

## 微紫青霉 CBHI 酶的 CBD 蛋白编码区在大肠杆菌中的 亚克隆及表达\*

汪天虹 王春卉\*\* 高培基 钟 玲 邹玉霞

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 对插入质粒 pUC18-181 上的微紫青霉 (*Penicillium janthinellum*) CBHI 酶的 cDNA 基因进行一系列 DNA 体外操作, 包括进行序列定向缺失, 最后将两末端修饰为平端后进行连接使质粒环化。用得到的产生序列定向缺失的重组质粒转化大肠杆菌 JM109。利用 CBD 能吸附到结晶纤维素上的特性, 从随机选取的 24 个缺失转化子中筛选到一株含 CBD 编码区的转化子 JM109 (pUC18C), 所表达的 CBD 融合蛋白分子量为 21kD。JM109 (pUC18C) 所产生的 LacZ-CBD 融合蛋白可通过对纤维素的吸附-解吸附过程一步纯化。其 IPTG 诱导的 pNPC 酶活力为零, 表明该菌已不再具有 CBHI 酶活力。

**关键词** 序列定向缺失, 外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I, 纤维素吸附区, 微紫青霉

**分类号** Q785

纤维素是世界上数量最大的可再生性碳源物质, 其生物降解对维持生物圈的能量循环和碳素循环至关重要。其降解过程涉及到一系列的纤维素酶, 是在多酶协同作用下完成。纤维素酶是由只水解可溶性纤维素, 能微弱吸附但不能水解不溶性纤维素的催化区 (CD) 和能吸附于纤维素表面但无水解活力的吸附区 (CBD) 组成的, 中间有一段富含羟基氨基酸的链接区<sup>[1,2]</sup>。纤维素吸附区虽然对纤维素没有直接的化学降解作用, 但已有报道该区可以疏解结晶纤维素<sup>[3]</sup>, 有可能是破坏了结晶纤维素的分子间氢键所致。因此, 对纤维素吸附区结构和功能的研究, 包括对纤维素酶两个功能区相互关系的研究和纤维素吸附区与纤维素之间吸附性质的研究, 对了解纤维素的生物降解机制以及对纤维素酶的进一步开发利用, 都具有重要的意义。纤维素吸附区依据其氨基酸序列的同源性可以分为五个族<sup>[4]</sup>, 其中族 I 包括大多数真菌纤维素酶的纤维素吸附区。真菌 CBD 大约是细菌 CBD 大小的三分之一。

微紫青霉 (*Penicillium janthinellum*) 是一种腐生性的半知菌, 它可以产生广谱的裂解酶类, 包括纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶和淀粉酶<sup>[5]</sup>, 对该菌 CBHI 纤维素吸附区的研究尚未见报道。

本文对微紫青霉的外切葡聚糖纤维二糖水解酶 (CBHI) 的 cDNA 基因进行了一系列

\* 国家自然科学基金、山东省自然科学基金和国家教委博士点基金资助项目。

\*\* 现通讯地址: 深圳进出口商品检验局, 518045。

收稿日期: 1997-03-17

体外操作,包括定向序列缺失,得到了其纤维素吸附区(CBD)的编码区,并对其性质进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

实验中所用的菌株和质粒见表 1。

表1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株与质粒 Strains and plasmids	基因型及遗传特征 Genotype and hereditary property	参考文献及来源 References and sources
<i>E. coli</i> JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, $\lambda^-$ , $\Delta$ (lac-proAB), F', traD36, proAB, lacIq Z $\Delta$ M13	[6]
pUC18-181	微紫青霉 cbh1 插入 pUC18, 分子量为 4.59kb cbh1 from <i>P.janthinellum</i> was inserted into pUC18, MW4.59kb	[5]
pUC18	Ap <sup>r</sup> , lacZ $\alpha$ , MW2.69kb	[7]
pUC18C	由 pUC18-181 改造得到, 其上所携带的 cbh1 的底物催 化区已缺失。 Obtained from pUC18-181, the CD of cbh1 was deleted by in vitro DNA manipulations.	本文工作 This work

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶 BstXI、MluI 购自 Promega 公司, S1 核酸酶、T4DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim 公司。大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 酶)、外切核酸酶 III (ExoIII)、限制性内切酶 HindIII、BamHI 和  $\lambda$  DNA/HindIII、SspI/EcoRI 购自华美生物工程有限公司。低熔点琼脂糖、电泳用 SDS 购自 Sigma 公司, 标准蛋白购自 Pharmacia 公司。所用实验条件均按生产厂家推荐条件。其它无机、有机试剂均为分析纯。

