

嗜热真菌纤维素酶的 CBD 与海栖热袍菌的 纤维素酶融合表达

乐易林¹ 邵蔚蓝^{1,2*}

(1. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 南京师范大学 生命科学学院 江苏 南京 210046)

摘要: 将嗜热真菌毛壳菌纤维素酶 Cel7A 的纤维素结合结构域编码区与极端嗜热厌氧菌海栖热袍菌的纤维素酶 CelB 基因进行融合, 构建重组质粒 pHsh-CBD-CelB, 并在大肠杆菌中表达。对融合蛋白进行纯化, 通过热处理和离子交换层析, 纯化到的融合蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱显示为单一条带。对融合蛋白的特性研究, 结果表明融合蛋白降解 CMC 的最适反应温度为 90°C, 结晶纤维素吸附实验表明该融合蛋白具有结合结晶纤维素的能力, 并且融合蛋白降解 CMC 与结晶纤维素的能力得到提高。

关键词: 海栖热袍菌, 嗜热毛壳菌, 纤维素结合结构域(CBD), 融合蛋白

Expression and Characterization of the Fusion Protein CBD-CelB

LE Yi-Lin¹ SHAO Wei-Lan^{1,2*}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Department of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

Abstract: The CBD-encoding region of family 7 cellobiohydrolases gene from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* was inserted into the upstream of the *CelB* gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. The recombinant plasmid pHsh-CBD-CelB was expressed in *Escherichia coli* JM109. CBD-CelB fusion protein was purified by a simple heat treatment followed by DEAE-Sepharose FF column. The optimal temperature of CBD-CelB fusion protein for CMC activity was 90°C, and the fusion protein had the ability of binding crystalline cellulose. Enzyme activity of CMC and Avicel was increased.

Keywords: *Thermotoga maritima*, *Chaetomium thermophilum*, Cellulose binding domain (CBD), Fusion protein

纤维素酶分子普遍具有类似的结构, 由 3 部分组成: 纤维素结合结构域(CBD), 催化结构域(CD)和连接桥(Linker)^[1]。对纤维素结合结构域的结构与

功能的研究以及纤维素结合结构域与结晶纤维素之间的吸附性质的研究, 有助于了解纤维素的降解机制。

* 通讯作者: Tel/Fax: 86-25-85891836; ✉: wshao@jssmail.com.cn
收稿日期: 2008-10-21; 接受日期: 2008-12-04

纤维素结合结构域的分类和功能,根据 CBD 分子大小及氨基酸的相似性将已知的 CBD 分成家族,大部分的 CBD 位于家族 、 、 [1,12]。家族 的 CBD 包括 33~40 个氨基酸残基,所有真菌的 CBD 都属于家族 ;家族 的 CBD 包括 95~108 个氨基酸残基;产生纤维小体的梭菌中的 CBD 属于家族 ,大小为 132~172 个氨基酸残基。对纤维素酶的纤维素结合结构域开展了研究[2,3],研究表明瑞氏木霉外切葡聚糖酶 CBD 结构域的缺失,会影响酶对结晶纤维素的降解[2]。微紫青霉 CBHI 酶纤维素结合结构域在大肠杆菌中进行表达,结果表明天然棉花纤维经 CBHI 酶的纤维素结合结构域的处理会有一定程度的非水解性降解作用,表明微紫青霉 CBHI 酶的纤维素结合结构域具有解聚天然结晶纤维素的作用[4]。

本文报道了对嗜热真菌纤维素酶 Cel7A 纤维素结合结构域与嗜热厌氧菌的纤维素酶基因的融合表达,以及融合基因表达产物的纯化与特性研究。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒、培养基和培养条件

大肠杆菌 (*Escherichia coli* JM109)(购自 Promega 公司)采用 Luria-Bertani (LB) 培养基培养(g/L): 酵母粉 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 5。海栖热袍菌(*Thermotoga maritima* ATCC 43589)采用厌氧培养基培养, 80°C 静置培养 8 h[5]。

质粒 pHsh 由本实验室构建,属于热激表达载体[6]。该表达载体是由大肠杆菌 σ^{32} 调控,包括一个热激启动子和终止子,通过热激就可以表达外源基因。

1.2 基因操作

海栖热袍菌基因组提取, DNA 操作采用分子克隆技术标准方法进行。质粒转化采用电转化方法进行,质粒和 PCR 产物采用 Qiagen Plasmid kit 和 PCR purification kit (Qiagen, USA) 纯化。合成的引物见表 1。

