

# 扣囊复膜孢酵母 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中的克隆与表达

邵金辉 赵 云 毛爱军 朱雅新 董志扬\*

(中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 利用 PCR 技术,从扣囊复膜孢酵母的总 DNA 中扩增得到  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -Glucosidase)基因(*BGL1*),长度为 2596 bp,连接到 pGEM-T 载体上,用限制性内切酶切下目的基因,插入到巴斯德毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中,使之位于  $\alpha$ -因子信号肽下游,且与之同框,构建重组质粒 pSHL9K。通过电转化将重组质粒 pSHL9K 插入到 *Pichia pastoris* GS115 菌株染色体中,获得高效表达 *BGL1* 基因的毕赤酵母重组工程菌株。重组酶的最适温度为 50℃,最适 pH 为 5.4。培养基中  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性最高可达 47U/mL。

**关键词** 扣囊复膜孢酵母  $\beta$ -葡萄糖苷酶 巴斯德毕赤酵母 表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0792-03

纤维素酶系由内切葡聚糖酶(EC3.2.1.4)外切纤维二糖水解酶(EC3.2.1.91)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)3种酶构成。内切葡聚糖酶和外切纤维二糖水解酶把纤维素降解成纤维二糖,进而由  $\beta$ -葡萄糖苷酶分解成葡萄糖<sup>[1,2]</sup>。而  $\beta$ -葡萄糖苷酶在纤维素酶水解过程中为最后一步关键酶,对纤维素糖化水解具有关键性作用,但从微生物所产纤维素酶来看,  $\beta$ -葡萄糖苷酶在纤维素酶系中所占比例很低不足 1%,这使得  $\beta$ -葡萄糖苷酶成为纤维素降解为单糖的瓶颈<sup>[1]</sup>,对  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达,以成为研究纤维素酶催化机制的重要环节之一。到目前为止,已有上百个微生物  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因得到克隆,许多微生物来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因已获得异源表达<sup>[2]</sup>,例如最近 Murray 等<sup>[3]</sup>从嗜热真菌 *Talaromyces emersonii* 中克隆了  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *cel3a*,在里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中表达,并研究了重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶性质。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统作为一种新型的真核基因表达系统,具有目的蛋白表达量高、且具有天然的生物活性,操作简单,以及价格低廉等优点<sup>[4,5]</sup>。因而巴斯德毕赤酵母表达系统为  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的表达提供了一个良好条件,利用酵母表达扣囊复膜孢酵母  $\beta$ -葡萄糖苷酶方面的工作在国内外尚未见报道。

本研究从扣囊复膜孢酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)基因组中克隆了编码  $\beta$ -葡萄糖苷酶的基因(*BGL1*)<sup>[6]</sup>,插入到巴斯德毕赤酵母表达载体 pPIC9K  $\alpha$ -因子信号肽序列下游,且与之同框。通过电转化,获得高效表达 *BGL1* 基因的重组 *Pichia pastoris*。通过优化表达条件,实现了  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的高效表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和试剂**:大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 菌株为本实验室保存。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115[his4]菌株及质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。pGEM-T 载体试剂盒购自 Promega 公司,DNA 回收试剂盒购自鼎国生物技术发展中心,PCR 所用 Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司,PCR 引物合成与 DNA 测序由上海基康生物技术有限公司完成。其它分子生物学试剂购自 Sigma 公司和华美生物工程公司等。

**1.1.2 酵母菌培养基**:YPD 固体培养基(每升含 10g 酵母抽提物,20g 蛋白胨,20g 葡萄糖,15g 琼脂);MD 固体培养基(每升含 13.4g YNB,20g 葡萄糖,4  $\times$  10<sup>-4</sup>g 生物素,15g 琼脂);MM 培养基(每升含 13.4g YNB,4  $\times$  10<sup>-4</sup>g 生物素,5mL 甲醇);BMGY(每升含 10g 酵母抽提物,20g 蛋白胨,1mol/L 磷酸钾,pH6.0,13.4g YNB,10mL 甘油,4  $\times$  10<sup>-4</sup>g 生物素);BMMY(每升含 10g 酵母抽提物,20g 蛋白胨,1mol/L 磷酸钾,pH6.0,13.4g YNB,5mL 甲醇,4  $\times$  10<sup>-4</sup>g 生物素)。

