

# 耐碱性甘露聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达

谭秀华<sup>1</sup> 武玉永<sup>2</sup> 马立新<sup>1\*</sup> 蒋思婧<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>湖北大学生命科学学院分子微生物与基因工程实验室 武汉 430062)

(<sup>2</sup>滨州医学院细胞生物学教研室 滨州 256603)

**摘 要** 通过功能平板从土壤中筛选得到含甘露聚糖酶基因的耐碱菌株。构建其基因组文库,从中筛选到甘露聚糖酶基因 TM1 并测序分析,用 BLAST 分析表明, TM1 的氨基酸序列与其他在 GenBank 发表的甘露聚糖酶的氨基酸序列的同源性均低于 60%,故确定其为一个新的甘露聚糖酶基因(GenBank 登录号为 AY623903)。将此基因去除信号肽后的编码序列克隆到表达载体 pHBM905C 上,得到重组质粒 pHBM1201。经 *Sal* I 酶切后分别转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*) KM71、GS115、SMD1168,得到分泌表达的重组毕赤酵母。挑选相对表达量最高的重组毕赤酵母 SMD1168-3 在摇瓶中诱导产酶,对该酶的粗酶进行酶学性质分析表明,其最适反应温度为 55℃,最适 pH 值为 7.5,以魔芋粉为底物所测得的最高酶活为 41.8U,半衰期为 1h,在 80℃保温 5min 其酶活由最初酶活的 77% 下降到 11%,温度下降到 55℃后活性可恢复到最初酶活的 60% 以上。

**关键词** :甘露聚糖酶,克隆,毕赤酵母,表达,酶活

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)04-0543-04

$\beta$ -甘露聚糖酶( $\beta$ -1,4-D-mannan mannohydrolase; EC3.2.1.78)是一类降解甘露聚糖、葡萄甘露聚糖、半乳甘露聚糖和半乳葡萄甘露聚糖的主链  $\beta$ -1,4-D-甘露吡喃糖的酶<sup>[1,2]</sup>,它在利用现存在于一些植物如干椰子肉的胚乳、象牙棕榈树的坚果、瓜尔豆、洋槐、咖啡树以及魔芋的块茎中的各种  $\beta$ -甘露聚糖有着潜在的重要性<sup>[3]</sup>。按其最适 pH 值的不同又有酸性、中性、碱性之分。国内外现主要用于造纸工业纸浆的漂白<sup>[4,5]</sup>、油井的破胶、降解植物胶生产低聚糖用作双歧杆菌促生长因子,防病抗衰老的保健食品以及饲料工业中作为抗营养因子<sup>[6]</sup>。微生物来源的  $\beta$ -甘露聚糖酶具有活力高、成本低、来源稳定、提取方便等明显优点,对于其他种类的  $\beta$ -甘露聚糖酶来说,碱性或耐碱性的  $\beta$ -甘露聚糖酶不仅可以生产用作双歧杆菌促生长因子的低聚糖,而且在需碱性环境的纸浆漂白等工业方面应用更为广泛,因此对微生物来源的碱性或耐碱性  $\beta$ -甘露聚糖酶的研究和开发具有重要的意义。本文主要报道的是克隆到了一个新的耐碱性甘露聚糖酶基因并对其编码的在毕赤酵母中分泌表达的甘露聚糖酶的粗酶进行了相关酶学性质的研究分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**:大肠杆菌 XL10-Gold 购于 Stratagene 公司,巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) SMD1168、GS115、KM71,质粒 pBluescript II SK(+) 购于 Invitrogen 公司,菌株 *Bacillus* sp. 从土壤中取得。pHBM905C 为本实验室保存。

**1.1.2 培养基**:LB、NZY 培养基参照文献[7], YEPD、MD、BMGY、BMMY 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。筛选耐碱的甘露聚糖酶菌株的培养基:LB 固体培养基,用 NaOH 调 pH 值到 10,加 0.5% 的魔芋粉,0.03% 的曲利本兰。

