

深海沉积物宏基因组文库中产蛋白酶克隆 CAPRO2 的筛选及酶学性质分析

徐辉¹, 赵晶², 曾润颖¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所、海洋生物遗传资源重点实验室 福建 厦门 361005;
2. 厦门大学海洋与环境科学学院 福建 厦门 361005)

摘要: 利用选择性筛选培养基从所构建的深海沉积物宏基因组文库中筛选得到一株产蛋白酶的克隆(CAPRO002), 对其进行了酶学性质分析. 结果表明该酶的最适作用温度为 65℃, 最适作用 pH 值为 9.0. 该蛋白酶具有较好的热稳定性, 在 40℃ 以下的温度中可长期保持稳定, 在 50℃ 中处理 6h 后仍能保持 60% 的活力, 在 60℃ 下保温 30 min 后仍能保持约 60% 的活力. Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 对该蛋白酶有明显的促进作用, 而且 Ca^{2+} 的存在可明显提高该蛋白酶的热稳定性, Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 这 3 种离子均在 3.0 mmol/dm³ 浓度时具有最高的促进作用, 当浓度高于 3.0 mmol/dm³ 时, 这 3 种离子对酶活力的促进作用减弱. Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对酶有明显的抑制作用. CAPRO2 蛋白酶在 pH 值为 7.5~9.5 时活力较高, pH 值为 7.5 时可保持约 80% 的活力, pH 值为 9.5 时保持 60% 的活力, 而在 pH 值高于 9.5 的条件下酶活力下降较快, pH 值为 10.0 时活力降为约 15%, 表明 CAPRO2 属于碱性蛋白酶. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、E-64 和 AEBSF 对 CAPRO2 蛋白酶均无抑制作用, 显示该酶不属于丝氨酸蛋白酶, 而 EDTA 对酶有明显的抑制作用, 表明该酶属于金属蛋白酶.

关键词: 海洋生物学; 深海沉积物; 宏基因组文库; 蛋白酶; 热稳定性

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1000-8160. 2011. 04. 011

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2011)04-0522-06

微生物在环境中起着非常重要的作用, 尤其是在深海、极地等极端环境中. 尽管极端微生物的研究日益广泛, 但目前为止, 大多数的极端微生物对人类而言仍然是未知的. 极端微生物由于适应各种苛刻的环境条件而产生了很多具有特殊性质的生物活性物质, 它们在工业、农业、医药等方面具有广阔的应用前景, 其中低温酶、高温酶等极端酶的研究最为广泛, 部分极端酶已得到应用^[1-3], 因此对新极端酶的筛选一直是极端环境微生物资源研究开发的热点之一. 传统的酶筛选方法是获得纯培养的菌株, 这种方法的优点是目的性强, 纯培养的菌株也便于后续的基因工程、蛋白质工程等操作^[4]. 但是, 自然环境中绝大部分的微生物是目前的技术所无法进行培养的, 尤其是在深海极端条件下的微生物更是难以获

得纯培养. 宏基因组技术的应用克服了这一瓶颈, 通过对环境样品宏基因组的分析和筛选可以直接获得产酶的基因, 而不需进行菌株的培养, 因此该技术被认为是筛选新型极端酶的最好的方法之一^[5-6]. 目前采用宏基因组技术已经成功获得了各种各样酶的基因, 包括淀粉酶^[7-10]、脂肪酶^[11-13]、蛋白酶^[14]和几丁质酶^[15-16]等. 本实验室也从所构建的南极样品宏基因组文库中成功筛选到了蛋白酶基因并进行了表达^[17].

