

嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶的克隆与重组表达及其酶学性质研究

胡开蕾¹ 韩剑² 刘伟丰² 王艳萍¹ 陶勇^{2*}

(1. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院 天津 300457)

(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 【目的】克隆嗜热脱氮土壤芽孢杆菌中的 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB*, 在 *E. coli* 中异源表达, 纯化并研究其酶学性质。【方法】利用 PCR 技术从嗜热脱氮土壤芽孢杆菌的基因组 DNA 中克隆得到 *bglB* 基因, 将该基因克隆到表达载体 pGEX-2TL 上并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达, 对纯化后的 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及寡聚状态进行分析。【结果】重组表达的 β -葡萄糖苷酶最适温度为 65 °C, 最适 pH 为 7.0, 能在 pH 5–10、60 °C 下稳定存在 4 h, 并能在较高的离子强度(880 mmol/L K⁺)下发挥其功能。Al³⁺离子对其有强烈的激活作用, Co²⁺有一定的抑制作用。最适反应条件下该酶比活力为 0.043 IU/mg。该酶具有多种寡聚体形式, 这些寡聚体均有 β -葡萄糖苷酶活性。【结论】获得一个耐热耐盐的中性 β -葡萄糖苷酶, 为进一步研究 β -葡萄糖苷酶的催化作用机理, 提高其热稳定性提供一定的帮助。

关键词: β -葡萄糖苷酶, 嗜热脱氮土壤芽孢杆菌, 重组表达, 耐热, 耐盐

Cloning, expression and characterization of a beta-glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans*

HU Kai-Lei¹ HAN Jian² LIU Wei-Feng² WANG Yan-Ping¹ TAO Yong^{2*}

(1. College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

基金项目: 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题(No. SKLMR-20100602)

*通讯作者: Tel: 86-10-64807419; 信箱: taoyong@im.ac.cn

收稿日期: 2012-02-10; 接受日期: 2012-02-27

Abstract: [Objective] Cloning of β -glucosidase gene *bglB* from *Geobacillus thermodenitrificans*, heterologous expression in *E. coli*, purification and characterization of its enzymatic properties. **[Methods]** Molecular cloning of the β -glucosidase encoding gene (*bglB*) from *Geobacillus thermodenitrificans* was performed by using a PCR technique. The gene was expressed in BL21(DE3) of *Escherichia coli*. After purification, the enzymatic properties and the protein aggregation of β -glucosidase was investigated. **[Results]** The optimum temperature and optimum pH of the recombinant β -glucosidase are 65 °C and 7.0 respectively, the enzyme is stable for 4 h under the conditions of pH 5–10, 60 °C, and it maintains its high enzymatic activity at the high salt concentration (up to 880 mmol/L K^+). The recombinant β -glucosidase is strongly activated by Al^{3+} , while slightly inhibited by Co^{2+} . Under the optimal reaction condition, the enzyme specific activity of recombinant β -glucosidase is 0.043 IU/mg. The β -glucosidase GST fusion protein exists in different oligomers by a Superdex G-200 gel filtration analysis, and the different oligomers of enzymes all have hydrolase activity. **[Conclusion]** We successfully obtained a heat- and salt- resistant neutral recombinant β -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans*, and paved a way for further study of its catalytic mechanism and improvement its thermal stability of beta-glucosidase.

Keywords: β -glucosidase, *Geobacillus thermodenitrificans*, Recombinant expression, Heat-resistant, Salt-resistant

β -D-葡萄糖苷水解酶(EC 3.2.1.21), 又称 β -葡萄糖苷酶, 能特异地催化低聚糖(通常2–6个单糖残基)、烷基和芳香族烃基末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键的水解^[1–2]。 β -葡萄糖苷酶是纤维素酶系中的关键限速酶, 能将纤维素在内切葡聚糖酶(1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4)和纤维二糖水解酶(1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91)的协同作用下生成的纤维寡糖水解成葡萄糖^[3–4]。 β -葡萄糖苷酶广泛分布在自然界中, 多种植物、动物、真菌、细菌及古菌体内都含有 β -葡萄糖苷酶^[5–6]。它参与生物体的糖代谢, 对维持生物体的正常生理功能有重要意义。目前, β -葡萄糖苷酶主要用于协同其它纤维素酶降解纤维素, 此外, 在食品工艺、医学领域、日用化工以及植物病虫害防治中也发挥一定的作用。然而, 天然条件下的 β -葡萄糖苷酶由于活性较低、产量小、热稳定性差等原因, 其应用受到了一定的限制。

嗜热土壤芽孢杆菌属于中性嗜热芽孢杆菌,

其种间的 16S RNA 基因序列的相似性很高(98.5%–99.2%), 作为生物工业化生产耐热酶的重要菌种来源, 其潜在的工业化价值受到广泛关注。目前, 科学家们已经发现并研究了嗜热土壤芽孢杆菌来源的多种耐热酶, 如 L-阿拉伯糖异构酶^[7]、脂肪酶^[8]、 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶^[9], 而嗜热土壤芽孢杆菌来源的 β -葡萄糖苷酶未见报道。

