

海栖热袍菌内切葡聚糖酶 Cel12B 与木聚糖酶 XynA CBD 结构域融合基因的构建、表达及融合酶性质分析

李相前^{1,2} 邵蔚蓝^{1,3*}

(¹ 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

(² 淮阴工学院生化学院 淮安 223001) (³ 南京师范大学生命科学院 南京 210097)

摘 要 海栖热袍菌内切葡聚糖酶 Cel12B 是极耐热胞外酶,氨基酸序列分析表明不含有纤维素结合结构域(CBD),对结晶纤维素无活性,但同样菌种来源的木聚糖酶 XynA 有催化结构域和纤维素结合结构域。用同样极耐热酶 CBD 区域和 Cel12B 融合构建重组质粒 pET-20b-Cel12B-CBD,经诱导表达后,对结晶纤维素有活性。酶学特性研究表明:最适反应温度为 100℃、最适 pH 为 5.8、在 pH4.5~7.0 时酶活力稳定,90℃保温 2h 仍有 87% 的酶活。

关键词: 海栖热袍菌 纤维素结合域 内切葡聚糖酶 基因融合

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)05-0726-04

纤维素是植物细胞壁主要结构多糖,由 D 葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接成的线性大分子。纤维素资源是世界上最大的可再生资源,它的降解对解决能源危机、环境污染、粮食短缺等有重要意义。内切葡聚糖酶是纤维素降解酶系中的重要一员,纤维素的降解首先由内切葡聚糖酶随机切割 β -1,4 主键,进而由纤维二糖酶和 β 葡萄糖苷酶完成彻底降解^[1]。自纤维素酶发现以来,有关纤维素酶研究一直是科学界热点,迄今为止已有上百种来源于真菌、细菌的内切葡萄糖酶、纤维二糖酶和葡萄糖苷酶相继被纯化、克隆、表达。在酶的生化特性中,热稳定性是其重要性质之一^[2]。

海栖热袍菌是生活在海底火山口的严格厌氧极端嗜高温菌,因此很难用作工业生产菌种,采取基因工程方法,用常用的宿主表达基因是生产极端嗜高温菌耐热酶的一条合理途径。目前已纯化和表达过的来源于极端嗜热菌 *Thermotoga maritima* 内切葡聚糖酶对天然纤维素没有降解能力^[3,4],这些酶的结构中只有催化结构域缺少纤维素结合域。来源于真菌纤维素酶结构研究相当多,其中瑞氏木霉 *Trichoderma reesei* 内切葡聚糖酶三维结构已清楚,由催化结构域(CD)、纤维素结合结构域(CBD)和连接桥 Link 组成^[3]。有关常温纤维素酶 CBD 融合表达研究报道较多,但由于缺乏热稳定性高的 CBD 区域极耐热酶 CBD 融合表达鲜有研究,虽然 CBD 准确的生物学功能不清楚,但 CBD 能够提高底物在酶周边

的浓度或破坏底物多糖结构进而增强了催化能力^[4~6]。本研究 *T. maritima* 内切葡聚糖酶 cel12B 与同样来源木聚糖酶 A 的 CBD 融合表达^[7,8],以期极耐热酶的应用研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109, JM109B(DE3)购于 Promega 公司; *T. maritima* 购自美国菌种保藏中心,编号为 ATCC43589;质粒 pET-20b 购于 Novagen 公司。

1.1.2 酶和试剂:Pyrobest 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量等购于 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司;氨苄青霉素、IPTG 购自 Sigma 公司。

1.2 海栖热袍菌基因组 DNA 的提取

在除氧充氮条件下配制培养基,分装于 100mL 预先充氮的血清瓶中,加盖密封并灭菌。用注射器按 0.5%(V/V)接种量接种,80℃静置培养 8~12h,收集细胞,于 16℃环境下可保存半年^[4]。

1.2.1 细胞制备及裂解:80℃静置培养 *T. maritima* 8h 取 500mL 菌液,在 5000g 离心 10min,收集细胞。用 9.5mL TE 缓冲液重悬菌体,加入 0.5mL 10% SDS 和 50 μ L 蛋白酶 K(20mg/mL),混合均匀,37℃保温 1h。

