

## 外源木聚糖酶在枯草芽胞杆菌中信号肽筛选

范鑫 杨明明 曹鹏涛 张伟 张雯 宋秀平 龚月生\*

西北农林科技大学动物科技学院 杨凌 712100

**摘要:**【目的】本试验旨在筛选引导表达外源木聚糖酶基因高效分泌的信号肽,为枯草芽胞杆菌木聚糖酶高效分泌表达系统提供元件。【方法】构建信号肽筛选载体,载体是以含壮观霉素抗性基因的大肠-枯草穿梭载体为基本骨架,目标蛋白为耐碱性木聚糖酶,可在麦芽糖启动子 Pglv 诱导下表达。从枯草芽胞杆菌 A1747 基因组中扩增获得 24 个 Sec 途径信号肽,并将其全部链接到至筛选载体上,并在枯草芽胞杆菌 WB700 中实现表达分泌。重组菌在 3% 麦芽糖诱导下培养 24h 后用 DNS 法测定上清酶活。【结果】成功构建信号肽筛选载体 pGPSX 及 24 个表达载体,实现木聚糖酶表达分泌。且不同信号肽对于引导外源木聚糖酶分泌能力不同,其中 YnfF 信号肽引导分泌目标蛋白效率最高,上清酶活为 37.2IU/mL。【结论】试验证明在枯草杆菌中对外源蛋白进行信号肽筛选是提高其分泌的有效途径,并获得了针对木聚糖酶高效分泌信号肽 YnfF。

**关键词:** 木聚糖酶基因,信号肽,枯草芽胞杆菌

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)07-0979-05

木聚糖酶是一类将木聚糖降解成低聚木糖或木糖的复合水解酶系,其中  $\beta$ -1,4-D-木聚糖酶负责水解木聚糖主链骨架,是酶系中的关键酶。这种酶在提高饲料转化率、发酵成产乙醇、纸浆漂白等众多领域有着十分重要的应用价值,然而酶活力低使生产成本提高成为了限制其工业化生产的主要问题<sup>[1-3]</sup>。

利用基因工程的方法改造木聚糖酶基因、优化分泌表达系统从而获得优良的酶工程菌是现今企业及科研单位的主要研究方向。枯草芽胞杆菌由于其非致病性、遗传背景清楚、胞外分泌能力强等优势,近年来被作为宿主菌广泛应用于酶制剂的生产中<sup>[4]</sup>。研究表明证明枯草芽胞杆菌能够有效分泌外源蛋白,同时也对其分泌机制和过程中的相关元件做了较为深入的研究。信号肽为蛋白新生肽链 N 端的一段 25-32 个氨基酸残基组成的肽段,是诱导

蛋白跨膜分泌关键元件<sup>[5]</sup>。2006 年 Ulf Brockmeier 研究利用信号肽预测软件 SignalP 3.0 在枯草芽胞杆菌基因组中搜寻信号肽,并用其引导异源蛋白分泌,结果表明信号肽与异源蛋白间存在着适配性问题,且不同信号肽对异源蛋白分泌效率之间有着明显的差异<sup>[6-7]</sup>。本研究以实验室前期筛选到的来源于短小芽胞杆菌的碱性木聚糖酶为目标基因构建信号肽筛选载体,在 24 个 Sec 途径的信号肽最终筛选获得枯草芽胞杆菌中分泌该木聚糖酶的最优信号肽,进而为木聚糖酶工程菌的进一步优化提供原件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

基金项目: 国家自然科学基金 (30871813)

