

长梗木霉 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及表达

钟斐¹ 叶秀云^{1,2} 李仁宽^{1,2} 严芬^{1,2} 林娟^{1,2} 华宝玉¹ 杨捷^{1,2*}

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

(2. 酶高效表达国家工程实验室 福建 福州 350002)

摘要: 【目的】以实验室筛选获得的一株长梗木霉 GM2 (*Trichoderma longibrachiatum*) 为材料, 克隆出其 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase)基因 *bgII* 并在大肠杆菌和酵母中进行表达。【方法】利用同源克隆扩增出其 β -葡萄糖苷酶基因 *bgII* 全长序列, 分别亚克隆到质粒 pET-32a(+)和 pPICZ α -B 中, 构建其原核表达载体 pET32a(+)-*bgII* 和真核表达载体 pPICZ α -B-*bgII*。【结果】*bgII* 基因序列全长 2 369 bp, 含两个内含子, 编码 744 个氨基酸。在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达 *bgII*, 重组蛋白以包涵体形式存在, 上清液中没有 β -葡萄糖苷酶的酶活。将载体 pPICZ α -B-*bgII* 电转化入毕赤酵母 GS115, 得到 78 kD 左右重组蛋白, 与预测大小相符。按 9%接种量接入 50 mL YP 培养基(初始 pH 5.5), 30 °C 振荡培养 96 h, 添加终浓度 1%的甲醇诱导后 β -葡萄糖苷酶酶活达 60 U/mL。重组酶 *bgII* 催化水杨苷水解反应的最适 pH 为 5.0, 最适温度为 70 °C; 另外, 此 *bgII* 在 pH 3.0-10.0 和 40 °C-60 °C 范围内具有比较好的稳定性。【结论】长梗木霉 GM2 的 β -葡萄糖苷酶在 *P. pastoris* 中获得可溶性表达, 并证明有一定的活性。

关键词: β -葡萄糖苷酶, 长梗木霉, 克隆, 表达, 毕赤酵母

基金项目: 福建省科技厅项目(No. 2011J05078, 2010J0573); 福建省教育厅项目(No. JA10023, JA10022); 福州大学人才基金项目(No. XRC-1032)

*通讯作者: Tel: 86-591-22866376; 信箱: fjfzhyj@gmail.com

收稿日期: 2011-11-15; 接受日期: 2012-02-22

Cloning and expression of the beta-glucosidase gene from *Trichoderma longibrachiatum*

ZHONG Fei¹ YE Xiu-Yun^{1,2} LI Ren-Kuan^{1,2} YAN Fen^{1,2} LIN Juan^{1,2}
HUA Bao-Yu¹ YANG Jie^{1,2*}

(1. College of Biological Sciences and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. National Engineering Laboratory for Highly Efficient Enzyme Expression, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] The complete sequence of a β -glucosidase gene from a *Trichoderma longibrachiatum* strain GM2 previously isolated in the laboratory, namely *bgII*, was amplified and expressed. [Methods] The gene of *bgII* was amplified via homologous cloning. The *bgII* sequence corresponding to the mature peptide was subcloned into plasmids pET-32a(+) and pPICZ α -B, respectively. [Results] Sequencing results showed that the *bgII* gene was 2 369 bp in size encoding 744 amino acids, interrupted by two introns. The *bgII* protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) existed mostly in inclusion bodies, and there was no detectable β -glucosidase activity in the soluble proteins. The expression vector pPICZ α -B-*bgII* was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation, and the recombinant protein with the molecular weight around 78 kD, consistent with the expected protein size, was secreted. Under the fermentation conditions of 9% initial inoculum, initial pH of 5.5, 30 °C and 1% methanol induction, after shaking for 96 h, the β -glucosidase activity of 60 U/mL was obtained. Enzyme property analyses demonstrated that the optimum pH and the optimum temperature for the recombinant *bgII* were 5.0 and 70 °C, respectively; furthermore, this *bgII* exhibited good stability at pH between 3.0 and 10.0 and the temperature range of 40 °C–60 °C. [Conclusion] The gene of *bgII* was expressed in *P. pastoris* with β -glucosidase activity.

Keywords: β -glucosidase, *Trichoderma longibrachiatum*, Cloning, Expression, *Pichia pastoris*

β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, EC3,2,1,21), 简称BG, 全称 β -D-葡萄糖苷水解酶, 又名纤维二糖酶(Cellobiase)、龙胆二糖酶(Gentobiase)和苦杏仁苷酶(Amygdalase), 是一种能够水解结合于末端非还原性的 β -D-糖苷键, 释放出 β -D-葡萄糖和相应配基的葡萄糖苷酶^[1]。

研究发现, β -葡萄糖苷酶在纤维素的酶法水解过程中起着关键作用^[2], 是纤维素水解成葡萄糖的限制因素, 而纤维素是自然界含量最为丰富的可再生碳水化合物, 以纤维素为原料生产燃料乙醇成为许多国家重点发展代替化石能源的一种生物能源产品。食品工业中, 以葡萄糖为原料,

在 β -葡萄糖苷酶的作用下合成低聚龙胆糖^[3]; 在医学方面, 由于病毒糖蛋白的合成会依赖葡萄糖苷酶的活性, 因此一些科研工作者通过研究葡萄糖苷酶的抑制剂来找到抑制HIV的方法^[4]。最近发现, 植物 β -葡萄糖苷酶能水解野黑樱苷, 释放氢氰酸, 在植物体病虫害防御中起作用。因此, 研究 β -葡萄糖苷酶具有重要的理论和实用价值。

到目前为止, 已有上百个微生物 β -葡萄糖苷酶基因得到克隆^[5], 许多在大肠杆菌或者酵母中得到了表达^[6-8]。真菌中目前 β -葡萄糖苷酶报道较多的是酵母^[9]和木霉属、曲霉属^[10-12]等霉菌。

