

嗜热毛壳菌纤维素酶(CBH II) cDNA 的克隆及在毕赤酵母中的表达 Cloning and Expressing of Cellulase Gene(*cbh2*) from Thermophilic Fungi *Chaetomium thermophilum* CT2

刘守安 李多川* 俄世瑾 张燕

LIU Shou-An , LI Duo-Chuan* , E Shi-Jin and ZHANG Yan

山东农业大学环境生物系 泰安 271018

Department of Environmental Biology , Shandong Agriculture University , Tai 'an 271018 , China

摘 要 嗜热毛壳菌 *Chaetomium thermophilum* CT2 是一种土壤腐生菌 ,可产生具有重要工业生产价值的纤维素酶类。RACE-PCR 获得嗜热毛壳菌纤维二糖水解酶 II(CBH II)的编码基因(*cbh2*)。DNA 序列分析表明 *cbh2* 的开放阅读框由 1428 个碱基组成 ,编码 476 个氨基酸。推断的氨基酸序列包含一个典型真菌纤维素酶的糖结合域(CBD)催化域(CD)以及二者之间富含脯氨酸和羟基氨基酸的连接桥。根据氨基酸序列推算该酶分子量为 53kD ,属于糖苷水解酶第六家族 ,具有该家族催化保守区的典型特征。PCR 扩增 *cbh2* 的成熟蛋白编码基因 ,利用基因重组的方法构建可在毕赤酵母分泌表达系统中表达纤维二糖水解酶蛋白的重组表达载体 ,并转化毕赤酵母得到重组子。在毕赤酵母醇氧化酶 *AOX1* 基因启动子的作用下 ,重组蛋白得到高效表达 ,小规模发酵量达 1.2 mg/mL。经硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose Fast flow 阴离子层析等步骤纯化了该重组表达蛋白。SDS-PAGE 得到重组蛋白分子量为 67kD ,与从嗜热毛壳菌中纯化的该酶分子量一致。该重组纤维二糖水解酶作用的最适合温度 50℃ ,最适 pH4.0 ,在 70℃ 的半衰期为 30min ,具有较好的热稳定性。

关键词 嗜热毛壳菌 纤维二糖水解酶 cDNA 克隆 巴斯德毕赤酵母 基因表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0892-08

Abstract *Chaetomium thermophilum* CT2 can produce extracellular cellulase with industrial value . We designed two degenerate primers to amplify catalytic domain sequence of cellobiohydrolase II(CBH II) . Full length of cDNA was obtained by rapid amplification of cDNA ends technologies . DNA sequencing revealed that *cbh2* has an open reading frame of 1428bp , which encodes a putative polypeptide of 476 amino acids . The deduced amino acid sequence shows that the predicted molecular mass is 53 kD and the *cbh2* consists of a fungal-type carbohydrate binding domain(CBD) separated from a catalytic domain by a linker region rich in proline/serine/threonine . PCR product consisting of the entire CBH II coding region without its signal sequences was cloned into the yeast secretive plasmid pPIC9K , which was then transformed into *Pichia pastoris* GS115 . Highly efficient production of the cellobiohydrolase II was achieved in *P. pastoris* under the control of the *AOX1* promoter , and the expressing level was 1.2 mg/mL by small-scale culturing . The recombinant cellobiohydrolase II was purified by using ammonium sulfate fraction , DEAE-Sepharose Fast flow chromatography . A molecular mass of the purified enzyme is 67 kD determined by SDS-PAGE and this is similar to the native cellobiohydrolase II purified from *C. thermophilum* CT2 . The recombinant enzyme exhibited optimum catalytic activity at pH 4.0 and 50℃ respectively . It was thermostable at 50℃ and retained 50% of its

Received : July 25 , 2005 ; Accepted : August 31 , 2005 .

This work was supported by Chinese National Science Foundation(No.30270013 , 30170013) ; Chinese Nation Programs for High Technology Research and Development(No.2003AA241162) .

* Corresponding author . Tel 86-538-8249071 E-mail : lidc20@sdau.edu.cn

国家自然科学基金(No.30270013 , 30170013) 国家高技术研究与发展计划资助项目(No.2003AA241162) . ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

original activity after 30 min at 70℃ .The high level of fully active recombinant cellobiohydrolaseⅡ got from *P. pastoris* makes this expression system attractive for fermentor and industrial applications.

