

# 纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达\*

李莹,陈斌,敬俊锋,何正波

(重庆师范大学昆虫与分子生物学研究所 重庆高校生物活性物质工程研究中心  
活性物质生物技术教育部工程研究中心,重庆 400047)

**摘要** 纳豆激酶是一种良好的天然蛋白酶类溶栓物质。国内外许多学者对该酶进行了基因工程研究,但在克隆表达过程中出现了许多长短不同的基因片段。本研究通过原产日本的优质纳豆中分离鉴定出高产纳豆杆菌 N07 并提取该菌株的全基因组,通过 PCR 手段扩增出能编码纳豆激酶信号肽、前导肽和成熟肽的前纳豆激酶酶原基因 *NK1*,以及能编码纳豆激酶成熟肽的纳豆激酶基因 *NK2*,构建了纳豆激酶基因的表达载体 pET30a-*NK1* 和 pET30a-*NK2*,转化 *E. coli* BL21 后在大肠杆菌中表达,并进行了活性分析。结果发现,纳豆激酶酶原基因片段 *NK1* 能成功表达出有活性的分泌型纳豆激酶,而纳豆激酶基因片段 *NK2* 的表达产物为无活性的包涵体。在对 *NK1* 和 *NK2* 的比较研究后可知,纳豆激酶酶原基因片段 *NK1* 能在大肠杆菌中很好的分泌表达,这将为纳豆激酶基因工程的深入研究奠定基础。

**关键词** 纳豆激酶基因;大肠杆菌;克隆;表达

中图分类号:Q785;Q786

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2012)01-0077-05

纳豆激酶是纳豆在发酵过程中由纳豆杆菌分泌的一种可溶解血栓的蛋白质<sup>[1]</sup>,它不仅能直接作用于纤维蛋白,而且还可以激活体内的 t-PA,从而表现出很强的溶血栓作用<sup>[2]</sup>。此外,它还具半衰期长、无毒副作用、分子量小、可以口服、口服后无不良反应等优点<sup>[3]</sup>。因此国内外有关研究人员都认为它极有可能成为新一代的抗血栓药物<sup>[4]</sup>。

Nakamura 等<sup>[5]</sup>首次报道了包括调控顺序在内的 1 473 bp 的 *NK* 全长基因序列。*NK* 基因以 GTG 为起始密码子,随后是 1 143 bp 组成的阅读框架,*N* 端的第 1~29 个氨基酸残基是信号肽(Signal peptide),第 30~106 的 77 个氨基酸残基是前肽(Propeptide),随后的 275 个氨基酸残基为纳豆激酶成熟肽(Nattokinase)。利用基因工程技术,作为药物大规模生产稳定高效具有导向性的溶栓药物纳豆激酶对于提高疗效、安全性及延长药物的半衰期,降低生产成本等方面具有重要意义。

本研究对新分离和筛选到的一株具有高效纤溶活性的菌株进行了纳豆激酶编码基因的克隆表达研究,以期今后对纳豆激酶结构基因的改造,改变纳

豆激酶的分子结构,进一步降低分子量、提高酶活力和热稳定性、延长半衰期等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 载体与菌株 纳豆杆菌 N07 由本实验室从纳豆中筛选获得,用于转化的菌株为 *E. coli* BL21 pM-D18-T Simple 载体为大连 TaKaRa 公司产品;pET-30a 载体本实验室保存。

1.1.2 工具酶与试剂 溶菌酶、EXTaq 酶、限制性内切酶 BamH I、Xho I、T<sub>4</sub> DNAligase 和 DNA Marker 均购自大连 TaKaRa 公司;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、细菌总 DNA 提取试剂盒、小量质粒抽提试剂盒均自上海生工生物工程技术服务有限公司;凝血酶、纤维蛋白原、尿激酶均自北京鼎国生物技术有限责任公司;其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 培养基<sup>[6]</sup> 大肠杆菌 LB 培养基中营养成分为:蛋白胨 1%,酵母粉 0.5%,NaCl 0.5%;纳豆杆菌培养基中营养成分为:牛肉膏 0.5%,酵母粉 0.5%,葡萄糖 0.5%,蛋白胨 1%,NaCl 0.5%。