1.2.2 DNA 的提取:参考文献 [4] 的方法进行。

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金项目(05KJB180006)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-83598838 E-mail: wlsbao@jsmail.com.cn

作者简介:李相前(1965-)男,江苏盐城人,副教授,博士研究生,研究方向为微生物基因工程。E-mail:xiangqianli2002@163.com

收稿日期:2005-11-01 接受日期:2006-02-22 修回日期:2006-03-28

1.3 融合基因的构建

基因扩增引物按 GenBank 报道的内切葡聚糖酶 Cel12B 序列和木聚糖酶 A 的 CBD 区域序列设计 4 条引物序列分别为引物 1: 5'-GGAATTCATATGACGAGCGTTGGTGAACGG-3'; 引物 2: 5'-AAGACC TCAGGTTTTACAACCTTCGACAGAGAAGTCC-3'; 引物 3: 5'-GAAGTTGTA AAA CCTGAGGTCCTCCACCAC-3'; 引物 4: 5'-CCCAAGCTTATTACTCGAGCTTGATGAGCCTGAGGTTACC-3'。黑体表示酶切位点, 斜体表示搭头区域。内切葡聚糖酶 Cel12B 基因由引物 1 和引物 2 配对通过 PCR 扩增获得, 在引物 2 带有木聚糖酶 A 的 CBD 区域上游片段序列, 木聚糖酶 XynA 的 CBD 基因由引物 3 和引物 4 配对通过 PCR 扩增获得, 扩增条件均为: 95°C 5min, 94°C 50s, 60°C 1.5min, 72°C 3min, 35 个循环, 72°C 10min。在引物 3 的上游带有内切葡聚糖酶 Cel12B 下游基因片段序列。融合基因合成按以下方法进行, 首先分别合成亲本基因, 然后以引物 1 和引物 4 配对, 两个亲本基因 PCR 产物为模板, 扩增条件: 95°C 5min; 94°C 50s, 65°C 1.5min, 72°C 3min, 35 个循环, 72°C 10min; 融合基因构建方式见图 1。

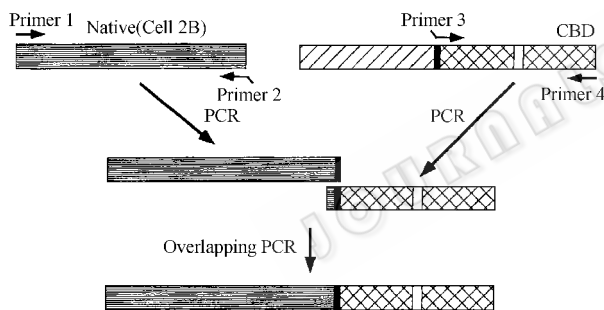


图 1 融合基因构建图

Fig. 1 Construction of chimeric gene.

1.4 重组质粒构建

融合基因 PCR 扩增结束后, 电泳检查并将 PCR 产物回收, 用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切并经纯化, 以适当比例与同样双酶切的 pET-20b 载体混合, 加入连接酶, 16°C 过夜, 连接液转化 JM109, 在 Amp 平板上挑取转化子, 获得重组质粒 pET-20b-*Cel12B-CBD*。

1.5 融合基因在 pET-20(b) 表达载体中的表达

重组蛋白表达参考文献[4], 培养结束后, 取 1mL 菌液, 以 12000r/min 离心 1min 收集菌体, 用 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA pH 7.6) 洗涤细胞两次, 并用 500 μ L 20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 重悬细胞, 超声波破碎 30s 4 次。12000r/min、4°C 离心 15min 去除细胞碎片沉淀, 取上清于 70°C 下热处理 30min 后, 9600g、4°C 离心 30min, 上清液为粗酶液。蛋白质浓度测定采用 Bradford 方法^[4]。

1.6 葡聚糖酶酶活的测定

加酶液 100 μ L 和 50 μ L 0.1mol/L pH 6.0 的咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液, 350 μ L 水, 500 μ L CMC 底物, 85°C 反应 10min 后, 加 2mL 终止剂 DNS 煮沸 5min 冷却后测 A_{520} 值。酶活单位 (U) 的定义: 在 85°C 下, pH 6.0, 1 分钟内催化产生 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量。

