

耐碱性木聚糖酶基因在短小芽孢杆菌中高效分泌表达的研究

刘伟丰 毛爱军 祝令香 赵 云 董志扬*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:从木聚糖酶高产短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) BP51 中克隆得到木聚糖酶基因 *xynA*, 将其构建在芽孢杆菌表达载体 pWH1520 中得到重组质粒 pWSX11. *xynA* 由木糖诱导 *xylA* 启动子调控 *xynA* 表达. 采用同源高效表达策略, 以原生质体转化方法将 pWSX11 转回原始菌株 BP51 中, 获得重组菌株 BPX11. 通过木糖诱导重组菌株中的 *xynA* 基因高效分泌表达, 使木聚糖酶产酶活力比原菌株 BP51 提高了 87%, 同时对重组表达的木聚糖酶的酶学性质进行了初步研究.

关键词: 木聚糖酶 短小芽孢杆菌 芽孢杆菌表达系统

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)04-0487-04

内切 β -1, 4-木聚糖酶[EC3.2.1.8]是木聚糖酶系中最主要的酶, 它通过催化水解木聚糖主链内部的 β -1, 4-木糖苷键来降解木聚糖, 其产物以寡聚木糖、木二糖为主伴有少量的木糖. 随着木聚糖酶在造纸、饲料及食品发酵工业中的广泛应用, 木聚糖酶已成为酶学研究领域的一个重要对象. 通过现代分子生物技术构建木聚糖酶高产工程菌以及改良木聚糖酶性质已是目前研究方向之一^[1, 2].

木聚糖酶广泛存在于细菌、真菌、藻类等微生物中, 不同来源的木聚糖酶性质也各不相同. 短小芽孢杆菌木聚糖酶由于具有良好的耐热、耐碱等特性^[3], 非常适于纸浆生物漂白及饲料工业中应用, 该酶基因在 1983 年^[4]已被克隆得到, 并分别在大肠杆菌、酵母中得到表达^[5, 6], 但表达活力极低, 无法应用于产业化. 到目前为止, 在国内外尚未见该基因在芽孢杆菌中表达的报道.

本文在国内外首次报道采用同源表达策略在短小芽孢杆菌中高效分泌表达木聚糖酶, 通过从短小芽孢杆菌 BP51 中克隆得到木聚糖酶基因 *xynA*, 将其构建到木糖诱导的芽孢杆菌表达载体 pWH1520 中, 再通过转化原生质体, 将木聚糖酶基因表达载体转入原短小芽孢杆菌 BP51 中, 获得木聚糖酶高产重组工程菌株, 使短小芽孢杆菌的产酶水平有较大幅度提高, 产酶周期明显缩短, 为该木聚糖酶产业化应用奠定了良好基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* BP51 为本实验室保存, 质粒 pGEM-T Easy 购于 Promega 公司, 芽孢杆菌分泌表达载体 pWH1520 购于 MoBiTec 公司.

1.1.2 培养基:LB 培养基见文献[7]; AB3 培养基配成 1.75% 购自 Difco 公司, 芽孢杆菌转化培养基、SMM 液、SMMP 液和 CR5 培养基见 MoBiTec 公司操作手册, 产酶发酵培养基每升含蛋白胨 20g、酵母膏 20g、稻草粉 10g、木糖 5g, pH6.5, 四环素工作浓度为 10 μ g/mL.

1.1.3 酶和试剂:各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 回收试剂盒、蛋白质分子量标准购自鼎国生物技术公司; 小牛肠碱性磷酸酶、X-Gal 购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶购自 Sangon 公司; PCR 引物由 Genecore 公司合成; 其它生化试剂购于 Sigma 等公司.

1.2 芽孢杆菌总 DNA 的提取

参照文献[7]的方法从短小芽孢杆菌 BP51 中提取基因组 DNA.