### 1.3 培养基及培养条件

1.3.1 LB 培养基(%): NaCl1、酵母粉 0.5、胰蛋白胨 1, pH7.0~7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min, 固体加 1.2% 的琼脂粉。37℃ 平板培养或 180r/min 摇床液体培养。

1.3.2 SOC 培养基: 转化回复时使用。

### 1.4 质粒的提取与纯化

根据刘伟民等<sup>[8]</sup>的方法提取质粒, 采用 Maniatis 等的方法对质粒进行纯化<sup>[9,10]</sup>。

### 1.5 含微紫青霉 CBHICBD 编码区的重组质粒的构建

提取质粒 pUC18-181DNA。用产生 5' 突出端的限制性内切酶 MluI 和产生 3' 突出端的限制性内切酶 BstXI 对带有微紫青霉 CBHICBD 基因的该质粒进行双酶切, 以产生具不同突出端的线性化质粒。用低熔点琼脂糖凝胶电泳法收集大片段后用外切核酸酶 III 处理不同时间, 取样终止反应。因外切核酸酶 III 只作用于 3' 凹端或平端的双链 DNA, 而不

作用于3'凸起端的双链DNA,放外切核酸酶III只作用于线性双链的MluI端。然后用S1核酸酶和Klenow酶修饰双末端后,进行平端连接,使质粒环化。用产生系列缺失的质粒转化感受态大肠杆菌JM109细胞。转化后的菌涂布于含Ap50~100 µg/ml的LB平板,37℃培养以筛选Ap<sup>r</sup>转化子。

### 1.6 CBD重组质粒的筛选

选择一定数目Ap<sup>r</sup>转化子,小量提取质粒DNA进行凝胶电泳。筛选质粒大小介于pUC18(2.69kb)和pUC18-181(4.59kb)之间的转化子。

### 1.7 蛋白质凝胶电泳——LacZ-CBD融合蛋白的检测与鉴定

将JM109(pUC18)、JM109(pUC18-181)和JM109(pUC18C)分别在LB液体培养基中活化后,以1%的接种量接种含50 µg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基,培养2~3h后,加入IPTG诱导,继续培养14~16h,取5ml菌液离心,收集菌体。加入200 µl溴酚蓝加样缓冲液,煮沸5min后在12.5%的SDS聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,观察各菌株蛋白质电泳图谱的变化情况以进行初步检测。

将菌体在IPTG诱导条件下培养16h后,取100ml的培养液离心收集菌体,重悬于20mmol/L、pH6.0的磷酸缓冲液中。-20℃冰冻4h后,在冰浴中进行超声破碎以释放出胞内蛋白。离心弃去细胞碎片制得粗酶液。将粗酶液与微晶纤维素混合,含有CBD的融合蛋白被吸附,而不能吸附于微晶纤维素上的大部分蛋白被去除。再以含6mol/L脲的上述磷酸缓冲液洗脱。用截留分子量为8~10kD的透析袋透析脱盐后,再以PEG 20000反渗透析将体积浓缩至2ml左右,以12.5%的SDS-PAGE进行凝胶电泳检测含CBD蛋白的亚克隆,同时进行CBD融合蛋白的分子量测定,并与JM109(pUC18)和JM109(pUC18-181)所产生的胞内蛋白相比较。

### 1.8 微紫青霉CBHI CBD亚克隆所携带CBD编码区大小的测定

以λDNA/HindIII和SppI/EcoRI作为DNA分子量标准质粒pUC18C的HindIII酶切片段的大小,以确定插入片段的分子量。

### 1.9 pNPC酶活力的测定<sup>[11]</sup>

按1.7方法,用IPTG诱导液体培养的菌体,不同时间取样,超声破碎后测粗酶液的pNPC酶活力。以pH5.0、50mmol/L的醋酸钠缓冲液配制2.5mmol/L的pNPC溶液,0.8ml的反应混合液加入适当稀释的酶液,50℃保温30min,加入1%的碳酸钠1ml终止反应,410nm比色。以含不同浓度的对硝基酚溶液作标准曲线。以每毫升菌液每分钟所产生的对硝基酚的摩尔数计算酶活。并同其生长曲线相比较。