\* 通信作者。Tel: +86-29-87092102; E-mail: gongyuesheng@sohu.com

作者简介: 范鑫 (1985-) 男, 陕西西安人, 硕士研究生, 主要从事枯草芽胞杆菌基因工程研究。E-mail: aooshuman@126.com

收稿日期: 2010-12-27; 修回日期: 2011-02-28

DH5 $\alpha$  ,含耐碱性木聚糖酶基因 (*xynA*) 短小芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus*) BYG5-20 , 枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 1A747 和 (*Bacillus subtilis*) WB700 均为实验室前期保存。大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭质粒 pGJ148 ,含壮观霉素抗性基因质粒 pShuttle ,均为本实验室前期构建 ,pLRES2-ZSGreen1 质粒购自 Clontech 公司 ,pGME-T Vector 购自 Promega 公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**主要限制性内切酶购自 Promega 公司 ,T4 连接酶购自 Fermentas 公司 ,Ex Taq 酶 ,碱性磷酸酶 ,DNA make 购自 TAKALA 公司 ,细菌基因组提取、质粒提取、胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司 ,抗生素、梓木木聚糖酶购自 Sigma 公司 ,测序服务由南京金斯瑞公司提供。PCR 仪 C1000、电转化仪 Genepulser<sup>TM</sup>、胶成像系统 ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS + 均为 Bio-Rad 公司产品。

**1.1.3 培养基,**各种抗性培养基中抗生素浓度为: 氨苄青霉素 (Amp) 100mg/L ,壮观霉素 (Spec) 50mg/L ,氯霉素 (Cm) 7.5mg/L。

## 1.2 大肠杆菌、枯草芽胞杆菌的 DNA 操作

大肠杆菌质粒提取、DNA 的酶切、电泳、DNA 片段连接、转化均参照文献<sup>[8]</sup>。枯草杆菌感受态制备、转化参考文献<sup>[9]</sup>。

## 1.3 木聚糖酶酶活测定

将重组菌菌液 50  $\mu$ L 接种至 5 mL 含 Spec 抗性 LB 培养基的试管中扩大培养 12h ,吸取扩大后的菌液 600  $\mu$ L 接种到含 3% 麦芽糖的 30 mL LB 中 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 培养 24 h ,然后在 4 $^{\circ}$ C 7000  $\times$  g 离心 10 min 收集上清。并参照<sup>[11]</sup>中 DNS 法测定上清液中木聚糖酶酶活 ,酶活定义:以每分钟生成 1  $\mu$ .mol 木聚糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位 (IU)。接种时每个重组菌设 3 个重复 ,利用 SPSS13.0 单因素方差分析 (ANOVA) 进行数据处理 ,采用 Duncan 法进行多重比较。

## 2 结果和分析

### 2.1 载体构建

由于需要在 WB700 中筛选重组子 ,因此需更换 pGJ148 载体抗性基因 ,以 pGJ148 为模板扩增获得 2.7 kb 的 pGJ148 去氯霉素骨架 ,上面含有大肠杆菌和枯草芽胞杆菌复制子 ,以及麦芽糖诱导性启动子 Pglv。用 pShuttle 做为模板获得了 1.0 kb 的壮观霉

素抗性基因 (Spec<sup>R</sup>) ,其在大肠杆菌和枯草杆菌中均有功能。木聚糖酶基因来自于本实验室筛选到的一株分泌耐碱性木聚糖酶短小芽胞杆菌 BYG5-20 ,去掉自身信号肽后的编码区 603 bp。又以 pLRES2-ZSGreen1 质粒为模板扩增获得了 700 bp 绿色荧光蛋白基因 ,在两端引入 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点。将以上获得的片段连接至 pGEM-T Vector 载体 ,获得 4 个中间载体 p148Cm-TV、pSpec-TV、pXynA-TV、pGFP-TV ,测序结果与预期一致。用 *Bgl* II 和 *BamH* I 分别消化 p148Cm-TV 和 pSpec-TV ,将两个片段连接并转化 DH5 $\alpha$  ,选择壮观霉素抗性培养基筛选重组子 ,质粒命名为 pPS。再用 *BamH* I 和 *Sac* I 消化 pXynA-TV ,获得木聚糖酶基因编码区去掉自身信号肽片段 ,将其连接至 pPS 上获得 pPSX。再用 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切 pGFP-TV 获得 GFP 基因编码区 ,连接至 pPSX 相应位点获得最终筛选载体 pGPSX (图 1)。