曲霉属中研究较多的是黑曲霉;木霉来源的纤维素酶基因研究中里氏木霉和绿色木霉较多^[13-16],而对长梗木霉研究较少^[17-18],对于长梗木霉来源的 β -葡萄糖苷酶基因的克隆表达研究未有报道。本实验室前期筛选得到一株耐高温纤维素降解菌,命名为GM2。经菌落、菌体形态学观察并结合ITS rDNA分子生物学鉴定,将GM2确定为长梗木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)。本实验利用分子生物学手段将长梗木霉GM2的 β -葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中成功表达,从而为今后进一步对该基因进行结构和功能分析以及分子改造奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

长梗木霉GM2由本实验室从腐烂的秸秆中分离并保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21(DE3)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115由本实验室保藏,表达载体pET-32a(+)购自Novagen公司,pPICZ α -B和克隆载体pCR2.1购自Invitrogen公司。

1.2 试剂及培养

各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、*rTaq* DNA Polymerase、低分子量标准蛋白质均购自TaKaRa Biotechnology公司。Gel Extraction Kit为TIANGEN公司产品。*Pfu* DNA Polymerase为Fermentas公司产品。Zeocin、山梨醇、琼脂糖、酵母粉、蛋白胨等购自上海生物工程公司。PDA培养基、LB培养基、LLB培养基、YPD培养基的配制均按照Invitrogen公司毕赤酵母操作手册进行。

1.3 真菌DNA的制备

菌株GM2接入PDA液体培养基,30℃、200 r/min摇床培养24 h后,8层纱布过滤菌丝体,无菌蒸馏水洗涤3遍。取适量菌丝体于研钵中,

加入液氮快速研磨成细小粉末。采用快捷型植物基因组DNA提取系统(TIANGEN公司)提取基因组DNA。

1.4 β -葡萄糖苷酶(*bgII*)基因的克隆

用*Pfu* DNA Polymerase从基因组DNA中扩增出各个外显子,再用Over-lap PCR将各段外显子连接起来,具体步骤如图1所示。根据里氏木霉*bgII*基因(GenBank accession No. U09580.1)设计引物:P1:5'-ATGCGTTACCGAACAGCAGC TGCGCTG-3';P2:5'-CTACGCTACCGACAGAG TGCTCGTCAA-3'。第一轮PCR用引物P1和P2,以基因组DNA为模板,得到全长序列;第二轮用引物F1 [5'-ATCCGGAATTC TCGCTGTTCCCC CTGCAGGAAC-3' (*EcoR* I)]和F2 (5'-GTAGTTG AACTTGGTGTAAAGACAGGCCAAAGCCAAAC TCGTACCG-3')、F3 (5'-CGAGTTTGGCTTTGGC CTGTCTTACACCAAGTTCAACTACTCACG-3')和F4 [5'-ATCCGTCTAGACGCTACCGACAGA GTGCTCGT-3' (*Xba* I)],以基因组DNA为模板,常规PCR扩增出外显子exon2、exon3;第三轮用引物F1和F4,以外显子exon2、exon3为模板经过Overlap-PCR扩增获得exon2-3,将其克隆到pCR2.1-T载体上。利用*rTaq* DNA Polymerase进行菌落PCR选取阳性克隆子(pCR2.1-T-*bgII*),酶切验证后进行序列测定(上海生工)。

1.5 *bgII*基因在大肠杆菌中的表达

用引物F5 [5'-CGGAATTCGCTGTTCCCC TGCAGGA ACTCCAT-3' (*EcoR* I)]和F6 [5'-GCCT CGAGCTACGCTACCGACAGAGTGCTCGT-3' (*Xho* I)],以质粒pCR 2.1-T-*bgII*为模板,高保真PCR (*Pfu* DNA Polymerase)获得*bgII*成熟肽编码序列。*EcoR* I和*Xho* I双酶切pET-32a(+)空载体质粒与*bgII*基因成熟肽编码序列,分别胶回收载体片段和目的基因,然后4℃连接过夜后,转化到大肠杆菌DH5 α ,测序验证后将正确的质粒命名为pET32a(+)-*bgII*重组子。

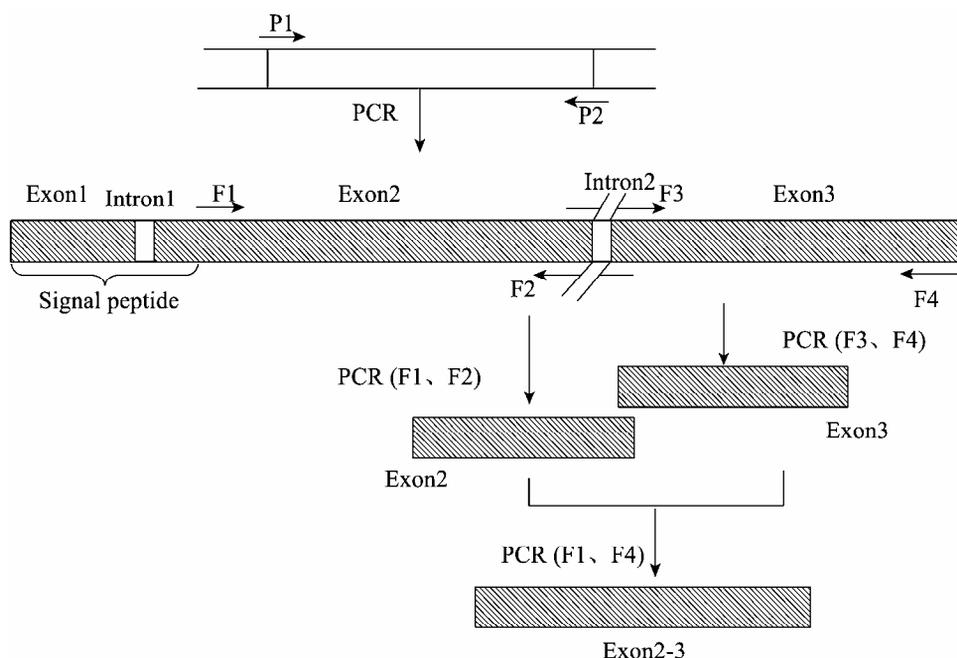


图1 β -葡萄糖苷酶(*bgII*)基因结构示意图与 Over-lap PCR 过程

Fig. 1 The structure of β -glucosidase (*bgII*) gene and the procedure of over-lap PCR