**1.1.3 试剂**:限制酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、dATP、dGTP、dCTP、dTTP, Klenow 大片段等购自 TaKaRa 公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

### 1.2 质粒的抽提和纯化

参照文献[7] 碱法提取,亚精胺法纯化。

### 1.3 总 DNA 的抽提

抽提步骤参照文献[8]进行,但在转移上清后,加等体积的异丙醇或 2.5 倍的无水乙醇之前要加等

基金项目:国家 863 计划(2002AA 2270117);国家“十五”科技攻关(2004BA713B04-05);湖北省自然科学基金(2003ABA118)

\* 通讯作者。Tel:86-27-88666349 86-27-50865627;Fax:86-27-88666349;E-mail:malixin9@hotmail.com

作者简介:谭秀华(1978-),女,山东烟台人,硕士研究生,主要从事分子微生物与基因工程方面的研究。E-mail:tanxh1997@hotmail.com

收稿日期:2004-12-27,修回日期:2005-04-18

体积氯仿混匀, 15000r/min 离心 3min。

#### 1.4 DNA 操作

大肠杆菌的转化参照文献 [7]; 毕赤酵母的转化参照 Invitrogen 公司的酵母操作手册。

#### 1.5 基因 TM1 的 PCR 引物设计和扩增反应

根据 TM1 全基因序列设计一对引物 P1 和 P2。扩增引物: P1 5'-GTCACGGTAGCGGTTCCGCATAT-3'; P2: 5'-GGCCAGGTTCCGCTATGTTTCGTTTAAAA-3'。GTCA 和 GGCC 分别为 P1 和 P2 的 5' 端接头。PCR 反应体系: 模板 < 1 $\mu$ g, 引物 1 和 2 均为 10 $\mu$ mol/L, 各 1 $\mu$ L, 10 $\times$  反应缓冲液 5 $\mu$ L, dNTP (4mmol/L) 5 $\mu$ L, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5 $\mu$ L, *Ex-Taq* DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L) 0.3 $\mu$ L, 补水至 50 $\mu$ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 51 $^{\circ}$ C 0.5min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min。

#### 1.6 SDS-PAGE 分析

具体步骤参照 BIO-RAD 实验手册进行。

#### 1.7 酶活力的检测

吸取 2.4mL 1.0% 的瓜儿豆胶<sup>[9]</sup>溶液 (以 0.2 mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液配制 pH5.8 ~ 8.0 的溶液, 以 0.1mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液配制 pH8.77 ~ 10.57 的溶液) 加入 0.1mL 经 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀的粗酶液, 50 $^{\circ}$ C 水浴反应 30min 后, DNS 法测定酶解液的还原糖基含量<sup>[10]</sup>。酶活力单位定义: 以每分钟生成 1 $\mu$ mol 相当于 D-甘露糖的还原糖所需的酶量为一个酶活力单位 (U)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 含甘露聚糖酶基因片段的克隆和亚克隆

稀释土样 1000 倍, 涂含魔芋粉底物和曲利本兰的 pH11.5 的 LB 平板, 筛选到产生水解圈的菌株, 参照文献 [11] 初步鉴定为 *Bacillus* sp.。抽提此菌株的总 DNA, 用 *Sau*3A I 部分酶切, 胶回收 4 ~ 9kb<sup>[12]</sup> 大小的带, 加 dATP、dGTP, 用 Klenow 大片段部分补平后克隆到经 *Sal* I 酶切, 加 dCTP、dTTP, Klenow 大片段部分补平后的 pBluescript II SK(+) 上, 转化大肠杆菌 XL10-Gold 构建该菌株的基因组文库。从文库中筛选到重组子 3820 个, 其中产生水解圈的有 8 个 (命名为 HBM1001 ~ HBM1008)。8 个目标重组子中以 HBM1003 出现水解圈最早且菌落周围水解圈最大, 因此抽质粒对其所插入片段进行亚克隆得到 5 个重组质粒 (命名为 pHBM1003-1 至 pHBM1003-5), 用 *Bam*H I 单切, 琼脂糖凝胶电泳比较大小, 其