### 1.2 总 DNA 的提取和 *BGL1* 基因的克隆

提取扣囊复膜孢酵母的总 DNA<sup>[7]</sup>,以所提取的 DNA 为模板进行 PCR。引物序列为 5'-CCAGAATTCGTCCCAA TTCAAAACT-3' 和 5'-ATGCCGCCCTCAAATAGTAAACAGG-3',下划线部分序列分别带有限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 的识别位点。50 $\mu$ L PCR 反应体系中含有 0.5 $\mu$ mol/L 每种引物,250 $\mu$ mol/L dNTP 混合物,1  $\times$  PCR 缓冲液,1.25U Pyrobest DNA Polymerase,50ng DNA 模板。PCR 扩增条件:92℃ 5min,94℃

基金项目:国家 863 计划(2001AA214151);中国科学院知识创新方向性课题(KJCX2-SW-206-1)

\* 通讯作者。Tel 86-10-62551206; Fax 86-10-62551296; E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

作者简介:邵金辉(1970-),男,山东省聊城市人,助理研究员,硕士,研究方向为基因工程药物。

其他作者:江 宁

收稿日期:2004-11-06,修回日期:2005-07-11

50s 47°C 50s 72°C 3min30s, 共 30 个循环, 72°C 10min。

### 1.3 重组表达质粒的构建

将 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上, 获得重组质粒 pSHLTV。对 pSHLTV 进行 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的基因片段。对质粒 pPIC9K 进行 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切。连接两种酶切产物, 构建成重组质粒 pSHL9K 并进行酶切及测序鉴定。

### 1.4 受体菌 GS115 感受态细胞的制备和电转化

按照 Invitrogen 公司提供的毕赤酵母操作手册进行, 制备感受态细胞后立即使用。将 80 $\mu$ L 感受态细胞和 10 $\mu$ L DNA 溶液(含 15 $\mu$ g pSHL9K 质粒 DNA 的 *Sal* I 酶切产物)混合, 转入预冷的 0.2cm 电转化杯中, 冰浴 5min。用 Bio-Rad GenePluser 电击(1500V 电压, 25 $\mu$ F 电容, 10ms)后, 立即加入 1mL 冰冷的 1mol/L 山梨醇溶液, 将混合液转入 1.5mL 无菌离心管。取 200 $\mu$ L 涂布于 MD 平板上, 在 30°C 培养 2~4d, 获得 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型转化子。

### 1.5 阳性转化子的鉴定

用无菌牙签挑取 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型转化子, 先后在 MM 和 MD 平板上划线(先划 MM 平板), 30°C 培养 2d。在 MD 上生长正常, 在 MM 上没有生长或生长缓慢的菌株为阳性转化子。

### 1.6 *S. fibuligera* BGL1 基因在毕赤酵母中的表达

将 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型单菌落接种于装有 75mL BMGY 培养基的 500mL 培养瓶中, 28~30°C 摇床培养(250~300r/min) 30h。室温 3000g 离心 5min 收集细胞, 细胞沉淀重悬于 20mL BMMY 液体培养基中, 置于 250mL 培养瓶中 28~30°C 摇床继续培养。每隔 24h 补加蒸发的水分, 并添加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%。诱导 6d 后, 离心, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.7 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性检测

采用二硝基水杨酸比色法测定<sup>[7]</sup>。取 1mL 含 1% 水杨苷(salicin)的 McIlvaine 缓冲液(pH 5.4), 向其中加入 0.5mL 酶溶液, 50°C 反应 30min, 加入二硝基水杨酸 3mL, 煮沸 10min, 加入 16mL 蒸馏水, 在 550nm 处测定吸光度。每分钟分解底物生成 1 $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量为 1 个国际单位(IU)。