1.3 融合蛋白的表达与纯化

重组质粒电转化到宿主细胞 *E. coli* JM109 中,挑取重组单菌落接种于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素的 LB 培养液中, 30°C 振荡培养, 培养液至 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时, 转入 42°C 水浴摇床进行热激表达, 继续培养 8 h 后, 离心收集菌体, 用 50 mmol/L, pH

7.5 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤细胞 2 次, 并用相同缓冲液重悬细胞, 经高压破碎细胞后, 离心取上清即为粗酶液。将粗酶液在 80°C 热处理 30 min 后, 4°C 离心 30 min 去除变性蛋白。用 50 mmol/L, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液将 DEAE-Sepharose FF 层析柱平衡后, 进行上样, 用 0 mol/L~0.5 mol/L 的 NaCl 缓冲液线性梯度洗脱, 收集洗脱液。最终蛋白纯度由 SDS-PAGE 鉴定。

表 1 引物设计
Table 1 primers designed

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
B1	CTAGCGTTGGTGCAACGGAC
B2	GGGCTCGAGTTATTTTACAACCTCGACAG
C1	TAGTACAACCAAGTGTAACCGATAACCACCACA CTGACCCCATTTTCATGGGTATATCTCCTT
C2	ACCACGGGTTAAGCTGAGTACAAGTAGTACC AGCAACACAGTTAGTACAACCAAGTGTAAC
C3	ACAGCCAGTGTCTTGAGGCTAGCGTTGGTGC AAC

1.4 酶活测定方法

CMC 活性测定方法参照文献[7]进行, 以 0.5% CMC 为底物。

Avicel 酶活性测定方法参照文献[8]进行, 以 1% 微晶纤维素(Microcrystalline cellulose)为底物。酶活性单位定义为每分钟催化产生 1 μmol 还原糖的酶量。

1.5 纤维素结合实验

纤维素结合实验参考文献进行[9]。将重组酶 CBD-CelB 和 CelB 与结晶纤维素混合在缓冲液中, 放置在 50°C 恒温摇床中温育 2 h 后, 离心后测定上清液的蛋白浓度, 对照采用同样融合蛋白与结晶纤维素混合在缓冲液中, 不经过摇床温育离心后测定上清液的蛋白浓度, 两者比较后减少的蛋白为结合到结晶纤维素上的蛋白。

2 结果

2.1 优化密码子

按照大肠杆菌密码子使用表, 对 *Chaetomium thermophilum* CBD(GenBank: AM711862)编码序列中的所含的非优势和极端稀有密码子用大肠杆菌的优势密码子进行替换, 但不改变氨基酸序列。发现在原来 *C. thermophilum* CBD 中存在很多在大肠杆

菌密码子中使用率极低的密码子，将其中的 17 个密码子换成大肠杆菌优势密码子。新的基因与原始基因的序列比较见图 1。序列 1 为原始序列，下划线部分为需要优化的密码子，序列 2 为优化后的序列。

2.2 重组质粒的构建

pHsh-CBD-CelB 构建过程见图 2。

T. maritima 的 *CelB* 基因带有信号肽序列基因^[10]，在克隆 *CelB* 基因时根据 GenBank 中基因序列 (GenBank: NC_000853) 去除信号肽序列而设计引物 B1 与 B2(见表 1)用于扩增 *T. maritima* 的 *CelB* 基因，去除信号肽后基因序列大小为 756 bp。信号肽序列使用程序 SignalP 进行鉴别。PCR 反应条件为 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环；72℃ 10 min。使用 *Pyrobest* DNA polymerase (TaKaRa) 进行扩增，PCR 产物为平末端。表达载体 pHsh 由本实验室构建，通过热激进行

表达。载体通过 *Stu* I、*Xho* I 双酶切后与 *Xho* I 单酶切的 *CelB* 基因片段进行连接，构建好重组质粒 pHsh-*CelB*。

根据 *C. thermophilum* CBD 编码序列优化后的密码子序列设计 3 条引物：C1、C2、C3 (见表 1)，以重组质粒 pHsh-*CelB* 为模板，通过反向 PCR 的方法将 99 bp 的 CBD 编码序列融合到 *CelB* 基因的上游序列。具体方法如下：第 1 轮 PCR 条件以 pHsh-*CelB* 为模板，C1 和 C3 为引物进行反向 PCR 扩增出线形片段，第 2 轮 PCR 再以第 1 轮 PCR 扩增得到的线形片段产物为模板，以引物 C2 和 C3 进行扩增，PCR 产物纯化后，进行磷酸化，加入 T4 DNA 连接酶进行自身环化。得到一个新的重组质粒 pHsh-CBD-*CelB*(图 2)。对构建好的重组质粒进行双酶切验证，由于重组质粒 pHsh-*CelB* 和 pHsh-CBD-*CelB* 在 ATG 前面都带有一个酶切位点 *Sal* I，采用 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切，结果见图 3。

