

里氏木霉内切葡萄糖苷酶 IV 在毕赤酵母中的表达*

汤新 刘刚 田生礼 张煜 邢苗**

(深圳大学生命科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳 518060)

摘要: 进行了内切葡萄糖苷酶 IV (EG IV) 在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统中的表达。采用 RT-PCR 的方法从里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 中分离到 *eg4* 基因。将 *eg4* 基因与毕赤酵母表达载体 pPICZαA 连接, 得到重组质粒 pPICZαA-*eg4*。将该重组质粒线性化后转化毕赤酵母 GS115, *eg4* 基因通过同源重组被整合到毕赤酵母的染色体上, 并处于酵母 α 因子的下游, 得到重组菌株 *P. pastoris*-EGIV1。在甲醇诱导下, 重组菌株 *P. pastoris*-EGIV1 可以合成并分泌 EGIV, 培养液的 CMC 活力达到 2.11 U/mL。

关键词: 纤维素酶, 内切葡萄糖苷酶 IV, 里氏木霉, 毕赤酵母

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0047-05

Expression of the *Trichoderma reesei* Endoglucanase IV in *Pichia pastoris**

TANG Xin LIU Gang TIAN Sheng-Li ZHANG Yu XING Miao**

(College of Life Sciences, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

Abstract: In this work, the *Pichia pastoris* expression system was applied to express the *T. reesei* EGIV. The *eg4* gene was isolated from rice hull induced *T. reesei* culture through RT-PCR, and was ligated with the *Pichia* expression vector pPICZαA, resulting in the recombinant plasmid pPICZαA-*eg4*. The recombinant plasmid pPICZαA-*eg4* was then linearized and transformed into *P. pastoris* GS115, and the *eg4* gene was in frame integrated into the *Pichia* genome through homologous recombination, resulting the recombinant strain *P. pastoris*-EGIV1. With methanol induction, the recombinant strain *P. pastoris*-EGIV1 expressed and secreted EGIV into the culture supernatant with CMC activity of 2.11U/mL. The SDS-PAGE analysis showed that the apparent molecular weight of expressed protein was about 50kD, slightly less than that produced by *T. reesei*.

Key words: Cellulase, Endo-I, 4-β-D-glucanase, *Trichoderma reesei*, *Pichia pastoris*

由丝状真菌里氏木霉所产生的纤维素酶系是最为高效的纤维素水解酶之一, 由内切 β-葡萄糖苷酶 (EG)、纤维二糖水解酶 (CBH) 和纤维二糖酶 (BG)^[1,2] 3 种组分构成。各组分协同作用, 可以将木质纤维素水解为葡萄糖。其中 EG 优先作用于无定型纤维素, 从纤维素分子的内部进行水解^[3]。在里氏木霉纤维素酶系中, 各种组分所占的比例主要由微生物内部的调控机制调节, 很难通过改变培养条件来进行人工控制。而纤维素酶的不同应用过程往往对纤维素酶各组分的要求有着不同的要求, 如在纺织品水洗时需要 EG 的相对活性较高, 直接由里氏木霉合成的纤维素酶不能很好地满足这些要求^[4]。为了解决这一问题, 一些研究者采用基因工程技术改造里氏木霉菌株, 使纤维素酶系中某一组分的比例提高, 取得了预期的效果^[5-7]。如果采用合适的表达系统单

* 深圳市科技计划项目资助 (No. 20020127)

** 通讯作者 Tel: 0755-26558382, E-mail: xingmiao@szu.edu.cn, Fax: 0755-26558382

收稿日期: 2005-01-31, 修回日期: 2005-03-04

独表达纤维素酶系的各种组分, 然后按照不同的应用目的将纤维素酶的各种组分以一定的比例混合, 则可以更有效的和更为广泛的适应不同应用过程对纤维素酶各组分比例的不同要求。本文报导里氏木霉纤维素酶的组分之一 EGIV 在毕赤酵母中的表达结果。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

里氏木霉 (*T. reesei*) QM9414, ATCC 26921 购自 ATCC。大肠杆菌 *E. coli* Top10F', 巴氏毕赤酵母菌株 *P. pastoris* GS115 以及分泌型表达质粒 pPICZαA 由 Invitrogen 公司提供。用于 PCR 产物克隆的载体 pUCm-T 由上海生物工程技术服务有限公司提供。

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 片段纯化试剂盒均购自 Takara 公司 (大连)。蛋白质和 DNA 分子量标准以及培养基成分如蛋白胨、酵母抽提物、酵母碱等由上海生物工程技术服务有限公司提供 zeocin 和 TRIZOL 试剂购自 Invitrogen。PCR 引物合成和 DNA 序列测定由 Takara 公司完成。

