

特异腐质霉中性内切葡聚糖酶 II 基因的克隆及表达*

谭慧芳^{1,2} 张国青¹ 郑光宇² 崔福绵¹ 钱世钧^{1**}

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)¹ (北京师范大学 北京 100875)²

摘要: 利用 RT-PCR 的方法, 以特异腐质霉 (*Humicola insolens*) H31-3 总 RNA 为模板, 克隆到中性内切葡聚糖酶 II 基因 *egl2* 的 cDNA, 将其插入到表达载体 pGAPZαA 中, 重组质粒经线性化, 电击转化毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 菌株 GS115, 筛选到分泌表达重组 EG II 的毕赤酵母工程菌株。SDS-PAGE 检测结果表明, 重组 EG II 在酵母中得到了特异性表达, 表达产物的表观分子量约为 55kD, 同时对工程菌株的发酵条件和重组 EG II 的性质进行了初步研究。

关键词: 特异腐质霉, 毕赤酵母, 内切葡聚糖酶 II, 分泌表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2653 (2006) 06-0068-06

Cloning and Expression of the Endo-β-glucanase II Gene from *Humicola insolens* H31-3*

TAN Hui-Fang^{1,2} ZHANG Guo-Qing¹ ZHENG Guang-Yu² CUI Fu-Mian¹ QIAN Shi-Jun^{1**}

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)¹

(Beijing Normal University, Beijing 100875)²

Abstract: A endo-β-glucanase II (EG II) cDNA gene was isolated from the fungus *Humicola insolens* H31-3 by RT-PCR. It was cloned into the expression vector pGAPZαA, and the resultant recombinant plasmid was introduced into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation after lineared by *Bsp*H I digestion. The recombinant *Pichia pastoris* strain was obtained and SDS-PAGE showed that the apparent molecular weight of the expression product was about 55kD. The culture condition and the properties of the recombinant EG II were characterized elementarily.

Key words: *Humicola insolens*, *Pichia pastoris*, Endoglucanase II, Secretive expression

纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 生物转化纤维素物质成为有用产物一直是纤维素酶研究的主要动力。纤维素酶是指能水解纤维素 β-1, 4 葡萄糖苷键, 使纤维素变成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称, 是由内切-β-葡聚糖苷酶 (endo-1, 4-β-D-glucanases, EC3.2.1.4, EG)、纤维二糖水解酶 (1, 4-β-D-cellobiohydrolases 或 exo-1, 4-β-D-glucanases, EC3.2.1.91, CBH)、β-葡萄糖苷酶 (1, 4-β-D-glucosidases, EC3.2.1.21, BG) 3 个主要成分组成的诱导型复合酶系^[1]。按最适作用 pH 值不同, 可分为酸性纤维素酶 (最适 pH 为 4.8 左右, 由绿色木霉、里氏木霉、康氏木霉、黑曲霉、青霉等产生)、中性纤维素酶 (最适 pH 为 6~8, 由长梗木霉、腐质霉、芽孢杆菌等产生)、碱性纤维素酶 [最适 pH8~11, 由嗜碱芽孢杆菌、腐质霉等产生)。

目前, 纤维素酶的应用已经扩展到医药、日用化工、造纸、食品发酵、废水处理、工业洗涤、中草药提取等各个领域^[2], 其前景十分广阔。其中中性纤维素酶在纺织、

* 国家十五科技攻关项目资助 (No. 2004BA713B03-01)

** 通讯作者 Tel: 010-62651598, E-mail: Qiansj@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2006-02-22, 修回日期: 2006-04-12

食品、饲料和制药等行业均具有广泛的应用前景，尤其是在纺织领域应用市场最大，特别是在牛仔布“洗旧”整理加工过程中，用中性纤维素酶洗不易产生反染现象^[3]。目前中性纤维素酶市场需求量较大，大约占整个纤维素酶需求的 30% 以上，国内市场主要还是依赖进口，价格昂贵，因此开展中性纤维素酶高产菌株的选育和高效提取的研究，缩短我国与国际先进水平的差距，降低生产成本，实现中性纤维素酶国产化，具有重大而深远的意义。