Key words Thermophilic fungi cellobiohydrolaseⅡ cDNA cloning , *Pichia pastoris* , expressing

纤维素是地球上最丰富的可再生资源,是植物细胞壁的主要成分,由β-1,4-葡萄糖苷键连接葡萄糖形成的线形聚合体,不溶于水,可被纤维素酶水解成葡萄糖^[1]。细菌和真菌是降解纤维素的主要微生物,主要是通过分泌纤维素酶降解纤维素^[2]。纤维素酶是一组能降解纤维素的酶的总称。一般真菌纤维素酶系(cellulase system)由三类不同但又互补的酶组成,分别为内切型β-1,4-葡聚糖酶(EG)、外切型β-1,4-葡聚糖酶(又称为纤维二糖水解酶, CBH)和β-葡萄糖苷酶(也称为纤维二糖酶, BG)^[3]。纤维二糖水解酶从长链纤维素分子末端水解β-1,4-糖苷键,每次切下一个纤维二糖分子^[4]。纤维素酶应用广泛,主要用于食品、纺织、饲料添加剂、纤维素饲料、生物制品、纤维废物转化配料、造纸等领域,已经成为现代酶制剂工业中的重要酶类。虽然纤维素酶在微生物中广泛存在,但是产酶效率低,难以获得大量产品,而且热稳定性差,货价寿命短,从而一直限制着纤维素酶的推广应用。嗜热毛壳菌是能在50℃条件下正常生长的一类嗜热真菌,能产生热稳定的完整纤维素酶类^[5]。我们试图通过基因工程的手段,分离嗜热毛壳菌热稳定纤维二糖水解酶编码基因,并导入毕赤酵母中,利用酵母生长快、易于培养等特点,使纤维素酶基因在常温和短时间内快速、超量表达,期望达到降低能耗和提高经济效益的目的。本文将在从中国分离到的嗜热毛壳菌中克隆纤维二糖水解酶基因,并构建重组毕赤酵母工程菌表达此纤维素酶,为大规模发酵及工业应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:嗜热毛壳菌 *Chaetomium thermophilum* CT2 为本实验室分离得到。大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5α、JM109 为本实验室保存;毕赤酵母 *Pichia Pastoris* GS115 和 pPIC9K 分泌型表达载体购自 Invitrogen 公司;质粒 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 酶和试剂:Trizol 购自 Invitrogen,DEPC、Tris、RT-PCR 试剂盒、胶回收试剂盒、IPTG、X-gal、氨苄青霉素、DNA Marker(DL2000,λ-*Hind*Ⅲ digest)、限制酶、T4DNA 连接酶等工具酶购自 TaKaRa 公司;

SMART-RACE 试剂盒购自 Clontech 公司。G418 购自 Invitrogen,医用脱脂棉(甲级)购自上海生工。

PCR 引物合成及测序由上海生物工程公司完成。

1.1.3 培养基及培养条件:固体 PDA 培养基 50℃ 培养 72h,液体诱导培养基(1000mL 培养基中含 15g 微晶纤维素,10g 淀粉,4g 酵母,750mL 蒸馏水,250mL 自来水,Vogel's 母液,微量元素 0.1mL,浓盐酸调 pH 值到 5.0,103.5kPa 下灭菌 20min),50℃,200r/min 培养 48h^[6]。

大肠杆菌 LB 培养基见《分子克隆实验指南》(第三版),YPD、MM、MD、BMGY、BMMY,培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.2 PCR 引物

根据实验需要设计 PCR 扩增引物(表 1)。

| Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification | |
|---|-----------------------------------|
| Primer sequence | |
| CS1 : | 5'-GAYYTGCCNGSYNGSGSYTGYG-3' |
| CA1 : | 5'-CCNCCWGGCTTACCAGAC-3' |
| CS2 : | 5'-GACITACCAGACCGTGATTGC-3' |
| DT1 : | 5'-TGCCGAAGCTTTTTTTTTTAGC-3' |
| CA2 : | 5'-ATAGACCACTCGCCGTTCGAAGC-3' |
| B1 : | 5'-CCTTGTCTCTGTCTCTGTT-3' |
| B2 : | 5'-TGGCAAAATCCATACTCAA-3' |
| CS3 : | 5'-GTATTTCGGGATCTGCATGGCTAAGC -3' |
| CA3 : | 5'-TTCAGAACGGAGGGTTGGCAATTCC-3' |

1.3 嗜热毛壳菌 *cbh2* 基因的克隆

1.3.1 总 RNA 提取:在纤维素诱导培养基上接种嗜热毛壳菌,50℃恒温培养 3d,收集菌丝,无菌水冲洗,液氮速冻,提取总 RNA。方法见 Trizol 试剂盒说明。

1.3.2 全长 cDNA 序列的克隆:

RT-PCR 按照 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒说明进行。PCR 所用正向引物 CS1 和反向引物 CA1 是根据已报道纤维二糖水解酶Ⅱ基因同源序列设计的兼并引物。PCR 反应体系(25μL)cDNA 2μL,10 × Buffer 2.5μL,dNTP 2μL,25mmol/L MgCl₂ 2μL,上下游引物各 1.5μL,Taq DNA 聚合酶 0.5μL(5u/μL),ddH₂O 13μL。反应条件为 94℃ 3min 预变性;94℃ 45s,60℃ 45s,72℃ 1min,共 30 个循环;72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。

3'RACE:根据已测定的序列设计特异引物,CS2。

用 CS2 和下游锚定引物 DT1 进行 PCR 反应,反应程序如下:94℃ 3min 预变性,然后进行以下循环:94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 1min,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min,4℃ 保存,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