中 pHBM1003-5 所含目的片段 (约 3kb) 最小, 送其到上海博亚公司测序。

### 2.2 甘露聚糖酶基因的测序分析

将所测得的序列用 Genetool 分析, 结果表明所测序列包含一个 960bp 完整的  $\beta$ -甘露聚糖酶基因, 编码一个 319 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其计算分子量为 35.09kD。用 BLASTN 软件<sup>[13]</sup>通过 Internet 进行分析, 该基因的氨基酸序列与在此基因登录之前 GenBank 中已登录的同类基因的氨基酸序列的同源性均低于 60%, 所以判断其为一个新的甘露聚糖酶基因 (GenBank 登录号为 AY623903), 命名为 TM1。通过 Singal V2.0 的分析, 该基因包含一个 30 个氨基酸大小的信号肽, 位于 TM1 序列的前端。

### 2.3 含甘露聚糖酶基因的毕赤酵母表达质粒 pHBM1201 的构建

引物 P1 和 P2 扩增的是 TM1 不带信号肽的片段。将 PCR 扩增的不带信号肽的产物凝胶回收纯化后, 在 dTTP 的保护下经 T4 DNA 聚合酶处理, 与经 *Cpo* I 和 *Not* I 双酶切的毕赤酵母表达载体 pHBM905C 相连, 得到重组质粒 pHBM1201 (图 1)。

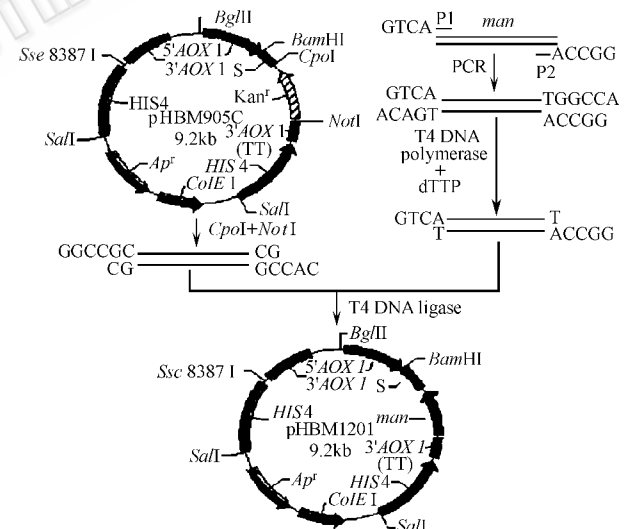


图 1 质粒 pHBM1201 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pHBM1201

### 2.4 甘露聚糖酶基因的分泌表达

将重组质粒 pHBM1201 和 pHBM905C (对照) 用 *Sal* I 酶切, 转化毕赤酵母 SMD1168、KM71 和 GS115 3 种菌株, 涂 MD 平板, 从各种转化子中分别挑选 8 个 (分别编号为 Control-1 至 Control-8; SMD1168-1 至 SMD1168-8; KM71-1 至 KM71-8; GS115-1 至 GS115-8) 进行平板诱导表达, 72h 后观察平板, 除对照外的各转化子周围均有水解圈产生, 即除对照外均为含 TM1 基因的重组质粒。挑取菌体接种于 200mL 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 24h, 离心, 取上清液, 经 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 滤液经 0.22 $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 即为粗酶液。

大的 SMD1168-3、KM71-2 和 GS115-6 点在同一块平板上,通过比较(图 2)选定菌体较小而水解圈最大的 SMD1168-3 菌株进行摇瓶表达,每 12h 加甲醇诱导。在诱导表达 72h 之后该酶活性达最高值为 3.59U,经 SDS-PAGE 检测(图 3),在大约 35kD 处有明显的表达蛋白带,与甘露聚糖酶的计算分子量是一致的。

