

瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II 在大肠杆菌中的 重组表达及重组酶性质测定

维 军, 宫晓燕, 魏 炜, 杨 纯, 方何建, 戴亦军, 袁 生

(江苏省生物多样性和生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 将不含信号肽的瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II(Ce5A)的 cDNA 克隆到 pET-28a(+)表达质粒上, 与其 N 末端 6 个组氨酸标签序列融合, 构建成 pET-28a(+)-eg12 表达质粒, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达. 利用低温诱导策略, 成功表达出活性重组蛋白. Western blot 结果显示重组 Ce5A 相对分子质量大约为 43 000. 进一步对重组 Ce5A 进行 Ni-NTA 亲和层析柱纯化并对其进行酶学性质测定, 结果显示以羧甲基纤维素钠为作用底物时重组酶最适用 pH 为 4.5, 最适用温度为 60℃; 重组酶热稳定性较好, 在 65℃ 及以下保温 1.5 h 活性仍相当稳定. Mn^{2+} 对 Ce5A 的酶活有促进作用, Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 有抑制作用, 其它金属离子和 EDTA 对酶活没有明显影响. 底物特异性研究表明, 重组 Ce5A 只能水解混合键葡聚糖和羧甲基纤维素钠, 对混合键葡聚糖的水解能力是其对羧甲基纤维素钠水解能力的 6.7 倍, 但对微晶纤维素、Glass microfibril filters、木聚糖、阿拉伯木聚糖和木葡聚糖没有水解作用.

[关键词] 羧甲基纤维素钠盐, 内切葡聚糖酶, 大肠杆菌, β -葡聚糖, 瑞氏木霉

[中图分类号] Q 939.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)03-0092-07

Expression of Recombinant *Trichoderma Reesei* Endoglucanase II in *Escherichia coli* and Properties of the Recombinant Enzyme

Luo Jun, Gong Xiaoyan, Wei Wei, Yang Chun, Fang Hejian, Dai Yijun, Yuan Sheng

(Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources
School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract Ce5A of *Trichoderma reesei* was fused with histidine(6) tag and cloned in pET-28a(+) plasmid. With a low temperature induction strategy, the enzyme was successfully expressed in *E. coli* host. Western blot analysis showed that the recombinant Cel5A had a molecular weight of 43 000. The recombinant Ce5A had maximal activities at pH 4.5, 60℃ and was stable when it was heated for 1.5 h at 65℃. The enzymatic activity was enhanced by 1 mmol/L Mn^{2+} and inhibited by Fe^{3+} and Cu^{2+} while other metal ions and EDTA had no effect. The recombinant Ce5A was able to hydrolyze β -glucan and CM-C-Na but unable to hydrolyze Avicel, Glass microfibril filters, Xylan, Arabinoxylan and Xyloglucan. The activity of Cel5A to digest β -glucan is 6.7 fold higher than to digest CM-C-Na.

Key words CM-C-Na, endoglucanase, *Escherichia coli*, β -glucan, *Trichoderma reesei*

纤维素是地球上数量最多的可再生自然资源, 从廉价的可再生的木质纤维素生产生物能源及产品对维持人类社会的持续性发展至关重要^[1] (Zhang et al. 2006). 工业生产中将纤维素转化成葡萄糖, 进一步发酵成为酒精是纤维素最有潜力的利用途径之一. 长久以来, 人们一直在想方设法利用各种来源的纤维素酶水解植物细胞壁的多糖组分, 将其转化为可利用的单糖组分, 并最终将其变成可再生生物能源如乙醇或其它有用物质等.

许多类型的真菌和细菌能够产生水解纤维素的酶类, 其中丝状真菌 *Trichoderma reesei* 是最被广泛研究的纤维素降解生物. *T. reesei* 产生一系列不同的纤维素酶, 其中大多数已被深入研究. 这些酶主要分为三

收稿日期: 2009-03-06

基金项目: 国家自然科学基金 (211100B386).

