

耐碱性木聚糖酶基因在巨大芽孢杆菌中的表达及其酶学性质

包怡红¹, 刘伟丰³, 何永志², 董志杨^{2*}

(¹ 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

(² 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

(³ 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 【目的】从耐碱性木聚糖酶高产短小芽孢杆菌中克隆得到带有自身启动子的木聚糖酶基因, 将其在巨大芽孢杆菌中进行表达, 并对表达产物进行性质分析。【方法】将克隆得到的木聚糖酶基因 *xynA* 以及带有自身启动子序列的结构基因, 构建在芽孢杆菌表达载体 pWH1520 和改造后的载体 pWG03 中, 得到重组质粒 pWTEJX 和 pWGXYN, 分别转化到巨大芽孢杆菌 BM70 中, 获得重组巨大芽孢杆菌 BMJXH9 和 BMGpp12; 经过诱导产酶培养, 均得到分泌表达。【结论】重组巨大芽孢杆菌 BMGpp12 比 BMJXH9 产酶活力提高了 3 倍, 重组表达的木聚糖酶的酶学性质研究表明其仍具有很好的耐碱性, 这为木聚糖酶的进一步应用研究提供了重要的理论依据。

关键词: 木聚糖酶; 巨大芽孢杆菌; 芽孢杆菌表达系统

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)10-1353-07

木聚糖酶作为一种多酶体系广泛的存在于各种微生物中, 在近年来的研究历程中, 科学家们已从不同来源的微生物中分离到大量的不同类型和功能的木聚糖酶^[1,2], 并对其酶学性质、催化机制以及分子结构也有了比较详尽的研究。随着生物技术的不断发展和进步, 特别是基因工程技术和蛋白质工程技术的广泛应用, 对木聚糖酶的了解更加深入, 已经分离出多种木聚糖酶基因, 并出现多种木聚糖酶产品。尤其是具有特殊性质的木聚糖酶更是受到不同应用行业的青睐^[3]。

自 20 世纪 80 年代初开展木聚糖酶基因的研究工作以来已有上百种来自细菌和真菌的木聚糖酶基因被克隆并得到表达。木聚糖酶基因克隆工作所用的始发菌株大多数为细菌^[4], 研究外源木聚糖酶基因表达和调控机制的受体菌也主要为大肠杆菌。芽孢杆菌具有非致病性、分泌蛋白能力强的特性和良

好的发酵基础, 是目前原核表达系统中分泌表达外源蛋白较理想的宿主^[5]。国内外对芽孢杆菌作为宿主菌研究较多的是枯草杆菌, 其它芽孢杆菌的报道却很少。本文从耐碱性木聚糖酶高产菌株中克隆得到 *xynA* 基因, 并且利用该基因上游携带启动子构建表达载体, 通过原生质体转化法, 在巨大芽孢杆菌中成功地实现了分泌表达。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、短小芽孢杆菌 *B. pumilus* BP51、巨大芽孢杆菌 BM70 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 培养基和溶液: LB 培养基见文献^[6]; AB₃ 培

* 通信作者。E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

作者简介: 包怡红(1970-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 副教授, 研究方向为食品生物技术和食品微生物。E-mail: baoyihong@163.com

收稿日期: 2009-06-23; 修回日期: 2009-07-21

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 20 g ,酵母膏 20 g ,木糖 5 g ,pH6.5 ,抗生素四环素工作浓度为 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 国公司 ;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 大肠杆菌的 DNA 操作

质粒提取、DNA 的酶切、电泳、CIP 脱磷反应、DNA 片段连接、转化大肠杆菌均参照文献^[6]进行。

1.3 芽孢杆菌 DNA 的操作

1.3.1 芽孢杆菌的总 DNA 提取 :参照文献^[6]的方

P31 5'- CGG GATCC TAA AATG A A AAAGGAG AG GA ATG -3' ;

*Bam*HI I II

P32 5'- CGG GATCCTTAGTTGCCAATAAACAG-3'。

*Bam*HI

其中 P31 上游带一个终止子 TAA(I)和一个核糖体结合位点(II),两引物均带一个 *Bam*HI 酶切位点。以短小芽孢杆菌 BP51 总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L,含有 50 ng DNA ,0.2 mmol/L dNTP ,25 pmol 每种引物 ,1 \times PCR 反应缓冲液 2.5 U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 :93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后 ,93 $^{\circ}$ C 变性 50 s ,51 $^{\circ}$ C 退火 1 min ,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min ,进行 35 个循环 ;然后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将 PCR 扩增产物经 DNA 快速回收试剂盒回收。

