

# 活性污泥多源酯酶基因次選殖與表現分析

廖仁寶<sup>(1)</sup> 陳若菁<sup>(1)</sup> 李佳音<sup>(2)</sup> 吳明哲<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>行政院農業委員會畜產試驗所

<sup>(2)</sup>國立臺灣大學農業化學系

## Subcloning and expression of esterase genes from an activated sludge metagenome

R. B. Liaw<sup>(1)</sup>, J. C. Chen<sup>(1)</sup>, C. Y. Lee<sup>(2)</sup> and M. C. Wu<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

<sup>(2)</sup>Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

The ten putative esterase genes (*est1*, *est2*, *est3*, *est4b*, *est5*, *est6*, *est10*, *est11*, *est12A*, *est13*) derived from an activated sludge metagenome were successfully cloned into pET-52b(+) 3C/LIC expression vector by PCR. The recombinant plasmids were designated pET52b-Est1, -Est2, -Est3, -Est4B, -Est5, -Est6, -Est10, -Est11, -Est12A, and -Est13, respectively. The ten putative esterase genes could be overexpressed in *Escherichia coli* BL21 Star (DE3), but the expressed enzymes except rEst6 (recombinant Est6) existed in insoluble form. Most of the esterases except Est4B were overexpressed as soluble form when using *Escherichia coli* ArcticExpress (DE3) as the expression host and cultured at low temperature. However, only purified rEst6 expressed in *E. coli* BL21 Star (DE3) could be obtained with Strep•Tactin purification kit. Although the putative esterases could be expressed as soluble form in *E. coli* ArcticExpress (DE3), the problem was that most of the enzymes could not be purified with Strep•Tactin purification kit and His•Bind purification kit. Otherwise, the purified target enzymes accompanied by Cpn60 when using Strep•Tactin purification kit. Therefore, it is necessary to overcome the problems of the expression and purification of these novel esterase genes and only then can the biochemical properties of these esterases be characterized in the future.

Key Words: Activated sludge, Esterase, Subcloning

### 緒言

脂解酵素(lipolytic enzymes)分兩大類，包含酯酶(esterases, 酵素分類EC 3.1.1.1)與脂肪酶(lipases, 酵素分類EC 3.1.1.3)，前者可水解與合成短鏈甘油酯，後者作用對象則為長鏈甘油酯。脂解酵素為重要的工業酵素，可用於食物與飼料、清潔劑、化學合成、化妝品與香水、藥物合成等。脂解酵素具有多種特性，包括寬廣受質專一性、有機溶劑穩定性、位置專一性及立體專一性，故能應用於特殊產物的產製。畜牧廢水場之活性污泥中含有豐富的微生物，經過16S RNA基因序列分析比對，高達90%的細菌屬於未經培養分析的(Liaw *et al.*, 2010)。在先前的研究，以多源基因庫活性篩選方式得到12個株系，經DNA序列解析後可得到16個推定的脂解酵素基因。因此，本研究進一步將其中10個脂解酵素基因選殖至表現載體pET52b(+)上，進一步分析該等基因在宿主細胞表現情形，期能大量表現與純化該等酵素，並瞭解其生化特性，俾利應用於產業。

### 材料與方法

- (一)脂解酵素基因：10個脂解酵素基因來自10個含脂解活性的株系ASL01~ASL13，相關酵素DNA序列已經解析(Liaw *et al.*, 2010)。
- (二)引子設計：依據個別基因DNA序列與pET-52b(+) 3C/LIC表現載體構築限制設計引子。
- (三)PCR：利用個別酵素基因引子對進行增幅放大，以利重組質體之構築。
- (四)接合與轉形反應：依據廠商操作手冊將PCR產物與pET-52b(+) 3C/LIC表現載體接合，進一步以熱衝擊方式將重組質體轉形至宿主細胞大腸桿菌，添加SOC培養基後塗抹於選擇性培養基(Spirit blue agar)上過夜培養。
- (五)轉形株挑選：在培養皿上挑選具脂解活性轉形株於3 mL LB液態培養基，內含50 µg/mL ampicillin，振盪培養過夜後，利用套組萃取其質體DNA。
- (六)DNA定序：利用Sanger定序方法分析重組質體插入部分之DNA序列。
- (七)酵素純化與SDS-PAGE：利用Strep•Tactin與His•Bind兩種純化試劑組進行表現蛋白質的親和性純化步驟，並以SDS-PAGE分析蛋白質純化情形。