通讯联系人: 袁 生, 教授, 博士生导师, 研究方向: 微生物生长代谢调控. E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

大类: (1) 内切-1, 4-β-D 葡聚糖酶, (2) 外切-1, 4-β-D-葡聚糖酶又称 1, 4-β-D-纤维二糖水解酶 (3) 1, 4-β-D-葡萄糖苷酶。

内切葡聚糖酶可随机地作用于糖链内部水解可溶性的具有取代基的纤维素, 但是很难水解高度有序的微晶纤维素; 外切葡聚糖酶不能有效作用于取代基纤维素但是能够降解微晶纤维素; β 葡萄糖苷酶能够水解另两种酶水解产生的纤维二糖以及其它短链寡聚糖为葡萄糖^[2] (Pentti^h et al 1987). 目前已经分离的 *T. reesei* 纤维素酶至少包括 2 种外切葡聚糖酶, Cel7A (CBH I)^[3] (Shoemaker et al 1983) 和 Cel6A (CBH II)^[4] (Teeri et al 1983), 5 种内切葡聚糖酶, 即 Cel7B (EG I)^[5] (Pentti^h et al 1986)、Cel5A (EG II)^[6] (Saloheimo et al 1988)、Cel12A (EG III)^[7] (Okada et al 1998)、Cel61A (EG IV)^[8] (Saloheimo et al 1997) 和 Cel45A (EG V)^[9] (Saloheimo et al 1994) 以及一种 β 葡萄糖苷酶^[10] (Barnett et al 1991). 其中内切葡聚糖酶 Cel5A, 又称 EG II 最初被命名为 EG III^[6] (Saloheimo et al 1988), 占表达的纤维素酶总量的 5% ~ 10%, 是最重要的内切酶之一^[11] (Wang et al 2005), 它具有很高的催化活性, 被广泛用于纺织、印刷、染料、造纸和洗涤等工业^[12] (Qin et al 2008).

为了研究纤维素酶之间的协同作用, 需要获得各种纯的纤维素酶制剂. 从真菌培养液中分离纯化天然纤维素酶需要花费大量时间和劳力, 且常常存在其它微量多糖水解酶的干扰影响. 最好的办法是利用基因工程菌异源表达重组纤维素酶. 已知很多纤维素酶在真核细胞表达系统如酵母细胞或丝状真菌细胞中成功表达, 但丝状真菌细胞存在内源纤维素酶干扰问题, 酵母细胞也被发现存在内源果胶酶 (结果未发表), 而我们实验室证明果胶酶与 expansin 具有协同作用^[13] (Zhao et al 2008), 因而需要探讨纤维素酶在原核细胞中异源重组表达. 本文报道来自瑞氏木霉内切葡聚糖酶 Cel5A 首次在大肠杆菌中异源重组表达及其重组酶学性质的研究.

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

Trichoderma reesei QM 9414 (ATCC) 用于克隆 *egl2* (Cel5A 的编码基因), 菌株在含 1% (w/v) CM C-Na (sigma) 的 Vogel's 培养基中 27℃ 静置生长 5 d^[14] (Sandhu et al 1982). 大肠杆菌 DH5α (Novagen) 作为基因克隆的宿主菌, 大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3) RIL (Stratagene) 用作基因表达的宿主菌, pMD18-T (Takara) 作为克隆载体, pET-28a(+) (Novagen) 用作表达载体.

1.2 Cel5A 基因的克隆与表达

参照 Logemann et al^[15] (1987) 的方法从 *T. reesei* 菌丝体中提取总 RNA, 然后用 oligo (dT) 12-18 primer 通过逆转录得到其 cDNA. PCR 引物设计根据瑞氏木霉纤维素内切葡聚糖酶 II 基因序列 (NCBI accession number D178347), 正义引物 (5'-CATATGCAGCAGACTGTCTGGGGC-3') 包含 *Nde* I 限制性酶切位点, 反义引物 (5'-GGATCCCTACTTTCTTGCGAGACACG-3') 包含 *Bam*H I 限制性酶切位点, 使用 PfuItraTM DNA 聚合酶 (Stratagene) 和上述特异引物通过扩增得到不含信号肽的 Cel5A cDNA; 然后将 Cel5A cDNA 序列连接到 pMD18-T Vector 构建的 pMD18-T-*egl2* 质粒转化 DH5α 得到 pMD18-T-*egl2*-DH5α 阳性转化子; 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 将不含信号肽的 Cel5A cDNA 片段从 pMD18-T-*egl2* 上切下, 连接到 pET-28a(+) 表达载体上, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 细胞, 得到 pET-28a(+) - *egl2*-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 阳性转化子.

pET-28a(+) - *egl2*-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 转化子在 LB 中培养, 100 mL LB 中分别加入葡萄糖、卡那霉素和氯霉素分别至终浓度为 1% (w/v)、50 μg/mL 和 34 μg/mL 在 37℃, 220 r/min 条件下培养, 当 A_{600} 达到 0.8 左右时, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 6 h. 低温诱导时表达条件为 15℃、160 r/min 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达 50 h.