蛋白酶是应用得最为广泛的一类酶, 在工业上有着广泛的用途, 例如洗涤业、食品加工、制药、皮革、诊断试剂等^[18]. 大部分投入应用的蛋白酶都是中温酶, 它们在 30~50℃ 范围内活力最高. 而对于工业应用来说, 高温酶由于在高温下具有高的催化

收稿日期: 2010-11-30

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2007AA091407); 中国大洋矿产资源研究开发协会资助项目(DYXM-115-02-2-04)

作者简介: 徐辉(1986~), 男, 硕士研究生; E-mail: xu_hui0929@126.com

通讯作者: 曾润颖, 男, 研究员; E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn

效率和稳定性,而得到重视,它们的应用不仅可以节约成本、简化工艺,而且可以开拓酶的应用领域。因此,虽然蛋白酶的研究已经十分广泛,但对高温蛋白酶的筛选和研究无论是在理论上还是实际应用中仍然具有重要的意义。本文对所构建的深海沉积物宏基因组文库进行了筛选,并对获得的一个克隆 CAPRO2 所产蛋白酶的性质进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 样品及蛋白酶的筛选

所用样品为采用多管采样器采集自“大洋一号”第 19 航次 CM3MC04-1 站点(19.5°N,157.4°E)的东太平洋 5 378 m 水深的海底沉积物。样品采集后 -20 °C 保存,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。沉积物总 DNA 的提取采用原位裂解法^[19],通过脉冲凝胶电泳对所提取的 DNA 进行检测,回收 35 ~ 40 kb 部分的 DNA 片段进行宏基因组文库构建。宏基因组文库构建参照试剂盒说明书进行^[20],所用的 SuperCos 1 Cosmid Vector kit 和 Gigapack III XL Packaging Extract 购自 Stratagene 公司。

将宏基因组文库克隆涂布于筛选培养基(含 1% 脱脂奶粉、1% NaCl、0.5% 酵母膏、0.01% 氨苄青霉素)上,在 37°C 条件下进行筛选,挑选一株出现透明圈速度最快,产生透明圈较大的克隆进行酶学性质分析,编号为 CAPRO2。

1.2 蛋白酶酶学性质分析

将 CAPRO2 克隆接种于发酵培养基中(含 1% 酪蛋白、1% NaCl、0.5% 酵母膏、0.01% 氨苄青霉素),在 37°C 培养 24 h,发酵液于 4°C 在 6 000 r/min 的转速下离心 15 min 后,去除上清,将细胞用浓度为 0.01 mol/dm³ 的缓血酸胺-盐酸(pH 值为 8.0)重新悬浮,将悬浮液进行超声波破碎,条件为:50 W、2 s、破碎 8 s 暂停,总处理时间约为 10 min。细胞破碎液于 4°C 在 10 000 r/min 的转速下离心 10 min 后,取上清液进行酶学性质分析。

蛋白酶活性测定采用 Folin 试剂显色法进行^[21]。以 1 cm³ 酶液在 30 °C、pH 值为 8.0 的条件下每分钟水解酪蛋白产生 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 30 ~ 80 °C 的温度范围内间隔 5°C 测定蛋白酶的活力,以分析温度对酶活力的影响。

分别以 pH 值为 6.0 ~ 10.5 的不同的磷酸钠缓冲液(pH 值为 5.0 ~ 8.0)、缓血酸胺-甘氨酸缓冲液

(pH 值为 8.0 ~ 12.0)配制 1% 的酪蛋白溶液作为测量蛋白酶活力的底物溶液,在 65 °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。

将蛋白酶液在 30 ~ 80°C 的范围内间隔 10°C 的温度下分别保温,在不同时间点取出测定剩余蛋白酶活力的大小,以此分析蛋白酶的热稳定性。

在浓度为 0.01 mol/dm³ 的缓血酸胺-盐酸(pH 值为 8.0)缓冲液中加入各种金属离子(终浓度为 1 mmol/dm³),在 20°C 下放置 15 min 后测定酶活力,以检测金属离子对酶活力的影响。进一步选取促进酶活力的金属离子进行研究,测定不同浓度的金属离子对酶活力的影响。

