

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

赵 云 刘伟丰 毛爱军 江 宁 董志扬*

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 从多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa* 1.794)中克隆得到 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA*。将其构建在大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达载体 pET28a(+)上,转化 *E. coli* BL21,获得重组工程菌 BL1979。重组表达的 β -葡萄糖苷酶的酶活力达到 24.7 IU/mL,经镍柱纯化后的 β -葡萄糖苷酶最适温度为 37℃,最适 pH 值为 7.0,该酶经纯化后纯度可达 92.7%。用非变性梯度聚丙烯酰胺电泳发现该酶具有多种寡聚体形式,经荧光底物活性染色表明这些寡聚体均具有 β -葡萄糖苷酶活性。

关键词 β -葡萄糖苷酶,多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*),重组表达

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0741-04

β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC3.2.1.21)又称 β -D-葡萄糖苷水解酶,是一种能催化水解 β -葡萄糖苷键生成葡萄糖的酶,是纤维素酶系中一类重要的酶^[1]。纤维素酶大致由三类水解酶组成,分别是 β -葡聚糖苷酶、纤维二糖水解酶和 β -葡萄糖苷酶,在纤维素降解过程中,从纤维素分解成葡萄糖需以上三种酶协同作用。 β -葡萄糖苷酶可将纤维二糖水解为葡萄糖,是纤维素水解糖化过程中的限速步骤^[2]。

近年来,可再生的纤维素资源的降解利用越来越受到重视,所以对 β -葡萄糖苷酶的研究在很多国家得到了广泛开展。多粘芽孢杆菌所产 β -葡萄糖苷酶对木质纤维素来源的纤维二糖水解专一性较高,这对于研究纤维素的酶解机制有重要意义,因而受到高度重视^[3]。该酶基因已在 1989 年被 Gonzalez-candelas L 克隆得到并进行了表达研究,但表达活力较低,粗酶液的比活仅为 0.364 IU/mg^[4]。

本文从多粘芽孢杆菌中克隆到 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因,将其构建在 pET-28a(+)上,转化大肠杆菌 BL21(DE3),使多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中实现了高效表达,重组表达的 β -葡萄糖苷酶的比活为 14.9 IU/mg。同时通过对重组表达 β -葡萄糖苷酶纯化对其酶学性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21(DE3)、多粘芽孢杆菌 1.794;质粒 pGEM-T Easy 购于 Promega 公司,质粒 pET-28a(+)为本实验室保存。

1.1.2 培养基: 采用 LB 培养基培养大肠杆菌宿主和多粘芽孢杆菌,抗性筛选时加入卡那霉素至终浓度 50 μ g/mL。

1.1.3 试剂: 各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 回收试剂盒、蛋白质分子量标准购自鼎国生物技术公司;小牛肠碱性磷酸酶、X-Gal 购自 Promega 公司;高分子量蛋白标准购自 Pharmacia 公司;PCR 扩增引物由基康公司合成;其它生化试剂购于 Sigma 等公司。

1.2 方法

1.2.1 多粘芽孢杆菌总 DNA 的提取: 按照 Murray 的方法^[5]从多粘芽孢杆菌 1.794 中提取基因组总 DNA,大小在 20 kb 左右。

1.2.2 *bglA* 基因的 PCR 扩增: 根据已报道的多粘芽孢杆菌 *bglA* 基因序列^[6],设计并合成特异性引物,两条引物的 5' 端分别含有单一的 *Bam*H I 和

收稿日期:2004-03-08,修回日期:2004-05-25。

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(No. 2001AA214151)、中科院知识创新方向性课题(No. KJ9X2-SW-206-1)。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-62551206; E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn

*Hind*Ⅲ酶切位点。

P1:cgcggaatcatgactattttcaatt; P2:cccaagcttttagcgtctagctcaca。

*Bam*H I

*Hind*Ⅲ

以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板,用引物 P1、P2 对 *bglA* 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L,含有 50 ng 1.794 总 DNA,0.2 mmol/L dNTP, 25pmol 每种引物, 1 \times PCR 反应缓冲液, 2.5u Taq DNA 聚合酶。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 45 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 进行 35 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 扩增产物经 DNA 回收试剂盒回收。

1.2.3 *bglA* 基因克隆与序列分析:将 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 上,转化 *E. coli* DH5 α 。筛选得到含 *bglA* 基因的阳性克隆,进行酶切鉴定和序列分析。

1.2.4 *bglA* 基因重组表达载体的构建:利用 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ双酶切得到的 *bglA* 基因片段,连接到表达载体 pET28a(+)的 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ酶切位点上,得到重组表达质粒,转化 *E. coli* BL21(DE3)。

1.2.5 在平板上用荧光底物直接筛选阳性转化子^[7,8]:将 MUG(4-methyl umbelliferyl β -D-glucopyranoside)溶于 DMF(Dimethyl formamide)中,得 20mg/mL 溶液,用滤膜过滤除菌。在涂有荧光物质 MUG 的 LB 抗性平板上筛选阳性重组子,用于表达研究。

1.2.6 *bglA* 基因在 *E. coli* BL21 中的诱导表达:将重组菌接到含卡那霉素的 LB 培养基中继续培养至对数生长期,加入 IPTG 到终浓度 0.75 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导 3~5h,室温下 4000 r/min 离心 15min 收集菌体。

1.2.7 酶的纯化:按 1%的接种量将重组菌接种于含有卡那霉素的 LB 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C, 200r/min 下振荡培养至 OD 值达 0.5~0.8, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 3~5h。收集细胞,按 SNBC 3S NTA Resin 的操作方法在非变性条件下抽提 His-Tag 蛋白质。

1.2.8 SDS-PAGE 电泳和蛋白定量分析:Folin-酚方法测蛋白浓度,以牛血清白蛋白制作标准曲线。

1.2.9 非变性梯度凝胶电泳及活性染色:梯度胶范围为 7%~15%, 2mmol/L MUG 溶液进行活性染色。

1.2.10 重组表达 β -葡萄糖苷酶活力的测定^[9]:将纯化后的酶液用 β -对硝基酚葡萄糖苷(β -pNPG)为底物进行酶活测定:取一定稀释的酶液 0.1 mL,加入 0.1 mL 用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸(CP)缓冲液(pH7.0)配制的 10mmol/L pNPG 底物, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min,加入 0.1mL 0.6mol/L Na₂CO₃ 试剂,用水定容至 2 mL 后在 400 nm 处测光吸收,以每分钟生成 1 μ mol p-nitrophenol 所需酶量定义为 1 个酶活力单位。

2 结果和分析

2.1 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、鉴定与表达载体构建

通过 PCR 方法,从多粘芽孢杆菌总 DNA 中扩增出 1346 bp *bglA* 的基因片段,连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化 *E. coli* DH5 α 。序列分析结果表明扩增出的 *bglA* 基因序列与报道的序列同源性为 99%。将 pGEM-T Easy 上的 *bglA* 基因片段用 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ切下,插入到表达载体 pET28a(+)的多克隆位点中的 *Bam*H I 和 *Hind*Ⅲ位点上,转化受体菌 *E. coli* BL21(DE3)。将重组质粒命名为 pETBT,将含有该质粒的重组菌株命名为 BL1979。重组质粒 pETBT 见图 1, pETBT 酶切分析见图 2。