1.3 蛋白抽提和纯化

诱导表达结束后, 在 8 000 r/min 4℃ 条件下离心 5 min 收集菌体, 用 10 mL 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.0 溶液洗涤菌体, 重复洗涤 1 次, 将菌体在 -80℃ 条件下冻存 6 h 以上; 然后用 10 mL 含 100 μg/mL lysozyme 和 1 mmol/L PMSF 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 溶液重新悬浮细胞, 在 0℃ 条件下, 超声破碎细胞, 12 000 r/min、4℃ 离心 20 min 上清抽提液即为粗蛋白. 抽提液进一步用 Ni^{2+} -NTA 柱 (Novagen) 按

照纯化系统操作程序进行亲和层析纯化,洗脱的蛋白液转至透析袋 ($25 \times 16 \text{ mm}^2$, SigmaA Hrich) 在 $20 \text{ mmol/L NaAC-HAC}$, $\text{pH} 4.5$ 缓冲液中透析 3 h $12\ 000 \text{ r/min}$ 、 4°C 离心 5 min, 上清蛋白为纯化的重组蛋白, 用于后续实验.

1.4 SDS-PAGE and Western blot 分析

SDS-PAGE 浓缩胶浓度为 3.5%, 分离胶浓度为 11.0%, 用考马斯亮蓝 R-250 染色. Western blot 根据 Sambrook et al.^[16] (1989) 方法进行, 略作修改. 蛋白样品与上样缓冲液混合, 煮沸 5 min, 上样后进行凝胶电泳; 电泳结束后凝胶上分离的蛋白转至 PVDF 膜 (Biorad), 转移缓冲液为 25 mmol/L Tris 192 mmol/L 甘氨酸, 20% (v/v) 甲醇, $\text{pH} 8.3$. PVDF 膜在含 5% 脱脂奶粉的 PBS-T (PBS 加 0.1% Tween20 $\text{pH} 7.2$) 中封闭 3 h, 洗涤后用含 0.3% BSA 的 TBS-T 以 1:5000 稀释的 His 标签单克隆抗体 (一抗) 室温下孵育 4 h, 洗涤后用含 0.3% BSA 的 TBS-T 以 1:5000 稀释的兔抗鼠 IgG (二抗) 室温孵育 1 h; 最后 PVDF 膜用 TMB Stabilized Substrate for HRP (Promega) 显色. 预染蛋白 marker SM 0411 (Fementas) 用于 SDS-PAGE 和 Western blot.

1.5 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定参照 Bradford 的方法采用考马斯亮蓝 G-250 法进行粗蛋白和纯化蛋白含量测定^[17] (Bradford 1976), 以牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白.

1.6 重组 Cel5A 酶活性检测

重组 Cel5A 对各种底物的水解活性测定采用二硝基水杨酸试剂 (DNS) 法测定水解过程中释放的还原糖量进行^[14] (Sandhu et al. 1982).

测定内切-1,4- β -D-葡聚糖酶活性的反应体系和条件为: 0.4 mL 反应体系, 内含 $50 \text{ mmol/L NaAC-HAC buffer}$ ($\text{pH} 4.5$)、 5 mg/mL 羧甲基纤维素钠和适量重组表达的 Cel5A; 60°C 反应 20 min. 当测定重组 Cel5A 底物特异性时, 5 mg/mL 羧甲基纤维素钠被用下列多糖底物所替换, 混合键葡聚糖 (from barley, Megazyme), 木聚糖 (from oat speltz, Sigma), 阿拉伯木聚糖 (from wheat, FMC), 木葡聚糖 (from famarind seed, FMC), 微晶纤维素 PH 101 (FMC) 和 Glass microfibre filters (Whatman); 除了使用不溶性底物微晶纤维素和 Whatman filters 时反应条件为 60°C 反应 12 h 之外, 其它底物的反应条件为 60°C 反应 20 min. 为了检测反应体系中产生的还原糖的量, 加 0.4 mL DNS 试剂终止反应, 100°C 加热 10 min 显色, 然后检测在 520 nm 处的吸收值, 再根据标准曲线回归方程, 换算得到还原糖浓度. 一个酶活单位定义为检测条件下每 min 反应释放 $1 \mu\text{mol}$ 还原糖的酶量.

