

## 植物乳杆菌 WU14 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶的基因克隆、 蛋白表达及生物信息学分析

缪婷婷<sup>1,2</sup>, 沈风飞<sup>1,2</sup>, 张晓晓<sup>3</sup>, 邱胡林<sup>1,2</sup>, 徐波<sup>2</sup>, 尹爱国<sup>2\*</sup>, 石鹏君<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>江西农业大学生物科学与工程学院 南昌 330045

<sup>2</sup>广东石油化工学院生物与食品工程学院 广东茂名 525000

<sup>3</sup>中国农业科学院农产品加工研究所 北京 100193)

**摘要** 植物乳杆菌是一类兼性异养,兼性厌氧的同型发酵乳酸菌,其在改善食品风味和发酵特性等方面发挥着重要作用,而这种功能特征与其具有糖苷酶活性密切相关。为了挖掘植物乳杆菌糖苷酶的应用价值,以植物乳杆菌 WU14 为研究对象,利用聚合酶链式反应(PCR)技术成功克隆了 8 个 WU14 的糖苷水解酶,生物信息学分析表明均为糖苷水解酶 1 家族(GH1)的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶基因。鉴于植物乳杆菌中该类糖苷酶鲜有报道,采用原核异源表达展开研究。序列分析表明 8 个酶蛋白氨基酸序列具有 GH1 家族的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶典型的 2 个保守催化位点,序列一致性在 32%~74%之间。经 SDS-PAGE,8 个蛋白均在大肠杆菌中表达,其中 BglAW14、BglCW14、BglFW14 为部分可溶性表达,其余为蛋白表达,形成包涵体。生物信息学分析显示:8 个基因的编码蛋白都无信号肽和跨膜结构,疏水性较强。由亚细胞定位预测可知,除 BglEW14 主要存在于分泌结构内和 BglHW14 主要存在于细胞膜外,其余 6 个基因都存于细胞质内。对 8 个 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆表达及生物学序列分析,为进一步探究植物乳杆菌来源的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶的分子机理研究奠定了基础。

**关键词** 植物乳杆菌 WU14; 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶; 基因克隆; 蛋白表达; 生物信息学分析

**文章编号** 1009-7848(2022)06-0062-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.06.007

乳酸菌是一类在自然界中广泛存在的革兰氏阳性菌,能够在生物氧化的过程中获得能量并生长繁殖。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)属于乳杆菌科中的乳杆菌属,最适生长温度在 30~35 °C,最适 pH 值为 6.5 左右,是一类兼性异养,兼性厌氧的同型发酵乳酸菌<sup>[1]</sup>。植物乳杆菌作为安全的食品发酵剂,在改善食品风味和发酵特性等方面被广泛应用<sup>[2]</sup>。其在葡萄酒酿造业中也发挥着重要作用。植物乳杆菌是葡萄酒进行苹果酸乳酸发酵常见的乳酸菌之一<sup>[3]</sup>,可在葡萄酒高酒精、低、高温等苛刻条件下生长<sup>[4]</sup>,并且其产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶对葡萄酒的风味有着非常重要的影响<sup>[5]</sup>,对

于葡萄酒的增香具有广阔的应用前景<sup>[6]</sup>。

$\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -Glucosidase, EC3.2.1.21),是一种能够水解糖苷键,从而产生挥发性香气物质和葡萄糖的糖苷水解酶 (glycohydrolase enzyme, GH enzyme)<sup>[7]</sup>, 又称  $\beta$ -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶,它能水解结合于非还原性末端的  $\beta$ -D-葡萄糖苷键,同时释放出  $\beta$ -D 葡萄糖和相应的配基,是纤维素分解酶系中的重要组成成分<sup>[8]</sup>。另外,还有一类 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶(6-phospho- $\beta$ -glucosidase, EC 3.2.1.86)<sup>[9]</sup>在微生物中基本以胞内酶的形式存在,可催化 6-磷酸-纤维二糖、6-磷酸-纤维素寡糖等 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷类化合物产生葡萄糖-6-磷酸,使纤维素得以分解<sup>[10-11]</sup>。

6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶有两类,分别分布于 GH1 和 GH4 中。GH1 家族作用残基多为两个谷氨酸残基,靠近 N 端的谷氨酸起酸/碱作用,另一谷氨酸起亲核试剂的作用<sup>[12]</sup>。这两类酶的主要区别是 GH4 的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶催化底物分解时需要金属离子(Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>或 Fe<sup>2+</sup>)和 NAD<sup>+</sup>的辅助,而 GH1 的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶则可独

**收稿日期:** 2021-06-22

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31760438, 32072166);  
广东省自然科学基金-面上项目(2019A15150  
11696);广东省普通高校重点领域专项(乡村振兴)  
项目(2020ZDZX1020)

**作者简介:** 缪婷婷(1996—),女,硕士生

**通信作者:** 尹爱国 E-mail: 240523958@qq.com  
石鹏君 E-mail: shipengjun@caas.cn

立完成催化作用<sup>[11-13]</sup>。目前关于  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究很多,而有关 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶的报道很少,鲜见有关植物乳杆菌来源的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶,原因之一可能是其在异源表达时容易形成包涵体或需要磷酸化底物<sup>[14]</sup>。牛瑜<sup>[15]</sup>、尹捷等<sup>[16]</sup>和刘晴等<sup>[17]</sup>以 pNP $\beta$ G6P(*p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glucuronide-6-phospho, 对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷-6-磷酸)为底物,测定 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活。