提取 pET32a(+)-*bgII* 重组子的质粒 DNA, 转化 BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于 LB/Amp 平板, 挑取阳性克隆子 37 °C、180 r/min, 振荡培养过夜。然后按 1% 的接种量接种至 50 mL 的 LB/Amp 培养基, 加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG, 37 °C 培养 5 h。每 1 h 取样 1 mL, 将样品离心收集菌体细胞, 重悬细胞于一定体积的 50 mmol/L PBS (pH 8.0) 中。采用冰浴超声破碎, 超声破碎的条件: 功率 360 W, 破碎 2 s, 间隔 2 s, 共 20 min。离心, 分别取上清液和沉淀用于 SDS-PAGE 检测目的蛋白的可溶性分析。

1.6 表达载体 pPICZ α -B-*bgII* 的构建、转化及转化子的诱导表达

EcoR I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pPICZ α -B 和 pCR2.1-T-*bgII*, 分别胶回收载体片段和目的基因, 然后 4 °C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 得到的正确质粒命名为 pPICZ α -B-*bgII*。

*Pme*I 线性化质粒 pPICZ α -B-*bgII*, 电转化毕赤酵母 GS115 感受态, 山梨醇重悬后转至无菌试

管中, 加入 1 mL YPD 培养基, 30 °C 静置 1-2 h, 取适量均匀涂布在 YPD/Zeocin (100 mg/L) 筛选平板上, 30 °C 培养直到单菌落出现。挑取酵母单菌落接入 YPD/Zeocin (100 mg/L) 液体培养基, 振荡培养, PCR 和双酶切验证, 鉴定后获取重组毕赤酵母 GS115/pPICZ α -B-*bgII*。pPICZ α -B 空质粒处理同上, 转化菌为阴性对照。

鉴定正确的单菌落接种至 5 mL YPD 培养基中, 30 °C 培养 24 h 后, 将培养液接入 50 mL YP 培养基中, 30 °C 振荡培养 6 h 后, 添加甲醇诱导 *bgII* 基因的表达。

对酵母重组子产 β -葡萄糖苷酶的发酵条件: 包括培养基初始 pH 值、添加甲醇的浓度和接种量进行单因素研究。设置培养基初始 pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5; 接种量分别为 5%、7%、9%、11%、13%; 添加的甲醇浓度分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 接入装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中。分别在每种条件下培养酵母重组子菌株, 30 °C 培养 96 h 时取样, 分别测

定发酵液的 β -葡萄糖苷酶活力。

1.7 重组蛋白的检测

1.7.1 对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)定性平板检测:对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)检测平板的组成成分为:2% (W/V)琼脂, pH 5.0 的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, 2.5 mmol/L pNPG。取重组毕赤酵母发酵上清液 200 μ L 加入到定性检测平板上的空穴中, 以 GS115/ pPICZ α -B 酵母菌株上清液作阴性对照, 50 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后, 观察空穴周围是否出现反应圈。

1.7.2 SDS-PAGE 检测:将发酵上清液进行 SDS-PAGE 分析, SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%, 电泳完毕用考马斯亮蓝染色。

1.7.3 β -葡萄糖苷酶活性的定量检测:为测定毕赤酵母重组子发酵上清液的酶活, 吸取 0.5 mL 粗酶液于具塞比色管中, 加入 1.5 mL 0.5% 水杨苷柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.0), 于 50 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min, 沸水浴灭活 5 min, 按 DNS 比色法测定还原糖含量, 以灭活的酶液作为空白。酶活定义: 每分钟内分解底物生成 1 μ g 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.8 重组 *bgII* 酶学性质分析

以水杨苷为底物, 在不同 pH (3.0–8.0, 间隔 1.0) 的 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中, 测定酶活力, 确定酶的最适反应 pH。为确定 pH 稳定性, 以不同 pH (3.0–11.0, 间隔 1.0) 的缓冲液(0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液或 0.1 mol/L Na₂HPO₄-NaOH 缓冲液)稀释酶液, 置于室温下保温 1 h, 测定残余酶活力。将 0 h 酶液作为对照, 计算相对酶活力。

最适反应温度通过在 30 $^{\circ}$ C–90 $^{\circ}$ C (间隔 10 $^{\circ}$ C) 条件下测定酶活力。温度稳定性的测定是在不同温度(40 $^{\circ}$ C–80 $^{\circ}$ C, 间隔 10 $^{\circ}$ C) 下将粗酶液保温 1 h 后测定残余酶活力。以上实验独立进行至少 2 次, 每次 3 个平行。

2 结果

2.1 *bgII* 基因的分析

bgII 基因全长 2 369 bp, BLAST 分析结果表明, 该基因与绿色木霉(GenBank accession No. FJ882071.1)和里氏木霉(GenBank accession No. U09580.1)有 93% 和 89% 同源性。发现 *bgII* 基因含有两个内含子, 分别位于 35–66 bp 和 1 896–1 959 bp。

通过 Overlap-PCR 得到 *bgII* 基因 cDNA 序列, 全长 2 235 bp, 编码 744 个氨基酸, 如图 2 所示。<http://www.expasy.org/> 预测该蛋白分子量为 78 251.4 D, 等电点为 5.96, 1–31 位氨基酸为信号肽序列。该蛋白的氨基酸序列分别与绿色木霉(*Trichoderma viride*)来源的(GenBank accession No. AAQ76093.1)和里氏木霉(*Trichoderma reesei*)来源的 *bgII* (GenBank accession No. AAA18473.1) 94% 和 96% 相似, 与 *Talaromyces stipitatus* 来源的 *bgII* (GenBank accession No. XP_002485128.1) 仅 62% 相似, 与 *Thielavia terrestris* 来源的 *glycoside hydrolase family 3 protein* (GenBank accession No. AEO67341.1) 70% 相似。*bgII* 编码的蛋白质属于糖苷水解酶家族 3 (Glycosyl hydrolases family 3), 并且蛋白的氨基酸含有该家族的保守区域, Glu²⁶² 和 Asp²⁶⁷ 氨基酸残基为催化活性中心并且在糖苷水解酶家族 3 中是高度保守的。