\* 收稿日期 2011-02-18 修回日期 2011-09-18 网络出版时间 2012-01-15 18:09:00

资助项目:重庆市自然科学基金重点项目(No. CSTC2008BA5030)

作者简介:李莹,女,硕士,研究方向为基因工程,通讯作者:陈斌,E-mail: c\_bin@hotmail.com

网络出版地址: [http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120115.1809.201201.78\\_014.html](http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120115.1809.201201.78_014.html)

1.1.4 引物的设计合成 根据 NCBI 公布的纳豆激酶基因序列设计引物如下:

引物 Primer 1 为 5'-GCG GAT CCA TGA GAA GCA AAA AAT T-3'; 引物 Primer 2 为 5'-CCC TCG AGT TGT GCA GCT GCT TG-3'。上游引物加入 BamH I 酶切位点, 加入 GC 两个保护碱基; 下游引物加入 Xho I 酶切位点, 加入 CC 两个保护碱基。这对引物用以扩增编码纳豆激酶信号肽、前肽和成熟肽序列, 长度为 1 143 bp, 称为片段 1。

引物 Primer 3 为 5'-GCC GGA TCC GCG CAA TCT GTT CCT TAT-3'; 引物 Primer 4 为 5'-GCG CTC GAG TTA TTG TGC AGC TGC TTG TA-3'。上游引物加入 BamH I 酶切位点, 加入 GCC3 个保护碱基; 下游引物加入 Xho I 酶切位点, 加入 GCG3 个保护碱基。这对引物用以扩增编码纳豆激酶基因成熟肽序列, 长度为 825 bp, 称为片段 2。

## 1.2 方法

1.2.1 纤维蛋白平板的制备<sup>[7]</sup> 0.1 g 琼脂糖溶于 20 mL 测活缓冲液(含 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.02 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 值为 7.0)中 121 °C 灭菌后冷却至 58 °C, 加入 20 mg 纤维蛋白原, 摇匀后倒入已加有 20 U 凝血酶的平板, 4 °C 冷藏保存备用。

1.2.2 纳豆杆菌 N07 的分离及基因组的提取<sup>[8]</sup> 选取 5 粒纳豆, 溶于 5 mL 无菌生理盐水中, 稍振荡后, 置于摇床上 24 h, 摇床工作条件为 37 °C、220 r·min<sup>-1</sup>。取培养液 0.1 mL 于 EP 管内, 离心去上清, 用 1 mL 无菌生理盐水重悬菌体; 置于 80 °C 恒温水浴锅加热 10 min, 以去除杂菌<sup>[9]</sup>。将加热后的菌悬液经梯度稀释后涂布酪蛋白平板, 过夜培养, 选出透明圈明显的 10 个单菌落依次分别命名为 N01 到 N10。分别用 LB 培养基活化, 梯度稀释再次涂布酪蛋白平 203 板复筛, 得到 N07 样品透明圈最大。

将 N07 样品在 LB 中扩大培养, 取适量的指数生长期细菌用 UNIQ-10 柱式 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。用紫外分光光度计测量 DNA 含量, 进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳判定 DNA 完整性。

1.2.3 前纳豆激酶原基因及纳豆激酶基因的克隆

将设计的两对引物分别进行 PCR 扩增。扩增体系: 总体系为 50 μL, 其中 ddH<sub>2</sub>O 40.5 μL, 10 × PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 5 μL, 10 nmol·L<sup>-1</sup> 引物各 1.0 μL, 5 U·μL<sup>-1</sup> TaqDNA 聚合酶 0.5 μL, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 1.0 μL, 基因组 DNA 1 μL(约 100200

ng)。扩增反应过程为 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次, 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4 表达载体的构建 利用内切酶 BamH I 和 Xho I 对 PCR 产物、质粒 pET30a 分别进行双酶切, 用 1% 的凝胶进行电泳, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段部分, 然后通过 T<sub>4</sub> DNA Ligase 连接, 转化 *E. coli* BL21。采用菌落 PCR 方法, 筛选出阳性克隆子并进一步进行基因序列测定。

