

链霉菌 zxy19 木聚糖酶酶学 性质及酶基因克隆

王 吟^{1,2} 杨艳燕² 肖 静¹ 徐 俊^{1*}

(1. 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005)
(2. 湖北大学生命科学学院 应用生化研究室 武汉 430062)

摘 要: 采用平板筛选法, 从红树林放线菌中筛选到一株有较强木聚糖酶活的菌株 zxy19, 其 16S rDNA 序列与 *Streptomyces sampsonii* 的同源性仅为 96%。该菌株木聚糖酶活为 852.41 IU/mL, 酶反应最适 pH 值为 7, 最适反应温度为 60°C。用针对木聚糖酶基因保守结构域的一对简并引物扩增到该酶基因部分序列, 进而通过反向 PCR 扩增到了完整的酶基因。对该基因序列分析结果表明此木聚糖酶基因属于糖基水解酶家族 11 的成员, 酶蛋白氨基酸序列与已报道序列同源性最高为 79% (*Streptomyces lividans* xylanase B)。构建了该酶重组表达质粒 pET-28a-xyl696, 经过 IPTG 诱导实现了该酶蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的异源表达, 且通过镍柱纯化后的表达产物具有生物学活性。

关键词: 红树林, 链霉菌, 木聚糖酶, 异源表达

The Xylanase Properties and the Xylanase Gene of *Streptomyces* sp. zxy19

WANG Yin^{1,2} YANG Yan-Yan² XIAO Jing¹ XU Jun^{1*}

(1. The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005)
(2. College of Life Science Hubei University, Wuhan 430062)

Abstract: A mangrove actinomycetes strain zxy19 that has shown strong xylanase activity was selected by plate screening. Sequencing analysis and Blast search of the 16S rDNA gene of the strain revealed that the highest identity in the database was 96% against *Streptomyces sampsonii*. Characterization of the xylanase enzymatic properties of zxy19 has shown that the optimal pH was 7 and the optimal temperature was 60°C. Degenerate primers were designed according to the conservative domains of actinomycetal xylanase to amplify the partial xylanase gene. The complete enzyme gene xyl696 was obtained by inverse PCR subsequently and confirmed by DNA sequence analysis. Blast search of the translated amino acid sequence suggested that the enzyme belongs to the glycosyl hydrolases family 11 with the highest similarity as 79% against the xylanase B produced by *Streptomyces lividans*. The xylanase gene was cloned into the expression

基金项目: 国家重点科技研究发展计划("973 项目", No. 2006CB708200); 国家高技术研究发展计划("863 计划", No. 2006AA09Z437); 留学回国人员科研启动基金

* 通讯作者: ✉ xu.junn@gmail.com

收稿日期: 2008-04-29; 接受日期: 2008-07-09

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

vector to construct pET-28a-*xyl696* and introduced into *E. coli* BL21(DE3). After IPTG inducing, the over expressed recombinant xylanase was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography and proved to have catalytic activity.

Keywords: Mangrove, *Streptomyces*, Xylanase, Heterologous expression

木聚糖(Xylan) 是植物半纤维素的主要成份, 是除纤维素之外自然界中最为丰富的多糖, 也是自然界中最为丰富的可再生资源之一。木聚糖酶属于水解酶类, 是一类可以将木聚糖降解成低聚木糖或木糖的复合酶系, 该酶可广泛应用于造纸、食品和饲料等行业^[1]。木聚糖酶在自然界分布相当广泛, 已报道的能产木聚糖酶的微生物有细菌、真菌和链霉菌等多种微生物类群。近年来已从瑞氏木霉、黑曲霉、橄榄绿链霉菌中克隆了木聚糖酶基因, 并在大肠杆菌或毕赤酵母中实现了高效表达。从陆地或海洋极端环境来源的木聚糖酶由于催化活性独特而更引人注目, 如短小芽孢杆菌中的耐碱性木聚糖酶、来源于海栖热袍菌和深海地芽孢菌的耐热木聚糖酶等^[2-4]。