1.4.2 带有自身启动子编码序列 *xynA* 基因的扩增 :实验室通过 TAIL-PCR 的方法 ,从保存的木聚糖酶高产短小芽孢杆菌 BP51 中得到含有上、下游调控序列的 *xynA* 基因 ,将其构建在 pGEM-Teasy 上 ,转化 DH5 α ,得到菌株 pGEM-GJF12 ,进行测序 ,根据测序结果 ,设计并合成如下 PCR 引物 ,两条引物均带一个 *Bgl* II 酶切位点 :

P39 ,5'-GAAGATCTCCTCATGCAGATTCAGTCAT-3' ;

Bgl II

P310 5'-GAAGATCTAACGAGGGCCTTTCGAAGAT-3'

Bgl II

法从短小芽孢杆菌 BP51 中提取基因组 DNA。

1.3.2 芽孢杆菌原生质体的制备 :从斜面上将芽孢杆菌 BM70 接种于 AB₃ 培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 培养过夜 ,以 2% 的接种量接于 5 mL AB₃ 培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 值为 1.0 ,3000 \times g 离心 15 min ,菌体用 0.5 mL SMMP 液重悬 ,加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL ,37 $^{\circ}$ C 保温 ,一定时间取样镜检 ,观察原生质体的形成情况。待观察到菌体全部转变成原生质体时 ,3000 \times g 离心 15 min 沉淀原生质体。再用 500 μ L SMMP 液洗一遍后 ,3000 \times g 离心 15 min ,重悬于 0.5 mL 的 SMMP 液中。

1.4 耐碱性木聚糖酶基因的克隆

1.4.1 结构基因的克隆 :根据已报道的 *xynA* 结构基因序列^[7] ,设计并合成 PCR 引物 ,克隆基因带有自身信号肽编码序列。两条引物的 5' 端分别设计了单一的 *Bam*HI 酶切位点。

以短小芽孢杆菌 BP51 总 DNA 为模板 ,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L ,含有 50 ng DNA ,0.2 mmol/L dNTP ,25 pmol 每种引物 ,1 \times PCR 反应缓冲液 2.5 U Taq DNA 聚合酶。反应条件为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后 ,94 $^{\circ}$ C 变性 50 s ,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min ,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min ,进行 35 个循环 ;然后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。将 PCR 扩增产物经 DNA 快速回收试剂盒回收 ,连接到 pGEM-T Easy 上 ,转化 DH5 α ,筛选获得阳性克隆 ,得到 pGEM - TKXY1。

1.5 芽孢杆菌表达载体的改造

将由 MoBiTec 购买的芽孢杆菌表达载体 pWH1520 进行改造。用 *Hin* III 限制内切酶除去载体自身的启动子 ,重新连接 ,转化 *E. coli* DH5 α ,获得新的无启动子的芽孢杆菌表达载体 pWG03。

1.6 重组表达载体的构建

将 pGEM-TEJ2 质粒用 *Bam*HI 酶切得到带信号肽序列 *xynA* 基因片段 ,连接到芽孢杆菌表达载体 pWH1520 的多克隆位点 *Bam*HI 上 ;同时将 pGEM-TKXY1 用 *Bgl* II 酶切得到带有自身启动子序列的 *xynA* 基因片段 ,连接到芽孢杆菌表达载体 pWG03 ,转化 DH5 α 酶切、PCR 鉴定重组表达载体及其插入

方向。

1.7 表达产物的分析和鉴定

参照 Laemli^[8]方法利用 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 0.1 mL 稀释的酶液,加入到 0.1 mL 用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH6.5)配成的 1% 木聚糖溶液中,50℃ 反应 10 min,加入 0.6 mL DNS 试剂,煮沸 10 min,用水定容至 5 mL 后测 550 nm 光吸收,以每分钟生成 1 μmol 木糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(IU)。

1.8 重组木聚糖酶基因的诱导表达

将重组芽孢杆菌接入含四环素的 LB 培养基中 37℃ 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,分别加入木糖和麸皮浸提液到终浓度 0.5%,诱导培养一定时间,室温下 3000 × g 15 min 离心收集上清。

