文章编号:1009 - 038X(2003)03 - 0057 - 05

木聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达及表达蛋白的纯化

薛业敏, 曹建平, 毛忠贵, 邵蔚蓝
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036)

摘 要:热海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧细菌,其产生的耐高温和热稳定性的木聚糖酶 B 具有很好的工业应用前景.利用 PCR 技术将嗜热产乙醇菌 *T. maritima* 编码高度热稳定性木聚糖酶的基因克隆至原核表达载体 pET - 20b,使之与组氨酸标签融合,并在大肠杆菌 JM109(DE3)中得到了高效表达.最后采用金属 Ni^{2+} 螯和层析柱对基因表达产物进行了纯化.

关键词:木聚糖酶 B;PCR 扩增;表达;纯化
中图分类号:Q 786 **文献标识码**:A

Expression of Xylanase B Gene of *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli*

XUE Ye-min, CAO Jian-ping, MAO Zhong-gui, SHAO Wei-lan
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Thermotoga maritima* is one of the few hyperthermophilic bacteria described to date. The xylanases found in *T. maritima* has shown the extremely thermostablity and considerable potential in large-scale production. The gene of xylanaseB from *T. maritime* ATCC 43589 was amplified by PCR, inserted into the plasmid pET-20b, and fused with the 6-His tag. The resultant recombinant plasmid pET-20b-XynB was transformed to *E. coli* JM109(DE3). A gene product band can be seen with SDS-PAGE. The recombinant protein was purified by heating and immobilizing metal affinity chromatography.

Key words: xylanase B; PCR amplification; expression; isolation

木聚糖酶是一类水解木聚糖主干链内部 β-1,4 木糖苷键的酶,多数作用于木聚糖的无侧枝区段,产生低聚糖或带有侧枝的寡聚糖[1~3].该酶不仅在食品、饲料、纺织、能源工业中有着广阔的应用前景,而且在农作物残渣的利用,特别是在纸浆造纸工业中用于纸浆漂白,能够提高纸浆白度,降低后续漂白工序的化学药剂用量,从而减少对环境的污染[4~8].由于纸浆漂白工序的环境是温度较高的碱性,这就要求木聚糖酶具有耐热和耐碱的特性.目前,人们已从自然界分离到许多产木聚糖酶的菌株,但往往都存在着产酶不高或耐热耐碱不够的问题.因此,运用现代分子生物学技术构建符合人们要求的发酵工程菌已成为研究热点.

热袍菌属的海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧细菌,生长在 55 ~ 90 ℃海底火山口处,能够分解利用淀粉、纤维素、半纤维素等多聚糖,产生耐高温和热稳定性的淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶[9,10]. 该菌所产的木聚糖酶最适催

收稿日期:2003 - 01 - 06; 修回日期:2003 - 02 - 24.
作者简介:薛业敏(1963 -),女,安徽蚌埠人,副教授,发酵工程博士研究生.

万方数据

化温度高达 105 ℃[10],是造纸工业用酶所需的理想特性.作者选择 *T. maritima* 作为材料,利用已经报道的 *T. maritima* 基因组资料,对木聚糖酶进行基因克隆、表达与纯化研究.

1 材料与方法

1.1 材料

T. maritima 购自美国菌种收藏中心,编号为 ATCC43589;大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 JM109(DE3)购于 Promega (Wisconsin, WI, USA). 质粒 pET-20b 是带有 T_7 启动子,氨苄青霉素 (Amp) 抗性基因和组氨酸标签的表达质粒,购于 Novagen 公司.

限制性内切酶 *Xho*I, *Nde*I, T_4DNA 连接酶和 PyrobestDNA 聚合酶,分别购自华美生物工程公司、博彩生物公司和宝生物工程公司;Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司;燕麦木聚糖和 IPTG 购自 Sigma 公司;质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 培养基和培养条件 大肠杆菌培养在 LB 培养基,电转化用 SOC 培养基,转化子的选择用含有氨苄抗性(100 μg/mL)的 LB 培养基,配方见文献[12].