1.3 木聚糖酶 *xynA* 基因的克隆

根据文献中 *xynA* 基因的序列^[4]设计 PCR 扩增引物, 上游带一个终止子 *taa*(I) 和一个核糖体结合

基金项目: 国家 863 计划(2001AA214161); 中国科学院知识创新方向性课题(KJCX2-SW-206-1)

* 通讯作者. Tel/Fax 86-10-62551206 E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

作者简介: 刘伟丰(1976-)男(满), 吉林四平人, 硕士, 从事微生物酶分子生物学研究. E-mail: liuwf@sina.com.cn

收稿日期: 2003-06-09, 修回日期: 2004-04-12

位点(II),两引物均带一个 *Bam*H I 酶切位点:

P1 :cgggatcc [taa] aatg [a] a [aaaggag] ag [ga] atg ;

*Bam*H I I II

P2 :cgggatcccttagttgccaataaacag.

*Bam*H I

提取短小芽孢杆菌 BP51 总 DNA,以此为模板,对 *xynA* 基因进行扩增,PCR 反应体系为 50 μ L,含有 50ng DNA,0.2mmol/L dNTP,25pmol 每种引物,1 \times PCR 反应缓冲液,2.5U *Taq* DNA 聚合酶。反应条件 93 $^{\circ}$ C 3min,93 $^{\circ}$ C 50s,51 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 7min。将 PCR 扩增产物经 DNA 回收试剂盒回收,连接到 pGEM-T Easy 上,转化 DH5 α ,筛选获得阳性克隆,进行测序鉴定。

1.4 重组表达载体的构建

将上述含 *xynA* 基因的 pGEM-T Easy 质粒用 *Bam*H I 酶切得到 *xynA* 基因片段,将该片段连接到芽孢杆菌表达载体 pWH1520 的多克隆位点 *Bam*H I 上,转化 DH5 α ,酶切鉴定重组表达载体。

1.5 芽孢杆菌的转化

从斜面上将短小芽孢杆菌接种于 AB3 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 12h,以 2% 的接种量接于 5mL AB3 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600} 值 1.0,4000r/min 离心 15min,菌体用 0.5mL SMMP 液重悬,加入溶菌酶至终浓度 1mg/mL,37 $^{\circ}$ C 保温 1h,生成的原生质体用 SMMP 液洗一遍后,重悬于 0.5 mL 的 SMMP 液中。

按 MoBiTec 公司的操作手册进行芽孢杆菌的转化。

1.6 *xynA* 基因的诱导表达

将重组芽孢杆菌接入含四环素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。以 2% 的接种量转接到含四环素的 LB 培养基中继续培养至对数生长期,加入木糖到终浓度 0.5%,诱导培养一定时间,室温下 4000r/min 15min 离心收集上清。

1.7 重组菌株的产酶发酵

将重组芽孢杆菌接入产酶培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养。间隔一定时间取样分析木聚糖酶活性。

1.8 表达产物的分析和鉴定

参照 Laemli^[8] 方法用 SDS-PAGE 对表达产物进行分析;木聚糖酶活力测定采用 DNS 定糖方法进行^[9]:取 0.1mL 稀释的酶液,加入到 0.1mL 用 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH6.5)配成的 1% 木聚糖溶液中,50 $^{\circ}$ C 反应 10min,加入 0.6mL DNS 试剂,煮沸 10min,用水定容至 5mL 测 550nm 光吸收,以每分钟生成 1 μ mol 木糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位 (IU)。

2 结果和分析

2.1 木聚糖酶基因的克隆和表达载体构建

利用 pWH1520 载体时,外源基因会与上游的一段载体自身多肽融合表达。因此在设计上游引物 P1 时,加入了终止密码子 TAA 以终止载体自身多肽的翻译,并利用 *xynA* 基因自身的核糖体结合位点开始 *xynA* 独立的翻译;P2 为下游引物。两种引物均加入了 *Bam*H I 位点。以 *B. pumilus* BP51 的总 DNA 为模版,PCR 扩增获得木聚糖酶基因片段,长 716bp,带有自身信号肽序列,将该基因克隆到 pGEM-T Easy 中,经测序鉴定与已报道的 *xynA* 基因序列同源性 100%。以 *Bam*H I 酶切得到的基因片段,连接到表达载体 pWH1520 上,获得重组表达质粒 pWSX11(图 1)。利用基因内部的 *Eco*R I 位点鉴定插入片段方向,酶切验证结果证明质粒构建成功。