本文从嗜热脱氮土壤芽孢杆菌中克隆得到了 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因, 并将其构建在 pGEX-2TL 上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 使嗜热脱氮土壤芽孢杆菌的 *bglB* 基因在大肠杆菌中实现了高效表达。同时, 对重组表达的 β -葡萄糖苷酶进行纯化, 并对其寡聚状态及性质进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Geobacillus thermodenitrificans* 菌株由中国科学院微生物研究所菌种保藏中

心提供。*Escherichia coli* BL21(DE3)菌株、*Escherichia coli* DH5 α 菌株和质粒 pGEX-2TL 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: PNPG (4-nitrophenyl- β -glucopyranoside)、PNP- β -D-galactoside 和 PNP- α -D-mannoside 购于 Sigma 公司, Typtone 和 Yeast Extract 购于 Oxoid 公司, DNA marker 和蛋白 Marker 购于 Fermentas 公司, TransStart FastPfu DNA Polymerase 购于北京全式金生物技术有限公司, T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司, IPTG 和 L-谷胱甘肽(还原性)购于 Amresco 公司, 凝血酶购于北京鼎国昌盛公司, 其他均为国产分析纯试剂。细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、普通 DNA 回收试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。Pierce BCA Protein Assay Kit 购于 Thermo Scientific 公司。PCR 扩增引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。1 mL GStrapTM HP 柱、20 mL superdex G-200 层析柱和 AKTA FPLC 购于 GE Healthcare 公司, 离心机购于 Eppendorf 公司, 酶标仪购于 Tecan 公司。

1.1.3 培养基和缓冲液: LB 培养基: Typtone 1%, NaCl 1%, Yeast Extract 0.5%。GST Binding buffer: Na₂HPO₄ 4.3 mmol/L, KH₂PO₄ 1.47 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, pH 7.4。GST Elution buffer: Tris-HCl 50 mmol/L, L-谷胱甘肽(还原性) 10 mmol/L, pH 8.0。

1.2 方法

1.2.1 β -葡萄糖苷酶的克隆、重组质粒构建及序列分析: (1) 基因组的提取: 使用细菌基因组提取试剂盒提取 *Geobacillus thermodenitrifican* 的基因组 DNA。

(2) *bglB* 基因的 PCR 扩增: 根据已报道的 *Geobacillus thermodenitrifican* NG80-2 的 *bglB* 基因序列(序列号 CP000557, Region: 1847541..1848953), 使用 Primer Premier 5 软件

设计, 引物序列如下: BglBF: 5'-CTCAGATACATATGGAACAACAATCGAAGCA-3'; BglBR: 5'-CTCAGAGGATCCTCAAAATCCGTTGTTTTCGC-3' (上游引物添加限制性内切酶 *Nde* I 识别位点, 下游添加限制性内切酶 *Bam*H I 识别位点, 两者用下划线标出)。以 *Geobacillus thermodenitrifican* 的基因组 DNA 为模板, 用引物 BglBF、BglBR 对 *bglB* 基因进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μ L: 基因组 DNA 100 ng, 引物各 0.2 μ mol/L, dNTPs 250 μ mol/L, 5 \times TransStart Fast Pfu Buffer 10 μ L, TransStart FastPfu DNA Polymerase 1 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经普通 DNA 回收试剂盒回收。

(3) *bglB* 基因重组表达载体的构建: 使用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 对 PCR 产物进行酶切, 并连接到表达载体 pGEX-2TL 的 *Nde* I 和 *Bam*H I 位点上, 转化到 *E. coli* DH5 α 。筛选阳性克隆进行酶切验证, 并送测序。

将测序得到的 *bglB* 基因翻译成蛋白序列, 通过 NCBI 比对, 挑选出相似性高、不同来源与功能的同源序列, 利用 MEGA 4 软件对其进行序列相似性比对以及系统进化分析, 用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, 用于检验支持率的重复抽样次数为 100 次。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶的表达纯化: (1) β -葡萄糖苷酶在 *E. coli* BL21 中的诱导表达: 将重组质粒转化到 BL21 菌株中, 挑选单克隆, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。按 1% 的接种量接种于 100 mL (含 100 mg/L 氨苄青霉素)的 LB 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 下振荡培养至 *OD*₆₀₀ 达到 0.5–0.8。冰上放置 30 min, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG, 置于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 8 h。4 $^{\circ}$ C、4 500 r/min 离心 15 min 收集菌体。

(2) β -葡萄糖苷酶的纯化: 将菌体悬浮于 5 mL

磷酸钾缓冲液(20 mmol/L, pH 7.2)中, 超声波破碎细胞。4 °C、8 500 r/min 离心 15 min, 收集上清。取 2 mL 的上清用 GST binding buffer 稀释到 10 mL, 以 0.2 mL/min 的流速通过 1 mL GSTrap™ HP 柱, 然后用 10 mL 的 GST binding buffer 洗涤柱床, 最后用 3 mL 的 GST elution buffer 洗脱纯化产物。将纯化产物于磷酸钾缓冲液(20 mmol/L, pH 7.0)中, 4 °C 透析过夜。纯化产物用凝血酶进行验证。