将酶液与不同浓度的各种变性剂、蛋白酶抑制剂混合,20°C 下放置 3 h 后测定酶活力,以检测蛋白酶对变性剂和蛋白酶抑制剂的耐受性。

2 结果与分析

研究结果表明 CAPRO2 蛋白酶的最适作用温度为 65°C(图 1),在 70°C 时能保持 60% 的剩余活力,在 55°C 时保持 44% 的剩余活力。热稳定性实验表明 CAPRO2 蛋白酶在 40°C 以下的温度中保温后活力上升 30% ~ 40%,且保温 25 h 后活力保持不变,仍为原始活力的 130% ~ 140%。酶在 50°C 下保温 6 h 后,在 60°C 下保温 30 min 后仍能保持约 60% 的活力,表现出良好的热稳定性。Ca²⁺ 对该酶的热稳定性具有明显的促进作用。在反应体系中含有 1 mmol/dm³ 的 Ca²⁺ 时,酶活力在 60°C 下的半衰期由约 45 min 提高到 3 h(图 2),热稳定性得到显著提高。

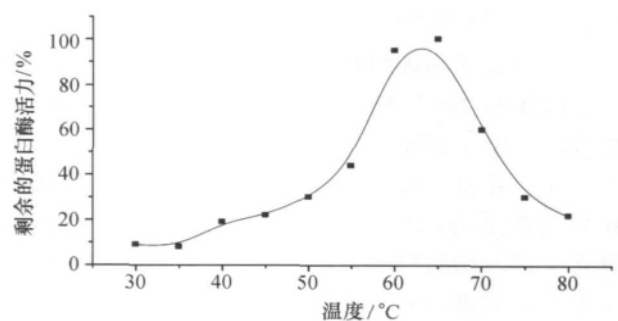


图 1 温度对 CAPRO2 蛋白酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the CAPRO2 protease activity

最适 pH 值实验结果(图 3)表明 CAPRO2 蛋白酶在 pH 值为 8.5 时活力最高,在 pH 值低于 8.5 的条件下(6.0 ~ 8.5)的活力较高,pH 值为 6.0 时可保持约 35% 的活力,pH 值为 7.5 时保持 80% 的活

力.而在 pH 值高于 9.0 的条件下酶活力下降较快, pH 值为 9.5 时活力约为 60% pH 值为 10.0 时的活力则下降致约为 15% ,表明 CAPRO2 属于中性偏碱蛋白酶.