腐质霉 (*Humicola* sp.) 能产中性纤维素酶^[4,5]，其许多基因都已经得到克隆和表达^[6-8,9]，但表达活力低，目前还没有在工业上应用的报道。本研究采用 RT-PCR 的方法，从特异腐质霉 (*H. insolens*) H31-3 中克隆到中性内切葡聚糖酶基因 *egl2* cDNA，这在国内是首次从腐质霉中克隆到纤维素酶基因；并构建了毕赤酵母表达载体 pGAPZαA-EG II，首次实现了其在毕赤酵母 GS115 中的表达，为进一步研究构建毕赤酵母工程菌株奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

特异腐质霉 (*H. insolens*) H31-3、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、巴斯德毕赤酵母菌株 (*P. pastoris*) GS115、毕赤酵母组成型整合表达载体 pGAPZαA 均由实验室保存，pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Takara LA Taq (with GCbuffer) 购自大连宝生物工程公司，胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京天为时代公司，抗生素 ZeocinTM、TRIzol kit、oligo- (dT)₁₅、SSII RTase 购自 Invitrogen 公司，其余试剂均为国产、进口分析纯。

1.3 培养基

LB、低盐 LB、YPD 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.4 *egl2* cDNA 的克隆及毕赤酵母表达载体的构建

1.4.1 总 RNA 的提取：特异腐殖霉在诱导培养基中，42℃ 振荡培养 3d 后，过滤收集菌体，用 DEPC 处理的水清洗后立即放入液氮中研磨，用 TRIzol kit 提取总 RNA。

1.4.2 *egl2* cDNA 的克隆：根据文献 [6, 7] 中报道的基因序列，设计引物：P₁：5'-ATCTCGAGCAGGGCGGTGCATGG-3'，P₂：5'-TAGCCGCCCGCCTATGGCACGTATT-3'，在 P₁ 添加 *Xho*I 酶切位点，从编码成熟蛋白核苷酸开始，P₂ 添加 *Not*I 酶切位点，结束于基因的终止密码子。以总 RNA 为模板，通过 RT-PCR 扩增得到 *egl2*cDNA。将 PCR 产物回收，与 pGEM-T Easy Vector 连接，转化 *E. coli*DH5α，筛选阳性克隆进行测序鉴定。

1.4.3 毕赤酵母重组表达载体的构建：*egl2*cDNA 经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切后，插入表达载体 pGAPZαA 中，使其位于 α-因子信号肽序列的下游，得到重组质粒 pGAPZαA-EGII 如图 1。

1.5 重组毕赤酵母工程菌株的构建

pGAPZαA-EG II 经 *Bsp*H I 酶切线性化后，

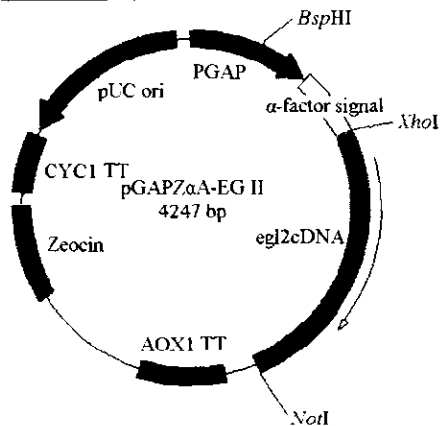


图 1 重组质粒 pGAPZαA-EG II 构建图

电激转化毕赤酵母 GS115, 涂布于含 Zeocin 的 YPD 琼脂平板上, 30℃ 培养 2 ~ 3d 至转化子出现。

1.6 重组毕赤酵母工程菌株的筛选和鉴定

1.6.1 刚果红平板染色: 在转化子平板上倒上层琼脂 (1% CMC-Na, 0.5% 琼脂, 0.1mol/L pH6.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配置), 30℃ 保温 1h, 用 1mg/mL 的刚果红溶液染色 1h, 弃去染液后用 1mol/L 的 NaCl 溶液脱色 1h^[7]。观察产生的透明圈, 透明圈的大小大致反应菌株产重组 EG II 酶活力的高低。

1.6.2 重组毕赤酵母菌株的 PCR 鉴定: 用玻璃珠提取酵母基因组 DNA^[10], 以此为模板, P₁、P₂ 为引物, 进行 PCR 扩增。

1.7 重组毕赤酵母工程菌株的表达

挑取转化子于 5mLYPD 液体培养基中, 30℃, 250r/min 振荡培养过夜; 取 0.1mL 的过夜培养物转接到含有 50mLYPD 的 250mL 锥形瓶中, 继续振荡培养 1d。将培养物于 4℃ 下 6,000r/min 离心 5min, 收集上清, 即为粗酶液。

