

# 酸性木聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达\*

李春华 李翔 马立新\*\*

(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

**摘要:** 运用“鸟枪法”克隆构建了环境微生物的基因组文库, 并从中筛选得到一个酸性木聚糖酶基因, 命名为 *xyt3*, 其在 GenBank 中的登录号为 gb: AY300805。BLAST 分析表明, 该基因的序列同源性很低, 其中仅存在很短的木聚糖酶基因的同源片段, 其编码的木聚糖酶属于 Glycosyl hydrolases family 10, 与来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 的 intra-cellular xylanase 在氨基酸水平具 77% 同源性。该基因经 T4 DNA polymerase 处理后, 克隆至经限制性内切酶 *Cpo* I 和 *Not* I 双酶切后的毕赤酵母表达载体 pHBM905, 获得重组质粒 pHBM706。此重组质粒转化毕赤酵母 GS115, 经含有交联木聚糖的选择性培养平板和 PCR 扩增鉴定筛选得到重组毕赤酵母 GS115 (pHBM706)。以 0.5% 甲醇于 28℃ 诱导产酶, 测得重组毕赤酵母 GS115 (pHBM706) 在诱导的第 36h 产酶达最高值, 所产粗酶液酶活为 0.177 IU/mL。该酶的最适反应 pH 为 5.5, 最适反应温度为 50℃。

**关键词:** “鸟枪法”克隆, 基因组文库, 木聚糖酶, 毕赤酵母, 表达

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0089-07

## Cloning of Acidic Xylanase Gene and Its Secretion Expression in *Pichia pastoris*\*

LI Chun-Hua LI Xiang MA Li-Xin\*\*

(Faculty of Life Science, HuBei University, Wuhan 430062)

**Abstract:** An acidic xylanase gene, named *xyt3*, was cloned from the genomic library of environmental microbes constructed by using shotgun cloning strategy, and submitted to GeneBank with accession number of gb: AY300805. BLAST analysis indicated that the gene *xyt3* has low similarity with other xylanase genes and the encoded xylanase, sorted as Glycosyl hydrolases family 10, has 77% similarity with the intra-cellular xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* at amino acid level. Treated with T4 DNA polymerase, the gene *xyt3* was ligated with the linearized *Pichia pastoris* expression vector pHBM905 produced by digestion of restriction endonuclease *Cpo*I and *Not*I to generate the recombinant plasmid pHBM706. Then the plasmid pHBM706, digested by restriction endonuclease *Sal*I, was transformed into *P. pastoris* GS115 to obtain the recombinant *P. pastoris* GS115 (pHBM706), which was induced to produce the recombinant xylanase with 0.5% methanol at 28℃. At the 36th hours of induction, the produced crude enzyme was detected to reach the highest enzyme activity of 0.177 IU/mL. The optimal pH and temperature of the enzyme activity is 5.5 and 50℃ respectively.

**Key words:** Shotgun cloning, Genomic library, Xylanase, *Pichia pastoris*, Expression

木聚糖 (xylan) 是一种多聚五碳糖, 是植物半纤维素的重要组成部分, 占植物碳水化合物总量的 1/3, 其含量仅次于纤维素, 是在自然界中一类重要的再生生物资源。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39900003)

国家高新技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2001AA214161, 2002AA227011)

中药生物技术湖北省重点实验室开放基金资助项目

\*\* 通讯作者 Tel: 86-27-88666349, Fax: 86-27-88666349, E-mail: malixing@hubu.edu.cn

收稿日期: 2005-02-24, 修回日期: 2005-04-07

木聚糖酶是木聚糖降解酶系中的关键酶, 根据其氨基酸序列的同源性, 它分属于多聚糖代谢酶类的第 10 和第 11 组, 这两类木聚糖酶在作用方式、分子量、净电荷、不带电荷的碱性及酸性氨基酸比例等方面存在较显著差异<sup>[1]</sup>。木聚糖酶可将木聚糖水解为不同长度的木寡糖和少量的木糖, 可广泛应用于制浆造纸工业、食品工业、饲料工业和能源工业等领域<sup>[2]</sup>, 而且不同的应用领域对木聚糖酶的酶学性质有着不同的要求, 如纸浆工业需耐碱性能高的木聚糖酶, 而饲料工业则需耐酸的木聚糖酶。

木聚糖酶广泛存在于各种微生物中, 目前已从不同来源的微生物中分离到了多种具不同性质的木聚糖酶, 如碱性、中性、高温木聚糖酶等, 并克隆了其编码基因<sup>[3]</sup>。本研究从构建的环境微生物基因组文库中筛选到一酸性木聚糖酶的编码基因, 并在毕赤酵母中实现了分泌表达, 且对所产木聚糖酶的相关酶学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 土样

土壤样本采自江夏区豹懈镇一陈年草垛下。

1.2 酶、培养基和主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶, 4 种 dNTP 均购自 TaKaRa 公司, 燕麦木聚糖、RBB-Xylan (Remazol Brilliant Blue-Xylan) 购自 Sigma 公司, YNB 购自 Difco 公司, 其它常规试剂为进口分装或国产分析纯; LB 培养基见文献 [4]; YEPD、MM、MD、BMCY、BMMY 培养基见 Invitrogen 公司的毕赤酵母操作手册; 富集培养基: 2% 麸皮, 0.5% 硫酸铵, 0.5% 磷酸氢二钾, 0.1% 硫酸镁。

1.3 菌株与质粒

见表 1。

表 1 供试菌株和质粒

Strains/plasmids	Characteristics	Xource
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Ter', SupE44, hsdR17, recA1, endA1, gryA966, thi-1relA1	From Stratagene
<i>Pichia pastoris</i> GS115	his4	From Invitrogen
<i>P. pastoris</i> GS115 (pHBM706)		This work
pPIC9K	Amp', Kan', ColE1, HIS4, P <sub>AOX1</sub> , T <sub>AOX1</sub> , α-Factor SS, MCS	From Invitrogen
pHBM905	Derivative of pPIC9K, Amp', HIS4, Kan', ColE1, HIS4, P <sub>AOX1</sub> , T <sub>AOX1</sub> , α-Factor SS, MCS	Stored in this lab.
pHBM706	Xyl3 cloned in pHBM905	This work
Bluescript M13-	Amp', ColE1, fl ori, Plac, lacZ', lacI, MCS	From Stratagene
pHBM803	Derivative of Bluescript M13-, Kan', two Earl sites in MCS	Stored in this lab.
pHBM803-xyf3	Xy3 cloned in pHBM803	This work

1.4 环境微生物基因组 DNA 的抽提

参照文献 [5], 称取 5g 土壤样品于液体富集培养基中, 30℃, 250r/min 振摇培养 72h, 收集菌体, 以适量 extraction buffer 悬浮后加入 10g 酸洗玻璃珠, 于涡旋仪快速振荡混匀后加入终浓度为 2% 的 SDS 溶液, 于 65℃ 水浴保温 1h, 6,000g 离心 10 min, 取上清, 并向其中加入 1/2 体积的 30% 聚乙二醇/1.6mol/L NaCl 溶液, 混匀, 室温静置 2h 后, 10,000g 离心 20 min, 弃尽上清, 以适量 TE buffer 悬浮沉淀。向悬浊液中加入终浓度为 0.75mol/L 的醋酸钾溶液, 混匀后冰浴 5 min, 于 4℃, 16,000g 离心 30 min,

取上清,并分别以酚/氯仿和氯仿/异戊醇抽提一次,最后加入 0.6 体积异丙醇混匀,16,000g 离心 30 min,弃尽上清,沉淀即 DNA 干燥后溶于适量 TE buffer。

### 1.5 环境微生物基因组文库的构建

参照文献 [6],以 *Sau3AI* 部分酶切环境微生物基因组 DNA,且以凝胶电泳回收 4~10kb 大小 DNA 片段,并在 dGTP 存在的条件下以 Klenow fragment 对其部分补平;同时以 *EarI* 完全酶切衍生于质粒 Bluescript M13 的载体 pHBM803,并经凝胶电泳回收大片断。二者在 T4 DNA ligase 的催化下进行连接,并转化 *E. coli* XL10-Glod 菌株。

### 1.6 木聚糖酶基因的克隆

RBB-Xylan 底物平板上得到的阳性克隆由上海博亚生物技术有限公司采用 3730 测序仪进行测序,运用 GeneTool 软件对测得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析。

### 1.7 质粒 DNA 的抽提、DNA 的酶切、补平及回收

质粒 DNA 的抽提、DNA 的酶切和补平参照文献 [4] 进行,DNA 片段回收采用 Clontech 公司的 Advantage TM PCR-pure Kit 或 Gel-extract Kit 回收。

### 1.8 毕赤酵母总 DNA 的抽提

参照文献 [6] 进行。

### 1.9 PCR 扩增反应

参照文献 [4],采用 PE2400 型 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增反应。

Forward Primer1: 5'-GTCACGATGAAGAAAACCCAACACT-3'

Reverse Primer2: 5'-GGCCACTTTTTTATTTGGGTTTGGGTTA-3'

94℃ 5min; 94℃ 30s; 56℃ 30s; 72℃ 90s; 30 circles; 72℃ 7min

### 1.10 PCR 产物的处理

以 T4 DNA Polymerase 并添加终浓度为 0.4mmol/L dTTP,于 12℃ 处理 PCR 产物 30min。

### 1.11 大肠杆菌 XL10-Gold 感受态细胞的制备、DNA 的连接、转化大肠杆菌

参照文献 [4]。

### 1.12 毕赤酵母感受态细胞的制备、转化、重组毕赤酵母毕赤的 Mut 表型(甲醇利用表型)鉴定及诱导表达

参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行。

### 1.13 重组毕赤酵母在底物平板上的诱导表达

将 MD 培养平板上生长的毕赤酵母转化子转接适量至 BMGY 培养平板上,28℃ 培养 2d,再分别转接适量菌落至含有 0.5% RBB-Xylan 的 MM 底物平板上,每 12h 添加甲醇至终浓度为 0.5% 进行诱导,观察其表达情况。

### 1.14 木聚糖酶活力测定及酶活力单位定义<sup>[7]</sup>

以 0.02mol/L pH8.5 磷酸缓冲液配制密度  $\rho = 10\text{g/L}$  的燕麦木聚糖溶液,取 2.4mL 此溶液,加入 0.1mL 重组毕赤酵母诱导所产粗酶液,于 50℃ 反应 30min 后,置沸水浴终止反应。然后采用 DNS 法测定还原糖(以木糖作为标准溶液)含量,以每 1min 生成 1 $\mu\text{mol}$  还原糖作为 1 个酶活力单位(IU)。 $OD_{520}$  值与酶活单位的换算公式如下:

酶活单位/mL 酶液 (IU/mL) =  $[(OD_{520} \text{ 值}) \times 0.5697 + 0.008] \times 5000 / 150.14 / 30 / \text{酶液体积}$ 。酶活力单位定义:在 pH5.5,温度为 50℃ 时每分钟生成 1 $\mu\text{mol}$  还原糖作为 1 个酶活力单位(IU)。

## 2 结果与分析

### 2.1 木聚糖酶基因 *xyI3* 的克隆

环境微生物基因组 DNA 及其部分酶切如图 1 所示。运用含 0.5% RBB-Xylan 底物

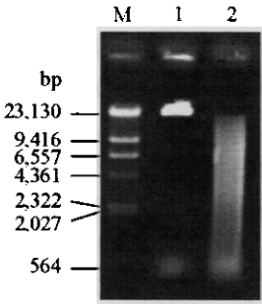
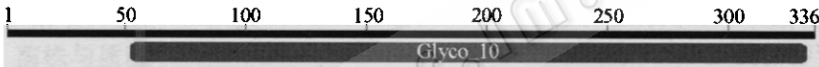


图 1 环境微生物基因组 DNA 及其 *Sau3AI* 部分酶切电泳图

M  $\lambda$ DNA/*Hind*III, 1 Genomic DNA of environmental microbes, 2 Genomic DNA partly digested by restriction endonuclease *Sau3AI*

和 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养平板于所构建的基因组文库中挑取一个周围具透明圈的单菌落即阳性克隆的测序结果表明, 在大小为 1110bp 的插入片段中存在一长为 1011bp 的开放阅读框 (open-reading frame, ORF)。在 NCBI 数据库中 BLAST 分析表明, 该基因序列的同源性低, 其中仅存在一些很短的木聚糖酶基因的同源片段, 所编码木聚糖酶的保守序列同源性为 99.0%, 属于 Glycosyl hydrolases family 10 (见图 2), 存在 F/10 族木聚糖酶的保守氨基酸序列 TAENEMK (47-53), 且与来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 的 intra-cellular xylanase

在氨基酸水平具 77% 同源性 (图 3)。将该基因命名为 *xyI3*, 并将该序列提交 GenBank, 登录号为 gb: AY300805。



gi | 4056655 | gb | aac98123.1 | intra-cellular xylanase [ *Geobacillus stearothermophilus* ] Length = 331

Score = 445 bits (1145), Expect = e-124

Identities = 211/322 (65%), Positives = 249/322 (77%)

Query: 6 MKKSEQLACAFRNDFLIGA AVNHTIVSQSELLKQHYSVTAENEMKFESLHPPEEHLTYT  
M S SL F NDF IGA AVN TI Q + LL H NS + TAEN MKFE L PEE + T  
Sbjct: 1 MNSSLPLSRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQKQLLDHVNSITAENHMKFEHLQPEEGKFT  
Query: 66 FDRADRIAGFARENGMKLRGHTLIWHNQTPDWVFDGNGCMAGRELLARMKSHIETVVK  
F ADRI FA + M + RGHTL + WHNQTPDWVF + DG G R + + LL RMK HI TVV +  
Sbjct: 61 FQEADRIVDFACSHMAVRCHTLVWHNQTPDWVFQDQGCHVSRDVL LERMKCHISTVVR  
Query: 126 RYKDTVYCWVDVNEAVTDDGEESLRPSKW LHCIGDDFIEQA FRFAHEVDPEALLFYNDYN  
RYK + YCWDV + NEAV D + G E LRPSKW IGDDF + EQAF + A + E DP + ALLFYNDYN  
Sbjct: 121 RYKGKIYCWVDINEAVADEGNELLRPSKW RQIGDDFMEQAFLYAYEADPDALLFYNDYN  
Query: 186 ECNPGKREKIYSLVKSLENGTPVHGIGLQAHWNLYDPSLDLIREAIERYASLG LKLVQT  
EC P KREKI + + LVKSL + G P + HGIC + QAHW + L PSLD IR AIERYASLG + L + T  
Sbjct: 181 ECFPEKREKIFALVKSLRDKGIPIHGIGMQAHWSLTRPSLDEIRAAIERYASLGVLHIT  
Query: 246 EMDVSVFADFDRRTDLTAPTAEMMRLQEQRKQFFDLFREYKEVLTSVTFWGAADDYTWL  
E + DVS + F F DRRTDL APT + EM + Q + RY Q F LF + EY + + V + SVTFWG ADD + TWL  
Sbjct: 241 ELDVSMFEFHDRRTDLAAPTSEMIERQAERYGQIFALFKEYRDIQSVTFWGIADDHTWL  
Query: 306 DHFPVRGRKNWPLLFDTQRPK 327  
D + FPV GRKNWPLLF D + + PK  
Sbjct: 301 DNFPVHGRKNWPLLFDEQHKPK 322

图 2 *xyI3* PHI- and PSI-BLAST 结果



振荡培养并抽提总 DNA, 然后以此总 DNA 为模板, 以 Primer1 和 Primer2 为引物对转化子进行 PCR 扩增鉴定, 同时以质粒 pHBM803-*xyI3* 为模板作为此 PCR 扩增反应的正对照, 结果如图 6 所示。

将经 PCR 鉴定正确的重组毕赤酵母转化子转接至含有 0.5% RBB-Xylan 的 BMMY 培养平板, 28℃ 诱导培养后挑取一株具较大水解圈的重组毕赤酵母, 并命名为 GS115 (pHBM706)。重组毕赤酵母的 RBB-Xylan 培养平板筛选如图 7 所示。

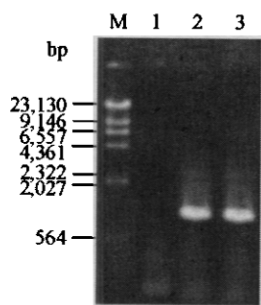


图 6 PCR 扩增反应鉴定重组毕赤酵母

M  $\lambda$ DNA/*Hind* III, 1 Control (-): *P. pastoris* (pHBM905)/ template, 2 GS115 (pHBM706) total DNA/ template, 3 Control (+): pHBM803-*xyI3*/template

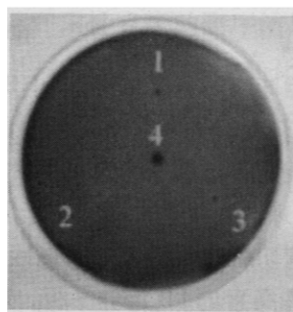


图 7 重组毕赤酵母的 RBB-xylan 平板检测

1, 2, 3 GS115 (pHBM706), 4 Control (-): GS115 (pHBM905)

## 2.4 木聚糖酶基因 *xyI3* 在毕赤酵母中的诱导表达

GS115 (pHBM706) 经 Mut 表型鉴定为 Mut<sup>+</sup>, 并据此进行甲醇诱导产酶, 同时将转入质粒 pHBM905 的毕赤酵母 GS115 同步诱导作为产酶的本底对照, 二者同时取样分析。经 DNS 法测定还原糖含量, 结果 GS115 (pHBM706) 在诱导的第 36h 产酶达最高值, 所产粗酶液酶活为 0.177 IU/mL, 如图 8。

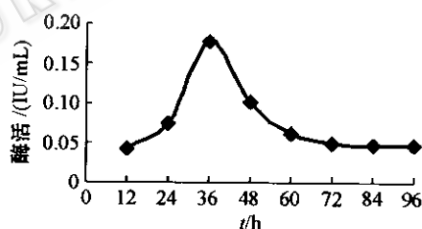


图 8 GS115 (pHBM706) 诱导产酶曲线

## 2.5 重组木聚糖酶酶学特性分析

以 pH5.5 的磷酸缓冲液配制燕麦木聚糖底物溶液, 分别在 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃ 测定所产粗酶液酶活力, 测得该木聚糖酶的最适反应温度为 50℃, 且在 80℃ 时仍具 50% 以上酶活性, 如图 9。分别以 pH4.0, pH4.5, pH5.0, pH5.5, pH6.0, pH6.5, pH7.0, pH7.5, pH8.0, pH8.5, pH9.0, pH9.5, pH10.0 的磷酸缓冲液配制燕麦木聚糖底物溶液, 在 50℃ 反应温度下测定酶活力, 测得其最适反应 pH 值为 5.5, 且在酸性 pH 范围内具 50% 以上酶活, 而在碱性范围内则酶活性急剧下降, 如图 10。

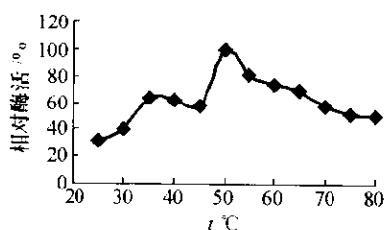


图9 温度对重组木聚糖酶活性的影响

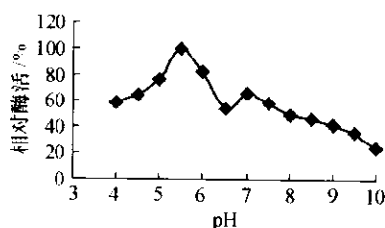


图10 pH对重组木聚糖酶活性的影响

### 3 讨论

据统计, 由于培养条件的局限, 目前已利用的微生物尚不足自然界微生物资源总量的 1/10。本研究通过直接构建环境微生物的基因组文库, 筛选得到一酸性木聚糖酶的编码基因, 不仅省却了微生物的筛选和培养过程, 更重要的是克服了未培养微生物培养条件的局限, 从而提高了对自然界微生物资源的利用程度和基因克隆的效率。

本研究采用啤酒酵母  $\alpha$ -因子信号肽, 实现了该酶在毕赤酵母中的分泌表达, 这对于实现该酶的制备及应用具有重要意义。

然而, 在本研究中该酶在毕赤酵母 GS115 中的表达水平不高, 一方面可能是由于毕赤酵母翻译时密码子使用的倾向性, 导致翻译效率低下。许多研究表明, 在单细胞生物中密码子的选择倾向性是影响外源蛋白翻译效率的一个关键因子<sup>[8]</sup>, 如 Sinclair G 等通过优化密码子提高了外源基因在毕赤酵母中的表达水平<sup>[9]</sup>; 另一方面, 该酶在诱导表达的 36h 后酶活性大幅下降, 因此也有可能是由于表达所产生的酶分泌至胞外后被迅速降解所致。目前, 我们已克隆到 10 余个具不同性质的木聚糖酶基因, 其中有几个已在毕赤酵母中实现了分泌表达, 如江正兵等<sup>[10]</sup>已将短小芽孢杆菌木聚糖酶基因在毕赤酵母中实现了分泌表达。因此, 我们将对所克隆到的这些木聚糖酶基因进行 DNA Shuffling 以提高该酶的表达水平。从实验所获得的数据可知, 该酶在酸性环境和高温下具较高的稳定性, 因此当大幅提高其表达水平后, 有望实现其在饲料工业中的应用。

### 参考文献

- [1] Henissai B, Bairoch A. *Biochem J*, 1993, **293**: 781 ~ 788.
- [2] Prade R A. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, **13** (12): 101 ~ 131.
- [3] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. *FEMS Microbiology Rev*, 1999, **23** (4): 411 ~ 456.
- [4] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 34 ~ 56.
- [5] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, *et al.* *Biol Proced Online*, 1998, **14** (1): 40 ~ 47.
- [6] F 奥斯伯, R 布伦特, R E 金斯顿, *et al.* 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, 147 ~ 150.
- [7] Paice M G, Jurasek L, Carpenter M R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1978, **36** (6): 802 ~ 808.
- [8] Xia X. *Genetics*, 1998, **149** (1): 37 ~ 44.
- [9] Sinclair G, Choy F Y. *Protein Expr Purif*, 2002, **26** (1): 96 ~ 105.
- [10] 江正兵, 宋慧婷, 马立新. *生物工程学报*, 2003, **19** (1): 50 ~ 55.