微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
研究报告

MAY 20, 2012, 39(5): 696–701
© 2012 by Institute of Microbiology, CAS

斜卧青霉 L-06 内切葡聚糖酶Ⅰ基因的克隆与表达

刘韫滔[1] 韩学凤[1] 罗泽宇[1] 邱玉峰[1] 龙敏南[2] 胡忠[1*]

(1. 汕头大学 生物学系 广东 汕头 515063)
(2. 厦门大学 能源研究院 福建 厦门 361005)

摘 要: 【目的】克隆斜卧青霉 L-06 的内切葡聚糖酶Ⅰ基因(*eg*I), 并实现其在大肠杆菌内的高效表达。【方法】利用 RT-PCR 技术克隆了斜卧青霉 L-06 的内切葡聚糖酶Ⅰ基因(*eg*I), 并将 *eg*I 基因克隆到原核表达载体中, 构建了重组质粒 pET32a-*eg*I。【结果】转化至大肠埃希菌 Rosetta(DE3), 经 IPTG 诱导重组蛋白表达, SDS-PAGE 检测结果表明: 重组表达产物的相对分子质量约为 80 kD, 与预期相符。重组表达的菌悬液, 经破碎离心, 取其上清液, 进行纤维素酶活性染色, 获得了活性条带。DNS 法测得内切酶活力为 2.56 IU/mL。【结论】构建了斜卧青霉 L-06 内切葡聚糖酶Ⅰ的原核表达系统。

关键词: 斜卧青霉 L-06, 内切葡聚糖酶Ⅰ, 克隆, 原核表达

Cloning and expression of *eg*I gene from *Penicillium decumbens* L-06

LIU Yun-Tao[1] HAN Xue-Feng[1] LUO Ze-Yu[1] QIU Yu-Feng[1]
LONG Min-Nan[2] HU Zhong[1*]

(1. *Department of Biology, Shantou University, Shantou, Guangdong* 515063, *China*)
(2. *The School of Energy Research, Xiamen University, Xiamen, Fujian* 361005, *China*)

Abstract: [Objective] The research focus on cloning endoglucanase I (*eg*I) gene from *Penicillium decumbens* L-06 and expressing in *Escherichia coli* with high efficiency. **[Methods]** *eg*I gene was cloned from *Penicillium decumbens* L-06 by RT-PCR method. Recombinant plasmid pET32a-*eg*I was constructed and was transformed into *Escherichia coli* rosetta(DE3).

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41076106); 广东省自然科学基金项目(No. S2011030005257); 广东省科技计划项目(No. 2009B090300346); 广东高校科技创新重点项目(No. CXZD1124)
***通讯作者:** Tel: 86-754-82902081; ✉: hzh@stu.edu.cn
收稿日期: 2012-02-21; **接受日期:** 2012-03-08

Recombinant protein with His-tag was expressed in *E. coli* rosetta(DE3) after induction with IPTG and then was purified with the Ni-NTA affinity chromatography. **[Results]** As expected, the relative molecular mass was approximately 80kD after analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Hydrolysis activity of recombinant protein was assayed by cellulase activity staining and DNS method (2.56 IU/mL). **[Conclusion]** The results achieve the purpose as constructing prokaryotic expression system and expressing *eg*I gene.

Keywords: *Penicillium decumbens* L-06, Endoglucanase I, Cloning, Prokaryotic expression

纤维素是生物圈里最丰富的有机物质[1], 其不断通过光合作用得以补充[2]。全世界通过光合作用产生的植物纤维质每年高达 2 000 亿 t, 其中 89%目前未被人类利用, 只有 11%用作饲草、造纸和建筑原料[3]。事实上所有的纤维素材料均可转化为具有商业价值的产品, 例如: 乙醇、乙酸、单细胞蛋白等[4]。纤维素的生物转化近些年受到了极大的重视, 大规模纤维素生物转化工艺的发展, 将有效解决或减轻食品和动物饲料的不足、废弃物处理、矿石燃料依赖性等一系列问题[2]。

利用微生物产生的纤维素酶来分解和转化纤维素则是纤维素利用的有效途径。一个完整的纤维素酶系, 通常由作用方式不同而能相互协同催化水解纤维素的三类酶组成: 内切葡聚糖酶(EC 3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(EC 3.2.1.91)、β-葡萄糖苷酶[5−6]。在前期的研究过程中, 本课题组分离和筛选出一株高效纤维素降解菌株——斜卧青霉 L-06, GenBank 登录号为 EU273880, 它不但有较完整的纤维素酶系, 并且对酸碱均具有较强的耐受性[7−9]。到目前为止, 至少有 400 余种纤维素酶基因得到克隆表达并且被测序。单是瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*), 就有 30 多个基因被报道, 包括内切葡聚糖酶和外切纤维二糖水解酶基因被克隆和测序, 并在大肠杆菌或者酵母菌中获得表达[3,10−12]。利用基因工程的手段, 构建合适的工程菌, 是实现酶制剂工业应用的有效途径。因此, 为了更好地利用斜卧青霉 L-06, 以实现其工业化应用, 本研究对其纤维素酶基因进行克隆, 并实现了原核表达。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pET-32a(+)、大肠杆菌 DH5α 和 Rosetta(DE3)、斜卧青霉(*Penicillium decumbens*) L-06 均为本实验室保藏。

