取40%~70%饱和度的上清液作为

初步纯化的待测酶液进行性质分析.

1.4 蛋白酶性质分析

蛋白酶活性测定采用Folin试剂显色法进行^[13].以1 mL酶液在30 °C、pH 8条件下每min水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸所需的酶量定义为一个酶活力单位(u).

以1%的酪蛋白溶液作为测量蛋白酶活力的底物溶液,分别在0、10、20、30、40、50、60 °C的温度下测定蛋白酶的活力,以分析温度对酶活力的影响.

分别以pH 5~12的不同的磷酸钠缓冲液(pH 5~8)、Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8~12)配置1%的酪蛋白溶液作为测量蛋白酶活力的底物溶液,在30 °C温度下测定蛋白酶活力,以分析pH值对蛋白酶活力的影响.

将各蛋白酶液置于50 °C分别保温10、20、30、40、50、60 min和2 h,之后在pH 8的Tris-甘氨酸缓冲液中,于30 °C下检测蛋白酶剩余活力的大小,以此分析蛋白酶的热稳定性.

2 结果

2.1 宏基因组文库构建

采用土壤原位裂解法提取南极环境样品中微生物总DNA,最大限度地获取样品中总DNA,减少了不易裂解的微生物DNA的流失,同时所得DNA片段在48 kb以上,满足构建Cosmid文库的要求(图1).

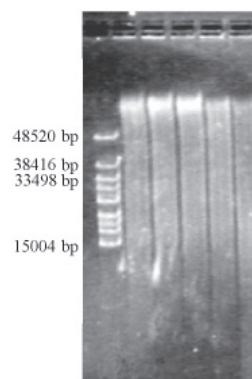


图1 深海沉积物宏基因组DNA脉冲电泳检测
(分子量标准为: λ mix DNA)

Fig. 1 The pulse field gel electrophoresis of metagenomic DNA of deep sea sediment (DNA marker: λ mix DNA)

所构建的文库包含约7 000个克隆,随机挑取30个Cosmid文库克隆,提取质粒后,以BamH I进行酶切,部分克隆酶切片段的电泳结果如图2所示.对此质粒酶切图谱进行分析计算,扣除Cosmid载体片段(8.7 kb),该文库克隆的平均插入片段大小在30 kb以上,至少包含了210 Mb的DNA信息.

2.2 产蛋白酶克隆筛选及16S rRNA序列分析

取10 μL保种的文库,用LB培养基进行扩大培养,培养液经稀释后涂布于筛选培养基上,结果获得30株有明显水解透明圈的克隆,在这些克隆的发酵上清液中可检测到明显的蛋白酶活性,表明其均为胞外酶.提取这30个克隆的质粒,经Plasmid-safe ATP-Dependent DNase处理后,利用通用细菌引物27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')和1492R (5' GGTTACCTTGTACGACTT 3')^[14]扩增16S rRNA基因. PCR

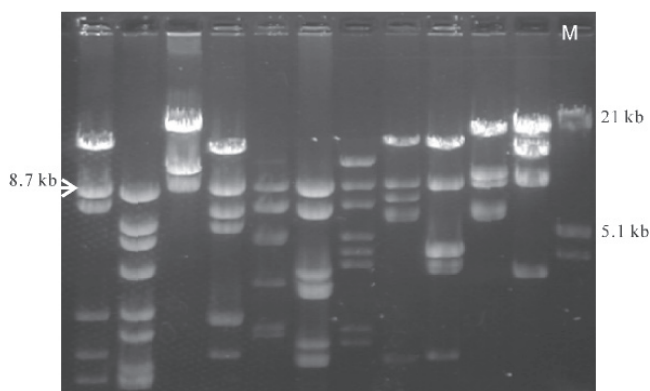


图2 所构建文库部分克隆BamHI酶切结果

Fig. 2 Part of the BamHI digestion results of cosmid library M. λ DNA/EcoRI+HindIII; 其余为克隆酶切后的结果 M: λ DNA/EcoRI+HindIII; Other lanes for the digestion results

产物经过Afa I和Msp I完全酶切后进行图谱比较, 结果发现30个克隆分属于18个不同的谱型, 将这18个16S rRNA产物进行测序. 与GenBank数据库中序列进行比对的结果表明, 这些产蛋白酶的菌株分别来自假单胞菌(*Pseudomonas*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)和弧菌(*Vibrio*) 3个菌属, 其中属于寡养单胞菌属的克隆最多, 但其序列同源性均较低. 在系统发育树(图3)上来看, 一些克隆所处的分支的置信度值比较低, 这些序列可能来源于新的菌株.

