

运用定点突变提高重组木聚糖酶在毕赤氏酵母中的表达*

陆 健 曹 钰 陈 坚

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要 运用 PCR 介导的定点突变对米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源的木聚糖酶在毕赤酵母中的重组表达进行了研究,获得一表达量远远高于亲本的突变株 I156A,对其进行了提纯并研究其酶学特性,除热稳定性外其余与亲本基本一致。突变株 I156A 所产木聚糖酶 XynF1 的分子量为 35kD,在 pH 4~9 范围内稳定,最适 pH 为 7.0,最适温度为 45℃,在 50℃以下稳定性略高于亲本。

关键词 重组,木聚糖酶,定点突变,米曲霉,巴斯德毕赤酵母

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)04-0425-06

随着经济和科技的发展,环境和资源问题越来越引起人们的关注,半纤维素中的木聚糖约占纤维物质的 15%~30%。木聚糖的完全降解需要木聚糖酶和木糖苷酶的协同作用,其中木聚糖酶(1,4-β-D-xylan xylohydrolase,EC 3.2.1.8)以内切方式水解木聚糖分子中的 β-1,4 糖苷键,是一类重要的半纤维素酶。人们对各种微生物来源的木聚糖酶展开了各方面的基础研究,克隆了其中一些并在原核和真核中进行了同源或异源重组表达^[1~5]。

目前毕赤酵母表达系统是倍受关注的真核表达系统,它不仅具有可诱导的强启动子(AOX1),而且外源基因整合于染色体上,可防止重组工程菌的退化,并且具有高密度发酵等特点,因而正在成为外源基因表达的常用表达系统。

研究发现,米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源的木聚糖酶基因 XynF1 在毕赤酵母中重组表达时,重组酶的催化活性非常低。本文对重组表达于毕赤氏酵母的木聚糖酶 XynF1 运用 PCR 介导的定点突变,提高重组酶的酶活水平,并研究了酶学性质。

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌 HB101、巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) XSI15(his4)及表达质粒 pPIC9K 购于美国 INVITROGEN 公司,米曲霉(*Aspergillus oryzae*) RIB128 日本国税厅酿造研究所保藏,分别在 37℃、30℃、30℃培养大肠杆菌、酵母和米曲霉。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 胰蛋白胍(DIFCO)10g,酵母浸膏(DIFCO)5g,NaCl 10g,用蒸馏水定容至 1L,pH7.0,添加氨苄青霉素 0.1mg/mL 用于质粒筛选。

* 本研究得到了日本科学技术厅(STA)资助

作者简介:陆 健(1968-),男,江苏太仓人,江南大学生物工程学院讲师,在职博士研究生,研究方向为酿酒微生物和酶技术,1998~2000 年赴日本国税厅酿造研究所进行研究工作。

收稿日期:2001-10-29,修回日期:2002-02-22

1.2.2 YPD 培养基 葡萄糖 20g, 酵母浸膏 10g, 蛋白胨 20g, 用蒸馏水定容至 1L, pH6.5, 用于酵母的培养, YPD-G418 培养基添加不同量的 G418, 用于体外多拷贝插入的筛选。

1.2.3 BMMY 培养基 酵母浸膏 10g, 胰蛋白胨 20g, 酵母氮基 (DIFCO) 13.4g, 生物素 4×10^{-4} g, 甲醇 5mL, 用 100mmol/L pH6.0 磷酸缓冲液定容至 1L, 用于重组毕赤氏酵母的表达培养。

1.2.4 RDB 培养基 山梨糖醇 182g, 葡萄糖 20g, 酵母氮基 13.4g, 生物素 4×10^{-4} g, 氨基酸混合物 (含 Leu, Ile, Lys, Met, Glu 各 0.5%) 0.05g, 用蒸馏水定容至 1L, 用于毕赤氏酵母的转化。

1.2.5 麦麸培养基 蛋白胨 1g, 酵母膏 5g, NaNO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 蔗糖 3g, 麦麸 10g, 用蒸馏水定容至 1L, pH6.0, 用于米曲霉 RIB128 的培养。