1.2.5 前纳豆激酶原基因及纳豆激酶基因的表达

取含有前导肽基因和全肽基因的 BL21 重组菌液 100 μL, 分别加入到两个含有抗生素的 100 mL LB 培养基中, 37 °C 培养 2~3 h, 当 OD550 值约为 0.8 时, 向培养基中加入 20% 葡萄糖溶液 1 mL 和 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 溶液 100 μL, 放于 22 °C 低温诱导培养过夜。

1.2.6 SDS-PAGE 鉴定表达产物 收集诱导培养的菌体, 用 1 × SDS 裂解液裂解, 配制 5% 浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS 电泳, 进行 SDS-PAGE 法鉴定。薄层扫描测定表达的纳豆激酶在菌体总蛋白中所占的比例。

1.2.7 纤维蛋白平板检测表达产物的纤溶活性 将重组 *E. coli* BL21 诱导发酵培养。取发酵液进行菌体超声波破碎和离心取发酵上清, 分别取 20 μL 点样到纤维蛋白平板上, 37 °C 温箱中放置 18 h, 观察结果。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增序列结果

在实验中, 提取基因组, 利用已设计的引物进行 PCR 扩增, 结果在 800~900 bp 之间(NK1, 片段 1) 和 1 100~1 200 bp 之间(NK2, 片段 2) 可以扩增出特异的条带(图 1)。与预期片段长度吻合。

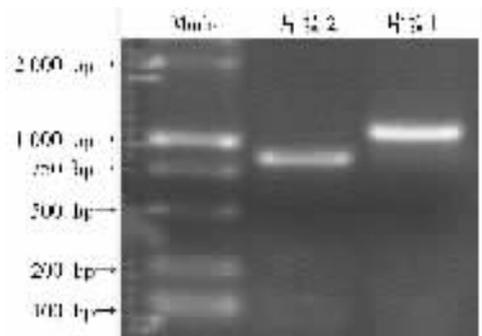


图 1 琼脂糖凝胶电泳图

### 2.2 表达质粒的构建与鉴定

将所获得的基因片段进一步与质粒载体 pET30a 酶连、转化 *E. coli* BL21 后,都筛选到了阳性克隆子,分别命名为 pET30a-NK1 和 pET30a-NK2。利用内切酶 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,可切出与插入基因大小近似的片段,酶切结果与预期一致(图 2)。

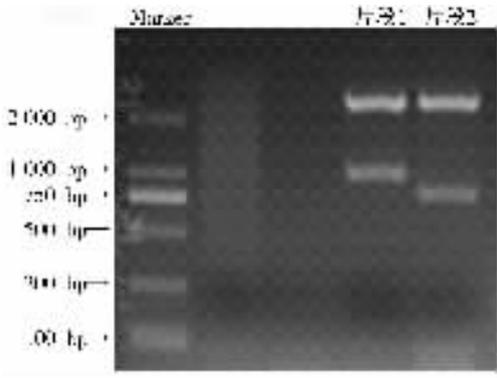


图 2 重组质粒双酶切鉴定结果

将带有 pMD18-T-NK1 和 pMD18-T-NK2 的菌液送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。将测序结果与 NCBI 上发表的纳豆激酶基因序列对比发现,扩增得到的结果与报道序列相似度达 99.8 %。

### 2.3 重组表达质粒在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 法鉴定

将重组质粒转化 *E. coli* BL 21 感受态细胞后,经过 IPTG 诱导培养,并收集破碎菌体后的发酵液,去除菌体的发酵液,均加等体积的 2 × SDS-PAGE Loading Buffer 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示两段基因均成功表达,其中前纳豆激酶酶原基因 NK1 表达出了分泌性蛋白,纳豆激酶条带位于 20.1 ~44.3 kD 之间,大约 28 kD 左右(图 3 中黑线所指处)。薄层扫描法测得 pET30a-NK1 的纳豆激酶表达产物约占菌体总蛋白的 20% 左右,pET30a-NK2 的纳豆激酶表达产物约占菌体总蛋白的 30% 左右(图 3)。

