

瑞氏木霉内切葡聚糖酶Ⅲ基因的克隆 及在酿酒酵母中的表达*

肖志壮 王 婷 汪天虹 曲音波** 高培基

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要:采用刚果红染色法从瑞氏木霉 cDNA 文库中分离到一株具有 CMCase 活性的阳性克隆,测序结果显示该基因所编码的蛋白质为瑞氏木霉内切葡聚糖酶Ⅲ(EG Ⅲ)。对重组酿酒酵母所产生的 EG Ⅲ进行了酶学性质分析,其最适 pH 为 5.0,最适温度为 60℃。检测了酿酒酵母蛋白质分泌系统组分 SSO2 和 SEB1 对 EG Ⅲ分泌的影响。结果表明,在可过量表达蛋白质分泌系统组分 SSO2 的酿酒酵母 H837 中,EG Ⅲ的分泌量最高。由此分析,酿酒酵母 SSO2 蛋白可能在 EG Ⅲ的分泌中,是一个限速步骤。通过 PCR 方法删除 EG Ⅲ基因 5' 端非翻译区的 98bp 核苷酸序列使 EG Ⅲ表达量提高了 5.3 倍。这提示我们,瑞氏木霉的 EG Ⅲ基因在酿酒酵母细胞中表达时,其 mRNA 5' 端先导序列中可能存在影响该基因表达水平的调控序列。

关键词:内切葡聚糖酶Ⅲ, 瑞氏木霉, 酿酒酵母, 基因表达, 蛋白质分泌

中图分类号:Q932 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0391-06

丝状真菌瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)具有降解纤维素与半纤维素的完全酶系,传统地被应用于生产各种酶制剂。由瑞氏木霉生产的纤维素酶类已被广泛应用于食品和饲料工业,近年来并被用于纺织和纸浆造纸工业^[1]。在造纸工业中,纤维素酶用于纸浆改性,可提高脱水速度、纸张的光滑度、撕裂系数和抗拉系数等。以纤维素酶为主要成分的混合酶已成功地用于各种回收纸的酶法脱墨。由酶法脱墨产生的最高亮度级的产品比例可由占常规脱墨的不足 20% 提高到 80% 以上。低剂量的内切葡聚糖酶(endoglucanase, EG)可用于纺织、印染和洗涤剂工业中,进行各种棉布的表面处理^[2]。纤维素酶代替浮石对牛仔服装进行砂洗,有利于染料从纤维表面的磨光,同时,保证了服装的强度。瑞氏木霉菌株产生的胞外纤维素酶蛋白量可达 40 克/升,比一般细菌高出几百倍^[3]。它能产生多种纤维素酶,其中以 EG Ⅲ的催化效率最高^[4]。

为了使 EG Ⅲ更好地用于造纸、纺织和洗衣业的中性和碱性环境,我们需要改造 EG Ⅲ的蛋白结构,因此,EG Ⅲ的基因克隆及其在工程菌中的高效表达具有重要意义。

本文从瑞氏木霉 cDNA 文库中筛选到 EG Ⅲ基因,转化到酿酒酵母细胞中进行了表达,并比较了酿酒酵母的蛋白质分泌系统组分 SSO2 和 SEB1 对 EG Ⅲ分泌的作用,同时研究了 EG Ⅲ mRNA 5' 非翻译区序列对基因表达的影响。

* 国家自然科学基金资助(39970392)