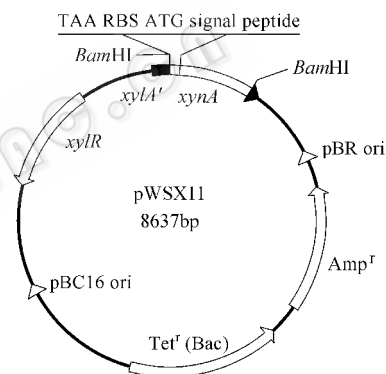


图 1 重组质粒 pWSX11 图谱

Fig.1 Map of recombinant plasmid pWSX11

2.2 重组木聚糖酶的诱导表达

将重组质粒 pWSX11 以原生质体法转化短小芽孢杆菌 BP51,获得含有重组质粒的重组菌株 BPX11。将 BPX11 转接到含 10 μ g/mL 四环素 LB 培养基中,添加 0.5% 木糖诱导表达,当菌体生长至 OD_{600} 大于 5.0,经离心收集发酵液上清,进行酶活力测定和 SDS-PAGE 分析。

结果表明,重组菌 BPX11 木聚糖酶基因表达产物主要分泌到胞外,在胞外上清中的酶活力可达 106.85IU/mL,原宿主菌 BP51 在此培养条件下未见木聚糖酶产生,表明在此条件下重组短小芽孢杆菌 BPX11 的酶活力是由 *xylA* 启动子诱导表达产生的,原始菌 BP51 在木糖诱导的 LB 培养基中不产木聚糖酶。SDS-PAGE 结果显示,重组菌 pWSX11 在短小芽孢杆菌中的表达产物分子量约为 22kD(图 2),与原木聚糖酶分子量大小一致。未经诱导的对照中没有检测到明显的木聚糖酶活力,表明重组木聚糖酶的表达是受木糖诱导物严格调控诱导的。

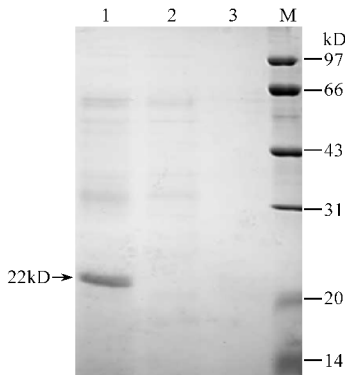


图 2 重组木聚糖酶基因的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Analysis of recombinant xylanase by SDS-PAGE

1. BPX11 induced by xylose ;2. BPX11 without induced ; 3. BP51 induced by xylose ; M. Standard protein molecular weight.

2.3 重组表达的木聚糖酶的性质研究

取重组菌 BPX11 在 LB 培养基中的诱导表达产物进行酶活力测定。同时将短小芽孢杆菌 BP51 接于产酶发酵培养基中 ,37℃ 培养 48h ,培养液经 4000r/min 离心 15min ,取上清液检测木聚糖酶活力 ,作为原始菌株产生木聚糖酶的对照。

2.3.1 重组木聚糖酶作用最适温度和温度稳定性 :在不同温度条件下测定重组木聚糖酶活力 ,发现该酶最适反应温度为 55℃ ,与 BP51 产生的木聚糖酶一致。将重组木聚糖酶液分别在 30℃、50℃ 和 60℃ 温度条件下保温不同时间 ,检测剩余的酶活力。结果表明重组木聚糖酶在 30℃ 的条件下保温 15h 仍具有 100% 的酶活力 ,而在 60℃ 条件下保温 2h 酶活力下降 90% ,稳定性与原始菌株 BP51 产生的木聚糖酶均基本一致。但在 50℃ 条件下 ,重组木聚糖酶保温 2h 酶活力下降 50% ,与原始菌株产生的木聚糖酶下降 10% 相比 ,稳定性有比较明显的下降。