1.8 重组毕赤酵母表达产物的分析

1.8.1 重组表达 EG II 的酶活力检测: 采用 DNS 定糖法测定内切葡聚糖酶的活力^[11]。取 0.1mL 适当稀释的粗酶液, 加入 0.9mL 1% CMC-Na (0.1mol/L pH6.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制), 65℃ 反应 30min, 加入 3mL DNS 试剂, 煮沸 10min, 用蒸馏水定容至 10mL, 在 550nm 波长下测定光吸收值。以每分钟产生 1μmol 葡萄糖所需酶量为一个酶活力单位 (IU)。

1.8.2 蛋白质含量的测定: 参考《蛋白质技术手册》^[12] 测定蛋白含量。

1.8.3 SDS-PAGE: 取粗酶液 20μL, 进行 SDS-PAGE, 分析重组蛋白的表达情况。

1.8.4 重组 EG II 最适 pH 及 pH 稳定性测定: 在不同 pH 条件下测定重组 EG II 的酶活力; 将酶液在不同 pH 值的缓冲液中室温保温 24h, 检测剩余的酶活力。

1.8.5 重组 EG II 最适温度及温度稳定性测定: 在不同温度条件下测定重组 EG II 的酶活力; 将酶液在不同温度下分别保温 1 ~ 4h, 检测剩余的酶活力。

1.9 工程菌株发酵条件的优化

1.9.1 重组毕赤酵母菌株的稳定性检测: 挑取单菌落于 5mLYPD 液体培养基中, 30℃, 250r/min 培养, 每 24h 转接一次, 分别取第 10、20、30、40、50 代的菌体, 划线到 YPD 固体培养基, 于 30℃ 静置培养至单菌落出现, 挑单菌落于 5mLYPD 液体培养基中, 30℃, 250r/min 培养 2d, 检测酶活力。

1.9.2 信号肽对工程菌株产酶的影响: 本研究还构建了一个以 EG II 自身信号肽为分泌信号的表达载体 pGAPZ-EG II, 而 pGAPZαA-EG II 是利用 α-因子信号肽来实现 EG II 的分泌表达, 分析不同的信号肽对工程菌株产酶的影响。

1.9.3 培养时间和基因拷贝数对重组菌株产酶的影响: 在不同的时间 (24h, 48h, 56h, 72h, 96h, 120h) 收集培养物, 分析最佳产酶时间。改变平板培养基中抗生素 Zeocin 的浓度 (100、500、1,000、2,000μg/mL), 研究不同基因剂量对重组菌株产酶的影响。

2 结果

2.1 特异腐质霉总 RNA 的提取

利用 Trizol 提取腐质霉的总 RNA, 甲醛变性凝胶电泳可见明显的 28S、18S 和 5SrRNA 条带, mRNA 则成薄雾状分布于整个泳道, 说明提取的 RNA 完整性很好 (图 2)。

2.2 *egl2*cDNA 克隆

经 RT-PCR 扩增得到 *egl2* 的 cDNA, 约 1, 200bp (图 3)。将 *egl2*cDNA 序列在 NCBI 上进行 Blastn 分析, 扩增的片段与 *H. grisea egl2*^[6] 基因的同源性为 98.9%, 与 *H. insolens CMC3*^[7] 基因的同源性为 97.26%。

2.3 表达载体的构建

egl2 cDNA 经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切, 插入到表达载体 pGAPZαA 的 α-因子信号肽序列下游, 获得重组质粒 pGAPZαA-EGII, 酶切 (图 4) 和测序结果表明插入片段在 pGAPZαA 中有正确的阅读框。

2.4 重组毕赤酵母工程菌株的筛选和鉴定

挑取平板上水解圈大的菌落于 5mLYPD 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 2d, 做进一步筛选。提取重组菌株基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 结果表明 *egl2*cDNA 序列已插入到毕赤酵母的基因组中 (图 5)。