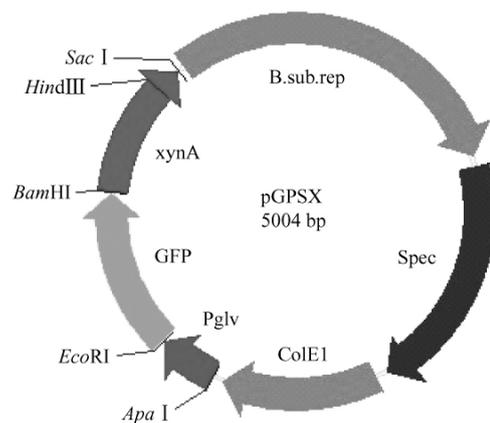


图 1 筛选载体 pGPSX 质粒图谱

Fig. 1 Construction of screening vector pGPSX. Pglv and xynA represent the Pglv promoter and the XynA mature peptide encoding sequence from *Bacillus pumilus* BYG5-20 , B. sub. Rep and CoEI represent replication protein in *B. subtilis* and *E. coli* CoEI replicon , Spec and GFP represent spectinomycin resistance marker and green fluorescent protein , respectively.

### 2.2 分泌表达载体的构建

以 A1747 基因组为模板扩增获得 24 个信号肽片段 Epr、YjfA、YfhK、Csn、Bpr、BglC、LytB、LipA、YckD、Pel、YnfF、PhrK、YbdN、YobB、YddT、YhfM、BglS、Vpr、AprE、YjdB、LipB、DacB、AmyE、YndA (图 2) ,据报道<sup>[6]</sup>这些信号肽有效引导角质酶的分泌 ,将其与 pGEM-T Vector 连接并测序 ,对测序正确的质粒酶切 ,胶回收信号肽片段 ,连接至筛选载体

pGPSX 上 GFP 所在位置,从而构建 pEpr-PSX、pYjfA-PSX 等 24 个木聚糖酶分泌表达载体。然后将这些载体转化枯草芽胞杆菌 WB700 中,在壮观霉

素和氯霉素双抗性培养基上筛选阳性克隆,扩大培养后保存菌液,命名为 WB700 (pEpr-PSX)、WB700 (pYjfA-PSX) 等。

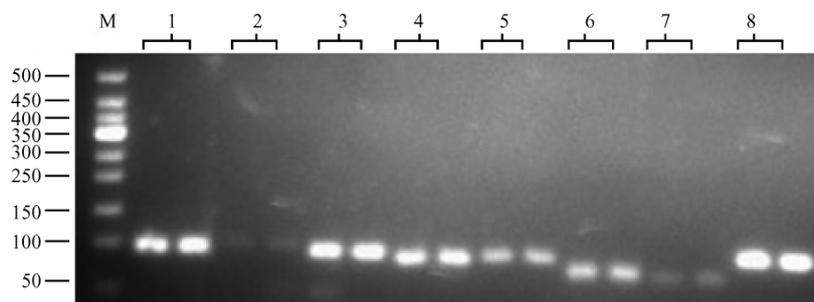


图 2 部分信号肽扩增

Fig. 2 Part of the signal peptides. M. 50bp DNA; 1. Epr; 2. YjfA; 3. YfhK1; 4. Csn; 5. Bpr; 6. BglC; 7. LytB; 8. LipA.

### 2.3 含不同信号肽对重组枯草芽胞杆菌分泌木聚糖酶影响

将获得重组菌,在 3% 麦芽糖诱导下 37℃ 培养 24h 后用 DNS 法测定上清液酶活。在扣除宿主菌本

底酶活后,结果显示含不同信号肽的重组菌培养液上清中酶活不同,其中含 YnfF 信号肽的重组菌分泌能力最强,其上清中酶活为 37.2IU/mL,显著高于其它重组菌 ( $P < 0.05$ )。