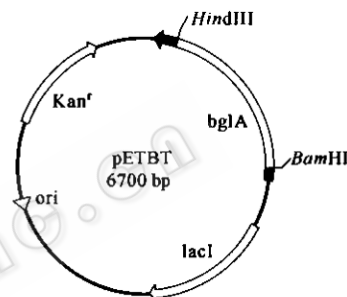


图 1 重组质粒 pETBT 图谱

Fig.1 Map of recombinant plasmid pETBT

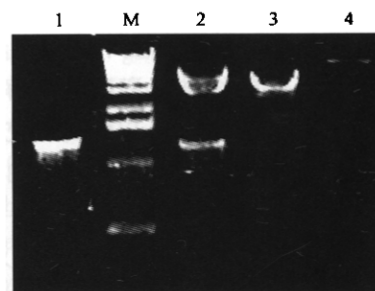


图 2 重组质粒 pETBT 的酶切鉴定

Fig.2 The restriction analysis of recombinant plasmid pETBT

1: PCR product of *bglA*; M: 1kb DNA ladders; 2: pETBT digested by *Bam*H I and *Hind*Ⅲ; 3: pET28a digested by *Bam*H I and *Hind*Ⅲ; 4: pETBT digested by *Dra*I

2.2 荧光底物筛选阳性转化子

转化子中含有 *bglA* 基因片段的重组菌可在含 MUG 的 LB 抗性平板上筛选,对于表达 *bglA* 基因的阳性转化子可水解底物 MUG 并释放 4-methyl umbelliferone,该物质在紫外灯下为可见荧光。结果见图 3。

2.3 β -葡萄糖苷酶基因诱导表达及酶的分离纯化

将重组菌株 BL1979 接于含卡那霉素的 LB 培养基中, IPTG 诱导后,重组菌经超声破碎,进行 SDS-PAGE 分析和 β -葡萄糖苷酶活力的检测。SDS-PAGE

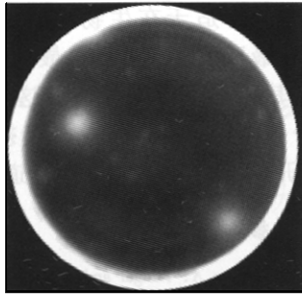
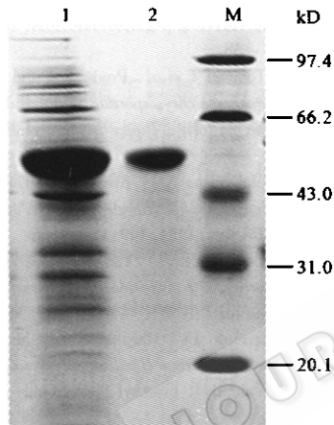


图3 MUG 平板筛选阳性转化子

Fig.3 Activity screening of transformants with MUG

1,2: positive clone transformed with pETBT

分析表明,经诱导的重组菌有明显的重组蛋白表达带。重组蛋白分子量约为 52 kD,文献报道中 *Bacillus polymyxa* 所产 β -葡萄糖苷酶分子量为 50 kD^[4],本实验中 β -葡萄糖苷酶的 N 端增加了 14 个氨基酸的融合肽,重组蛋白的分子量大小与理论值相符,粗酶

图4 重组表达 β -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 分析Fig.4 Analysis of recombinant expression β -glucosidase by SDS-PAGE

M: standard protein molecular weight;

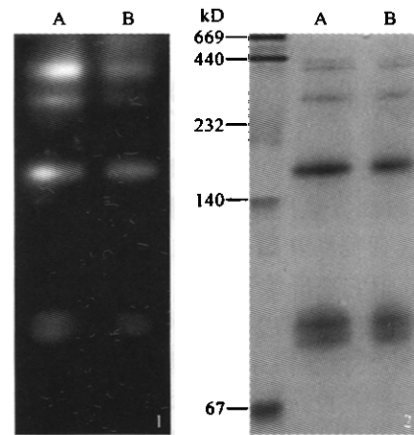
1: crude extract of recombinant strain BL1979 induced by IPTG;

