

极耐热内切葡聚糖酶 Cel12B 的 基因克隆、表达和酶学性质的研究

李相前^{1,2}, 邵蔚蓝^{1,3}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

(2. 淮阴工学院生物系, 江苏 淮安 223001)

(3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 极耐热酶在工业生产中有可观的潜在用途,为此从极端嗜热厌氧细菌海栖热袍菌中通过 PCR 方法克隆出 Cel12B 基因,构建重组表达质粒 pET-20b-Cel12B,转化至大肠杆菌 JM109(DE3)诱导表达后,获得极耐热重组内切葡聚糖酶.经过热处理和组氨酸亲和层析柱纯化,获得电泳纯单一一条带,酶学性质测定表明:最适作用 pH 为 6.0,最适作用温度 90℃,在 pH5.3~6.5 之间酶活力稳定,90℃ 半衰期 70 min.

[关键词] 内切葡聚糖酶,海栖热袍菌,热稳定性

[中图分类号] Q933 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2006)03-0071-05

Cloning and Expression of Endoglucanase Cel12B Gene from *Thermotago Maritima* in *Escherichia coli* and Characterization of Recombinant Enzyme

Li Xiangqian^{1,2}, Shao Weilan^{1,3}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

(2. Department of Biological, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223001, China)

(3. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract Endoglucanase is one of major parts of enzymatic hydrolysis of cellulose. The endoglucanase found in *T. maritima* shows extremely high thermostability and considerable potential in industrial application. A thermostable endoglucanase Cel12B from a hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, is over-expressed in *Escherichia coli* using the T7 polymerase expression system. The expressed endoglucanase Cel12B is purified in two steps, heat treatment and immobilized metal affinity chromatography, and obtains a single band on SDS-PAGE. The maximum activity on carboxymethylcellulose is found at 90℃ and pH 6.0, The purified enzyme has a half-life of over 70-min at 90℃, and retains over 87% of its activity after holding a pH ranging from 5.3 to 6.5 for 2 h at 85℃.

Key words endoglucanase, *Thermotago maritima*, thermostability

0 引言

纤维素是自然界中数量最大的可再生资源,它的降解是自然界碳素循环的中心环节,纤维素的利用与转化对于解决目前世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有十分重要意义^[1].

内切葡聚糖酶是纤维素酶法降解的重要一员,一般认为:内切葡聚糖酶以随机方式切割葡聚糖线性大分子,再辅以纤维二糖酶和葡萄糖苷酶作用彻底降解纤维素.在纤维素酶法降解研究中,来自真菌的常温

收稿日期:2005-11-10.

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助项目(05KJB180006).

作者简介:李相前,1965—,博士研究生,副教授,主要从事发酵工程的学习与研究. E-mail: xiangqianli2002@163.com

酶研究较多,事实上极耐热酶在工业转化过程中具有保持较快反应速度、反应受污染可能性小、提高酶作用底物溶解度、较高抗化学变性等优点而引起广泛注意^[2]。海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)是生长在海底火山口的极端嗜热专性厌氧微生物,能够分解利用淀粉、纤维素、半纤维素等多聚糖,可以产生耐高温和热稳定性的淀粉酶、纤维素酶和半纤维素酶^[3]。根据已公布的基因组序列,经对编码的氨基酸序列分析,海栖热袍菌有多个编码内切葡聚糖酶的基因,其中内切葡聚糖酶 Cel5A、Cel12A、Cel74 等均有报道,但 Cel12B 的酶学特性尚未知^[4-6]。本文报道用 pET-20b 表达载体,克隆、表达 *T. maritima* 内切葡聚糖酶 Cel12B 基因并融合 6 个组氨酸标签,经亲和层析,获得纯酶,测试了该酶部分生化特性,为极耐热内切葡聚糖酶的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 *E. coli* JM109, JM109(DE3)购于 Promega 公司; *T. maritima* 购自美国菌种保藏中心,编号为 ATCC43589; 质粒 pET-20b 购于 Novagen 公司。

1.2 酶和试剂

Pyrobest 聚合酶、限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA 标准分子量等购于 TAKARA 公司; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司; 氨苄青霉素、IPTG 购自 SIGMA 公司。

