

链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达

张红莲¹ 姚 斌^{1*} 王亚茹¹ 袁铁峥¹ 张王照¹ 伍宁丰² 范云六²

¹(中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

²(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘 要 从橄榄绿链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 中克隆出木聚糖酶基因 *xynA*, 将带与不带原基因信号肽编码序列的 *xynA* 分别以正确的阅读框架克隆到大肠杆菌表达载体 pET-22k(+) 上的 *pelB* 信号肽编码序列之后, 得到 2 种构建的重组载体, 在重组大肠杆菌中木聚糖酶得到了表达, 表达产物具有生物活性。进一步将不带原基因信号肽编码序列的 *xynA* 插入到毕赤酵母转移载体 pPIC9 中, 转化毕赤酵母得到重组子, 在重组子中木聚糖酶基因得到了高效分泌表达, 在摇床培养水平上的表达量达到 200mg/L, 且表达产物具有生物学活性。

关键词 木聚糖酶 XYN A, 高效表达, 毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2003)01-0041-05

木聚糖(Xylan)是一种多聚五碳糖,是植物半纤维素的重要组分,它占植物碳水化合物总量的 1/3,在自然界中是继纤维素之后含量第二丰富的再生生物资源^[1]。

β -1, 4-木聚糖酶(β -1, 4-D-xylanohydrolase, EC3.1.2.8)可将木聚糖降解,其主要产物为低聚糖和木二糖。木聚糖酶可广泛应用于制浆造纸、饲料、食品和能源工业中^[2]。

木聚糖酶广泛存在于微生物中,目前已从不同来源的微生物中分离到了上百种木聚糖酶,并克隆了其编码基因^[3],也大量尝试了在大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌、拟杆菌等细菌,曲霉、酿酒酵母等真菌以及在植物中表达木聚糖酶基因^[3]。在分子生物学方面,目前已有上 10 种木聚糖酶进行了晶体 X-ray 的高级结构研究^[3-5],并通过氨基酸修饰、突变等手段研究其结构与功能的关系,加深了对木聚糖酶作用机制的了解^[3]。

橄榄绿链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 能产生 2 种胞外木聚糖酶:XYNA 和 XYNB,我们在前期工作中纯化了 XYNA 并进行了详细的酶学性质研

究^[6],此酶具有较好的酶学性质,有望在生产实践中实际应用,本文报道木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达,为进一步工业化廉价生产木聚糖酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

Streptomyces olivaceoviridis A1 菌株为中国农业科学院饲料研究所生物技术研究室分离、保存;大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109、BL21(DE3) 质粒载体 pUC19 等为中国农业科学院饲料研究所生物技术研究室保存;大肠杆菌表达质粒 pET-22k(+) 为 Novagen 公司产品;毕赤酵母菌株 GS115、表达载体 pPIC9 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 工具酶和生化试剂

限制酶 *Eco*R I, *Kpn* I, *Nco* I, *Hind* III, *Sma*I I, *Dra* I 等购自 Gibco 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品;Taq 酶为 TaKaRa 公司的 TaKaRa LA Taq™(with GC Buffer);可溶性 4-O-Me-D-glucurono-D-xylan、IPTG

收稿日期 2002-07-24, 修回日期 2002-10-22。

基金项目 国家高技术研究与发展计划(863 计划)项目资助(No.2001AA214041)。

* 通讯作者。 Tel 86-10-68975126; Fax 86-10-68975127; E-mail yaobin@public3.bta.net.cn

购自 Sigma 公司。

1.3 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 菌株总 DNA 的提取

取 35℃ 培养 4 ~ 5d 的菌液 1000r/min 离心 10min 沉淀菌体,取 50mg 菌泥加 500 μ L 无菌水清洗,离心取沉淀。沉淀重悬于 500 μ L 溶菌酶混合液(2mg/mL 溶菌酶、50mg/mL RNase、0.3mol/L 蔗糖、25mmol/L Tris-HCl、25mmol/L EDTA, pH8.0),37℃ 温育 30min,再补加酶液 100 μ L 于 50℃ 继续保温 30min,至菌液透明后,加 10% SDS 至终浓度 2%,搅拌约 5min 至菌液粘度显著下降,15000r/min 离心 100min 去碎片。上清液用等体积酚、酚:氯仿、氯仿依次抽提,异丙醇常温沉淀,沉淀用 70% 乙醇洗涤后真空干燥,溶于 30 μ L 无菌水中备用。