1.3 DNA 操作及转化

DNA 操作及转化按标准方案进行, 其中限制性内切酶、T4 连接酶、大肠杆菌感受态细胞购于日本 Takara Shizou 公司, 毕赤酵母表达 Kit 购于 Invitrogen 公司, 并依据其推荐的方案采用原生质体法进行转化。

1.4 质粒 PIC9K-XynF1 的构建

米曲霉在麦麸培养基上培养 3d, 用 Nippon gene 公司的 Isogen 制备米曲霉 RIB128 的 mRNA, 并用 mRNA 快速制备 Kit (Pharmacia 公司) 纯化, 然后用 SMART PCR cDNA 合成 Kit (Clontech 公司) 合成米曲霉的 cDNA, 并利用反转录 PCR 法扩增编码米曲霉 XynF1 基因。根据 Kitamoto 等人^[6]对 XynF1 基因的报道设计的两条寡核苷酸引物如下, 分别与 XynF1 的 26 ~ 32 氨基酸和 327 ~ 322 氨基酸同源。Sense-P1 : 5'-CGGAATTCGCAGCCGCCAGCAT-CAATGATG-3' (含 EcoR I 酶切位点), Antisense-P2 : 5'-TAGGGCGGCCGCTTACAGAGCATCGA TGAT-3' (含 Not I 酶切位点), 扩增后的片段克隆至质粒 pPIC9K。

1.5 定点突变

根据 Higuchi 的方法^[7]进行定点突变操作。用于突变的寡核苷酸由 Gene Assembler (Pharmacia 公司) 合成, 根据与 XynF1 同属于一族木聚糖酶的氨基酸序列比较, 设计的突变引物如下所示 (带有下列划线部分为替换的核苷酸), H156A : 5'-GACGTTGT-CAACGAGGCCTTCGATGAGGACGGC-3'。

1.6 木聚糖酶酶活的测定

木聚糖酶酶活的测定方法如下 : 0.2mL 适当稀释的酶液加入到已在 40℃ 保温过的 0.5mL 的 2% 木聚糖 (from oat speltz, Sigma 公司) 和 0.3mL 100mmol/L pH4.5 醋酸盐缓冲液, 40℃ 反应 30min, 释放出的糖按照 Somogyi-Nelson 法在 500nm 处测定。酶活单位定义 : 在 pH4.5 40℃ 每分钟产生 1 μ mol 产物 (木糖) 为 1 活性单位 (U)。

1.7 重组木聚糖酶的纯化

将含有突变重组质粒的毕赤氏酵母在完全培养基 YPD 上 30℃ 预培养 20 h, 再接种于 BMMY 培养基 30℃ 摇瓶培养 80h, 离心收集上清液。浓缩后的上清液经过 TSK G2000SW (21.5mm \times 600mm, Tosoh 公司, 日本) 凝胶色谱柱, 用 40mmol/L pH6.5 磷酸缓冲液 (含 0.2mol/L 的 NaCl) 洗脱, 收集有活力的组分, 浓缩后进样至阴离子交换柱 (Poros HQ/M, 4.6mm \times 10mm, PerSeptive Biosystems, 日本), 用 40mmol/L pH5.0 醋酸盐缓冲液 (含 1.0mol/L 的 NaCl) 进行梯度洗脱, 收集活力峰。

1.8 凝胶电泳

SDS-PAGE 按照 Laemmli 方法进行,使用 10% 聚丙烯酰胺凝胶(日本第一化学公司),银染色或考马斯亮蓝染色。琼脂糖凝胶浓度为 1%,100 伏电泳,紫外摄影。

1.9 温度和 pH 的影响及稳定性

按木聚糖酶活测定方法在 pH4.5、35℃~55℃ 以及 pH5~8、40℃ 分别测定重组木聚糖酶的酶活,以考察酶的最适作用温度和 pH。

将酶液在它们的最适温度(最适 pH 条件)下分别在不同 pH(不同温度)下保持 1h,考察酶的 pH 稳定性和耐热稳定性。

1.10 米氏常数 K_m 的测定

在 40℃ pH4.5 的醋酸缓冲液中,底物浓度从 2mg/mL 增大至 12.5mg/mL 测定酶反应的初速度。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒 pPIC9K-XynF1 的构建