1.9 发酵培养

将重组芽孢杆菌接于 2 mL LB 培养基中 37℃ 培养过夜,以 2% 的接种量转接于 50 mL 产酶培养基中,37℃ 220 r/min 摇床培养。间隔一定时间取样分析木聚糖酶活性。

2 结果

2.1 带有信号肽编码序列 *xynA* 基因的扩增

从短小芽孢杆菌 *B. pumilus* BP51 中提取基因组 DNA,大小约为 20 kb。以 *B. pumilus* BP51 的总 DNA 为模版,PCR 扩增获得带有信号肽的木聚糖酶基因片段,大小约为 700 bp。测序结果与已报道的短小芽孢杆菌 *xynA* 基因相对比,同源性可达 98%。

将该基因克隆到 pGEM-T Easy 中得到重组质粒 pGEM-TEJ2。

2.2 带有启动子调控区编码序列 *xynA* 基因的扩

以 *B. pumilus* BP51 的总 DNA 为模板,PCR 扩增获得带有木聚糖酶基因调控区编码序列的片段,大小约为 1700 bp。序列分析显示,-49 至 +63 区在其典型的与已报道的短小芽孢杆菌 *xynA* 基因的 5' 上游区相比,同源性为 90%,启动子 -10 区中,有一个碱基由 T 改变为 C。-280 至 -50 为未报道序列,通过与芽孢杆菌属调控序列比较发现,在 -156 至 -143 及 -61 至 -74 处有 2 个潜在的阻遏蛋白结合位点 *cre* 序列,在这两处序列上下游富含 A/T,具有 *cre* 序列的典型特征。

将该基因克隆到 pGEM-T Easy 中得到重组质粒 pGEM-TKXY1。

2.3 重组工程菌 BMJXH9 的构建

2.3.1 质粒 pWTEJX 的构建

以 *Bam*H I 酶切 pGEM-TEJ2,得到带有信号肽编码序列的 *xynA* 基因片段,连接到表达载体 pWH1520 上,利用基因内部的 *Eco*RI 位点鉴定插入片段方向。最终得到重组表达质粒 pWTEJX(见图 1,图 2)。

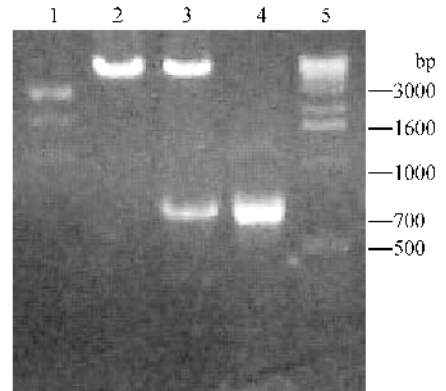


图 1 重组质粒 pWTEJX 的酶切鉴定

Fig. 1 The restriction analysis of recombinant plasmid pWTEJX. 1. pWTEJX/*Eco*RI; 2. pWH1520/*Bam*HI; 3. pWTEJX/*Bam*HI; 4. PCR product; 5. 1 kb DNA ladders.

2.3.2 带有信号肽编码序列 *xynA* 基因在巨大芽孢杆菌中的表达

将重组质粒 pWTEJX 转化巨大芽孢杆菌 BM70,获得重组转化子 BMJXH9。转接后,添加木糖到终浓度 0.5%,诱导培养一定时间,1200 × g 离心 5 min 取上清为胞外上清;沉淀经超声波破碎仪进行破碎处理,1200 × g 离心 5 min 取上清为超声上清。然后分别对胞外上清、超声上清和超声沉淀进行酶活力测定以及 SDS-PAGE 分析。

结果显示,*xynA* 自身信号肽在巨大芽孢杆菌中可以正常发挥作用,BMJXH9 的表达产物可以分泌到胞外,属于分泌型表达;胞外上清木聚糖酶的酶活力可达 12.50 IU/mL;表达产物分子量为 22 kDa(图 3)。

2.4 重组工程菌 BMGpp12 的构建

2.4.1 pWGXYN 的构建

将由 MoBiTec 购买的芽孢杆菌表达载体 pWH1520 进行改造。用 DNAMAN 软件对 pWH1520 序列分析。据自身的限制性酶切位点特点,利用启动子序列附近含有的 *Hind*III 限制性内切酶位点,除去载体 pWH1520 自身的 *xylA* 启动子以及 *xylR* 阻遏基因,重新连接,转化 *E. coli* DH5α,获得新的无启动子的芽孢杆菌表达载体 pWG03。