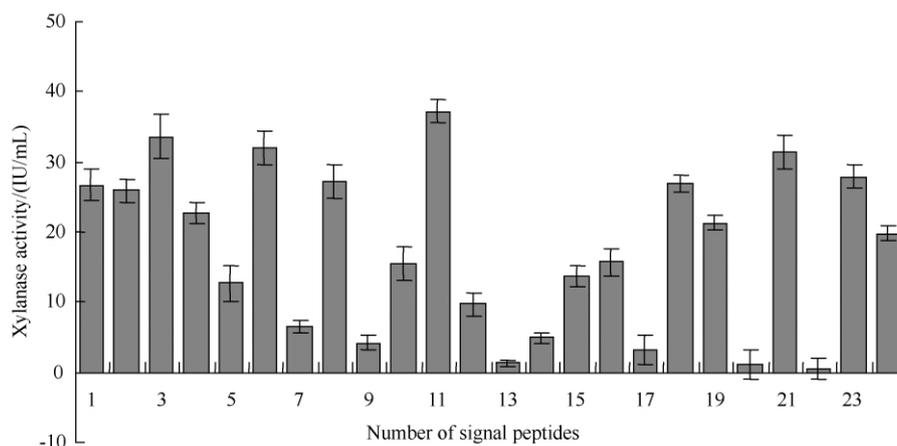


图 3 上清液中木聚糖酶酶活

Fig. 3 Xylanase activity of the culture supernatant. Recombinant strains incubate in the LB medium which have 3% maltose. The xylanase activity of the culture supernatant were detected after 24h incubation.

## 3 讨论

近年来,枯草芽胞杆菌已被广泛用于重要工业用酶的生产,由于其清晰的遗传背景及较强的胞外分泌能力,非常适宜于作为工程宿主菌,然而要实现外源蛋白的高效分泌必须依赖枯草杆菌自身信号肽的引导,且只有当目标蛋白分泌量达到 1-15 mg/L 时才具有工业生产意义<sup>[6]</sup>。近年来,研究利用生物

信息学软件 SignalP 3.0 已在枯草芽胞杆菌中预测到 144 个 Sec 途径信号肽<sup>[10]</sup>,然而外源蛋白的分泌与信号肽之间存在着适配性的问题,不同新号肽引导外源蛋白分泌的能力有着显著的差异。因此针对目标蛋白进行信号肽筛选,是提高其胞外分泌量的一种可行的方法。

本研究的目标蛋白是来源于短小芽胞杆菌 BYG5-20 的耐碱性木聚糖酶<sup>[11]</sup>,并以更换抗性后的大肠-枯草穿梭载体 pGJ148 作为骨架,采用选择麦

芽糖诱导型启动子 Pglv<sup>[12]</sup>, 成功构建信号肽筛选载体 pGPSX。同时将扩增获得的 24 个 Sec 途径新号肽连接至筛选载体上, 获得分泌表达载体, 转入已敲除 7 种蛋白酶基因的枯草芽胞杆菌 WB700 中获得一系列能够分泌目标蛋白的重组菌。酶活测定结果显示不同信号肽引导木聚糖酶分泌量不同, 其中 YnfF 引导分泌能力最强, 在 3% 麦芽糖诱导下培养 24 小时上清酶活 37.2 IU/mL。在 Ulf Brockmeier (2006) 研究中, 本研究选择的 24 个信号肽是引导角质酶分泌效率都比较高, 且其中 Epr 是角质酶分泌最适信号肽, 然而我们试验结果显示, 24 个重组菌上清酶活差异很大, 且 Epr 并不是引导木聚糖分泌最适信号肽, 上清酶活为 27.8 IU/mL, Rusch SL (1994)<sup>[13]</sup> 研究显示信号肽 H 区疏水性的增加有利于 Sec 途径信号肽的分泌, 但是结果显示 H 区疏水性与分泌能力无明显关系。

试验表明在枯草芽胞杆菌中对外源蛋白进行信号肽筛选是提高其分泌量的有效途径, 获得的信号肽 YnfF 为枯草芽胞杆菌木聚糖酶表达分泌系统的进一步优化打下了坚实的基础。