### 2.4 纤维蛋白平板检测活性

纤维蛋白平板检测发现,携带 pET30a-NK1 的 BL21 发酵液可溶解纤维蛋白,并且去除菌体的发酵液也可以在纤维蛋白平板上形成透明圈(图 4A1, A2),说明前纳豆激酶酶原基因 NK1 在 BL21 中成功表达出有活性的分泌型纳豆激酶。而携带 pET30a-NK2 的 BL21 发酵液在纤维蛋白平板上无法形成透明圈,虽然 SDS-PAGE 分析显示纳豆激酶

基因 NK2 成功表达(图 4B1, B2),但是不具有活性。

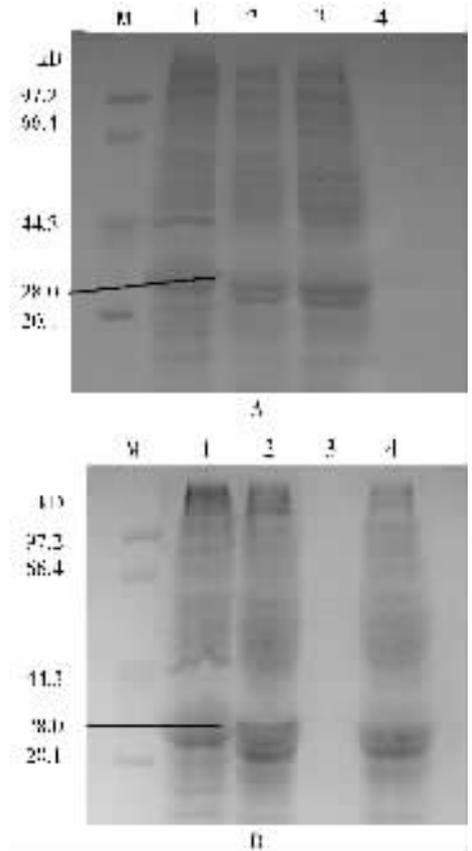


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析  
A pET30a-NK1 ( M :Marker, 1 :纳豆杆菌破碎菌体发酵液, 2 :pET30a-NK1 破碎菌体发酵液, 3 :pET30a破碎菌体发酵液, 4 :pET30a-NK1 去除菌体发酵液) ;B pET30a-NK2( M :Marker, 1 :纳豆杆菌破碎菌体发酵液, 2 :pET30a-NK2 破碎菌体发酵液, 3 :pET30a-NK2 去除菌体发酵液, 4 :pET30a破碎菌体发酵液)。

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

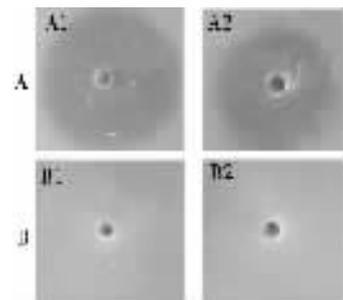


图 4 表达产物的活性检测  
A1 pET30a-NK1 破碎菌体发酵液活性检测 ;A2 pET30a-NK1 去除菌体发酵液活性检测 ;B1 pET30a-NK2 破碎菌体发酵液活性检测 ;B2 : pET30a-NK2 去除菌体发酵液活性检测。