配制 0.4mg/mL 葡聚糖溶液母液, 然后用不同浓度梯度的葡萄糖与 DNS 反应, 最后测溶液在每次反应后的 A_{520} 值。在一定范围内, 葡萄糖的浓度与吸光度值呈线性关系。

1.7 融合蛋白酶学特性

1.7.1 最适反应温度的测定: 在 65~105°C 范围内, 每隔 5°C, 与底物反应 10min 分别测定酶活 (105°C 酶活测定: 反应液密封在高压灭菌锅中升到预定温度维持 10min, 取出后迅速置冰浴, 测定所形成还原糖量)。以酶活最高为 100%, 其余酶活与之相比计算相对酶活。

1.7.2 最适反应 pH: 在 pH 4.5~8.0 范围内, 缓冲液是 0.1mol/L 咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液, 与底物反应 10min 分别测定酶活。以酶活最高为 100%, 其余酶活与之相比计算相对酶活。

1.7.3 温度稳定性: 在相对稳定的 pH 5.8 下, 使酶在某个温度下保温不同的时间, 再测定相对酶活, 以未保温 (4°C 保存) 的酶样活性为 100%, 确定酶的温度稳定性。

1.7.4 pH 稳定性: 酶在不同的 pH 条件下保温相同的时间, 再分别测定残留酶活性, 与不保温酶的酶活相比, 计算百分比。缓冲液的选择同上。

1.7.5 底物专一性测定: 以燕麦木聚糖、CMC、Barley- β -glucan、p-nitrophenyl 为底物, 融合酶底物特异性测定方法与重组亲本酶测定方法相同。

2 结果

2.1 融合基因构建

天然纤维素是吡喃葡萄糖基由 β -1,4 糖苷键连接而成的线性分子链, 并进而藉氢键形成螺旋状和聚集成为超分子结构聚合物, 分子链有序排列为结晶区, 松弛无规则聚集为无定形区, 是一两相共存的体系。为了考察 CBD 对极耐热内切葡聚糖酶作用天然纤维素的影响, 我们尝试用 *T. maritima* 的木聚糖酶 XynA 的连接区和 CBD 区域融合到 Cel12B 的 C 端, 构建了融合基因, 琼脂糖凝胶电泳显示获得了预期大小, Cel12B 片段 759bp, CBD 片段 1101bp (经测序验证序列无误)。

2.2 融合基因的表达

重组质粒 pET-20b-*Cel12B-CBD* 转化至大肠杆菌

菌 JM109(DE3),经 IPTG 诱导 4h 后 ,收集菌体细胞超声波破裂 ,热处理后取上清进行 SDS-PAGE(分离胶的浓度为 10%)。从电泳图谱上可以看出 ,融合蛋白在相对分子质量 68kDa 处有明显的蛋白表达条带(图 2)。

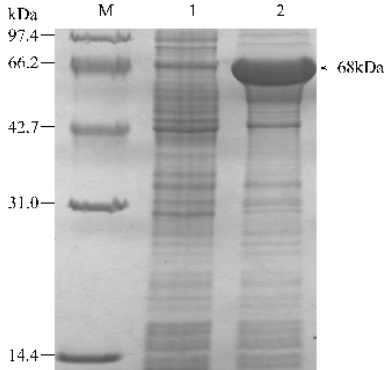


图 2 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of chimeric enzyme after induced expression. M, protein marker ;1. Crude extract of induced *E. coli* JM109(DE3) pET-20b ;2. Crude extract of induced *E. coli* JM109(DE3) pET-20b-Cel12B-CBD.

2.3 融合蛋白酶学特性

2.3.1 重组内切葡聚糖酶的最适反应 pH 的确定 :将重组内切葡聚糖酶与底物 CMC 在不同 pH 值条件下 ,100℃ 反应 10min 以酶活最高为 100% ,其余酶活与之相比计算相对酶活。

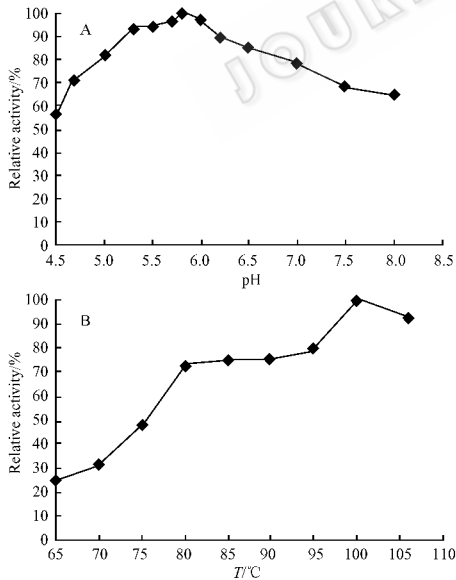


图 3 pH(A) 和温度(B)对酶活的影响

Fig.3 The optimal pH(A) and temperature(B) of chimeric enzyme.

