

极耐热内切葡聚糖酶 *Cel* 12B 的高效表达

李相前^{1,2} 邵蔚蓝^{1,3}

1(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

2(淮阴工学院, 淮安, 223001) 3(南京师范大学生命科学院, 南京, 210097)

摘要 海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是嗜极端高温的厌氧细菌, 其产生的极耐热葡聚糖酶具有很好的热稳定性和潜在的可观工业用途。但嗜高温菌基因在大肠杆菌中表达水平较低, *T. m* 内切葡聚糖酶 *Cel* 12B 基因带有信号肽, 应用在线预测分析, 通过 PCR 方法分别克隆 *Cel* 12B 完整基因和不带信号肽基因至 pET-20b 载体, 构建重组质粒 pET-20b-*Cel* 12B 和 pET-20b-*Cel* 12B-WS, 转化至大肠杆菌 JM109DE3 诱导表达后, 分析酶活, 结果表明去除信号肽重组菌单位酶活是未去除信号肽重组菌 11 倍多。

关键词 内切葡聚糖酶, 海栖热袍菌, 信号肽, 表达

纤维素是自然界中分布最广, 含量最多的一种结构多糖, 又是自然界中数量最大的可再生资源, 纤维素的利用与转化对于解决目前世界能源危机, 粮食短缺, 环境污染等问题具有十分重要的意义^[1,2]。

纤维素酶是能水解纤维素的一类酶的总称, 主要包括 3 种成分, 分别为内切 β -1, 4-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4, EG)、纤维二糖水解酶 (EC 3.2.1.91, CBH) 和 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21, BGL)。前 2 种酶主要切割纤维素大分子成小片段, 第 3 种酶是糖化的关键性限速因子, 这 3 种酶必须协同作用才能完成纤维素的降解^[3]。

目前有 100 多个纤维素酶基因在大肠杆菌中得到克隆和表达^[4], 在酶的生物学、动力学性质中, 很重要的性质之一就是它的热稳定性, 极耐热酶在工业转化过程中, 具有保持较快反应速度、反应受污染可能性小、提高酶作用底物溶解度、较高抗化学变性等优点而引起广泛注意^[2,4]。极耐热酶基因在常温菌中表达受密码子偏好性、mRNA 二级结构、信号肽等因素影响, 表达水平很低, 本研究运用 DNA 分析程序对海栖热袍菌内切葡聚糖酶 12B 的信号肽序列进行分析, 通过设计引物对原始海栖热袍菌内切葡聚糖酶 12B 进行定向改造, 获得在大肠杆菌中表达水平提高的重组菌。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 *E. coli* JM109, JM109 (DE3) 购于

Promega 公司; 海栖热袍菌 *T. maritima* 购自美国菌种保藏中心, 编号为 ATCC43589; 质粒 pET-20b 购于 Novagen 公司。

1.2 酶和试剂

Pyrobest 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量等购于 TAKARA 公司; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司; 氨苄青霉素、IPTG 购自 SIGMA 公司。

1.3 海栖热袍菌基因组 DNA 的提取方法

在除氧充氮条件下配制培养基, 分装于 100 mL 预先充氮的血清瓶中, 加盖密封并灭菌。用注射器按体积分数为 0.5% 的接种量接种, 80℃ 静置培养 8 h, 收集细胞, 16℃ 环境下可保存半年。

1.3.1 细胞制备及裂解

(1) 80℃ 静置培养 *T. maritima* 8 h, 取 500 mL 菌液, 在 5 000 g 离心 10 min, 收集细胞。

(2) 用 9.5 mL TE 缓冲液重悬菌体, 加入 0.5 mL 10% SDS 和 50 L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 混合均匀, 37℃ 保温 1 h。

1.3.2 DNA 的提取

参照文献[5]的方法。

1.4 引物设计

按照已知的海栖热袍菌葡聚糖酶基因设计引物, 运用 DNA 分析程序对海栖热袍菌内切葡聚糖酶 12B 的信号肽序列进行分析, 设计去除信号肽引物, 引物由中科院上海生物工程中心合成。引物 1: N 端: 5'-GGAATTCATATGAGGTGGGCAGTTCTTCTG A-3', 引物 2 (去除信号肽): N 端: 5'-GGAATTC-CATATGACGAGCGTTGGTGCAACGG-3', 前面加上 NdeI 位点; 下游引物设计: C 端: 5'-CC-

第一作者: 博士研究生, 副教授。

* 江苏省教育厅自然科学基金 (05KJB180006)