2.3.2 重组木聚糖酶作用最适 pH 和 pH 稳定性 :在不同 pH 条件下分析重组木聚糖酶的活力 ,表明该酶最适 pH 为 6.5 ,与 BP51 产生的木聚糖酶一致。将重组木聚糖酶在不同 pH 值的缓冲液 37℃ 保温 30min ,检测剩余的酶活力 ,发现该酶在 pH10.0 的条件下保温 30min 仍有 60% 的酶活力 ,表明该重组酶有较好的耐碱性 ,并与 BP51 产生的木聚糖酶一致。

2.4 重组工程菌与原始出发菌株的产酶能力比较

分别将重组菌株 BPX11、原始菌株 BP51 接种于产酶发酵培养基中 37℃、225r/min 摇床培养 ,间隔 8h 取样分析培养液上清中的木聚糖酶活力。结果表明 ,重组菌 BPX11 在 8h 时开始产酶 ,在培养 40h 后产酶量可达 968.08 IU/mL 培养物 ,与原始菌株 *B. pumilus* BP51 比较 ,最高产酶活力提高了 87%(图 3)。

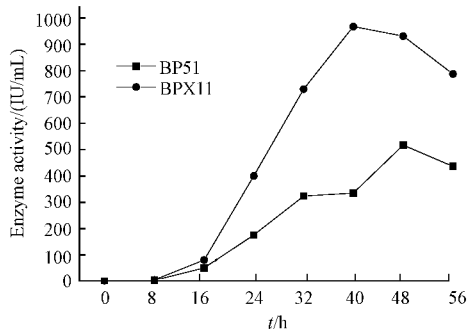


图 3 产酶发酵培养基中的产酶分析

Fig.3 Analysis of xylanase production in fermentation medium

3 讨论

短小芽孢杆菌来源的木聚糖酶具有较高的酶活力和较好的耐碱性 ,因此国内外学者都对该酶进行了大量研究^[10,11] ,该酶基因在 1983 年已得到克隆 ,人们通过各种分子生物技术 ,试图在大肠杆菌、酵母菌中进行了表达^[5,6,12,13] ,但这些表达系统对短小芽孢杆菌木聚糖酶基因的表达能力极低 ,如在大肠杆菌表达系统中 ,短小芽孢杆菌的木聚糖酶表达活力不足 1 IU/mL^[12]。江正兵等^[13]利用毕赤酵母表达系统对短小芽孢杆菌木聚糖酶进行表达 ,但表达活力较低。由于短小芽孢杆菌具有较高的产木聚糖酶能力 ,目前报道的采用各种异源表达系统 ,表达活力都没有明显超越短小芽孢杆菌自身的产酶活力。因此本文采取了同源表达策略 ,将构建好的短小芽孢杆菌木聚糖酶基因表达载体转回到短小芽孢杆菌供体菌中 ,使木聚糖酶基因的表达水平得到明显提高。同源表达可以避免一系列在异源表达过程中发生的问题 ,如易被内源蛋白酶降解、易发生错误折叠等。已报道一些微生物来源的酶基因如漆酶、β-葡萄糖苷酶基因已经采用此方式在原始菌株中获得高效表达^[14,15] ,但在短小芽孢杆菌中通过同源表达来提高木聚糖酶产酶水平在国内外尚属首次报道。

pWH1520 表达系统是带有 *xylA* 启动子的芽孢杆菌表达系统 ,所含有的 *xylA* 启动子为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 木糖异构酶基因的启动子 ,其调控机制已被阐明^[16]。该启动子可被 pWH1520 上 *xylR* 基因的编码蛋白阻遏 ,但在含有木糖而不含葡萄糖的培养基中阻遏被去除 ,启动子被有效诱导。该表达系统属非分泌型表达系统 ,尚未见到利用该系统进行分泌表达报道。本实验通过利用木聚糖酶基因自身核糖体结合位点和信号肽序列成功地实现了 *xynA* 基因的高效分泌表达。在 *xylA* 启动子下诱导产生的重组木聚糖酶最适温度、最适 pH、pH 稳定性等均与原始菌株产生的木聚糖酶性质一致 ,但温

