

系列木聚糖降解酶基因同向串连表达的研究

刘思园, 邵蔚蓝, 裴建军, 吴华伟

(南京师范大学微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

[摘要] 采用分子克隆操作方法, 通过设计多个 SD 序列的多克隆位点, 首次成功构建了一个木聚糖降解酶系列基因同向串连表达载体, 经筛选鉴定获得具有极耐热性的 α -阿拉伯呋喃糖苷酶基因(*XarB*)、葡萄糖醛酸酶基因(*aguA*)和木聚糖酶基因(*XynB*)同向串连的 pHsh/*XarB-aguA-XynB* 一株克隆菌。酶学分析表明重组菌株具有较好的阿拉伯糖苷酶、木糖苷酶、葡萄糖醛酸酶和木聚糖酶活性。酶活单位分别为: 阿拉伯糖苷酶 11.8 U/mL, β -木糖苷酶 6.87 U/mL, α -葡萄糖醛酸酶 1.53 U/mL, 木聚糖酶 6.58 U/mL。

[关键词] 表达载体, 基因工程, 同向串连, 木聚糖降解酶

[中图分类号] Q814.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0093-05

Expression of Some Xylanolytic Enzyme Genes Tandem in the Same Direction

Liu Siyuan, Shao Weilan, Pei Jianjun, Wu Huawei

(The Key Laboratory of Microbiology Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: An expression vector is constructed with a tandem of three xylanolytic enzyme genes in the same direction, which includes arabinofuranosidase/xylosidase gene, α -glucuronidase gene, and xylanaseB gene. A new strategy is adopted to design three separate ribosome binding sites in the multiple cloning site of the expression vector. The analysis of enzyme activities of the engineered strain (pHsh/*XarB-aguA-XynB*) show that it has 11.8 U/mL of arabinofuranosidase, 6.87 U/mL of β -xylosidase, 1.53 U/mL of α -glucuronidase and 6.58 U/mL of xylanaseB activities.

Key words: expression vector, gene engineering, tandem in the same direction, xylanolytic enzyme

0 引言

目前, 木聚糖酶在食品、饲料、纺织、能源工业, 特别是在纸浆和造纸工业中已经得到广泛的应用^[1-4], 但是木聚糖酶只能将木聚糖分解成带有侧枝的不同聚合度的寡糖片段, 它不能降解侧链。而 94% 的秸秆半纤维素是由阿拉伯糖葡萄糖醛酸木聚糖构成; 同时我国每年有大量的秸秆成为环保负担, 利用木聚糖酶水解这类农业废弃物时, 阿拉伯糖和葡萄糖醛酸侧枝则对木聚糖酶的作用产生空间屏障, 使得内切木聚糖酶不能分解邻近这些侧枝的木聚糖而影响水解效率。因此, 阿拉伯呋喃糖苷酶、葡萄糖醛酸酶的参与对于低聚木糖的生产、废物的生物处理、食品或饲料养分的提高, 以及半纤维素的生物转化起着非常重要的作用。

热袍菌属的海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* MSB8 属极端嗜高温的厌氧细菌, 生长在 55 ~ 90℃ 海底火山口处, 能够分解和利用淀粉、纤维素、半纤维素等多聚糖^[5,6,7], 是极耐热性半纤维素酶的重要来源, 也是基因工程的理想材料。该菌所产的木聚糖酶和 α -葡萄糖醛酸酶具有极耐热性, 最适催化温度分别高达 105℃^[6] 和 85℃^[7]。嗜热产乙醇菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 能转化木糖、低聚木糖和木聚糖, 它产生的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶具有很高热稳定性, 同时, 还具有 β -木糖苷酶活性^[8]。将这种双重活性的

收稿日期: 2005-02-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370034).