采用反转录 PCR 法扩增 *XynF1* 基因,扩增片段经 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切后,克隆至巴斯德毕赤酵母的载体 pPIC9K 中,构建成 pPIC9K-XynF1,内含受 AOX1 启动子调控的 *XynF1* 基因(图 1)。

2.2 定点突变

经过三轮 PCR 将 *XynF1* 中 Ile¹⁵⁶ 突变为 Ala¹⁵⁶,扩增获得 0.9kb 的 DNA 片段(图 2),通过序列测定分析,确证突变位点与设计的目标位点一致。转化大肠杆菌,随机筛选 16 个阳性克隆子。经酶切鉴定含有目标片段,再经过大量培养、提取、纯化获得含有突变的 *XynF1* 基因的重组质粒。

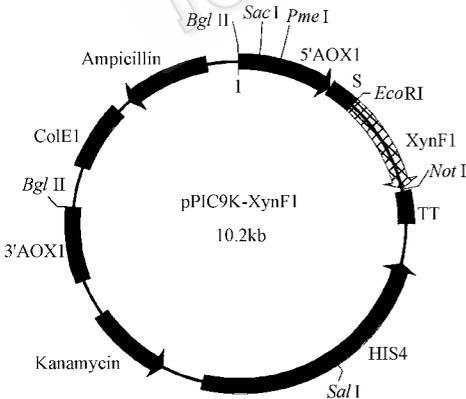


图 1 重组质粒 pPIC9K-XynF1

Fig. 1 A plasmid pPIC9K-XynF1

XynF1 gene was amplified by the method of reverse transcription polymerase chain reaction; Plasmid pPIC9K-XynF1 was *Pichia pastoris* vector that contains *XynF1* under the control of AOX1 promoter.

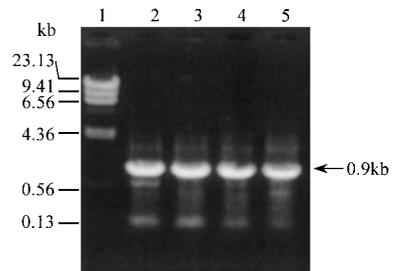


图 2 定点突变扩增后 *XynF1* 基因片段的电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of PCR products of *XynF1* gene by site-direct mutagenesis
1. λ DNA/*Hind* III ; 2 ~ 5. PCR products of *XynF1* gene by site-direct mutagenesis.

重组质粒 pPIC9K-*XynF1* 经 *Pme* I 切割,采用表达系统推荐的原生质体法转化巴斯德毕赤氏酵母 GS115,在不含组氨酸的再生平板 RDB 上随机挑选 200 个克隆子。经同步培养后,鉴定转化子的 G418 抗性,从中挑选具有较高抗性的转化子,并在含有 RBB-木聚糖 (Remazol Brilliant Blue R-D-Xylan, Sigma 公司)的平板上培养鉴定。在研究过程中发现突变株 H156A 的 G418 抗性浓度为 0.5mg/mL,远低于亲本的 G418 抗性浓度 1.75mg/mL。由于 G418 抗性水平大致依赖于所整合的细菌卡那霉素基因数目,因而也反映了重组质粒的整合拷贝数。由此可知,突变株的整合拷贝数低于亲本。

2.3 培养和纯化

将含有突变的 *XynF1* 基因的转化子(突变株)和未突变的 *XynF1* 基因的转化子(亲本或出发菌株)在 BMMY 培养基上摇瓶培养,并每天补加 5mL/L 的甲醇诱导表达。

测定摇瓶培养上清液中的木聚糖酶含量,发现突变株的产酶单位远远高于出发菌株的产酶单位。在以考马斯蓝染色的突变株上清液蛋白凝胶电泳中能非常清晰地看到一条约 35kD 的谱带,而亲本则很难辨认(图 3),这表明突变株木聚糖酶的分泌表达量远高于亲本,但同时发现突变株的粗酶液很快地丧失活力,考虑到高密度发酵胞外蛋白浓度很高时,毕赤氏酵母分泌的蛋白酶浓度也相应提高,分泌的外源蛋白会遭到一定程度的降解,因而有必要提纯木聚糖酶。