2.3.2 重组内切葡聚糖酶的最适反应温度的确定 :将重组内切葡聚糖酶与底物 CMC 在不同温度条件下 ,100℃ 反应 10min ,以酶活最高为 100% ,其余酶活与之相比计算相对酶活。

2.3.3 重组内切葡聚糖酶的 pH 稳定性分析 :酶在不同的 pH 条件下 90℃ 保温 2h ,再分别测定残留酶活性与 4℃ 保温的酶活相比 ,计算百分比。结果表明 :最适 pH 为 5.8 ,pH 大于 6.5 后 ,酶活急剧下降。

2.3.4 重组内切葡聚糖酶的温度稳定性分析 :在 pH5.8 下 ,使酶在 90℃ 和 100℃ 温度下保温不同的时间 ,以未保温(4℃ 保存)的酶样活性为 100%。结果表明 :90℃ 保温 2h 仍有 87% 的酶活 ,100℃ 保温 2h 仍有 42% 的酶活。

2.3.5 底物特异性 :重组酶对 Barley β -glucan、CMC、*p*-nitrophenyl、Oat spelt xylan 都能分解 ,对 Avicel 无活性。融合酶对所有试验底物均检出活性 ,表现出对结晶纤维素一定分解能力。底物专一性测定用粗酶 ,酶的实际比活应高于粗酶比活。

表 1 重组内切葡聚糖酶 cel12B 和融合酶底物特异性

Table 1 Substrate specificity of *T. maritima* endoglucanase

Substrate	cel12B and chimeric enzyme	
	Recombinant Cel12B-CBD ^a Specific activity(U/mg)	Recombinant Cel12B ^b Specific activity(mU/mg)
Barley β -glucan	242.7	2905
CMC	86.3	890
<i>p</i> -nitrophenyl	4.6	50
Avicel	0.24	0
Oat spelt xylan	39.4	8

^a Assays were performed at substrate concentration of 4mmol/L *p*-nitrophenyl β -D-cellobioside , 1% (W/V) non-soluble polymeric substrates or 0.5% (W/V) soluble polymers in 100mmol/L potassium dihydrogen phenylate-imidazole buffer pH 6.0 , at 85℃ using an enzyme concentration of 3 μ g/mL(crude enzyme extract). Incubation was carried out for 10 ~ 60min for Barley β -glucan , CMC , *p*-nitrophenyl , 10h for xylan and Avicel. ^b Data reported by Liebl. W , et al. (1996)^[4].

融合前的重组亲本酶 Cel12B 最适作用温度 85℃ ,最适作用 pH6.0 ,温度稳定性方面为 90℃ 半衰期 9h(粗酶液)^[4]。融合酶酶学特性表明 :最适反应温度 100℃、最适 pH 为 5.8、在 pH4.5 ~ 7.0 酶活力稳定 ,90℃ 保温 2h 仍有 87% 的酶活。融合酶表现出最适反应温度有较大提高 ,最适反应 pH 稍有改变 ,温度稳定性与亲本酶无明显差异 ,底物特异性上对结晶纤维素有一定的分解能力 ,较亲本酶有质的改变 ,为极耐热纤维素酶对天然纤维素生物转化研究提供基础。

3 讨论

海栖热袍菌生活环境是在海底火山口 ,Cel12B 和 Cel74B 带有信号肽分泌到胞外 ,以大分子可溶性多聚糖为底物提供细胞能源 ,分解产物是寡多糖 ,转移到细胞内可被其它内切葡聚糖酶如 Cel5A 和 Cel12A 等进一步降解 ,这是 *T. maritima* 能够以大分子葡聚糖为底物生长的原因 ,同时也表明这些胞外葡聚糖酶并没有分解天然纤维能力^[9,10]。过去一般认为 :在天然纤维素降解过程中 ,内切酶首先随机