红树林是亚热带海岸潮间带特有的生物多样性极为丰富的生态环境, 该环境中大量的植物凋落物主要被微生物产生的纤维素分解酶、木质素分解酶等分解^[5], 对红树林真菌的木聚糖酶一直研究的较多^[6], 而红树林链霉菌的半纤维素降解酶系则鲜见报道。本研究从红树林土壤放线菌中筛选到一株具有较高木聚糖酶活的链霉菌, 对其酶学特性进行了初步的研究。克隆了该菌中的木聚糖酶基因, 并将该酶基因大肠杆菌中进行了异源表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 放线菌由本实验室分离自福建漳江口红树林自然保护区土壤; 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 为本实验室保藏; 载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 工具酶和生化试剂: 各种限制性内切酶、T4 连接酶、LA Taq 及各种分子量标准购自 TaKaRa 公司; D-木糖购自 Sigma 公司; 引物由上海英俊生物公司合成; 胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生物工程技术服务公司; 其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.1.3 培养基: 高氏合成培养基: 淀粉 2.0%; KNO₃ 0.1%; K₂HPO₄·3H₂O 0.05%; MgSO₄·7H₂O 0.05%;

NaCl 0.05%; FeSO₄ 0.001%; 琼脂 1.5%; 调 pH 7.2~7.4。

木聚糖酶筛选培养基: 木聚糖 1.2%; NaCl 0.2%; K₂HPO₄·3H₂O 0.2%; MgSO₄·7H₂O 0.03%; CaCl₂ 0.02%; 蛋白胨 0.1%; 酵母粉 0.1%; 琼脂 1.5%; 调 pH 7.5。

种子培养基: 胰蛋白胨 1.7%; 植物蛋白胨 0.3%; NaCl 0.5%; K₂HPO₄·3H₂O 0.25%; 葡萄糖 0.25%; 调 pH 7.5。

产酶发酵培养基: 木聚糖 1.2%; NaCl 0.2%; K₂HPO₄·3H₂O 0.2%; MgSO₄·7H₂O 0.03%; CaCl₂ 0.02%; 调 pH 7.5。

1.2 产酶菌株的筛选和培养

接种甘油保藏的放线菌到高氏斜面上, 28°C 培养 1 周后转接到木聚糖酶筛选培养基平板上。28°C 培养 3 d 后, 挑选产生水解圈透明且直径较大者进行摇瓶复筛。从高氏一号斜面刮取适量孢子接种于 10 mL 种子培养基中, 28°C 培养 3 d 后, 再按 10% 接种量转接于 250 mL 含有 50 mL 液体发酵培养基的三角瓶中, 200 r/min, 28°C 培养。

1.3 酶学性质的研究

1.3.1 木聚糖酶活力测定及酶活力单位定义: 发酵液直接于 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液为粗酶液。采用 DNS 法^[7]测定反应液中的还原糖含量: 取 1 mL 稀释酶液, 加入 1 mL 1% 的木聚糖溶液, 50°C 反应 30 min 后, 加入 2 mL 的 DNS 试剂。煮沸 10 min, 用水定容至 10 mL。550 nm 处测吸光度。酶活力单位定义: 在最适反应条件下, 以每 1 min 生成 1 μ mol 的还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位 (International Unit, IU)。

1.3.2 酶的最适反应 pH 的测定: 使用以下缓冲体系: 50 mmol/L 的柠檬酸缓冲液(3.0~6.0)、磷酸缓冲液(7.0)、Tris-HCl 缓冲液(8.0~8.5)、甘氨酸-NaOH 缓冲液(9.0~10.5)、磷酸-NaOH 缓冲液(11.0~13.0), 配制不同 pH 的 1% 木聚糖溶液, 按 1.3.1 方法测定粗酶活力。

1.3.3 酶的最适反应温度的测定: 用 pH 7 的缓冲液配制 1% 木聚糖溶液, 分别在不同温度(30°C~80°C)

