

极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达^{*}

薛业敏 毛忠贵 邵蔚蓝

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要 海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 为嗜极端高温的厌氧细菌,其产生的极耐热性木聚糖酶 B 具有非常可观的工业应用前景。但编码该酶的基因 *xynB* 在大肠杆菌中的表达较困难。文中利用 PCR 技术将 *xynB* 克隆至原核表达载体 pET-20b,并与组氨酸标签进行融合构建重组质粒 pET-20-*xynB*。研究发现 pET-20-*xynB* 在稀有密码子 AGA,AGG 和 AUA 得到加强的大肠杆菌宿主菌株 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 中,木聚糖酶基因的表达水平远远高于在其他菌株中的表达。结合对重组菌的诱导条件的优化,使得重组蛋白表达量达到 11.5%,比酶活达到 25.69 U/mg,比常规基因工程菌株提高 12.5 倍。

关键词 木聚糖酶基因 高效表达 诱导条件优化

木聚糖是阔叶植物和禾本科植物细胞壁的主要成分之一,广泛存在于水果、谷物以及秸秆中。木聚糖酶是水解木聚糖主干链内部的 β -1,4 糖苷键产生低聚木糖或带有侧枝的寡聚糖。由于木聚糖酶在食品、饲料、纺织、能源工业,特别是在纸浆和造纸工业中有着非常广阔的应用前景,对于木聚糖酶及其基因的研究引起了国内外科学工作者的关注^[1-4]。但是虽然已有上百个木聚糖酶被提纯或克隆,木聚糖酶的产量并不高。即使使用了基因工程菌,目前世界上能够提供木聚糖酶的生物公司仍很少^[5]。至今还未有热稳定性木聚糖酶的基因实现高水平的超量表达。

热袍菌属的海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是嗜极端高温的厌氧细菌,生长在 55~90℃ 海底火山口处,能够分解利用淀粉、纤维素、半纤维素等多聚糖,可以产生耐高温和热稳定性的淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶^[6,7],该菌所产的木聚糖酶最适催化温度高达 105℃^[7-9],这是造纸工业用酶所需的理想特性。选择 *T. maritima* 作为材料,采用基因手段对木聚糖酶基因进行高效表

达,可以获得从自然界难以得到的大量木聚糖酶。目前,已有研究者用这个木聚糖酶基因 *xynB* 构建过基因工程菌,但其表达水平很低^[8,9]。本研究采用带有 T7 强启动子的 pET-20b 表达载体,针对 *T. maritima* 的木聚糖酶基因序列中密码子 AGC(Arg),AGA(Arg),ATA(Ile)使用频率高的特点,选择 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 为表达宿主,对 *xynB* 基因进行高效表达,并对重组菌的诱导条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

T. maritima 购自美国菌种收藏中心,编号为 ATCC43589,大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 JM109(DE3)购于 Promega (Wisconsin, WI, USA),质粒 pET-20b 和 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 购于 Novagen 公司,它们的遗传特性见表 1。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Xho*I, *Nde*I, T4 DNA 连接酶和 PyrobestDNA 聚合酶 购自华美生

第一作者:博士研究生,副教授。

^{*} 国家轻工总局 211 专项基金资助项目

收稿时间 2003-03-12 改回时间 2003-08-28

表 1 菌株与质粒

菌株与质粒	基 因 型	来 源
<i>E. coli</i> JM109	<i>RecA supE44 endA1 hsdR17 gyrA96relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacI</i> Δ M15]	Promega
<i>E. coli</i> JM109 (DE3)	<i>RecA supE44 endA1 hsdR17 gyrA96relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacI</i> Δ M15] With DE3 λ prophage carrying the T ₇ RNA polymerase gene.	Promega
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3) RIL	<i>E. coli B F-ompT hsdS (r_B-m_B^r) dcm + Tet^r gal λ (DE3) endA</i>	Stratagene
pET-20b	Hte [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>] The expression vector with a strong T7 promoter upstream of the MCS	Novagen