1.3 微生物培养

大肠杆菌培养基 (LB)、毕赤酵母培养基 (YPD、MMH、MDH、BMGY、BMMY) 组成成分参见 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达系统操作手册 (www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselecte man. pdf), 重组质粒的筛选时 LB 培养基需加入 25 μg/mL zeocin, 在筛选重组毕赤酵母菌株时 YPD 培养基需加入 100 μg/mL zeocin。在 37℃, 220r/min 的旋转式摇床上进行大肠杆菌的培养。在 30℃, 250r/min 的条件下进行毕赤酵母的培养。

1.4 里氏木霉 *eg4* 基因的分离

采用 RT-PCR 方法从里氏木霉中分离 *eg4* 基因。在含有稻草粉的 Mandels 培养基中培养里氏木霉^[8], 48h 后离心收集菌体, 然后使用 TRIZOL 试剂按该试剂使用说明提取里氏木霉的总 RNA。使用 Takara 公司的 RNA PCR 试剂盒合成 cDNA 第一链, 再以 cDNA 第一链为模板, 通过 PCR 方法进行 *eg4* 基因的扩增。PCR 反应体系含 200 μmol dNTP、0.5 μL (2.5U) EX Taq DNA 聚合酶、60 pmol 特异的上下游引物 P1 和 P2、以及 50 μL 反转录产物。所使用的引物为:

P1: 5' - GCT GAA TTC GGA CAT GGA CAT ATT AAT GAC -3'

P2: 5' - GAC GGT ACC GTG TGC CTC GAA CCT CCA A -3'

在 P1 和 P2 的 5' 端分别加入 *EcoRI* 和 *KpnI* 的酶切位点 (斜体)。PCR 扩增步骤为 94℃5min, 94℃1min, 52℃1min, 72℃延伸 2min, 循环 30 次; 再 72℃延伸 7min。PCR 产物与 pUCm-T 连接后在 Takara 公司进行序列测定。

1.5 表达载体的构建及重组毕赤酵母的筛选

将 RT-PCR 特异性扩增产物的 *eg4* 的编码序列与载体 pPICZαA 连接, 得到重组质粒 pPICZαA-*eg4*。然后参见 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达系统操作手册, 采用电转移法进行重组质粒在毕赤酵母的转化。在分别在 MMH 和 MDH 平板上培养转化菌落, 确定其甲醇利用效率 (Mut 表型), 以便在重组蛋白表达时采取相应的方法。

1.6 重组 EGIV 在毕赤酵母中的诱导表达

重组毕赤酵母在 25mL BMGY 培养基中 (250mL 三角瓶) 中培养至 OD_{600} 为 2.0 ~

6.0, 离心收集菌体, 加入 25mL BMMY 培养基后于 30℃, 250RPM 条件下继续培养, 每 24h 补加占培养液体积 0.5% 的甲醇, 定时取样, 测定菌体密度和酶活性, 同时进行培养液的 SDS-PAGE 分析。

1.7 分析方法

重组毕赤酵母培养液的 SDS-PAGE 分析按照分子生物学实验指南进行。所使用的凝胶浓度为 12%, 上样量为 20 μ L (10 μ L 培养液加 10 μ L 载样液)。

采用羧甲基纤维素 (CMC) 为底物进行 EG IV 活力的测定。反应体系由 0.4mL 1.25% (w/v) 的 CMC, 0.1mL 0.5mol/L 的柠檬酸缓冲液 (pH5.0), 和 0.5mL 适当稀释的酶液组成。在 50℃ 水浴中反应 15min 后加入 3mL DNS 试剂终止反应, 并在沸水浴煮沸 5min。流水冷却后, 加入蒸馏水至 25mL, 测定 540nm 下的吸光值, 根据葡萄糖标准曲线确定酶反应过程所释放的还原糖量。一个活力单位定义为在上述反应条件下每小时释放 1 毫克还原糖 (以葡萄糖计) 所需要的酶量。

2 结果与讨论

2.1 内切 β -葡萄糖苷酶基因的分离

在一般情况下, 里氏木霉的纤维素酶基因处于受阻遏状态, 为了获得其 cDNA, 需要采用诱导物启动纤维素酶基因的表达。本文分别采用 0.1% 微晶纤维素和 1% 经稀硫酸预处理稻草粉对里氏木霉进行 48h 的诱导培养。经总 RNA 抽提, RT-PCR 扩增, 均可以得到约 1,000bp 的 *eg4* 基因, 如图 1 所示。由于在设计 PCR 引物时, 扣除了 *eg4* 基因中信号肽的编码序列, 因此所得到的片段长度为 975bp, 小于 GenBank 上发布的 *eg4* 基因的序列长度 (1,035bp)。对扩增产物的测序结果表明, 所分离的 *eg4* 基因与 GenBank 发布的序列具有 100% 的同源性。