根据 NCBI 数据库中的比对信息得到植物乳杆菌 WU14 中有 8 个 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶基因。本研究对 8 个基因 *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglEW14*、*BglFW14*、*BglGW14* 和 *BglHW14* 进行基因克隆和异源表达,并对其对应的编码蛋白进行生物信息学分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

植物乳杆菌 (*L. plantarum*)WU14 筛自腌菜,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  克隆菌株、*E. coli* BL21 (DE3) 表达菌株购自博迈德生物公司,表达载体 pET30a(+) 为本实验室保存。

### 1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 *Hind* III、*Nde* I, Thermo Scientific 公司; *Exnase* II 连接酶, Vazyme 公司; KOD Plus Neo 高保真酶, 株式会社东洋纺公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒和清洁回收试剂盒, 康宁生命科学有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Solarbio 公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, TIANGEN 公司; 镍柱填料, QIAGEN 公司; TGA Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit 12%, BIO-RAD 公司; 其它试剂均为国产分析纯, 购自北京化学试剂公司。

### 1.3 试验仪器

DK-8D 三孔电热恒温水槽, 上海齐欣科学仪器有限公司; PCR 仪, Bio-rad 公司; 紫外分光光度计, 菲勒仪器有限公司; 超声波细胞破碎仪, 贝普斯科技有限公司; 台式高速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; pH 计, METTLER TOLEDO 公司; 电子天平, 上海天美天平仪器有限公司; 胶片观察灯, 北京六一仪器厂; 电泳仪, 北京东方瑞利电泳

设备有限公司; 磁力搅拌器, Kylin-bell 实验仪器公司; 恒温振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 脱色摇床, Kylin-bell 实验仪器公司; 洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司。

### 1.4 培养基和相关溶液

1) LB 培养基 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl, (固体培养基含 20 g/L 琼脂), 121  $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

2) MRS 液体培养基 蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 10.0 g, 酵母膏 5.0 g,  $K_2HPO_4$  2.0 g, 柠檬酸铵 2.0 g, 无水乙酸钠 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 吐温-80 1.0 mL,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.50 g,  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0.25 g, 调节 pH 值为 7.0, 加入蒸馏水补至 1 L。

3) 10 $\times$ SDS-PAGE 缓冲液 188 g 甘氨酸, 10 g SDS, 30.3 g Tris 碱, 蒸馏水 900 mL 25  $^{\circ}$ C 水浴搅拌溶解, 定容至 1 L, 室温保存备用。

4) 考马斯亮蓝 R250 染色液 0.1% (质量分数) 考马斯亮蓝 R250, 10% (质量分数) 冰醋酸, 25% (质量分数) 异丙醇, 蒸馏水定容 1 L, 过滤去除杂质, 室温避光保存备用。

5) 卡那霉素 配制母液 50 mg/mL, 滤器过滤除菌, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

6) NTA 缓冲液 20 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 0.5 mol/L NaCl, 20~300 mmol/L 咪唑, 每个梯度调 pH 7.4。

7) IPTG 配制母液 24 mg/mL, 滤器过滤除菌, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

8) 50 $\times$ TAE Buffer Tris 242 g,  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  37.2 g, 冰乙酸 57.1 mL, 蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 8.5, 室温保存备用。

### 1.5 方法

1.5.1 菌种活化 从 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中取出保藏菌株植物乳杆菌 WU14 在 MRS 固体平板上划线, 挑取单菌落接种到 4 mL MRS 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 静置培养 12 h, 后按 1% 接种量接种至 100 mL MRS 液体培养基中 37  $^{\circ}$ C 静置培养 12 h。

1.5.2 基因组 DNA 提取及浓度纯度检测 使用购自 Solarbio 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取植物乳杆菌 WU14 总基因组, 操作步骤按照试剂盒说明书进行, 提取的基因组 DNA 用超微量蛋白核酸分析仪检测, 确定提取的 DNA 的浓度

和纯度是否合格,将合格的基因组DNA置于-20℃冰箱保存。

1.5.3 目的基因的PCR扩增引物是由华大基因公司合成,PCR扩增特异引物序列依次为:

表1 基因扩增引物

Table 1 The primers used for gene cloning

引物名称	碱基序列	酶切位点
<i>BglAW14 F</i>	5'GATAAGGAGCGACAGATGCCCCACCATCAT CATCATCATGATAAGGAGCGACAGATGCCCC3'	<i>Nde I</i>
<i>BglAW14 R</i>	5'TTACAATTCATCTCCATTTTTTGGCTTACAATT CATCTCCATTTTTTGC3'	<i>Hind III</i>
<i>BglBW14 F</i>	5'TATAAACCAACTTATCCTAAAACACCATCAT CATCATCATTATAAACCAACTTATCCTAAAA3'	<i>Nde I</i>
<i>BglBW14 R</i>	5'TTAAGCTAGATCTTCACCATTTAAGCTAGAT CTTCACCAT3'	<i>Hind III</i>
<i>BglCW14 F</i>	5'TCAGAGTTCCCAGAAGGATTTCCACCATCAT CATCATCATTTCAGAGTTCCCAGAAGGATTTTC3'	<i>Nde I</i>
<i>BglCW14 R</i>	5'CTATTCAGATTTCTCCGCTAACCTATTCAGAT TTCTCCGCTAAC3'	<i>Hind III</i>
<i>BglDW14 F</i>	5'TATTCAAAAACAATGCCAACTGCACCATCATC ATCATCATTATTCAAAAACAATGCCAACTG3'	<i>Nde I</i>
<i>BglDW14 R</i>	5'CTATCCCAAATCTTCCCATTCCTATCCCAAAT CTTCCCATTC3'	<i>Hind III</i>
<i>BglEW14 F</i>	5'CAATTTCCGGCTGATTTTTACCACCATCATCAT CATCATCAATTTCCGGCTGATTTTTAC3'	<i>Nde I</i>
<i>BglEW14 R</i>	5'TTAATTTGAGGCCGAGGGACTTAATTTGAGGC CGAGGGAC3'	<i>Hind III</i>
<i>BglFW14 F</i>	5'ACAAAAGGATACAAAATGCCCCACCATCATCA TCATCATAAAAAGGATACAAAATGCCCC3'	<i>Nde I</i>
<i>BglFW14 R</i>	5'CTATAAATCTTTACCATCACTCGCTATAAATCTT TACCATCACTCG3'	<i>Hind III</i>
<i>BglGW14 F</i>	5'GCAACAACGAGTGGTTTACGATCCACCATCAT CATCATCATGCAACAACGAGTGGTTTACGATC3'	<i>Nde I</i>
<i>BglGW14 R</i>	5'CTACTTCAAATCGGCCCATTTCTACTTCAAATC GGCCCCATT3'	<i>Hind III</i>
<i>BglHW14 F</i>	5'ACGATTAAGGACGAGCGTTTACCATCATCA TCATCATAACGATTAAGGACGAGCGTTT3'	<i>Nde I</i>
<i>BglHW14 R</i>	5'CTAGTCAATTTCCGCCACCATTTCTAGTCAATTC GGCACCATT3'	<i>Hind III</i>

PCR反应体系(50 μL):KOD buffer 5 μL、dNTP 5 μL、MgSO<sub>4</sub> 3 μL、WU14基因组1 μL、引物各1.5 μL、KOD酶1 μL,加ddH<sub>2</sub>O至50 μL。

PCR扩增程序:94℃预变性2 min,98℃变性10 s,55℃退火30 s,68℃延伸1 min 30 s,35个循环,最后4℃保存。

用1%琼脂糖凝胶电泳验证PCR扩增产物,电泳结束后用凝胶成像系统留图分析。

1.5.4 pET30a(+)空载体双酶切 使用下列快切酶体系(50 μL)对pET30a(+)空载体进行双酶切37℃金属浴4 h,并使用PCR清洁试剂盒回收酶切产物,测好浓度,保存在-20℃冰箱中备用。

酶切体系:

pET30a(+)	20 μL
<i>Hind III</i> 限制性内切酶	1.5 μL
<i>Nde I</i> 限制性内切酶	1.5 μL

FD buffer	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	22 $\mu$ L
总体积	50 $\mu$ L

1.5.5 无缝连接目的片段与酶切载体 使用购自康宁生命科学有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因,然后使用 pET30a(+)载体系统,按照下列无缝连接体系 (10  $\mu$ L),37  $^{\circ}$ C 连接 45 min。质粒的转化参照大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态的转化方法进行。

Exnase II 连接酶	1 $\mu$ L
pET30a(+)	1 $\mu$ L
目的基因回收片段	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ L
buffer	2 $\mu$ L
总体积	10 $\mu$ L

1.5.6 重组质粒的提取及转化 用含有 Kana (K<sup>+</sup>) 抗生素的 LB 培养基活化已验证正确的含有重组克隆载体的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态菌株,37  $^{\circ}$ C 振荡培养 6~8 h,取 1~4 mL 的菌液用于提取重组质粒,质粒的提取参照康宁生命科学有限公司的质粒小提试剂盒的提取方法。重组质粒的转化参照大肠杆菌 BL21 感受态的转化方法进行。

1.5.7 重组蛋白的诱导表达、纯化和检测 将过夜培养的重组质粒种子液按 1%接种于 200 mL LB(K<sup>+</sup>)液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.8,加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h。收集诱导完成的发酵液菌体,利用超声破碎仪将细胞破碎,收集破碎上清液和破碎沉淀,用镍柱纯化蛋白,并用不同浓度的咪唑洗脱纯化蛋白,然后用 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.5.8 测序及生物信息学分析 将 1%琼脂糖凝胶电泳验证正确的菌液送至华大基因公司测序。测序完成后,将得到的碱基序列翻译为氨基酸序列,随后进行生物信息学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌 WU14 全基因组的提取

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取植物乳杆菌 WU14 全基因组 DNA,提取的基因组 DNA 用超微量蛋白核酸分析仪检测,其质量浓度

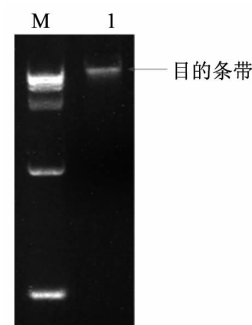
在 40 ng/ $\mu$ L,可用于后续试验,同时用 1%琼脂糖凝胶电泳验证,提取结果如图 1 所示。