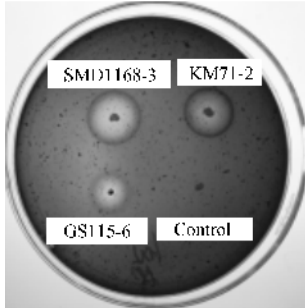


图 2 TM1 基因在 SMD1168, KM71, GS115 中的表达

Fig.2 The expression of TM1 in SMD1168, KM71, GS115

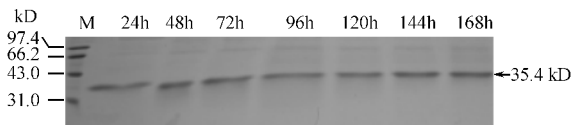


图 3 甘露聚糖酶的 SDS-PAGE 检测

Fig.3 Test of mannanase by SDS-PAGE

## 2.5 TM1 编码的碱性甘露聚糖酶的酶学特征

**2.5.1 pH 对酶活的影响**:分别用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液和碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液配制瓜尔豆胶底物(pH 值分别为 3.0、3.4、4.0、4.4、5.0、5.4、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.77、9.5、10.08、10.57),在 50℃ 反应温度下测定酶活,结果显示该酶的最适 pH 值为 7.5,在 pH6.5 ~ 10.57 范围内该酶的酶活较稳定,在 pH10.57 条件下的酶活是 pH3.0 条件下的 60 倍。

**2.5.2 温度对酶活的影响**:用 pH7.5 的磷酸缓冲液配制瓜尔豆胶底物分别在 35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃ 测定酶活,结果表明该酶的最适反应温度为 55℃,在 55℃ ~ 70℃ 范围内酶活下降缓慢。

**2.5.3 酶的半衰期以及高温对酶活的影响**:在最适温度与最适 pH 值的条件下测定酶活,通过比较确定该酶的半衰期约为 1h;在最适 pH 值的条件下测得 80℃ 时该酶的活性为最适 pH 与最适温度条件下测得的活性的 77%,80℃ 保温 5min 测定酶活,同样的处理之后再在 55℃ 处理 5min、10min、15min 测定酶活,结果表明该酶在 80℃ 处理 5min 后酶活下降到 11%,80℃ 处理 5min 再在 55℃ 反应以及分别处理、

5、10、15、30min 后其相对酶活提升并稳定在 62% ~ 71.3%。

**2.5.4 魔芋粉和瓜尔豆胶对酶活的影响**:用 pH7.5 的磷酸缓冲液配制魔芋粉底物测定酶活,结果表明所测酶活的最高值为 41.8U,与用 pH7.5 的磷酸缓冲液配制瓜尔豆胶底物测定的酶活相比高 10 倍以上。

综上所述,本研究有目的性的从土壤中筛选并克隆了 TM1 这一耐碱性甘露聚糖酶基因并对其酶学特征加以分析。研究发现,魔芋粉比瓜尔豆胶更适合做该酶的底物,在本实验中所测得的最高酶活为 41.8U,如果对其发酵条件加以优化的话,其酶活可能会大幅度提高,本实验室将对其进一步研究。从对该酶在碱性条件和酸性条件下所测得的酶活比较以及酶活随温度不同的变化趋势中可以看出 TM1 所编码的甘露聚糖酶在碱性和高温条件下相对稳定,与文献 [14] 中所表达的同类酶相比更具有耐高温性,尤其是该酶在 80℃ 保温 5min 后再恢复到 55℃ 其活性竟然提高到 60% 以上这个特点非常适合工业生产的要求。