1.3 海栖热袍菌基因组 DNA 的提取方法

参照参考文献 [7]。

1.4 引物设计

按照已知的海栖热袍菌葡聚糖酶基因(AE001752)设计引物,运用 DNA 分析程序对海栖热袍菌内切葡聚糖酶 12B 的信号肽序列进行分析,引物由中科院上海生物工程中心合成。

引物 1: N 端 5' - GGAATTCATATGAGGTGGCAGTCTTCTG A - 3', 前面加上 NdeI 位点;

下游引物设计: C 端 5' - CCCAAGCTTTTATTACTCGAG TTT TAC ACC TTC GAC AGA GAA GTCC, 引入组氨酸标签和 XhoI 位点,在组氨酸标签后加入两个终止密码子 UAA、UAG 来加强翻译终止。

1.5 重组质粒构建

PCR 扩增结束后(扩增的条件是 95°C 5 min, 暂停计时, 加高保真性的 Pyrobest 聚合酶, 加 40 μL 石蜡油密封, 35 次循环(94°C 50 s, 60°C 90 s, 72°C 3 min, 72°C 10 min;), 电泳检查并将 PCR 产物从胶回收, 用 NdeI 和 XhoI 双酶切并经纯化, 以适当比例与同样双酶切的 pET-20b 载体混合, 加入连接酶, 16°C 过夜, 转化 JM109 构建内切葡聚糖酶 12B 的重组质粒 pET-20b-Cel12B。

1.6 Cel12B 基因在 pET-20(b) 表达载体中的表达

用重组质粒 pET-20b-Cel12B 转化宿主菌株 *E. coli* JM109BDE3, 挑取单菌落接入含有 Amp 100 μg/mL 的 LB 培养基中, 30°C 振荡培养过夜; 取 100 μg/mL 过夜培养液接入 100 mL 含 Amp 100 μg/mL 的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8, 吸出 1 mL 未诱导的培养物, 剩余培养物中加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 并继续培养, 培养结束后, 取 1 mL 菌液, 以 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA pH 7.6)洗涤细胞 2 次, 并用 500 μL 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)重悬细胞, 超声波破碎 30 s 4 次, 12 000 r/min 4°C 离心 15 min 去除细胞碎片沉淀, 取上清测酶活。

1.7 葡聚糖酶酶活的测定

加酶液 100 μL 和 50 μL 0.1 mol/L pH 6.0 的咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液, 350 μL 水, 500 μL CMC 底物, 85°C 反应 10 min 后, 加 2 mL 终止剂 DNS 煮沸 5 min, 冷却后测 A₅₂₀ 值。酶活单位(U)的定义: 在 85°C 下, pH 6.0, 1 min 内催化产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量。

1.8 葡萄糖的标准曲线的测定

配制 0.4 mg/mL 葡聚糖溶液母液, 然后用不同浓度梯度的葡萄糖与 DNS 反应, 最后测溶液在每次反应后的 A₅₂₀ 值。在一定浓度范围内(0.05~0.25 mg/mL), 葡萄糖的浓度与吸光度值呈线性关系。

蛋白质浓度用 Bradford 法测定, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[8]。

1.9 重组酶的分离纯化

1.9.1 重组菌的培养

将含有质粒的 pET-20b-Cel12B 的 *E. coli* JM109 DE3 的 LB 平板菌种接种于 Amp 的 LB 液体培养基, 30℃ 转速 200 r/min 摇瓶过夜制备液体种子, 然后以 1% 的接种量接入 2 个装有 250 mL 含有 Amp 的液体 LB 培养基的 1 L 三角瓶中, 37℃ 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 0.6~0.8 时加入 IPTG 至浓度 1 mmol/L, 继续培养 6 h, 4℃ 下 5 000 g 离心 20 min 收集细胞。

1.9.2 粗酶液的制备

将收集细胞用 50 mL 亲和柱结合缓冲液三角瓶中重悬, 经高压细胞破碎仪(French Pressure, Thermo)破碎细胞, 9 600 g 离心 20 min, 取上清于 75℃ 热处理 20 min, 9 600 g 离心 30 min, 上清液即为粗酶液。(亲和层析所用缓冲液见参考文献 [7])。