## 2 结果

### 2.1 带有微紫青霉CBHICBD编码区的重组质粒的构建与筛选

用MluI和BstXI双酶切带有微紫青霉CBHI cDNA基因的质粒pUC18-181后,以低熔点琼脂糖凝胶电泳法收集大片段。然后用外切核酸酶III处理不同时间,从线性双链的MluI端进行序列定向缺失。最后经S1核酸酶和Klenow酶修饰双末端后进行平端连接,使质粒环化。用产生系列缺失的质粒转化感受态大肠杆菌JM109细胞。在氨苄平板上筛选到400余株氨苄抗性的转化子(图1)。这些转化子在含氨苄的麦康凯琼脂培养基上生

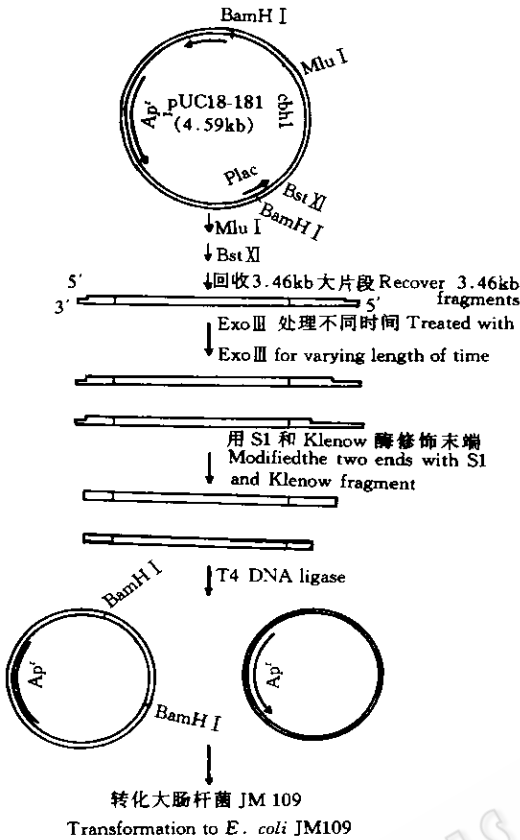


图1 微紫青霉CBHI酶的CBD亚克隆构建过程  
Fig.1 Construction of CBD of CBHI subcloning from *P.janthinellum*

特异性吸附的特点,通过对微晶纤维素的吸附-解吸附,从24株亚克隆中筛选到一株表达CBD融合蛋白的亚克隆,将该质粒定名为pUC18C。根据SDS-PAGE凝胶电泳中蛋白质分子量的对数与蛋白质迁移率成正比的关系,绘制标准曲线,并根据CBD融合蛋白的迁移率查得其分子量为21kD(见图2)。

通过对微晶纤维素的吸附-解吸附过程, JM109(pUC18C)的大部分菌体杂蛋白基本去除,蛋白质凝胶电泳接近单一带谱。CBD蛋白的这一特性,不仅可作为CBD蛋白本身分离鉴定的手段,也为分离纯化其它蛋白质和酶提供了一种简捷、快速的方法。与蛋白质标准分子量比较,

长且呈白色,表明在克隆载体pUC18上确有外源片段。

随机挑取48个转化子,小量提取质粒DNA在0.7%的琼脂糖凝胶上进行电泳,可以看到重组质粒的大小介于pUC18-181和pUC18之间(图略)。

2.2 LacZ-CBD融合蛋白的初步检测

如1.6、1.7所述方法,对质粒分子量介于pUC18和pUC18-181之间的4株亚克隆,包括JM109(pUC18C)和各对照菌株进行蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。从JM109(pUC18-181)的SDS-PAGE电泳图中可以看到,在分子量为56kD的位置上有一条蛋白带,而JM109(pUC18)无此蛋白带。此带应为CBHI酶的电泳带,与文献[5]报道带有微紫青霉cbh1的重组大肠杆菌产生的CBHI蛋白质分子量为56kD是一致的。产生序列定向缺失的重组质粒无此带,但在分子量小一些的位置上有比JM109(pUC18)多出的蛋白带,此带应为LacZ-CBD融合蛋白带。