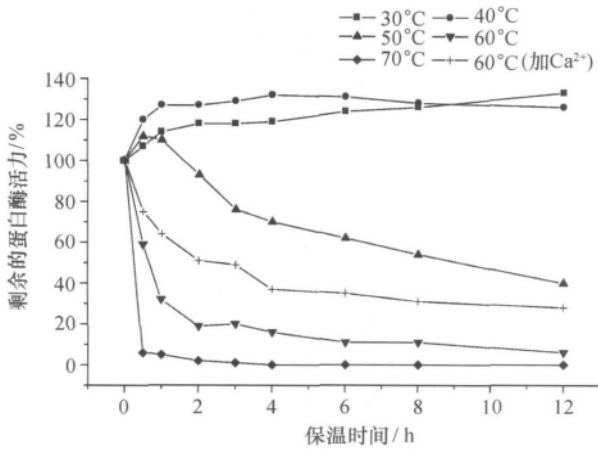


图 2 CAPRO2 蛋白酶的热稳定性
Fig. 2 Thermal stability of the CAPRO2 protease

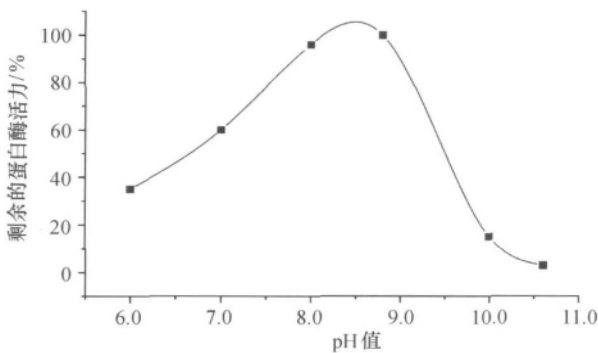


图 3 pH 对 CAPRO2 蛋白酶活力的影响
Fig. 3 Effect of pH on the CAPRO2 protease activity

金属离子对 CAPRO2 蛋白酶的影响实验结果 (表 1) 表明, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 对酶有明显的促进作用, Hg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 对酶有抑制作用, K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ 等离子对酶没有明显的作用. 进一步选取能促进酶活力的 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 三种离子研究不同金属离子浓度对酶活力的影响(图 4), 其中 Ca^{2+} 能够在较大浓度范围内促进酶活, 在浓度为 1.0 ~ 5.5 $mmol/dm^3$ 时可提高酶活力 50% 以上. 而 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 能够在较窄的浓度范围内促进酶活, Sr^{2+} 在浓度为 3.0 $mmol/dm^3$ 时可提高酶活力 50%, Co^{2+} 在浓度为 2.0 ~ 3.0 $mmol/dm^3$ 时可提高酶活力约 40%. 3 种离子均在 3.0 $mmol/dm^3$ 浓度时具有最高的促进作用, 当浓度低于 3.0 $mmol/dm^3$ 时, 随着离子浓度的增加促进作用加强, 当浓度高于 3.0 $mmol/dm^3$ 时, 随着离子浓度的增加促进作用减弱.

表 1 各种金属离子对 CAPRO2 酶活力的影响

Tab. 1 Effect of metal ions on the CAPRO2 protease activity

金属离子	相对酶活力/%	金属离子	相对酶活力/%
空白	100	Li^+	107
Sr^{2+}	114	Mg^{2+}	114
Fe^{3+}	73	Ca^{2+}	123
Rb^+	106	Cu^{2+}	47
K^+	102	Hg^{2+}	11
Na^+	106	Zn^{2+}	100
Mn^{2+}	104	Fe^{2+}	91
Co^{2+}	125		

注: 金属离子终浓度为 1 $mmol/dm^3$

CAPRO2 蛋白酶可耐受 35 $mmol/dm^3$ 浓度的 SDS 和 1 000 $mmol/dm^3$ 的脲(表 2), 而对盐酸胍较为敏感. 巯基乙醇对酶活的抑制作用明显, 表明二硫键对酶保持其活性中心与底物的结合能力具有重要作用. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、E-64 和 AEBSF 对 CAPRO2 蛋白酶均无抑制作用, 显示该酶不属于丝氨酸蛋白酶, 而 EDTA 对酶有明显的抑制作用, 表明该酶属于金属蛋白酶.

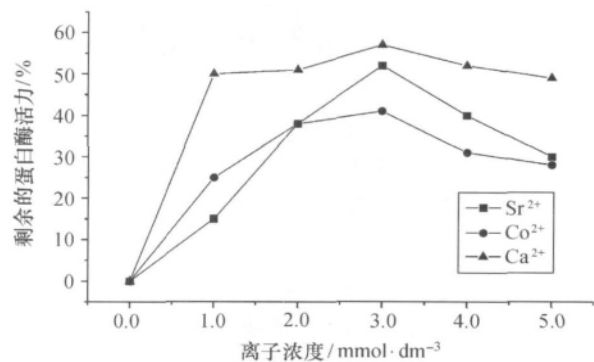


图 4 不同离子浓度对蛋白酶活力的促进作用

Fig. 4 Effect of the concentration of ions on the CAPRO2 protease activity

表 2 变性剂和蛋白酶抑制剂对 CAPRO2 酶活力的影响

Tab. 2 Effect of denaturant and protease inhibitors on the CAPRO2 protease activity

项目	组分浓度/ $mmol \cdot dm^{-3}$	相对酶活力/%
对照	0	100
PMSF	1	91
EDTA	10	27
E-64	1×10^{-2}	112
AEBSF	1	110
SDS	35	89
	70	4

续表 2

项目	组分浓度 /mmol · dm ⁻³	相对酶活力 /%
脲	1 000	109
	5 000	64
盐酸胍	1 000	45
	3 000	4
2-巯基乙醇	13	2
	650	0