条件下反应 30 min, 测定粗酶活力。

1.3.4 酶的稳定性测定: 将粗酶液在不同温度(50°C~80°C)下放置 2 h, 测定残余酶活力。

1.4 16S rDNA 的扩增和序列分析

采用 16S rDNA 的保守序列区引物 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R : 5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3' 扩增细菌的 16S rDNA。PCR 反应条件为: 反应前预变性 95°C 3 min; 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 再延伸 10 min。将 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 切出扩增条带, 用 Gel Extraction Kit 试剂盒回收纯化后克隆到 pMD18-T 载体上, 由上海英俊生物有限公司代为测序。测序结果用 NCBI 的 Blast 搜索 GenBank 进行序列比对。

1.5 木聚糖酶基因克隆

1.5.1 简并引物的设计: 以链霉菌 *Streptomyces lividans* 的 xylanase B 基因序列(GenBank 登录号: AAC06114) 为递交序列, 用 Blast 2.0 检索 SwissProt + SpTrEMBL 蛋白数据库, 从中再选取 7 个代表性的木聚糖酶序列作为引物设计的模板。以 Blockmaker^[8] 对这些序列进行块状比对, 找出无间隙高度保守的氨基酸序列。最后将比对结果递交到 CodeHop 服务器^[9] 进行运算, 检索出 6 条木聚糖酶的简并引物。

1.5.2 木聚糖酶基因保守区的扩增、测序: 以提取的菌株总 DNA 为模板, 采用设计的简并引物进行扩增, 上游引物 xylF : 5'-CAACCCCTGGTCGAGTAC tayathgtnga-3' degen=24; 下游引物 xylR : 5'-AC CCGTAGCACTGGTAGccytcngtngc-3' degen=32。预期目的条带大小为 420 bp。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 50 s, 30 个循环; 72°C 延伸 7 min。将胶回收的 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体, 由上海英俊生物有限公司代为测序, 测序结果用 NCBI 的 Blast 搜索 GenBank 进行序列比对。

1.5.3 反向 PCR 扩增、克隆和测序: 选择限制性内切酶对提取的菌株总 DNA 进行消化, 用苯酚和氯仿各抽提 1 次, 无水乙醇沉淀, 溶于无菌的去离子水中。取消化了的总 DNA 用 T4 连接酶在 16°C 进行自身环化连接反应 12 h。纯化连接产物后, 利用根据保守区序列设计的反向 PCR 引物进行扩增。上游引物 Inv-xylF : 5'-ATCACCACCGCAACCACTT-3';

下游引物 Inv-xylR : 5'-AGGGTCATGGAGACGG TGTCT-3'。反向 PCR 反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 50 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。回收片段大小在 2 kb 以上的 PCR 产物, 克隆到 pMD18-T 载体后由上海英俊生物有限公司代为测序, 测序结果用 DNAMAN 软件拼接出完整的酶基因序列, 用 NCBI 的 Blast 搜索 GenBank 进行比对。

1.6 木聚糖酶基因的异源表达

1.6.1 表达载体的构建: 根据反向 PCR 获得的木聚糖酶的基因序列, 设计一对能扩增完整阅读框的特异性引物, 两端添加 *Bam*H 和 *Eco*R 的酶切位点, 上游引物 xyl696F : 5'-ggatccATGCACGAGGACA GCACTCC-3'; 下游引物 xyl696R : 5'-gaattcTCAG CCGTTGACCCAGATGT-3'。从菌株总 DNA 中扩增酶基因片段, 经酶切后连接到表达载体 pET-28a 上, 采用 CaCl₂ 转化法转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 酶切鉴定重组子。对插入片段进行序列分析确证克隆的酶基因无突变。

1.6.2 木聚糖酶基因的异源表达: 将验证过的重组质粒转化表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取转化子阳性克隆于液体培养至 OD₆₀₀ = 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 于 18°C、180 r/min 低温慢速振荡培养 20 h, 诱导重组酶蛋白的表达。

1.6.3 表达蛋白的纯化: 将 200 mL 诱导培养液在 8000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀用 10 mL 的 pH 8.0 磷酸缓冲液重新溶解, 液氮反复冻融 3 次, 超声破碎细胞(功率 0.6 kW, 10 min)。按 GE Healthcare 公司 Ni⁺-NTA 柱使用手册方法纯化表达的目的蛋白, 并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。