2.2 *bgII* 基因在大肠杆菌中的表达

用 IPTG 诱导 pET32a(+)-*bgII*/BL21 表达的蛋白量随着诱导时间的延长而增多, 4 h 几乎达到饱和; 诱导 4 h 后的菌体用溶菌酶和超声波破碎, 离心, 分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3 所示, 目的蛋白大部分位于沉淀中, 上清中几乎没有目的蛋白, 上清液中没有测出 β -葡萄糖苷酶的酶活, 说明在大肠杆菌 BL21 表达的重组 β -葡萄糖苷酶形成了大量包涵体团聚体。

T.L GM2_bglI	(1)	<u>MRYRTAAALALAAAFVTADSHSTRNPAERAVVPAGTPTGTAVDKAKAALAKRN</u>
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(1)	<u>MRYRTAAALALATGPFARADSSSTSGASAEAVVLPAGTPTGTAVDKAKAALAKRN</u>
T.R_bglI(AAA18473.1)	(1)	<u>MRYRTAAALALATGPFARADSSSTSGASAEAVVLPAGTPTGTAVDKAKAALAKRN</u>
T.T(AE067341.1)	(1)	-----MLLHLAAMLAAYLARADETKNKVPRAAHSGTAAADRAHSSAAKAAAVAKMS
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(1)	-----MTNTALILLLASSVAPIINAQVISWSDAHSSATTLLGKRS
T.L GM2_bglI	(56)	LQDKVGVIVSGVWNGGPCVGNTPASASISYPSLCLQDQPLGVRYSTGSAFTTGGI
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(56)	LQDKVGVIVSGVWNGGPCVGNTPASKFYPSLCLQDQPLGVRYSTGSAFTTGGV
T.R_bglI(AAA18473.1)	(56)	LQDKVGVIVSGVWNGGPCVGNTPASKFYPSLCLQDQPLGVRYSTGSAFTTGGV
T.T(AE067341.1)	(51)	QQDKINIVTSGVWNGGPCVGNTPAIGSVGYPLCLQDQPLGVRYSTGSAFTTGGI
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(40)	QNDKIEIVTETSGKGPCVGNTRAPGSGSYPSLCLQDQPLGVRYANFVTAFFPST
T.L GM2_bglI	(111)	CAASTWMDINLIRBRGQFVIGSEVKASGLHVLGGPVAGPLGKIPGGRRWEGFVDFP
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(111)	CAASTWMDVNLIRBRGQFVIGSEVKASGLHVLGGPVAGPLGKIPGGRRWEGFVDFP
T.R_bglI(AAA18473.1)	(111)	CAASTWMDVNLIRBRGQFVIGSEVKASGLHVLGGPVAGPLGKIPGGRRWEGFVDFP
T.T(AE067341.1)	(106)	CAASTWMDVNLIRBRGQFVIGSEVKASGLHVLGGPVAGPLGKIPGGRRWEGFVDFP
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(95)	NASLFWMDRLMNQRCGAALSAKAGLGVNVLGGPVAGPLGKIPGGRRWEGFATDFP
T.L GM2_bglI	(166)	SLGLAMGQTIINGIQSYGQAQAKHYIINEQELSRDITSSNEDDRTHELYDHPFF
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(166)	SLGLAMGQTIINGIQSYGQAQAKHYIINEQELSRDITSSNEDDRTHELYDHPFF
T.R_bglI(AAA18473.1)	(166)	SLGLAMGQTIINGIQSYGQAQAKHYIINEQELSRDITSSNEDDRTHELYDHPFF
T.T(AE067341.1)	(161)	SLGLAMGQTIINGIQSYGQAQAKHYIINEQELSRDITSSNEDDRTHELYDHPFF
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(150)	SLSSVAMIEPTITMDSQSGQAQAKHYIINEQELSRDITSSNEDDRTHELYDHPFF
T.L GM2_bglI	(221)	ADAVANVASMCSYNNKNTTACBPQYTLQVYKDDLGGFGYMLCWNAGHATP
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(221)	ADAVANVASMCSYNNKNTTACBPQYTLQVYKDDLGGFGYMLCWNAGHATP
T.R_bglI(AAA18473.1)	(221)	ADAVANVASMCSYNNKNTTACBPQYTLQVYKDDLGGFGYMLCWNAGHATP
T.T(AE067341.1)	(216)	ADAVANVASMCSYNNKNTTACBPQYTLQVYKDDLGGFGYMLCWNAGHATP
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(205)	ADAVANVASMCSYNNKNTTACBPQYTLQVYKDDLGGFGYMLCWNAGHATP
T.L GM2_bglI	(276)	GSANGLDLSMPGDDN--GNRLLWGPALTIHAVNGQVPTSRVDDM/TRLAAWY
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(276)	GSANGLDLSMPGDDN--GNRLLWGPALTIHAVNSNQVPTSRVDDM/TRLAAWY
T.R_bglI(AAA18473.1)	(276)	GSANGLDLSMPGDDN--GNRLLWGPALTIHAVNSNQVPTSRVDDM/TRLAAWY
T.T(AE067341.1)	(271)	GSANGLDLSMPGDDN--GNRLLWGPALTIHAVNSNQVPTSRVDDM/TRLAAWY
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(260)	NSANGLDLSMPGDDN--GNRLLWGPALTIHAVNSNQVPTSRVDDM/TRLAAWY
T.L GM2_bglI	(329)	LVGGDQ-----AGYPSFDNRRVYGNHRTNVRALARDIVLLRNQANVLPPLAK
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(329)	LVGGDQ-----AGYPSFNTRRNVOGNHKTNVRALARDIVLLRNQANVLPPLAK
T.R_bglI(AAA18473.1)	(329)	LVGGDQ-----AGYPSFNTRRNVOGNHKTNVRALARDIVLLRNQANVLPPLAK
T.T(AE067341.1)	(324)	LVGQN-----AGYPTNRRKASVGNHKEVNRALARDIVLLRNQGGVLPPLAK
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(315)	LVGGDQGFPAVAFNSWNGGQAIVNVTSSNHNEVAHVAVARDIVLLRNNGTLPPLAK