2.2 表达载体的构建

用 PCR 产物纯化试剂盒纯化所分离的 *eg4* 基因, 纯化的产物经 *EcoRI* 和 *KpnI* 双酶切后与用同样酶切的 pPICZ α A 连接, 连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* TOP10F', 用含 zeocin 的低盐 LB 平板筛选转化菌株。转化后的大肠杆菌经扩大培养、质粒抽提、以及 *EcoRI* 和 *KpnI* 双酶切鉴定, 表明 *eg4* 基因已成功地被克隆到 pPICZ α A 中 (如图 2 所示), 所得到的重组质粒命名为 pPICZ α A-*eg4*。对 pPICZ α A-*eg4* 的测序结果表明, *eg4* 位于质粒中甲醇启动子的下游, 并具有正确的阅读框。

2.3 毕赤酵母的转化和重组菌株的鉴定

将重组质粒 pPICZ α A-*eg4* 用 *Pme I* 酶线性化, 用电转方法将线性化的质粒转化 *P. pastoris* GS115, 用含 100 μ g/mL zeocin 的 YPD 培养基进行重组菌株的筛选。由于重组质粒 pPICZ α A-*eg4* 与 *P. pastoris* GS115 的基因组 DNA 具有同源的序列 (*aox1* 基因的上游序列), 当线性化的质粒进入酵母细胞后, 两者会发生同源重组, 从而使 *eg4* 基因整合到毕赤酵母的染色体上, 得到重组毕赤酵母菌株。将经 zeocin 抗性平板初步筛选得

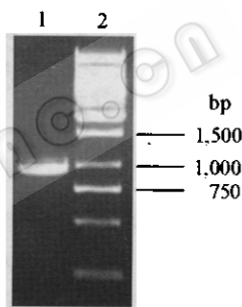


图 1 RT-PCR 分离 *eg4* 基因的琼脂糖凝胶电泳
1 *eg4* 基因, 2 1kb DNA 分子量标记

到的 *P. pastoris* 重组菌株在 BMGY 培养基中进行摇瓶培养后, 用 CTAB 法提取基因组 DNA。以酵母转化菌株的基因组 DNA 为模板, 采用 *eg4* 基因的上下游引物 (P1, P2) 进行扩增, 在大部分菌株中都得到了和 *eg4* 基因大小相对应的片段, 如图 3 所示。以酵母转化菌株的基因组 DNA 为模板, 采用 5' *aox1* 引物和 3' *aox1* 引物进行扩增, 在大部分重组菌株中可以扩增到约 1500bp 的片段, 经和 pUCm-T 载体连接和序列测定, 表明在重组毕赤酵母菌株中 *eg4* 基因位于甲醇启动子和酵母 α 因子的下游, 并具有正确的阅读框。

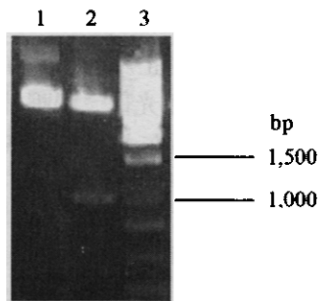


图 2 重组质粒 pPICZ α - *eg4* 双酶切鉴定

1 重组质粒 pPICZ α - *eg4*, 2 重组质粒 pPICZ α - *eg4* 的双酶切产物, 3 DNA 分子量标记

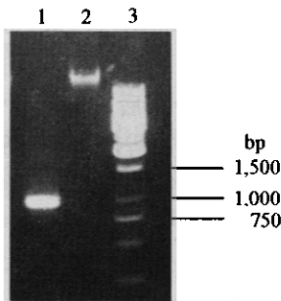


图 3 毕赤酵母重组菌株的

PCR 鉴定

1 以毕赤酵母重组菌株的基因组 DNA 为模板用 P1、P2 引物进行 PCR 扩增的产物, 2 毕赤酵母重组菌株的基因组 DNA, 3 DNA marker

2.4 重组 EGIV 的表达

在重组毕赤酵母菌株中, *eg4* 位于甲醇启动子和 α 因子的下游。在甲醇的诱导下, 重组 EGIV 将被合成并分泌到胞外。挑取 40 个重组 *P. pastoris* 菌株进行纤维素酶的表达。按照毕赤酵母表达系统的操作指南, 以 BMMY 为培养基在摇瓶中进行培养, 大部分菌株的培养液都具有 EGIV 的活性, 从中挑取表达效率最高的重组菌株进行以后的实验, 记为菌株 *P. pastoris*-EGIV1。以菌株 *P. pastoris*-EGIV1 在 BMMY 培养基中进行重组 EGIV 的产酶培养, 定时取样, 测定菌体浓度和 EGIV 的活性, 结果如图 4 所示。由于初始的菌体浓度较高, 菌体生长很快就进入稳定期, 培养液中 EGIV 的活性在诱导培养