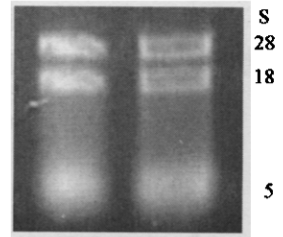


图 2 特异腐质霉总 RNA

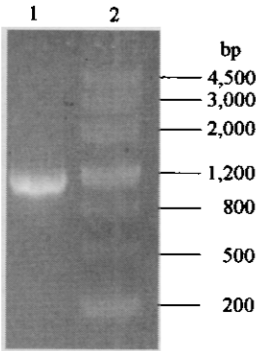


图 3 *egl2*cDNA 的克隆

1 PCR 产物 *egl2*cDNA, 2 DNA marker

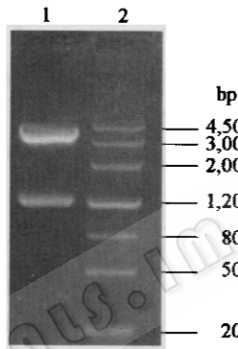


图 4 双酶切鉴定重组质粒 pGAPZαA-EG II

1 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切重组质粒 pGAPZαA-EG II, 2 DNA marker

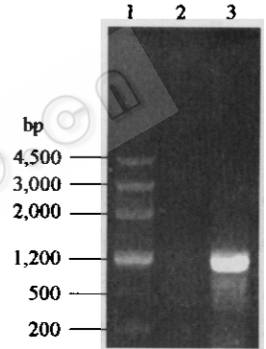


图 5 重组毕赤酵母菌株的 PCR 鉴定

1 DNA marker, 2 宿主菌 GS115 的 PCR 产物, 3 重组毕赤酵母菌株的 PCR 产物

2.5 重组毕赤酵母表达产物的分析

2.5.1 SDS-PAGE: 结果表明, 重组 EG II 实现了在毕赤酵母中的分泌表达, 表达蛋白的表观分子量约为 55kD (图 6), 大于预测的分子量 42kD, 推测表达产物在翻译后修饰时发生了糖基化。

2.5.2 重组 EG II 最适反应 pH 及 pH 稳定性: 重组 EG II 最适反应 pH 在 5.5 ~ 6.0 左右 (图 7), 但在 4.5 ~ 6.0 的范围内, 酶活力都在 80% 以上, 说明其在 4.5 ~ 6.0 的 pH 环境下, 仍能很好的发挥作用, 适应工艺灵活性的需要。酶液在不同 pH 条件下室温保存 24h 后, 在 pH4.0 ~ 8.0 条件下仍有 85% 以上的活力 (图 8)。

2.5.3 重组 EG II 最适反应温度及温度稳定

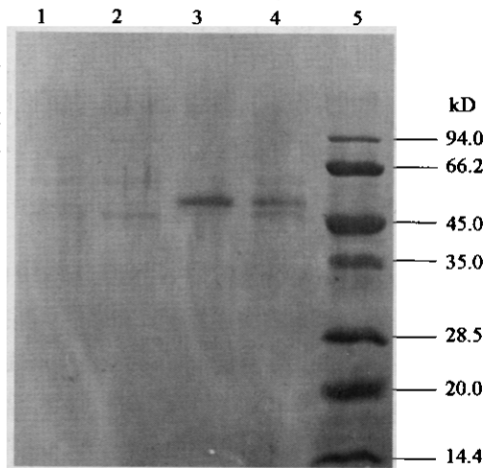


图 6 重组 EG II 的 SDS-PAGE 分析

1 宿主菌 GS115 发酵产物, 2 空载体 pGAPZαA 重组毕赤酵母发酵产物, 3、4 pGAPZαA-EG II 重组毕赤酵母发酵产物, 5 低分子量标准蛋白 Marker

性: 重组 EG II 的最适反应温度为 65℃ (图 9); 酶液在 60℃ 保温 4h 后仍有 90% 以上的活力 (图 10), 比木霉和曲霉所产纤维素酶具有更好的热稳定性。