** 通讯联系人;参加本工作的还有邹玉霞

作者简介:肖志壮(1967-),男,山东荣成人,山东大学微生物技术国家重点实验室在读博士,主要从事微生物分子生物学的研究。

收稿日期:2000-10-10,修回日期:2000-11-16

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验中所用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 各菌株及质粒的遗传特征见表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Properties of heredity	Selective marker	References or sources
<i>S. cerevisiae</i> H158	leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his4-519		[5]
<i>S. cerevisiae</i> H837	H81 over-expressed a protein secretary component SS02 of <i>S. cerevisiae</i>	SC-Trp	Inst. of Biotechnol., VTT, Finland
<i>S. cerevisiae</i> H1822	H81 over-expressed a protein secretary component SEB1 of <i>S. cerevisiae</i>	SC-Trp	Inst. of Biotechnol., VTT, Finland
<i>S. cerevisiae</i> H835	H81 harboring a expression vector with trp1 gene	SC-Trp	As above
pAJ401	5.55kb, with ura3, 2 μ plasmid origin and PCK promoter and terminator of <i>S. cerevisiae</i>	SC-Ura	As above
pAJ401-eg3	plasmid pAJ401 with entire eg3 gene from <i>T. reesei</i>	SC-Ura	Present paper
pAJ401-eg3d	pAJ401 with eg3 gene without 5' untranslated region	SC-Ura	Present paper
pUC19	2.69kb, Amp ^r , lacZa	Amp ^r	This lab
pUC19-eg3	pUC19 with eg3 gene	Amp ^r	Present paper
<i>E. coli</i> DH5a	F ⁻ , supE44, Δ (argF lacZya) U169, Φ 801acZ Δ 15, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁻), recA1, end A1, gyr96, thi1, relA1, λ ⁻		This lab
<i>T. reesei</i> QM9414 cDNA library	<i>S. cerevisiae</i> H158 as host, pAJ401 as expression vector	SC-Ura	Inst. of Biotechnol., VTT, Finland

1.2 培养基

培养 *E. coli* 用 LB 培养基, 培养 *S. cerevisiae* 时根据菌株特性采用不同的选择性合成培养基 SC、Ura 缺陷合成培养基 SC-Ura 或 Ura、Trp 双缺陷合成培养基 SC-Trp-Ura^[6]。

1.3 分子克隆用酶及试剂盒

Pfu DNA 聚合酶为 Promega 公司产品, 凝胶回收试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.4 EG 基因克隆的筛选

将构建在酿酒酵母中的 *T. reesei* QM9414 cDNA 文库涂布于含有 0.5% CMC 的 SC-Ura 平板上, 30℃ 培养 3d 后, 用 0.1% 的刚果红染液染色 1h, 然后用 1mol/L NaCl 脱色约 40min, 挑选产生透明水解圈的阳性克隆, 平板划线挑取单菌落进行菌种保存。

1.5 酵母质粒的提取

采用 Hoffman 方法进行^[7]。

1.6 大肠杆菌转化、质粒的提取及分子克隆操作

按常规方法进行^[8]。

1.7 内切葡聚糖酶Ⅲ基因序列测定

按双脱氧法进行^[8]。

1.8 内切葡聚糖酶活性测定

取 0.5mL 适当稀释的 EG Ⅲ 培养物上清液,加入含 0.5mL 0.5% CMC 的 50mmol/L 醋酸缓冲液(pH4 或 5),或者 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH6 ~ 8)中,保温 60min,用 Smogyi 方法测定还原糖^[9]。

1.9 EG Ⅲ 5'非翻译区的删除及表达

以质粒 pAJ401-eg3 为模板设计了一对引物用于删除 EG Ⅲ 5'非翻译区序列,它们的序列为:引物 1(5'-GTCAGAATTCATGAACAAGTCCGTGGCTC-3');引物 2(5'-GACCATGAT-TACGCCAAGC-3')。PCR 产物经 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后,凝胶回收 1.4kb 片段,插入到酵母表达载体 pAJ401 的 *Eco*RI 和 *Xho*I 位点之间。用连接产物转化酿酒酵母菌,在 SC-Ura(或 SC-Ura-Trp)选择性培养基上筛选阳性转化子。

2 实验结果

2.1 内切葡聚糖酶基因的筛选

采用刚果红染色法从 *T. reesei* cDNA 文库中,筛选到 12 株具有 CMCase 活性的阳性克隆。经菌种纯化、测定酶活确证后,选取一株内切葡聚糖酶酶活最高的酿酒酵母菌株提取包含质粒在内的酵母总 DNA,转化 *E. coli* DH5 α ,在氨苄平板上选取阳性转化子。从阳性转化子中提取质粒并用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳(图 1)。由电泳结果可见,插入载体 pAJ401 上的外源核苷酸片段长 1.5kb。