作者简介: 刘思园, 女, 1976—, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生物学的研究. E-mail: siyuan8888@163.com

通讯联系人: 邵蔚蓝, 女, 1958—, 特聘教授, 博士生导师, 主要从事微生物分子生物学的教学与研究. E-mail: wlshao404@hotmail.com

酶与 α -葡萄糖醛酸酶或乙酰酯酶以及木聚糖酶协同作用就可彻底降解木聚糖。

目前国内外对这些极耐热性木聚糖降解酶基因的克隆、表达研究非常活跃,但是从未有人将它们进行联合表达,作者在这方面进行了开创性研究。将 *T. maritima* 的木聚糖酶、 α -葡萄糖醛酸酶和 *T. ethanolicus* 的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶的基因同向串连在表达载体中,并在大肠杆菌 JM109 中成功实现了这系列木聚糖降解酶的串连表达。该项研究提供了一种快速实现不同蛋白质在同一个宿主内高水平表达的技术,同时大大减少了实验操作的工作量。对于代谢过程中的不同酶,在功能上需要协同作用而同时表达的基因工程菌的构建具有重要的参考价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

嗜热产乙醇菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 由美国乔治亚州大学微生物系惠赠。海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* MSB8 购自美国菌种收藏中心,编号为 ATCC43589。大肠杆菌 *E. coli* JM109 购于 Promega (Wisconsin, WI, USA)。热激表达载体 pHsh 质粒系本实验室构建。

1.1.2 培养基

T. maritima MSB8 和 *T. ethanolicus* JW200 所用的培养基配方见文献^[7-9]。

1.1.3 主要生化试剂

限制酶 *NdeI*, *NheI*, *EcoRV*, *PstI*, *SmaI*, *BamHI*, *KpnI*, *StuI*, *SspI*, *XbaI*, *XhoI*, *SacI*, 磷酸化酶 T_4 PNK, T_4 DNA 连接酶和 Pyrobest DNA 聚合酶,购自宝生物工程公司;溶菌酶、氨苄青霉素、木聚糖、对硝基苯酚- β -D-木糖苷、对硝基苯-阿拉伯呋喃糖苷、4-O-甲基葡萄糖醛酸基-D-木聚糖和燕麦木聚糖购自 Sigma 公司;质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基和培养条件

大肠杆菌培养在 LB 培养基,电转化用 SOC 培养基,在氨苄抗性平板^[10]上筛选转化子。

T. maritima MSB8 和 *T. ethanolicus* JW200 的接种与培养:培养基经加热驱氧、充氮、冷却后加还原剂 Na_2S 0.5 g/L,并分装于预先充氮的 100 mL 血清瓶中,加盖密封并灭菌。用注射器按 0.5% 接种量接种于预先还原的培养基中,分别于 80℃ (*T. maritima*) 和 59℃ (*T. ethanolicus*) 静置培养 8 h。

1.2.2 基因操作

基因组 DNA 提取、DNA 的内切酶水解和连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备,以及基因的高效电转化方法均参照文献^[11]。质粒的制备、从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.2.3 反向 PCR

根据质粒 pHsh 多克隆位点的序列设计一对外向性引物 (pHsh-F-II 和 pHsh-R-II, 见表 1), 由上海生工生物工程技术服务公司合成。扩增参数:95℃ 变性 5 min, 加 Pyrobest DNA 聚合酶,94℃ 变性 40 s,60℃ 退火 1.5 min,72℃ 延伸 3 min,循环 35 次后 72℃ 保温 10 min。

1.2.4 含三个 SD 序列的质粒 pHsh

反向 PCR 产物割胶回收,末端磷酸化后加 T_4 DNA 连接酶使其自身环化。

1.2.5 DNA 测序

由上海生工生物工程技术服务公司完成。

1.2.6 PCR 扩增 *XarB*、*aguA*、*XynB* 基因

根据 Gene Bank 中 *XarB*、*aguA*、*XynB* 基因序列分别设计引物,由上海生工生物工程技术服务公司合成。上游引物均不含酶切位点,下游引物分别带有不同的酶切位点(见表 1)。PCR 扩增参数:95℃ 变性 5 min,加 Pyrobest DNA 聚合酶,94℃ 变性 40 s,分别在 54℃ (*XarB*)、56℃ (*aguA*)、55℃ (*XynB*) 退火 1.5 min,72℃ 延伸 3 min,循环 35 次后 72℃ 保温 10 min。

1.2.7 重组表达载体的构建

XarB 基因的 PCR 产物经 *PstI* 酶切后和经 *EcoRV*、*PstI* 双酶切的质粒 pHsh 用 T_4 DNA 连接酶连接,经筛

选鉴定获得插有 *XarB* 基因的质粒 pHsh/*XarB*;同理,*XynB* 和 *aguA* 基因 PCR 产物分别经 *XhoI*、*BamHI* 酶切后,再分别与经 *StuI*、*XhoI* 双酶切的质粒 pHsh/*XarB* 以及 *SmaI*、*BamHI* 双酶切的质粒 pHsh/*XarB-XynB* 连接,最后筛选鉴定获得同时插有 *XarB*、*aguA*、*XynB* 基因的重组表达载体 pHsh/*XarB-aguA-XynB*.