以 *Bgl* II 酶切 pGEM-TKXY1,得到带有调控区编码序列的 *xynA* 基因片段,连接到表达载体 pWG03 上,利用基因内部的 *Eco*R V 和 *Xba*I 位点鉴定插入

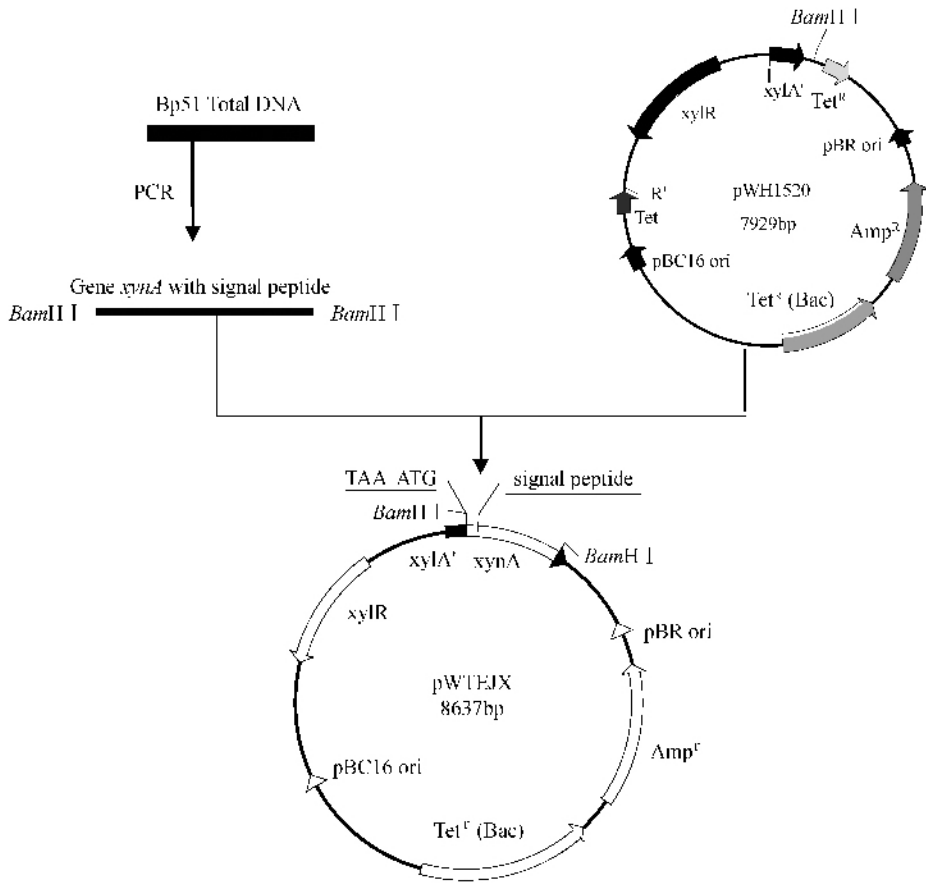


图 2 重组质粒 pWTEJX 图谱

Fig. 2 Map of recombinant plasmid pWTEJX.

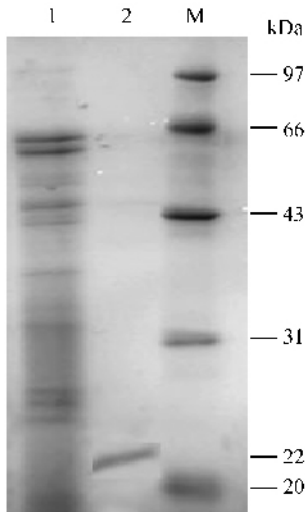


图 3 BMJXH9 的表达产物

Fig. 3 Expression product of BMJXH9. 1. Intracellular proteins ; 2. Extracellular proteins ; M. Standard protein molecular weight.