1.2.3 β -葡萄糖苷酶的酶活测定: 酶活测定参考文献[5], 取 10 μ L 纯化后的酶液, 25 μ L 磷酸钾缓冲液(200 mmol/L, pH 7.0)和 85 μ L H₂O 混合, 于 60 °C 孵育 5 min; 加入 5 μ L PNPG (浓度 50 mmol/L), 60 °C 反应 15 min; 加入 100 μ L pH 10.8 甘氨酸-NaOH (200 mmol/L)终止反应; 取 200 μ L 反应液, 在 405 nm 处测光吸收, 以每分钟生成 1 μ mol 4-Nitrophenyl 所需酶量定义为 1 个酶活力单位(μ mol/min)。蛋白浓度测定采用 Pierce BCA Protein Assay Kit 测定。

1.2.4 β -葡萄糖苷酶的酶学性质研究: (1) 温度对酶活力的影响。1) 最适温度: 取 10 μ L 一定浓度的纯化后酶液, 分别于 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 下测定其酶活力, 并计算其比活。2) 温度耐受: 取一定量的纯化后的酶液, 分别于 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 孵育 30、60、120、240 min; 然后于 60 °C 下测定酶活力, 并计算其比活。

(2) pH 对酶活力的影响。1) 最适 pH: 取 10 μ L 一定浓度的纯化后酶液, 分别于不同 pH 的缓冲液(终浓度均为 40 mmol/L)中, 60 °C 测定其酶活力, 并计算其比活。2) pH 耐受: 取一定量的纯化后酶液, 分别于不同 pH 的缓冲液中孵育 4 h; 然后, 于 60 °C 下, 取一定浓度的 10 μ L 酶液, 在磷酸钾缓冲液(终浓度 40 mmol/L, pH 7.0)中测定酶活力, 并计算其比活。

(3) 离子强度对酶活力的影响。取 10 μ L 一

定浓度的纯化后酶液, 分别于不同离子强度(终浓度 4、40、80、160、320、640、880 mmol/L)的磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中, 60 °C 测定其酶活力, 并计算其比活。

(4) 金属离子对酶活力的影响。将 10 μ L 一定浓度的纯化后酶液, 5 μ L 磷酸钾缓冲液(200 mmol/L, pH 7.0), 15 μ L 柠檬酸钠缓冲液(200 mmol/L, pH 7.0)混合后, 分别加入终浓度为 0.1、1.0、10.0 mmol/L 的金属离子, 补水到 125 μ L, 60 °C 下测定其酶活力, 并计算其比活。

1.2.5 β -葡萄糖苷酶聚合状态分析: 取 500 μ L 一定浓度的纯化后酶液通过 Superdex G-200 分子筛进行分离确定其寡聚状态, 并收集各个组分, 60 °C 测定其酶活力, 并计算其比活。标准样品 A: 葡聚糖蓝(2 000 kD)、铁蛋白(440 kD)和半清蛋白(75 kD)。标准样品 B: 甲状腺球蛋白(669 kD)、醛缩酶(160 kD)和卵清蛋白(43 kD)。

2 结果与分析

2.1 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、鉴定与表达载体构建及序列分析

通过 PCR 方法, 从嗜热脱氮土壤芽孢杆菌总 DNA 中扩增出 1 413 bp 的 *bglB* 基因, 将其成功连接到 pGEX-2TL 上, 重组质粒被命名为 pGEX-*bglB*。

测序结果显示, 扩增出的 *bglB* 基因与已报道的 *Geobacillus thermodenitrifican* NG80-2 的 *bglB* 基因序列相似性 99%, 蛋白序列与 *Geobacillus thermodenitrifican* NG80-2 的 BglB 序列相比存在 3 个氨基酸差异; 但与其它 *Geobacillus* 菌株来源的 BglB 相比, 这 3 个位点的氨基酸则是一致的, 这可能是由不同的 *Geobacillus* 菌株间的差异所导致的。

NCBI 比对结果显示, BglB 蛋白属于糖基水解酶家族 1, 该家族的主要成员包括部分 β -葡萄

糖苷酶、6-磷酸- β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶以及6-磷酸- β -半乳糖苷酶等。序列相似性比对发现, 这些同源蛋白大多来源于芽孢杆菌和一些肠道细菌, 预测的功能也各有不同。值得注意的是, 芽孢杆菌来源的同源蛋白 N-端区域明显比肠道细菌多出一段序列(表 1), *Geobacillus* 来源的同源蛋白序列的 N-端区域(BglB 蛋白对应序列为-----MEQQSKQP)则更为保守。

同源蛋白的系统发育树(图 1)分析发现, *Bacillus* 菌株来源的 BglB 同源蛋白能形成一个大簇。在该簇族中, *Geobacillus* 菌株来源的蛋白和常温芽孢杆菌来源的蛋白分别形成一个小的簇族。而肠道细菌独自形成一簇。从系统发育树上