1.9.3 His-tag 柱亲和层析

将粗酶液经微孔膜过滤后注入亲和层析柱(Novagen χ 1.6 cm \times 2 cm), 然后用洗涤缓冲液洗涤, 最后用洗脱缓冲液洗脱, 流速 0.5 mL/min, 以每管 1 mL 分部收集。收集酶活的峰值部分, 用半透膜超滤浓缩后, 以 SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯度。

1.10 重组酶性质分析

(1) 最适反应温度的测定: 在 65~100℃ 范围内, 每隔 5℃, 分别测定酶活。以酶活最高为 100%, 计算相对酶活。

(2) 最适反应 pH: 在不同的 pH 值条件下分别测定酶活, 以酶活最高为 100%, 计算相对活性。反应所用的缓冲液是 0.1 mol/L 咪唑-邻苯二甲酸氢钾缓冲液, 使用时需在 90℃ 下校正, 校正后的范围 pH 值为 4.5~8.0。

(3) 温度稳定性: 在相对稳定的 pH 值下, 使酶在某个温度下保温不同的时间, 再测定相对酶活, 以未保温(4℃ 保存)的酶样活性为 100%, 由此确定酶的稳定性。

(4) pH 稳定性: 酶在不同的 pH 值条件下保温相同的时间, 再分别测定残留酶活性与不保温的酶活比, 计算百分比。缓冲液的选择同上。

2 结果

2.1 原核表达质粒的构建

采用 PCR 技术从 *T. maritima* 菌的基因组中扩增出 Cel12B 基因片段(870 bp)见图 1, PCR 产物和载体双酶切, 以适当比例混合并连接, 构建内切葡聚糖酶基因 Cel12B 的高效表达质粒 pET-20b-Cel12B, 其特点是 T7 启动子控制下的内切葡聚糖酶基因与组氨酸标签融合, 便于重组蛋白纯化。

2.2 重组质粒鉴定分析

连接液转化大肠杆菌 JM109 后, 在 Amp 抗性平板上得到转化子。然后用限制性内切酶对重组质粒进行鉴定, 重组质粒能被 Nde I 和 Xho I 双酶切下一条与 PCR 扩增片段大小一致的片段(如图 2)。因此, 初步证实 Cel12B 基因已插入 pET-20b 载体中。测序后, 经过比对分析, 得到 Cel12B 基因序列。

2.3 Cel12B 基因在大肠杆菌中的表达

重组质粒 pET-20b-Cel12B 转化至大肠杆菌 JM109(DE3)经 IPTG 诱导 4h 后, 收集菌体细胞进行 SDS-PAGE(分离胶的浓度为 10%), 考马斯亮蓝染色结果见图 3。从电泳图谱上可以看出, 内切葡聚糖酶 Cel12B 在相对分子质量 32 000 处有明显的蛋白表达条带。

2.4 表达蛋白的纯化

经 IPTG 诱导表达的菌体 JM109(DE3)/pET-20b-Cel12B 裂解, 并经 70℃ 20 min 热处理, 取上清液加到亲和层析柱(Poly-His 亲和层析柱), 检测不同流份中内切葡聚糖酶酶活。结果表明: 在洗脱缓冲液中

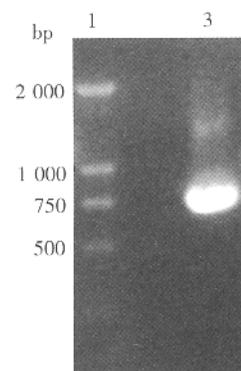


图 1 内切葡聚糖酶 Cel12B 的 PCR 产物电泳图
1: Mark DL2000; 2: Cel12B 基因

得到较高的酶活,证明组氨酸融合表达载体构建成功.取活力高的流份并管,经透析样品用 SDS-PAGE 电泳检测,酶纯度达到电泳均一,结果见图 3.