2 结果与分析

2.1 高产木聚糖酶菌株的筛选

将从红树林土样分离纯化的 152 株放线菌分别接入筛选培养基平板, 每株点 3 个重复进行初筛, 共有 70 株菌能产生透明水解圈具有木聚糖酶活性, 其中菌株 zxy19 经初筛显示较高的木聚糖酶活性, 进一步测定酶活达到 852.41 IU/mL。对菌株 zxy19 的 16S rDNA 序列分析结果表明其与 *Streptomyces sampsonii* 的同源性仅有 96%。

2.2 菌株 zxy19 的酶学性质

2.2.1 培养时间对产酶的影响: 在 0 h~72 h 内控制

温度为 28°C, 转速为 200 r/min, 每隔 12 h 取样测定粗酶液的酶活。结果表明, 该菌在培养 48 h 时木聚糖酶活力最高, 以后有所下降并保持稳定(图 1)。

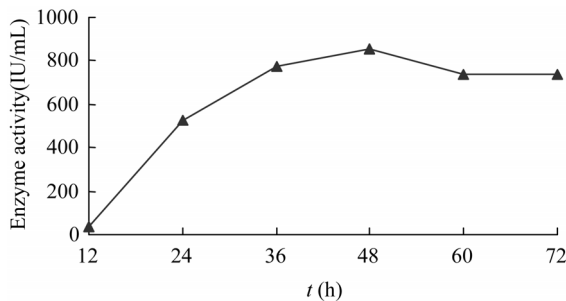


图 1 不同培养时间对菌株产酶活力的影响
Fig. 1 Effect of the time on enzyme activity

2.2.2 酶促反应的最适 pH: 菌株培养 48 h 后制备粗酶液, 在 50°C 不同 pH 值下测定木聚糖酶活。结果如图 2 所示, 该菌酶活在 pH 值 3~10 范围内先升后降, 在 pH 值 7 左右达到最大。

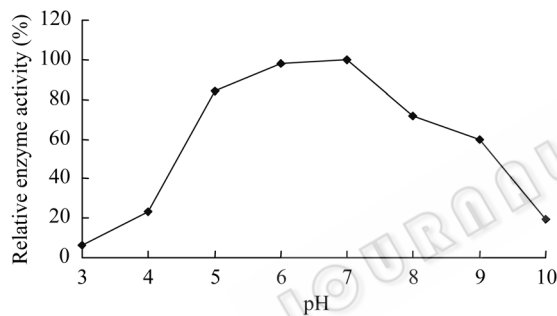


图 2 pH 值与木聚糖酶活之间的关系曲线
Fig. 2 Effect of pH on enzyme activity

2.2.3 酶促反应的最适温度: 在 pH 值为 7 的缓冲体系中, 测定不同反应温度下(30°C~80°C)的粗酶活力。该酶酶活随温度变化情况如图 3 所示, 在 60°C 时酶活力最高, 其最适的酶促反应温度在 60°C 左右。

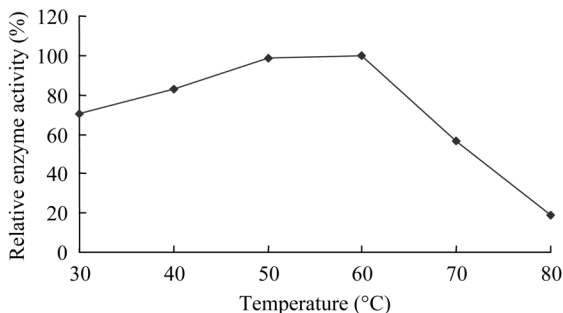


图 3 温度与木聚糖酶活之间的关系曲线
Fig. 3 Effect of temperature on enzyme activity

2.2.4 酶的耐热性实验: 将粗酶液在 pH 值为 7 的缓冲体系中, 在不同温度(30°C~80°C)下放置 30 min 后, 进行酶活测定。结果如图 4 所示, 在 50°C 以下, 酶活力保持不变; 在 60°C 处理 30 min, 酶活仍维持有 80% 酶活; 在 80°C 时酶活丧失。由此可见, 酶活在 50°C 以下可保持稳定。