看, *Geobacillus* 来源的 BglB 蛋白与常温来源的同源蛋白相比, 更具有自己的特点。

2.2 β -葡萄糖苷酶的表达纯化

SDS-PAGE (图 2)分析表明, 经过 IPTG 诱导后的重组菌有明显的可溶性重组蛋白表达。表达的同源蛋白大小约为 76 kD。*Geobacillus thermodenitrifican* 的 BglB 的预计值大约是 50 kD 左右, 本实验中 BglB 的 N 端带有大小约为 26 kD 的 GST 标签。纯化后的重组蛋白经过凝血酶处理形成 50 kD 切除 GST 标签的 BglB 和 26 kD 的 GST 标签的蛋白带。通过凝胶扫描系统分析, 纯化后 76 kD 大小的蛋白主带占总蛋白的 90% 以上。

表 1 BglB 蛋白及其部分同源蛋白 N 端序列差异					
Table 1 Difference of N-terminus of BglB protein and part of homologous proteins					
菌株 Strain	功能 Function	序列号 Accession number	长度 Length of se- quence (bp)	相似性 Identities (%)	N 端序列 N-terminal sequence
<i>Geobacillus thermodenitrifican</i>	bglB		470	100	-----MEQQSKQPITYRFPAGFWWGSAT
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	Beta-glucosidase	YP_001125856	470	99	-----MEQQSKQSITYRFPAGFWWGSAT
<i>Geobacillus</i> sp. TC-S8	Thermostable beta glucosidase-like protein	ACE77068	470	94	-----MEQRSKQPITYRFPAGFWWGSAT
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	6-Phospho-beta-glucosidase	YP_004588242	470	84	-----MKQQTKEILYRFPDGFWWGSAT
<i>Exiguobacterium</i> sp. AT1b	Beta-glucosidase	YP_002886257	474	73	-MTNPTQTRMKEQKTYQFPTDFWWGTAS
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	Mannoside-phospho-beta-d-glucosidase	NP_388465	465	73	-----MAHTEQYRFPKDFWWGSSA
<i>Paenibacillus polymyxa</i> E681	Beta-glucosidase A	YP_003873030	474	72	MNHTMKDIEQQTIQYRFPSPDFWWGSSA
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> PAM 55	Putative beta-glucosidase	YP_004854310	464	71	-----MTYKFPENFWWGSA
<i>Escherichia coli</i> B185	Beta-glucosidase	ZP_06659768	465	68	-----MRYRFPDNFWWGSAC
<i>Enterobacter asburiae</i> LF7a	Glycoside hydrolase family protein	YP_004826595	457	67	-----MKYSFPEHFWWGSAS

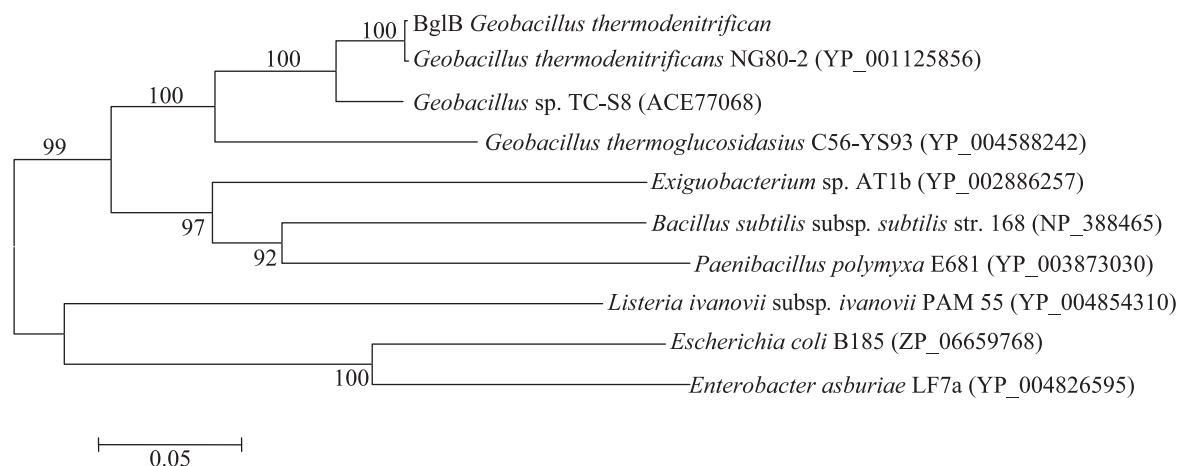


图 1 BglB 蛋白及其部分同源蛋白的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of BglB protein and part of homologous proteins

2.3 β -葡萄糖苷酶的酶学性质研究

2.3.1 温度对酶活力的影响: 最适温度如图 3A 所示, β -葡萄糖苷酶在 60 °C–70 °C 之间能保持 95% 以上的酶活, 其最适温度在 65 °C 左右。

80 °C 下酶活力低于 10%。

重组 BglB 对温度的稳定性如图 3B 所示, β -葡萄糖苷酶在 60 °C 下孵育 30、60、120、240 min, 酶活力基本保持不变; 70 °C 孵育 30 min, 酶活力大约降为原来的一半左右; 80 °C 孵育 30 min, 几乎检测不到 β -葡萄糖苷酶的酶活。