图 4 表达产物的活性检测

## 3 讨论

纳豆激酶作为一种非常有潜力的新型溶栓剂,受到了国内外研究者多方面的关注。纳豆激酶的基

因序列经常出现不同的报道,推测造成这种现象的原因如下,由于基因的变异性,同种细菌的不同的株系携带的基因可能会有细微的差别,很多研究人员用的纳豆杆菌都是自行分离纯化的,彼此之间属于不同的株系,纳豆激酶基因序列出现细微差别是正常现象。在纳豆激酶的基因工程制备方面,很多研究者使用不同的生物反应器都实现了纳豆激酶的表达。例如,张淑梅等<sup>[10]</sup>在大肠杆菌中表达了纳豆激酶成熟肽基因;刘北域<sup>[11]</sup>、谢秋玲等<sup>[12]</sup>在大肠杆菌中表达了纳豆激酶原基因,并得到经过自身剪切和未剪切的两种表达产物,经过自身剪切的表达产物具有纤溶活性;朱立成等<sup>[13]</sup>克隆了包括启动子、信号肽、成熟肽序列的纳豆激酶全长基因,并在大肠杆菌中成功地表达;黄磊等<sup>[14]</sup>在蛋白缺陷型枯草芽孢杆菌中表达了纳豆激酶原基因和纳豆激酶基因,两者的表达产物均具有纤溶活性;罗立新等<sup>[15]</sup>在巴斯德毕赤酵母中表达了纳豆激酶成熟肽基因,产物具有活性;袁琳等<sup>[16]</sup>通过根癌农杆菌 EHA105 介导,转化番茄的下胚轴,纳豆激酶基因在番茄转录水平上得到表达;陈寅等<sup>[17]</sup>克隆了前纳豆激酶酶原基因,构建 pVL 载体,转化病毒,转染家蚕,用家蚕杆状病毒表达系统实现了纳豆激酶在家蚕血液中的表达。以上有关研究为本研究纳豆激酶前导肽序列对纳豆激酶活性和分泌影响情况提供了基础。

本研究选择大肠杆菌原核表达系统,成功地构建了前纳豆激酶酶原基因的表达载体 pET30a-NK1 和纳豆激酶基因的表达载体 pET30a-NK2,转化 *E. coli* BL21,测序结果表明,克隆到的两条目的片段与 NCBI 文献上发表的纳豆激酶基因序列对比,相似度达 99.8%。经过 IPTG 诱导培养,收集破碎菌体后的发酵液,去除菌体的发酵液,用纤维蛋白平板法检测酶活发现,前纳豆激酶酶原基因的表达产物具有活性且分泌到细胞外,为分泌性蛋白,而纳豆激酶基因的表达产物则不具有纤溶活性。原因可能是纳豆激酶的前导肽序列能帮助纳豆激酶成熟肽正确折叠,从而增强纳豆激酶的可溶性和活性,而没有前导肽帮助的话,纳豆激酶成熟肽正确折叠的几率就很低,容易形成包涵体,失去活性。有文献报道,一些与 NK 基因同源的枯草杆菌菌素蛋白有相似的前导肽区域,它们在大肠杆菌中表达需要前导肽序列<sup>[18]</sup>。枯草菌素原 E 在大肠杆菌中表达可通过自

身加工切除前导肽序列而形成有活性的成熟肽<sup>[19]</sup>。另外,信号肽序列表达出的信号肽帮助纳豆激酶从细胞内转移至细胞外,实现了纳豆激酶在大肠杆菌的胞外表达,给后期的分离纯化减少了麻烦。需要进一步进行的工作包括发酵条件的优化、纳豆激酶的纯化等,这将为纳豆激酶作为保健品的开发奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme( nattokinase) in the vegetable cheese natto a typical and popular soy-bean food in the Japanese diet [ J ]. *Experimentia*, 1987, 43( 10 ): 1110-1111.
- [2] Fujita M S, Nomura K C, Hong K G, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme in the vegetable cheese natto a popular soybean fermented food in Japan [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197( 3 ): 1340-1347.
- [3] 杨艳燕, 李顺意, 高尚, 等. 豆豉中纳豆杆菌的筛选和纳豆激酶的初步分离 [ J ]. *沈阳医科大学学报*, 2001( 6 ): 436-438.
- [4] 付利, 杨志兴. 纳豆激酶的研究与应用 [ J ]. *生物工程进展*, 1995, 15( 5 ): 46-49.
- [5] Nakamura T K, Yamagata Y H, Ichishima E J. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis*( natto ) [ J ]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56( 11 ): 1869-1871.
- [6] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学试验 [ M ]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [7] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [ J ]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 346-351.
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [ M ]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 满丽莉, 张丽萍. 纳豆激酶高产菌株的筛选鉴定及特征研究 [ J ]. *农产品加工学刊*, 2007, 5( 5 ): 4.
- [10] 张淑梅, 张云湖, 赵晓祥. 纳豆激酶基因的克隆与表达 [ J ]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15( 6 ): 912-915.
- [11] 刘北域, 官孝群, 宋后燕. 纳豆激酶原的基因克隆及在大肠杆菌中表达 [ J ]. *上海医科大学学报*, 1999, 26( 6 ): 401-404.
- [12] 谢秋玲, 孙奋勇, 廖美德. 纳豆激酶原基因的克隆及表