### 結論

許多研究指出多源酯酶基因無法在宿主細胞大腸桿菌大量表現為可溶性狀態，因此，有必要克服這些新型酯酶基因的表現和純化問題，如此方能進行酯酶的生物化學性質分析與後續應用。

### 結果與討論

由活化污泥多源基因體中所得10個推定的酯酶基因(*est1*, *est2*, *est3*, *est4b*, *est5*, *est6*, *est10*, *est11*, *est12A*, *est13*)已成功藉由PCR選殖至pET-52b(+) 3C/LIC表現載體上。重組質體分別命名為pET52b-Est1, -Est2, -Est3, -Est4B, -Est5, -Est6, -Est10, -Est11, -Est12A, -Est13。10個推定的酯酶基因可在*Escherichia coli* BL21 Star (DE3)中大量表現，但除rEst6外，其他表現的酯酶以不溶性形式存在(圖1)。當使用*Escherichia coli* ArcticExpress (DE3)作為表現宿主並在低溫下培養時，大多數酯酶除了Est4B之外被大量表現為可溶形式(圖2)。然而，只有在*E. coli* BL21 Star (DE3)中表達的rEst6可以用Strep•Tactin純化試劑組純化而得。雖然推定的酯酶可以在*E. coli* ArcticExpress (DE3)中表達為可溶形式，但問題為大多數酯酶無法使用Strep•Tactin純化試劑組和His•Bind純化試劑組純化。當使用Strep•Tactin純化試劑組時，Cpn60伴隨著純化的標的酯酶出現(圖3)。

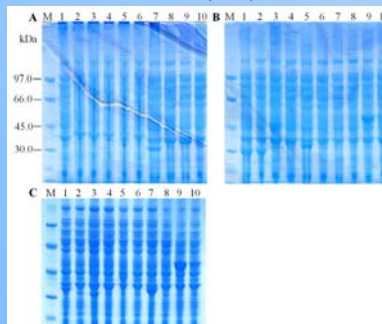


圖1. 重組質體在*E. coli* BL21 Star (DE3)的表現。  
A與B：菌株在25°C培養20 h；C：在18°C培養24 h。(A) Lanes 1-2: pET52b(+), lanes 3-4: pET52b-Est1, lanes 5-6: pET52b-Est2, lanes 7-8: pET52b-Est3, lanes 9-10: pET52b-Est4B。(B) Lanes 1-2: pET52b-Est5, lanes 3-4: pET52b-Est6, lanes 5-6: pET52b-Est10, lanes 7-8: pET52b-Est11, lanes 9-10: pET52b-Est12A。(C) Lanes 1-2: pET52b-Est13, lanes 3-4: pET52b-Est13, lanes 5-6: pET52b-Est13, lanes 7-8: pET52b-Est13, lanes 9-10: pET52b-Est13。

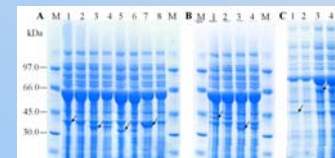


圖2. 重組質體在*E. coli* ArcticExpress (DE3)的表現。  
(A) Lanes 1-2: pET52b-Est1, lanes 3-4: pET52b-Est2, lanes 5-6: pET52b-Est3, lanes 7-8: pET52b-Est4B。(B) Lanes 1-2: pET52b-Est5, lanes 3-4: pET52b-Est6, lanes 5-6: pET52b-Est10, lanes 7-8: pET52b-Est11, lanes 9-10: pET52b-Est12A, lanes 11-12: pET52b-Est13。

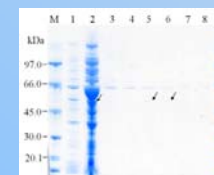


圖3. 以Strep•Tactin套組純化rEst13之SDS-PAGE分析圖。  
rEst13在*E. coli* ArcticExpress (DE3)中表現。  
Lane 1：流通管柱物，lane 2：流洗部分，lanes 3-8：洗提部分。箭頭所指為標的蛋白質。