## 参考文献

- [ 1 ] 丁强. 饲用木聚糖酶的研究进展及应用. *中国饲料 (China Feed)* 2010, (3): 22-25.
- [ 2 ] 吴香波, 谢益民. 木聚糖酶在制浆造纸工业中的应用和研究进展. *上海造纸 (Shanghai Paper Making)*, 2008, 39(5): 6-9.
- [ 3 ] 陈威威, 江正强, 王瑞君. 绵毛嗜热丝孢菌木聚糖酶对面包品质的改善. *食品与发酵工业 (Food and Fermentation Industries)* 2008, 34(12): 1-4.
- [ 4 ] 沈卫锋, 牛宝龙, 翁宏隧, 何丽华, 孟智启. 枯草芽胞杆菌作为外源基因表达系统的研究进展. *浙江农业学报 (Acta Agriculturae Zhejiangensis)* 2005, 17(4): 234-238.
- [ 5 ] Fu LL, Xu ZR, Li WF, Jiang BS, Ping LU, Chun XH. Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: Implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology Advances* 2007, 25: 1-12.
- [ 6 ] Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T. Systematic Screening of All Signal Peptides from *Bacillus subtilis*: A Powerful Strategy in Optimizing Heterologous Protein Secretion in Gram-positive Bacteria. *Journal of Molecular Biology* 2006, 362: 393-402.
- [ 7 ] Zhu FM, Ji SY, Zhang WW, Li W, Cao BY, Yang MM. Development and Application of a Novel Signal Peptide Probe Vector with PGA as model protein: monitoring Tat Pathway Signal Peptides in *B. subtilis* WB700. *Molecular Biotechnology* 2008, 39: 225-230.
- [ 8 ] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 27-30.
- [ 9 ] 祝发明. 枯草芽胞杆菌 Tat 分泌表达青霉素 G 酰化酶初步研究. 西北农林科技大学的博士学位论文, 2006.
- [ 10 ] Bendtsen JD, Nielsen H. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340: 783-795.
- [ 11 ] 曹要玲. 耐碱性木聚糖酶高产菌株的筛选、产酶条件优化及其木聚糖酶基因的克隆. 西北农林科技大学的硕士学位论文, 2006.
- [ 12 ] Yang MM, Zhang WW, Zhang XF, Cen PL. Construction and characterization of a novel maltose inducible expression vector in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters* 2006, 28: 1713-1718.
- [ 13 ] Rusch SL, Kendall DA. Transport of an Export-defective Protein by a Highly Hydrophobic Signal Peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(2): 1243-1248.

# Screening of optimal signal peptide for heterologous xylanase secretion by *Bacillus Subtilis*

Xin Fan , Mingming Yang , Pengtao Cao , Wei Zhang , Wen Zhang , Xiuping Song , Yuesheng Gong\*

Department of Animal Science , Northwest A&F University , Yangling 712100 , China

**Abstract:** [ **Objective** ] We searched optimal signal peptide for heterologous and exogenous secretion of xylanase in *Bacillus subtilis*. [ **Methods** ] We constructed a screening vector for signal peptides from *B. subtilis*. The Alkali resistance xylanase gene (xynA) from *Bacillus pumilus* was chosen as reporter gene and cloned into *E. coli* and *B. subtilis* shuttle vector pGJ148 which has maltose-inducible promoter Pglv and spectinomycin resistant gene. 24 Sec-type signal peptides (SPs) was amplified from *B. Subtilis* 1A747 and cloned into the screening vector for the expression of xynA in *B. Subtilis* WB700. The xylanase activity of the culture supernatant were detected after 24h incubation. [ **Results** ] The screening of these signal peptides revealed differences in xylanase activity of the culture supernatants , The recombinant strain containing Ynff signal peptide showed the highest xylanase acitivity (37.2IU/mL). [ **Conclusion** ] Experiment proved screening of signal peptides is effective way for optimization of the export of heterologous protein in *B. subtilis*.

**Keywords:** xylanase gene , singal peptides , *Bacillus Subtilis*

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30871813)

\* Corresponding author. Tel: +86-29-87092102; E-mail: gongyuesheng@sohu.com

Received: 27 December 2010/ Revised: 28 February 2011

## 系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位 ,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank ,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA ,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件 (如 NJ 法) ,并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法 ,如 Neighbour - Joining 等 ,这样结果就更为可靠 ,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作 [参见:微生物学报 ,2004 44(2) :143. ]

① 系统树中:菌名应列出全称 ,且属和种名应斜体 ,名称后再加括号 ,其内含序列号。

② 图注 (本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容 ,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰 ,字体为"Time New Roman" ,字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"\* . Tif" ,分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word" ,画出树 ,输入文字。