### 2.2 克隆 8 个 $\beta$ -葡萄糖苷酶编码基因

通过基因组测序结果分析,经 CAZy 数据库 (<http://www.cazy.org/>)注释分析发现基因组上具有 8 个 GH1 家族 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶基因。利用植物乳杆菌 WU14 基因组为模板,以目的基因的特异性引物为扩增引物进行 PCR 扩增,然后用 1%琼脂糖凝胶电泳验证,结果如图 2 所示,目的条带大小为 1 500 bp 左右,结果显示扩增条带大小正确,条带单一浓度较高,可用于后续试验。

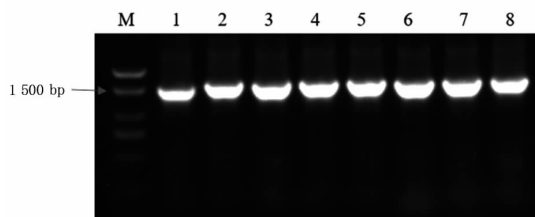
### 2.3 SDS-PAGE 分析重组蛋白

利用生物信息学软件 SnapGene 分析目的基



注:M:Marker 15 000;泳道 1:WU14 全基因组 DNA。

图 1 植物乳杆菌 WU14 基因组的琼脂糖凝胶电泳  
Fig.1 Gel electrophoresis of *L. plantarum* WU14 genome



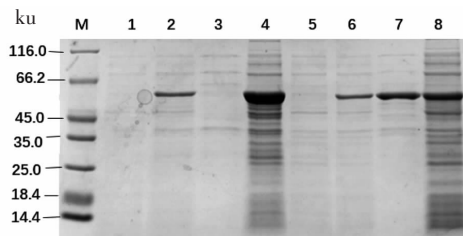
注:M:DNA 标准 Marker 2 000;泳道 1:*BglAW14* 基因、泳道 2:*BglBW14*、泳道 3:*BglCW14*、泳道 4:*BglDW14*、泳道 5:*BglEW14*、泳道 6:*BglFW14*、泳道 7:*BglGW14*、泳道 8:*BglHW14*。

图 2 *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglEW14*、*BglFW14*、*BglGW14* 和 *BglHW14* 基因 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglEW14*、*BglFW14*、*BglGW14*、*BglHW14* gene PCR amplification



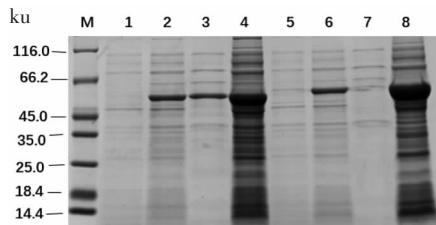
因序列,8个基因的理论蛋白大小均为55 ku左右。8个蛋白结果如图3到图6所示,以未加IPTG诱导的菌液作为对照组,可以看出8个蛋白都诱导表达成功,蛋白 *BglAW14*、*BglCW14* 和 *BglFW14* 的破碎上清液表达条带明显且与诱导成



注:M:蛋白Maker;泳道1:-IPTG *BglBW14*;泳道2:+IPTG *BglBW14*;泳道3:*BglBW14* 破碎上清;泳道4:*BglBW14* 破碎沉淀;泳道5:-IPTG *BglCW14*;泳道6:+IPTG *BglCW14*;泳道7:*BglCW14* 破碎上清;泳道8:*BglCW14* 破碎沉淀。

图3 SDS-PAGE分析Fnr蛋白

Fig.3 SDS-PAGE analysis of Fnr protein



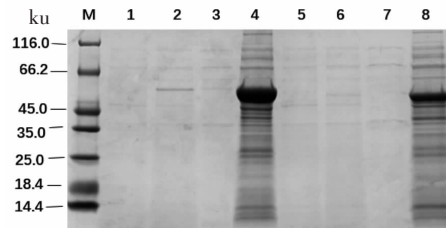
注:M:蛋白Maker;泳道1:-IPTG *BglFW14*;泳道2:+IPTG *BglFW14*;泳道3:*BglFW14* 破碎上清;泳道4:*BglFW14* 破碎沉淀;泳道5:-IPTG *BglGW14*;泳道6:+IPTG *BglGW14*;泳道7:*BglGW14* 破碎上清;泳道8:*BglGW14* 破碎沉淀。

图5 SDS-PAGE分析 *BglDW14* 和 *BglEW14* 蛋白

Fig.5 SDS-PAGE analysis of *BglFW14* and *BglGW14* protein

纯化蛋白 *BglAW14*、*BglCW14* 和 *BglFW14* 的 SDS-PAGE 结果如图7所示,3个蛋白用不同浓度的咪唑溶液洗脱后,得到的纯化蛋白的条带与对应的已诱导的菌体破碎液上清条带一致,表达量高且条带单一,用 pNPG 法处理样品 10 min 没有检测到  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活。刘晴等<sup>[10]</sup>研究的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶 TteBg1B 具有较强的底物特异性,对  $\beta$ -D-葡萄糖苷键和  $\beta$ -D-半乳糖苷键仅有微弱的水解作用。尹捷等<sup>[15]</sup>研究的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶 PhgL 具有底物专一性,对 pNP 衍生