1.2 培养基[7]

1.2.1 斜面培养基: 马铃薯琼脂(PDA)培养基: 马铃薯 200 g 切块成 1 cm 左右, 在 1 000 mL 蒸馏水中煮沸, 纱布过滤取汁。滤汁中加入葡萄糖 10 g, 琼脂约 15 g, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后备用。

1.2.2 斜卧青霉基础培养基: 基础液体发酵产酶培养基: 加浓的 Mandels 营养盐溶液[13−14]中加入 1%麸皮, 0.1%蛋白胨, 50 mL 培养基装入 300 mL 三角瓶, 灭菌后备用。

1.2.3 纤维素酶诱导培养基: Mandels 营养盐液含 0.1%羧甲基纤维素钠, 灭菌后备用。

1.2.4 LB 培养基: 配制每升培养基, 在 950 mL 蒸馏水中加入蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 加 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.0, 用蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计: 参考 GenBank 数据库中已报道的 *P. decumbens* (GenBank 登录号 EU339127.1)的 *eg*I 基因, 利用软件 Primer premier 5.0 设计引物, 并由赛百盛公司合成:

Forward: 5′-CTAGGGATCCATGTCTTTCACAAGGAGAC-3′;

Reverse: 5′-CTAGAAGCTTTCACAGGCAC

TGAGAGTAG-3′。

为了便于与载体连接, 在引物中加入酶识别位点, EGⅠ的引物中加入了 *Bam*HⅠ和 *Hin*dⅢ位点(见引物中的划线部分)。

1.3.2 斜卧青霉 L-06 的复苏和保藏: 从真空冻干菌管中用接种环刮下少量细胞接于 PDA 液体培养基, 30 °C 培养 24 h, 用接种环从培养液中蘸取少量菌液画线于 PDA 斜面, 30 °C 静置培养到长出孢子, 于 4 °C 保存。

1.3.3 斜卧青霉 L-06 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成: (1) 总 RNA 的提取方法参照 Omega 公司生产的 RNA-Solv Reagent 试剂盒的说明; (2) cDNA 的合成按照南京凯基生物科技发展有限公司公司生产的 RT-PCR 试剂盒说明书操作。

1.3.4 *eg*I 基因的诱导表达: 将阳性重组子接种到新鲜液体 LB 培养基中, 待细菌生长到对数生长期后(OD_{600}=0.6−0.8), 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导目的基因表达, 诱导 3 h 后, 取适量菌液做诱导表达效果的检测。实验以未加 IPTG 诱导为对照。

1.3.5 纤维素酶活性检测: 参见 Manchenko 和 Blank 的相关文献报道[9,15−16]。

2 结果

2.1 纤维素酶基因的 PCR 扩增及测序

利用各纤维素酶的引物, 以菌株 L-06 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 电泳结果显示扩增片段约为 1.5 kb, 与预期相符(图 1)。

测序结果表明, 该片段与数据库的 *P. decumbens* (GenBank 登录号 EU339127.1)核酸序列有着 99%的相似性, 由此可以判断 PCR 扩增产物确实是 *eg*I 基因。

2.2 纤维素酶基因 *eg*I 的表达

2.2.1 重组表达载体构建: 经过相应酶切的 *eg*I 基因片段与 pET-32a(+)载体连接, 转化 *E. coli* DH5α 宿主, 挑取合适的克隆子, 送深圳华大基因研究院进行基因测序, 测序结果表明纤维素酶基因正确地与表达载体 pET-32a(+)连接, 并得到了重组表达载体 pET32a-*eg*I。

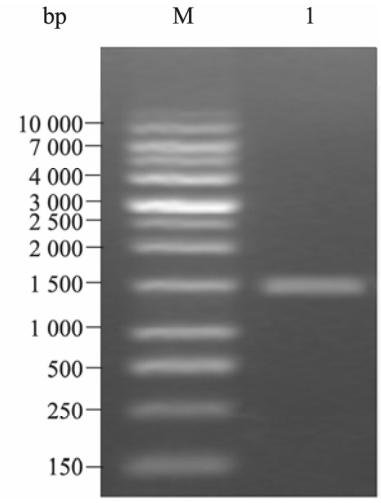

图 1 *eg*I 基因的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis result of *eg*I PCR

Note: M: DNA marker; 1: PCR product of *eg*I.