2.3.2 pH 对酶活力的影响: 在不同 pH 条件下分析重组表达的 β -葡萄糖苷酶的酶活力发现, 该酶在 pH 7.0 时表现出最大活力, 是典型的中性 β -葡萄糖苷酶, 最适 pH 为 7.0, 如图 4A 所示。图 4B 中重组 BglB 对 pH 的稳定性表明, 在不同 pH 的缓冲液中孵育 4 h, 重组表达的 β -葡萄糖苷酶在 pH 5–10 的缓冲液中的酶活力能维持在 90% 以上; 在 pH 5.0 的柠檬酸钠缓冲液中, β -葡萄糖苷酶最稳定。

2.3.3 离子强度对酶活力的影响: 在不同离子强度的磷酸钾缓冲液中, 重组表达的 β -葡萄糖苷酶酶活力的变化(图 5)显示: 当磷酸钾浓度大于 40 mmol/L 时, 该酶活力基本维持在 100% 左右;

当达到 880 mmol/L 时, 酶活力跃升至 120%。这一现象表明, 重组表达的 β -葡萄糖苷酶在很高离子浓度的环境中仍然保持较高的酶活。

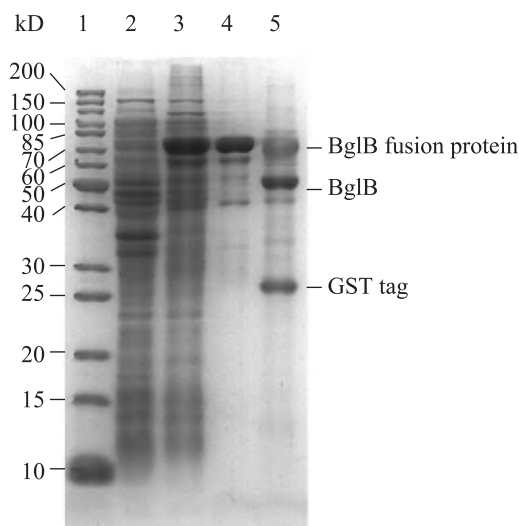


图 2 重组表达 BglB 蛋白纯化 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant expression BglB protein during purification

注: 1: 标准蛋白; 2: 未诱导的 BL21; 3: 经 IPTG 诱导表达的 BL21; 4: 纯化后的带 GST 标签的重组蛋白; 5: 凝血酶切除 GST 标签的重组蛋白。

Note: 1: Size markers (from top to bottom: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 and 10 kD); 2: The non-induced recombinant strain BL21; 3: Recombinant strain BL21 induced by IPTG; 4: Purified fusion GST tag protein; 5: Fusion GST tag protein digested by thrombin.

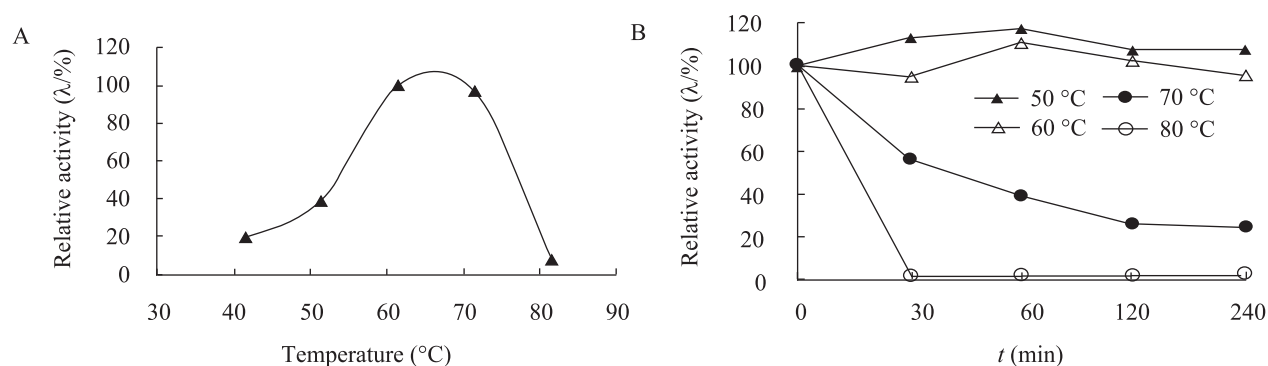


图3 温度对 BglB 酶活力的影响(A)及 BglB 的热稳定性(B)

Fig. 3 Effect of temperature on activity of recombinant BglB (A) and its temperature stability (B)