片段方向。最终得到以 Bp51 中 *xynA* 基因的启动子、终止子为表达元件的重组表达质粒 pWGXYN(见图 4)。

2.4.2 带有启动子调控区编码序列 *xynA* 基因在巨

大芽孢杆菌中的表达 :将重组质粒 pWGXYN 转化巨大芽孢杆菌 BM70 ,获得重组转化子 BMGpp12。转接后 ,诱导培养一定时间 ,1200 × g 离心 5 min 取上清为胞外上清 ;沉淀经超声波破碎仪进行破碎处理 ,1200 × g 离心 5 min 取上清为超声上清。然后分别对胞外上清、超声上清和超声沉淀进行酶活力测定以及 SDS-PAGE 分析。

实验结果表明 ,BP51 中木聚糖酶 *xynA* 基因的启动子和终止子表达元件 ,在巨大芽孢杆菌中可以得到识别 ,而且 BMGpp12 的表达产物可以分泌到胞外 ,属于分泌型表达 ,胞外上清木聚糖酶的酶活力可达 35.48 IU/mL ,酶活力可达到 BMJXH9 胞外上清中木聚糖酶酶活力的 3 倍。由此可以证明 BP51 是一株木聚糖酶高产菌株 ,与其自身较强的启动子是分不开的。SDS-PAGE 结果显示 ,BMGpp12 在巨大芽孢杆菌中的表达产物分子量为 22 kDa ,与 BMJXH9 所产为同一种酶(图 5)。

2.5 培养基对重组巨大芽孢杆菌 BMGpp12 产酶的影响

将重组巨大芽孢杆菌 BMGpp12 接种于 2 mL LB

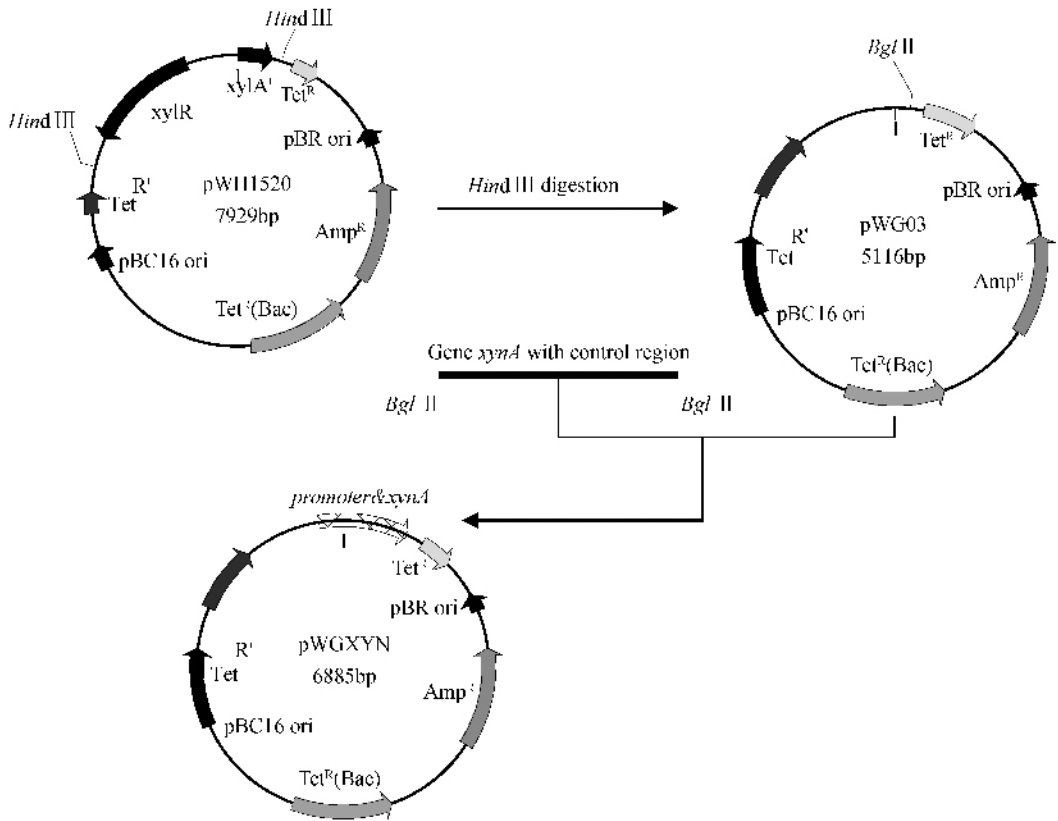
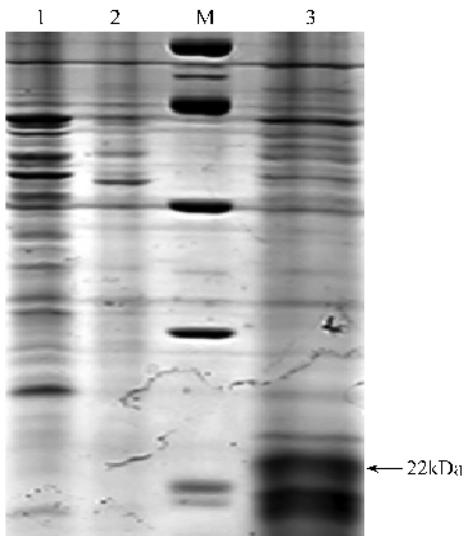