2.2.2 *eg*I 基因的诱导表达: 从核酸序列推断, 所克隆到的纤维素酶基因编码的纤维素酶分子量约为 50 kD, 加上载体中融合到目的蛋白部分大约 30 kD。因此理论上该重组蛋白分子量大约 80 kD。结果如预期, 无论是在菌体总蛋白还是在菌体破碎后的上清和沉淀中都有预期的目的蛋白(图 2)。

通过 Western blotting 对以 pET32-*eg*I 为载体的表达系统的重组蛋白进行验证, 获得目的条带(图 3), 再次说明表达的重组蛋白是纤维素酶 *eg*I。

2.2.3 重组表达产物的纤维素酶活性: 将重组菌经超声破碎后的上清液进行蛋白电泳羧甲基纤维素凝胶活性染色后, 在凝胶上出现活性带(图 4)。但活性明显低于对照(L-06 发酵液)。其原因可能是大部分重组蛋白表达生成包涵体的缘故, 上清液仅存在少量可溶性重组蛋白。并且由图 2 可知, 重组菌培养液中没有重组蛋白的表达。

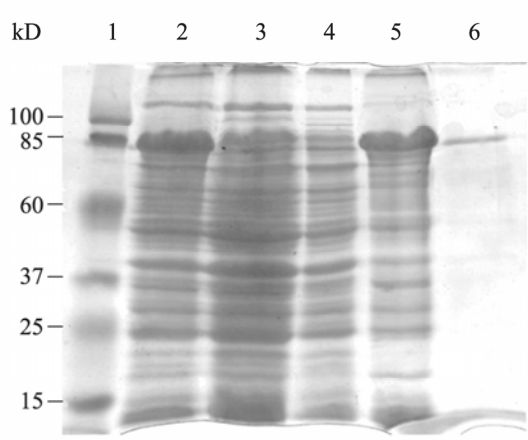

图 2 IPTG 诱导蛋白表达的结果

Fig. 2 The result of induction and expression by IPTG

Note: 1: Protein marker; 2: Total bacteria (Induced); 3: Control (without IPTG); 4: Supernatant (induced); 5: Precipitate (induced); 6: The recombinant protein purified by Ni-NTA affinity chromatography column.

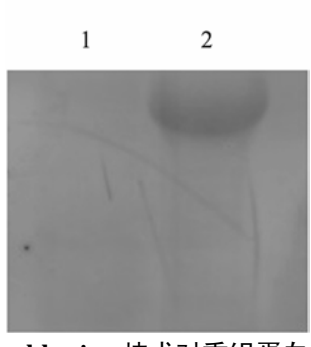

图 3 Western blotting 技术对重组蛋白的验证

Fig. 3 Western blotting technology were used to identify the the recombinant protein

Note: 1: Control; 2: Supernatant (induced).

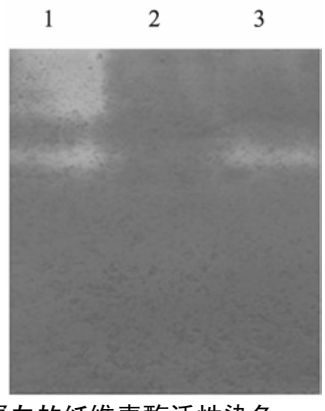

图 4 重组蛋白的纤维素酶活性染色

Fig. 4 The recombinant protein using cellulase activity staining

Note: 1: Control; 2: Precipitate (induced); 3: Supernatant (induced).

重组菌经超声破碎后, 利用 DNS 法测得其上清液的内切酶活力为 2.56 IU/mL (酶活测定方法: 取经适量稀释的粗酶液 0.5 mL, 加入含 1% CMC_Na 的醋酸缓冲液(pH 4.8, 0.1 mol/L) 1.5 mL, 经 50 °C 恒温水浴 30 min 后, 立即按 DNS 法测定还原糖: 加入 2 mL DNS 显色液, 沸水浴中显色 10 min 后。快速冷却终止反应, 540 nm 处测定 *OD* 值, 对比标准曲线计算酶活)。在上述检测条件下, 1 mL 粗酶液每分钟产生 1 μmol 葡萄糖定义为一个酶活单位。

3 讨论

由于内切葡聚糖酶 *eg*I 在造纸和纺织的广泛应用, 因此选取 *eg*I 作为原核表达的目的基因。

本文通过 RT-PCR 方法从菌株斜卧青霉 L-06 克隆了纤维素酶基因 *eg*I, 并测得了其核酸序列(GenBank 登录号 FJ393561)。序列分析表明 *eg*I 基因大小为 1 434 bp, 编码具有 455 个氨基酸分子的成熟纤维素酶, 分子量大约为 50 kD。