当测定 pH 对重组 Cel5A 活性影响时: 配制从 $\text{pH} 3.0 \sim \text{pH} 6.5$ 的 NaAC-HAC buffer 和 $\text{pH} 7.0 \sim \text{pH} 8.5$ 的 Tris-HCl buffer 分别替代反应液中的 $50 \text{ mmol/L NaAC-HAC buffer}$ ($\text{pH} 4.5$).

当测定温度对重组 Cel5A 活性影响时: 反应温度由 25°C 到 80°C 范围所指定的温度代替上述反应体系的 60°C .

当测定温度稳定性时: 重组酶加入 $50 \text{ mmol/L pH} 4.5 \text{ NaAC-HAC}$ 中分别置 55°C 、 60°C 、 65°C 、 70°C 和 75°C 水浴锅中处理从 10 min 到 3 h 不同时间, 再加入底物 CMC-Na 按上述反应体系 60°C 反应 20 min 测定重组酶残留活性.

当测定金属离子对重组酶活性影响时: 反应液中分别加入终浓度 1 mmol/L 的下列金属离子, Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^+ 和金属离子螯和剂 EDTA, 按上述反应体系测定重组酶活性.

2 结果

2.1 重组 Cel5A 在大肠杆菌中的表达

我们利用 *E. coli* 作为宿主菌表达 *T. reesei* Cel5A 不含信号肽的 cDNA. 在 0.5 mmol/L IPTG 的诱导下, 重组菌 pET-28a(+)-*egl2*-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 在 37°C 220 r/min 培养 6 h, 所表达出的重组蛋白几乎全部以不溶的包涵体形式存在, 检测不到纤维素酶活性, Western blot 在细胞抽提液中未检测到重组 Cel5A. 为了使重组蛋白以可溶性的活性形式表达, 对细胞的表达条件进行了优化研究. 最佳优化条件是以 0.2 mmol/L IPTG 诱导, 15°C 、 160 r/min 表达 50 h, 全细胞细胞裂解液的上清抽提液可检测到纤维

素酶活性. 细胞裂解液 SDS- PAGE 全蛋白分析表明, 与空载质粒对照相比 (well 2), 在相对分子质量约 43 000处存在一个较强的表达蛋白条带 (well 1), 上清抽提液表达蛋白因受杂蛋白的干扰难以确认, 但活性分析和 Western blot检测表明抽提液中确实存在可溶性的重组表达的 Cel5A (见图 1).

2.2 重组 Cel5A 的纯化

事先在重组 Cel5A 的 N端融合有 6个组氨酸标签, 可利用 Ni^{2+} - NTA 亲和层析法纯化分离重组 Cel5A. SDS-PAGE 检测 Ni^{2+} - NTA 亲和层析纯化蛋白显示, 细胞抽提液中大部分杂蛋白已被去除, 虽然仍存在少量其它杂蛋白, 但相对分子质量为 43 000的蛋白条带清晰可见, 而含空载质粒的表达菌的蛋白抽提液进行亲和层析后则没有相应的条带, 说明该蛋白为可溶性的重组表达的 Cel5A, Western blot检测也表明该蛋白条带确实为重组表达的 Cel5A(见图 1). 详细的纯化数据见表 1.