## 参 考 文 献

- [1] Matheson N K, McCleary B V. The *Polysaccharides*. Aspinall G O, eds. Vol. 3. New York: Academic Press, 1985.
- [2] McCleary B V, Matheson N K. Enzymic analysis of polysaccharide structure. In: Tipson R S, Horton D. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. eds. London: Academic Press Ltd, 1986, 147-276.
- [3] Akino T, Kato C, Horikoshi K. Two *Bacillus* beta-mannanases having different COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(12):3178-3183.
- [4] Paice M G, Gurnagul N, Page D H, et al. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14(4):272-276.
- [5] Viikari L, Kantelinen A, Ratto M, et al. Enzyme in biomass conversion. *American Chemical Society*, 1991, 11-21.
- [6] 杨文博, 佟树敏, 沈庆, 等.  $\beta$ -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用. *微生物学报*, 1995, 22(4):204-207.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [8] Ceniz J L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20:2380.
- [9] Yoshida S, Sako Y, Uchida A. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for an enzyme from *Bacillus circulans* K-1 that degrades guar gum. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(3):514-520.

- [ 10 ] Akino T, Kato C, Horikoshi K, *et al.* Characterization of three beta-mannanases of an alkalophilic *Bacillus* sp. . *Agric Biol Chem*, 1988, **52**: 773 – 779.
- [ 11 ] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社 2001.
- [ 12 ] Ethier N, Talbot G, Sygusch J. Gene cloning, DNA sequencing, and expression of thermostable beta-mannanase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**( 11 ): 4428 – 4432.
- [ 13 ] Maruyama Y, Nakajima T. The aman6 gene encoding a yeast mannan backbone degrading 1,6-alpha-D-mannanase in *Bacillus circulans*: cloning, sequence analysis, and expression. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**( 9 ): 2018 – 2020.
- [ 14 ] Ma Y, Xue Y, Dou Y, *et al.* Characterization and gene cloning of a novel  $\beta$ -mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 2004, 1431 – 0651.

## Cloning and expression in *Pichia pastoris* of an alkaline mannanase gene

TAN Xiu-hua<sup>1</sup> WU Yu-yong<sup>2</sup> MA Li-xin<sup>1\*</sup> JIANG Si-jing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Microbiology & Gene Engineering, College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

(<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China)

**Abstract**: A strain containing alkaline mannanase gene was isolated from soil by functional plates and the genome library was constructed. From it a mannanase gene TM1 was acquired and was sequenced. The BLAST analysis showed a lower-than-60% similarity of the amino acid sequence to those in GenBank and proved TM1 to be a new mannanase gene (GenBank accession number AY623903). The new gene without signal peptide was cloned into the *Pichia pastoris* expression vector pHBM905C. The recombinant plasmid pHBM1201 was digested by *Sal* I and transformed into *Pichia pastoris* KM71, GS115, SMD1168, respectively. All of the recombinant *Pichia pastoris* strains containing pHBM1201 secreted functional  $\beta$ -mannanase. Because of its high mass of expression, the recombinant *Pichia pastoris* SMD1168-3 containing pHBM1201 was induced at shake flasks. The optimal temperature and pH of the  $\beta$ -mannanase produced by the recombinant strains were 55°C and 7.5, respectively. The enzymatic activity for konjak powder reached 41.8 with a half life of one hour. After keeping at 80°C for 5min, the enzymatic activity declined from 77% to 11% and the enzymatic activity could recover up to more than 60% when the temperature descended to 55°C.

**Key words**: Mannanase, Cloning, *Pichia pastoris*, Expression, Enzymatic properties

Foundation item: Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA227011); National Key Technologies R&D Program in the 10th Five-Year Plan (2004BA713B04-05); Hubei Province National Natural Science Fund (2003ABA118)

\* Corresponding author. Tel: 86-27-88666349; 86-27-50865627; Fax: 86-27-88666349; E-mail: malixin9@hotmail.com

Received date: 12-27-2004

## 《微生物学报》加入“万方数据”等数字化期刊群的声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

通常在期刊的出版过程中,不可能将其中的一篇撤掉。因此,本刊建议:凡不同意转让光盘版和网络版的作者,改投其他刊物。

读者可上网查询浏览本刊内容,刊物网址: <http://wsxb.periodicals.com.cn>