物工程公司, 博彩生物公司和宝生物工程公司, Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司; 燕麦木聚糖和异丙基硫代半乳糖苷 IPTG 购自 Sigma 公司; 质粒抽提 QI-Aprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QI-Aquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.1.3 PCR 引物

基因扩增引物按实验要求设计: N 端引物 (5'-GGAATTCATATGAAAATA TTACCTTCTGTGTTGAT-3') 内有一个 *Nde*I 酶切位点, 该酶切位点包含起始密码子 (ATG); C 端引物 (5'-CCC TC-GAGTCTTTCTTCTATCTTTTTTCTCCAG-3') 内有一个 *Xho*I 酶切位点; 由上海生工生物工程技术服务公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 培养基和培养条件

大肠杆菌在 LB 培养基中培养, 电转化用 SOC 培养基, 转化子的选择用含有氨苄青霉素 (Amp) 抗性 (100 μ g/mL) 的 LB 培养基, 或氯霉素 (Cam) 抗性 (60 μ g/mL) 配方见参考文献 [10]。

培养 *T. maritima* 所用的培养基配方为 (1 L): 可溶性淀粉 0.5 g, 树脂天青 (resazurin) 1 mg, NaCl 28 g, MgSO₄·7H₂O 3.5 g, MgCl₂·6H₂O 2.7 g, KCl 0.33 g, NH₄Cl 0.25 g, CaCl₂ 0.0855 g, 酵母膏 0.1 g, 微量元素 (配方见文献^[6]) 15 mL, pH 7.0。培养基经加热驱氧、充氮、冷却后加还原剂 Na₂S

0.5 g/L, 并分装于预先充氮的 100 mL 血清瓶中, 加盖密封并灭菌。

T. maritima 的接种与培养: 用注射器按 0.5% 接种量接种于预先还原的培养基中, 80℃ 静置培养 8 h。菌种于室温厌氧条件下可保存半年。

1.2.2 基因操作

基因组 DNA 提取、DNA 的内切酶水解和连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备, 以及基因的高效电转化方法均参照配方见文献 [10]。质粒的制备、从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.2.3 重组表达载体的构建

用以上合成的一对引物, 以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板, 按材料与方法中介绍的条件进行 PCR 扩增。PCR 扩增参数: 先在 95℃ 变性 5 min, 加 Pyrobest DNA 聚合酶; 然后 94℃ 变性 50 s, 54℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 3 min, 循环 35 次后 72℃ 保温 10 min。PCR 扩增结束后, 电泳检测并将 PCR 产物从胶回收后, 用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切并经纯化, 以适当比例与同样双酶切的 pET-20b-*xynB* 大片段混合并连接, 转化大肠杆菌 JM109 构建重组原核表达载体 pET-20b-*xynB*。

1.2.4 *xynB* 基因在原核表达载体中的表达和诱导表达条件的优化

用重组质粒 pET-20b-*xynB* 转化宿主菌株 *E. coli* JM109 (DE3) 或 BL21-CodonPlus

(DE3)-RIL,挑取单菌落接入含有 Amp 或 Cam 的 LB 培养液中,37℃ 培养过夜,取 500 μ L 过夜培养液接入 100 mL 含 Amp 或 Cam 的 LB 培养液中,37℃ 振荡培养至 OD_{600} 达 0.6~0.8,吸出 1 mL 未诱导的培养物,剩余培养物中加入 IPTG 至浓度 1 mmol/L,并继续培养,培养结束后,取 1 mL 菌液,以 1200 r/min 离心 1 min 收集菌体,用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA pH 7.6) 洗涤细胞 2 次,并用 300 μ L 同样缓冲液重悬细胞,加溶菌酶至 2 mg/mL 25℃ 1 h,12000 r/min 离心 30 min,取上清测酶活和蛋白质浓度。

(1) 诱导剂浓度的确定:将重组菌培养过夜培养物以 1% 的接种量接入含有 Amp 和 Cam 的 LB 培养液中,分别加入 IPTG 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 后,继续诱导 6 h 检测酶活力。

(2) 诱导剂添加时间的确定:将重组菌分别培养至 OD_{600} 为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 时,加入 IPTG (终浓度为 1.0 mmol/L) 持续诱导 6 h。取 1 mL 样品按上述方法分析酶活。

(3) 诱导时间的确定:将重组菌培养至 OD_{600} 达 0.8,加入 IPTG 至浓度 0.8 mmol/L,继续进行诱导培养,在不同的诱导时间下取 1 mL 样品,用上述方法分析酶活。

1.2.5 木聚糖酶活测定^[11]

木聚糖酶活性的测定是 0.5% 燕麦木聚糖为底物,利用对羟基苯甲酸酐肼与水解反应产生的还原糖的显色反应进行比色,具体方法是,在 90 μ L 50 mmol/L pH 5.8 的邻苯二甲酸氢钾-咪唑缓冲液中加 0.1 mL 0.5% 燕麦木聚糖,然后添加 10 μ L 酶液在 95℃ 下保温 10 min,最后加入 NaOH/对羟基苯甲酸酐肼终止反应。其混合物在沸水浴中加热 10 min 后,在冰水浴中冷却,用分光光度计在 410 nm 下测其吸收值。木聚糖酶活性单位定义为每分钟催化产生 1 μ mol 木糖的酶量。以木糖作标准曲线。

1.2.6 蛋白质浓度的测定

用 Bradford 法测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白 (Sigma Inc.) 作为标准蛋白^[12]。

2 结果与讨论

2.1 原核高效表达质粒的构建

欲达到外源基因的高效表达需要选择一个好的大肠杆菌表达系统。迄今为止,已经发展了多种大肠杆菌表达系统,如 Lac 和 Tac 表达, P_L 和 P_R 表达系统以及 T_7 表达系统等。由于 T_7 启动子专一性被 T_7 RNA 聚合酶识别而不被大肠杆菌 RNA 聚合酶识别,以及 T_7 RNA 聚合酶的专一性及合成 mRNA 的速度比大肠杆菌 RNA 聚合酶快得多,并可以转录某些不能被大肠杆菌 RNA 聚合酶转录的序列,使得 T_7 表达系统成为目前所有表达系统中表达目的基因水平最高的。 pET 系列载体是目前最有效的大肠杆菌表达载体,它是利用大肠杆菌 T_7 噬菌体的转录体系为元件构建的高效表达载体。

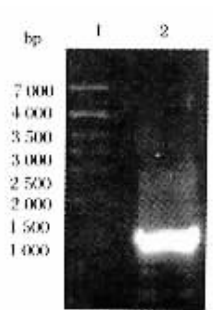


图 1 木聚糖基因 *xynB* 的 PCR 产物电泳图

1-DNA 分子质量标准;2-*xynB* 的 PCR 产物

采用 PCR 技术从 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 扩增 1 kb 的 *xynB* 基因片段 (图 1),克隆至表达质粒 pET -20b 中,构建了木聚糖酶基因 *xynB* 的高效表达质粒 pET -20b-*xynB* (图 2),其特点是 T_7 启动子控制下的木聚糖酶基因与组氨酸标签融合,便于重组蛋白的纯化。

2.2 重组质粒及转化子的鉴定分析

JM109 中因不含 T_7 RNA 聚合酶基因,而它自身的 RNA 聚合酶不能从 T_7 启动子

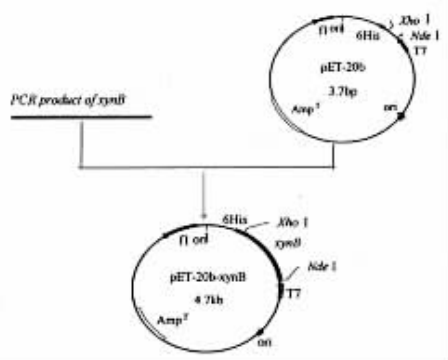


图 2 重组质粒 pET-20b-*xynB* 构建图
进行转录, pET 载体中的多克隆位点也位于细菌 RNA 聚合酶的弱转录活性区域,将重组质粒先转入此类宿主中,外源基因不能转录,因而保证了质粒的稳定性,并可获得相当高的转化率和大量的重组质粒。

将重组表达质粒 pET-20b-*xynB* 用 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切并经纯化,以适当比例与同样双酶切的 pET-20b 混合并连接,转化大肠杆菌 JM109 后,在 Amp 抗性平板上得到转化子。然后用限制性内切酶对重组质粒进行鉴定,重组质粒能被 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切下一条与 PCR 扩增片段大小一致的片段(如图 3)。因此,初步证实 *xynB* 基因已插入 pET-20b 载体中。

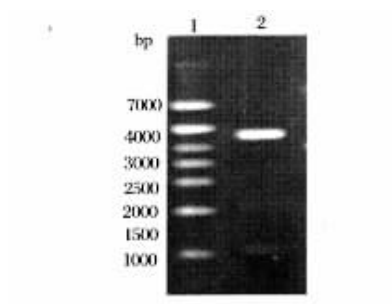


图 3 质粒 pET-20b-*xynB* 限制性内切酶分析
1—DNA 分子量标准;

2—pET-20b-*xynB* *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切

2.3 木聚糖酶在大肠杆菌中的高效表达

大肠杆菌宿主菌 JM109(DE3)是噬菌体 DE3 的溶源菌,其在噬菌体 DE3 中的 *int* 基因中插入了一段含有 *LacI* *lacUV5* 启动子和 T7RNA 聚合酶基因的 DNA 片段,因此,

JM109(DE3)IPTG 成为诱导外源蛋白表达的诱导物。

将重组质粒 pET-20b-*xynB* 转入常规大肠杆菌 JM109(DE3),IPTG 诱导表达后,收集菌体细胞进行全细胞 SDS-PAGE 电泳(分离胶的浓度为 10%),电泳图谱见图 4。菌细胞破碎后的酶活检测显示(见表 2),木聚糖酶基因在大肠杆菌 JM109(DE3)中得到活性表达但表达量并不高,密度扫描计算可知,重组菌株 JM109(DE3) pET-20b-*xynB* 目标蛋白 XynB 的表达量占全菌蛋白的 3.0%,这表明采用强启动子并没有实现木聚糖酶基因的高效表达。

针对以上情况,对 Genbank 中海栖热孢菌的木聚糖酶基因序列进行分析,发现该基因有 1044 个碱基,编码 348 个氨基酸,其中编码 15 个精氨酸的密码子全都是大肠杆菌使用频率为 1.3%~2.0% 的 AGA 和 AGG,而在编码 28 个异亮氨酸密码子中约 40% 是使用频率为 3.8% 的 AUA。这些稀有密码子的存在可能限制了 *T. maritima* 的 *xynB* 表达。

大肠杆菌宿主菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 是具有 T7RNA 聚合酶表达系统的蛋白质高效表达宿主 BL21(DE3)的衍生菌,是针对外源基因含有大量大肠杆菌使用的稀有密码子(如 AGA,AGG)和影响大肠杆菌产蛋白量的密码子 AUA,CUA,CCC 特点,使其带有大肠杆菌稀有 tRNA 基因额外拷贝,如 *argU* tRNA, *ileY* tRNA 和 *leuW* tRNA,以识别 AGA/AGG, AUA, CUA,使得一些因稀有密码子的存在而不能在大肠杆菌中高水平表达的基因实现高效表达。

本实验以重组质粒 pET-20b-*xynB* 转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, IPTG 诱导表达后,并以 pET-20b 为对照,收集菌体细胞进行全细胞蛋白电泳(分离胶的浓度为 10%),考马斯亮蓝染色的结果见图 3。从电泳图谱上可以看出,质粒 pET-20b-*xynB* 在大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-

RIL 中表达的电泳泳道中比对照明显多出一条分子质量大约为 43 ku 的蛋白表达带,表达量占总蛋白的 8.7%,木聚糖酶活性达 20.5 U/mg。由此可以推断,木聚糖

表 2 木聚糖酶酶活性检测

宿主菌	JM109(DE3)	BL21-CodonPlus(DE3)RIL
酶活力	1.95	20.5
/u·mg ⁻¹		

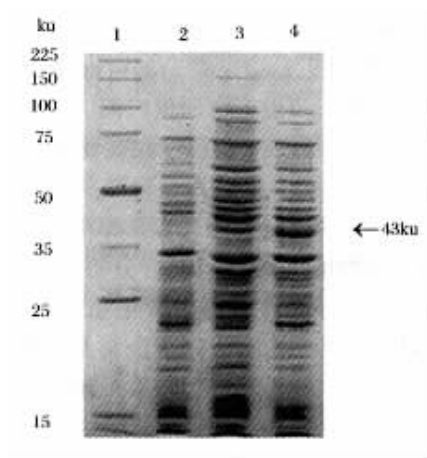


图 4 融合蛋白诱导表达的全细胞 SDS-PAGE 谱图

- 1- 蛋白质分子量标准;
- 2- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL/pET-20b;
- 3- *E. coli* JM109(DE3)pET-20b-xynB;
- 4- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL/pET-20-xynB

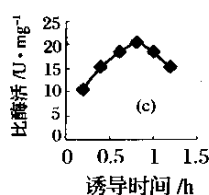
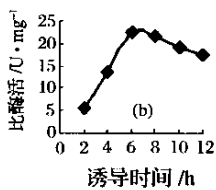
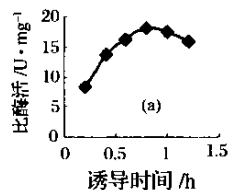


图 5 重组酶表达的最佳诱导条件

- a- IPTG 浓度对重组酶表达的影响; b- 诱导时机对重组酶表达的影响的影响;
- c- 诱导时间对重组酶表达的影响。

3 结 论

文中选用大肠杆菌的高效表达载体 pET-20b 作为接受载体,以大肠杆菌 JM109 (DE3)为表达宿主,使木聚糖酶基因得到表达,但表达水平并不理想。对 Genbank 中海栖热袍菌的木聚糖酶基因序列进行分析表

酶基因中的稀有密码子限制了其在大肠杆菌中的表达。

2.4 大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)RIL/ pET-20b-xynB 诱导条件的优化

由图 5 可见,在 IPTG 较低浓度时,重组酶的表达式随着 IPTG 浓度的增加而增加,当浓度为 0.8mmol/L 时产酶达最高(图 5, a)。超过此用量酶活有下降趋势,说明 IPTG 对菌体生长有一定毒性作用。在菌体生长的不同时期添加诱导剂都可诱导表达目的产物,其中 IPTG 在 OD_{600} 为 0.8 时加入诱导表达效果最好(图 5 c),诱导 6 h 后酶活力达最高(图 5 b)这说明诱导剂的添加时间对基因表达效果的影响很大,过早加入诱导剂,会因其毒性作用而不利于细胞生长,使酶的总体表达量降低,但过迟,细胞已成熟,体内蛋白酶的水解能力增强,有可能使酶活下降。

在以上最佳诱导条件下,再对重组菌 BL21-CodonPlus(DE3)RIL/pET-20b-xynB 进行诱导培养结果见图 6,重组蛋白的表达式占总蛋白提高到 11.5%,比酶活达到 25.69 U/mg,比常规基因工程菌株提高 12.5 倍。

明, *Thermotoga* 属的基因的密码子的偏好性与大肠杆菌有很大差异, *T. maritima* 的木聚糖酶基因中编码精氨酸的密码子全都是大肠杆菌稀有密码子 AGA 和 AGG,因此,选择大肠杆菌带有附加 *argU* tRNA, *ile Y* tRNA 和 *leu W* tRNA 基因的 BL21-Codon-Plus(DE3)RIL 作为表达宿主。实验结果表

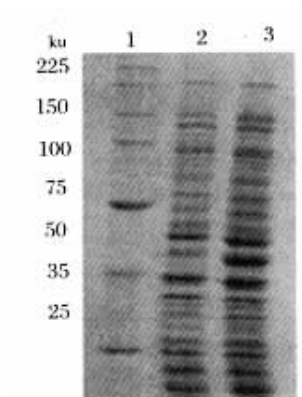


图 6 融合蛋白诱导表达的全细胞 SDS-PAGE 谱图

1—蛋白质分子质量标准；

2—*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL / pET-20b；

3—*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL / pET-20b-*xynB*

明,大肠杆菌宿主中稀有密码子 *tRNA* 拷贝数增加大大提高了 *xynB* 的表达水平。这也表明通过改变木聚糖酶基因稀有密码子为大肠杆菌的优势密码子将有望实现该基因在大肠杆菌中高水平超量表达,目前本实验室正在开展这方面的工作。

由于选用 T_7 强启动子转录完全依赖于 T_7 RNA 聚合酶,因此, T_7 RNA 聚合酶的转录调控模式就决定了表达系统的调控方式。在用噬菌体 DE3 的溶源菌作为表达载体的宿主菌时,调控方式为化学信号诱导型。因此,工程菌对重组蛋白的表达水平还受诱导条件的影响。本实验通过对重组菌 BL21-

CodonPlus(DE3)-RIL/pET-20b-*xynB* 诱导表达条件的优化,使重组菌比酶活达到 25.69U/mg。同时,由于选用了大肠杆菌带有组氨酸标记的表达载体 pET-20b 作为接受载体,这样表达产物一般融合 6 个组氨酸作为标签,可通过金属离子亲和层析柱纯化,简化操作以减少目的蛋白的损失。

参 考 文 献

- 1 Sunna A, Autranikian G. Critical Review in Biotechnology, 1997, 17(1): 39~67
- 2 Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 326~338
- 3 邵蔚蓝,薛业敏. 食品与生物技术, 2002, 21(1): 88~93
- 4 Jiang Z, Atsushi K, Mohammad M A et al. J Biosci Bioeng, 2001, 92: 423~428
- 5 刘相梅,祁蒙,曲音波. 生物工程进展, 2001, 21(2): 28~31
- 6 Rober H, Thomas A L, Helmut K et al. Arch Microbiol, 1986, 144: 324~333
- 7 Christoph W, Wolfgang L. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1810~1815
- 8 David J S, Liam C W, Rosalind A R et al. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 4110~4113
- 9 江正强,李里特,林清等. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 280~284
- 10 Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 11 Lever M. Anal Biochem, 1972, 47: 273
- 12 Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 5848~5853

Expression of Xylanase B Gene of *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli*

Xue Yemin Mao Zhonggui Shao Weilan

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)

ABSTRACT *Thermotoga maritima* is one of the few hyperthermophilic bacteria described to date. The xylanases found in *T. maritima* showed extremely high thermostability and considerable potential in industrial application. The gene of xylanase B from *T. maritima* ATCC 43589 was amplified by PCR, inserted into the plasmid pET-20b, and fused with the 6-His tag. The recombinant plasmids pET-20b-*xynB* were transformed to *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Rare codons for arginine (AGA/AGG) and isoleucine (AUA) affect the expression of *xynB* gene in *E. coli*. It was found that the activities of recombinant xylanase was 12.5 times higher in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL than that in conventional *E. coli* host strains under optimized induction conditions.

Key words Xylanase B, gene expression, optimum induction