2.2 基因序列测定与分析

对 1.5kb 外源 DNA 片段进行了序列测定。将测序结果通过 BLAST E-mail 服务器提交到 GenBank 查寻,发现该序列与 Saloheimo 等人^[10]克隆的 EG Ⅲ cDNA 序列基本相同,仅在结构基因(以起始密码子 ATG 的 A 为 +1)的密码子 58 ~ 60 位 GTC 变为 GCT,430 ~ 432 位 GAG 变为 GAC,1198 ~ 1200 位 AGC 变为 GGC,因而在包含由 21 个氨基酸组成的信号肽在内的 EG Ⅲ 蛋白质的第 20、144、400 位氨基酸残基由 Val、Glu、Ser 分别突变为 Ala、Asp、Gly。由测定的该核苷酸序列和有关文献报导可知^[4],瑞氏木霉成熟 EG Ⅲ 由 397 个氨基酸组成,分子量为 48kD,pI 值为 5.1。在 pH4.8

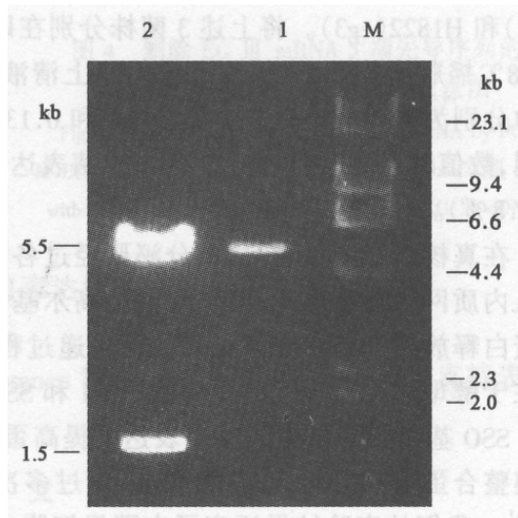


图 1 pAJ401-eg3 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig.1 Agarose electrophoresis of restriction products
M. λ DNA/*Hind*Ⅲ marker; 1. pAJ401/*Eco*RI + *Xho*I;
2. pAJ401-eg3/*Eco*RI + *Xho*I.

时 CMCase 活性最高。而在 55℃ 时, 它的稳定 pH 范围仅在 4~6 之间。

2.3 重组 EG III 的最适作用温度及 pH 值

测定了重组酿酒酵母 H158(eg3) 所产生的 EG III 的最适作用温度和 pH 值。由于 EG III 是在酵母 PGK 启动子控制下表达, 因此菌体培养是在葡萄糖培养基中进行。于 30℃, 培养 72h 后, 离心取上清液测定内切葡聚糖酶活力。测定结果(图 2、3)表明, H158(eg3) 所产 EG III 的催化活性在 60℃, pH5.0 时最高。此结果与文献报导相符^[10]。

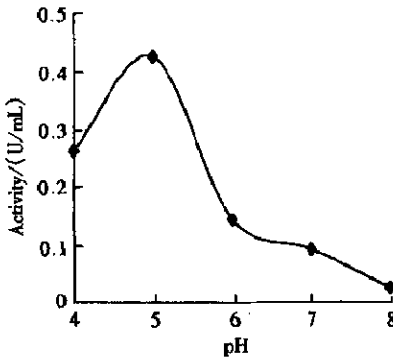


图 2 pH 对 EG III 酶活作用曲线

Fig. 2 Effect of pH on EG III activity

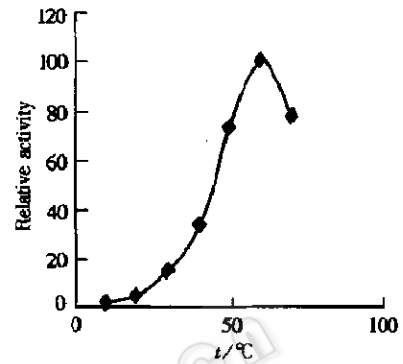


图 3 温度对 EG III 作用曲线

Fig. 3 Optimum temperature of EG III

2.4 酿酒酵母蛋白质分泌系统组分对 EG III 表达的影响

为研究酿酒酵母的蛋白质分泌组分对 EG III 基因表达的影响, 我们将携带瑞氏木霉 EG III cDNA 基因的质粒 pAJ401-eg3 分别转化 *S. cerevisiae* H835、过量表达酿酒酵母蛋白质分泌组分 SSO2 的 *S. cerevisiae* H837 和过量表达酿酒酵母蛋白质分泌组分 SEB1 的 *S. cerevisiae* H1822。在 SC-Ura-Trp 选择性培养基平板上分别得到阳性转化子 H835(eg3), H837(eg3) 和 H1822(eg3)。将上述 3 菌株分别在以 2% 葡萄糖为碳源的相应选择性液体培养基中 28℃ 摇瓶培养 3 天后, 测定培养物上清液的 CMCase 活力。测定结果 3 菌株的 CMCase 活力分别为 0.147 U/mL、0.160 U/mL 和 0.130 U/mL (3 次实验的平均值) (培养液细胞浓度相同, 数值略)。即当以 H837 为宿主菌表达 EG III 时, EG III 胞外酶活最高(比 835(eg3) 提高 8.8%)。