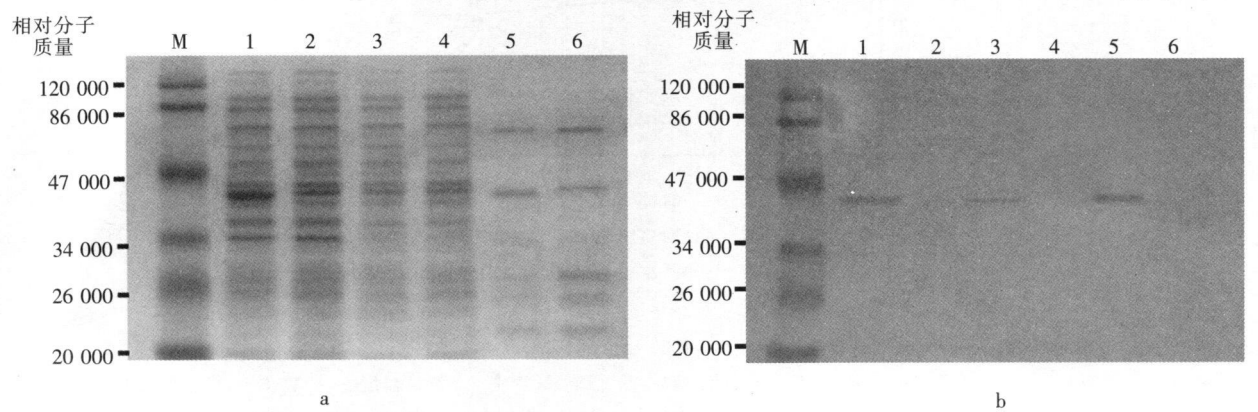


图 1 Cel5A 的表达与纯化的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.1 Cel5A expression and purification

(a)Cel5A 表达的 SDS-PAGE 分析.M, 蛋白分子量标准;1, pET-28a(+)-egl2-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 的全细胞裂解液;2,pET-28a(+)-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 的全细胞裂解液;3,pET-28a(+)-egl2-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 的抽提液;4,pET-28a(+)-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 的抽提液;5,亲和纯化后的 pET-28a(+)-egl2-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 抽提液;亲和纯化后的 pET-28a(+)-BL21-CodonPlus (DE3) RIL 抽提液.(b)图(a)对应的 Western blot 图.

表 1 重组 Cel5A 的纯化

Table 1 Purification of recombinant Cel5A

组分	总蛋白 /mg	总酶活 /U	特异酶活 /(U /mg)	纯化效果 (- 倍数)	得率 %
细胞裂解液	51	17.3	0.34	1	100
Ni^{2+} - NTA 纯化上清	0.135	4.3	32.2	94.7	24.9

2.3 pH、温度对重组 Cel5A 活性和稳定性的影响

测定了不同 pH 和不同温度对重组 Cel5A CMCase 活性和稳定性的影响, 结果显示以 CMC - Na 为作用底物时重组酶最适作用 pH 为 4.5 重组酶最适作用温度为 60℃; 重组酶热稳定性较好, 在 65℃及以下保温 1.5 h 活性仍相当稳定, 65℃孵育 3 h 后酶活仍维持在 70% 左右, 而当温度到 75℃时重组酶会很快地失去活性 (见图 2).

2.4 金属离子和 EDTA 对重组酶活性的影响

终浓度 1 mmol/L 的金属离子对重组 Cel5A 的 CMCase 活性影响结果如下: 如果指定没有添加任何金属离子的酶活为 100%, 添加 Mn^{2+} 后酶活提高至 139%; 添加 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 分别抑制酶活到 27%、56% 和 83%; 添加其它金属离子和金属螯合剂 EDTA, 对重组酶的活性基本没有影响, 说明该酶为非金属酶 (见表 2).

表 2 金属离子对重组 Cel5A CMCase 活性的影响

Table 2 Effects of metal ions on Cel5A CMCase activity

金属离子	浓度 /(mmol/L)	相对活性 %
None	1	100*
BaCl_2	1	97
CaCl_2	1	95
FeCl_3	1	27
FeSO_4	1	83
KCl	1	97
MnCl_2	1	139
MgSO_2	1	93
NaCl	1	98
CuCl_2	1	56
AgNO_3	1	92
ZnCl_2	1	95
EDTA	1	98

*: 未添加金属离子和 EDTA 的活性为 100% (activity= 33.2 U /mg).