1.4 木聚糖酶基因 *xynA* 的克隆及大肠杆菌重组表达载体的构建

主要根据 Maniatis 手册^[7]进行。将克隆到的带有和不带有原信号肽编码序列的木聚糖酶基因 *xynA* 插入表达质粒 pET-22b 上,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取阳性克隆子,用于表达研究。

1.5 大肠杆菌重组子表达的木聚糖酶检测

取 500 μ L 诱导后的培养液离心收集菌体,用无菌水洗 2 次后重悬于 30 μ L 无菌水中,加入等体积的 SDS 上样缓冲液,沸水浴 5min,进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

诱导后的菌体离心沉淀,用 1mL 柠檬酸缓冲液(含 1mmol/L PMSF, pH5.6)洗 2 次,沉淀再用 60 μ L 柠檬酸缓冲液悬浮,超声波破碎菌体,13000r/min 离心 5min,去除细胞碎片,用常规方法来检测上清的木聚糖酶活性。

木聚糖酶活性检测用国际通用的 Somogyi-Nelson 法,测定时酶促反应的 pH 值为 5.2,温度为 55℃。1 个木聚糖酶活性单位(IU)为在一定条件下,每分钟分解木聚糖生成 1 μ mol 木糖所需的酶量。

1.6 酵母重组表达载体的构建及重组酵母的筛选

不带原信号肽编码序列的木聚糖酶基因经 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切后插入酵母表达载体 pPIC9 的 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切位点,得到重组质粒 pPIC9-*xynA*。

酵母菌株 *Pichia pastoris* GS115 于 500mL YPD (1% 酵母提取物、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖)中 30℃ 培养至 $A_{600} = 1.3 \sim 1.5$,1500g 离心收集菌体,先后用 500mL、250mL 预冷的无菌水洗菌体,离心去上清液,用 20mL 预冷的 1mol/L 山梨醇悬浮菌体,离心后菌

体再用 0.5mL 预冷的山梨醇悬浮,取 40 μ L,加入 1 ~ 5 μ g 经 *Dra* I 线性化的重组质粒 pPIC9,冰浴 5min,用电转化仪电击,电击结束后立即加入 0.5mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇,取 200 μ L 于固体 RDB(18.6% 山梨醇 2% 葡萄糖,1.34% 无氨基酸的酵母氮源(Yeast Nitrogen Base W/O amino acids, YNB),0.00004% Biotin,0.005% 谷氨酸,0.005% 甲硫氨酸,0.005% 赖氨酸,0.005% 亮氨酸,0.005% 异亮氨酸,2% 琼脂糖)上涂板,30℃ 培养直至转化子出现。用牙签挑取转化子对应点种到 MM(1.34% YNB,0.00004% Biotin,0.5% 甲醇,1.5% 琼脂糖)和 MD(1.34% YNB,0.00004% Biotin,2% 葡萄糖,1.5% 琼脂糖)平板上,30℃ 培养 2d,在 MD 上生长正常而在 MM 上生长不正常或不生长的转化子为阳性克隆子。

1.7 重组酵母的培养、诱导表达及检测

重组酵母于 10mL BMGY[1% 酵母提取物,2% 蛋白胨,1.34% YNB,0.00004% Biotin,1% 甘油(体积比)]中,30℃ 剧烈振荡使细胞生长至饱和状态($A_{600} = 10 \sim 20$),离心收集菌体,加入 10mL 诱导培养基 BMMY(用 0.5% 甲醇代替 BMGY 中的甘油),30℃ 下继续培养,每 12h 取样,测酶活性,直至 96h,筛选出高表达菌株,同时进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 *xynA* 的克隆

根据所发表的 FXYN 编码基因全序列资料^[8],合成上游引物 Z1 5' TA GAA TTC GCC ATG GGCTCGTACGC-CCTTCCC3',下游引物 Z2 5' TA GGT ACC TCA GGT GCG GGT CCA GCG3',在上游引物 Z1 中引入 *EcoR* I 位点和 *Nco* I 位点(下划线标示),下游引物 Z2 中终止密码子之后引入 *Kpn* I 酶切位点(下划线标示)。Z1、Z2 为引物,以 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 的染色体 DNA 为模板,由于模板 GC 含量较高,并且二级结构复杂,所以用专门针对这种模板的 Taq 酶:TaKaRa LA Taq™(with GC Buffer)],扩增出约 1.4kb 的带原信号肽编码序列的完整木聚糖酶基因 *xynA*,利用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 位点克隆到 pUC19 上,序列测定结构表明它与报道的 *fxyn* 序列^[8]完全一致。进一步根据 XYNA 成熟蛋白序列设计引物 Z3 5' TA GAA TTC GCC ATG GCC GAG AGC ACG CTC3',与 Z2 配对克隆出去掉了信号肽编码序列的木聚糖酶基因 *xynA*。