度稳定性有所下降,可能是由于酶液中的不同成份造成的。

短小芽孢杆菌自身的木聚糖酶基因可在富含木聚糖的培养基中被显著诱导,同时木糖也不会抑制短小芽孢杆菌自身木聚糖酶基因的表达^[17]。产酶发酵培养基中含有木糖和木聚糖,可同时诱导 BPX11 内 *xylA* 启动子下重组木聚糖酶基因以及染色体上的自身木聚糖酶基因的表达,BPX11 在产酶发酵培养基中产生的木聚糖酶应为重组表达与自身表达共同产生的。产酶发酵培养基中不含葡萄糖成份,因此不会受到葡萄糖效应的影响。

将工程菌 BPX11 与原始受体菌进行产酶发酵研究,发现工程菌 BPX11 的产酶水平比对照原始菌 BP51 有了大幅度的提高,表明通过本同源表达策略可以显著地提高原始菌的产酶能力,产酶周期也明显缩短,这为该酶的产业化应用奠定了良好基础。

参 考 文 献

- [1] Wong K, Tan L, Saddler J. Multiplicity of in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev*, 1988 **52** 305–317.
- [2] Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56** 326–338.
- [3] Panbangred W, Shinmyo A, Kinoshita S, et al. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agric Biol Chem*, 1983 **47** 957–963.
- [4] Fukusaki E, Panbangred W, Shinmyo A, et al. The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (*xynA*) of *Bacillus pumilus*. *FEBS Letters*, 1984 **171** 197–201.
- [5] Panbangred W, Kondo T, Negoro S, et al. Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *Bacillus pumilus* and their expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1983 **192** 335–341.

- [6] Nuyens F, Zyl W, Iserentant D, et al. Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo-beta-xylanase (*xynA*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001 **56** 431–434.
- [7] Osborn F, Blinder R, Justin R E, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998, 39–40.
- [8] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970 **227** 680–685.
- [9] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426–428.
- [10] Moriyama H, Fukusaki E, Cabrera Crespo J, et al. Structure and expression of genes coding for xylan-degrading enzymes of *Bacillus pumilus*. *Eur J Biochem*, 1987 **166** (3) 539–545.
- [11] Ko E, Akatsuka H, Moriyama H, et al. Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*. *Biochem J*, 1992 **288** (Pt 1) 117–121.
- [12] 刘相梅, 祁 蒙, 吴志红, 等. 短小芽孢杆菌 A-30 耐碱性木聚糖酶基因的分子生物学研究. 应用与环境生物学报, 2001, **7** (1) 61–65.
- [13] 江正兵, 宋慧婷, 马立新. 短小芽孢杆菌木聚糖酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究. 生物工程学报, 2003, **19** (1) 50–55.
- [14] Record E, Asther M, Sigoillot C, et al. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003 **62** (4) 349–355.
- [15] Miettinen-Oinonen A, Suominen P. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. *Appl Environ Microbiol*, 2002 **68** (8) 3956–3964.
- [16] Rygus T, Scheler A, Allmansberger R, et al. Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol*, 1991 **155** (6) 535–542.
- [17] 姜英辉, 刘相梅, 陈士诚, 等. 碱性 β -聚糖酶产生菌选育及产酶条件优化. 应用与环境生物学报, 1999, **5** (4) 404–410.

Secreted Overexpression of Alkali-tolerant Xylanase Gene in *Bacillus pumilus*

LIU Wei-Feng MAO Ai-Jun ZHU Ling-Xiang ZHAO Yun DONG Zhi-Yang*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The xylanase-encoding gene *xynA* was cloned from *Bacillus pumilus* BP51, a xylanase over producer. The *xynA* gene was inserted in *Bacillus* expression vector pWH1520, downstream of *xylA* promoter. The recombinant plasmid pWSX11 was transformed back into the original strain *B. pumilus* BP51 and the recombinant *B. pumilus* BPx11 was obtained. The *xynA* was over expressed and the xylanase was secreted into medium. The xylanase activity produced by recombinant BPX11 had increased about 87% as compared with the original strain BP51. The properties of the recombinant xylanase were characterized.

Key words: Xylanase, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* expression system

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214161); The Knowledge Innovation Project (KIP) of Chinese Academy of Sciences (KJCX2-SW-206-1)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62551206; E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

Received date 06-09-2003