2: purified fusion 6 \times His-tag fusion protein

液酶活可达 24.7IU/mL。重组表达的 β -葡萄糖苷酶为一带有 6 个组氨酸标记的融合蛋白,可经金属螯和柱层析被纯化。 β -葡萄糖苷酶纯化后经 SDS-PAGE 分析,可见为一均一蛋白带,电泳结果见图 4。通过凝胶扫描系统分析,目的蛋白纯度为 92.7%。

2.4 非变性梯度凝胶电泳

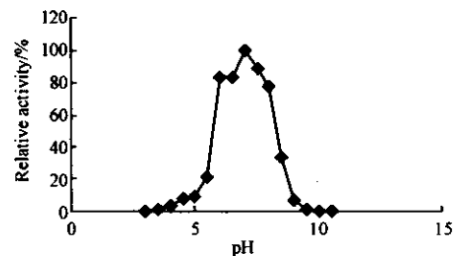
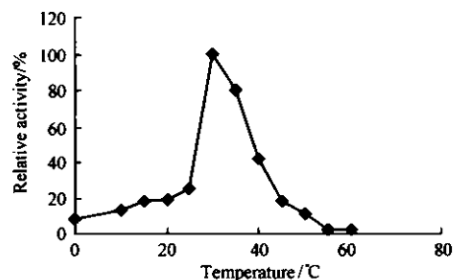
将纯化后的融合蛋白进行非变性梯度凝胶电泳,先用 MUG 进行活性染色,30min 后在紫外光下观察实验结果;考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色后在可见光下观察实验结果。将不同的染色方法得到的结果进行分析,可见融合表达的 β -葡萄糖苷酶在天然状态下为寡聚体形式,并在二、四、六、八聚体状态下都有相应的水解酶活性(电泳结果见图 5, A、B 为相同样品,但上样量分别为 40 μ L 和 30 μ L)。

图5 纯化后 β -葡萄糖苷酶的非变性梯度凝胶电泳Fig.5 Nondenaturing gradient gel electrophoresis of purified β -glucosidase

1: corresponding activity of β -glucosidase was photographed under UV light; 2: the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 and photographed under visible light

2.5 重组表达 β -葡萄糖苷酶的性质

重组表达 β -葡萄糖苷酶的最适温度和最适 pH: 在不同温度条件下分析重组表达 β -葡萄糖苷酶活力变化,发现该重组酶的最适温度为 37 $^{\circ}$ C。在不同 pH 反应条件下分析重组表达 β -葡萄糖苷酶的酶活力,发现该酶在 pH7.0 时表现出最大酶活力,表明该酶最适 pH 为 7.0。重组表达 β -葡萄糖苷酶的最适温度和最适 pH 与文献报道的 β -葡萄糖苷酶一致(图 6、图 7)。

图6 pH 值对重组表达 β -葡萄糖苷酶活力的影响Fig.6 Effect of pH on activity of recombinant β -glucosidase图7 温度对重组表达 β -葡萄糖苷酶活力的影响Fig.7 Effect of temperature on activity of recombinant β -glucosidase

3 讨论

β -葡萄糖苷酶作为纤维素酶中的一个重要组分,在医疗、食品、生物质转化中有重要的应用价值,特别是随着近年来环境能源等危机的加重,木质纤维素作为自然界最广泛的碳源受到了各国政府的高度重视。 β -葡萄糖苷酶是纤维素彻底降解为单糖的一个瓶颈,但它在纤维素酶系中含量很低,对它能将纤维二糖降解为单糖的催化水解机制了解得也不是很清楚。本文将多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶基因**bglA**构建到 pET28a(+) 载体上的 T7 强启动子下游,在 *E. coli* 中实现了高效表达。pET28a(+) 表达载体具有 T7 强启动子序列,表达出的融合蛋白带有 6 个组氨酸标记便于酶的分离纯化。对于进一步研究酶的催化作用机理有一定的研究意义。