## 2 结果

### 2.1 BGL1 基因的克隆和重组质粒 pSHL9K 的构建

PCR 扩增后获得的 *BGL1* 基因长度为 2596bp, 与预计大小相符。PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上, 获得重组质粒 pSHLTV。对 pSHLTV 进行 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切, 回收 *BGL1* 基因片段。对质粒 pPIC9K 进行 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切, 连接 *BGL1* 基因片段, 构建成重组质粒 pSHL9K。重组质粒 pSHL9K 进行 *Bgl* II 单酶切、*Sal* I 和 *Eco*R I 双酶切以及 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 并进行测序。酶切及测序结果表明 *BGL1* 基因被正确地插入到 pPIC9K 质粒中。

### 2.2 阳性克隆的筛选

取 190 个电转化获得的 *P. pastoris* His<sup>+</sup> 型转化子进行甲醇利用型鉴定, 结果表明这些转化子均为 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> 型菌株。用含 G418 的 YPD 平板筛选, 以获得含多拷贝目的基因的菌

株<sup>[8,9]</sup>。G418 浓度分别为 0.5、1、2 和 3mg/mL。最后获得抗浓度为 3mg/mL G418 的重组菌株 9 个, 选择其中一个生长快的菌株 PG-1 进行基因表达分析。

### 2.3 表达产物的酶活性测定及酶活性性质的鉴定<sup>[10,11]</sup>

取重组工程菌株 PG-1 进行培养, BMGY 培养基扩增菌体, 在 BMMY 培养基中甲醇诱导表达 6d。培养基离心后取上清制备粗酶液, 以水杨苷为底物, 用二硝基水杨酸试剂比色法测定粗酶液中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性, 活性可达 47U/mL。SDS-PAGE 分析结果表明, 该菌株能够分泌表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶蛋白, 分子量为 167kD(图 1)。在其它条件一定的情况下, 研究 pH 和温度对酶活性的影响, 结果表明重组酶的最适 pH 为 5.4, 最适温度为 50°C。将重组酶分别在 30~60°C 范围内的不同温度下保温 30min, 测定剩余酶活性, 结果重组酶在 30~50°C 之间稳定。由此可见, 重组酶与来源于 *Sacchromycopsis fibuligera* 菌株的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的性质基本一致<sup>[5]</sup>。

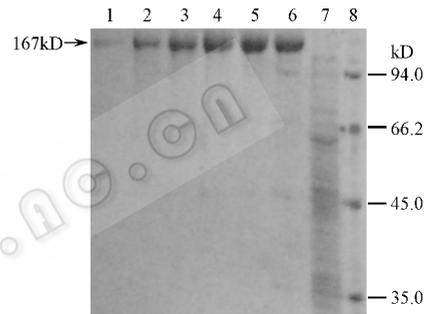


图 1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expressed products

1~6. Culture supernatant of induced *Pichia pastoris* PG-1 from 1 to 6 days; 7. Culture supernatant of induced *Pichia pastoris* transformed with pPIC9K for 6 days (condensed for ten times); 8. Molecular weight standard.

## 3 讨论

在自然界中有丰富的纤维素资源, 许多微生物可产生各种纤维素酶将纤维素降解, 利用纤维素为碳源进行生长, 而人类对这一巨大资源的有效利用是非常少的, 由于当今世界粮食和能源的短缺使可再生的植物纤维资源的开发和利用更加受到重视, 而传统的化学法降解纤维素有许多不利之处, 如反应条件剧烈、设备昂贵、后处理存在环境污染等问题, 因此利用微生物及其产生的酶降解纤维素成为当前生物学研究领域的热点。在降解纤维素所需的 3 种酶中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶所占比例最小, 这直接影响了纤维素酶系的水解效率。因此利用基因工程技术, 使  $\beta$ -葡萄糖苷酶高效表达, 有助于提高纤维素的利用率。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是一种优良的外源真核基因表达系统, 其表达质粒具有 AOX1 强启动子, 基因表达效率较高, 可用甲醇进行简易、精确的调控, 蛋白产物能够进行正确的翻译后加工和修饰, 而且可以进行高密度细胞发酵和大规模生产, 因此我们采用该表达系统对  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因进行克隆和表达<sup>[8]</sup>。