表 1 实验中使用的引物列表*

| Name | Size | Sequence | Use |
|-----------|-------|--|----------------|
| pHsh-F-II | 59 bp | 5'-CCGGGTATATCTCCTTCTGCGAGCTAGCCATATGATATCT ATATCTCCTTCTTGTCCGAC-3' | pHsh 反向 PCR |
| pHsh-R-II | 58 bp | 5'-GGGAGGATCCGGTACCAAGGAGATATAAGGCCTTCTAG AGATCTCGAGCACCACCACC-3' | pHsh 反向 PCR |
| X1 | 24 bp | 5'-ATGGCTAAGCCAATTATATTTAGAT-3' | 扩增 <i>XarB</i> |
| A1 | 18 bp | 5'-GACTACAGGATGTCTGG-3' | 扩增 <i>aguA</i> |
| B1 | 25 bp | 5'-ATGAGCCAGAATCTATCTCTGAGAG-3' | 扩增 <i>XynB</i> |
| X2 | 33 bp | 5'-CCCCTGCAGTTATTTATTCTCTACCCTTACTTC-3' | 扩增 <i>XarB</i> |
| A2 | 31 bp | 5'-CCCGGATCCTCACGGATATATCTTTCTTCCC-3' | 扩增 <i>aguA</i> |
| B2 | 39 bp | 5'-CCCCTGCAGTTATTTCTTTCTTCTATCTTTTCTCC AG-3' | 扩增 <i>XynB</i> |

* pHsh-F-II 和 pHsh-R-II 中的划线处为 SD 序列。

1.2.8 重组菌的诱导表达

重组质粒 pHsh/*XarB-aguA-XynB* 转化 *E. coli* JM109,挑取重组单菌落,接种含 *Amp* 的 LB 液体培养基,30℃ 过夜;按 1% 接种量接种于 2.5 mL 含 *Amp* 的 LB 培养基中,30℃ 振荡培养至 OD_{600} 达 0.7~0.8,42℃ 水浴摇床中热激诱导 6~8 h。

1.2.9 粗酶液的制备

取 1 mL 培养液,离心后去上清,1 mL TE 缓冲液洗涤细胞,离心沉淀用 400 μ L Tris-Cl (50 mmol/L,pH 7.5) 重悬,加溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL,室温下反应 30 min 后离心,上清为粗酶液。

1.2.10 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用 12% 的聚丙烯酰胺,按 Laemmli 方法进行蛋白电泳,电泳后用考马斯亮蓝 G-250 染色 1 h,然后脱色。

1.2.11 重组菌的生物学测定

对克隆菌 pHsh/*XarB-aguA-XynB* 的活性分析包括阿拉伯糖苷酶和 β -木糖苷酶活性、 α -葡萄糖醛酸酶活性、木聚糖酶活性,测定方法见文献^[7,8,11,12]。

2 结果与分析

2.1 质粒 pHsh 的反向 PCR 和测序

图 1 中第 2 泳道为质粒 pHsh 反向 PCR 结果,其大小与质粒 pHsh DNA 相同,约为 2.5 kb。测序结果表明反向 PCR 产物多克隆位点的序列与所设计的引物一致。

2.2 *XarB*、*aguA*、*XynB* 基因的扩增

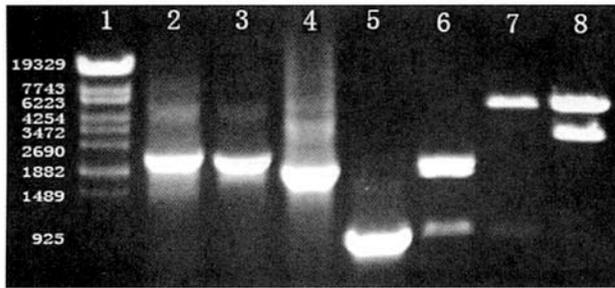
XarB、*aguA*、*XynB* 基因的 PCR 结果见图 1,其大小分别为 2.5 kb、2 kb 和 1 kb,与文献报道^[5-8] 的相同,见图 1 中第 3、4、5 泳道。