T.L GM2_bglI	(377)	PASIAVIGSVAVIGNHARNSPSCSDRGGCNSGALFMGWSGSAVNYPYFVAFYDAEN
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(377)	PASIAVVGSAALIGNHARNSPSCSDRGGCDDGALFMGWSGSAVNYPYFVAFYDAEN
T.R_bglI(AAA18473.1)	(377)	PASIAVVGSAALIGNHARNSPSCSDRGGCDDGALFMGWSGSAVNYPYFVAFYDAEN
T.T(AE067341.1)	(371)	PARLALVGSAAVAVANPENGIN--CNDQSCDQALFMGWSGSAVNYPYFVAFYDAEK
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(370)	PSIAAIIETDAQTNPSGPN--ACTDRGCDTTLFMGWSGSCQCFPYITDGLTATK
T.L GM2_bglI	(432)	TRASSGTVTLNNDNTSSGASARGKDVAVIITADSGEGYITVEGNAGDRIN
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(432)	TRASSGTVTLNNDNTSSGASARGKDVAVIITADSGEGYITVEGNAGDRIN
T.R_bglI(AAA18473.1)	(432)	TRASSGTVTLNNDNTSSGASARGKDVAVIITADSGEGYITVEGNAGDRIN
T.T(AE067341.1)	(424)	ARASSGTVTLNHNSTSGVASVSSAAAVIITADSGEGYITVEGNAGDRIN
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(423)	SQASSGTVTITTSISDDGTASASAKNAEYAVIITADSGEGYITVEGNAGDRIN
T.L GM2_bglI	(487)	LDPWHNGNLLVQAVASANSNIVVHSVGAILEILALPQVAVVWAGSPSQES
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(487)	LDPWHNGNLLVQAVASANSNIVVHSVGAILEILALPQVAVVWAGSPSQES
T.R_bglI(AAA18473.1)	(487)	LDPWHNGNLLVQAVASANSNIVVHSVGAILEILALPQVAVVWAGSPSQES
T.T(AE067341.1)	(479)	LDPWHNGNLLVQAVASANSNIVVHSVGPVLEILALTAGVAVVWAGSPSQEN
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(478)	LDPWHNGNLLVQAVAVNKKTIIVHSVGPVLEILALQENVAVVWAGSPSQES
T.L GM2_bglI	(542)	GFALDVLGQVSPSGKLYTIAKSPNDYNTIIVSGSDSPSEGLFDYKHFDDA
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(542)	GFALDVLGQVSPSGKLYTIAKSPNDYNTIIVSGSDSPSEGLFDYKHFDDA
T.R_bglI(AAA18473.1)	(542)	GFALDVLGQVSPSGKLYTIAKSPNDYNTIIVSGSDSPSEGLFDYKHFDDA
T.T(AE067341.1)	(534)	GFALDVLGSLTAPSGKLYTIAKRAEDYGTAVVSGDDNYSSEGLFDYKHFDDA
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(533)	GFALADILVGRTPASGKLYTIAKQTAQYGTAVVSGDDNYSSEGLFDYKHFDDA
T.L GM2_bglI	(597)	NIIPRFEGGSLKFN--TTFYSLDVLSTAKS--GPTGAVVPGGSDLLQVW
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(597)	NIIPRFEGGSLKFN--TTFYSLDVLSTAKS--GPTGAVVPGGSDLLQVW
T.R_bglI(AAA18473.1)	(597)	NIIPRFEGGSLKFN--TTFYSLDVLSTAKS--GPTGAVVPGGSDLLQVW
T.T(AE067341.1)	(588)	KIIPRFEGGSLKFN--TTFYSLDVLSTAKS--GPTGAVVPGGSDLLQVW
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(587)	NIIPRFEGGSLKFN--TTFYSLDVLSTAKS--GPTGAVVPGGSDLLQVW
T.L GM2_bglI	(647)	TVTVDIANSQVVGAEVAQLYITPSSAPRPPKQLRGFARLNLAPGSSGATFN
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(650)	TVTVDIANSQVVGAEVAQLYITPSSAPRPPKQLRGFARLNLAPGSSGATFN
T.R_bglI(AAA18473.1)	(647)	TVTVDIANSQVVGAEVAQLYITPSSAPRPPKQLRGFARLNLAPGSSGATFN
T.T(AE067341.1)	(640)	TVTVDIANSQVVGAEVAQLYITPSSAPRPPKQLRGFARLNLAPGSSGATFN
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(637)	TVTVDIANSQVVGAEVAQLYITPSSAPRPPKQLRGFARLNLAPGSSGATFN
T.L GM2_bglI	(702)	IRRRDLSYWDITTSQNVVVPSSGSGISVVGASSRDRRLTSTLSVA*
T.V_bglI(AAQ76093.1)	(705)	IRRRDLSYWDITTSQNVVVPSSGSGISVVGASSRDRRLTSTLSVA*
T.R_bglI(AAA18473.1)	(702)	IRRRDLSYWDITTSQNVVVPSSGSGISVVGASSRDRRLTSTLSVA*
T.T(AE067341.1)	(695)	LIRRRDLSYWDITTSQNVVVPSSGSGISVVGASSRDRRLTSTLSVA*
T.S_bglI(XP_002485128.1)	(692)	LIRRRDLSYWDITTSQNVVVPSSGSGISVVGASSRDRRLTSTLSVA*

图 2 *bglI* 的氨基酸序列

Fig. 2 The deduced amino acid sequence of *bglI* gene

注: 下划线处为信号肽, *代表终止密码子, Δ 表示内含子位置, 方框处为保守的催化区域, 黑色背景为完全一样的区域, 灰色背景的是相似区域。

Note: The signal peptide is underlined. * designates the stop codon. The conserved amino acids in the catalytic center are boxed. Δ indicates the intron position. The identical amino acids are in black background, and the similar amino acids are in gray background.