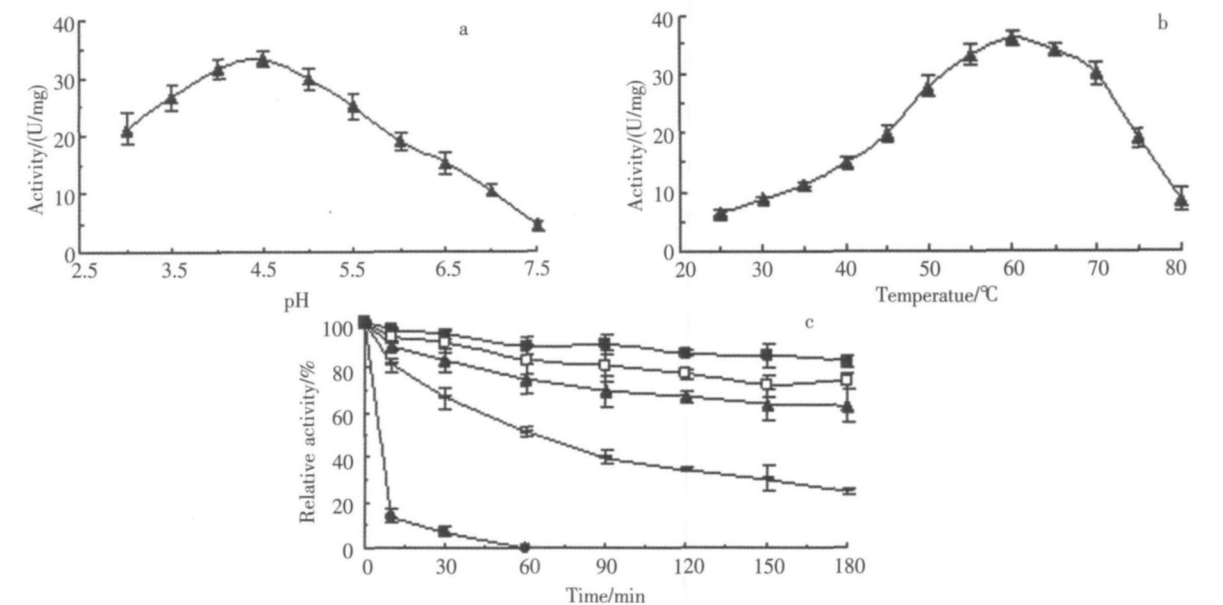


图 2 pH、温度对重组 Cel5A 活性的影响

Fig.2 Effects of pH and temperature on Cel5A activity

(a)重组 Cel5A 的最适作用 pH.反应混合物内含 50 mmol/L 图中所示不同 pH 的缓冲液,5 mg/mL CMC-Na,于 60°C.反应 20 min.(b)重组 Cel5A 的最适作用温度.反应混合物内含 50 mmol/L pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液,5 mg/mL CMC-Na,于图中所示不同温度反应 20 min.(c)重组 Cel5A 的温度耐受性.重组 Cel5A 在 pH4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液中于不同的温度[55°C(■);60°C(□);65°C(▲);70°C(○);75°C(●)]处理从 10min 到 3 h,然后加入终浓度 5 mg/mL CMC-Na,于 60°C.反应 20 min;在冰浴中处理的酶的活性指定为 100%.

2.5 重组酶的底物特异性测定

底物特异性研究表明,重组 Cel5A 只能水解混合键葡聚糖和 CMC-Na 对混合键葡聚糖的水解能力是其对 CMC-Na 水解能力的 6.7 倍.对其它半纤维素底物木聚糖、阿拉伯木聚糖和木葡聚糖没有降解作用,值得注意的是对微晶纤维素 Avicel 和 Glass microfibrer filters 也没有检测到水解活性 (见表 3).

3 讨论

很多异源性的蛋白尤其是来自真核生物的蛋白在大肠杆菌中往往不能折叠成天然活性形式而是一般聚集成不溶性的形式即所谓的包涵体.这种情况下这些蛋白在大肠杆菌中表达就遇到了很大的困难^[18] (Hanning et al 1998). 有许多策略被研究者用来改善或提高蛋白的正确折叠效率包括共表达同源或异源的折叠辅助蛋白、菌培养条件的优化及表达融合蛋白等. 其中对培养条件进行优化是一种简单有效促进蛋白正确折叠的方法. 对培养条件的优化包括对培养基成分的改造、诱导剂浓度的优化和培养温度、培养 pH 的优化等方面. 低温诱导是一种常见有效的提高蛋白折叠的策略,其原理可能涉及很多因素,如蛋白自联作用力的减弱、蛋白合成速度的降低以及多肽链折叠动力学的改变等^[18] (Hanning et al 1998). 在我们的研究中发现 Cel5A 在 37°C 诱导表达时,重组蛋白几乎全部是以不溶性的包涵体的形式存在,当在 15°C 诱导表达时表达出了可溶性的活性重组蛋白. 我们还用低温诱导的方法表达了另外一个 *T. reesei* 纤维素酶-外切葡聚糖酶 II (Cel6A),但是没有检测到有活性蛋白的表达. 由此可见蛋白多肽链的正确折叠是异源表达这些真菌来源纤维素酶的关键因素,应该联合运用多种改善蛋白折叠的方法来有效表达这类蛋白.

纯化的天然内切葡聚糖酶往往混有少量的外切葡聚糖酶. 从 *T. reesei* 中纯化单一的纤维素酶是很困难的事,这些酶的特性仍需要去进一步阐释^[19] (Okada et al 1998). 因此有必要将这些酶进行异源表达,得到没有其它酶污染的重组酶,以供进一步研究这些酶的特性及其之间的联系. 我们将 *T. reesei* Cel5A 在通常没有纤维素酶干扰的大肠杆菌中表达,对重组酶进行了底物特异性测定. 结果显示在对所用的多种多

表 3 重组 Cel5A 的底物特异性	
Table 3 Specificity of recombinant Cel5A	
底物	水解活性 / (U / mg)
羧甲基纤维素钠	35.2
微晶纤维素	-
Glass microfibrer filters	-
混合键葡聚糖	235.8
木聚糖	-
木葡聚糖	-
阿拉伯木聚糖	-

-: 未检测到

糖底物中 Cel5A 只水解混合键葡聚糖和 CMC-Na 微晶纤维素 (Avicel) 通常被认为是很好的度量外切葡聚糖酶活性的底物, 但关于内切葡聚糖酶的 Avicelase 活性仍然不是很明确。虽然在有些研究中重组 Cel5A 显示了微弱的 Avicelase 活性^[20] (Takashima et al 1998)^[12] (Qin et al 2008), 然而在我们的测定条件下没有检测到重组 Cel5A 的 Avicelase 活性, 这说明很可能 Cel5A 本身的外切酶活性与蛋白的糖基化有关, 或者 Cel5A 本身就不具有外切酶活性, 以往报道的 Cel5A 的 Avicelase 活性可能与酶制剂中含有微量外切葡聚糖酶有关。因而对于需要排除其它纤维素酶干扰的研究, 选用合适的重组表达系统是非常必要的。

根据 Macarrón et al^[21] (1993) 研究报道, 从 *T. reesei* 中分离纯化的天然 Cel5A 相对分子质量约 48 000 但 Qin et al^[12] (2008) 报道, Cel5A 在 *Saccharomyces cerevisiae* 表达时, 其表达产物 Cel5A 被高度糖基化, 据糖基化程度不同分为 Compound 1 (57 000) 和 Compound 2 (80 000~200 000) 2 个组分; 在 *Aspergillus oryzae* 中表达的 Cel5A 也存在糖基化现象, 其表达产物 Cel5A 相对分子质量变为 55 000^[20] (Takashima et al 1998)。但本研究表达的重组 Cel5A 相对分子质量仅 43 000 大小非常接近于理论计算值, 由于在大肠杆菌中重组表达的蛋白质通常不发生糖基化, 基于在大肠杆菌中重组表达的 Cel5A 酶有较高的活性, 我们可以认为糖基化作用并不是 Cel5A 活性所必需的。

[参考文献]