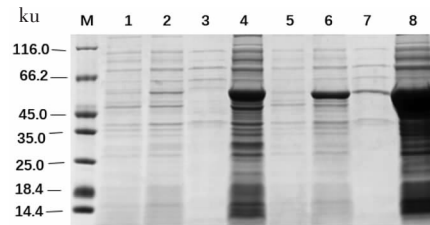
物的条带一致,都在 55 ku 左右,其余的 5 个蛋白的菌体破碎上清未检测到表达蛋白,而菌体破碎沉淀都有大量表达,故 5 个蛋白都为包涵体表达。蛋白 *BglAW14*、*BglCW14* 和 *BglFW14* 为部分可溶性表达。



注:M:蛋白Maker;泳道1:-IPTG *BglDW14*;泳道2:+IPTG *BglDW14*;泳道3:*BglDW14* 破碎上清;泳道4:*BglDW14* 破碎沉淀;泳道5:-IPTG *BglEW14*;泳道6:+IPTG *BglEW14*;泳道7:*BglEW14* 破碎上清;泳道8:*BglEW14* 破碎沉淀。

图4 SDS-PAGE分析 *BglDW14* 和 *BglEW14* 蛋白

Fig.4 SDS-PAGE analysis of *BglDW14* and *BglEW14* protein



注:M:蛋白Maker;泳道1:-IPTG *BglHW14*;泳道2:+IPTG *BglHW14*;泳道3:*BglHW14* 破碎上清;泳道4:*BglHW14* 破碎沉淀;泳道5:-IPTG *BglAW14*;泳道6:+IPTG *BglAW14*;泳道7:*BglAW14* 破碎上清;泳道8:*BglAW14* 破碎沉淀。

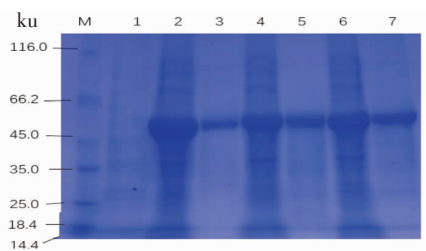
图6 SDS-PAGE分析 *BglHW14* 和 *BglAW14* 蛋白

Fig.6 SDS-PAGE analysis of *BglHW14* and *BglAW14* protein

物中的  $\alpha$ -半乳糖苷键,6-磷酸- $\alpha$ -葡萄糖苷键,6-磷酸- $\alpha$ -半乳糖苷键及 6-磷酸- $\alpha$ -甘露糖苷键均无水解作用,本研究中的这 3 个纯化酶与已报道的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶具有特异降解 6-磷酸底物,而不能水解 pNPG 的酶学特性相一致。

## 2.4 目的基因 *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglEW14*、*BglFW14*、*BglGW14* 和 *BglHW14* 的生物信息学分析

2.4.1 氨基酸序列分析、跨膜结构和信号肽预测  
用 NCBI 比对氨基酸序列,结果如表 2 所示,8 个



注: M: 蛋白 Maker; 泳道 1: pet-30a 空载体; 泳道 2: *BglAW14* 破碎上清; 泳道 3: *BglAW14* 纯化蛋白; 泳道 4: *BglCW14* 破碎上清; 泳道 5: *BglCW14* 纯化蛋白; 泳道 6: *BglFW14* 破碎上清; 泳道 7: *BglFW14* 纯化蛋白。

图 7 SDS-PAGE 分析 *BglAW14*、*BglCW14* 和 *BglFW14* 纯化蛋白

Fig.7 SDS-PAGE analysis of *BglAW14*, *BglCW14* and *BglFW14* purified protein

表 2 植物乳杆菌的 GH1 家族葡萄糖苷酶的基因注释和一致性分析

Table 2 Gene annotation and consistency analysis of GH1 family glucosidase from *L. plantarum*

蛋白名称	蛋白注释	一致性/%	GenBank
<i>BglAW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	ASI63769.1
<i>BglBW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	ACT63688.1
<i>BglCW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	AGE37681.1
<i>BglDW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	AOG32790.1
<i>BglEW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	ASI62503.1
<i>BglFW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	AOG33440.1
<i>BglGW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	KRL98352.1
<i>BglHW14</i>	6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	100	ANM73531.1

表 3 氨基酸序列分析、跨膜结构和信号肽预测

Table 3 Amino acid sequence analysis, transmembrane structure and signal peptide prediction

蛋白名称	氨基酸数量	分子质量/ku	理论等电点	跨膜结构	信号肽
<i>BglAW14</i>	460	53.39	5.04	无	无
<i>BglBW14</i>	486	55.81	5.75	无	无
<i>BglCW14</i>	482	54.73	4.82	无	无
<i>BglDW14</i>	487	55.29	5.05	无	无
<i>BglEW14</i>	490	55.84	5.24	无	无
<i>BglFW14</i>	479	54.89	4.94	无	无
<i>BglGW14</i>	480	54.71	5.1	无	无
<i>BglHW14</i>	478	54.85	5.17	无	无

#### 2.4.2 氨基酸序列比对分析及系统发育树分析

将 8 个蛋白的氨基酸序列进行序列比对, 结果如图 8 所示, 8 个序列都具有 GH1 家族葡萄糖苷酶的两个典型的谷氨酸(E)催化位点。N 端序列差异明显, C 端序列具有较高的一致性。同时对 8 个蛋