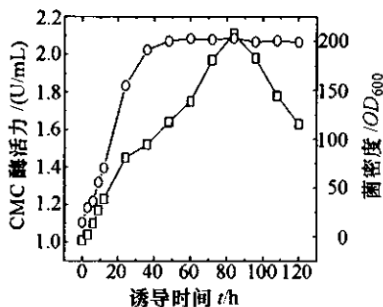


图 4 重组毕赤酵母菌株 *P. pastoris*-EGIV1 的产酶时间曲线

—○— 重组毕赤酵母菌株 *P. pastoris*-EGIV1 的 CMC 酶活力, —□— 重组酵母菌株的生长曲线

84h 时达到高峰, 活力为 2.11U/mL。培养时间过长时, EGIV 的活性下降, 可能是由于被毕赤酵母产生的蛋白酶降解。

对菌株 *P. pastoris*-EGIV1 产酶培养液的 SDS-PAGE 分析结果表明, 在培养周期内重组 EGIV 的浓度变化与检测的 EGIV 的活性相对应, 在诱导后 84h 达到高峰, 随后由于被降解而下降, 如图 5 所示。重组 EGIV 的分子量为 50kD 左右, 比由氨基酸序列推测的分子量 (约 34kD) 大, 略低于在天然产生菌 *T. reesei* 中的分子量 (56kD, Saloheimo 等, 1997), 可能是由于 *P. pastoris* 与 *T. reesei* 对蛋白质糖基化的差异造成的。

重组毕赤酵母细胞蛋白的表达量、酶活性受到诱

诱导物甲醇浓度的影响。当甲醇诱导浓度为 1% 时, 重组蛋白的表达量最大, 此时酶活也最高, 如图 6 所示。

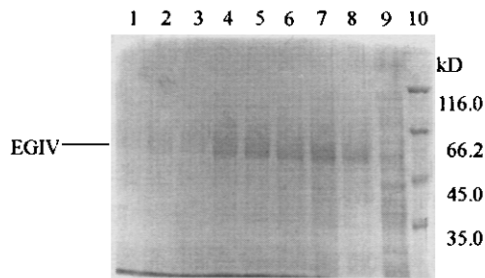


图 5 菌株 *P. pastoris* - EGIV1 培养液的
SDS - PAGE 分析

1 ~ 10 分别为诱导后 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、84 h、96 h、120h 的培养液和蛋白质分子量标记

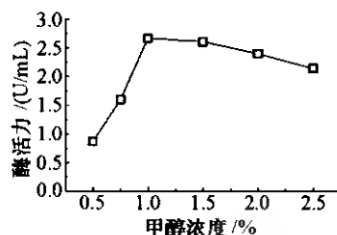


图 6 诱导物浓度对重组毕赤酵母中
EGIV 表达的影响

3 结论

巴氏毕赤酵母表达系统具有表达率高、可将表达产物分泌至胞外等优点, 被广泛用来进行重组蛋白的表达^[9,10]。本文以提高纤维素酶的生产效率和使用效果为目标, 在 *P. pastoris* 中进行了里氏木霉 EGIV 的表达。经甲醇诱导后, 重组菌株 *P. pastoris*-EGIV1 培养液的 CMC 活力达到 2.21 U/mL, 表达产物的分子量约为 50 kD, 接近于原产生菌里氏木霉中所表达的 EGIV 的分子量。本工作为实现纤维素酶系不同组分在不同应用过程的合理搭配打下了基础。

参考文献

- [1] Wood T M. Biochem Soc Trans, 1984, **13**: 407 ~ 410.
- [2] Claeysens M, van Tilbeurgh H, Kamerling J P, et al. Biochem J, 1990, **270**: 251 ~ 256.
- [3] 阎伯旭, 高培基. 生命科学, 2000, **12** (2): 86 ~ 88.
- [4] Heikinheimo L, Buert J, Miettinen-Oinonen A, et al. Textile Res J, 2000, **70**: 969 ~ 973.
- [5] Harkki A, Mantyla A, Penttila M, et al. Enzyme Microb Technol, 1991, **13**: 227 ~ 233.
- [6] Miettinen-Oinonen A, Suominen P. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 3956 ~ 3964.
- [7] Wang T H, Liu T, Wu Z H, et al. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2004, **36**: 667 ~ 672.
- [8] Kubicek C P, Messner R, Gruber F, et al. J Bio Chem, 1993, **268**: 19364 ~ 19368.
- [9] 章如安, 杨晟, 邱容得, 等. 微生物学通报, 2000, **27** (5): 371 ~ 373.
- [10] Cereghino J L, Cregg M. FEMS Microbiol Rev, 2000, **24**: 45 ~ 66.