3 讨论

微生物蛋白酶根据其反应活性的酸碱性可以分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶。碱性蛋白酶指的是在 pH 值从中性到碱性范围活性较高的蛋白酶,目前所研究的碱性蛋白酶主要有 2 类,一类属于丝氨酸蛋白酶,另一类属于金属蛋白酶。CAPRO2 蛋白酶不被 PMSF、E-64 和 AEBSF 等丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制,而对 EDTA 敏感,且该酶最作用 pH 值为 8.5,在 pH 值为 7.0~9.0 范围内保持较高的活力,表明它属于碱性金属蛋白酶。碱性蛋白酶需要有金属离子的激活,必须的金属离子有 Mn²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Fe²⁺,尤其是 Ca²⁺对碱性蛋白酶有明显的稳定作用^[22]。本实验中 CAPRO2 蛋白酶的活性与之一致,Co²⁺和 Ca²⁺对酶有明显的激活作用,均可提高酶活力 50% 以上,而且 Ca²⁺的存在可明显提高该蛋白酶的热稳定性。

大多数金属蛋白酶是 Zn²⁺ 金属蛋白酶,依据 Zn²⁺ 的结合位点可将金属蛋白酶分为 5 类^[23]。在本实验中发现 Zn²⁺ 对 CAPRO2 蛋白酶的活性没有明显影响,因此该酶并不同于绝大多数金属蛋白酶,活性中心并不依赖于 Zn²⁺。Kim 等(1995)对大肠杆菌

中的一种细胞质金属内肽酶进行研究,发现 Co²⁺ 是该酶的辅助因子^[24]。本实验中 Co²⁺ 和 Sr²⁺ 对酶活具有明显的促进作用,因此推测 Co²⁺ 和 Sr²⁺ 是 CAPRO2 蛋白酶的一种辅助因子。

CAPRO2 蛋白酶在 30 和 40℃ 下保温后活力有略微提升,这可能是由于该酶属于高温酶,在 30 和 40℃ 条件下,其分子结构较为松散而又没有发生变性,酶的柔性增加,因此活力得以提高。而且该酶在 50℃ 下保温 6 h 后仍能保持约 60% 的活力,在 60℃ 下保温 30 min 后也仍能保持约 60% 的活力,表现出良好的热稳定性,在工业上具有较好的应用价值。

该克隆子 CAPRO2 插入片段大小为 35 kb,已经经过酶切图谱分析验证,符合预期构建此文库的要求。目前没有进行测序,其 DNA 序列中可能含有某种蛋白酶的阅读框,如金属蛋白酶的阅读框等。该蛋白酶尚未进行纯化,目前并不知道其分子量的大小。CAPRO2 蛋白酶来源于所构建的深海沉积物宏基因组文库,是一个高温酶,而所用的深海样品所处的环境温度大约恒定为 4℃,是一个低温的环境。造成这种温度差异的原因可能是由于 CAPRO2 蛋白酶基因来自非深海“土著”微生物,是由上层海洋、或陆地微生物随着沉降作用而存在于深海低温环境中。当然,这类微生物在深海环境中可能是处于休眠状态,或者是代谢极其缓慢的状态,也正因为如此,才更好地表明本文所采取的构建非培养微生物的宏基因组文库,进而筛选出功能基因和活性物质的方法是成功的。后期工作的开展将针对该酶的纯化;CAPRO2 插入片段(35 kb)中蛋白酶基因的亚克隆与表达;以及化学和物理诱变等,希望能够获得高纯、高活力、高稳定性的蛋白酶,应用于工业生产。

参考文献:

- [1] Lee H S, Kwon K K, Kang S G, et al. Approaches for novel enzyme discovery from marine environments [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(3): 353-357.
- [2] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1(3): 200-208.
- [3] Zecchinon L, Claverie P, Collins T, et al. Did psychrophilic enzymes really win the challenge? [J]. *Extremophiles*, 2001, 5(5): 313-321.
- [4] Ogawa J, Shimizu S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods [J]. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(1): 13-21.
- [5] Steele H L, Jaeger K E, Daniel R, et al. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2009, 16(1/2): 25-37.
- [6] Ferrer M, Beloqui A, Timmis K N, et al. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2009, 16(1/2): 109-123.
- [7] Lammler K, Zipper H, Breuer M, et al. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning [J]. *J Biotechnol*, 2007, 127(4): 575-592.
- [8] Yun J, Kang S, Park S, et al. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic

- library [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12): 7 229-7 235.
- [9] Richardson T H, Tan X, Frey G, et al. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(29): 26 501-26 507.
- [10] Rondon M R, August P R, Bettermann A D, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2 541-2 547.
- [11] Jeon J H, Kim J T, Kim Y J, et al. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 81(5): 865-874.
- [12] Hardeman F, Sjoling S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 59(2): 524-534.
- [13] Lee M H, Lee C H, Oh T K, et al. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(11): 7 406-7 409.
- [14] Acevedo J P, Reyes F, Parra L P, et al. Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique [J]. *J Biotechnol*, 2008, 133(3): 277-286.
- [15] Lecleir G R, Buchan A, Hollibaugh J T. Chitinase gene sequences retrieved from diverse aquatic habitats reveal environment-specific distributions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(12): 6 977-6 983.
- [16] Cottrell M T, Moore J A, Kirchman D L. Chitinases from uncultured marine microorganisms [J]. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(6): 2 553-2 557.
- [17] Zhang Y, Zhao J, Zeng R Y. Expression and characterization of a novel mesophilic protease from metagenomic library derived from Antarctic coastal sediment [J]. *Extremophiles*, 2011, 15(1): 23-29.
- [18] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(1): 15-32.
- [19] Zeng R Y, Zhao J, Zhang R, et al. Bacterial community in sediment from the western Pacific "Warm Pool" and its relationship to environment [J]. *Science in China (Series D): Earth Sciences*, 2005, 48(2): 282-290.
- [20] 郭巧玲, 杨祥胜, 赵晶, 等. 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 [J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(4): 507-510.
- [21] 陈曾燮, 刘兢, 罗丹. 生物化学实验 [M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1994.
- [22] 邓菊云. 微生物碱性蛋白酶研究进展 [J]. *现代食品科技*, 2008, 24(3): 293-296.
- [23] Jiang W, Bond J S. Families of metalloendopeptidases and their relationships [J]. *FEBS Lett*, 1992, 312(2/3): 110-114.
- [24] Kim K I, Baek S H, Hong Y M, et al. Purification and characterization of protease Ci, a cytoplasmic metalloendoprotease in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(50): 29 799-29 805.

Screening and characterization of a protease-producing clone CAPRO2 from metagenomic library of deep sea sediments

XU Hui¹, ZHAO Jing², ZENG Run-ying¹

(1. Third Institute of Oceanography/ Key lab of Marine Biogenetic Resources, SOA, Xiamen 361005, China;

2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A protease-producing clone (CAPRO2) was screened from metagenomic library of deep sea sediments using selective medium, and the characteristics of protease was studied. The results showed that the optimal temperature and pH for CAPRO2 protease activity were 65°C and 9.0, respectively. The enzyme had excellent thermal stability. It was stable at temperature below 40°C, and retained about 60% of residual activity after 6 hours incubation at 50°C and 30 minutes incubation at 60°C. The presence of Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ and Co²⁺ increased the activity obviously, and Ca²⁺ enhanced the thermal stability distinctly. Three ions, Ca²⁺, Sr²⁺ and Co²⁺, increased the activity of the enzyme significantly at concentration of 3.0 mmol/dm³, and the activity-increasing effect was weak when the concentrations of these 3 ions were higher than 3.0 mmol/dm³. The ions Hg²⁺, Fe³⁺ and Cu²⁺ inhibited the enzyme activity notably. The CAPRO2 protease showed higher activity at pH 7.5 ~ 9.5, retaining 80% and

60% of residual activity at pH 7.5 and 9.5, respectively. The residual activity decreased rapidly at pH higher than 9.5 and reduced to about 15% at pH 10.0. It indicates that the enzyme belongs to alkaline protease. The serine protease inhibitors, PMSF, E-64 and AEBSF, showed no inhibition to the CAPRO2 enzyme activity, which indicates that the enzyme was not serine protease. On the other hand, EDTA inhibited the enzyme activity strongly, indicating that the enzyme belongs to metalloproteinase.

Key words: marine biology; deep sea sediment; metagenomic library; protease; thermal stability

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1000-8160. 2011. 03. 011

(责任编辑: 杜俊民)