水解纤维素无定形区,暴露出更多的非还原性末端链,为外切酶的作用提供条件。但它无法解释结晶纤维素的酶解是怎样进行的,而这又是纤维素降解的关键。纤维素结合结构域 CBD 具有破坏纤维素超分子结构这一功能发现,表明 CBD 区域是天然纤维素被有效酶解的关键所在,本实验结果也证明这一推测^[4,9]。有关 CBD 结构和内切葡聚糖酶的融合有许多研究,有些研究是关于 CBD 分别接在内切葡聚糖酶的 N 端或 C 端,有些研究是串联 2 个甚至更多 CBD 区域,CBD 数量对于融合蛋白提高作用于天然纤维素能力一般呈正相关,但涉及到的 CBD 结构域均来自常温微生物,有关极耐热纤维素酶 CBD 融合鲜有报道,这主要由于极耐热 CBD 区域来源少。本实验获得的融合酶具有分解天然纤维素能力,但分解能力较弱,进一步研究可从 CBD 区域来源和串联表达研究着手,同时对于极端嗜热菌来源 CBD 与常温菌来源 CBD 作用于天然纤维素的差异也有待研究。

参 考 文 献

[1] Glazer AN, Nikaido H. Microbial Biotechnology. New York : W. H. Freeman and Company, 1995.
[2] 汪天虹,王春卉,高培基. 纤维素酶分子的纤维素吸附区的结构与功能. 生物工程, 2000, 20(2): 37-40.
[3] Kraulis J, Clore GM, Nilges M, et al. Determination of the three-

dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 1989, 28: 7241-7257.

[4] Chhabra SR, Kelly RM. Biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel74 with and without acarbohydrate binding modul(CBM). *FEBS Letters* 2002, 531: 375-380.
[5] Din N, Gilkes NR, Tekant B, et al. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding domain of a bacterial cellulose. *Biol Technol*, 1991, 9: 1096.
[6] Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, et al. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J*, 1994, 298: 705.
[7] Huber R, Langworthy TA, Konig H, et al. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90°C. *Arch Microbiol*, 1986, 144: 324-333.
[8] Winterhalter C, Heinrich P, Candusso A, et al. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbio*, 1995, 15(3): 431-444.
[9] Mangala SL, Kittur FS, Nishimoto M, et al. Fusion of family VI cellulose binding domain to *Bacillus halodurans* xylanase increases its activity and substrate-binding capacity to insoluble xylan. *Mol Catalysis*, 2003, 21: 221-230.
[10] Chhabra SR, Shockley KR, Ward DE, et al. Regulation of endo-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 545-554.

The construction of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel12B fused with CBD and the characterization of chimeric enzyme

LI Xiang-qian^{1,2}, SHAO Wei-lan^{1,3*}

(¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

(² School of Life Science, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

(³ School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: *Thermotoga maritima* is strictly anaerobic and extremely thermophilic bacteria. The endoglucanase found in *T. maritima* showed extremely high thermostability and considerable potential in industrial application. Endoglucanase (Tm) Cel12B is extracellular enzyme. Tm Cel12B did not contain a cellulose-binding domain (CBD) and lacked activity on crystalline cellulose. Tm XynA is composed of catalytic domain (CD) and cellulose-binding domain (CBD). As such, the gene of CBD from Tm XynA was fused at the carboxyl-terminus of Tm Cel12B and recombinant plasmid pET-20b-Cel12B-CBD was obtained. The recombinant plasmid pET-20b-Cel12B-CBD was transformed to *E. coli* JM109 (DE3), induced by IPTG. The properties of chimeric enzyme were determined. The chimeric enzyme displayed pH activity and stability profiles similar to those of parental enzyme with optimal pH 5.8. The optimal activity of the chimera was observed at 100°C and the enzyme kept 87% of original enzyme activity after incubated at 90°C for 2h. A notable feature on substrate specificity is that the chimeric enzyme has the capacity to hydrolases crystalline cellulose.

Keywords: *Thermotoga maritima*; Carbohydrate binding domain; Endoglucanase; Gene fusion