基因与对应的蛋白注释的一致性在 100%。在线 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 8 个基因编码蛋白的氨基酸长度、分子质量和等电点如下表 3 所示。蛋白质的跨膜结构能分析蛋白质的定位, 为后续的表达、纯化有着重要影响, 利用 TMHMM 2.0 对 8 个基因进行跨膜结构预测, 结果如下表 2 所示, 8 个蛋白均没有跨膜结构, 预测结果均为可溶性蛋白。信号肽能够引导新合成的蛋白向分泌通路转移, 预测蛋白类型, 利用 SignalP4.0 对 8 个基因进行信号肽预测, 预测结果如下表 2 所示, 8 个蛋白均没有信号肽, 预测结果均为非分泌蛋白。

白序列用 MEGA 5 软件的 NJ 法构建系统发育树, 结果如图 9 所示, 8 个蛋白序列的一致性在 32%~74% 之间。从进化树分析结果发现, 8 个蛋白形成 3 个进化簇, 其中 *BglBW14* 和 *BglDW14* 氨基酸一致性最高为 74%, 其次 *BglFW14*、*BglHW14*

和 *BglGW14* 相互之间的一致性在 66%以上。其它蛋白氨基酸一致性均在 60%以下,尤其 *BglAW14* 与其它 7 个蛋白氨基酸一致性在 40%以下。

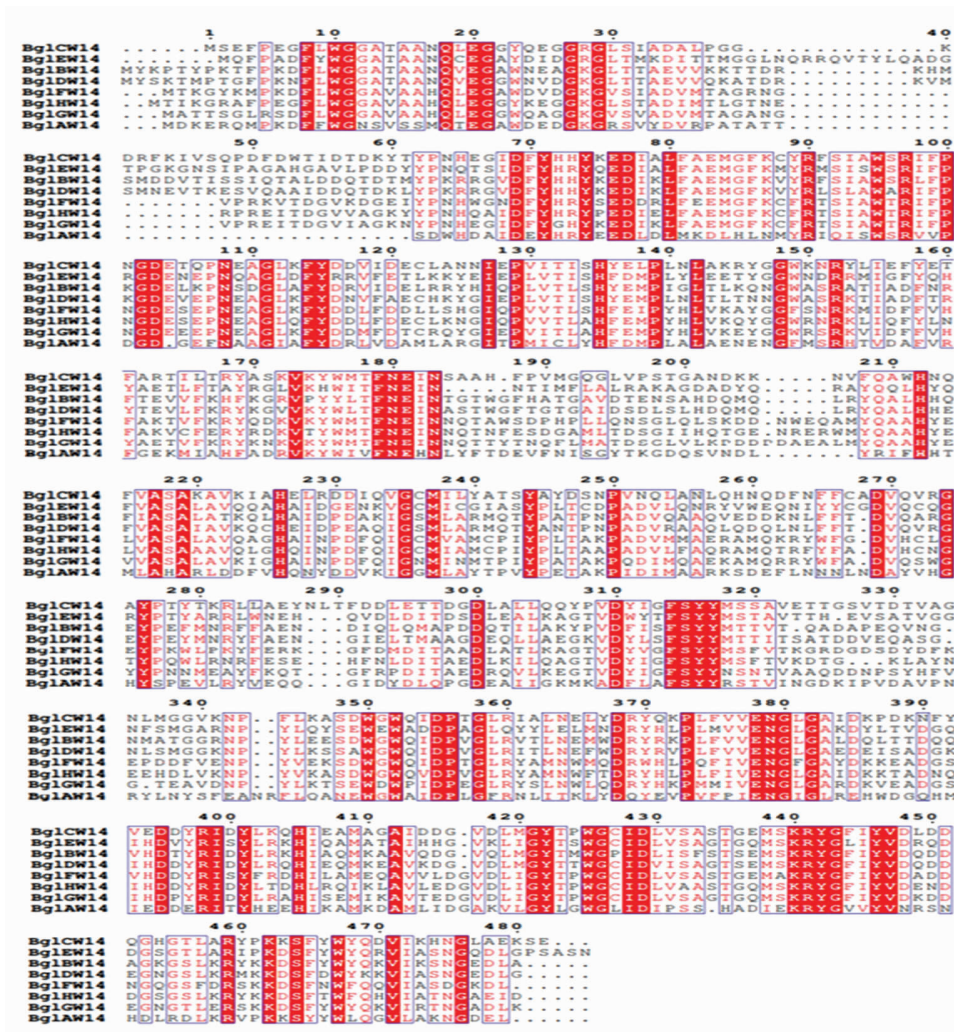


图 8 氨基酸序列比对结果

Fig.8 Amino acid sequence alignment results

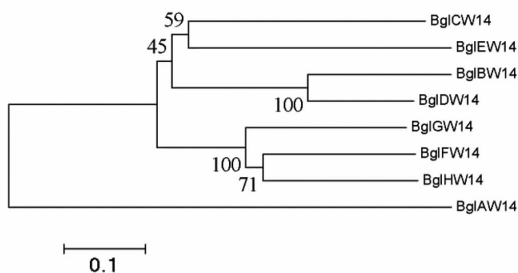


图 9 系统发育树

Fig.9 Phylogenetic tree

2.4.3 蛋白二级结构预测 蛋白质的二级结构是蛋白质的多肽链中有规则重复的构象,主要包括  $\alpha$ -螺旋  $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角,在线 ([https://npsa-prabiibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopmpl](https://npsa-prabiibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopmpl))预测 *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglEW14*、*BglFW14*、*BglGW14* 和 *BglHW14* 的二级结构,结果如下表 4 所示,8 个蛋白均有最大占比的  $\alpha$ -螺旋,中等占比的延伸链,大占比的无规则卷曲以及小占比的  $\beta$ -转角。