在真核细胞中, 蛋白质的分泌要经过各种膜包被的囊泡运输过程。分泌性蛋白质首先从内质网转运到高尔基体, 再通过高尔基体衍生的分泌囊泡与原生质膜融合, 最终将分泌蛋白释放到细胞外。这种囊泡的传递过程需要许多蛋白质参与协调才能完成。其中, 存在于酵母原生质膜上的蛋白质 SSO1 和 SSO2 参与分泌蛋白从高尔基体到原生质膜的运输。SSO 基因在酵母中的过量表达能提高蛋白质在培养基中的分泌量^[11]。酵母中另外一种膜整合蛋白 SEB, 位于内质网上, 经过多次跨膜参与形成蛋白质穿过脂双层的传导通道^[12]。我们的实验结果证实了在酵母细胞中, SSO 蛋白对 EG III 的分泌量的提高有帮助。由此可以认为, 酿酒酵母蛋白质分泌因子 SSO2 是 EG III 分泌过程中的限速步骤。但在 H1822(eg3) 中, EG III 的分泌量却低于 H158(eg3), 其原因还有待进一步分析研究。

2.5 EG III mRNA 5' 端非翻译区序列的删除对基因表达的作用

EG III cDNA 序列的 5' 端中存在一段 98 个核苷酸的非翻译区(或称为先导序列)。序

列如下:5'-CGGCACGAGACGCTCTTTTCGTCGGCCCGTAGATATCAGATTGCTATTCACTCGCACAGACGAAGCCTCTGCTCGATAATATCTCCCCGTCATCGACAATG-3'。为研究 EG III mRNA 5'端非翻译区序列对基因表达是否有作用,我们用 PCR 方法删除了起始密码子 ATG 上游全部非翻译区序列(98 个核苷酸)(图 4)。将携带先导序列缺失的 EG III cDNA 基因的 DNA 片段克隆到表达载体 pAJ401 上,在酵母 PGK 启动子控制下表达,构建了重组质粒 pAJ401-eg3d。用 pAJ401-eg3d 转化 *S. cerevisiae* H837,得到重组酿酒酵母 H837(eg3d)。以带有 EG III 先导序列的 H837(eg3)为对照,观察了先导序列对 EG III 表达的影响,发现 EG III 5'非翻译区删除后,EG III 蛋白表达水平显著提高,其转化子在 CMC 平板上产生的水解圈平均大小为 8.6mm,而对照仅为 3.7mm。随机挑选 10 株转化子进行液体培养,取培养物上清液测定内切葡聚糖酶活力。其内切葡聚糖酶活力平均为 0.928 U/mL,而对照仅为 0.147 U/mL。即 EG III 5'非翻译区删除后,其表达活性提高了 5.3 倍。van den Heuvel 的研究表明,在酵母菌 mRNA 起始密码子 AUG 的 5'上游存在一段平均长度为 52 个核苷酸的非翻译区,它的碱基组成非常重要。一般情况下,AT 含量较高,从而避免形成强的二级结构。如果插入一段 GC 含量高于 40% 的序列,则会明显降低蛋白质翻译的效率^[13]。本文使用 PCR 方法删除了 GC 含量为 46% 的 EG III 基因 5'先导序列的 98 个核苷酸显著提高了 EG III 蛋白质的表达水平。结果提示,EG III mRNA 5'端先导序列中可能存在酵母调控蛋白的结合位点或可形成强的二级结构,从而影响了 EG III 在酵母中的表达量这种作用很可能是在翻译水平上进行。由此可以推断,当外源基因在酿酒酵母中表达时,对其 mRNA 5'端先导序列的改造,很可能是提高外源蛋白表达量的一种有效的方式。

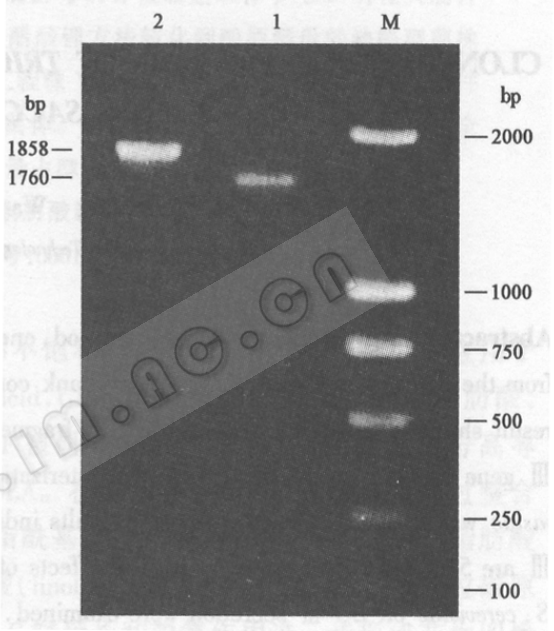


图 4 删除 EG III mRNA 5'端先导序列的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4 Deletion of 5' leader of EG III mRNA by PCR
M, DL-2000 molecular standard; 1, PCR product of EG III cDNA without 5' leader; 2, PCR product of entire EG III cDNA.

致谢 对芬兰 VTT 生物技术研究所以 Sirrka Keranen 和 Merja Penttilä 博士的慷慨支持表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Nevalainen H. Application and fundamental investigations. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. 593 ~ 599.
- [2] Wright J D. 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver: Publication Clerk, 1998. A5 ~ A189.
- [3] Knowles J, Letovaara P, Teeri T. *Biotechnology*, 1987, 5: 255 ~ 261.
- [4] Macarron R, Acebal C, Castillon M P, et al. *Biochem J*, 1993, 286: 867 ~ 873.

- [5] Hallborn J, Gorwa M F, Meinander N. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**: 326 ~ 333.
- [6] Johnston. J R. *Molecular Genetics of Yeast*. Oxford: Oxford University Press, 1994. 121 ~ 130.
- [7] Hoffman C S, Winston F. *Gene*, 1987, **57**: 267 ~ 272.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.21 ~ 1.84.
- [9] Somogyi M J. *Biol Chem*, 1952, **195**: 19 ~ 23.
- [10] Saloheimo M, Lehtovaara P, Penttila M, et al. *Gene*, 1988, **63**: 11 ~ 21.
- [11] Ruohonen L, Toikkanen J, Tieaho V, et al. *Yeast*, 1997, **13**: 337 ~ 351.
- [12] Toikkanen J, Gatti E, Takei K, et al. *Yeast*, 1996, **12**: 425 ~ 438.
- [13] Heuvel J J, Planta R J, Raue H A. *Yeast*, 1990, **6**: 473 ~ 482.

CLONING AND EXPRESSION OF *TRICHODERMA REESEI* ENDOGLUCANASE III (EG III) GENE IN *SACCHAROMYCES CEREVASIAE* *

Xiao Zhizhuang Wang Ting Wang Tianhong Qu Yinbo** Gao Peiji

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Using Congo red-staining method, one positive clone with CMCase activity was isolated from the *Trichoderma reesei* cDNA gene bank constructed in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequencing result showed that the 1.5 kb-length DNA fragment inserted in the recombinant plasmid encoded EG III gene from *T. reesei*. Enzymatic characterization of the EG III produced by recombinant *S. cerevisiae* was analyzed. The experimental results indicated that the optimum pH and temperature for EG III are 5.0 and 60°C, respectively. The effects of secretory system components SSO 2 and SEB1 of *S. cerevisiae* on EG III secretion were examined. The results indicated that the amount of EG III secreted by the strain with SSO 2-overexpression was highest among the different recombinant *S. cerevisiae* strains, showed that SSO 2 is a rate-limiting component of the secretory machinery in the process of EG III secretion. Furthermore, the EG III expression level was increased 5.3 times by deletion. Furthermore, the EG III expression level was increased 5.3 times by deletion of the 98 bp in 5' untranslated region of eg3 mRNA sequence. This result suggested that the regulation region could exist in the 5' untranslated region of EG III mRNA, which is recognized by the gene expression related factors of *S. cerevisiae*.

Key words: Endoglucanase III, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, Gene expression, Protein secretion

* This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (39970392)

** Corresponding author and director of the project