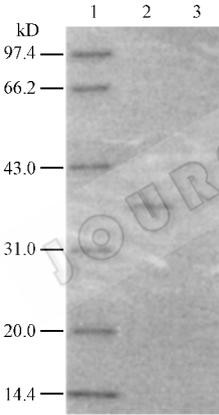


图 3 突变株和亲本培养上清液的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of the supernatant of the mutant and wild-type
Lane 1 2 μ L protein standard(DAICH I -III);Lane 2 :10 μ L supernatant of the recombinant mutant ;Lane 3 :20 μ L supernatant of the recombinant wild type.

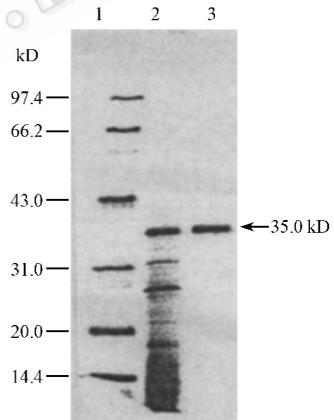


图 4 纯化后的重组木聚糖酶 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of the purified recombinant mutant xylanase stained by sliver stain
Lane 1 :Protein standard (DAICH I -III);Lane 2 :Active fractions collected from gel filtration chromatography ;Lane 3 :Purified recombinant xylanase.

突变株的培养上清液经过凝胶过滤色谱和离子交换色谱等步骤纯化后,在 SDS-PAGE 上获得单一的蛋白条带,分子量大约为 35kD(图 4)。

2.4 突变株和亲本酶学特性比较

从表 1 可以看出,突变株和亲本在酶学性质上除了热稳定性略有不同,其它特性基本一致。突变株培养上清液中的酶活单位比亲本提高了约 1 000 倍。两者的 K_m 相差约一

倍,表明它们与底物的亲和性相差较大。

表 1 突变株和亲本酶学特性

Table 1 Properties of xylanase from parent and mutant

Properties of enzyme	Xylanase from parent	Xylanase from mutant
Enzyme activity/(u/mL)	0.042	47.700
Optimum temperature/°C	45	45
Optimum pH	7.0	7.0
Temperature stability/°C	45	50
pH stability	4~9	4~9
K_m /(mg/mL)	23.61	43.28

米曲霉的木聚糖酶基因 $XynF1$ 在毕赤氏酵母中进行表达,由于毕赤氏酵母对外源蛋白的翻译后修饰与高等真核很相似,多为甘露糖型的 N-糖苷键,不会产生超糖基化^[8],并且宿主为分泌型表达。因而其低表达量的原因不同于其它木聚糖酶基因在原核宿主中受限于细胞质或周质空间以及蛋白质的翻译后修饰等因素。结果分析表明尽管突变株的整合拷贝数低于亲本,但是突变株的木聚糖酶分泌表达量却远高于亲本。这表明在毕赤氏酵母中基因拷贝数的增加并不一定意味着外源基因表达水平的上升,有时反而对表达起反作用。有研究报道表明,对于分泌型表达的转化子影响表达水平的关键在于巴斯德毕赤氏酵母分泌途径处理外源蛋白的能力^[9]。此外宿主表达系统在密码子使用上的偏好性在翻译水平影响外源基因的表达,因而密码子的用法也是可能的影响因素^[10]。

除了酶蛋白分泌量的差异外,突变株和亲本发酵液中木聚糖酶的比活力相差约 70 倍,推测其原因是受到突变株酶蛋白结构的改变而引起的。由 Kitamoto 等人对 $XynF1$ 基因的报道可知,木聚糖酶 $XynF1$ 依据其序列同源性推定属于糖苷水解酶 F 家族(又称 10 家族),并由同源性比较推定木聚糖酶 $XynF1$ 中 155 位的谷氨酸作为酸碱催化中的质子供体。将其紧邻的异亮氨酸 I¹⁵⁶ 突变为结构简单的极小氨基酸丙氨酸 A¹⁵⁶,其侧链的疏水性降低。在酶促反应中,底物过渡态的电荷与酶蛋白活性中心附近的电荷相互作用,因而酶蛋白细微结构的改变将影响基态和过渡态之间的能量差,即某个氨基酸残基的改变可能会影响反应的活化能。156 位的氨基酸残基在极性和空间结构的改变使得糖基-酶的共价中间产物的形成也发生改变,表现在酶与底物的亲和力降低。