2.4.4 亚细胞定位 亚细胞定位能预测蛋白在细胞内的位置,对于研究蛋白具有重要意义,在线



(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) 预测 *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglEW14*、*BglFW14*、*BglGW14* 和 *BglHW14* 编码蛋白在细胞内的位置如下表 5 所示, *BglAW14*、*BglBW14*、*BglCW14*、*BglDW14*、*BglFW14* 和 *BglGW14* 的预测

结果显示其位于细胞质内, *BglEW14* 的预测结果显示其位于分泌内, *BglHW14* 的预测结果显示其位于细胞膜。其中 *BglCW14* 和 *BglFW14* 在周质空间内有较多的占比, *BglCW14* 和 *BglFW14* 具有部分可溶性可能与此相关。

表 4 蛋白二级结构预测

Table 4 Protein secondary structure prediction

蛋白名称	$\alpha$ -螺旋	$\alpha$ -螺旋 占比/%	延伸链	延伸链 占比/%	无规则卷曲	无规则卷曲 占比/%	$\beta$ -转角	$\beta$ -转角 占比/%
<i>BglAW14</i>	195	42.39	85	18.48	133	28.91	47	10.22
<i>BglBW14</i>	187	38.48	92	18.93	155	31.98	52	10.7
<i>BglCW14</i>	174	36.1	102	21.16	150	31.12	56	11.62
<i>BglDW14</i>	224	46	81	16.63	125	25.67	57	11.7
<i>BglEW14</i>	172	35.1	108	22.04	161	32.86	49	10
<i>BglFW14</i>	168	35.07	87	18.16	165	34.45	59	12.32
<i>BglGW14</i>	159	33.12	102	21.25	158	32.92	61	12.71
<i>BglHW14</i>	149	31.17	105	21.97	161	33.68	63	13.18

表 5 亚细胞定位

Table 5 Subcellular localization

蛋白名称	细胞质	跨膜	分泌	周质空间
<i>BglAW14</i>	7.64	2.36	0	0
<i>BglBW14</i>	7.97	1.43	0.6	0
<i>BglCW14</i>	4.91	2.93	0.4	1.76
<i>BglDW14</i>	4.59	2.91	1.86	0.65
<i>BglEW14</i>	0.58	3.15	6.01	0.27
<i>BglFW14</i>	4.31	2.75	0.65	2.29
<i>BglGW14</i>	7.15	0.87	0.31	1.67
<i>BglHW14</i>	3.2	6.6	0	0.2

### 3 结论

1) 本研究成功克隆到 8 个来自植物乳杆菌 WU14 的 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶编码基因。经 SDS-PAGE 验证可知 8 个酶蛋白在大肠杆菌中异源表达成功, 但只有 3 个蛋白 *BglAW14*、*BglCW14* 和 *BglFW14* 为部分可溶性表达, 其余 5 个酶蛋白为包涵体。

2) 对 8 个基因的编码蛋白进行生物信息学分析, 结果显示: 8 个基因都属于 GH1 家族, 编码 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶。编码氨基酸具有 GH1 家族 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶保守的两个催化区域

(NEP 和 ENG)。编码蛋白都无信号肽和跨膜结构、疏水性较强。亚细胞结构预测可知, 除了 *BglEW14* 主要存在于分泌结构内和 *BglHW14* 主要存在于细胞膜, 其余的 6 个基因都存在于细胞质内。

3) 研究表明 *BglAW14*、*BglCW14* 和 *BglFW14* 在大肠杆菌中异源表达为可溶性蛋白, 并纯化获得了单一目的条带, 但上述 3 个可溶性蛋白以 pNPG 为底物未检测到  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, 这与 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶具有特异降解 6-磷酸底物, 而不能高效水解 pNPG 的酶学特性相一致。