1	<u>AAG</u> TGG <u>GGC</u> CAG <u>TGC</u> <u>GGC</u> GGT ATC <u>GGC</u> TAC <u>ACC</u> <u>GGC</u> <u>TGC</u> ACT AAC <u>TGC</u>
2	AAA TGG GGT CAG TGT GGT GGT ATC GGT TAC ACT GGT TGT ACT AAC TGT
1	GTT GCT <u>GGC</u> <u>ACC</u> <u>ACC</u> <u>TGC</u> ACT CAG <u>CTC</u> AAC <u>CCC</u> TGG TAC AGC CAG <u>TGC</u> <u>CTG</u>
2	GTT GCT GGT ACT ACT TGT ACT CAG CTT AAC CCG TGG TAC AGC CAG TGT CTT

图 1 C. thermophilum CBD 原始基因和优化后基因序列比较

Fig. 1 Comparison of CBD gene sequence between original DNA and optimized DNA

Note: 1: Original sequence; 2: The optimized gene sequence.

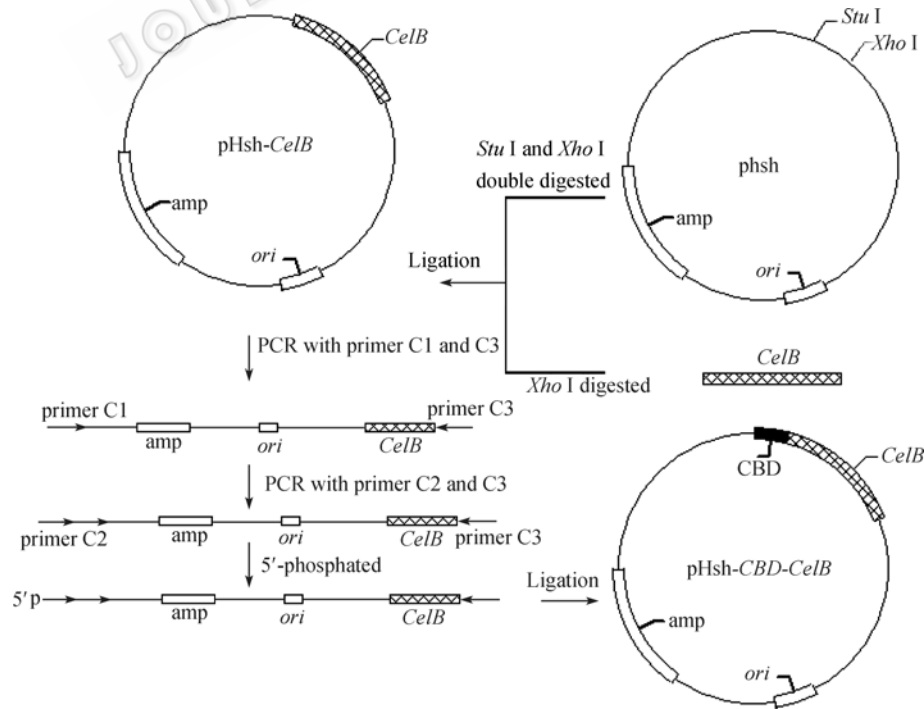


图 2 重组质粒构建过程

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid

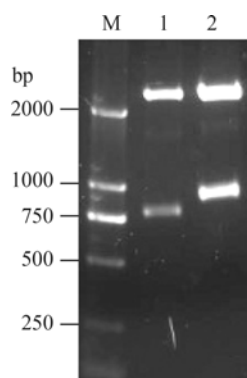


图3 重组质粒双酶切验证

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid

Note: M: DNA Marker DL2000; 1: recombinant plasmid pHsh-CelB digested by Sal I and Xho I; 2: recombinant plasmid pHsh-CBD-CelB digested by Sal I and Xho I.