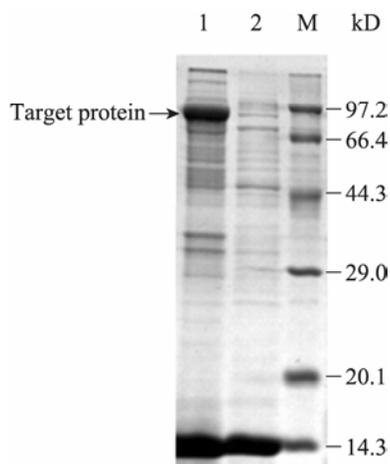


图3 重组表达蛋白可溶性分析

Fig. 3 Solubility analysis of the expressed protein

注: 细胞经过超声破碎后离心, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE. M: 低宽度标准蛋白; 1: 沉淀中的蛋白; 2: 上清液中的蛋白.

Note: The cell were ultrasonicated and centrifuged. The supernatant and sediment were separately collected for SDS-PAGE. M: Protein marker; 1: Proteins in the sediment; 2: Proteins in the supernatant.

2.3 *bgII* 基因在毕赤酵母中的表达

分别取添加甲醇前的发酵液、诱导 1 d 后的发酵液和诱导 3 d 后的发酵液, 离心取上清液进行 SDS-PAGE 分析, 得到的结果如图 4 所示, 重组子 GS115/pPICZ α -B-*bgII* 经过甲醇诱导后, 能产生大小为 78 kD 左右的蛋白。

对-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pPNPG)在 β -葡萄糖苷酶的作用下反应生成产物对-硝基苯酚显示黄色, 如图 5 所示, 注入 GS115/pPICZ α -B-*bgII* 重组子发酵液的周边出现黄色反应圈, 对照组 GS115/pPICZ α -B 发酵液周边则没有变化, 说明重组毕赤酵母的发酵上清液中存在有活性的 β -葡萄糖苷酶。

重组子不同发酵时间的发酵液 DNS 法测定 β -葡萄糖苷酶酶活, 结果如图 6 所示, 96 h 时, 发酵液中重组 β -葡萄糖苷酶活力最高, 为 41 U/mL。

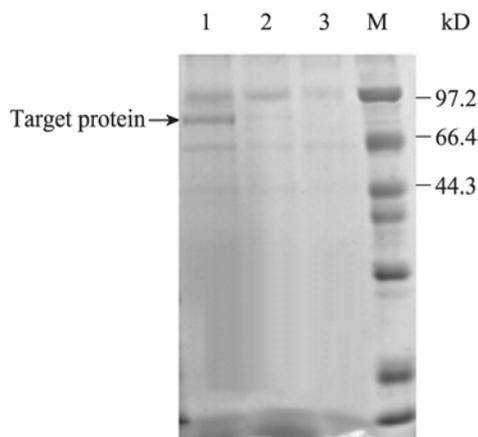


图4 重组 GS115/pPICZ α -B-*bgII* 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 Electrophoretic analysis of the recombinant GS115/pPICZ α -B-*bgII* by SDS-PAGE

注: M: 低宽度标准蛋白; 1: 诱导 3 d 的 GS115/pPICZ α -B-*bgII* 发酵液; 2: 诱导 1 d 的 GS115/pPICZ α -B-*bgII* 发酵液; 3: 诱导前的 GS115/pPICZ α -B-*bgII* 发酵液.

Note: M: Protein marker; 1: GS115/pPICZ α -B-*bgII* induced for 3 d; 2: GS115/pPICZ α -B-*bgII* induced for 1 d; 3: GS115/pPICZ α -B-*bgII* before induction.

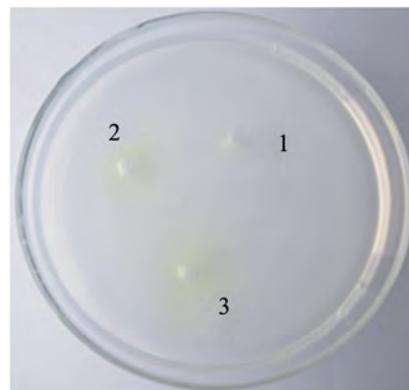


图5 重组 β -葡萄糖苷酶的平板定性检测

Fig. 5 Qualitative detection of the recombinant *bgII* on agar medium containing pPNPG

注: 1: 对照组 GS115/pPICZ α -B 发酵液无反应圈; 2、3: GS115/pPICZ α -B-*bgII* 重组子周边显色, 具有 β -葡萄糖苷酶活力.

Note: 1: Control lacking glucosidase activity; 2, 3: Transformants showing glucosidase activity.