2.3 以CBD对微晶纤维素的吸附性质筛选CBD亚克隆

利用CBHI CBD蛋白对微晶纤维素

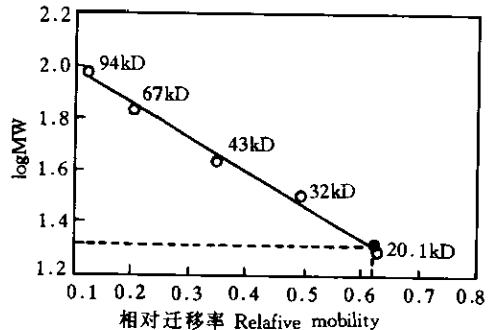


图2 SDS-PAGE电泳迁移率计算CBD融合蛋白的分子量

Fig.2 The molecular weight of CBD fusion protein according to the  $M_r$  in SDS-PAGE electrophoresis  
○ Standard protein; ● CBD fusion protein

LacZ-CBD融合蛋白的分子量约为21kD。

#### 2.4 JM109(pUC18C)与出发菌株产酶情况的比较

提取经IPTG诱导后的JM109(pUC18C)的粗酶液,测定其pNPC活力,结果如图3所示。可以看出,经序列缺失后筛选出的JM109(pUC18C)确实不再具有CBHI活力。

#### 2.5 pUC18C中CBD编码区分子量大小的测定

提取质粒pUC18、pUC18-181和pUC18CDNA,用HindIII酶切后,在0.7%的琼脂糖凝胶上进行电泳,电泳检测结果为质粒pUC18C的分子量为3.2kb,插入的CBD编码区大小为0.5kb。

### 3 讨论

对纤维素酶的底物吸附区(CBD)的分子生物学研究,现主要集中在其结构、功能和作用机制上。不管是基于理论研究的需要,或是进行应用研究的要求,从对纤维素酶底物吸附区进行亚克隆着手研究纤维素酶对底物吸附的机制以及底物吸附区和催化区的相互关系都不失为一个简捷的方法。CBD在蛋白质分离纯化上的应用潜能,更使这一研究具重要性和吸引力。因此本研究对微紫青霉CBHI CBD编码区DNA片段进行了亚克隆。

根据文献报道,微紫青霉外切葡聚糖纤维二糖水解酶(CBHI)在氨基酸序列上与瑞氏木霉的CBHI酶具有70%的同源性<sup>[5]</sup>。根据其氨基酸序列可以推断该酶CBD蛋白的基因应开始于第1540个核苷酸附近。如包括中间的链接肽,则应开始于第1350个核苷酸附近。但在这两个位置上都没有合适的限制性酶切位点用以直接经酶切后得到CBD基因亚克隆。因此我们决定采用MluI、BstXI双酶切后用外切核酸酶III产生渐近序列缺失的方法以得到合适的亚克隆。另外,我们保留了该基因开放读码框架前部的84个核苷酸,也即28个氨基酸,目的是保留该基因的前导肽,以利于进一步研究CBD在真核生物中的分泌性表达。但通过序列缺失进行亚克隆,必然存在读码框架的问题,这为筛选工作带来一定的难度。为解决这一困难,我们利用了CBHICBD蛋白对微晶纤维素特异性吸附的性质,通过吸附-解吸附过程,既对亚克隆的CBD蛋白进行了分离纯化,同时也进行了鉴定。

LacZ-CBD蛋白是在pUC18的LacZ启动子控制下表达的,该质粒为高拷贝数,LacZ也是强启动子。因此,CBD蛋白在大肠杆菌中的表达量是比较高的。但由于pUC18为一般的克隆载体,而非分泌表达型载体,所产生的LacZ-CBD为胞内蛋白,分离纯化步骤较

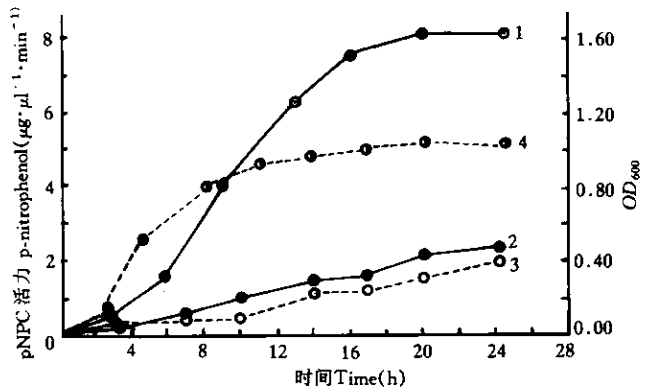


图3 各菌株产CBHI酶曲线比较

Fig.3 Comparison of the CBHI produced by JM109(pUC18-181), JM109(pUC18) and M109(pUC18)

1. JM109(pUC18-181); 2. JM109(pUC18C); 3. JM109(pUC18); 4. The growth curve: JM109(pUC18-181), JM109(PUC18) and JM109(pUC18C).