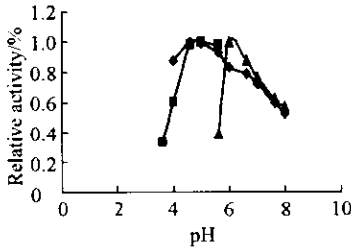


图 7 重组内切葡聚糖酶 II 最适反应 pH

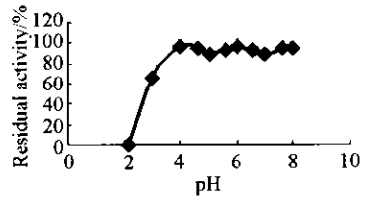


图 8 重组内切葡聚糖酶 II pH 稳定性

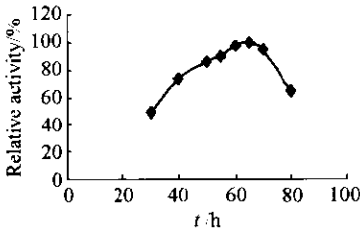


图 9 重组内切葡聚糖酶 II 最适反应温度

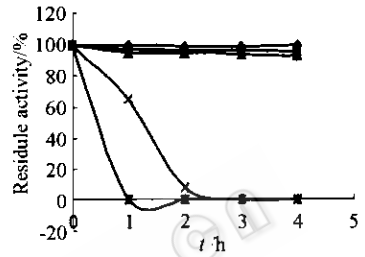


图 10 重组内切葡聚糖酶 II 温度稳定性

2.6 工程菌株发酵条件的优化

2.6.1 重组毕赤酵母菌株的稳定性: 将工程菌株传代 50 次后, 检测第 10、20、30、40、50 代的酶活力, 基本保持稳定。

2.6.2 信号肽对工程菌株产酶的影响: 本文构建的两个组成型表达载体不同在于, 其中一个载体是利用 EG II 自身信号肽, 而另一个载体是利用 α -因子信号肽来实现重组 EG II 的分泌表达。结果表明, α -因子信号肽实现了重组 EG II 的分泌表达, 而以 EG II 自身信号肽作为分泌信号的重组菌株的发酵液中基本上测不到酶活力。

2.6.3 培养时间和基因拷贝数对重组菌株产酶的影响: 对不同时间收集的培养物进行酶活力检测, 结果表明, 摇瓶发酵 24h 酶活力就达到最高, 继续培养对酶活力和蛋白含量没有明显提高作用。改变平板培养基中抗生素 Zeocin 的浓度, 结果表明, 增加抗生素 Zeocin 的浓度, 筛选到的重组菌株的酶活力逐渐增加, 浓度在 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时重组菌株表现的酶活力最高, 但当浓度达到 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 酶活力反而降低。

3 讨论

本研究首次在巴斯德毕赤酵母系统中表达了特异腐质霉 *egl2* 基因, 通过对重组菌株进行 Zeocin 抗性加压筛选, 获得了高拷贝整合的重组菌株, 增加了基因的表达水平, 摇瓶培养 24h 酶活力最高可达 2.5 IU/mL, 大大缩短了发酵时间; 而且 P_{GAP} (3'-磷酸甘油醛脱氢酶启动子)^[13] 是一种组成型强启动子, 使用 P_{GAP} 在发酵时不需甲醇诱导, 不必更换碳源, 工艺简单, 更适应工业化生产的要求; 另外 α -因子信号肽使表达的重组蛋白分泌到胞外, 且毕赤酵母自身分泌的蛋白种类比较少, 使得纯化更为简便, 为其工业化生产奠定了基础。

目前我国还没有一家厂家商业化生产中性纤维素酶, 有关高产中性纤维素酶菌株

选育的报道也很少。本研究构建的重组菌株产中性内切葡聚糖酶的活力还远远达不到工业生产的要求,还有待于进一步优化发酵条件;另外对该重组酶的定向分子进化研究正在进行中,以进一步提高酶活力。

参 考 文 献

- [1] Sang J, Han Y, Je Y, *et al.* J Biol Chem, 1995, **270** (43): 26012 ~ 26019.
- [2] 肖春玲, 徐常新. 微生物学杂志, 2002, **22** (2): 33 ~ 35.
- [3] 王 静. 安徽农业大学学报, 1997, **24** (1): 84 ~ 87.
- [4] Schulein M. J Biotech, 1997, **57**: 71 ~ 81.
- [5] Takashima S, Nakamura A, Masaki H, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1996, **60** (1): 77 ~ 82.
- [6] Takashima S, Nakamura A, Masaki H, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1997, **61** (2): 245 ~ 250.
- [7] Dalboge H, Heldt-Hansen H P. Mol Gen Genet, 1994, **243**: 253 ~ 260.
- [8] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, *et al.* J Biotech, 1996, **50**: 137 ~ 147.
- [9] Moriya T, Watanabe M, Sumida N, *et al.* Biosci Biotech Biochem, 2003, **67** (6): 1434 ~ 1437.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. (黄培堂 等译.) 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 2002. 485 ~ 487.
- [11] Ghose T K. Pure and Appl Chem, 1987, **59** (2): 257 ~ 268.
- [12] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [13] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, *et al.* Gene, 1997, **186**: 37 ~ 44.