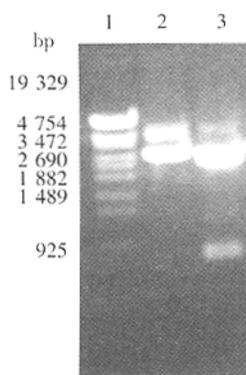


图 2 重组质粒酶切鉴定

1:Mark; 2:pET-20b-Cel12B Nde I 单酶切;3:pET-20b-Cel12B Nde I 和 XhoI 双酶切

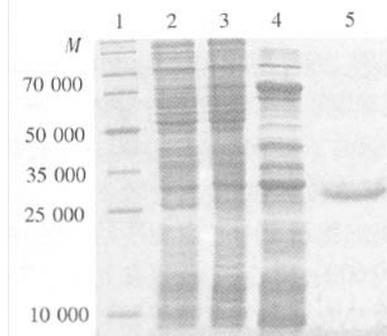


图 3 极耐热内切葡聚糖酶(10%)纯化过程的 SDS-PAGE 图谱

1: 蛋白质分子量标准;2: 重组质粒未诱导细胞粗液;3: 重组质粒诱导后细胞粗液;4: 热处理后细胞粗液;5: 过亲和柱后细胞裂解液

2.5 纯化重组酶的性质

2.5.1 重组内切葡聚糖酶的最适反应 pH

在不同的 pH 值条件下分别测定酶活,以酶活最高为 100%,计算相对活性,结果如图 4,重组内切葡聚糖酶的最适反应 pH 是 6.0 左右.

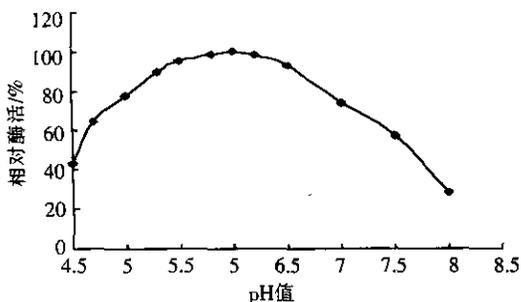


图 4 pH 对酶活的影响

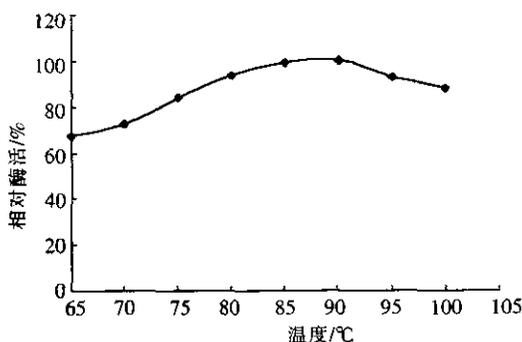


图 5 温度对酶活的影响

2.5.2 重组内切葡聚糖酶的最适反应温度

在 65~100°C 范围内,每隔 5°C,分别测定酶活.以酶活最高为 100%,计算相对酶活,重组内切葡聚糖酶的最适反应温度为 90°C.95°C 以后酶活有所降低.

2.5.3 重组内切葡聚糖酶的 pH 稳定性

酶在不同的 pH 条件下 85°C 保温 2 h,再分别测定残留酶活性与 4°C 保温的酶活相比,计算百分率.重组内切葡聚糖酶在 pH5.3~6.5 都比较稳定.pH 6.0 时残余酶活最高,pH 6.5 以后 pH 值升高残余酶活迅速降低.

2.5.4 重组内切葡聚糖酶的温度稳定性

在相对稳定的 pH 6.0 下,使酶在某个温度下保温不同的时间,再测定相对酶活,以未保温(4°C 保存)的酶样活性为 100%,由此确定酶的稳定性,测得结果表明,重组内切葡聚糖酶的温度稳定性不太好,在 90°C 下保温 2 h 后,残存酶活和没保温酶的酶活相比还有 28%,在 100°C 下保温 2 h 后几乎为 0.

3 讨论

海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧真细菌,生长在 55~90°C 海底火山口,是极耐热酶重要来源.但该菌产生包括纤维素酶、淀粉酶和木聚糖酶,这些酶的酶学性质比较相近,分离纯化某一酶类非常困难.同时海栖热袍菌生长条件苛刻,细胞密度低,不适合工业化生产.利用基因克隆技术,将极耐热内切葡聚糖酶基因克隆至表达载体,通过提高表达水平可以得到自然界难以得到的有可观潜在

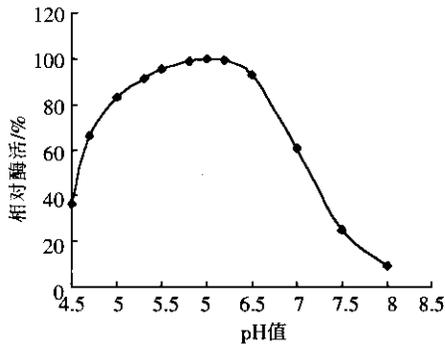


图6 pH对酶的稳定性的影响

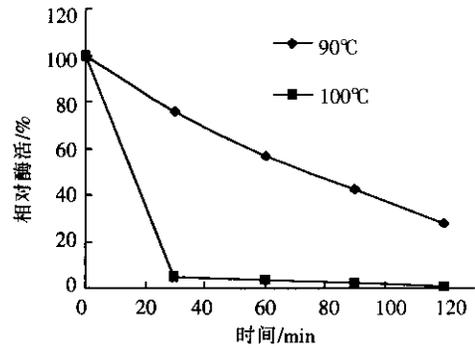


图7 温度对酶的稳定性的影响

用途的热稳定性内切葡聚糖酶^[3,9,10]。

由于基因表达产物带有一个6个组氨酸的标签,可通过金属离子亲和层析法进行纯化。同时表达蛋白对热稳定性高,将重组菌细胞破碎后的上清经70℃,20 min的热处理,去除了大量菌体蛋白,再通过一步组氨酸亲和层析柱可达到电泳一条带的纯度,为酶学性质鉴定和分析工作提供了便利,也为重组酶的大规模工业化提取奠定基础。

热稳定性是酶的众多性质中重要因素之一,因为如果不需要终止酶催化反应,酶的半衰期长就意味着效率高。同时热稳定性酶与常温酶相比有以下优点:①高温下的热稳定性,可以降低污染的危害。②室温下较长的贮藏期,对商品酶制剂尤为重要。③有较高的抗化学变性。④高温下的高活性,因为耐高温酶随温度上升其活性增加的程度比常温酶更明显,同时温度增加使反应体系粘度降低,促使传质效率高。⑤易于大规模生产和纯化。因为基因工程技术构建高效表达高温酶的常温重组菌,可以不需要高温设备,表达产物可以通过热处理去除大量杂蛋白,简化纯化操作。

纤维质原料生物转化是当今科技界热点,内切葡聚糖酶是纤维素降解酶系中重要一员,来自于常温微生物中常温纤维素酶研究较多,来源于嗜极端高温菌热稳定性高的纤维素降解酶几乎都缺乏对天然纤维素分解能力,通过蛋白质工程改造这些酶使之具有降解结晶纤维能力是一个值得研究的方向^[11,12]。

[参考文献]

- [1] 谭仁祥,孟军才,陈道峰,等. 植物成分分析[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [2] Martin S. Protein engineering of cellulases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1543: 239-252.
- [3] 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: 324-333.
- [4] Chhabra S R, Kelly R M. Biochemical characterization of Thermotoga maritime endoglucanase Cel74 with and without acarbohydrylate binding module(CBM)[J]. FEBS Letters, 2002, 531: 375-380.
- [5] Bronnenmeier K, Kern A, Liebl W, et al. Purification of Thermotoga maritima enzymes for the degradation of celulosic material[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1399-1407.
- [6] Liebl W, Ruile P, Bronnenmeier K, et al. Analysis of a Thermotoga maritima DNA fragment encoding two similar thermostable maritime DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, CelA and CelB, and characterization of the recombinant enzymes[J]. Microbiology, 1996, 142: 2532-2542.
- [7] 薛业敏. 耐热性木聚糖降解酶系的基因克隆、表达和酶学性质研究[D]. 无锡:江南大学,2004.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [9] Christoph W, Wolfgang L. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritime MSB[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1810-1815.
- [10] Nelson K E, Clayton R A, Gill S R, et al. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima[J]. Nature, 1999, 399: 323-329.
- [11] Martin S. Protein engineering of cellulases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1543: 239-252.
- [12] Linder M, Teeri T T. The roles and function of cellulose-binding domains[J]. J Biotechnology, 1997, 57(1/2/3): 15-28.

[责任编辑:孙德泉]