- 达 J]. 华南理工大学学报 2002, 30( 6 ):19-21.
- [ 13 ] 朱立成, 张耀洲. 纳豆激酶原核表达纯化及多克隆抗体的制备[ J ]. 浙江大学学报 2006, 33( 4 ):447-450.
- [ 14 ] 黄磊, 谢玉娟, 李申, 等. 纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达[ J ]. 食品科学 2007, 28( 5 ):199-202.
- [ 15 ] 罗立新, 黄志立, 潘力, 等. 纳豆激酶在巴斯德毕赤酵母中的表达[ J ]. 华南理工大学学报 2003, 31( 2 ):1-4.
- [ 16 ] 袁琳, 刘红海, 王吟, 等. 纳豆激酶基因导入番茄的研究[ J ]. 湖北大学学报 2006, 28( 2 ):181-186.
- [ 17 ] 陈寅, 林旭瑗, 张志芳, 等. 纳豆激酶基因在家蚕生物反应器中的表达[ J ]. 中国蚕业 2003, 24( 1 ):67-68.
- [ 18 ] Ikemura H, Takagi H, Inouye M. Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*[ J ]. J Biol Chem, 1987, 262( 16 ):7859-7864.
- [ 19 ] Ikemura H, Inouye M. In vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*[ J ]. J Biol Chem, 1988, 263( 26 ):12959-12963.

## The Cloning of Nattokinase Gene and Its Expression in *E. coli*

LI Ying, CHEN Bin, JING Jun-feng, HE Zheng-bo

( Institute of Entomology and Molecular Biology, Chongqing Engineering Research Center for Bioactive Substances, Engineering Research Center for Bioactive Substance Biotechnology of Ministry of Education, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China )

**Abstract** : Nattokinase is a natural streptokinase. Many scholars at home and abroad for the enzyme of genetic engineering research, but the genetic sequences in cloning expression appeared in much different length. The present study aims to determine which fragment of the nattokinase gene is better for the expression of the gene in *E. coli* BL21. We first isolated the effective fibrinolytic strain *Bacillus subtilis* N07 from Japanese natto, and extracted its genomic DNA. The nattokinase gene fragment Pre-Pro-NK( *NK1* ) that encodes signal peptide, propeptide and mature peptide, and the fragment NK( *NK2* ) that only encodes mature peptide were then separately amplified from the genomic DNA using PCR with specific primers. Two expression vectors, pET30a-NK1 for *NK1* and pET30a-NK2 for *NK2*, were constructed and transferred into *E. coli* BL21, followed by the multiplying of *E. coli* BL21 culture induced by IPTG, the isolation and purification of nattokinase and the detection of nattokinase activity on fibrin plates. The results showed that the bacteria from pET30a-NK1 effectively produced the secretive nattokinase with high fibrinolytic activity. However, the bacteria from pET30a-NK2 could not produce active nattokinase. This research has compared the expression of *NK1* with *NK2* in *E. coli* BL21, and the *NK1* could express well; it would be helpful in producing nattokinase by engineering.

**Key words** : nattokinase gene; *E. coli*; cloning; expression

( 责任编辑 方 兴 )