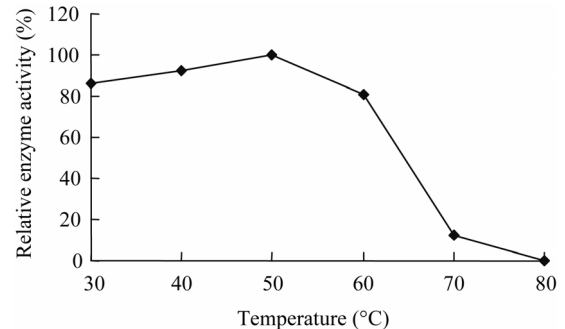


图 4 木聚糖酶酶活的热稳定性
Fig. 4 The thermal stability of xylanase activity

2.3 木聚糖酶基因保守区的扩增及序列分析

以菌株 zxy19 的总 DNA 为模板, 用设计的简并引物经 PCR 扩增获得了单一目的条带, 大小为 420 bp。克隆该 PCR 产物至 pMD18-T 载体, 对插入片段的 DNA 序列分析表明所获得的木聚糖酶基因片段属于糖基水解酶家族 11 的成员。

2.4 反向 PCR 扩增木聚糖酶基因及序列分析

选用 *Apa* 对菌株总 DNA 进行酶切。以酶切后 DNA 片段的环化产物为模板, 根据上述已获得的部分木聚糖酶基因序列设计反向 PCR 引物, 扩增已知序列的侧翼。PCR 扩增获得了包含木聚糖酶保守区上下游序列的约 2 kb 的 PCR 产物, 将其回收后克隆到 pMD18-T 载体。对插入片段的 DNA 序列分析表明, 获得了长为 696 bp 的完整木聚糖酶基因序列 (GenBank 登录号: EU399235)。通过 NCBI 在线 Blast 序列比对发现, 克隆到的木聚糖酶氨基酸序列与 *Streptomyces lividans* xylanase B 氨基酸序列相似性最高达 79%。

2.5 木聚糖酶基因异源表达载体的构建

在木聚糖酶基因序列起始密码子和终止密码子外侧分别添加 *Bam*H 和 *Eco*R 酶切位点, 设计一对特异性引物, 以菌株的总 DNA 为模板, 扩增出完整的木聚糖酶基因。将 PCR 产物经上述两个酶双酶切后克隆到表达载体 pET-28a(+)上, 并通过序列分析确证获得了读框正确的重组质粒 pET-28a-xyl696。

2.6 表达产物的纯化及重组酶活性分析

收集 IPTG 诱导后的 pET-28a-xyl696 的 BL21

(DE3)克隆培养物, 超声破碎细胞后, 对细胞裂解液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。根据木聚糖酶蛋白序列推测表达的融合蛋白的分子量大小为 28.882 kD。如图 5 所示, 细胞裂解液上清和沉淀中都有与预期的目的条带大小一致表达产物($M_r \approx 29$ kD)。

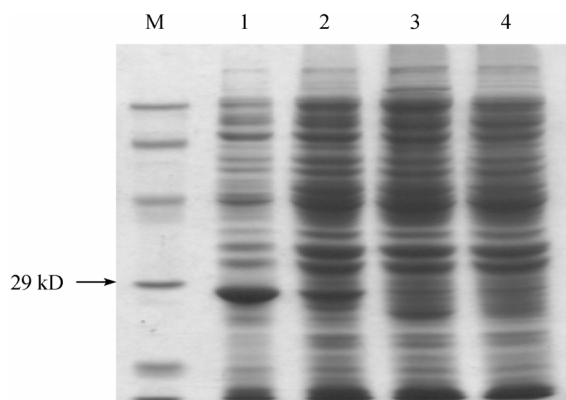


图 5 pET-28a-xyl696(BL21)诱导表达的 SDS-PAGE
Fig.5 SDS-PAGE of the expressed xylanase proteins in BL21