收稿日期: 2005-10-31, 改回日期: 2005-12-23

CAAGCTTTTATTACTCGAG TTT TAC ACC TTC
GAC AGA GAA GTCC,引入组氨酸标签和 XhoI 位
点,在组氨酸标签后加入两个终止密码子 UAA、
UAG 来加强翻译终止^[6,7]。

1.5 重组质粒构建

PCR 扩增结束后,电泳检查并将 PCR 产物从胶回收,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 载体混合,加入连接酶,16℃ 过夜,转化 JM109 构建内切葡聚糖酶 12B 的重组质粒 pET-20b-*Cel*12B 和 pET-20b-*Cel*12B-WS。

1.6 重组质粒的表达

用重组质粒 pET-20b-*Cel*12B 和 pET-20b-*Cel*12B-WS 转化宿主菌株 *E. coli* JM109B(DE3),挑取单菌落接入含有 Amp 100 μg/mL 的 LB 培养基中,30℃ 振荡培养过夜;取过夜培养液接入 100 mL 含 Amp 100 μg/mL 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 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 至终浓度 1 mmol/L,并继续培养,培养结束后,取 1 mL 菌液,以 12 000 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 500 μL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 重悬细胞,超声波破碎,30 s,4 次。12 000 r/min,4℃ 离心 15 min 去除细胞碎片沉淀,取上清液测酶活。

1.7 葡聚糖酶酶活的测定

加酶液 100 μL 和 50 μL 0.1 mol/L pH 6.0 的咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液,350 μL 水,500 μL CMC 底物,85℃ 反应 10 min 后,加 2 mL 终止剂 DNS 煮沸 5 min,冷却后测 A₅₂₀ 值。酶活单位(U)的定义:在 85℃ 下,pH 6.0,1 min 内催化产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量。

配制 0.4 mg/mL 葡聚糖溶液母液,然后用不同浓度梯度的葡萄糖与 DNS 反应,最后测溶液在每次反应后的 A₅₂₀ 值。在一定范围内,葡萄糖的浓度与吸光度值呈线性关系。

2 实验结果

2.1 PCR 扩增

以提取的海栖热孢菌的基因组 DNA 为模板,用合成的引物进行 PCR 扩增,扩增产物用 0.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,见图 1。结果表明,在 925bp 和 870bp 处各有一条带,这与预期长度相符。

2.2 重组质粒构建及酶切鉴定

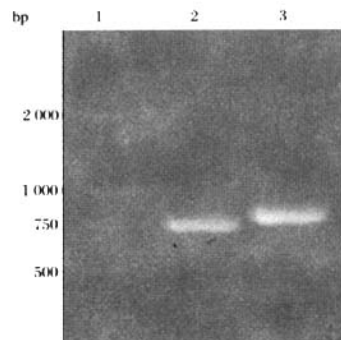


图 1 内切葡聚糖酶 *Cel*12B 的 PCR 产物电泳图
1:Mark DL2000 2:去除信号肽的 *Cel*12B 基因 3:*Cel*12B 基因

外源基因的高效表达需要一个好的表达系统,pET 系统是利用大肠杆菌 T7 噬菌体的转录体系构建的高效表达载体,pET 系统下游还含有 6 个组氨酸标签,便于融合蛋白的纯化。

JM109 中不含有 T7RNA 聚合酶基因,而它自身的 RNA 聚合酶不能从 T7 启动子进行转录,pET 载体中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,因而保证质粒稳定性,并可获得相当高的转化率和大量的重组质粒^[9]。

将 PCR 产物和 pET-20b 载体经双酶切并纯化,以适当比例混合并连接,连接液转化大肠杆菌 JM109,在 Amp 平板上得到转化子,用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定(见图 2),初步鉴定内切葡聚糖酶基因和去除信号肽片段基因已插入 pET20b 载体中。

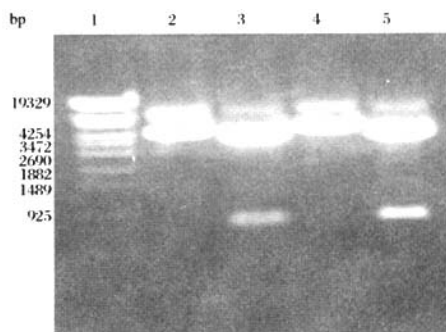


图 2 重组质粒酶切鉴定

1:Mark; 2:pET-20b-*Cel*12B-WS *Nde*I 单酶切; 3:pET-20b-*Cel*12B-WS *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切; 4:pET-20b-*Cel*12B *Nde*I 单酶切; 5:pET-20b-*Cel*12B-WS *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切