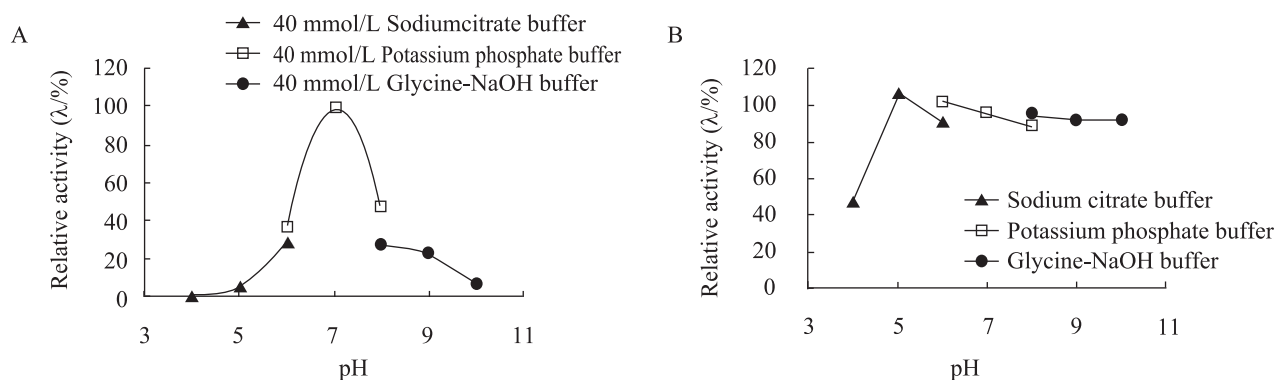


图4 pH 对 BglB 酶活力的影响(A)及 BglB 的 pH 稳定性(B)

Fig. 4 Effect of pH on activity of recombinant BglB (A) and its pH stability (B)

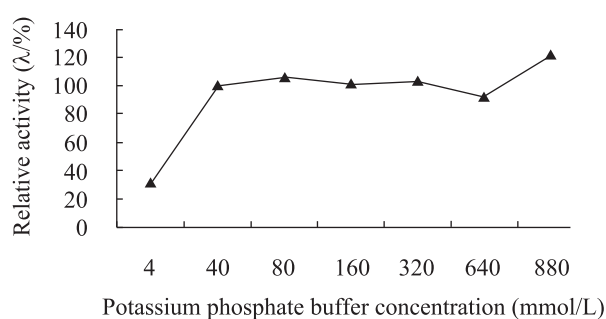


图5 离子强度对重组 BglB 的影响

Fig. 5 Effect of ionic strength on the recombinant BglB activity

2.3.4 金属离子对酶活力的影响: 不同浓度的金属离子对 β -葡萄糖苷酶的酶活力影响如图 6 所示, 在 0.1 和 1.0 mmol/L 的金属离子下, β -葡萄糖

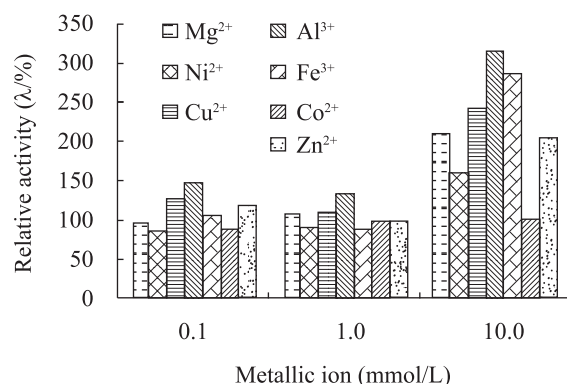


图6 金属离子对重组 BglB 的影响

Fig. 6 Effect of metallic ions on the recombinant BglB activity

苷酶的酶活力均能维持在 80% 以上, 其中 Al³⁺ 和 Cu²⁺ 对其有激活作用, Ni²⁺ 和 Co²⁺ 对其有抑制作用

用;当金属离子(除了 Co^{2+})浓度为 10 mmol/L 时, β -葡萄糖苷酶的酶活力均得到很大程度的提高,其中 Al^{3+} 的影响最为明显,其活力提高到 316%。

2.3.5 β -葡萄糖苷酶的比活力:通过计算,诱导表达的粗酶液上清的比活为 0.000 75 IU/mg,纯化后的 β -葡萄糖苷酶比活为 0.005 8 IU/mg。当测活体系中加入柠檬酸钠(终浓度 24 mmol/L)和 Al^{3+} (终浓度 10 mmol/L)时, β -葡萄糖苷酶比活最高能达到 0.043 IU/mg。底物多样性研究发现重组表达的 β -葡萄糖苷酶还具有少量的 β -半乳糖苷酶活性。以 PNP- β -D-galactoside 为底物时其比活力

是以 PNPG 为底物的 17%,以 PNP- α -D-mannoside 为底物时其比活力为 0。

2.4 β -葡萄糖苷酶聚合状态分析

纯化后的 β -葡萄糖苷酶经过 Superdex G-200 分子筛(图 7)分析发现,融合表达的 β -葡萄糖苷酶不以单体(76 kD)、二聚体(152 kD)的形式存在,而是以寡聚体的形式存在,根据其分子量的大小可将这些寡聚体分为 3 类: A 组分(>2 000 kD)、B 组分(440–669 kD)和 C 组分(160–440 kD)。根据出峰时间和 β -葡萄糖苷酶单体的分子量推测, B 组分可能是七聚体(532 kD)或者八聚体(608 kD),