5'RACE:根据已知序列设计特异引物 CA2 和 B1、B2 进行 Touchdown PCR,反应程序为:94℃ 3min,72℃ 3min,进行 3 个循环;94℃ 1min,68℃ 1min,72℃ 1min,进行 3 个循环;然后 94℃ 1min,65℃ 1min,72℃ 1min 反应 25 个循环,最后 72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

全长 cDNA 扩增:分别在起始密码子 ATG 上游和终止密码子 TGA 下游设计特异引物 CS3 和 CA3 扩增。

1.4 CBH II 成熟肽编码基因的扩增及毕赤酵母表达载体的构建

1.4.1 基因的 PCR 扩增:根据上述扩增得到的 *cbh2* 基因序列,设计一对引物扩增纤维二糖水解酶 II 成熟蛋白编码基因。设计引物时在上下游引物中分别引入了 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点(加下划线处为酶切位点)。

上游引物(C1) 5'-CCGAATTCGCCCTCTCCTGAGGAG-3'
下游引物(C2) 5'-GGGGGCGGCTCAGAGCGGAGGTTCG-3'

两个引物之间相距 1377bp,上游引物从纤维二糖水解酶成熟蛋白编码基因开始,扩增产物去除了 CBH II 信号肽序列。以嗜热毛壳菌总 RNA 反转录产物为模板进行 PCR 扩增。

1.4.2 毕赤酵母表达载体的构建:将 *cbh2* 基因的成熟蛋白编码序列经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 的多克隆位点,并位于 α -因子信号肽序列的下游,得到重组质粒,并对该质粒进行限制性酶切及测序鉴定。

1.5 毕赤酵母的电转化

酵母菌株 GS115 于 500mL YPD 中 30℃ 培养至 $A_{600} = 1.5$,1500r/min 离心收集菌体,先后用 500、250mL 预冷的无菌水洗菌体,4℃ 下 3000r/min 离心去上清液,用 20mL 预冷的 1mol/L 山梨醇悬浮,取 80 μ L 加入 5~10ng 线性化的重组质粒(*Nco* I 切),冰浴 5min,电击仪电击,电击参数为 1.5kV、25 μ F。电击结束后迅速加入 1mL 预冷后的 1mol/L 山梨醇,取 200 μ L 于固体 MD 培养基上涂板,30℃ 培养直至单个转化子出现。

1.6 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

1.6.1 重组毕赤酵母的筛选:用灭菌牙签挑取转化子对应点种到筛选培养基 MM 和 MD 平板上,30℃

培养 2d,在 MD 和 MM 均正常生长的转化子为阳性转化子。

1.6.2 酵母转化子的 PCR 鉴定:毕赤酵母基因组 DNA 提取参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。PCR 反应体系为 50 μ L,含有 50ng 基因组 DNA。

1.6.3 重组酵母工程菌株多拷贝整合子的筛选及诱导表达:将阳性转化子点种到不同 G418 浓度的 YPD 平板上,筛选抗不同 G418 水平的重组酵母菌株。将不同抗性水平的重组酵母菌株接种于含 25mL BMGY 培养基的 250mL 摇瓶中,30℃ 下 220r/min 摇床培养 48h。离心收集菌体,用无菌水洗 3 次,将菌体转移至含 200mL BMMY 诱导培养基的 1L 摇瓶中,30℃ 下继续培养,每 24h 补加 1mL 100% 甲醇。每隔 12h 取样,将培养液于 4℃ 下 5000r/min 离心 5min,收集上清液。

1.6.4 表达纤维二糖水解酶 II 的活性测定:酶活性测定基本采用 Ghos 法^[7]。称取 4mg 脱脂棉,加入 0.1mL 适当稀释的酶液、0.1mL 50mmol/L pH 5.0 醋酸缓冲液混合后,50℃ 下保温 24h,加入 0.1mL DNS 试剂测定还原糖量。

一个酶活力单位(u)定义为:每小时水解纤维素产生 1 μ mol 葡萄糖所需酶量。

1.7 重组毕赤酵母表达产物的分析及特性研究

1.7.1 表达产物纤维二糖水解酶的 SDS-PAGE 电泳:重组毕赤酵母在 BMMY 诱导培养的过程中,每隔 24h 取上清液 50 μ L,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分析重组蛋白的表达情况;收集培养 144h 的上清液进行蛋白纯化和性质研究。

1.7.2 酶的分离纯化:将提取的上清液用 70% 饱和度的硫酸铵沉淀 24h 后,8000r/min 离心 20min,收集沉淀,用适量的缓冲液 A (50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 值为 8.0)回溶,并在相同的缓冲液中透析 24h,8000r/min 离心 10min,取上清液。将上清液施于经缓冲液 A 平衡好的 DEAE-Sepharose 柱(1.0cm \times 20cm,凝胶为 Pharmacia 产品),酶蛋白先用 5 倍柱床体积的缓冲液 A 洗脱至 A_{280} 不变后,再用 100mL 缓冲液 A 和 100mL 含 0.3mol/L NaCl 的相同缓冲液溶液进行线形梯度洗脱,流速为 2.4mL/min,2.5min 收集 1 管。将每管进行活性测定和 SDS-PAGE 电泳检测纯度。