培养 *T. maritima* 所用的培养基配方(g/dL)为:可溶性淀粉 0.5, NaCl 28, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.5, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.33, NH_4Cl 0.25, $CaCl_2$ 0.38, 酵母膏 0.1,微量元素 15 mL, 树脂天青(resazurin) 1 mg,pH 7.0.培养基经加热驱氧、充氮、冷却后加还原剂 Na_2S 0.5 g/L, 并分装于预先充氮的 100 mL 血清瓶中,加盖密封并灭菌.

用注射器按 0.5%接种量接种于预先还原的培养基中, 80 ℃静置培养 8 h.菌种于室温厌氧条件下可保存半年.

1.2.2 基因操作 基因组 DNA 提取、DNA 的内切酶水解和连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备以及基因的高效电转化方法均参照文献[12].质粒的制备、从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行.

根据 GeneBank 中木聚糖酶基因 *Xyn*B 的 DNA 序列设计两个引物,N 端引物(5′-GGAATTCCATATGAAA ATATTACCTTCTGTGTTGAT-3′)内有一个 *Nde*I 酶切位点,该酶切位点包含起始密码子(ATG);C 端引物(5′-CCC TCGAGTCTTTCTTCTATCTTTTTCTCCAG-3′)内有一个 *Xho*I 酶切位点.设计的引物由上海生工生物工程技术服务公司合成.

PCR 反应为:95 ℃变性 5 min,加 Tyrobest DNA 聚合酶;然后 94 ℃变性 50 s, 48 ℃退火 90 s,72 ℃延伸 3 min,循环 35 次后于 72 ℃保温 10 min.

1.2.3 木聚糖酶活测定 木聚糖酶活性的测定是 0.5%燕麦木聚糖为底物,利用对羟基苯甲酸酰肼与水解反应产生的还原糖的显色反应进行比色[11].具体方法是:在 90 μL 50 mmol/L pH 5.8 的邻苯二甲酸二氢钾缓冲液中加 0.1 mL 0.5%燕麦木聚糖,然后添加 10 μL 酶液在 95 ℃下保温 10 min,,最后加入 NaOH 和对羟基苯甲酸酰肼终止反应.其混合物在沸水浴中加热 10 min 后,在冰水浴中冷却,用分光光度计在 410 nm 下测其吸收值.木聚糖酶活性单位定义为每分钟催化产生 1 μmol 产物的酶量,以木糖作标准曲线.

1.2.4 *Xyn*B 基因在原核表达载体中的表达 将构建好的重组质粒 pET-20b-XynB 转入 *E. coli* JM109 (DE3),挑取 1~2 个单菌落接入含有 Amp 的 LB 培养液中,30 ℃培养过夜.取 100 μL 过夜培养液接入 100 mL 含 Amp 的 LB 培养液中,30 ℃振荡培养至吸光度值达 0.6~0.8,吸出 1 mL 未诱导的培养物,剩余培养物中加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L,继续培养.在不同的诱导时间下取 1 mL 样品,以1 200 r/min 离心 1 min,收集菌体,用 pH 7.6 的 TE 缓冲液洗涤细胞两次,并用 300 μL 同样缓冲液重悬细胞,加溶菌酶达 2 mg/mL,25 ℃保温 1 h,12 000 r/min 离心 30 min,取上清液测酶活.

1.2.5 酶的纯化 按 1%接种量将含有质粒 pET-20b-XynB 的 *E. coli* JM109 (DE3) 接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养液中,置于 30 ℃,200 r/min 下振荡培养至 O.D.值达 0.6~0.8,加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L,并继续培养 4~6 h,以 4 800 *g* 离心 10 min 收集细胞.用 Rapid Affinity Purification Kit 中的结合缓冲液(Binding Buffer)悬浮细胞,经高压细胞破碎仪 (French Pressure, Thermo)破碎细胞, 9 600 *g* 离心 20 min,取上清液于 70 ℃下热处理 20 min 后,9 600 *g* 离心 20 min,上清液为粗酶液.酶的亲和层析法快速提取按 Novogen 的产品说明书进行. 将洗脱收集的酶蛋白转入透析袋,外置聚乙二醇进行浓缩,接着在 1 L 的 50 mmol/L Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液中透析 2 h(pH 6.8),最后用 3 mL 缓冲液洗出并加甘油至 20%, -20 ℃保存.