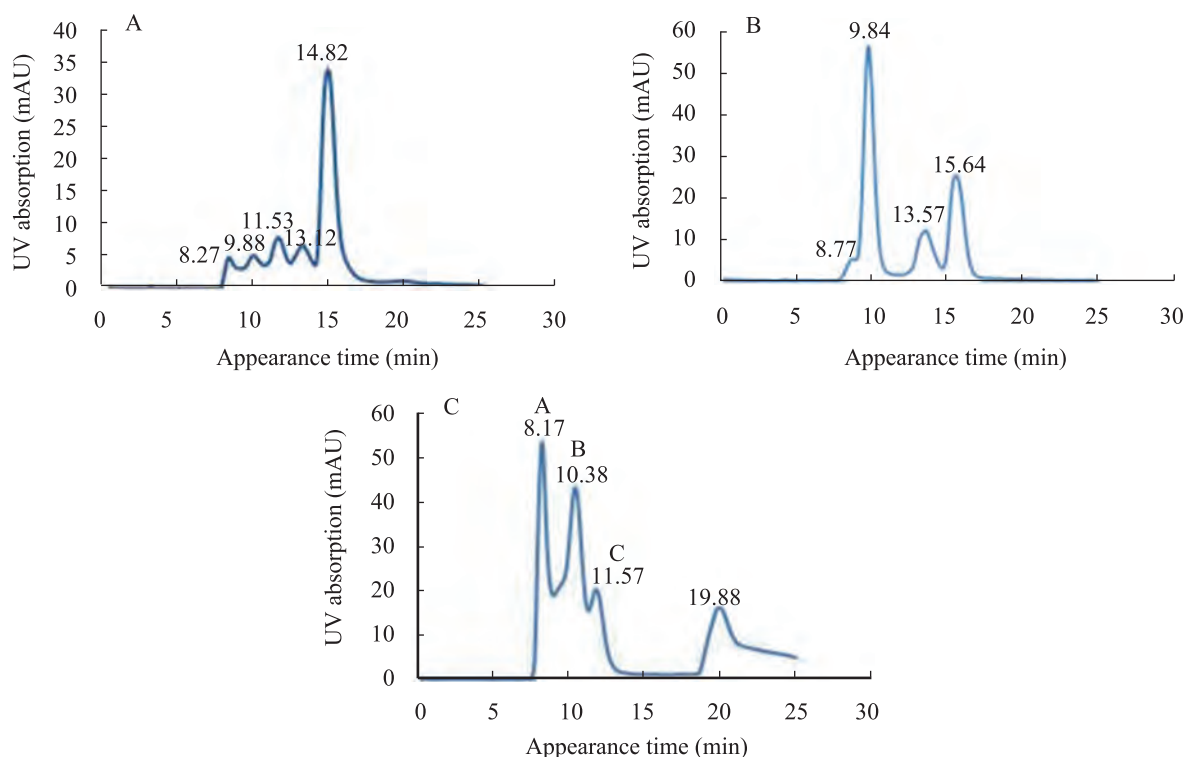


图 7 Superdex G-200 分子筛对重组 BglB 寡聚状态的分析

Fig. 7 Analysis of oligomeric of recombinant BglB by superdex G-200

注: A: 葡聚糖蓝(2 000 kD)出峰时间 8.27 min, 铁蛋白(440 kD)出峰时间 11.53 min, 半清蛋白(75 kD)出峰时间 14.82 min; B: 甲状腺球蛋白(669 kD)出峰时间 9.84 min, 醛缩酶(160 kD)出峰时间 13.75 min, 卵清蛋白(43 kD)出峰时间为 15.64 min; C: 重组 BglB 的峰图: 出峰时间分别是 8.17、10.38、11.57 min。

Note: A: Blue dextran (2 000 kD), appearance time: 8.27 min; ferritin (440 kD), appearance time: 11.53 min; conalbumin (75 kD), appearance time: 14.82 min. B: Thyroglobulin (669 kD), appearance time: 9.84 min; aldolase (160 kD), appearance time: 13.75 min; ovalbumin (43 kD), appearance time: 15.64 min. C: The peaks of BglB, appearance time: 8.17, 10.38, 11.57 min.

C 组分可能是五聚体(380 kD)或者六聚体(456 kD)。不同时间收集样品的蛋白浓度和酶活力分析如表 2 所示,从总蛋白量上看,分子量>669 kD 的蛋白(出峰时间 9.5 min 以前)占有蛋白比例的 59.3%,C 组分(出峰时间 11–12 min)最少,仅占 6.1%;从酶活力上看,不同寡聚态的 β -葡萄糖苷酶均具有 β -葡萄糖苷酶活性,其中,C 组分的 β -葡萄糖苷酶比活力最高,大约是其他聚合态的 2–4 倍。

表 2 各组分样品的蛋白浓度及比活力 Table 2 Protein concentration and specific activity of sample collected in different time				
编号 No.	收集时间 Collection time (min)	蛋白浓度 Protein concentration (mg/L)	比活 Specific activity (IU/mg)	蛋白浓度百分比 Percentage of protein concentration (%)
1	6.5–7.0	—	—	—
2	7.0–7.5	—	—	—
3	7.5–8.0	120.3	0.002 6	11.4
4	8.0–8.5	190.8	0.002 4	18.1
5	8.5–9.0	158.8	0.002 9	15.1
6	9.0–9.5	154.5	0.003 0	14.7
7	9.5–10.0	148.5	0.003 8	14.1
8	10.0–10.5	135.5	0.004 3	12.9
9	10.5–11.0	79.1	0.004 8	7.5
10	11.0–11.5	44.1	0.005 7	4.2
11	11.5–12.0	20.1	0.008 0	1.9
12	12.0–12.5	—	—	—

注: —: 超出测量范围。

Note: —: Out of range.