Note: The results were average values of three replicated experiments.

繁琐。若将 CBD 基因转移至分泌表达型载体上,则下游蛋白质分离纯化的工作量可望进一步减轻。此项研究工作正在进行中。

我们得到了一 CBD 亚克隆 JM109(pUC18C),所产生的 CBD 融合蛋白分子量为 21kD,包含了微紫青霉 CBHI 酶的链接区和吸附区。根据以往的研究,链接区对 CBD 的吸附功能影响并不大。但对于全酶,它的存在与否会影响酶的催化效力<sup>[12]</sup>。该区对酶起到了延伸、扭结和加固构型的作用。另外,蛋白酶(如木瓜蛋白酶)的作用位点多在此区。因此,该区的保留不仅减小了研究 CBD 蛋白分泌、表达和检测的难度,也为从融合蛋白中得到 CBD 蛋白提供了一个作用位点。

CBD 编码区的获得,使 CBD 蛋白在大肠杆菌中制备成为可能,从而为研究 CBD 在纤维素的酶解过程中的作用提供了便利的条件。另外,利用 CBD 能可逆地吸附于纤维素上的特性,CBD 已在蛋白质纯化和酶的固定方面得到应用。把 CBD 编码区与具重要经济价值的酶基因融合构建融合蛋白,必然有利于该酶的提取纯化。因此,CBD 亚克隆的构建与研究不仅具有重要的理论意义,也具有广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] Tilbeugh H, van Tomme P, Claeysens M *et al. FEBS Lett*, 1986, **204**:223~227.
- [2] 高培基, 曲音波, 汪天虹等. 纤维素科学与技术, 1995, **3**(2): 1~19.
- [3] Kraulis P J, Clore G M, Nilges M *et al. Biochemistry*, 1989, **28**:7241~7257.
- [4] Tapani Reinikainen, PhD thesis: The cellulose binding domain of cellobiohydrolase I from *T. reesei*: Interaction with cellulose and application immobilization. VTT publications 206. Espoo: Technical Research Centre of Finland, 1994.
- [5] Koch A, Weigel C T O, Schulz G. *Gene*, 1993, **124**:57~65.
- [6] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. *Gene*, 1985, **33**:103~119.
- [7] Messing J. *Methods Enzymol*, 1983, **101**:20.
- [8] 刘伟民, 杨至兴. 遗传, 1987, **9**(1):43~44.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1982.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [11] Deshpande M V, Erikson R E, Petersson G. *Anal Biochem*, 1984, **138**:481~487.
- [12] Shen H, Schmuck M, Pilz I *et al. J Biological Chemistry*, 1991, **266**(17):11335~11340.

## SUBCLONING AND EXPRESSION OF CODING REGION FOR CELLULASE BINDING DOMAIN OF CBH I FROM *P.JANTHINELLUM* IN *E.COLI*

Wang Tianhong Wang Chunhui Gao Peiji Zhong Ling Zou Yuxia

(The State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** The in vitro DNA manipulations, included the nested deletions, of *cbh1* from *P.janthinellum* inserted into pUC18-181 were carried out. The two ends of fragments were modified into blunt ends and the fragments were self-ligated. Then, the encircled plasmids were transformed to *E. coli* JM109. Utilizing the characterization of CBD binding to crystalline cellulose, one catalytic domain deletion transformant producing active LacZ-CBD fusion protein was isolated from 24 transformants randomly picked from 400 transformants. The molecular weight of the LacZ-CBD fusion protein is 21 kD. The plasmid was designated pUC 18C. The LacZ-CBD fusion protein produced by JM109(pUC18C) was able to be purified by procedure of adsorption-desorption to cellulose. The pNPC activity of crude enzyme solution of JM109(pUC18C) induced by IPTG were zero, identified that JM109(pUC18C) has no CBHI activity.

**Key words** Nested set of deletion, Cellobiohydrolase I, Cellulose binding domain, *Penicillium janthinellum*