- [1] Zhang YH, Hinne E, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies[J]. *Biotechnol Adv*. 2006; 24: 452-481.
- [2] Penttilä M E, André L, Saloheimo M, et al. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*. 1987; 3: 175-185.
- [3] Shoemaker S, Schweickart V, Ladner M, et al. Molecular cloning of exo-cellulohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27[J]. *Bio/Technology*. 1983; 691-696.
- [4] Teeri TT, Sabvouri I, Knowles J. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*[J]. *Bio/Technology*. 1983; 696-699.
- [5] Penttilä M, Lehtovaara P, Nevalainen H, et al. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene[J]. *Gene*. 1986; 45: 253-263.
- [6] Saloheimo M, Lehtovaara P, Penttilä M, et al. EG III: a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme[J]. *Gene*. 1988; 63(1): 11-22.
- [7] Okada H, Tada K, Sekiya T, et al. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM 9414[J]. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 555-563.
- [8] Saloheimo M, Nakari-Setälä T, Tenkanen M, et al. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast[J]. *Eur J Biochem*. 1997; 249: 584-591.
- [9] Saloheimo A, Henriksaas B, Hoffrén A M, et al. A novel small endoglucanase gene, eg5, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast[J]. *Mol Microbiol*. 1994; 13: 219-228.
- [10] Bamat C C, Benkar M, Fowler T. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates[J]. *Biotechnology (NY)*. 1991; 9: 562-567.
- [11] Wang T, Liu X M, Yu Q, et al. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*[J]. *Biomol Eng*. 2005; 22: 89-94.
- [12] Qin Y Q, Wei X M, Liu X M, et al. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability[J]. *Protein Express Purif*. 2008; 58: 162-167.
- [13] Zhao Q X, Yuan S, Wang X, et al. Restoration of mature etiolated cucumber hypocotyl cell wall susceptibility to expansion by pretreatment with fungal pectinases and EGTA in vitro[J]. *Plant Physiology*. 2008; 147: 1874-1885.
- [14] Sandhu D K, Kalra M K. Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates[J]. *Trans Br Mycol Soc*. 1982; 409-413.
- [15] Logemann J, Schell J, Wilmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues[J]. *Anal Biochem*. 1987; 163(1): 16-20.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 880-897.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254
- [18] Hanning G, Makrides S C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(2): 54-60
- [19] Okada H, Sekiya T, Yokoyama K, et al. Efficient secretion of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of its products[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 301-308
- [20] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* cellulases by *Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties[J]. J Biotechnol, 1998, 65: 163-171
- [21] Macarón R, Acebal C, Castillón M P, et al. Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*[J]. Biochem J, 1993, 289: 867-873

[责任编辑: 孙德泉]

(上接第 91 页)

[参考文献]

- [1] Grignani F, Fagioli M, Alcalá M, et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment[J]. Blood, 1994, 83(1): 10-25
- [2] Sakonji R, Ferguson B J, Wyllie A H, et al. New insights into the role of PML in tumour suppression[J]. Cell Res, 2008, 18(6): 622-640
- [3] Zimmer A, Nguyen Q D, Gespach C. Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease[J]. Cell Signal, 2004, 16(10): 1085-1104
- [4] Jensen K, Shields C, Freement P S, et al. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif[J]. Oncogene, 2001, 20(49): 7223-7233
- [5] Bernardi R, Papa A, Pandolfi P P. Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs[J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6299-6312
- [6] Fagioli M, Alcalá M, Pandolfi P P, et al. Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms[J]. Oncogene, 1992, 7(6): 1083-1091
- [7] Liu J H, Liu C C, Yen C C, et al. Pml and TAp73 interacting at nuclear body mediate inatinib-induced p53-independent apoptosis of chronic myeloid leukemia cells[J]. Int J Cancer, 2009, 125(1): 71-77
- [8] Xia M, Zhang J Q, Shen Y Q, et al. Concordant expression of proto-oncogene promyelocytic leukemia and major histocompatibility antigen HLA class I in human hepatocellular carcinoma[J]. Tissue Antigens, 2007, 70(4): 272-282
- [9] Wu W S, Vallian S, Seto E, et al. The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(7): 2259-2268
- [10] Matsushita H, Scaglioni P P, Bhaumik M, et al. In vivo analysis of the role of aberrant histone deacetylase recruitment and RAR alpha blockade in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia[J]. J Exp Med, 2006, 203(4): 821-828

[责任编辑: 孙德泉]