图4 重组质粒 pWGXYN 图谱

Fig. 4 Map of recombinant plasmid pWGXYN.



BMGpp12 的表达产物

Fig. 5 Expression product of BMGpp12. 1. Extracellular proteins without induced; 2. Intracellular proteins; 3. Extracellular proteins.

培养基, 然后以 2% 接种量转接如下各种培养基, 37℃ 下 220 r/min 摇床培养 60 h, 1200 × g 离心 5 min, 取上清, 测定木聚糖酶活力, 培养基成分和实验结果见表 1。

表 1 培养基成分与实验结果

Table 1 The result and ingredient of culture medium

Culture medium	Activity(IU/mL)
LB	25.8 ± 0.03
LB + 0.5% extraction of wheat bran	38.1 ± 0.03
LB + 4% wheat bran	43.9 ± 0.05
4% wheat bran	37.6 ± 0.07
4% wheat bran + 1% glucose	5.67 ± 0.04

实验结果表明: 麸皮可以诱导重组巨大芽孢杆菌 BMGpp12 木聚糖酶的产生, 在不含有其它成分的 LB 培养基中, *xynA* 基因也可得到分泌表达, 葡萄糖对酶的产生有强烈的抑制作用。

2.6 重组表达的木聚糖酶的酶学性质

收集 BMGpp12 诱导表达后的培养物, 离心取上清液, 分析木聚糖酶的酶学性质。

2.6.1 重组木聚糖酶作用最温度及温度稳定性: 在不同温度条件下测定重组木聚糖酶的酶活力, 最适反应温度为 55℃; 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 15 h 仍具有 100% 的酶活力。而在 50℃ 条件下保温 2 h 下降 50%, 在 60℃ 条件下则不稳定, 与原始菌

株 BP51 所产木聚糖酶相比,温度稳定性略有下降。

2.6.2 重组木聚糖酶作用最适 pH 及 pH 稳定性: 在不同 pH 反应条件下分析重组木聚糖酶的活力,表明该酶最适 pH 为 6.5,与原始木聚糖酶的一致。将重组木聚糖酶在不同 pH 值的缓冲液 37℃ 保温 30 min 检测剩余的酶活力,发现该酶在 pH10.0 的条件下保温 30 min 仍具有 60% 的酶活力,表明该重组酶具有较好的耐碱性。

3 讨论

木聚糖酶基因自 1983 年得到克隆,木聚糖酶基因的分子克隆和表达取得了很大的进展,不仅有近百种不同菌株的木聚糖酶基因被克隆,而且通过构建基因载体及特殊受体菌株等手段成功的使一些木聚糖酶基因得到表达^[9-10]。不过,表达的宿主菌和研究调控机制的受体菌株主要是 *E. coli*。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^[11],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较低,而且分泌效果也不很理想。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]。2003 年江正兵等^[13]利用毕赤酵母表达系统对短小芽孢杆菌木聚糖酶基因进行表达,最大表达活力为 11.63 IU/mL。本文以巨大芽孢杆菌为受体菌,不仅实现了分泌性表达,而且酶活力与相关报道比较也有所提高。

本研究采用的 pWH1520 表达系统是带有 *xylA* 启动子的芽孢杆菌表达系统,*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^[14]。该启动子可被 pWH1520 上 *xylR* 基因编码的蛋白阻遏,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^[15]。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的核糖体结合位点和信号肽序列实现了 *xynA* 基因的分泌表达。