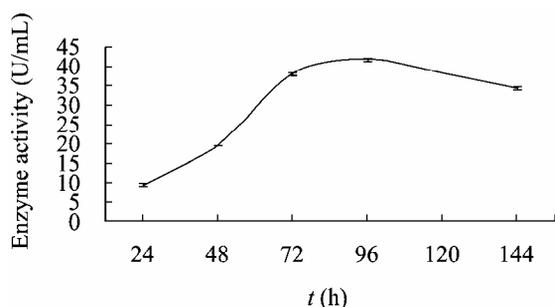


图6 重组菌株诱导产酶情况

Fig. 6 Status of *bgII* production of recombinants

分别在每种条件下培养酵母重组子菌株, 30 °C 培养 96 h 时取样, 测定发酵液的 β -葡萄糖苷酶活力(图 7)。结果显示, 当发酵培养基的初始 pH 为 5.5, 种子培养液接种量为 9%, 添加 1% 甲醇浓度时, GS115/pPICZ α -B-*bgII* 重组子发酵液中 β -葡萄糖苷酶活达到最高, 为 60 U/mL。

2.4 重组 *bgII* 的酶学性质

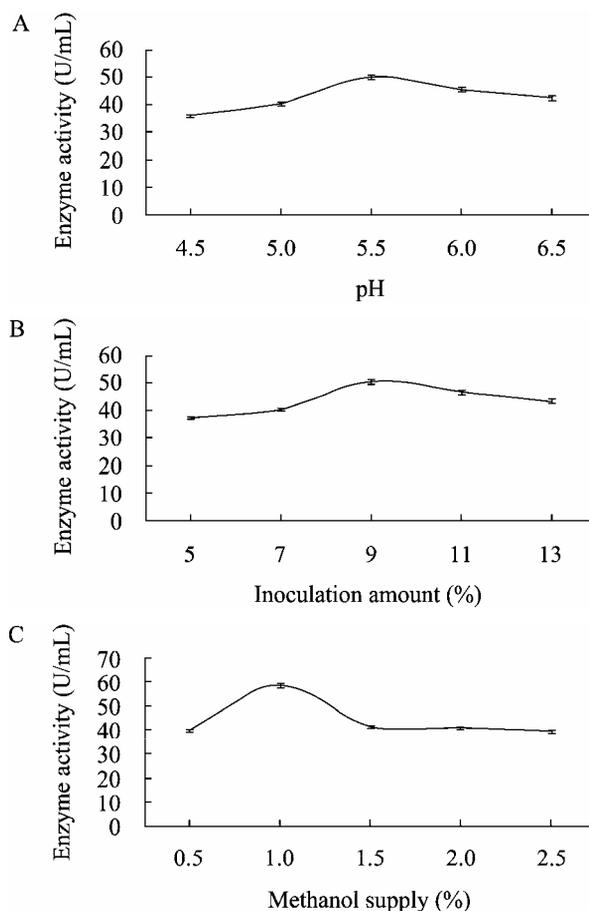
以 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠为缓冲体系, 水杨苷为底物, 测得重组酶的最适 pH 为 5.0 (图 8A)。在 pH 3.0–10.0 范围内, 酶的稳定性较好; 重组酶在 pH 3.0–6.0 条件下, 室温保温 1 h 能保留 80% 以上的活力, pH 7.0–10.0 同样条件下能保留 70% 以上的活力(图 8B)。

在最适反应 pH 下测得重组 *bgII* 酶的最适反应温度为 70 °C (图 8C), 而当温度升至 90 °C 时酶活力迅速下降, 仅有 70 °C 时的 13%。酶在 40 °C–60 °C 条件下有很好的稳定性, 保温 1 h 后相对酶活力均在 80% 以上。随着温度的升高, 酶趋于不稳定, 在温度 80 °C 下保温 1 h 后, 酶的相对酶活力为 22% (图 8D)。

3 讨论

本文从一株木霉属菌中克隆出 β -葡萄糖苷酶基因 *bgII*, 该序列全长 2 235 bp, 编码 744 个氨基酸。*bgII* 基因在大肠杆菌中, 以无活性的包涵体形式存在; 而在毕赤酵母中, 重组酶 *bgII* 的定量

和定性分析结果均表明: *bgII* 基因在 *P. pastoris* 中实现了分泌型的功能表达。研究表明, β -葡萄糖苷酶的亲核催化中心和酸碱催化中心都含有酸性氨基酸 Asp 和 Glu; Bause 等^[19]提出, 糖苷水解酶家族 3 的成员中, Asp 是保守氨基酸^[20], 在此位点以及周围的几个氨基酸序列 VMSDW 也是高度保守的。本文所得到 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列在这些位点和文献提到的一致, 因此应属于糖苷酶家族 3 成员。

图7 培养基初始 pH 值、接种量和甲醇浓度对产 β -葡萄糖苷酶的影响Fig. 7 Effect of the medium pH value, inoculation quantity and methanol concentration on *bgII* production

注: A: 培养基初始 pH 值对产酶的影响; B: 接种量对产酶的影响; C: 甲醇添加量对产酶的影响。

Note: A: Effect of the initial medium pH on *bgII* production; B: Effect of inoculation on *bgII* production; C: Effect of methanol concentration on *bgII* production.