2 实验结果

2.1 组氨酸融合表达载体的构建

万方数据

以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板,用上述引物进行 PCR 扩增,至 1 kb 大小,将此片段和表达质粒分别用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切后重组,构建出木聚糖酶基因 *Xyn*B 的融合蛋白表达质粒,该质粒的构建图见图 1.其特点是 T_7 启动子控制下的木聚糖酶基因与 6 个组氨酸序列标签融合,便于重组蛋白的纯化.

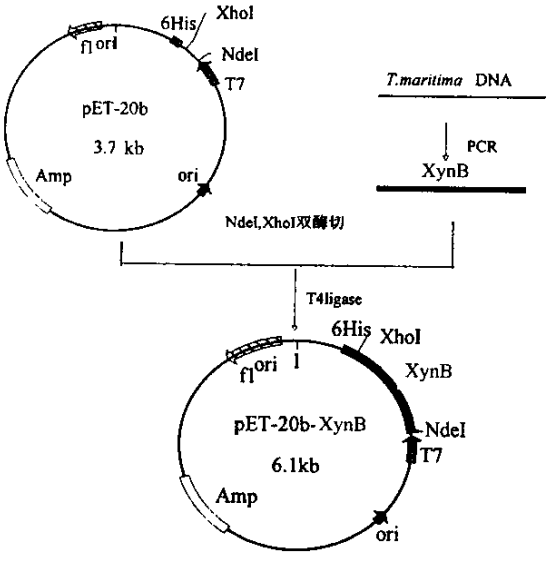


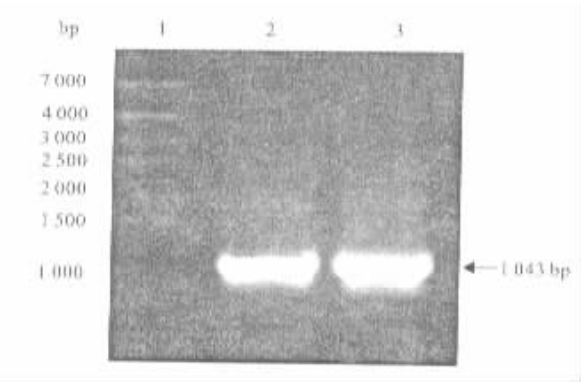
图 1　组氨酸融合表达载体的构建示意图

Fig.1　Construction of plasmid pET-20b-XynB

2.2　PCR 扩增及克隆

以 *T. maritima* 菌的基因组 DNA 为模板,以上述引物扩增出 1 kb 的片段,PCR 产物与预期基因片段大小一致.反应产物经琼脂糖凝胶电泳分析和 DNA 测序证明是一段 1 kb 大小的木聚糖酶基因 DNA 片段(见图 2).它包括 5′端的 *Nde*I, 3′端的 *Xho*1 和 ATG 开始的基因的编码序列.

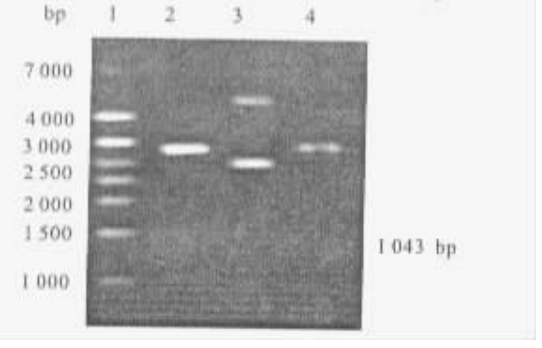
将 PCR 产物从胶回收后,用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切并经纯化,以适当比例与同样双酶切的 pET-20b 混合并连接,转化大肠杆菌 JM109(DE3)后,在 Amp 抗性平板上得到转化子.然后用限制性内切酶对重组质粒进行鉴定,重组质粒能被 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切下一条与 PCR 扩增片段大小一致的片段(见图 3).



1. DNA 标准相对分子质量标记;2,3. PCR 扩增片段

图 2　木聚糖酶的 PCR 电泳图

Fig.2　PCR cloning of the xylanase gene fragment



1. DNA 标准相对分子质量;2. 重组质粒 pET-20b-XynB 双酶切;3. 质粒 pET-20b;4. pET-20b 双酶切.

图 3　质粒 pET-20b-XynB 限制性内切酶分析

Fig.3　Restriction analysis of pET-20b-XynB

2.3　木聚糖酶在大肠杆菌中的表达

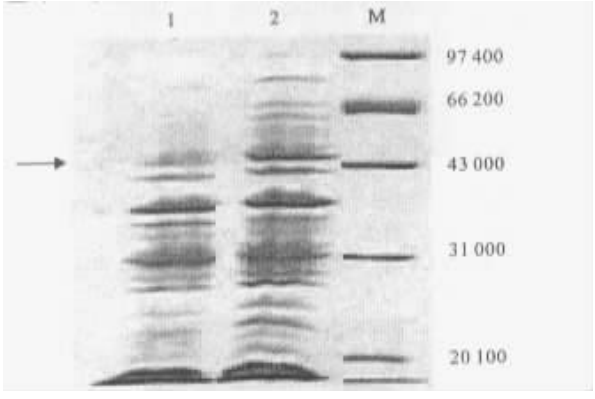
以重组质粒 pET-20b-XynB 转化大肠杆菌 JM109(DE3), IPTG 诱导表达后,用一倍 SDS 上样缓冲液煮沸来裂解菌体细胞,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS),重组质粒 pET-20b-XynB 在相对分子质量为 43 000 处有明显的蛋白表达(见图 4).同时,对 JM109(DE3)/ pET-20b-XynB 采用不同诱导时间进行重组菌融合蛋白的表达,以 JM109(DE3)/ pET-20b-XynB(不诱导)及 JM109(DE3)/ pET-20b 作对照,诱导条件为 30 ℃培养 0.8 ~ 1.0 h,诱导剂为 IPTG,在不同的诱导时间下取样测酶活,结果见图 5.诱导 8 h 的重组菌显示了较高的木聚糖酶活性,说明木聚糖酶基因已成功获得表达;而不诱导的重组菌也有一定的酶活,表明有较高的本底表达.在实验过程中发现,诱导菌的生长状况比不诱导菌差,说明木聚糖酶基因的表达对宿主大肠杆菌有一定的毒性.

2.4　木聚糖酶的纯化

利用 His 与金属 Ni^{2+} 的亲和性,带有 6 个组氨酸标记的融合蛋白经金属螯和柱层析被纯化.将 IPTG 诱导表达的菌体 JM109(DE3)/pET-20b-xylB 裂解,并经 70 ℃热处理 30 min,取上清液上 Poly-His 亲

万方数据

和层析柱,检测不同柱流分中木聚糖酶活性.结果表明,在洗脱缓冲液中检测到较高木聚糖酶活性,而在结合缓冲液、洗涤缓冲液中均未检测到酶活性.因此,组氨酸融合表达载体已构建成功.



1. 未诱导表达 2. 诱导表达 M. DNA 标准分子量

图 4 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 谱图

Fig.4 SDS-polyacrylamide gel(10%) of xylanase after induced expression

表 1 Poly-His 亲和层析不同柱流分中酶活性

Tab.1 Enzyme activity from Different fractions of the Poly-His protein purification chromatogram

组 分	酶活/(IU/mL)
结合缓冲液	0
洗涤缓冲液	0
洗脱缓冲液 1	4.56
洗脱缓冲液 2	2.32

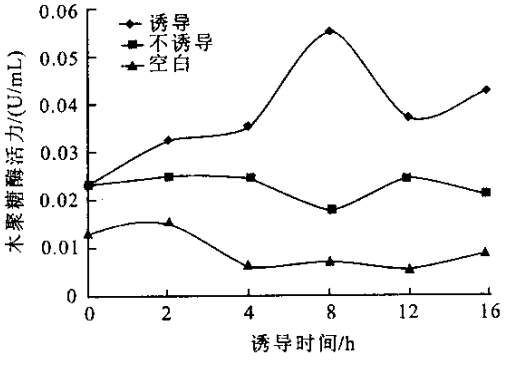


图 5 不同诱导时间对融合蛋白表达的影响

Fig.5 Expression of fusion protein for different induced time

3 讨 论

自然界分离出的产木聚糖酶的微生物,多存在着复杂的酶系,并伴有纤维素酶的产生,而纸浆工业用酶只需要不含纤维素酶的木聚糖酶,其目的是避免损伤纤维强度.作者利用 *T. maritima* 基因组 DNA 为材料,通过 PCR 克隆出编码高度热稳定性木聚糖酶基因,并在大肠杆菌中获得成功表达.同时,由于选用了大肠杆菌带有组氨酸标记的表达载体作为受体,这样表达产物一般融合 6 个组氨酸作为标签,可通过金属离子亲和层析柱使单一的木聚糖酶非常容易地得到纯化.

在实验过程中,利用在常温菌 *E. coli* 表达的木聚糖酶对热的稳定性,将重组菌 pET-20b-XynB 细胞破碎后的上清液经过 70 ℃、30 min 的热处理后,可去除大量首体蛋白,为后续纯化工作提供便利.

参考文献:

[1] Sunna A, Autranikian G. Xynanolytic enzymes from fungi and bacteria[J]. **Critical Review in Biotechology**, 1997, 17(1): 39 – 67.

[2] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, *et al*. Microbial xylanases and their industrial applications: a review[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2001, 56: 326 – 338.

[3] 邵蔚蓝,薛业敏. 以基因重组技术开发木聚糖类半纤维素资源[J]. **食品与生物技术**, 2002, 21(1): 88 – 93.

[4] Kosugi A, Murashima K, Roy H D, *et al*. Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates[J]. **J Bacteriology**, 2001, 183: 7037 – 7043.

[5] Chen C C, Adolphson R, Jeffrey F D, *et al*. Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from *Thermatoga maritima*[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1997, 20: 2039 – 2045.

[6] Medeiros R G, Silva F G, Salles B C, *et al*. The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine-free bleaching for eucalyptus pulp[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2002, 28(4): 204 – 206.

[7] Jiang Z, Atsushi K, Mohammad M A, *et al*. Characterization of a thermostable family 10 endo-xylanase (XynB) from *Thermotoga maritima* that cleaves p-nitrophenyl-β-D-xyloside[J]. **J Biosci Bioeng**, 2001, 92: 423 – 428.

[8] Neeta R, Abhay S, Mala R. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from *Alkaliphilic Bacillus* sp. Strain K-1[J].

万方数据

FEMS Microbiol Reviews, 1999, 23:411 – 459.

[9] Rober H, Thomas A L, Helmut K, *et al*. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90 ℃[J]. **Arch Microbiol**, 1986, 144:324 – 333.

[10] Christoph W, Wolfgang L. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1995, 61:1810 – 1815.

[11] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. **Anal Biochem**, 1972, 47:273.

[12] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

(责任编辑 李春丽)

(上接第 56 页)

[4] Alison Adams, Daniel E Gottschling, Chris A Kaiser, *et al*. Methods in yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual[M]. London: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

[5] Jens G Litske Petersen, Steen Holmberg. The *ILV*5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed[J]. **Nucleic Acids Research**, 1985, 13:4011 – 4027.

[6] Villa K D, Lee S. Control of vicinal diketone production by brewer's yeast. I. Effects of *ILV*5 and *ILV*3 gene amplification on vicinal diketone production and *ILV* enzyme activity[J]. **J AM Soc Brew Chem**, 1995, 53(2):49 – 53.

[7] **李建武,余瑞元. 生物化学实验原理和方法**[M]. **北京:北京大学出版社**, 1996.

[8] **张学群,张柏青. 啤酒工业控制指标及检测手册**[M]. **北京:中国轻工业出版社**, 1994.

[9] Yamano S, Tanaka J, Inoue T, *et al*. Cloning and expression of the gene encoding alpha-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti sp*. *xylinum* in brewer's yeast[J]. **J Biotechnol**, 1994, 32(2):165 – 171.

[10] Yamano S, Kondo K, Tanaka J, *et al*. Construction of a brewer's yeast having alpha-acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti sp*. *xylinum* integrated in the genome[J]. **J Biotechnol**, 1994, 32(2):173 – 178.

[11] **郭文洁,何秀萍,铁翠娟,等. 枯草芽孢杆菌 α-乙酰乳酸脱羧酶基因在啤酒酵母工业菌株中的表达**[J]. **微生物学报**, 2001, 41(1):105 – 108.

(责任编辑 李春丽)

万方数据