本项研究成功地获得了能够高效分泌表达  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的重组 *P. pastoris* 菌株。对其中重组 PG-1 菌株的研究表明,培养基中分泌表达的总蛋白量可达 9g/L 左右,SDS-PAGE 显示培养基中只有重组酶蛋白一条带,有利于对重组酶进一步分离和纯化。对重组 *P. pastoris* 菌株进行高细胞密度发酵和大规模生产,可以进一步提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶的生产量,有关研究我们将作进一步报道。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, *et al.* Molecular cloning and expression of the novel fungal  $\beta$ -Glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochem*, 1999, **125**: 728 - 736.

[ 2 ] Bhatia Y, Mishra S, Bisaria V S. Microbial beta-glucosidases: Cloning, properties, and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, **22**: 375 - 407.

[ 3 ] Murraya P, Arob N, Collinsa C, *et al.* Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*, 2004 **38** 248 - 257.

[ 4 ] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1993, **11** 905 - 910.

[ 5 ] Lache Y, Store V, Meutter J D, *et al.* High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1994, **12**: 1119 - 1124.

[ 6 ] Machida M, Ohtsuki I, Fukui S, *et al.* Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular  $\beta$ -Glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 3147 - 3155.

[ 7 ] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 第一版. 北京:科学出版社, 1998.

[ 8 ] Scorer C A, Clare J J. Rapid selection using G418 of high copy number transformant of *Pichia pastoris* for high level foreign gene expression. *Bio/Technology*, 1994, **2**: 181 - 184.

[ 9 ] 李忠兴,焦旭东,郝志军. 康宁木霉液体深层发酵生产纤维素酶. *微生物通报*, 1999, **26**: 403 - 405.

[ 10 ] Clare J J, Rayment F M. High-level expression of Tetanus toxin fragment c in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*, 1991a, **9**: 455 - 460.

[ 11 ] Clare J J, Romanos M A, Rayment F M, *et al.* Production of epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene*, 1991b, **105**: 205 - 221.

## Expression of $\beta$ -Glucosidase gene of *Sacchromycopsis fibuligera* in *Pichia pastoris*

SHAO Jin-hui ZHAO Yun MAO Ai-jun ZHU Ya-xin DONG Zhi-yang\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract**: A  $\beta$ -Glucosidase gene (*BGL1*) was amplified with PCR from the total DNA of *Sacchromycopsis fibuligera*, and was linked with pGEM-T vector. After cut down by restriction enzyme from pGEM-T vector, *BGL1* was inserted into the expression vector pPIC9K of *Pichia pastoris* in reading frame with  $\alpha$ -factor secreting signal peptide sequence to construct the recombinant plasmid pSHL9K. The recombinant plasmid pSHL9K was transformed into *Pichia pastoris* GS115 with electroporation. The recombinant *Pichia pastoris* strains which could efficiently secret recombinant  $\beta$ -Glucosidase were selected. The optimum temperature of the recombinant  $\beta$ -Glucosidase was 50°C, and the optimum pH was 5.4. The activity of  $\beta$ -Glucosidase could reach to 47U/mL in the culture medium.

**Key words**: *Sacchromycopsis fibuligera*,  $\beta$ -Glucosidase, *Pichia pastoris*, Expression

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA214161); The Knowledge Innovation Project (KIP) of Chinese Academy of Sciences (KJ9X2-SW-206-1)

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62551206; Fax: 86-10-62551296; E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

Other author: JIANG Ning

Received date: 11-06-2004