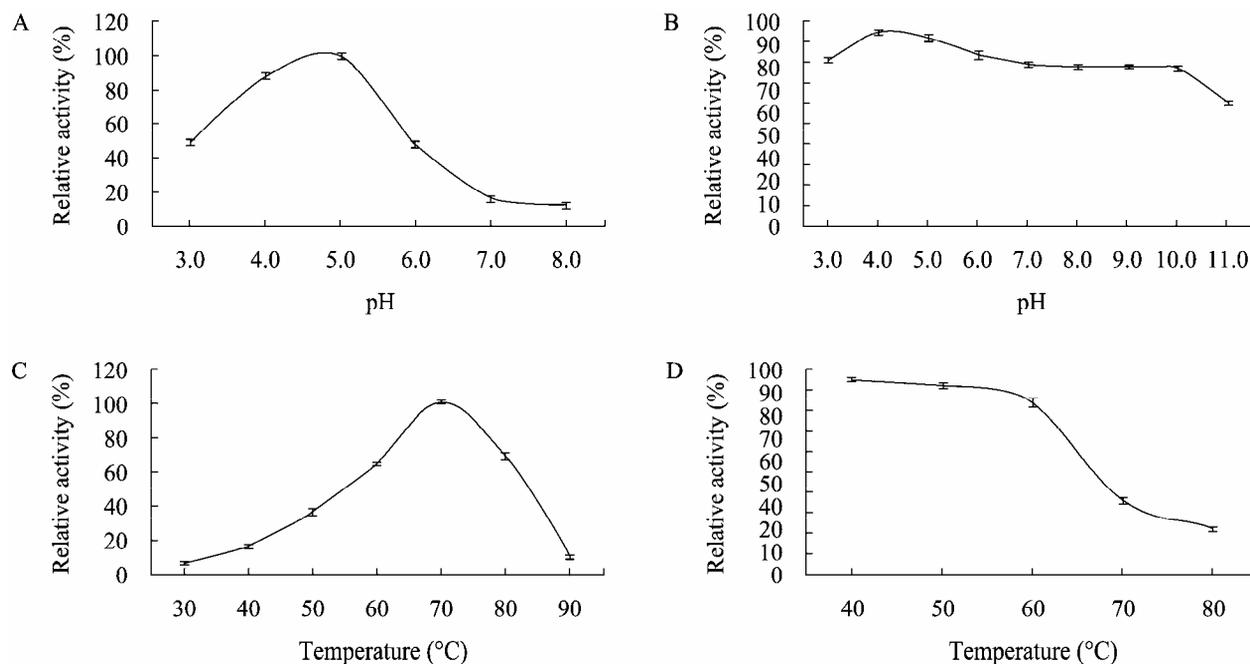


图8 pH、温度对重组 *bgII* 酶活力的影响

Fig. 8 Effect of pH and temperature on the activity and stability of the *bgII*

注: A: 最适 pH; B: pH 稳定性; C: 最适温度; D: 温度稳定性.

Note: A: pH dependence of the *bgII* enzymatic activity; B: pH stability of *bgII*; C: Temperature dependence of the *bgII* enzymatic activity; D: Thermal-stability of *bgII*.

目前研究的 β -葡萄糖苷酶主要来源于微生物。微生物来源的 β -葡萄糖苷酶在许多催化性质上都表现出相似性: 绝大多数 β -葡萄糖苷酶为酸性酶, 最适 pH 一般在 3.0–6.0 的酸性范围, 但少数 β -葡萄糖苷酶酸碱耐受性强, 最适 pH 在碱性范围内。例如, 分离得到的 *Alkalophilus* 的胞外 β -葡萄糖苷酶在 pH 4.0–10.2 具有一定的催化活性, 最适 pH 在 6.0–9.0 之间^[21]。另外, β -葡萄糖苷酶的最适温度范围很广, 分布在 40 °C–100 °C 之间。本文得到的重组 β -葡萄糖苷酶 *bgII* 的最适 pH 为 5.0, 在 pH 3.0–10.0 稳定性好, 耐酸碱的范围宽; 酶的最适反应温度在 70 °C, 在 40 °C–60 °C 条件下有很好的稳定性。本研究为今后 β -葡萄糖苷酶的研究、改造和应用奠定了基础。

参考文献

[1] Sinnott ML. Catalytic mechanism of enzymic

glycosyl transfer[J]. Chemical Reviews, 1990, 90(7): 1171–1202.

[2] Sternberg D, Vuayakumar P, Reese ET. β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1977, 23(2): 139–147.

[3] 彭喜春, 彭志英. β -葡萄糖苷酶的研究现状及应用前景[J]. 江苏食品与发酵, 2001(4): 22–25.

[4] 邵金辉, 韩金祥, 朱有名, 等. β -葡萄糖苷酶在工农医领域的应用[J]. 生命的化学, 2005, 25(1): 22–24.

[5] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803–807.

[6] Opassiri R, Hua YL, Wara-Aswapati O, et al. β -glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1[J]. The Biochemical Journal, 2004, 379(Pt1): 125–131.

[7] Kawai R, Yoshida M, Tani T, et al. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Bioscience, Biotechnology,

- and Biochemistry, 2003, 67(1): 1-7.
- [8] 房伟, 方泽民, 刘娟娟, 等. 新型海洋微生物 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及重组酶性质[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1914-1920.
- [9] 邵金辉, 赵云, 毛爱军, 等. 扣囊复膜孢酵母 β -葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中的克隆与表达[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 792-794.
- [10] 韩笑, 王义强, 陈介南, 等. 黑曲霉 *bgl* 基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. 生物学杂志, 2008, 25(4): 10-14.
- [11] 赵林果, 周潭澈, 李迅, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及序列分析[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(11): 53-57.
- [12] 唐德芳, 裴小琼, 李晓璐, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的筛选、克隆及表达[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(3): 423-426.
- [13] 周进, 银鹏. 葡萄糖苷酶在毕赤酵母中的重组表达及一步纯化[J]. 过程工程学报, 2009, 9(5): 981-986.
- [14] Kotake T, Kaneko S, Kubomoto A, et al. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Trichoderma viride* endo- β -(1-6)-galactanase gene[J]. The Biochemical Journal, 2004, 377(Pt3): 749-755.
- [15] Cummings C, Fowler T. Secretion of *Trichoderma reesei* β -glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Current Genetics, 1996, 29(3): 227-233.
- [16] 张彬彬, 李杰, 柏锡, 等. 里氏木霉 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及序列分析[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 129-134.
- [17] Gusakov AV, Sinitsyn AP, Gerasimas VB, et al. A product inhibition study of cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* using dyed cellulose[J]. Biotechnology, 1985, 3(3): 167-174.
- [18] 刘海英, 王娟, 舒正玉, 等. 长梗木霉内切葡聚糖酶 I 基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 355-359.
- [19] Bause E, Legler G. Isolation and structure of a tryptic glycopeptide from the active site of β -glucosidase A₃ from *Aspergillus wentii*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1980, 626(2): 459-465.
- [20] Fukuda K, Mori H, Okuyama M, et al. Identification of essential ionizable groups and evaluation of subsite affinities in the active site of β -D-glucosidase F₁ from a *Streptomyces* sp.[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(10): 2060-2067.
- [21] Paavilainen S, Hellman J, Korpela T. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new β -glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 927-932.