2.3 重组表达载体的构建与鉴定

通过酶切、连接方法,先后将 *XarB*、*XynB* 和 *aguA* 基因插入表达载体 pHsh 中,分别获得了重组质粒 pHsh/*XarB*、pHsh/*XarB-XynB* 和 pHsh/*XarB-aguA-XynB*(见图 2)。电泳检测结果表明 *XarB*、*XynB* 和 *aguA* 基因均已按照要求插入到质粒 pHsh.2 中(见图 1)。

2.4 串连的 *XarB*、*aguA*、*XynB* 基因在宿主中的表达

将构建的重组质粒 pHsh/*XarB-aguA-XynB* 转化大肠杆菌 JM109 菌株,42℃ 热击诱导表达后,收集并制备粗酶液,另取 1 mL 粗酶液用 70℃ 热处理 20 min,进行全细胞 SDS-PAGE 电泳。结果如图 3 所示,同时以转化的空载体为对照。从图上可以看出,*XarB*、*aguA* 和 *XynB* 基因在同一个菌体中均有表达,三种蛋白质的相对分子质量分别约为 85 000(*XarB*)、72 000(*aguA*)、43 000(*XynB*),与预计的结果基本一致。



1:λ-Eco T14 digest DNA marker; 2:PCR amplified pHsh; 3:PCR amplified *XarB*; 4:PCR amplified *aguA*; 5:PCR amplified *XynB*; 6:*SspI*-digested pHsh/*XarB*; 7:*PstI*-digested pHsh/*XarB*-*XynB*; 8:*PstI*-digested pHsh/*XarB*-*aguA*-*XynB*

图 1 PCR 扩增产物及酶切图谱

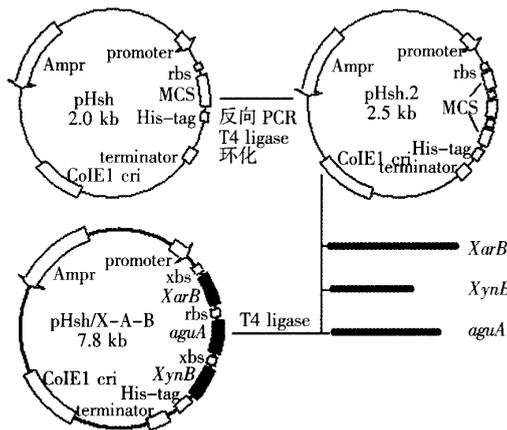
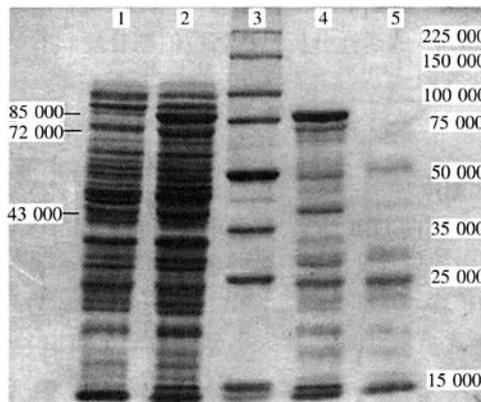


图 2 重组质粒 pHsh/*XarB*-*aguA*-*XynB* 的构建图



1:空质粒 pHsh; 2:诱导表达的 pHsh/*XarB*-*aguA*-*XynB*; 3:protein marker; 4:诱导表达的 pHsh/*XarB*-*aguA*-*XynB*,70°C,20min; 5:空质粒 pHsh, 70°C,20min

图 3 蛋白质诱导表达的 SDS-PAGE 图谱

2.5 重组酶的活性检测

重组菌的细胞密度生长到 $OD_{600} = 0.8$ 时,热激诱导 8 h 后,细胞密度为 $OD_{600} = 2.06$,收集细胞、溶解酶裂解、离心、上清即为粗酶液。检测粗酶液中各种酶活,结果见表 2。表明重组菌同时具有较好的木聚糖酶活性,葡萄糖醛酸酶活性,以及阿拉伯糖苷酶

表 2 重组菌的活性分析

| Expressed product | <i>XynB</i> | <i>aguA</i> | <i>XarB</i> | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | | | a | b |
| Enzyme activity/(U/mL) | 6.58 | 1.53 | 11.8 | 6.87 |

a. arabinofuranosidase activity; b. β -xylosidase activity

活性和 β -木糖苷酶活性.