1.7.3 纤维素酶表达的遗传稳定性:将筛选得到的酶活性最高的酵母工程菌在 YPD 平板上划线,取单菌落连续传代 10 次后,进行重组纤维素酶基因的 PCR 检测和表达产物的生物学活性研究。

1.8 重组纤维二糖水解酶Ⅱ的生物学特性

1.8.1 重组纤维二糖水解酶Ⅱ的反应最适温度及热稳定性:不同温度下(30℃、40℃、50℃、60℃、70℃)测酶活性,得出酶的最适反应温度;将重组蛋白在不同温度(50℃、60℃、70℃)下保温处理不同时间(10min、20min、30min、40min、50min、60min)后,立即在 0℃冰浴中冷却,然后检测剩余酶活。

1.8.2 重组酶的最适 pH:在不同 pH 值缓冲液中测定重组纤维二糖水解酶Ⅱ的酶活,检测酶作用的最适 pH 值。

2 结果与分析

2.1 以嗜热毛壳菌总 RNA 为模板进行 RT-PCR ,获得约 700bp 的片段,与预期大小相符

根据测定的片段序列设计特异引物,利用 SMART RACE 法进行 3'RACE 和 5'RACE,分别获得长度约为 1000bp 和 750bp 的片段。将目的带切胶纯化后 T/A 克隆测序结果表明,3'RACE 和 5'RACE 的插入片段长 1052bp 和 740bp。将 RT-PCR,3'RACE 5'RACE 产物的序列进行拼接,拼接的序列长 1737bp(图 1)。为了验证各片段来自同一基因,在起始密码子上游和终止密码子下游分别设计引物进行 PCR,得到约 1700bp 的 DNA 片段,测序结果与拼接结果完全一致。该基因的 GenBank 检索号为 AY861348。

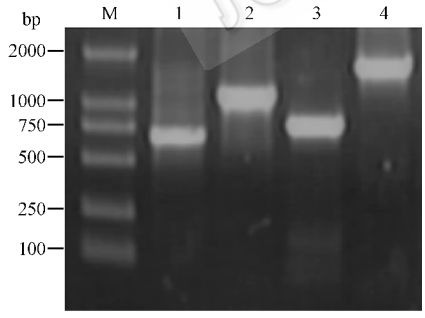


图 1 嗜热毛壳菌 *cbh2* 基因扩增电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of *cbh2* gene and electrophoresis of the PCR product

M : DL2000 DNA marker ; 1 : PCR amplification of *cbh2* fragment ; 2 : 3' RACE results ; 3 : 5' RACE results ; 4 : full length of the *cbh2* gene .

序列分析表明该基因具有真菌纤维二糖水解酶Ⅱ典型的序列特征,属于糖苷水解酶第六家族,具有第六家族纤维素酶的催化保守序列,一段位于第 198 与 214 个氨基酸之间的 VVYDLPDRDCAAAASNG,另一段位于第 246 与第 255 个氨基酸之间的 ILVIEPDSL(图 2)。推断的信号肽序列位于 1 ~ 17 个氨基酸,Ala(17)后有一个推断的剪切位点^[8]。其

成熟肽有一段糖结合域(CBD)通过一段富含脯氨酸(Pro)和羟基氨基酸(Ser ,Thr)的接头区与催化域相连^[2]。CBD 由 32 个氨基酸残基组成,位于 N 端,这与其它丝状真菌的 CBHⅡ相似。CBD 包含 5 个半胱氨酸和 5 个芳香族氨基酸残基(2 个色氨酸,3 个酪氨酸)^[9]。

2.2 成熟蛋白编码序列的克隆及毕赤酵母重组载体的构建

以添加了酶切位点的特异引物 C1 和 C2 扩增 *cbh2* 成熟蛋白编码基因,回收 PCR 产物并与 pMD18-T 载体连接,转化感受态 DH5 α ,得到重组质粒 pMD-T/*cbh*。测序得到一段长为 1377bp 的基因序列,与 2.1 扩增得到的基因序列完全一致。用 *Eco*RⅠ 和 *Not*Ⅰ 双酶切重组质粒 pMD-T/*cbh*,相同的限制性内切酶双酶切酵母分泌型表达质粒 pPIC9K。回收并纯化 *cbh2* 成熟蛋白编码基因及酶切得到的 pPIC9K 载体片段。T4 DNA 连接酶连接回收的片段,后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,获得重组质粒 pPIC9K/*cbh*,进行酶切鉴定,*Eco*RⅠ 和 *Not*Ⅰ 双酶切得到的片段长度与预期结果相符(图 3)。

2.3 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

转化受体菌毕赤酵母经 MM 和 MD 平板筛选后,挑选酵母转化子提取基因组 DNA 进行进一步 PCR 鉴定(图 4),筛选到多株重组酵母菌。将重组酵母菌点种到含 0.25mg/mL, 0.5mg/mL, 0.75 mg/mL, 1.0mg/mL, 1.5mg/mL, 2.0mg/mL, 2.5mg/mL, 3.0mg/mL G418 的 YPD 平板上,在含有 3.0 mg/mL G418 的平板上筛选到 26 个转化子(> 12 拷贝)。分别选取各 G418 抗性水平的酵母工程菌株(共 20 株)接种到 25mL BMGY 的培养基中,菌体生长 48h 后转入 200mL BMMY 培养基中进行诱导表达。分别取诱导培养的上清液进行活性检测,发现各转化子都具有纤维二糖水解酶活性,其中筛选出一株抗 3.0mg/mL 水平 G418 的酵母工程菌培养 144h 后活力最高,该菌株命名为 PGS-D。

2.4 重组表达产物的分离纯化及生物学特性

将获得的重组工程菌株 PGS-D 甲醇诱导培养,每隔 24h 收集酶液,各取 25 μ L 粗酶液 SDS-PAGE 电泳分析重组酶表达情况,结果得知重组纤维二糖水解酶的表达量随着时间的增加而增高,诱导 144h 后表达量达到最高,随后保持稳定不再增加(图 5)。检测重组蛋白的活性,诱导 144h 后酶活力达到最高 30u/mL。

1 CAGCACAACAGAGTCAAGACAAGCTTGGTCGCTCTTGTGTCAGAAGTTCATCTATGTCTCAA
61 CCCCCGGTCTGAGTATTTCGGGATCTGCATGGCTAAGCAGCTGCTGCTACTGCCGCTCTT
1 M A K Q L L L T A A L
121 GCGGCCACTTCGCTGGCTGCCCTCTCCTTGAGGAGCGCCAGAGCTGCTCCTCGTCTGG
12 A A T S L A A P L L E E R Q S C S S V W
181 GGTCAATGCGGTGGCATCAATTACAACGGCCCGACCTGCTGCCAGTCCGGCAGTGTTTGC
32 G Q C G G I N Y N G P T C C Q S G S V C
241 ACTTACTGTAAGTACTGGTACAGCCAGTGCATTCCCGGTCAGGCTCAGCCGCGCACGAC
52 T Y L N D W Y S Q C I P G Q A Q P G T T
301 AGCACCACGGCTCGGACCACCAGCACCAGCACCAGCACTTCGTCGGTCCGCCCCGACC
72 S T T A R T T S T S T S T S S V R P T
361 ACCTCGAATAACCCCTGTGACGACTGCTCCCCGACGACCACCATCCCGGCGCGCCTCG
92 T S N T P V T T A P P T T T I P G G A S
421 AGCAGGCCAGCTACAACGGCAACCCGTTCTCGGGTGTCCAACCTTTGGGCCAACACCTAC
112 S T A S Y N G N P F S G V Q L W A N T Y
481 TACTCTCGAGGTGCACACTTTGGCCATCCCGAGCTTGTCTCCTGAGCTGGCTGCCAAG
132 Y S S E V H T L A I P S L S P E L A A K
541 GCGCCAAGGTGCTGAGGTTCCAGCTTCCAGTGGCTCGACCGCAATGTGACTGTTGAC
152 A A K V A E V P S F Q W L D R N V T V D
601 ACTCTCTTCCGGAACCTTGGCGAAATCCGCGCGCCAACCAACCGCGGTGCCAACCCG
172 T L F S G T L A E I R A A N Q R G A N P
661 CCTTATGCCGGCATTTTCGTGGTTTATGACTTACCAGACCGTGATTGCGCGGTGCTGCT
192 P Y A G I F V V Y D L P D R D C A A A
721 TCGAACGGCGAGTGGTCTATCGCCAACAATGGTGCCAACAACCTACAAGGCTCATCGAC
212 S N G E W S I A N N G A N N Y K R Y I D
781 CGGATCCGTGAGCTCCTTATCCAGTACTCCGATATCCGCACTATTCTGGTCATTGAACCT
232 R I R E L L I Q Y S D I R T I L V I E P
841 GATTCCCTGCGCAACATGGTCACCAACATGAACGTCCAGAAGTGTCTGAAGCTGCTCC
252 D S L A N M V T N M N V Q K C S N A A S
901 ACTTACAAGGAGCTTACTGTCTATGCCCTCAAACAGCTCAATCTTCTCTACGTTGCCATG
272 T Y K E L T V Y A L K Q L N L P H V A M
961 TACATGGATGCTGGCCACGCTGGCTGGCTGGCTGGCCGCAACATCCAGCCTGCTGCT
292 Y M D A G H A G W L G W P A N I Q P A A
1021 GAGCTCTTTGCTCAAATCTACCGCGACGCTGGCAGGCCGCTGCTGTCGCGGTCTTGCG
312 E L F A Q I Y R D A G R P A A V R G L A
1081 ACCAACGTTGCCAACTACAATGCTTGGTCGATCGCCAGCCCTCCGTCCTACACCTCTCCT
332 T N V A N Y N A W S I A S P P S Y T S P
1141 AACCCGAACCTACGACGAGAAGCACTATATTGAGGCCTTTGCTCCTCTTCTCCGAACCA
352 G N P N Y D E K H Y I E A F A P L L R N Q
1201 GGCTTCGACGCAAGTTCATCGTCGACACCGGCGTAACGGCAAGCAGCCCACTGGCCAG
372 G F D A K F I V D T G R N G K Q P T G Q
1261 CTGGAATGGGCTCACTGGTGAATGTCAAGGGAACCTGGCTTCGGTGTGCGCCCTACTGCT
392 L E W G H W C N V K G T G F G V R P T A
1321 AACACTGGGCGATGAAGTGTGATGCTTTCGTTGGGTCAAGCCCGGTGGCGAGTCGAC
412 N T G H E L V D A F V W V K P G G E S D
1381 GGCACCAGCGACACCAGCGCTGCTCGTTATGACTATCACTGCGGCCCTTCCGACGCACTG
432 G T S D T S A A R Y D Y H C G A L S D A L
1441 ACTCCGGCGCTGAGGCTGGCCAATGGTTCAGGCTTATTTCGAACAGCTGCTCATCAAT
452 T P A P E A G Q W F Q A Y F E Q L L I N
1501 GCCAACCCCTCCGTTCTGAACGGAAGCGAGATACCGGAAGGCGGTGAGAAGAGCGGAATT
472 A N P P F *
1561 CAAGTCTCTGCTTATCAAAATCCACTACCAAGTGGATTAAAGCGGATTATACATCTGA
1621 GAAACAACCTGCTTTAAACTCTTCTGTACATATTTCACTTCGAGACGTGCCTCTTTCTC
1681 AGGAGCACTGTAGATAACAATATATCTGTACATTTCTGCAAAAAAAAAAAAAA

图2 嗜热毛壳菌纤维二糖水解酶 CBH II 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid and the relevant features of *C. thermophilum* CT2 *cbh2* gene
The CBD sequence is boxed. The glycosyl hydrolases family 6 signature patterns are underlined. Stop codon is denoted by an asterisk.

将培养 144h 的上清液 (NH₄)₂SO₄ 分级沉淀 ,用
缓冲液回溶透析后得到 50mL 的粗酶液 ,施于相同的
缓冲液平衡的阴离子交换柱 ,进行离子交换层析 ,
得到纯化的重组蛋白。取 20μL 纯酶液 SDS-PAGE
电泳 ,以空载体转化的毕赤酵母发酵产物为对照。
电泳结果表明 ,表达的纤维二糖水解酶 II 分子量为
67kD (图 6) ,与本实验室从嗜热毛壳菌中纯化得到的
纤维二糖水解酶一致 (67kD ,待发表) 。重组菌株

经过继代培养连续 10 次后 ,提取基因组 DNA 进行
PCR 鉴定 ,发现连续多次传代后纤维二糖水解酶基
因 (*cbh2*) 仍然稳定的整合在 PGS115 基因组中 ,且重
组纤维二糖水解酶 II 的表达量基本保持稳定。重组
纤维二糖水解酶 II 作用的最适温度为 50℃ ,最适
pH 为 4.0 (图 7) ,在 70℃ 保温处理 30min 后还保持
50% 相对酶活性 (图 8) ,表现了较高的热稳定性。

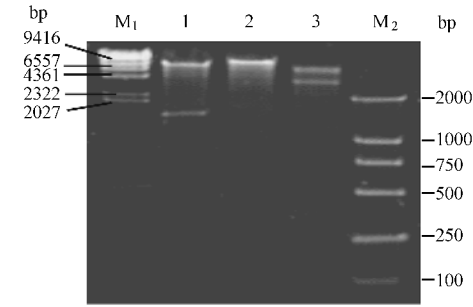


图 3 pPIC9K/cbh 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid pPIC9K/cbh M1 λ -Hind III digest DNA marker ; 1. pPIC9K/cbh EcoR I + Not I digestion (9276bp + 1377bp); 2. pPIC9K/cbh EcoR I digestion (10653bp); 3. pPIC9K/cbh EcoR I + Nco I digestion (6866bp + 3787bp); M2 : DL2000 DNA marker.

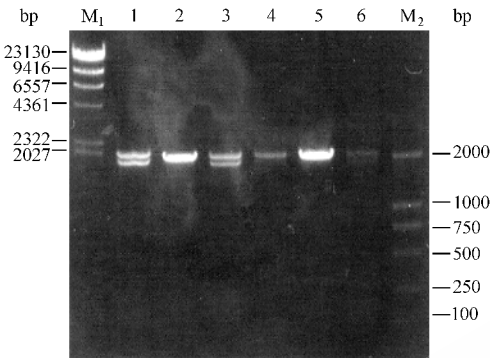


图 4 酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant *P. pastoris* by PCR 1 - 6 : PCR product of the recombinant yeast genomic DNA amplified with 5' AOX1 primer and 3' AOX1 primer ; Lane 1 , 3 , 6 shows recombinant yeast contain insert and the wild-type AOX1 gene (2.2kb); Lane 2 , 4 , 5 shows the recombinant yeast contain no insert (only the wild-type AOX1 gene); M1 λ -Hind III digest DNA marker M2 : DL2000 DNA marker.

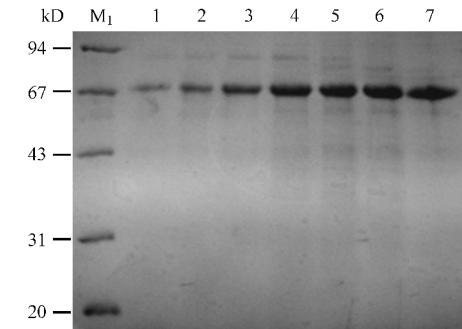


图 5 酵母工程菌 PGS-D 不同诱导时间表达 纤维二糖水解酶的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of CBH II expression level at different induction times for *Pichia* PGS-D strain

M1 :Protein molecular weight markers ; 1-7 : cbh2 expression induced 24h , 48h , 72h , 96h , 120h , 144h , 168h respectively .

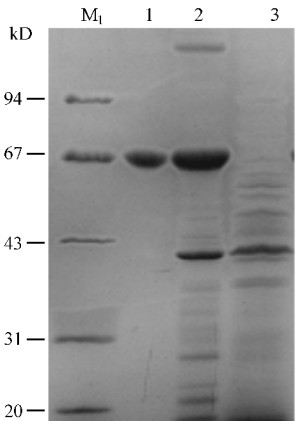


图 6 纯化的重组纤维二糖水解脱酶 II 的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of the purified recombinant CBH II M1 :Protein molecular weight markers ; 1 :The purified expressed CBH II ; 2 :Crude extract ; 3 :Medium supernatant of negative control (GS115/ pPIC9K induced 144h).

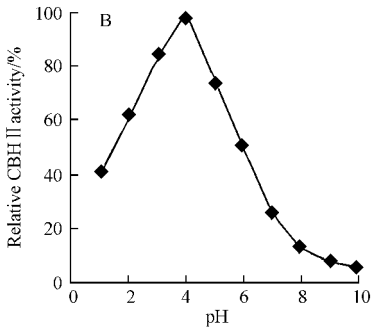
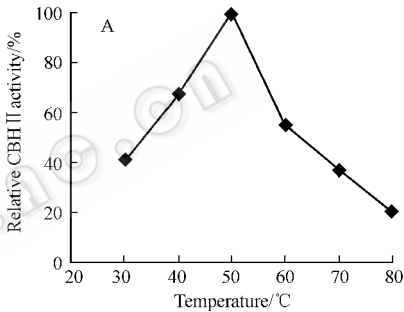


图 7 表达纤维二糖水解脱酶的最适反应温度和最适 pH

Fig. 7 Effect of temperature (A) and pH (B) on activity of the purified cellobiohydrolase II from the recombinant *P. pastoris* strain

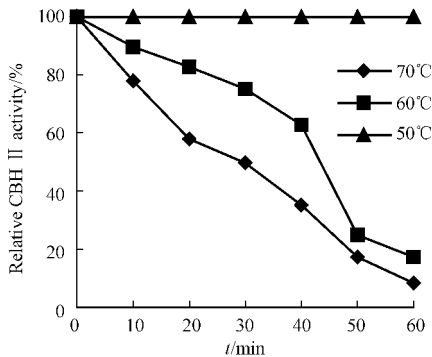


图 8 表达纤维二糖水解脱酶的热稳定性

Fig. 8 Thermostability of the purified cellobiohydrolase II of the recombinant *P. pastoris* strain

3 讨论

自然界中产生纤维素酶的微生物很多,目前人们对纤维素酶的研究多以中温真菌木霉为主,嗜热真菌同样能产生纤维素酶,而且产生的纤维素酶热稳定性高。本实验室已经研究并纯化了嗜热毛壳菌纤维素酶的各个组分^[6,10,11],并且已经证明各个组分都具有较高的热稳定性,因此与中温真菌相比,嗜热真菌产生的纤维素酶更具有工业开发优势。

纤维二糖水解酶Ⅱ在糖苷水解酶家族中占据了重要地位,被划为第六家族中^[12],分析比较这个家族所有真菌的纤维素酶基因,发现有两段比较保守的氨基酸序列。我们根据这两段序列设计一对引物成功扩增了嗜热毛壳菌的纤维二糖水解酶基因片段,此片段与其它真菌 *cbh2* 的同源性较高,此后以此片段为探针设计特异引物,通过 RACE 法扩增 cDNA,获得了纤维二糖水解酶Ⅱ基因的全长克隆。这种策略的成功应用启示我们,可以用此保守引物克隆其它丝状真菌的纤维二糖水解酶Ⅱ基因。

纤维二糖水解酶Ⅱ是纤维素酶的重要组分,目前从嗜热真菌中获取纤维素酶主要是在以纤维素为底物的液体培养基中诱导产生的。然而通过这种方式获取的纤维二糖水解酶的比活力仅为 0.12u/mg,产量和活性较低,效率不高。我们从嗜热毛壳菌中克隆了纤维素酶(CBHⅡ)的基因,利用重组毕赤酵母表达纤维素酶。获得的酵母工程菌在摇瓶中发酵 144h 后蛋白表达量超过 1.2mg/mL,酶活性为 30 u/mL,比活力达 25u/mg,是出发菌株的 200 倍;与从嗜热毛壳菌发酵产酶相比,重组毕赤酵母发酵获得的粗酶液中纤维素酶的含量和活性都很高,实现了外源基因在毕赤酵母中的高效表达,而且毕赤酵母产生的自身分泌蛋白很少,使分离纯化步骤比较简单(图 6)^[13,14]。与从嗜热毛壳菌中纯化的纤维二糖水解酶性质相似,重组酶的最适反应温度范围为 45℃~55℃,最适 pH 值在 3.5~4.5 之间,酸性条件下较稳定。表达的纤维二糖水解酶Ⅱ的热稳定性较高,在 50℃保温一周后酶活基本不损失,65℃的半衰期是 40min,70℃保温 30min 还具有 50% 的酶活力,高于其它嗜热真菌: *Humicola insolens*(65℃, $t_{1/2}$ = 5min)^[15], *Thermoascus aurantiacus*(50℃, $t_{1/2}$ = 8h)^[16]。重组毕赤酵母发酵产生的热稳定纤维二糖水解酶对于在较高温度下催化降解纤维素具有重要意义,一方面嗜热酶催化反应的条件下(超过 50℃)很少有杂菌污染,从而减少了细菌代谢产物对产品的污染,

可提高产物的纯度;另一方面酶制剂的工业生产成本降低,稳定性提高,可以在室温下分离提纯和贮藏运输,延长了货架寿命。

毕赤酵母是一种甲醇营养型酵母,作为一种较为理想的表达胞内和胞外源蛋白的真核蛋白表达系统具有很多优点^[18]。一方面,它能进行蛋白翻译后的修饰,包括糖基化修饰,有助于表达蛋白的活性和对蛋白酶的抗性,从本实验的结果看,通过酵母表达获得的纤维二糖水解酶Ⅱ与从嗜热毛壳菌纯化得到的该酶分子量一致,比通过氨基酸序列计算得到的蛋白分子量 53kD 大,可能是外源蛋白翻译后糖基化修饰的结果;另一方面,毕赤酵母在发酵过程中可以忍受高密度的菌体,重组工程菌能稳定的表达外源蛋白。因此利用毕赤酵母表达系统来表达纤维二糖水解酶是合适的。本项工作为进一步利用和开发纤维二糖水解酶,并解析其结构与功能的相互关系奠定了基础。已经开始对纯化的重组纤维素酶进行晶体学研究,随后的研究将做进一步的报道。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Coughlan MP. Cellulose degradation by fungi. In: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2nd edn. Elsevier Science Publishers: London and New York, 1990, pp. 1-36
- [2] Tome P, Warren RAJ, Gilkes NR. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv Microbial Physiol*, 1995, **37**: 3-81
- [3] Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol*, Adv. 1997, **15**: 583-620
- [4] Teeri TT. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech*, 1997, **15**: 160-167
- [5] Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology*, Reviews. 2000, **64**: 461-488
- [6] Li D C, Lu M, Li Y L et al. Purification and characterization of an endocellulase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2. *Enzymes and Microbial technology*, 2003, **33**: 932-937
- [7] Ghose TK. Measurement of cellulase. *Pure and Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257-268
- [8] Duvand H. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microb Technol*, 1984, **16**: 175-180
- [9] Gildes NR, Henrissat B, Kilburn DG et al. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence, conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev*, 1991, **55**(2): 303-315
- [10] Chu CX(楚春雪), Li DC(李多川), Guo RF(郭润芳). Purification and properties of an α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum*. *Microbiology and Biotechnology*, 2004, **23**(3): 379-402

- [11] Lu M(路梅), Li D(李多川). Studies on liquid-state fermentation for and properties of cellulase from *Chaetomium thermophile*. *Industrial Microbiology*, 2003, **33**(3) 21 – 24
- [12] Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S *et al.* Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5674
- [13] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Option in Biotechnology*, 1995, **6**(5) 527 – 533
- [14] Streekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE *et al.* Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**(1) 55 – 62
- [15] Hayashida S, Ohta K, Mo K. Cellulases of *Humicola insolens* and *Humicola grisea*. *Methods Enzymol*, 1988, **160**: 675 – 678
- [16] Khandke KM, Vithayathil PJ, Murthy SK. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **274**: 491 – 500
- [17] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expressing in yeast. *Review, Yeast*, 1992, **8**(6) 423 – 488