2.3 融合蛋白表达与纯化

将重组质粒 pHsh-CBD-CelB 与 pHsh-CelB 转化到大肠杆菌 JM109 中进行热激表达, 收集细胞进行高压破碎细胞后, 离心取上清即为粗酶液。CBD-CelB 与 CelB 粗酶液经过热处理后接着经过离子交换层析纯化最终得到电泳纯的蛋白。电泳图谱显示重组酶 CelB 分子量约为 27 kD, 融合蛋白 CBD-CelB 是在 CelB 的基础上融合了一段 33 个氨基酸组成的纤维素结合结构域, 图谱显示 CBD-CelB 分子量约为 30 kD, 表明纤维素结合结构域已融合到 CelB 上, 并得到了表达(图 4)。

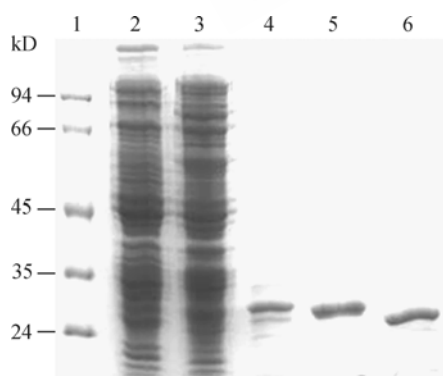


图4 融合蛋白 CBD-CelB 与重组酶 CelB 纯化过程 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of fusion protein CBD-CelB and CelB in purification steps

Note: 1: Protein Marker; 2: Crude extract of *E. coli* JM109 /pHsh; 3: Crude extract of *E. coli* JM109 /pHsh-CBD-CelB; 4: Proteins of *E. coli* JM109/pHsh-CBD-CelB remained after heat treatment; 5: Fusion protein CBD-CelB purified by DEAE-Sepharose FF; 6: CelB purified by heat treatment followed by DEAE-Sepharose FF column.

2.4 融合蛋白特性

2.4.1 温度对融合蛋白 CBD-CelB 与重组酶 CelB 的影响: 以 1.0% CMC 为底物, 测定融合蛋白 CBD-CelB 与重组酶 CelB 在 75°C、80°C、85°C、90°C、95°C 条件下的 CMC 酶活, 结果表明两种酶的最适反应温度都是 90°C (图 5)。

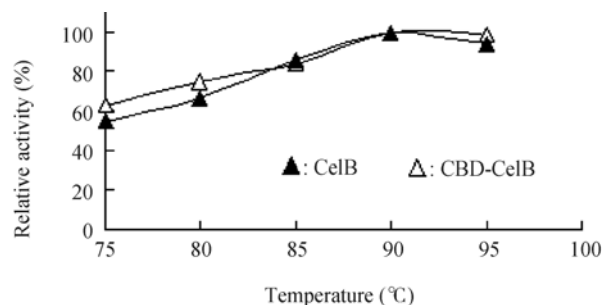


图5 温度-活力曲线图

Fig. 5 The optimum temperature for CMC activity

2.4.2 结晶纤维素结合实验: 将 1 μg 纯化的融合蛋白 CBD-CelB 和重组酶 CelB 分别与结晶纤维素混合在缓冲液中, 放置在 50°C 恒温摇床中温育 2 h。实验表明只有融合蛋白 CBD-CelB 与结晶纤维素有结合效果, 重组酶 CelB 不能与结晶纤维素结合(图 6)。

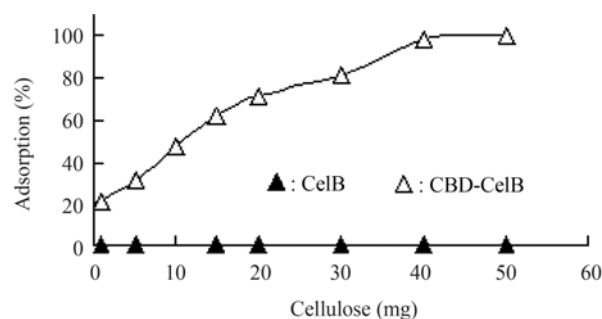


图6 重组蛋白对结晶纤维素的吸附能力

Fig. 6 Adsorption of CBD-CelB and CelB to cellulosic substrates

2.4.3 降解底物特性: 以 CMC 和结晶纤维素为底物, 将重组酶 CelB 与 CBD-CelB 在 90°C, pH 6.0 下水解底物, 重组酶 CBD-CelB 不仅提高了降解 CMC 的能力, 而且降解结晶纤维素的能力有一定程度的提高(表 2)。这可能是 CBD 区域增强了与底物的结合能力, 并且融合蛋白有助于将底物变得疏松, 而使纤维素链之间的氢键断裂。