3 讨论

研究蛋白质结构和功能时,蛋白质的表达是关键.采用基因工程方法进行高效表达是首选解决方案.由嗜热产乙醇菌 *T. ethanolicus* JW200 和海栖热袍菌 *T. maritima* MSB8 产生的系列极端耐热性木聚糖降解酶的基因工程菌的构建一直是人们的研究热点,其中有关单个 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因、葡萄糖醛酸酶基因和木聚糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达已经做了很多研究.

以往人们对这些木聚糖降解酶基因的研究都是将单个酶基因在大肠杆菌中分别进行克隆和表达后,再逐个添加不同的酶进行分析研究,其相关的研究工作程序繁琐,实际工作量也是很大.作者通过反向 PCR 的方法,在质粒 pHsh 的多克隆位点处设计三个串连的核糖体结合位点(ribosome binding site),首次成功地将 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因、葡萄糖醛酸酶基因和木聚糖酶基因克隆到同一个 pHsh 载体中,构建了 *XarB*、*aguA*、*XynB* 基因同向串连的重组表达载体 pHsh/*XarB*-*aguA*-*XynB*.由于三个 rbs 与启动子之间距离不同,第一个 rbs 可能具有一定的优先性.因此在构建串连表达的载体时,将活性较低的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因克隆在第一个 rbs 后,葡萄糖醛酸酶基因克隆在第二个 rbs 后,而高活性的木聚糖酶基因克隆在第三个 rbs 后.通过在重组菌 JM109 中表达和酶活检测,发现该重组菌均具有阿拉伯糖苷酶、木糖苷酶以及葡萄糖醛酸酶活性和木聚糖酶活性.这一尝试不仅可以快速的实现多个蛋白质的同时高水平表达,而且实验操作过程也简单易行.通过这种基因重组技术,也可以使发酵工程菌获得降解半纤维素的能力,或者把能有效降解半纤维素的微生物构建成发酵工程菌,从而把半纤维素转化为所需求的生物工程产品,对于一些代谢过程中复合应用的酶系构建基因工程菌具有重要的参考价值.

[参考文献]

- [1] Sunna A, Autranikian G. Xynlandytic enzymes from fungi and bacteria [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1997, 17(1): 39—67.
- [2] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbiol xylanases and their industrial applications: a review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56(3/4): 326—338.
- [3] Shao W L, Xue Y M. Molecular biotechnology in exploiting the resource of hemicellulose [J]. J Food Science Biotechnol, 2002, 21(1): 88—93.
- [4] Xue Y M, Mao Z G, Liu H L, et al. Advances in the studies on α -glucuronidase [J]. Forestry Chemistry and Industry, 2002, 22(4): 75—79.
- [5] Christoph W, Wolfgang L. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8 [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(5): 1810—1815.
- [6] Yamano S, Kondo K, Tanaka J, et al. Construction of a brewer's yeast having alpha - acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter acetii* sp. xylinum integrated in the genome [J]. J Biotechnol, 1994, 32(2): 173—178.
- [7] Ruile P, Winterhalter C, Liebl W. Isolation and analysis of a gene encoding a β -glucuronidase, an enzyme with a novel primary structure involved in the breakdown of xylan [J]. Mol Microbiol, 1997, 23(2): 267—279.
- [8] Shao W L, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* [J]. J Bacteriol, 1992, 174(18): 5848—5853.
- [9] Rober H, Thomas A L, Helmut K, et al. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90°C [J]. Arch Microbiol, 1986, 144(2): 324—333.
- [10] Milner Y, Avigad G. A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses [J]. Carbohydr Res, 1967, 4(3): 359—361.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates [J]. Anal Biochem, 1972, 47(2): 273.

[责任编辑:孙德泉]