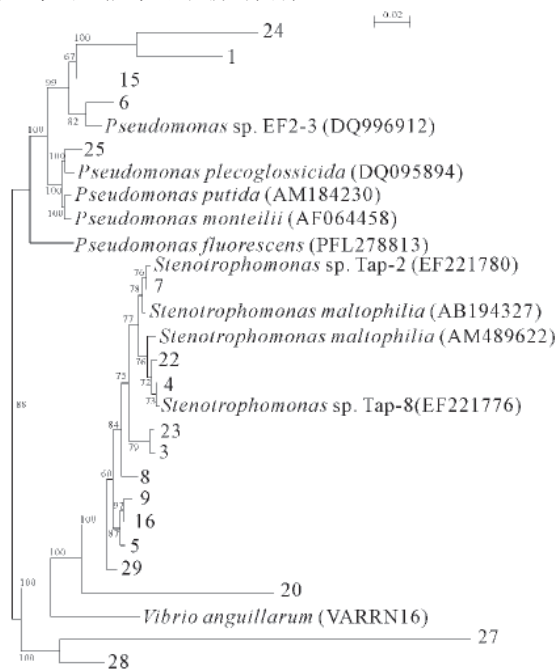


图3 产蛋白酶克隆16S rRNA基因的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA of clones producing protease

2.3 蛋白酶性质

根据16S rRNA序列的比较以及在筛选培养基上产生的透明圈大小, 选取10个在进化树上差距较大、活性也较大的阳性克隆作为研究对象. 结果表明, Pro20蛋白酶的最适作用温度最低, 为10~20 °C, Pro1、Pro4、Pro25和Pro27蛋白酶的最

适作用温度为20 °C, 另外有2个克隆(Pro6、Pro8)和3个克隆(Pro15、Pro24、Pro28)所产的蛋白酶分别在30 °C和40 °C时活力最高. 除了Pro5、Pro6、Pro25和Pro28蛋白酶以外, 其它蛋白酶在5 °C均保留了较高的相对活力. 对4个最适作用温度在30 °C以下的蛋白酶绘制了不同温度下的酶活力曲线(图4), 结果表明, 除了Pro1以外, 其余的蛋白酶在高于最适作用温度的条件下, 酶活力的降低相对更缓慢一些, 表现出与其它低温蛋白酶略有不同的性质.

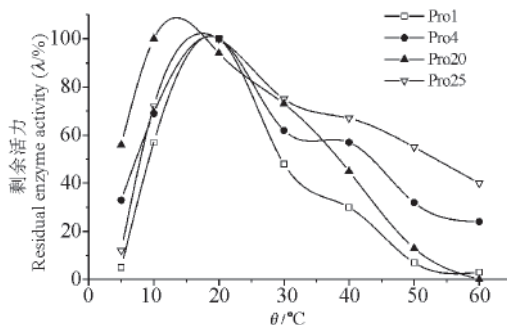


图4 温度对部分蛋白酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activities of some proteases

对所选的蛋白酶的最适作用pH值进行测定, 结果有6个蛋白酶的最适作用pH值在7~8之间, 属中性蛋白酶, Pro1、Pro4、Pro25这三个蛋白酶的最适作用pH在9~10之间, 属于碱性蛋白酶. Pro1和Pro24两个蛋白酶的碱耐受性最好, 在pH 11时能保持约50%的剩余活力(图5).

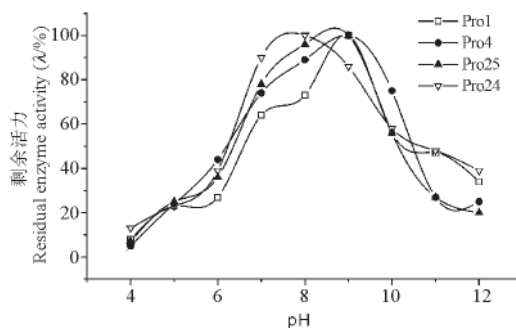


图5 pH对部分蛋白酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on activities of some proteases

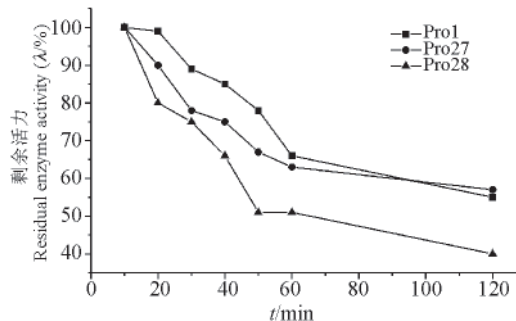


图6 部分蛋白酶的热稳定性

Fig. 6 Effect of temperature on stability of some proteases

将初步纯化后的各蛋白酶在50 °C保温后, 测定剩余的相对酶活力, 结果表明, Pro1、Pro27、Pro28这三个蛋白酶的热

稳定性较好, 在50 °C保温120 min后仍保持大约50%的剩余活力(图6), 而Pro15、Pro20、Pro25这3个蛋白酶的热稳定性最差, 在50 °C保温50~60 min后即基本丧失活力。