Sanz-Aparicio J 等人^[10]曾报道根据蛋白晶体结构分析多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶活性结构在天然状态下为八聚体,分子量为 400 000D,而我们通过梯度电泳活性染色分析,发现该酶在非变性情况下是以多种寡聚体作为活性结构,包括二聚体、四聚体、六聚体和八聚体,这些寡聚体都具有很好的 β -葡萄糖苷酶活性,而未发现单体活性结构,这与已发现的各种微生物来源的 β -葡萄糖苷酶有明显区别,这对进一步研究该酶水解机理有重要意义。

β -葡萄糖苷酶有广泛的底物特异性,来源于细菌的 β -葡萄糖苷酶属于糖苷水解酶家族 1,该家族成员除可水解 β -1,4 葡萄糖苷键外还可水解 β -1,3、 β -1,2 葡萄糖苷键^[4]。本文所表达的来源于多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)的 β -葡萄糖苷酶的最适底

物为纤维二糖,非常适于在生物质转化中纤维素降解糖化,但该酶最适温度为 37℃,最适 pH 值为 7.0,这可能限制了其在工业中的应用。这些都可通过对该酶的体外分子定向进化^[11],进一步提高该酶的酶学性质,有关研究我们将进一步作报道。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Woodward J, Wiseman A. Fungal and other β -D-glucosidase—their properties and applications. *Enzyme Microb Technol*, 1982, 4: 73–77
- [2] Yukt B, Saroj M, Bisaria VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(4): 375–407
- [3] Shewale JG. β -glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int J Biochem*, 1982, 14: 435–443
- [4] Gonzalez-candelas L, Aristoy MC, Polaina J. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(12): 3173–3177
- [5] Murray AW, Thompson WF. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325
- [6] Gonzalez-Candelas L, Ramon D, Polaina J. Sequences and homology analysis of two gene encoding β -glucosidase from *Bacillus polymyxa*. *Gene*, 1990, 95: 31–38
- [7] Rie K, Makoto Y, Tomomi T et al. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(1): 1–7
- [8] Van Tilbeurg K, Claeysens NM, Bruyne CK. The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulosytic enzymes. *FEBS Lett*, 1984, 149: 152–156
- [9] Ge SG(戈苏国), Song Y(宋钰), Yang SJ(杨寿钧) et al. Purification and some properties of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Chinese Biochemical Journal* (生物化学杂志), 1985, 1(1): 67–73
- [10] Sanz-Aparicio J, Hermoso JA, Martinez-Rapoll M et al. Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J Mol Biol*, 1998, 275: 491–502
- [11] Arrizubieta MJ, Polaina J. Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a β -glucosidase by random mutagenesis and *in vitro* recombination. *JBC*, 2000, 275(37): 28843–28843

Expression, Purification and Enzymatic Characterization of *Bacillus polymyxa* β -glucosidase Gene(*bglA*) in *Escherichia coli*

ZHAO Yun LIU Wei-Feng MAO Ai-Jun JIANG Ning DONG Zhi-Yang*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The β -glucosidase encoding gene *bglA* was cloned from *Bacillus polymyxa* 1.794. The *bglA* gene was inserted in expression vector pET28a(+) and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), finally the recombinant strain BL1979 was obtained. Induced by IPTG, the expression β -glucosidase activity reached to 24.7 IU/mL. The optimum temperature and optimum pH of the recombinant expression β -glucosidase in BL1979 were 37℃ and 7.0 respectively, the purity can reach to 92.7%. Analysis of the fusion protein by nondenaturing gradient gel electrophoresis, we found the fusion protein exists in dimer, tetramer, hexamer and octamer, they all have hydrolase activity.

Key words β -glucosidase, *Bacillus pumilus*, recombinant expression

Received: 03-08-2004

This work was supported by Grants from Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA214151.); The Knowledge Innovation Project (KIP) of Chinese Academy of Sciences (No. KJ92-SW-206-1).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62551206; E-mail: dongzy@sun.im.ac.cn