2.3 重组质粒表达

将重组质粒 pET-20b-*Cel*12B(内切葡聚糖酶完整基因)和 pET-20b-*Cel*12B-WS(去除信号肽后的基

因)转化 JM109DE3, IPTG 诱导表达后,收集细胞破碎,取上清液测酶活,结果见表 1。

表 1 两重组菌诱导表达后酶活

菌种	未去除信号肽的重组菌 pET-20b- <i>Cel12B</i>	去除信号肽的重组菌 pET-20b- <i>Cel12B</i> -WS
酶活 /U·mL ⁻¹	0.114	1.343

由表 1 可以看出,切除信号肽的重组菌酶的活性比未切除的重组菌酶的活性高 11 倍多,说明去除信号肽大幅度提高了表达水平。

3 讨 论

大肠杆菌有荚膜,外源基因表达的蛋白即使信号肽能被切除,也只能在间隙中,而且有些信号肽并不一定能切除或正确切除,这样会对外源基因表达或酶活产生影响。实验中运用线分析程序 Signa IP V2.0 对海栖热袍菌葡聚糖酶的信号肽进行了预测,并运用 PCR 的方法对海栖热袍菌葡聚糖酶的信号肽进行了切除。以每毫升菌液最高酶活来计,从结果可以看出,去信号肽对提高酶活的作用很大,去除信号肽后每毫升菌液酶活是去除信号肽前酶活的 11 倍多。分析可能的原因:(1)海栖热袍菌葡聚糖酶基因的信号肽被切除后,起始密码子区域大约 20 多个氨基酸中优势密码子的比例很高,这可能也会提高翻译速度,从而提高葡聚糖酶的表达量。(2)海栖热袍菌葡聚糖酶的基因的信号肽切除后,可能使得形成的 mRNA 二级结构有利于翻译,从而使得基因高效表达。(3)海栖热袍菌葡聚糖酶的信号肽在大肠杆菌中不能切除,造成葡聚糖酶停留在细胞膜上,造成表达量提高

不大,还有可能会影响葡聚糖酶的折叠,信号肽切除后就不会有上面的问题。

参 考 文 献

- 1 Glazer A N, Nikaido H. Microbial Biotechnology [M]. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
- 2 Shao W L. Isolation and characterization of hermicellulolytic enzymes fro anaerobic thermophiles[D]. University of Georgia, Athens, 1993: 2~23
- 3 Kloareg B. Structure of cell walls of marine algae and eco-physiological function of the matrix of polysaccharides[J]. Oceanogr Mar Biol Annu Rev, 1988, 26: 259~315
- 4 Martin S. Protein engineering of cellulases[J]. Biochemica et Biophysica Acta, 2000, 1543: 239~252
- 5 Rober Huber, Thomas A Langworthy, Helmut Konig, et al. *Thermotogo maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90℃ [J]. Arch Microbiol, 1986, 144: 324~333
- 6 薛业敏. 耐热性木聚糖降解酶系的基因克隆、表达和酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004
- 7 Bronnenmeier K, Kern A, liebl W, Staudenbauer WL. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of celulosic materials[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1 399~1 407
- 8 Liebl W, Ruile P, Bronnenmeier K, et al. Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable maritime DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, *CelA* and *CelB*, and characterization of the recombinant enzymes[J]. Microbiology, 1996, 142: 2532~2542
- 9 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 中国科学出版社, 2001

High-level Expression of Endoglucans *Cel12B* Gene from *Thermotago maritima* in *Escherichia coli*

Li Xiangqian^{1,2} Shao Weilan^{1,3}

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

2(HuaiYin Institute of Technology Huai an 223001, China; 3(School of Life Science, Naging Normal University, Naging 210097, China)

ABSTRACT *Thermotaga maritima* is strictly anaerobic and extremely thermophilic bacteria. The endoglucanase found in *T. maritima* showed extremely high thermostability and considerable potential in industrial application. But expression of *Thermotaga gene* in *E coli* is difficult. There is signal peptide in gene of endoglucanase *Cel12B* from *T. maritima*. The gene of endoglucanase *Cel12B*(with and without signal peptide sequence according to DNA analysis programs) was amplified by PCR and inserted into the plasmid pET-20b. The recombinant plasmid pET-20b-*Cel12B* and pET-20b-*Cel12B*-WS were transformed to *E. coli* JM109DE3, induced by IPTG and their gene expression levels were determined. The results showed that enzyme activity produced by pET -20b-*Cel12B*-WS was 11.8times higher than that by pET-20b-*Cel12B*.

Key words endoglucanase, *Thermotago maritime*, signal peptide, expression