米曲霉的木聚糖酶基因 $XynF1$ 在毕赤氏酵母中表达量极低以及突变株 I156A 表达量远远高于亲本的原因仍有待进一步的结构信息的研究。

致谢 日本国税厅酿造研究所提供了试验用菌株及部分实验材料,并协助进行了序列测定。

参 考 文 献

- [1] Ito K ,Ikemasa T ,Ishikawa T. *Biosci Biotech Biochem* ,1992 ,**56** :906 ~ 912.
 - [2] Torronen A ,Mach R ,Messner R ,et al. *Bio/Technology* ,1992 ,**10** :1461 ~ 1465.
 - [3] Lee J M T ,Hu Y ,Zhu K J H ,et al. *Can J Microbiol* ,1993 ,**39** :164 ~ 173.
- 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Espinar F M T ,Valles S ,Pinoga F ,et al . *Appl Microbiol Biotechnol* ,1996 **45** :338 ~ 341 .
- [5] Kotaro K ,Makoto T ,Takuya K ,et al . *J Ferment Bioeng* ,1995 **79** :422 ~ 428 .
- [6] Kitamoto N ,Yoshino S ,Ito M ,et al . *Appl Microbiol Biotechnol* ,1998 **50** :558 ~ 563 .
- [7] Higuchi R ,Krummel B ,Sakai R K . *Nucleic Acids Res* ,1988 **15** :7351 ~ 7367 .
- [8] Romanos M A ,Scorer C A . *Yeast* ,1992 **8** :423 ~ 488 .
- [9] Romanos M . *Current Opinion in Biotechnology* ,1995 **6** :527 ~ 533 .
- [10] Hockema A ,Kastellin R A ,Vasser M ,et al . *Mol Cell Biol* ,1987 **7** :2914 ~ 2924 .

Improvement or Recombinant Xylanase XynF1 From *Aspergillus oryzae* Expressed in *Pichia pastoris* by Site-directed Mutagenesis

Lu Jian Cao Yu Chen Jian

(School of Biotechnology ,The Key Laboratory of Industry Biotechnology Under Ministry of Education ,Southern Yangtze University ,Wuxi 214036 ,China)

Abstract : The recombinant xylanase XynF1 from *Aspergillus oryzae* expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* was improved by site-directed mutagenesis. The mutant I156A secreted about 47.7U/mL xylanase XynF1 in the BMMY medium. The mutant xylanase XynF1 was purified by ion exchange and gel filtration chromatographies. The molecular weight of purified XynF1 was 35kD. XynF1 was stable between pH 4 ~ 9 and its optimum pH was 7.0. The optimum temperature of XynF1 was 45°C and it was stable below 50°C. The properties of mutant were same as the parent's except the stability of temperature.

Key words : Recombinant , Xylanase , Site-directed mutagenesis , *Aspergillus oryzae* , *Pichia pastoris*

快 讯

《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”

近期,中国科学技术部公布了我国期刊进入“中国期刊方阵”的名单。全国共有716种期刊进入了“中国期刊方阵”,其中“双高”期刊40种;“双奖”期刊58种;“双百”期刊122种;“双效”期刊496种。《微生物学报》入选“双百”期刊方阵。

“中国期刊方阵”的建设是现阶段我国期刊出版事业发展的需要,是推进新世纪我国期刊发展的战略性举措,它将促进我国期刊“精品战略”的实施。

《微生物学报》编委会感谢各级领导的关心,感谢广大作者、读者对本刊办刊工作的大力支持。我们将更好地贯彻国家有关办刊工作的各项政策、法规和法令,进一步提高刊物质量,为我国的经济建设服务,为使期刊尽快走向世界做出积极贡献。