3 讨论

通过宏基因组DNA进行酶筛选主要有两种方法: 一种是通过设计引物或探针进行筛选, 另一种是功能驱动筛选, 直接获得表达酶基因的克隆。相比之下, 后者获得新酶的几率较大。但蛋白酶由于对宿主细胞具有毒害作用, 目前从宏基因组文库中筛选可表达蛋白酶克隆的研究报道很少。本选取5 378 m水深海底沉积物, 构建了一个插入片段约为35 kb, 至少包含900 Mb遗传信息的Cosmid文库。对文库进行蛋白酶活性克隆筛选的结果表明, 虽然大片段文库的构建难度相对较大, 获得的克隆数也较少, 但是由于Cosmid本身不是表达载体, 因此较大的插入片段有助于获得可直接表达酶基因的克隆。而其中一些酶最适作用温度很低(图4), 表现出了特殊的性质, 有可能是新的酶, 其基因和蛋白结构值得进一步研究。此外, 筛选结果也表明该深海样品中产蛋白酶的微生物多样性较为丰富, 主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

深海5 000 m以下的环境温度约为3~4 °C, 而从所获蛋白酶的性质来看, 它们的最适作用温度都高于环境温度, 其中Pro6、Pro8蛋白酶的最适作用温度为30 °C, Pro15、Pro24和Pro28这3个蛋白酶的最适作用温度为40 °C。这些结果预示着这些基因并非来源于深海“土著”菌种, 这些外来菌种在低温条件下的代谢水平较低, 而所获的蛋白酶在低温下都能保持较高的剩余活力, 能维持这些菌种在低代谢水平下的生长需要。

一般说来, 低温酶的热稳定性都较差, 而且酶的最适作用温度越低, 对高温越敏感^[15, 16]。而我们所获得的蛋白酶中, Pro1、Pro27、Pro28的热稳定性较好, 其中除了Pro28蛋白酶的最适作用在40 °C以外, Pro1和Pro27的最适作用温度为20 °C(图4)。此外, 对4个最适作用温度在30 °C以下的蛋白酶绘制了不同温度下的酶活力曲线(图4), 结果表明, 除了Pro1以外, 其余的蛋白酶在高于最适作用温度的条件下, 酶活力的降低反而相对更缓慢一些, 表现出与其它低温蛋白酶不同的性质。这些结果表明, 这些酶基因可能源自外来菌种在适应深海低温环境过程中所产生的变异, 值得进一步研究。

通过温度对蛋白酶活力的研究, 我们发现Pro20蛋白酶的最适作用温度为10~20 °C, 是目前报道中最低的, 其基因序列和蛋白结构具有较好的研究意义。目前投入工业应用的大多数是碱性蛋白酶, 在所获得的蛋白酶中, Pro1、Pro4和Pro25蛋白酶最适作用温度较低(20 °C), 最适作用pH为9~10, 属低温碱性蛋白酶。尤其是Pro1蛋白酶具有较好的pH耐受性, 在pH 11的条件下保持50%剩余活力(图5), 还具有较好的热稳定性(图6), 因此具有良好的应用开发潜力, 本实验所建立的宏基因组文库包含了大量(至少900 Mb)的遗传信息, 遗

传多样性也较为丰富, 除了本研究所获得的蛋白酶以外, 该文库还可为筛选其他酶类或生物活性物质提供良好的平台。

References

- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**: 345~351
- Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M, Legge RL. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 2008, **19**: 771~783
- Antranikian G, Vorgias CE, Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, **96**: 219~262
- Egorova K, Antranikian G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Curr Opin Microbiol*, 2005, **8**: 649~655
- Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresour Technol*, 2003, **89**: 17~34
- Voget S, Steele HL, Streit WR. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol*, 2006, **126**: 26~36
- Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2553~2557
- Richardson TH, Tan X, Frey G, Callen W, Cabell M, Lam D, Macomber J, Short JM, Robertson DE, Miller C. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 26501~26507
- Kourist R, Hari Krishna S, Patel JS, Bartnek F, Hitchman TS, Weiner DP, Bornscheuer UT. Identification of a metagenome-derived esterase with high enantioselectivity in the kinetic resolution of arylaliphatic tertiary alcohols. *Org Biomol Chem*, 2007, **5**: 3310~3313
- Hong KS, Lim HK, Chung EJ, Park EJ, Lee MH, Kim JC, Choi GJ, Cho KY, Lee SW. Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**: 1655~1660
- Zhang JW (张金伟), Zeng RY (曾润颖). Cloning, expression and characterization of the cold active lipase (Lip3) from metagenomic DNA of an Antarctic deep sea sediment. *Prog Biochem & Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2006, **33**: 1207~1214
- Zeng R, Zhao J, Zhang R, Lin N. Bacterial community in sediment from the western Pacific “warm pool” and its relationship to environment. *Sci China (Series D)*, 2005, **48**: 282~290
- 陈曾燮, 刘兢, 罗丹. 生物化学实验. 合肥: 中国科技大学出版社, 1994
- Delong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 5685~5689
- Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem*, 2006, **75**: 403~433
- Russell NJ. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*, 2000, **4**: 83~90