## 参 考 文 献

- [1] 张哲. 植物乳杆菌  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的胞内定位及性质研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.  
ZHANG Z. Intracellular localization and properties of *Lactobacillus plantarum*  $\beta$ -D-glucosidase[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014.
- [2] 卜潇. 葡萄酒中植物乳杆菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其苹果酸-乳酸发酵潜力研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.  
BU X. Study on *Lactobacillus plantarum*  $\beta$ -glucosidase and its malic acid-lactic fermentation potential in wine[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.
- [3] GAGNÉ S, LUCAS P M, PERELLO M C, et al. Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 110(1): 218-228.
- [4] MARET, DU, TOIT, et al. *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 4(6): 876-906.
- [5] MILLA ALVES BAFFI, NATÁLIA MARTIN, THAISE MARIÁ TOBAL, et al. Purification and Characterization of an Ethanol-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and Its Potential for Hydrolysis of Wine Aroma Precursors[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171 (7): 1681-1691.
- [6] LERM E, ENGELBRECHT L, DU TOIT M. Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* south African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures[J]. South African Journal of Enology & Viticulture, 2011, 32(2): 280-295.
- [7] BARBOSA A M, GIESE E C, DEKKER R F H, et al. Extracellular beta-glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology[J]. New Biotechnology, 2010, 27(4): 374-381.
- [8] 曹慧方. 来源于 *Alicyclobacillus* sp.A4 的 GH1 家族  $\beta$ -葡萄糖苷酶的克隆表达及葡萄糖耐受性分子改造[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2017.  
CAO H F. Cloning and expression of GH1 family  $\beta$ -glucosidase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and molecular modification of glucose tolerance[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [9] WITT E, FRANK R, HENGSTENBERG W. 6-Phospho- $\beta$ -galactosidases of Gram-positive and 6-phospho- $\beta$ -glucosidase B of Gram-negative bacteria: comparison of structure and function by kinetic and immunological methods and mutagenesis of the lacG gene of *staphylococcus aureus*[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1993, 6(8): 913-920.
- [10] DESAI S K, NANDIMATH K, MAHADEVAN S. Diverse pathways for salicin utilization in *Shigella sonnei* and *Escherichia coli* carrying an impaired bgl operon[J]. Archives of Microbiology, 2010, 192 (10): 821-833.
- [11] THOMPSON J, RUVINOV S B, FREEDBERG D I, et al. Cellobiose-6-phosphate hydrolase (CelF) of *Escherichia coli*: Characterization and assignment to the unusual family 4 of glycosylhydrolases[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(23): 7339-7345.
- [12] MCINTOSH L P, HAND G, JOHNSON P E, et al. The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: A 13 C-NMR study of *Bacillus circulans* Xylanase[J]. Biochemistry, 1996, 35(31): 9958-9966.
- [13] THOMPSON J, ROBRISH S A, BOUMA C L, et al. Phospho-beta-glucosidase from *Fusobacterium mortiferum*: Purification, cloning, and inactivation by 6-phosphoglucono-delta-lactone[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(5): 1636-1645.
- [14] THOMPSON J, LICHTENTHALER F W, PETERS S, et al. Beta-glucoside kinase (BglK) from *Klebsiella pneumoniae*. Purification, properties, and preparative synthesis of 6-phospho-beta-D-glucosides[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 (37): 34310-34321.
- [15] 牛瑜. 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶 Pbg125-217 的克隆、表达与酶学性质研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.  
NIU Y. Cloning, expression and enzymatic properties of 6-phosphate- $\beta$ -glucosidase Pbg125-217[D]. Jinan: Shandong University, 2011.
- [16] 尹捷, 刘一苇, 李洁, 等. 腾冲嗜热厌氧杆菌 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达与结晶及其功能鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008(10): 916-924.

- YIN J, LIU Y W, LI J, et al. Expression, crystallization and functional identification of 6-phosphate- $\beta$ -glucosidase from *Thermoanaerobacterium Tengchong*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008(10): 916-924.
- [17] 刘晴, 张宇微, 张宇宏, 等. 热稳定 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶 TteBglB 异源表达、分离纯化及酶学性质分析[J]. 中国农业科技导报, 2014, 16(6): 52-58.
- LIU Q, ZHANG Y W, ZHANG Y H, et al. Heterologous expression, purification and enzymatic properties of thermostable 6-phosphate- $\beta$ -glucosidase TteBglB[J]. China Agricultural Science and Technology Review, 2014, 16(6): 52-58.

### Cloning, Protein Expression and Bioinformatics Analysis of 6-Phosphor- $\beta$ -glucosidase Gene in *Lactobacillus plantarum* WU14

Miao Tingting<sup>1,2</sup>, Shen Fengfei<sup>1,2</sup>, Zhang Xiaoxiao<sup>3</sup>, Qiu Hulin<sup>1,2</sup>, Xu Bo<sup>2</sup>, Yin Aiguo<sup>2\*</sup>, Shi Pengjun<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045

<sup>2</sup>College of Biological and Food Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, Guangdong

<sup>3</sup>Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

**Abstract** *Lactobacillus plantarum* is a kind of facultative heterotrophic and facultative anaerobic homo-fermenting lactic acid bacteria, which has glycosidase activity and plays an important role in improving food flavor and fermentation characteristics. Using PCR technology, 8 6-phosphor- $\beta$ -glucosidase genes from the glycoside hydrolase 1 family of *L. plantarum* WU14 were successfully cloned. It is showed that eight genes contain a complete open reading frame, and the amino acid sequence alignment reveals there are two conservative catalytic sites of the 6-phosphor- $\beta$ -glucosidase gene in glycoside hydrolase 1 family, and the sequence identity is between 32%-74%. The results of SDS-PAGE shows that all proteins were expressed in *E. coli*. Among them, BglAW14, BglCW14, and BglFW14 are partially soluble expression. A purified and recovered to single target band was obtained, and the rest are expression of inclusion bodies. Bioinformatics analysis tells that the encoded proteins have weak hydrophobicity, and none of them have signal peptides and transmembrane structures. The prediction of subcellular structure shows that, except for BglEW14 mainly distributes in the secretion and BglHW14 mainly exists in the cell membrane. The remaining six genes are all present in the cytoplasm. The cloning, protein expression and biological sequence analysis of 6-phosphor- $\beta$ -glucosidase genes laid a theoretical foundation for further exploring the molecular research of 6-phosphor- $\beta$ -glucosidase derived from *Lactobacillus plantarum*.

**Keywords** *Lactobacillus plantarum* WU14; 6-phosphor- $\beta$ -glucosidase; gene cloning; protein expression; bioinformatics analysis