2.2 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌中的诱导表达

将带有信号肽编码序列的 *xynA* 和去掉了原信号肽序列的 *xynA* 通过 *Nco* I 与 *Hind* III 位点以正确的阅

读框架分别插入到表达载体 pET-22b(+) 的 *pelB* 信号肽编码序列之后,得到大小分别为 6.9kb 和 6.8kb 的重组质粒 pET-22b(+)-*xynA*(图 1)。

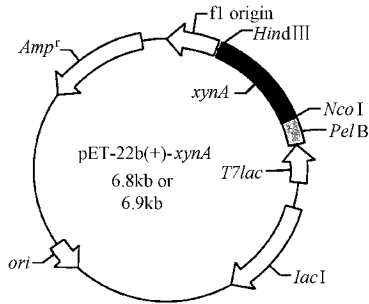


图 1 重组表达质粒 pET-22b(+)-*xynA* 的物理图谱

Fig.1 Physical map of recombinant expression plasmid pET-22b(+)-*xynA*

含有重组表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 用于诱导表达,表达的木聚糖酶 XYNA 经 SDS-PAGE 检测(图 2)和酶活性分析,结果表明:1. 两种构建的木聚

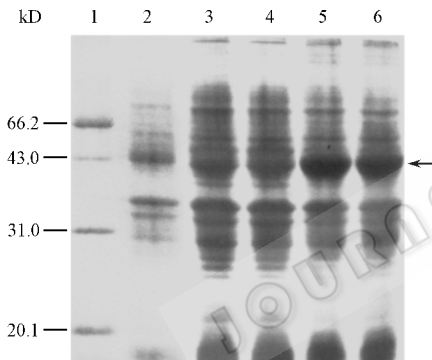


图 2 基因 *xynA* 在大肠杆菌中表达的木聚糖酶 XYNA 的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the *xynA* expressed in *E. coli*

1. Standard protein molecular weight; 2. *E. coli* with plasmid pET-22b(+); 3. *E. coli* recombinants with pET-22b(+)-*xynA* (*xynA* with signal peptide sequence); 4. Two *E. coli* recombinants with pET-22b(+)-*xynA* (*xynA* without signal peptide sequence); 5, 6. Two *E. coli* recombinants with pET-22b(+)-*xynA* (*xynA* without signal peptide sequence)

糖酶基因都得到了表达,均在 43kD 处出现一条特异性蛋白条带,分子量大小与木聚糖酶的理论分子量及来源于 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 的原始酶^[6]一致。两种构建表达的木聚糖酶分子量大小基本一样,但理论上带原信号肽编码序列的 *xynA* 表达的蛋白应比不带蛋白分子量大小(相差约 4.6kD),可能是原基因的信号肽在翻译后被切掉,这还有待进一步的实验分析研究。2. 不带原信号肽编码序列时其蛋白表达量约占可溶性蛋白的 30% 左右,而带原信号肽编码序列时其表达量较低,不到可溶性蛋白的 10%,但都可检测到木聚糖酶活性,效价分别为 12.2 IU/mL 和 3.9

IU/mL。

2.3 木聚糖酶基因 *xynA* 在酵母中的诱导表达

将去掉了原信号肽编码序列的木聚糖酶基因 *xynA* 通过 *EcoRI* 和 *SmaI* 位点以正确的阅读框架克隆到表达载体 pPIC9 上的酵母 α -因子信号肽编码序列之后,得到重组质粒 pPIC9-*xynA*(图 3)。