3 讨论

嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 NG80-2 的基因组序列于 2007 年公布在 NCBI 数据库中,其中预测的 β -葡萄糖苷酶基因总共有 3 个。经过序列分析发现,这 3 个 β -葡萄糖苷酶基因都属于糖苷水解酶 1 家族。为了研究嗜热脱氮土壤芽孢杆菌中 β -葡萄糖苷酶的性质,将其中的 *bglB* 基因构建到

pGEX-2TL 表达载体的 T7 强启动子下,并且在大肠杆菌 BL21 中实现了高效表达。表达出的融合蛋白带有 GST 标签,有利于酶的分离纯化。对进一步研究 β -葡萄糖苷酶的催化作用机理有一定的意义。

酶学性质研究发现,重组表达的 β -葡萄糖苷酶 BglB 与多粘芽孢杆菌来源的 β -葡萄糖苷酶^[10]属于同一个水解酶家族,但与之相比,二者酶学性质差异较大。重组表达的嗜热脱氮土壤芽孢杆菌来源的 β -葡萄糖苷酶对温度、pH、离子强度以及重金属有较高的耐受能力。已报道的 β -葡萄糖苷酶最适反应温度大多在 60 °C 以下,本研究表达的 β -葡萄糖苷酶最适反应温度为 65 °C,并且在 60 °C–70 °C 之间能保持 95% 以上的酶活,在 pH 5.0–10.0、60 °C 的条件下能稳定存在 4 h 以上。目前,对高离子强度条件下 β -葡萄糖苷酶功能的研究鲜有报道,本研究发现该重组表达的 β -葡萄糖苷酶在大部分重金属离子和高盐环境下能保持较高的酶活,且不同浓度(0.1–10.0 mmol/L)的 Al^{3+} 对该酶有一定程度的激活作用。张山等^[11]曾报道耐高温的木聚糖酶的 N-端区域对其热稳定性有重要意义,并利用这一特点对常温来源的木聚糖酶进行改造用于提高其热稳定性,本研究表达的 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列 N-端区域与一些常温细菌来源的 β -葡萄糖苷酶相比具有自身的特点。根据这一特点,可以通过 β -葡萄糖苷酶的体外分子定向进化^[12],提高 β -葡萄糖苷酶酶活力以及其对温度的耐受。

寡聚状态分析表明该酶具有多种不同形式的多聚体,不同寡聚态的蛋白浓度和酶活力均不相同,存在大量活性较低、分子量大于 669 kD 的寡聚态,只有含量最少的 C 组分具有较高的酶活。这些不同寡聚态的存在是否是因为异源表达的蛋白折叠不好所造成的,我们将在后续的研究中进行报道。

本研究从嗜热土壤芽孢杆菌中克隆表达了 β -葡萄糖苷酶,并分析了重组表达的 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及其寡聚状态。这一研究成功获得了一个耐热耐盐的 β -葡萄糖苷酶,为研究如何提高 β -葡萄糖苷酶的热稳定性提供一定的帮助。

参 考 文 献

- [1] Ryu DDY, Mandels M. Cellulases - biosynthesis and applications[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1980, 2(2): 91-102.
- [2] Wood TM. Properties of cellulolytic Enzyme-Systems[J]. Biochemical Society Transactions, 1985, 13(2): 407-410.
- [3] Beguin P. Molecular biology of cellulose degradation[J]. Annual Review of Microbiology, 1990, 44(1): 219-248.
- [4] Wood TM, McCrae SI, Bhat KM. The mechanism of fungal cellulase action-synergism between enzyme components of *Penicillium-Pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose[J]. Biochemical Journal, 1989, 260(1): 37-43.
- [5] Parry NJ, Beever DE, Owen E, et al. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*[J]. Biochemical Journal, 2001, 353(Pt1): 117-127.
- [6] 韩笑, 陈介南, 王义强, 等. β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(3): 8-12.
- [7] Kim HJ, Oh DK. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 120(2): 162-173.
- [8] Li HB, Zhang XB. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 42(1): 153-159.
- [9] Ezeji TC, Bahl H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 125(1): 27-38.
- [10] 赵云, 刘伟丰, 毛爱军, 等. 多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 741-744.
- [11] Zhang S, Zhang K, Chen XZ, et al. Five mutations in N-terminus confer thermostability on mesophilic xylanase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 395(2): 200-206.
- [12] Arrizubieta MJ, Polaina J. Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a β -glucosidase by random mutagenesis and *in vitro* recombination[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(37): 28843-28848.