表2 重组酶 CBD-CelB 降解 CMC 与结晶纤维素的能力
Table 2 CMC and Avicel activity of recombination enzyme CBD-CelB

重组蛋白 Recombination enzyme	酶活 Enzyme activity (U/mg)	
	CMC	Avicel
CelB	145.6	0.11
CBD-CelB	169.2	0.34

3 讨论

纤维素结合结构域不仅会影响对结晶纤维素的吸附和水解活力,而且有实验表明有的纤维素酶的 CBD 对不溶性底物有一定程度的非水解性降解作用,具有解聚天然结晶纤维素的效果^[5,12]。对 CBD 的特性研究有助于了解天然纤维素聚合物的解链过程, CBD 对纤维素表面的吸附作用和吸附后 CBD 参与催化降解纤维素的问题。

在对 *C. thermophilum* CBD 编码序列的分析结果表明,该编码区 99 bp 序列含有很多大肠杆菌的非优势和极端稀有密码子。因此,在不改变氨基酸序列的前提下,用大肠杆菌的优势密码子对原始序列进行了替换。该嗜热真菌的 CBD 编码区通过 PCR 的方法插入到嗜热厌氧菌海栖热袍菌纤维素酶 *CelB* 基因前端。采用本实验室构建的热激表达载体,重组质粒在大肠杆菌中进行表达,该融合蛋白的最适反应温度为 90℃。纤维素结合实验表明该融合蛋白具有结合结晶纤维素的能力,重组蛋白降解 CMC 与结晶纤维素的能力有明显提高,一方面可能是 CBD 区域增强了与底物的结合能力。另一方面,根据文献报道^[11],微紫青霉 CBD_{CBHI} 处理天然棉花纤维后,会产生一定程度的崩解作用,能对天然结晶纤维素起到一定程度的疏解或崩解作用,使结晶纤维素原来相对较规则而紧密的结构变得疏松和不规则,在一定程度上起到了帮助无定形化的作用,推测融合蛋白 CBD-CelB 在降解 CMC 和微晶纤维素有一定程度提高,可能是融合蛋白有助于底物变得疏松,而使纤维素链之间的氢键断裂。

参 考 文 献

- [1] 阎伯旭, 齐 飞, 张颖舒, 等. 纤维素酶分子结构和功能研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26**(3): 233-237.
- [2] Teeri TT, Lehtovaara P, Kauppinen S, *et al.* Homologous domains of trichoderma reesei cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene*, 1987, **51**: 43-52.
- [3] Amouri B, Fradi N, Gargouri A. Design of a fungal cellulose-binding domain for PCR amplification and expression in *E. coli*. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**: 1883-1888.
- [4] 汪天虹, 邹玉霞, 石屹峰, 等. 微紫青霉 CBHI 酶纤维素结合结构域在大肠杆菌中的分泌型表达及性质研究. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, **16**(5): 644-649.
- [5] Jiang Y, Zhou Q, Wu K, *et al.* A highly efficient method for liquid and solid cultivation of the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **259**(2): 254-259.
- [6] Shao W, Wu H, Pei J. A novel expression vector system regulated by 32 and methods for using it to produce recombinant protein. *US patent Application*, 2006, **11**: 614-626.
- [7] Lever M, Powell JC, Killip M, *et al.* A comparison of 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) with other reagents for the determination of glucose. *J Lab Clin Med*, 1973, **82**: 649-655.
- [8] Chhabra S, Kelly R. Biochemical characterization of *Thermotoga maritima* endoglucanase Cel74 with and without a carbohydrate binding module (CBM). *FEBS letters*, 2002, **531**: 375-380.
- [9] Morag E, Lapidot A, Govorko D, *et al.* Expression, purification, and characterization of the cellulose-binding domain of the scaffoldin subunit from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(5): 1980-1986.
- [10] Liebl W. Cellulolytic enzymes from *Thermotoga* species. *Methods in Enzymology*, 2001, **330**: 290-300.
- [11] 汪天虹, 王春卉, 高培基, 等. 微紫青霉 CBHI 酶的 CBD 蛋白编码区在大肠杆菌中的亚克隆及表达. 微生物学报, 1998, **38** (4): 269-275.
- [12] Linder M, Teeri TT. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*, 1997, **57**: 15-28.