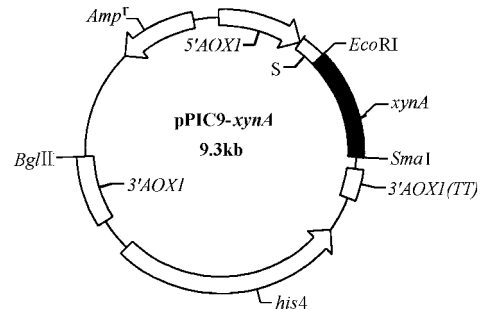


图 3 重组表达质粒 pPIC9-*xynA* 的物理图谱

Fig.3 Physical map of recombinant expression plasmid pPIC9-*xynA*

由于受体酵母 *Pichia pastoris* GS 115 为 His 缺陷型 (*his*⁻) 而重组载体上带有 *his4* 基因而无酵母复制起始子,这样在不加 His 的基本培养基 RDB 上只有 *his4* 整合到酵母染色体上的重组酵母才能正常生长。另外,外源基因同源重组到酵母染色体上后会破坏受体酵母的酒精氧化酶基因,使它不能利用甲醇作为碳源正常生长,这样重组子 (*mut*⁻) 在以甲醇为唯一碳源的 MM 培养基上就不生长或生长缓慢,而在以葡萄糖为碳源的 MD 培养基上能正常生长,通过这些标记筛选重组子。进一步在试管中诱导表达,通过酶活性测定,从 64 株重组子中筛选出胞外表达木聚糖酶的菌株 21 株,其中产酶最高的一株在试管培养中效价达到 29 IU/mL 培养液,在 500mL 三角瓶培养中达到 50 IU/mL,XYNA 酶蛋白表达量可达到 0.2mg/mL。从培养上清液的 SDS-PAGE 结果(图 4)来看,表达的酶蛋白分子量略大于在大肠杆菌中表达的酶蛋白,且蛋白电泳带型较宽,其原因可能是在酵母中表达的酶蛋白进行了糖基化修饰,在 XYNA 的氨基酸序列中发现有 5 个潜在的糖基化位点。

3 讨论

木聚糖酶 XYNA 具有较好的酶学性质^[6],它的最适 pH 为 5.6,最适温度为 60°C,耐碱、耐热性较好,在 pH9.0 时仍有近 50% 的酶活性,在 60°C 下处理 30min 还能维护 80.9% 的酶活性,同时对各种金属离子、表面活性剂 SDS 和螯合剂 EDTA 均不敏感,且无纤维素酶活性,有望在纸浆工业、食品工业和能源工业中实

际应用。但原菌株中 XYNA 的产量较低,通过基因工程的方法大幅度提高其单位产量对其实际应用有着重要意义。

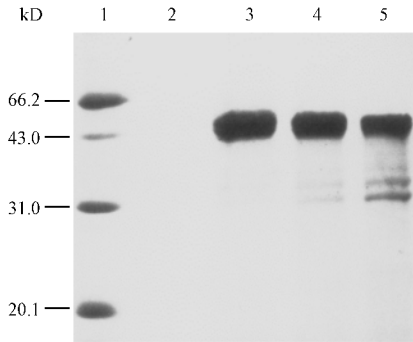


图4 在毕赤酵母中表达的木聚糖酶 XYNA 的 SDS-PAGE
Fig.4 SDS-PAGE analysis of the xylanase XYNA expressed
in *Pichia pastoris*

1. Standard protein molecular weight 2. *Pichia pastoris* GS115 host 3 ~
5. Three *pichia pastoris* recombinants

通过基因工程手段构建高效生物反应器是解决木聚糖酶工业化廉价生产这一问题的最有效途径,国内外都已进行了大量的研究并取得了较大进展。起先的工作是在大肠杆菌中表达,如 Sung 等^[9]使来源于 *Bacillus circulans* 的木聚糖酶基因在大肠杆菌细胞周质中表达量达到 300mg/L。近年来为了进一步提高表达量及便于酶的后加工,更多地采用分泌型的高效表达系统,如芽孢杆菌、链霉菌、曲霉等,1997 年 Ruiz-Arribas 等^[10]将 *Streptomyces halstedii* 的木聚糖酶基因在 *Streptomyces paryllus* 中表达,表达量达到 144IU/mL 发酵液;2002 年 de Faria^[11]和 Bergquist^[12]都报道了利用 *Trichoderma reesei* 来高效分泌表达来源于 *Humicola grisea* 的木聚糖酶基因 *xyn2*,表达量分别达到 0.5g/L 和 1g/L,为目前报道的最高水平。在本研究中,构建的重组毕赤酵母其木聚糖酶的表达量在摇床培养时达到了 0.2mg/mL,在可定量流加诱导剂的 5L 发酵罐高细胞密度发酵中提高到了 2mg/mL,效价达到 500IU/mL(详情将另文发表),比原始菌株提高了 5 倍以上(原菌株同时产 XYNA 和 XYNB 两种酶,总效价为 95 IU/mL)。另外,通过密码子优化等进行 *xynA* 的改造以期进一步提高其在毕赤酵母中的表达量的工作正在进行之中。

含原信号肽编码序列的 *xynA* 和不含原信号肽的 *xynA* 在大肠杆菌中表达的酶蛋白分子量基本一致,这有可能是原基因的信号肽编码序列在大肠杆菌中能被识别、切割,以往也有过链霉菌来源的信号肽编码序列在大肠杆菌中有生物学功能的报道,如