M: 低分子量蛋白标准; 1: IPTG 诱导后 pET-28a-xyl696(BL21)细胞裂解液沉淀; 2: IPTG 诱导后 pET-28a-xyl696(BL21)细胞裂解液上清; 3: 无 IPTG 诱导的 pET-28a-xyl696(BL21) 细胞裂解液; 4: IPTG 诱导的 pET-28a(BL21) 细胞裂解液

M: Protein molecular marker; 1: Pellet of the lysate of pET-28a-xyl696 (BL21) induced by IPTG; 2: Supernatant of the lysate of pET-28a-xyl696 (BL21) induced by IPTG; 3: Lysate of pET-28a-xyl696 (BL21) without IPTG induction; 4: Lysate of pET-28a (BL21) induced by IPTG

取细胞裂解液上清经 Ni-NTA 亲和层析纯化, 在 30 mmol/L 咪唑洗脱后, 获得了少量的可溶性重组蛋白。通过 DNS 法测得重组蛋白的木聚糖酶活为 251.1 IU/mL。

3 讨论

目前研究报道的产木聚糖酶的链霉菌主要有卷须链霉菌、白色链霉菌及链霉菌 Z18 等, 都分离至陆地环境^[10-12]。本文从海岸红树林放线菌中筛选到一株链霉菌 zxy19, 其摇瓶发酵培养所产木聚糖酶活力优于已报道的链霉菌木聚糖酶的产酶水平。对该菌株的 16S rDNA 鉴定可初步判定其为链霉菌属的一个新种, 显示了从兼备海陆环境特征的红树林生境中发现产木聚糖酶资源菌株的潜力。

对该酶基因的克隆和异源表达研究显示, 诱导后细胞裂解物上清中存在少量具有生物学活性的重组木聚糖酶蛋白。若利用大肠杆菌表达系统, 则需对包涵体进行溶解、变性及复性研究。考虑到该木聚糖

酶来源于基因组 GC 含量较高的链霉菌(该木聚糖酶 GC 含量是 66%), 在后续的实验中, 将通过 GC 碱基特异替换技术^[13]、基因组改组技术或更换其他异源表达宿主等途径, 优化重组酶的酶学特性, 提高重组酶的表达量, 使其满足工业生产的需要。

参考文献

- [1] Beg QK, Kapoor L, Mahajan L. Microbial xylanases and their industrial application: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**(3): 326-338.
- [2] 刘伟丰, 毛爱军, 祝令香, 等. 耐碱性木聚糖酶基因在短小芽孢杆菌中高效分泌表达的研究. *微生物学报*, 2004, **44**(4): 487-490.
- [3] Jiang ZQ, Deng W, Zhu YP, *et al.* The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **27**: 207-213.
- [4] Wu SJ, Liu B, Zhang XB, *et al.* Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **72**(6): 1210-1216.
- [5] 龙 寒, 向 伟, 林 鹏, 等. 红树林区微生物资源. *生态学杂志*, 2005, **24**(6): 696-702.
- [6] Yuan KP, Vrijmoed LL, Feng MG. Survey of coastal mangrove fungi for xylanase production and optimized culture and assay conditions. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, **45**(1): 91-96.
- [7] 曾 莹, 钟晓凌, 夏服宝. 木聚糖酶活力测定条件研究. *生物技术*, 2003, **13**(5): 21-22.
- [8] Henikoff S, Henikoff JG, Alford WJ, *et al.* Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene*, 1995, **163**(2): 17-26.
- [9] Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, *et al.* Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 1998, **26**(7): 1628-1635.
- [10] 李里特, 丁长河, 江正强, 等. 一株产木聚糖酶链霉菌的鉴定及发酵产酶. *微生物学通报*, 2003, **30**(6): 59-64.
- [11] 孙晓霞, 谢响明, 吴玉英, 等. 白色链霉菌产木聚糖酶规律及其耐热耐碱性的初步研究. *北京林业大学学报*, 2005, **27**(3): 72-75.
- [12] 翟 倩, 江正强, 闫巧娟, 等. 链霉菌 Z18 产木聚糖酶的发酵条件. *中国农业大学学报*, 2007, **12**(3): 75-80.
- [13] James GH, Jeremy RG, Sanna M, *et al.* Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(18): 9821-9826.