

# 木聚糖酶基因克隆、表达及序列分析研究

刘瑞田 曲音波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

木聚糖为植物细胞壁的主要成分之一,它是以木糖为单位,以 $\beta$ -1,4糖苷键连结起来的并带有许多短的取带基支链的多聚糖,是自然界中仅次于纤维素的一种丰富的生物质资源。使木聚糖降解的最主要的酶为木聚糖酶。该酶在食品、饲料工业中具有较大的应用价值,更有意义的是它可用于造纸工业中的纸浆漂白,改善纸浆性能,并且减少漂白工艺中的化学物质用量,从而大大减轻环境污染<sup>[1]</sup>。科学工作者先后分离出许多产生木聚糖酶的菌株,在这些菌株中,有的产酶能力很低,有的同时还产生对纸浆性能有不良影响的纤维素酶。为获得不产纤维素酶、易培养的木聚糖酶基因工程菌株,人们对某些木聚糖酶基因进行了克隆和表达,获得了一些高效表达菌株,并分析了某些基因序列。

## 1 木聚糖酶基因克隆与表达的研究概况

到目前为止,有近百种不同菌株的木聚糖酶基因被克隆或表达出来。在这些研究工作中所应用的受体细胞大都为大肠杆菌,而所运用的载体及限制酶则形式多样。重组质粒转化受体细胞的方式一般为 $\text{CaCl}_2$ 处理法或电穿孔法,与往常的基因克隆技术所不同的是,多数情况下对阳性克隆的筛选是基以其对底物的分解,而不是只用质粒所带的抗药性标记进行的。其方法是:将转化子培养在含有与RBB偶连的木聚糖(Remazol Brilliant Blue-Xylan)平板上,阳性克隆可在菌落周围形成明显的透明环<sup>[2]</sup>。而Karlsson等则利用与可可碱酸钠偶连的木聚糖(AZCL-Xylan)作为底物进行检测<sup>[3]</sup>。也有的是将转

化子在平板上培养出来后,再用含有木聚糖或RBB-Xylan的琼脂板覆盖其上,然后以刚果红将含有木聚糖的平板染色,固定脱色后阳性克隆可形成透明空斑<sup>[4]</sup>,继而可用基因探针或其它方法进一步鉴定。这种筛选阳性克隆的方法较为方便和直接。木聚糖酶基因克隆为该酶的高效表达、基因测序及酶分子生物学研究打下了基础。虽然已有许多木聚糖酶基因被克隆和表达出来,但绝大多数基因工程菌株产物表达水平很低,且有的表达产物存在于胞质内,针对这些问题,人们作了许多工作,成功地建立了一些高效表达或胞外分泌的工程菌株。

## 2 木聚糖酶基因的高效表达

近年来,通过构建特殊的基因载体及应用适宜的受体菌株等手段成功地使某些木聚糖酶基因得到高效表达,特归纳于表1。

whitehead<sup>[5]</sup>应用大肠杆菌-类菌体穿梭载体pVAL-1将栖瘤胃拟杆菌木聚糖酶基因转入脆弱拟杆菌或单形拟杆菌,转化子产生的酶活比原菌株高出1400倍。Shendye等<sup>[6]</sup>将枯草杆菌木聚糖酶基因在*E. coli* JM105中表达,转化子产酶水平很低,之后又将目的基因转化到不含木聚糖酶基因的枯草杆菌中,酶的表达水平比前者高出5倍。作者分析认为,不是因为在后一宿主细胞中的基因拷贝数增高,而实际上它比在大肠杆菌中的拷贝数要低得多。在大肠杆菌中低水平的表达可能是由于宿主细胞对来自枯草杆菌的基因信

表1 高效表达木聚糖酶基因工程菌株的建立

目的基因来源	基因载体	宿主细胞	文献
<i>Actinomadura</i> sp. FC7	pJF1或pJF6	无纤维素酶活和木聚糖酶活的 <i>Streptomyces lividans</i>	[5]
<i>Bacillus subtilis</i>	pLP1202	无木聚糖酶基因的 <i>Bacillus</i> A8	[6]
<i>Bacillus subtilis</i>	pUC19	<i>E. coli</i> HB101	[7]
<i>Bacteroides ruminicola</i> 23	<i>E. coli</i> - <i>Bacteroides</i> 穿梭载体pVAL-I	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides uniformis</i>	[8]
<i>Caldocellum sacchaolyticum</i>	pJLA602	<i>E. coli</i>	[9]
<i>Clostridium thermocellum</i>	运用 <i>Bacillus subtilis</i> 强的启动子构成载体	<i>B. Subtilis</i>	[10]
<i>Clostridium thermocellum</i>	pUC19的LacZ为启动子	<i>E. coli</i>	[11]
<i>Clostridium thermocellum</i>	pJX18	无蛋白水解酶活的 <i>Subtilis</i> DB104	[12]
<i>Dictyoglomus</i> sp.. R46B1	pJLA602	<i>E. coli</i>	[13]
<i>Humicola insolens</i>	pHD450	<i>Aspergillus aculeatus</i>	[14]
<i>Neocallimastix patricianum</i>	pND	<i>E. coli</i>	[15]
<i>Streptomyces halstedii</i> JM8	pJM9	<i>Parvullus</i>	[16]
<i>Streptomyces lividans</i>	pIJ702	<i>Lividans</i> 10-164	[17]
<i>Thermomonospora fusea</i>	pBR322	<i>Lividans</i>	[18]
<i>Trichoderma reesei</i>	pUC19	<i>T. reesei</i> 突变株	[19]

号识别较弱所致。Suominen等<sup>[19]</sup>将木聚糖酶基因与具很高产生纤维素酶性能的瑞氏木霉突变株 ALKO233 基因组重组,使其失去编码纤维素酶的作用,但仍保留着高蛋白产生功能,从而得到了高产木聚糖酶的菌株, Kluepfel等<sup>[17]</sup>以无纤酶和木聚糖酶活的变铅青链霉菌的突变株为受体细胞,以质粒 pIL702 为载体时,可将该菌的木聚糖酶基因高效表达,并分泌到胞外,而以大肠杆菌为受体时,木聚糖酶则存在于胞质外周。Herbers等<sup>[20]</sup>将热纤梭菌热稳定木聚糖酶基因通过含有 GV2260 质粒的根瘤土壤杆菌转入烟草中,并在其中得到高效表达。产生的木聚糖酶位于转基因烟草的质外小体中且易于提纯。

### 3 木聚糖酶工程菌的胞外分泌

在获得的木聚糖酶工程菌中,大多数菌株不能将木聚糖酶分泌到胞外,而是让其存留于周质区或胞质区。这样就给木聚糖酶的提纯和应用带来了不便,同时也影响该酶的产量,即使把克隆基因与编码分泌信

号肽的基因片段连接起来,表达的基因产物仍留在细胞的周质区。科学工作者从载体构建和受体菌的选择入手,成功地获得了一些胞外分泌型菌株。Tremblay等<sup>[21]</sup>将目的基因克隆到 pMK<sub>3</sub> 上,然后以不产生纤维素酶的蜡状芽孢杆菌 N.318 为宿主细胞,可使木聚糖酶分泌到胞外。Morosoli等<sup>[22]</sup>将目的基因插入 pJHS 质粒,在目的基因前引入了树干毕赤酵母的木聚糖诱导启动子 XYL1,将构建好的质粒 pIAF145 转化受体细胞树干毕赤酵母 PIH53,可表达并分泌有活性的胞外酶。Ali 和 Srivastava<sup>[23]</sup>将黄灰链霉菌 IAF45-CD 的木聚糖酶基因克隆到 pUC18 上,构成 pSX4,然后在对  $\lambda$ 噬菌体 cI857 具溶源性的 *E. coli* JM83 中表达, $\lambda$ 噬菌体在 42℃ 时可使大肠杆菌溶解,导致木聚糖酶释放到胞外环境中。

### 4 木聚糖酶基因序列分析

近年来,已测定了许多木聚糖酶基因的完整核苷酸序列,根据这些序列可推测酶的结构和性质,并为酶

的蛋白工程研究打下了基础。Kreuzer<sup>[24]</sup>对枯草杆菌 W23 木聚糖酶基因序列分析表明其操纵基因为一 25bp 核苷酸序列,位于启动子的下游 10bp 处。该 10bp 序列含有一个回文结构,而中间的 5 个碱基对不是回文结构,并且这一序列的倒数第二个碱基对与阻遏物的结合有关。在此序列之后为一编码 384 个氨基酸的开读框。它以 GTG 为起始密码子,以 TAA 为终止密码子。Shareck<sup>[25]</sup>对变铅青链霉菌编码三种木聚糖酶的基因分析表明,XlnA 基因含有一编码 41 个氨基酸,分子量为 4083 的信号肽基因序列,其后为编码分子量为 47129 的基因序列。从推测出的氨基酸序列可知,它是由 36% 疏水氨基酸,44% 亲水氨基酸和分别都为 10% 的碱性和酸性氨基酸残基构成。Yang<sup>[7]</sup>对枯草杆菌木聚糖酶基因克隆发现 HindIII-HincII 可编码木聚糖酶,当此片段前含有一个 0.3Kb 的片段时,可在受体细胞中高水平表达。酶基因的表达水平受这一 0.3kb 片段在木聚糖酶基因上、下游不同位置的影响。进一步研究表明,该酶基因起始密码子上游有一 391bp 序列,启动子可能在起始子上游 50-57bp 处。两个被认为起增强子作用的串联重复序列分别在上游的 254-267 和 286-302bp 处。

植物组织中的各种多聚糖是密切联系在一起的,微生物为了将它们更迅速彻底地分解,需产生多种糖分解酶,并且这些酶的基因往往聚簇在一起,能够同时或独立地转录翻译。嗜热脂肪芽孢杆菌-21 的一个 3.4Kb 基因片断可编码木糖苷酶和木聚糖酶。木糖苷酶基因位于后者上游,含有启动子和 SD 序列。木聚糖酶基因可能含有两个启动子和一个 SD 序列位于木糖苷酶的 3' 端,两基因至少可部分地独立表达<sup>[26]</sup>。Love 等<sup>[27]</sup>对 *Caldocellum saccharolyticum* 基因克隆发现一个约 6kb 的片断中有 5 个开读框,编码不同的蛋白质,并鉴定出了三个基因,第一个基因编码木聚糖酶,第二个基因编码木糖苷酶,第三个基因编码乙酰木聚糖酯酶。在卵形拟杆菌基因序列中也发现了三种降解木聚糖的基因聚簇在一起<sup>[28]</sup>。在纸浆漂白工艺中碱性木聚糖酶受到重视,虽已对一些碱性木聚糖酶基因进行了序列分析,并推测出其一级结构,但此结构与该酶的耐碱性的关系尚不清楚,我们实验室现正从事有关方面的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Jolan J S, Wood H G. 211th Am Chem Soc National Meet Division of Cellulose Paper Textile N208, 1996.
- [2] Mannarelli B M, Evans S, Lee D. J Bacteriol, 1990, 172: 4247~4254.
- [3] Karlsson E N, Kengon G L, Hegeman G D, et al. 6th International Cofer on Biotech in Pulp and Paper Industry, 1995.
- [4] Teather R H, Erfle J D. Appl Environ Microbiol, 1992, 43: 777~780.
- [5] Ethier JF, Harpin S, Girard C, et al. Can J Microbiol, 1994, 40: 362~378.
- [6] Shendye A, Rao M. Enzyme Microb Technol, 1993, 15: 343~347.
- [7] Yong R C A, Macyenzie C R. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 1192~1195.
- [8] Wittehead F P, Hespell R B. FEMS Microbiol Lett, 1990, 66: 61~66.
- [9] Luthi E, Jasmat N B, Bergquist PL. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 2677~2683.
- [10] Jung K H, Pack M Y. Biotechnol Lett, 1993, 15: 115~120.
- [11] Grepinet O, Chebron M C, Beguin P. J Bacteriol, 1988, 170: 4582~4588.
- [12] Cho K H, Jung K H, Pack M Y. Biotechnol Lett, 1995, 17: 157~160.
- [13] Gibbs M D. 6th International Cofer on Biotech in Pulp and Paper Industry, 1995.
- [14] Shao W, Wiegel J. J Bacteriol, 1992, 174: 5848~5853.
- [15] Xue G P, Lamont I L. J Bacteriol, 1995, 177: 269~277.
- [16] Alberto R A, Jose M F, Pilar S, et al. Appl Environ Microbiol, 1995, 2414~2419.
- [17] Kluepfel D, White R J, Gallo I. Abstr Pap Am Chem Soc 202 Meet Bio 7, 213, 1991.
- [18] Ghanys G, Hu Y J, Wilson D B. J Bacteriol, 1989, 171: 2963~2969.
- [19] Suominen P, Simon B J, Shemin D, et al. 5th International Cofer on Biotechnol in Pulp and Paper Industry, 1992.
- [20] Herbers K, Wiike I, Sonnewald J, et al. Biol Technol, 1995, 13: 63~66.
- [21] Tremblay L, Archibald F. Can J Microbiol, 1993, 39: 853~860.
- [22] Morosoli, Kolhouse J F, Kengon G L, et al. Prog Biotechnol, 1992, 7: 247~258.
- [23] Hi S, Barker H G, Vitely C, et al. Prog Biotechnol, 1992, 7: 455~458.
- [1] Jolan J S, Wood H G. 211th Am Chem Soc

- [24] Kreuzer P, Gartner D, Allmansberger R. *J Bacteriol*, 1989, 171:3840~3845.
- [25] Shereck F, Bibb M J, Chater K F, *et al.* *Gene*, 1991, 107:75~82.
- [26] Baba T, Shine R, Nanmoric T. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:2252~2258.
- [27] Love L E, Luthi E, Mcanulty J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:1017~1024.
- [28] Whitehead T R, Marco E. *J Bacteriol*, 1994, 176:2408~2412.