Tokuyasu 等^[13]用来源于 *Streptomyces lividans* 的几丁质酶信号肽编码序列,在大肠杆菌中使表达的异源蛋白分泌到胞外,并证实分泌的外源蛋白上的信号肽序列已被切除。Veiko^[14]等也证实来源于 *Streptomyces avidinii* 的链亲和素(streptavidin)的信号肽编码序列能在大肠杆菌中将表达的链亲和素分泌至细胞周质中。本研究中确切的证据还必需对表达的酶蛋白进行 N 端氨基酸序列测定后才能证实。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gregory A C E, O'Connell A P, Paul B G. Xylans. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1998, **15**(4):439-455
- [2] Prade R A. Xylanases from Biology to Bio Technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1995, **13**(12):101-131
- [3] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, **23**:411-456
- [4] Fujimoto Z, Kuno A, Kaneko S *et al.* Crystal structures of the sugar complexes of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase 'sugar binding structure of the family 13 carbohydrate binding module. *J Mol Biol*, 2002, **316**(1):65-78
- [5] Wouters J, Georis J, Engner D *et al.* Crystallographic analysis of family 11 endo-beta-1,4-xylanase Xy11 from *Streptomyces sp.* S38. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, **57**(pt12):1813-1819
- [6] ZHANG H K(张红莲), YAO B(姚斌), YUAN T Z(袁铁铮) *et al.* Purification and properties of 43kD xylanase XYNA from *Streptomyces olivaceoviridis* A1. *Journal of Agricultural Biotechnology(农业生物技术学报)*, 2002, **10**(1):10-14
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Atsushi Kuno, Daisuke Shimizu, Satoshi Kaneko *et al.* PCR cloning and expression of the F/10 family xylanase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, **86**(5):434-439
- [9] Sung W L, Luk C K, Zahab D M *et al.* Overexpression of the *Bacillus subtilis* and *circulans* xylanases in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 1993, **4**(3):200-206
- [10] Ruiz-Arribas A, Fernandez-Abalos J M, Sanchez P *et al.* Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xysl) from *Streptomyces halstedii* JM 8. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(6):2414-2419
- [11] de Faria F P, Te' O V S, Bergquist P L *et al.* Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **34**(2):119-123
- [12] Bergquist P, Te' O V, Gibbs M *et al.* Expression of xylanase enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Extremophiles*, 2002, **6**(3):177-184
- [13] Tokuyasu K, Kaneko S, Hayashi K *et al.* Production of a recombinant xylanase from *Streptomyces lividans* in a minimal medium of *Escherichia coli*

cells. *FEBS Lett*, 1999 **458** (1) 23 – 26

coil. Secretion of streptavidin by *E. coli* cells. *Bioorg Khim*, 1999,

- [14] Veiko V P, Gul'ko L B, Okorokova N A *et al.* Cloning of streptavidin gene from *Streptomyces avidinii* and its expression in *Escherichia*

25 :184 – 188

Expression of Xylanase Gene *xynA* from *Streptomyces olivaceoviridis* A1 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*

ZHANG Hong-Lian¹ YAO Bin^{1*} WANG Ya-Ru¹ YUAN Tie-Zheng¹ ZHANG Wang-Zhao¹
WU Ning-Feng² FAN Yun-Liu²

¹(*Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

²(*Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

Abstract The gene *xynA* encoding xylanase was cloned from *Streptomyces olivaceoviridis* A1. The *xynA* with and without origin signal peptide sequence were fused behind *pel* B signal peptide in the plasmid pET-22b(+) respectively, then transferred into the host *E. coli*. The xylanase expressed in *E. coli* had normal bioactivity. Further, the *xynA* without origin signal peptide sequence was cloned into the plasmid pPIC9 under the control of *AOX1* promoter and introduced into the host *Pichia pastoris* by electroporation. The results of SDS-PAGE and activity assay of the xylanase expressed by recombinant *P. pastoris* showed that the *xynA* had been overexpressed and secreted, and the xylanase expressed had normal bioactivity. The expression level of xylanase in recombinant *P. pastoris* exceeded 0.2mg/mL in shake culture.

Key words xylanase XYNA, overexpression, *Pichia pastoris*

Received : 07-24-2002

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863) (No. 2001 AA214041).

* Corresponding author. Tel 86-10-68975126 Fax 86-10-68975127 ; E-mail : yaobin@public3.bta.net.cn