另外我们实验室利用 Tail-PCR 的方法,从筛选的耐碱性木聚糖酶高产短小芽孢杆菌 BP51 得到其上、下游调控区序列,将其与 *xynA* 基因一起构建在经过改造的巨大芽孢杆菌表达载体 pWG03 上,利用自身携带的启动子和调控序列在受体菌中进行表达,木聚糖酶不仅得到了分泌表达,而且蛋白表达量提高了将近 3 倍。说明短小芽孢杆菌中的启动子和终止子元件在巨大芽孢杆菌中得到了识别,但高效表达的具体机制尚不十分清楚,是由于启动子与结

构基因的亲缘性还是确实为一强启动子,还有待于研究,进一步的开发利用以及机制研究也正是我们在进行的研究内容。

重组巨大芽孢杆菌 BMGpp12 在不含有麸皮成分的 LB 培养基中也可产生木聚糖酶,而原始菌株 BP51 的 *xynA* 则是严格的麸皮诱导型。重组木聚糖酶除温度稳定性有所下降以外,最适作用温度、pH 值、pH 稳定性等性质均与原始菌株产生的木聚糖酶的性质相一致,是在碱性范围内保持较高酶活力和稳定性的耐碱性木聚糖酶,pH10.0 的环境下,保温 30 min 仍可保存 60% 以上的活力,而且产酶周期明显缩短,这为该酶的产业化生产和造纸等特殊环境的应用奠定了良好基础。

参考文献

- [1] 孙迅,王宜磊,邓振旭.木聚糖酶高产菌株 *Bacillus pumilus* H-101 的筛选及产酶条件的研究.微生物学杂志(*Journal of Microbiology*),1997,12(2):17-3.
- [2] 杨瑞鹏,赵学慧.木聚糖酶高产菌株筛选和鉴定.华中农业大学学报(*Journal of Huazhong Agriculture University*),1990,9(3):311-314.
- [3] 刘青梅,祁蒙,曲音波.木聚糖酶基因克隆、表达、与分泌及定点诱变研究进展.生物工程进展(*Progress in Biotechnology*),2001,21(2):28-31.
- [4] Asbah F, Qureshy, LA Khan, et al. Expression of *Bacillus circulans* Teri-42 xylanase gene in *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27: 227-233.
- [5] Marjo, S, Ilkka, P, Protein Secretion in *Bacillus* Species. *Microbiological Reviews*, 1993, 57: 109-137.
- [6] FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, et al. 颜子颖,王海林译.精编分子生物学实验指南(*Short Protocols in Molecular Biology*).北京:科学出版社,1998,39-40.
- [7] 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.
- [8] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [9] Neeta K, Abhay, S, et al. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23: 411-456.
- [10] Moriyama H, Fukusaki E, Cabrera Crespo J, et al. Structure and expression of genes coding for xylan-degrading enzymes of *Bacillus pumilus*. *Europe Journal Biochemistry*, 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*. *Journal of Biochemistry* 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(*Journal of Applied and Environmental*), 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(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2003, 19(1) 50-55.
- [14] 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 Microbiology*, 1991, 155(6): 535-542.
- [15] 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*. *Molecular Gene Genet*, 1983, 192: 335-341.
- [16] Nuyens F, Zyl W, Iserentant D, et al. Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo-beta-xylanase (xynA) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2001, 56: 431-434.

Expression of alkali-tolerant xylanase in *Bacillus megaterium*

Yihong Bao¹, Weifeng Liu³, Yongzhi He², Zhiyang Dong²

(¹ College of Forestry, Northeast forestry University, Harbin 150040, China)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(³ Department of Biology Science and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract [Objective] We cloned xylanase-encoding gene *xynA* and its promoter from *Bacillus pumilus*, expressed in *Bacillus megaterium* and characterized the recombinant xylanase. **[Methods]** We inserted the xylanase-encoding gene *xynA* and its promoter in *Bacillus* expression vector pWH1520 and pWG03 which was modified from pWH1520. We transformed the recombinant plasmid pWTEJX and pWGXYN into *Bacillus megaterium*, and obtained the recombinant strains BMJXH9 and BMGpp12. Enzymes produced by recombinant strains expressing *xynA* were produced in the medium. The xylanase activity produced by recombinant BMGpp12 was three times higher than that of BMJXH9. The recombinant xylanase had the original enzyme alkali-tolerant properties. **[Conclusion]** Alkali-tolerant xylanase gene was successfully expressed and this provided a basis for further study of xylanase applied.

Keywords: Xylanase; *Bacillus megaterium*; *Bacillus* expression system

(本文责编: 张晓丽)

* Corresponding author. E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn