

应用纤维素结合域标签构建谷氨酸棒状杆菌表达系统

赵志敬, 蒋欢, 沈文婷, 宋淑滢, 胡广

北大工学院绍兴技术研究院 生物工程中心, 浙江 绍兴 312000

赵志敬, 蒋欢, 沈文婷, 等. 应用纤维素结合域标签构建谷氨酸棒状杆菌表达系统. 生物工程学报, 2013, 29(5): 691-694.
Zhao ZJ, Jiang H, Shen WT, et al. Cost-effective production of protein by using cellulose-binding domain fusion tag in *Corynebacterium glutamicum*. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 691-694.

摘 要: 为优化谷氨酸棒状杆菌表达系统的纯化工艺, 合成里氏木霉的 CBD 基因, 将其与谷氨酸棒状杆菌分泌表达载体 pXMJ19-sp 连接, 构建以 CBD 为纯化标签的重组载体 pXMJ19-sp-CBD。在该载体中插入 GFP 基因并转化至谷氨酸棒状杆菌, 可获得分泌表达融合蛋白 GFP-CBD 的重组菌。该菌经 IPTG 诱导后的发酵液在紫外灯下显示强烈的绿色荧光, 重组蛋白的分泌表达量达 200 mg/L。利用 CBD 标签对纤维素柱的可逆性吸附, 可直接对谷氨酸棒状杆菌分泌到培养基中的重组蛋白进行纯化, 从而简化工艺和降低成本, 为工业化大生产奠定基础。

关键词: 纤维素结合域, 谷氨酸棒状杆菌, 表达纯化, 绿色荧光蛋白

Cost-effective production of protein by using cellulose-binding domain fusion tag in *Corynebacterium glutamicum*

Zhijing Zhao, Huan Jiang, Wenting Shen, Lianyan Song, and Guang Hu

Bioengineering Center, Shaoxing Institute of Technology, College of Engineering, Peking University, Shaoxing 312000, Zhejiang, China

Abstract: The CBD gene from *Trichoderma reesei* was cloned into the *Corynebacterium glutamicum* secretion expression vector pXMJ19-sp, in which green fluorescent protein was inserted to obtain pXMJ19-sp-GFP-CBD. After induced by 0.5 mmol/L IPTG, GFP-CBD was expressed in *Corynebacterium glutamicum* at high level of 200 mg/L. The GFP-CBD could be purified to high purity with cellulose column. The results indicated CBD can be successfully used in *Corynebacterium glutamicum* expression system and thus offer an extremely simple, effective and scalable way for production of recombinant proteins.

Keywords: cellulose-binding domain, *Corynebacterium glutamicum*, expression and purification, GFP

谷氨酸棒状杆菌是非病原性的革兰氏阳性菌, 常被用于生产多种氨基酸^[1]。经多年改造, 有望用于大规模的蛋白生产^[2]。以它为表达宿主有以下优势: 1) 高效的分泌信号肽及分子伴侣系统使所分

Received: December 14, 2012; **Accepted:** February 21, 2013

Supported by: Science and Technology Plan Program of Shaoxing City (No. 2011A21008).

Corresponding author: Guang Hu. Tel: +86-575-88179263; Fax: +86-575-88179278; E-mail: hug@ie.pku.edu.cn

绍兴市科技计划项目 (No. 2011A21008) 资助。

网络出版时间: 2013-04-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130410.1001.002.html>

泌的重组蛋白大多具有生物活性^[3]; 2) 除常规分泌途径外, 还可通过双精氨酸易位途径进行分泌^[4]; 3) 不产生内毒素, 安全性好; 4) 分泌的蛋白酶少, 产物稳定^[3]; 5) 人们积累了丰富的发酵经验, 所以这是一种非常优良的工程菌株。

CBD 是纤维素酶的一个蛋白域, 含若干可吸附至纤维素表面的疏水区, 能提高纤维素酶活^[5]。亲和标签是纯化重组蛋白的常用方法, 而 CBD 标签较为独立的空间结构对蛋白性能的干扰小, 且它的吸附填料——纤维素成本低廉^[6]。近年来已有研究开始应用 CBD 为纯化标签进行蛋白纯化^[7]。

在谷氨酸棒状杆菌的表达系统中, 分泌到胞外的蛋白可通过离心、透析、浓缩或亲和层析等方法获得。但它们所使用的缓冲液及亲和树脂的高成本会加大蛋白纯化代价。本研究应用 CBD 标签优化谷氨酸棒状杆菌表达系统的纯化工艺, 试图降低生产成本。首先, 合成里氏木霉的外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I 的 CBD 基因并插入至谷氨酸棒状杆菌分泌表达载体, 获得以 CBD 为纯化标签的重组载体; 然后, 在该载体中插入 GFP 基因并转化至谷氨酸棒状杆菌进行融合蛋白 GFP-CBD 的表达; 最后, 利用 CBD 标签对纤维素柱的可逆性吸附, 对发酵液中的目的蛋白进行纯化, 实现蛋白生产工艺的优化, 为大规模生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和试剂

谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum* 13032、质粒 pXMJ19-sp 由天津科技大学的路福平教授提供; 质粒 pMXS-IRES-GFP 为实验室自有; 纤维素填料 Avicel PH-102NF 购自 FMC Biopolymer。

1.1.2 培养基

LB 培养基和 MMTG 培养基^[8]。

1.1.3 序列合成

参考 Van 等的 CBD 序列^[9], 由公司合成并插入至克隆载体 pGS3 形成 pGS3-CBD, 序列如图 1 所示:

```

ACCGGT(Age I) 1 GGTACCGGAAATCCGAGCGGAGGTAATCCACCCGAGGAAATGCGGCAACGACAACC
1 G T G N P S G G N P P G G N R G T T T T
61 CGTAGACCAAGCTACCAAGCTGGAAGTTCTCTGGCCGACTCAGAGTCATTACGGGAG
21 R R P A T T T G S S P G P T Q S H Y G Q
121 TGCGGCGGGATAGGTTATAGTGGCCCAACAGTTTGTGTGCGTACGACCTGCCAGGTG
41 C G G I G Y S G P T V C A S G T T C Q V
181 CTTAATCCTTATTATAGTCAGTGTCTGTAG CTGCAG (Pst I)
61 L N P Y Y S Q C L End
  
```

图 1 经密码子优化后的 CBD 序列

Fig. 1 CBD sequence after code optimization.

1.2 方法

1.2.1 构建 CBD 标签的谷氨酸棒状杆菌表达载体

试验流程如图 2 所示: *Age* I 和 *Pst* I 双酶切质粒 pGS3-CBD 并将目的基因 CBD 连接至 pXMJ19-sp, 构建以 CBD 为纯化标签的谷氨酸棒状杆菌表达载体 pXMJ19-sp-CBD。

1.2.2 GFP 表达载体的构建

带 CBD 标签的 GFP 表达载体: 以 pMXS-IRES-GFP 为模板, GF (5'-CGCTCGAGATGGTGAGCAA GGGCGAGGAG-3'), GR1 (5'-AAAAACCGGTCTT GTACAGCTCGTCCATG-3') 为引物, PCR 扩增不含终止子的 GFP 片段, 然后用 *Xho* I 和 *Age* I 双酶切连接至表达载体 pXMJ19-sp-CBD 形成以 CBD 为纯化标签的 GFP 表达载体 pXMJ19-sp-GFP-CBD。

带 polyHis 标签的 GFP 表达载体: 以 pMXS-IRES-GFP 为模板, 上述 GF 和 GR2 (5'-TGA CCTGCAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGCTTGT ACAGCTCGTCCATG-3') 为引物, PCR 扩增 GFP-His 片段并用 *Xho* I 和 *Pst* I 双酶切连接至 pXMJ19-sp, 构建以 polyHis 为纯化标签的 GFP 表达载体 pXMJ19-sp-GFP-His。

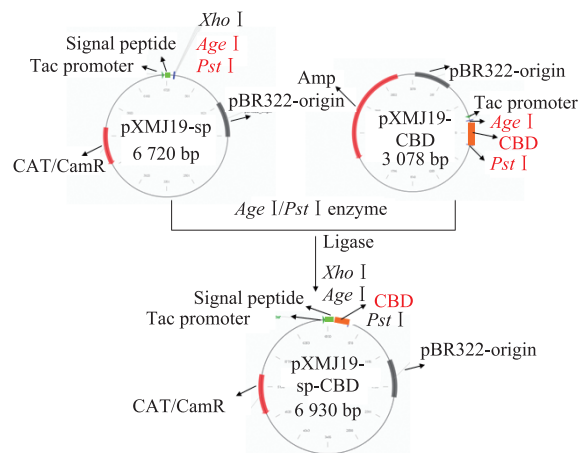


图 2 pXMJ19-sp-CBD 的构建流程图

Fig. 2 Construction of pXMJ19-sp-CBD.

1.2.3 谷氨酸棒状杆菌的转化及表达

参考 Van 等的方法进行质粒的谷氨酸棒状杆菌电转化^[10], 并在 MMTG 培养基中进行分泌表达。

1.2.4 蛋白纯化

粗提取: 发酵液离心所得上清即为蛋白粗液。

镍柱纯化: 30 mL 蛋白粗液添加终浓度 400 mmol/L NaCl 后上样至经磷酸缓冲液预平衡的 0.5 mL 镍柱, 以含 10、20 和 250 mmol/L 咪唑的磷酸缓冲液洗脱 10、3 和 5 mL, 收集各步骤液体。

纤维素柱纯化: 在蛋白粗液中添加终浓度 1 mol/L 的硫酸铵后上样至预平衡的 0.5 mL 纤维素柱, 分别用 1、0.5 和 0 mol/L 硫酸铵溶液洗脱 10、3 和 5 mL, 收集各步骤液体。

2 结果与分析

2.1 CBD 标签的谷氨酸棒状杆菌表达载体构建

将质粒 pGS3-CBD 的 CBD 基因克隆至 pXMJ19-sp, 如图 3A 所示: 双酶切的鉴定结果证明已经成功获得以 CBD 为纯化标签的 pXMJ19-sp-CBD。

2.2 GFP 分泌表达载体的构建

将 1.2.2 所得 GFP-His 和 GFP 基因分别克隆至 pXMJ19-sp 和 pXMJ19-sp-CBD, 如图 3B 所示: 双酶切的鉴定结果显示已成功获得 GFP 的分泌表达载体 pXMJ19-eGFP-His 和 pXMJ19-eGFP-CBD。

2.3 重组菌的构建与表达

将上述载体分别转化至谷氨酸棒状杆菌感受态细胞构建重组菌 *C. glutamicum*-pXMJ19-sp, *C. glutamicum*-pXMJ19-sp-GFP-His, *C. glutamicum*-

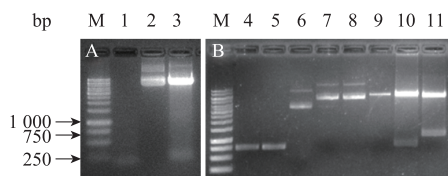


图3 载体的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction map of recombinant vector. M: DNA marker; 1: CBD gene; 2: pXMJ19-sp-CBD; 3: pXMJ19-sp-CBD-Age I-Pst I; 4: GFP-His; 5: GFP; 6: pXMJ19-sp; 7: pXMJ19-sp-GFP-His; 8: pXMJ19-sp-GFP-CBD; 9: pXMJ19-sp-His-Xho I; 10: pXMJ19-sp-GFP-CBD-Xho I-Pst I; 11: pXMJ19-sp-CBD-Age I-Pst I.

pXMJ19-sp-GFP-CBD。在 MMTG 培养中诱导表达 3 d 后离心, 所得上清如图 4B 所示: 在紫外灯下显示强烈的绿色荧光。蛋白粗液的 SDS-PAGE 分析如图 4C 所示: 所诱导表达的 GFP-His 和 GFP-CBD 约 30 kDa, 这与理论计算值 (28 kDa 和 33 kDa) 一致, 经 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测, 可估算该重组蛋白的分泌表达量约 200 mg/mL。

2.4 蛋白纯化

蛋白粗液的镍柱纯化结果如图 4D 所示, 通过镍柱纯化可获得纯度达 90% 的目的蛋白, 经 BCA 法检测可知其浓度为 1.48 mg/mL, 回收率达 78%, 镍柱对该蛋白的吸附能力达 8.8 mg/mL; 蛋白粗液的纤维素柱纯化结果如图 4E 所示: 纤维素柱纯化可获得 90% 以上纯度的目的蛋白, 经 BCA 法检测可知其浓度为 1.40 mg/mL, 回收率达 60%, 纤维素柱对该蛋白的最大吸附能力为 8.4 mg/mL。

吸附在纤维素柱上的重组蛋白可被纯水洗脱, 如图 4F 所示: 肉眼即可观察到目的蛋白在柱上的移动, 而没有 CBD 标签的蛋白则不会出现这个现象。

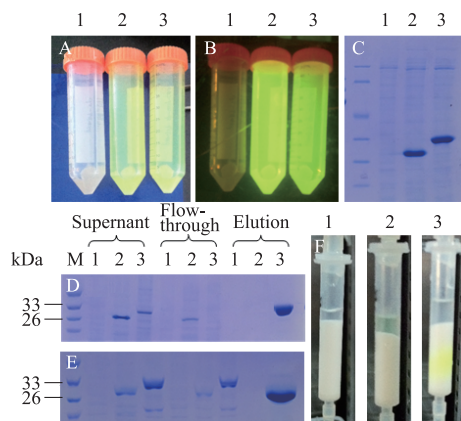


图4 重组蛋白 eGFP-His, eGFP-CBD 的分泌表达纯化
Fig. 4 Secretion and purification of recombinant pXMJ19-GFP-His and pXMJ19-GFP-CBD in *C. glutamicum*. 1: pXMJ19; 2: pXMJ19-GFP; 3: pXMJ19-GFP-CBD. (A, B) Fermentation broth under white/UV light. (C) SDS-PAGE analysis of secretion protein after dialysis. (D, E) Separation on Ni/cellulose matrices. (F) Separation of protein on a cellulose matrix.

3 讨论

由于产内毒素和易形成包涵体, 大肠杆菌无法达到食品级用酶的生产要求, 而谷氨酸棒状杆菌无

此局限。日本味之素公司新开发的谷氨酸棒状杆菌表达系统专门用于表达大肠杆菌难以生产的蛋白^[11]。刘凯等通过谷氨酸棒状杆菌分泌谷氨酰胺转氨酶, 所得培养基具有交联酪蛋白活性, 说明该系统有望实现食用蛋白的大规模生产^[12]。

本研究首次以 CBD 标签为谷氨酸棒状杆菌表达系统的纯化标签, 旨在优化其生产工艺。参考谷氨酸棒状杆菌信号肽筛选的结果, 所选用的信号肽为 cgR 蛋白信号肽^[13]。融合蛋白的分泌量达 200 mg/L, 而且有研究表明不同的谷氨酸棒状杆菌的分泌表达能力不同。本研究使用的 *C. glutamicum*13032 并不是最高效的分泌表达菌株, 例如 *Corynebacterium callunae*15991、13870、CC13826 的分泌表达能力均在其之上, 所以选择合适的菌株将有助于进一步提高分泌表达量^[14]。

本研究所分泌表达的 GFP-CBD 可在 1 mol/L 的硫酸铵存在下吸附在纤维素柱上, 之后在纯水条件下被洗脱, 且纯化效果与镍柱纯化相当。其中分泌到培养基中的 GFP-CBD 为可溶性蛋白, 在紫外灯下显示绿色荧光, 说明与 CBD 融合表达并没有影响 GFP 的正确折叠。Romas 等通过融合表达 CBD 简化抗菌肽 LL37 的纯化, 所得抗菌肽具抗菌活性, 说明 CBD 较为独立的空间结构对蛋白的活性影响较小^[15]。

该方法所用填料应选择孔径较小的微晶纤维素。Naohisa 等用的 80 μm 微晶纤维素, 其吸附能力达 15 mg/mL, 而本研究的 PH-102NF 为 150 μm 的微晶纤维素有 8 mg/mL 的吸附能力, 均比 Whatman 公司的大孔径纤维素粉 CF1、CC31 和 CC41 (0.54、0.89 和 1.4 mg/mL) 要强^[16]。但相较于传统的镍柱, 在性价比上已经高出很多, 且所用缓冲液 (硫酸铵) 和洗脱液 (蒸馏水) 相对便宜, 操作简便。所以以 CBD 为纯化标签的谷氨酸棒状杆菌表达系统既解决原核表达中内毒素问题, 又降低纯化过程中由于亲和树脂及缓冲液造成的高成本, 为实现谷氨酸棒状杆菌在大规模工业化生产奠定坚实的基础。

REFERENCES

- [1] Huser AT, Chassagnole C, Lindley ND, et al. Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(6): 3255–3268.
- [2] Burkovski. *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008: 31–45.
- [3] Lothar Eggeling MB. *Handbook of Corynebacterim glutamicum*. Boca Rotan: Caister Academic Press, 2005: 91–95.
- [4] Meissner D, Vollstedt A, van Dijk JM, et al. Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(3): 633–642.
- [5] Gilkes NR, Warren RA, Miller RC, et al. Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J Biol Chem*, 1988, 263(21): 10401–10407.
- [6] Shoseyov O, Shani Z, Levy I. Carbohydrate binding modules: biochemical properties applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(2): 283–295.
- [7] Hong D, Wan W, Gao XL. Expression and purification of recombinant protein by using Family 3 cellulose-binding domain fusion tag in eukaryotes: CN, 201110035017. 2011-01-19 (in Chinese).
洪洞, 宛雯, 高晓连. 家族 3 纤维素结合域在真核生物中作为重组蛋白质表达和纯化的亲和标签的应用: CN, 201110035017. 2011-01-19.
- [8] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, et al. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamomeus* transglutaminase. *J Biotechnol*, 2004, 110 (3): 219–226.
- [9] Wey TT, Hseu TH, Huang L. Molecular cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma koningii* G-39. *Curr Microbiol*, 1994, 28 (1): 31–39.
- [10] van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52 (4): 541–545.
- [11] Oda S. Ajinomoto group use *Corynebacterium glutamicum* expression system to do expression business of protein production. *Biotechnol Business*, 2011, 2: 4–5 (in Chinese).
小田修司. 味之素公司利用谷氨酸棒状杆菌的表达系进行蛋白表达业务. *生物产业技术*, 2011, 2: 4–5.
- [12] Liu K, Liu YH, Zhang Y. Heterogeneous expression of *Bacillus subtilis* transglutaminase. *J Tianjin Univer Sci Technol*, 2012, 27(3): 1–5 (in Chinese).
刘凯, 刘逸寒, 张艳. 枯草芽孢杆菌谷氨酰胺转氨酶的异源表达. *天津科技大学学报*, 2012, 27(3): 1–5.
- [13] Watanabe K, Tsuchida Y, Okibe N, et al. Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences. *Microbiology*, 2009, 155 (Pt 3): 741–750.
- [14] Itaya H, Kikuchi Y. Secretion of pro-transglutaminase by *Coryneform* bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78 (4): 621–625.
- [15] Ramos R, Domingues L, Gama M. *Escherichia coli* expression and purification of LL37 fused to a family III carbohydrate-binding module from *Clostridium thermocellum*. *Protein Expr Purif*, 2010, 71 (1): 1–7.
- [16] Sugimoto N, Igarashi K, Samejima M. Cellulose affinity purification of fusion proteins tagged with fungal family I cellulose-binding domain. *Protein Expr Purif*, 2012, 82 (2): 290–296.

(本文责编 郝丽芳)