为了获取高产量的重组纤维素酶, 并进一步研究其酶学性质、功能与结构。本文将克隆到的纤维素酶基因与表达载体 pET-32a(+)构建重组表达载体, 并转化 *E. coli* Rosetta(DE3)得到了重组工程菌; 初步探索了诱导纤维素酶基因表达的条件, 发现用 0.1−1.5 mmol/L 的 IPTG 诱导重组菌 3 h 后检测到目的蛋白的表达水平差异较大(结果未列出), 还需要后续实验进一步优化诱导表达的条件(不同 IPTG 浓度、诱导时间、低温诱导等), 甚至需要考虑更换表达载体。

蛋白电泳凝胶的活性染色即对蛋白质进行非变性电泳, 蛋白质在电泳过程中是处于非变性的, 电泳时蛋白的迁移率取决于蛋白的电荷和分子量, 非变性电泳在完成电泳后, 可以进行蛋白质活性测定。此项技术在纤维素酶研究中常被用来检测蛋白凝胶中纤维素酶条带存在的情况, 于

仁涛[17]还首次将二维电泳结合 MALDI-TOF MS 技术应用于纤维素酶活性染色中, 对烟曲霉胞外纤维素酶进行了分析。本研究将诱导后的重组菌经超声破碎后的上清液进行蛋白电泳羧甲基纤维素凝胶活性染色后, 获得了活性条带, 证明具有纤维素酶活性; 并通过 DNS 法检测到内切酶活性为 2.56 IU/mL。虽然相较于原始菌株 L-06, 其活性并不突出, 但与近期报道的原核重组表达的内切酶活性较为接近[18−19]; 而与近期报道的内切酶真核表达的活性相比, 内切酶原核表达的活性普遍低于真核表达水平[11,20]。这说明该表达系统还有很多需要优化的必要, 另外对包涵体复性的操作也可以做些改进。本研究不但克隆得到了斜卧青霉 L-06 的内切纤维素酶基因 *egI*, 并实现了其原核表达, 获得了较为理想的活性, 同时为该基因的工业应用建立了理论基础。

参 考 文 献

[1] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 45.

[2] Adsul MG, Bastawde KB, Varma AJ, et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(7): 1467−1473.

[3] 陈洪章. 纤维素生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[4] Lawford HG, Rousseau JD. Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 106(1/3): 457−469.

[5] Kansoh AL, Essam SA, Zeinat AN. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesie*[J]. Polymer Degradation and Stability, 1999, 63(2): 273−278.

[6] 高培基, 许平. 资源环境微生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 15−109.

[7] Liu YT, Xuan SX, Long CN, et al. Screening, identifying of cellulose-decomposing strain L-06 and its enzyme-producing conditions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(6): 1112−1116.

[8] Long CN, Ou YQ, Guo P, et al. Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06[J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(3): 517−523.

[9] Liu YT, Luo ZY, Long CN, et al. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran[J]. New Biotechnology, 2011, 28(6): 733−737.

[10] 邱思鑫, 范晓静, 胡方平, 等. 内生解淀粉芽胞杆菌 β-1,3-1,4-葡聚糖酶基因(bglS)的克隆与表达及酶学特性分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1173−1181.

[11] Wonganu B, Pootanakit K, Boonyapakron K, et al. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 58(1): 78−86.

[12] 吴振芳, 陈惠, 曾民, 等. 内切葡聚糖酶基因在毕赤酵母中高效表达研究[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 529−535.

[13] 曲音波, 高培基, 王祖农. 青霉的纤维素酶抗降解物阻遏突变株的选育[J]. 菌物学报, 1984, 3(4): 238−242.

[14] Jørgensen H, Mørkeberg A, Krogh KBR, et al. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(1): 42−48.

[15] Manchenko GP. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels[M]. Boca Raton: CRC Press Inc, 2003: 355−356.

[16] Blank A, Sugiyama RH, Dekker CA. Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis:

use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels[J]. Analytical Biochemistry, 1982, 120(2): 267−275.

[17] 于仁涛. 从天然生境中直接分离新纤维素酶组分方法的探讨[D]. 山东: 山东大学博士学位论文, 2007: 6.

[18] Zhang F, Chen JJ, Ren WZ, et al. Cloning, expression and characterization of an alkaline thermostable GH9 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans* YIM 90462T[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(21): 10143−10146.

[19] Ding SJ, Ge W, Buswell JA. Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(5): 621−626.

[20] Li JF, Tang CD, Shi HL, et al. Cloning and optimized expression of a neutral endoglucanase gene (*ncel*5A) from *Volvariella volvacea* WX32 in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(5): 537−540.

(上接 p.695)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如：DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词：应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn