

海栖热袍菌极耐高温木聚糖酶基因 *xynB₆₄* 在大肠杆菌中的融合表达

孙涛 申宁* 白羽 李文豪 韦萍

(南京工业大学 生物与制药工程学院 江苏 南京 210009)

摘要: 来源于极端嗜热菌海栖热袍菌(*Thermotoga maritima* MSB8)的木聚糖酶 B 具有极高的热稳定性, 在饲料、造纸、能源和食品医药行业具有巨大应用潜力。携带酶基因 *xynB₆₄* 的 pET28a(+) 重组载体在宿主大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达, 重组酶活力较低。更换宿主为携带稀有 tRNA 基因的大肠杆菌: BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 Rosetta(DE3)后, 酶活力分别提高了 197%和 277%, 但是后者中的表达会形成部分包涵体。宿主菌为大肠杆菌 Rosetta(DE3), 更换载体为 4 种融合表达载体 pET32a(+), pET42a(+), pET43.1a(+)和 pMAL-c2X 进行表达, 重组酶分别融合了 Trx、GST、Nus 和 MBP 标签。其中 Rosetta(DE3)/pMAL-c2X-*xynB₆₄* 表达酶活力最高, 相当于 Rosetta(DE3)/pET28a-*xynB₆₄* 表达酶的 88%, 而且目的酶表达量占全细胞蛋白的 40%, 几乎不形成包涵体。

关键词: 耐高温木聚糖酶, 稀有密码子, 融合标签, 翻译起始区

Fusion expression of an extreme-thermostable xylanase B₆₄ gene from *Thermotoga maritima* MSB8 in *Escherichia coli*

SUN Tao SHEN Ning* BAI Yu LI Wen-Hao WEI Ping

(School of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: Xylanase B from thermophile bacteria *Thermotoga maritima* MSB8 has extreme-thermostability, which has potential widely application for feed, papermanufacture, energy, food and medicine industries. Recombinant pET28a(+)-*xynB₆₄* was induced and expressed in *E. coli* BL21(DE3), and the activity of recombinant XynB₆₄ was very low. *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL and Rosetta(DE3) both harbouring rare tRNAs were used to replace *E. coli* BL21(DE3) and the activity of recombinant XynB₆₄ increased by 197% and 277%, respectively. However, some inclusion body was formed in *E. coli* Rosetta(DE3). Next, pET32a(+), pET42a(+), pET43.1a(+) and pMAL-c2X, which has the Trx, GST,

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(No. 2008BAI63B07)

* 通讯作者: Tel: 86-25-83172080; E: shenning@njut.edu.cn

收稿日期: 2010-11-27; 接受日期: 2011-02-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Nus and MBP fusion tag respectively were used to replace pET28a(+) with *E. coli* Rosetta(DE3) as host. The activity of recombinant XynB₆₄ produced by Rosetta(DE3)/pMAL-c2X-*xynB₆₄* was highest, which was equivalent to 88% of counterparts of Rosetta(DE3)/pET28a-*xynB₆₄*. Meanwhile about 40 percent whole cell proteins of former were recombinant XynB₆₄ with little inclusion body.

Keywords: Thermostable xylanase, Rare codon, Fusion tag, Translation initiation region (TIR)

木聚糖酶(Endo-1, 4-β-D-xylanase, EC 3.2.1.8)是半纤维素主要成分木聚糖的最关键降解酶之一,广泛存在于各种微生物中,在饲料工业、造纸工业、能源工业以及食品医药领域的应用价值,在科学界已引起广泛关注^[1-2]。本课题研究的海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* MSB8 木聚糖酶 B 具有较弱的纤维素酶活性^[3]、最适 pH 达 6.6-6.8 且耐受范围较宽、最适温度 90 °C 且热稳定性好^[4]、水解木聚糖产生木二糖的量较高^[5]等特性,极具工业化应用前景,但目前未见商品化酶的提供,原因主要是影响表达量及活性的因素尚未研究清楚,工业化成本太高。

外源基因的表达受诸多因素影响:外源基因本身的性质(密码子偏爱性、前导序列作用)、表达宿主(表达产物的稳定性、mRNA 稳定性)、表达载体[载体拷贝数、启动子强度、SD 序列、SD 序列到起始密码子的距离、翻译起始区(Translation initiation region, TIR)二级结构、转录终止效率、表达位置]、蛋白质之间的相互影响以及培养/诱导条件,而这些因素常常共同影响表达水平,需全面的分析改进。研究者已尝试去除信号肽^[6];在 C 端融合 CBM2b^[7],用 BL21(DE3)/pET28a(+)^[8]、BL21-CodonPlus (DE3)-RIL/pET20b(+)^[9]、JM109/pHsh^[10]表达 *xynB*;优化培养/诱导条件^[11];也有尝试用酵母表达 *xynB₆₄*^[4,12],已取得一定进展,但尚有一些影响因素未明确且存在一些问题。

首次研究了稀有 tRNA 基因补充种类、N 端融合标签对 *xynB₆₄* 表达的影响,讨论了目的基因 mRNA 的 TIR 最小生成自由能与表达量之间的关系,为工业化生产该酶提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株:见表 1。

表 1 菌株与质粒		
Table 1 Bacterial strains and plasmids		
菌株与质粒 Bacterial strains and plasmids	用途 Purpose	来源 Source
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	出发菌株	本实验室
pET28a(+)- <i>xynB₆₄</i>	出发重组质粒	本实验室
<i>E. coli</i> JM109	克隆宿主	Promega
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	补充4种稀有tRNA基因(<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>proL</i> , <i>leuW</i>)	Stratagene
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	补充6种稀有tRNA基因(<i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>ileX</i> , <i>glyT</i> , <i>proL</i> , <i>leuW</i>)	Novagen
pET32a(+)	提供Trx标签	Novagen
pET42a(+)	提供GST标签	Novagen
pET43.1a(+)	提供Nus标签	Novagen
pMAL-c2X	提供MBP标签	NEB

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III、*Bam*H I, PrimeSTAR HS DNA Polymerase (含 dNTPs Mixture), DL2000 DNA Marker, λ-*Hind* III digest DNA Marker, Protein Molecular Weight Marker (Low)购自宝生物工程有限公司;BU-T4 DNA Ligase、BU-*Taq* DNA Polymerase、Biomiga EZgene Plasmid Miniprep Kit、Biomiga EZgene Gel Extraction/Cycle Pure Kit, 琼脂糖购自南京天为生物科技有限公司;氨苄青霉素购自 Amresco 公司;硫酸卡那霉素、氯霉素、燕麦木聚糖和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Sigma 公司;T7 通用引物和自备引物(表 2)由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *xynB₆₄* 基因 CDS (Coding sequence)及两侧酶切位点的确定:将 BL21(DE3)/pET28a(+)-*xynB₆₄* 稀释涂布抗性平板,挑单菌落接种于抗性 LB 培养基,过夜培养,取 1 mL 送 Invitrogen 公司测序,测序结果用 Geneious 4.8.2 软件比对分析。

表 2 引物
Table 2 Primers

引物名称 Primer Name	引物序列(5'→3') Primer Sequence (5'→3')	长度 Size (bp)
T7 promoter primer	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7 terminator primer	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	20
Forward primer	CGCGGATCCATGGAAATATTACCTTCTGTGTTGATCCTT 下划线处为 <i>Bam</i> H I 位点	39
Reverse primer	CCCAAGCTTATTTTCTTCTTCTATCTTTTCTCCAGCACC 下划线处为 <i>Hind</i> III位点	41

1.2.2 稀有密码子分析: 利用 <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>在线服务对 *xynB₆₄* 基因 CDS 进行分析。

1.2.3 二硫键分析: 用 Geneious 4.8.2 翻译测序结果, 查看半胱氨酸数量和分布。从 PDB 数据库下载 1VBR (木聚糖酶与木二糖复合物的结晶)和 1VBU (木聚糖酶的结晶)文件^[13], 导入 Geneious 4.8.2 后, 查看三维结构中的二硫键。

1.2.4 *xynB₆₄* 基因 CDS 的获得: 利用 T7 及自备引物, 以 pET28a(+)-*xynB₆₄* 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μ L, 聚合酶为 PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 130 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 *Nco* I 和 *Hind* III、*Bam*H I 和 *Hind* III分别对纯化后的 PCR 产物进行双酶切, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测并从胶中回收纯化。

1.2.5 重组表达载体的构建与鉴定: 用 *Nco* I、*Hind* III双酶切 pET32a(+)和 pET42a(+); *Bam*H I、*Hind* III双酶切 pET43.1a(+)和 pMAL-c2X, 经胶回收纯化载体后, 和同样双酶切的目的片段连接, 转化 JM109, 涂布于相应抗性平板, 用 T7 及自备引物进行菌落 PCR, PCR 反应体系 50 μ L, 聚合酶为 BU-*Taq* DNA Polymerase, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 130 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。电泳检测, 得到预期条带即为连接方向正确的阳性克隆, 提质粒, 经 *Nco* I 和 *Hind* III、*Bam*H I 和 *Hind* III双酶切鉴定后送 Invitrogen 测序。

1.2.6 重组子的诱导表达: 将重组质粒 pET28a(+)-*xynB₆₄* 转化 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 Rosetta(DE3); pET32a(+)-*xynB₆₄*、pET42a(+)-*xynB₆₄*、

pET43.1a(+)-*xynB₆₄* 和 pMAL-c2X-*xynB₆₄* 转化 Rosetta(DE3), 菌落 PCR 鉴定阳性转化子, 保种, 稀释涂布抗性平板, 挑取单菌落接入含有相应抗生素的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养过夜, 按 1%接种量接入含相应抗生素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至 *OD*₆₀₀ 达 0.8 左右, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 继续培养 8 h, 置冰上 5 min。

1.2.7 木聚糖酶酶活测定: 取 7 mL 发酵液 10 000 r/min 离心去上清, 菌泥用 7 mL 磷酸缓冲液 (PBS 1/15 mol/L pH 6.6)重悬, 冰浴条件下于超声波细胞破碎仪以 400 W, 总时长 10 min, 超声 10 s, 间隔 10 s 破碎后 13 000 r/min 离心取上清即为粗酶液, 稀释适当倍数后取 50 μ L 酶液和 PBS 配制的 5 g/L 木聚糖溶液 0.95 mL 于 70 $^{\circ}$ C 水浴反应 20 min。冰水冷却后, 加入 2 mL DNS 试剂, 煮沸 10 min 以充分显色。冷却稀释至 10 mL 后测其 540 nm 处光吸收值, 由木糖的标准曲线计算酶转化所生成的木糖的量。以 1 mL 木聚糖溶液作为空白。木聚糖酶活力单位定义为: 在测定条件下, 每分钟水解木聚糖生成 1 μ mol 木糖所需的酶量。

1.2.8 木聚糖酶表达量的测定: 按公式: $0.2 \times 1 \text{ mL} / OD_{600}$ 值吸取诱导后的菌体, 10 000 r/min 离心收集菌体, 用 10 μ L 水重悬后加 10 μ L 2 \times loading buffer, 煮沸 5 min 后进行全细胞 SDS-PAGE, 分离胶的质量浓度 12%, 浓缩胶质量浓度 5%, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后用 Bondscan 4.3 软件对电泳图谱进行光密度扫描分析。

1.2.9 包涵体的检测: PBS 洗涤 1.2.7 超声破碎并离心后的沉淀, 用 1 mL 8 mol/L 尿素室温溶解 1 h, 13 000 r/min 离心取上清, SDS-PAGE 检测。

1.2.10 TIR 最小生成自由能分析: 利用 RNAstructure 5.03 软件对各表达质粒目的基因 mRNA 的 TIR 最小生成自由能(ΔG)进行分析预测。

2 结果与分析

2.1 *xynB₆₄* 基因 CDS 及两侧酶切位点的测序分析结果

测序结果表明, 基因序列跟杨梦华等^[4]的结果相同, 即第 64 位碱基由 A 变为 G, 导致第 22 位氨基酸由天冬酰胺变为天冬氨酸, 酶学性质表明最适 pH 6.6–6.8, 高于裴建军等测得的最适 pH 5.4–5.8^[14] (64 位碱基未突变); 两侧的酶切位点分别为 *Nco* I 和 *Hind* III, 也因为 N 端采用 *Nco* I 位点, 导致第 4 位碱基由 A 变为 G, 第 2 位氨基酸由赖氨酸变为谷氨酸。

2.2 稀有密码子分析结果

由 <http://pir.uniprot.org/taxonomy/> 查询可知, *Thermotoga maritima* MSB8 属于细菌域的热袍菌门, 而 *Escherichia coli* 属于细菌域的变形菌门, *Thermotoga maritima* MSB8 所产生的木聚糖酶 B 的基因中一些密码子对 *Escherichia coli* 来说是稀有密码子,

例如编码 Arg 的 AGG、AGA、CGG、CGA; 编码 Gly 的 GGA; 编码 Ile 的 AUA; 编码 Leu 的 CUA; 编码 Pro 的 CCC。

xynB₆₄ 基因序列中稀有密码子见图 1 下划线部分, 无 CGG、CGA 和 CUA, 为此选择了 2 种补充稀有密码子所对应 tRNA 基因的宿主菌: BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 Rosetta(DE3)来研究稀有密码子对 *xynB₆₄* 基因表达的影响。

2.3 二硫键分析结果

该酶的氨基酸序列中共有 4 个半胱氨酸残基, 其中有 1 个位于第 14 位(在前 19 位氨基酸组成的信号肽内^[6]), 酶的实际三维结构(从第 23 位氨基酸开始^[13])中没有发现二硫键, 不排除在大肠杆菌中表达时, 半胱氨酸误搭形成二硫键, 进而导致包涵体产生的可能, 突变部分跟二硫键形成无关。

2.4 重组质粒的构建及鉴定

重组质粒图谱见图 2, 重组质粒双酶切结果见图 3, 测序结果表明成功构建了重组质粒 pET32a(+)-*xynB₆₄*、pET42a(+)-*xynB₆₄*、pET43.1a(+)-*xynB₆₄* 和 pMAL-c2X-*xynB₆₄*。

```

ATG GAA ATA TTA CCT TCT GTG TTG ATC CTT TTG TTG GGA TGT GTT CCA GTT TTC AGC TCT      60
CAG GAT GTA TCT CTG AGA GAA CTC GCA GAA AAG CTG AAC ATC TAT ATT GGT TTT GCC GCA      120
ATC AAC AAC TTT TGG TCT CTT TCC GAC GCA GAA AAG TAC ATG GAA GTT GCA AGA AGA GAA      180
TTC AAC ATC CTG ACC CCT GAG AAC CAG ATG AAG TGG GAT ACG ATT CAT CCA GAA AGA GAC      240
AGA TAC AAT TTC ACT CCC GCT GAA AAA CAC GTT GAG TTT GCA GAA GAA AAC GAC ATG ATC      300
GTG CAT GGA CAC ACT CTT GTC TGG CAC AAC CAG CTT CCT GGA TGG ATC ACT GGT AGA GAA      360
TGG ACA AAG GAA GAA CTT TTG AAC GTT CTT GAA GAC CAC ATA AAA ACG GTG GTG TCT CAT      420
TTC AAA GGT AGA GTG AAG ATC TGG GAT GTG GTG AAC GAA GCG GTG AGC GAT TCT GGA ACC      480
TAC AGG GAA AGC GTG TGG TAC AAG ACG ATC GGT CCT GAA TAC ATT GAA AAA GCG TTC AGA      540
TGG GCA AAA GAA GCC GAT CCA GAT GCG ATT CTC ATC TAC AAC GAC TAC AGC ATA GAA GAA      600
ATC AAC GCA AAA TCG AAC TTC GTC TAC AAC ATG ATA AAA GAG CTG AAA GAA AAG GGA GTA      660
CCT GTT GAT GGA ATA GGA TTT CAG ATG CAC ATA GAC TAC AGA GGG CTC AAT TAT GAC AGT      720
TTC AGA AGG AAT TTG GAG AGA TTT GCG AAA CTC GGT CTT CAA ATA TAC ATC ACA GAG ATG      780
GAT GTG AGA ATT CCT CTC AGT GGT TCG GAG GAG TAT TAT TTG AAA AAA CAG GCT GAA GTT      840
TGT GCG AAG ATC TTC GAT ATA TGC TTG GAC AAC CCT GCA GTT AAA GCG ATC CAG TTT TGG      900
GGA TTC ACA GAC AAA TAC TCC TGG GTT CCC GGC TTT TTC AAA GGG TAC GGG AAA GCG TTG      960
CTC TTC GAT GAG AAT TAC AAC CCC AAG CCT TGT TAT TAC GCG ATA AAA GAG GTG CTG GAG      1 020
AAA AAG ATA GAA GAA AGA AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA      1 080

```

图1 稀有密码子分析

Fig. 1 Rare codons of *xynB₆₄*

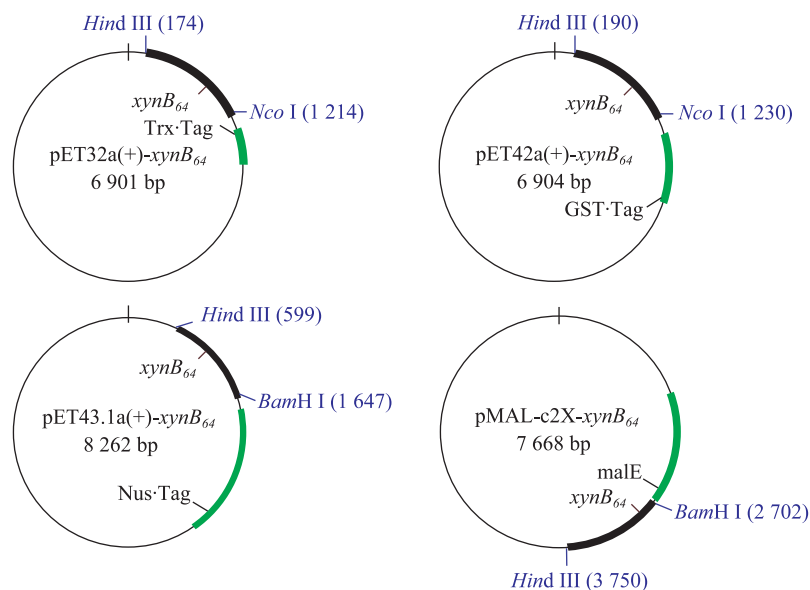


图2 重组质粒图谱

Fig. 2 Recombinant expression plasmids map

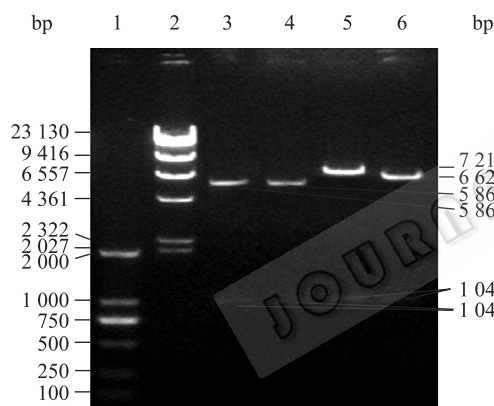


图3 重组质粒双酶切

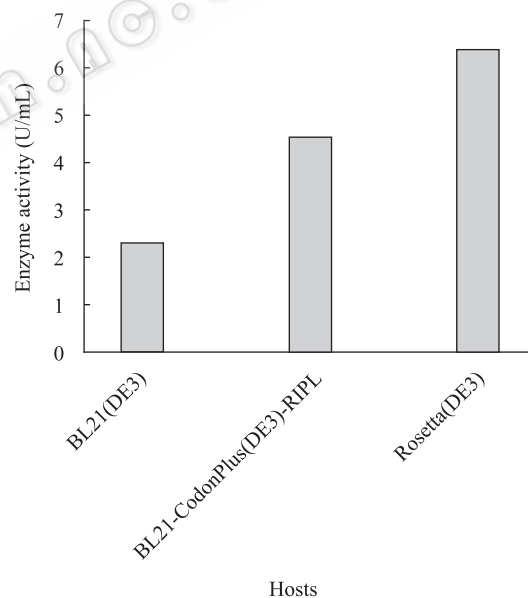
Fig. 3 Identification of recombinant expression plasmids

注: 1: DL2 000TM DNA marker; 2: λ -Hind III digest DNA marker; 3: pET32a(+)-*xynB*₆₄; 4: pET42a(+)-*xynB*₆₄; 5: pET43.1a(+)-*xynB*₆₄; 6: pMAL-c2X-*xynB*₆₄.

Note: 1: DL2 000TM DNA marker; 2: λ -Hind III digest DNA marker; 3: pET32a(+)-*xynB*₆₄; 4: pET42a(+)-*xynB*₆₄; 5: pET43.1a(+)-*xynB*₆₄; 6: pMAL-c2X-*xynB*₆₄.

2.5 pET28a(+)-*xynB*₆₄ 在不同宿主中的表达

pET28a(+)-*xynB*₆₄ 在 BL21(DE3)、BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL、Rosetta(DE3)中的表达情况见图4。BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 补充了4种稀有 tRNA 基因, Rosetta(DE3)补充了6种稀有 tRNA 基因, 酶活分别较 BL21(DE3)提高了197%和277%,

图4 pET28a(+)-*xynB*₆₄ 在不同宿主中的表达Fig. 4 pET28a(+)-*xynB*₆₄ express in different hosts

说明稀有密码子限制了 *xynB*₆₄ 的表达, 补充稀有 tRNA 基因种类不足也会导致表达受限, 在接下来的实验中都采用 Rosetta(DE3)作为宿主。

2.6 不同表达载体在 Rosetta(DE3)中的表达

Rosetta(DE3)/pET28a(+)-*xynB*₆₄、Rosetta(DE3)/pET32a(+)-*xynB*₆₄、Rosetta(DE3)/pET42a(+)-*xynB*₆₄、

Rosetta(DE3)/pET43.1a(+)-*xynB₆₄* 和 Rosetta(DE3)/pMAL-c2X-*xynB₆₄* 的表达情况见图 5。N 端融合标签蛋白后, 会不同程度的影响酶活, 影响最小的是 MBP 标签, 酶活下降了 12%。

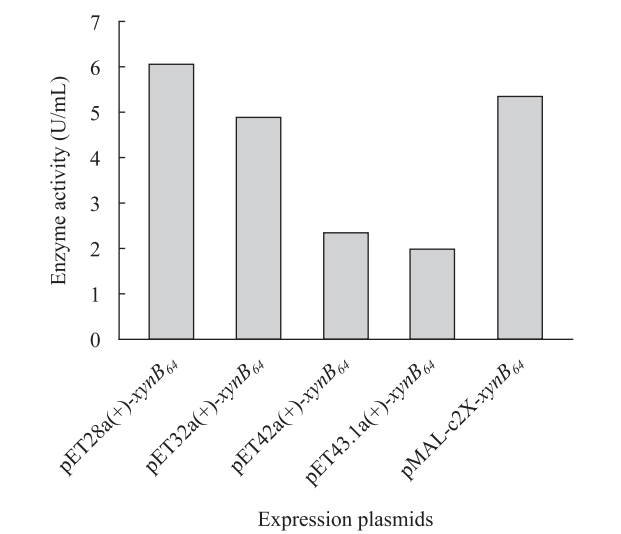


图 5 不同表达载体在 Rosetta(DE3)中的表达
Fig. 5 Recombinant expression plasmids express in Rosetta (DE3)

2.7 不同表达载体在 Rosetta(DE3)中的表达量及包涵体的检测

Rosetta(DE3)/pET28a(+)-*xynB₆₄*、Rosetta(DE3)/pET32a(+)-*xynB₆₄*、Rosetta(DE3)/pET42a(+)-*xynB₆₄*、Rosetta(DE3)/pET43.1a(+)-*xynB₆₄* 和 Rosetta(DE3)/pMAL-c2X-*xynB₆₄* 的表达量见图 6, 包涵体检测见图 7, Trx、GST、MBP 标签都能提高目的蛋白的表达量, 特别是融合 MBP 标签后, 表达量能达到全细胞的 40%左右, 且基本不形成包涵体。

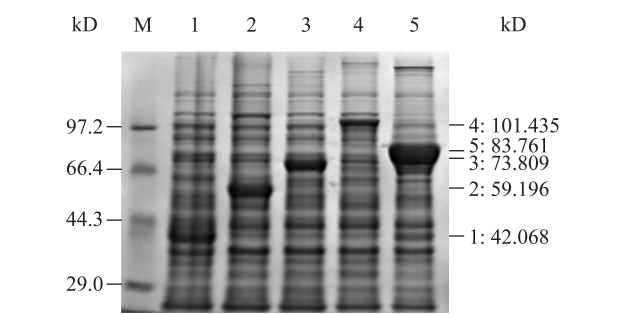


图 6 全细胞 SDS-PAGE
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of whole cell proteins

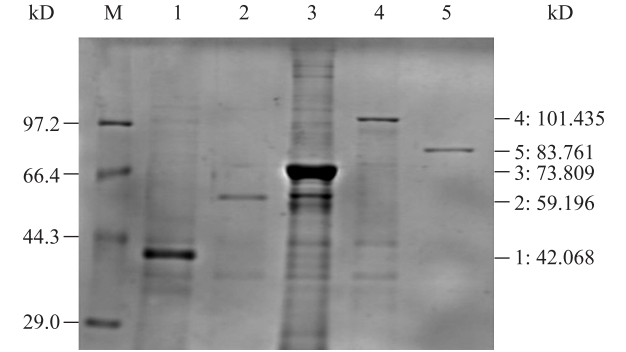


图 7 包涵体 SDS-PAGE
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of inclusion body
注: M: 蛋白质分子量标准(低); 1: Rosetta(DE3)/pET28a(+)-*xynB₆₄*; 2: Rosetta(DE3)/pET32a(+)-*xynB₆₄*; 3: Rosetta(DE3)/pET42a(+)-*xynB₆₄*; 4: Rosetta(DE3)/pET43.1a(+)-*xynB₆₄*; 5: Rosetta(DE3)/pMAL-c2X-*xynB₆₄*.
Note: M: Protein molecular weight marker (Low); 1: Rosetta(DE3)/pET28a(+)-*xynB₆₄*; 2: Rosetta(DE3)/pET32a(+)-*xynB₆₄*; 3: Rosetta(DE3)/pET42a(+)-*xynB₆₄*; 4: Rosetta(DE3)/pET43.1a(+)-*xynB₆₄*; 5: Rosetta(DE3)/pMAL-c2X-*xynB₆₄*.

2.8 TIR 最小生成自由能预测结果

分别选取 pET28a(+)-*xynB₆₄*、pET32a(+)-*xynB₆₄*、pET42a(+)-*xynB₆₄*、pET43.1a(+)-*xynB₆₄* 和 pMAL-c2X-*xynB₆₄* 目的基因 mRNA 的翻译起始点 -34+36^[10]、-30+70^[15]、+1+78^[16]和-41+36^[17]位碱基进行分析, 最小自由能(ΔG)预测见表 3。一般认为, mRNA 的 TIR 存在稳定的二级结构对翻译起始不利, 当其稳定性降低时(表现为 TIR 生成自由能变小), 有利于目的蛋白表达量的提高^[15]。从图 6 可知, 表达量顺序是: pMAL-c2X-*xynB₆₄*>pET32a(+)-*xynB₆₄*>pET42a(+)-*xynB₆₄*>pET28a(+)-*xynB₆₄*>pET43.1a(+)-*xynB₆₄*, 单按上述 4 篇文献中的自定义 TIR 最小生成自由能, 上述顺序完全不成立, 只有取表 3 中下划线部分的数据时, 上述顺序才基本成立。

表 3 TIR 最小生成自由能(ΔG kcal/mol)				
Table 3 The minimal formation free energy of TIR (ΔG kcal/mol)				
表达载体 Expression vectors	-34+36	-30+70	+1+78	-41+36
pET28a(+)- <i>xynB₆₄</i>	<u>-11.5</u>	-21.4	-16.3	<u>-12.6</u>
pET32a(+)- <i>xynB₆₄</i>	-6.0	<u>-10.3</u>	-17.3	<u>-9.1</u>
pET42a(+)- <i>xynB₆₄</i>	-13.3	-13.8	<u>-11.4</u>	-13.3
pET43.1a(+)- <i>xynB₆₄</i>	-9.6	<u>-15.3</u>	-13.6	-10.4
pMAL-c2X- <i>xynB₆₄</i>	<u>-5.5</u>	-15.3	-13.9	-10.9

3 讨论

前期准备实验研究了实验室保藏的基因工程菌 1020^[11], 通过优化培养条件, 优化诱导条件, 甚至高密度发酵后发现表达水平仍不理想。本文通过测序并与 Genbank 中 *Thermotoga maritima* MSB8 的木聚糖酶 B 基因序列进行比对, 然后分析稀有密码子分布, 结果显示 *xynB* 基因跟前人报道的有差别, 关键差别在第 64 位碱基由 A 变为 G, 导致第 22 位氨基酸由 Asn 变为 Asp; 由于 N 端采用 *Nco* I 位点, 导致第 4 位碱基由 A 变为 G, 第 2 位氨基酸由赖氨酸变为谷氨酸; C 端又由于采用 *Hind* III 位点和融合 6×His 而带入了 CTTGCGGCCGCACTCGAGCAC CACCACCACCACCT(分别编码 LeuAlaAlaAla LeuGluHisHisHisHisHisHis), 这些变化导致酶的最适 pH 由 5.4–5.8 提高到 6.6–6.8; *xynB*₆₄ 中大肠杆菌使用频率较少的密码子达 10.34%, 分别在 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 和 Rosetta(DE3)中表达, 结果酶活分别提高了 1.97 倍和 2.77 倍, 而两者的主要区别在于 Rosetta(DE3)多补充了 2 种稀有 tRNA 基因: *argW* 和 *glyT*, 说明密码子的优化对酶活的提高具有重要作用。

文献报道^[18]在目的基因 N 端融合 Trx、GST、Nus 和 MBP 标签后, 可以提高翻译起始效率, 除 GST 标签外都可以提高可溶性。在本实验中, Trx 标签可以提高表达量和可溶性, 但是不利于获得高酶活, 可能融合 Trx 标签后影响了酶的空间结构; 融合 GST 标签后, 可能是因为翻译过快而形成大量包涵体; Nus 标签可能是因为太大, 消耗了过多的代谢能量, 也可能是其目的基因 mRNA 的 TIR 生成自由能确实比 pET28a(+)-*xynB*₆₄ 的大, 从而导致表达量变小; 而采用 *P*_{tac}, 并融合 MBP 标签后却意外地获得了很高的表达量及可溶性, 需要注意的是, 在表达量和可溶性提高的同时, 酶活受到较大影响, 可能跟酶的空间结构有关系。另外分析了各表达载体目的基因 mRNA 的 TIR 最小生成自由能, 由表 3 可知选取碱基位置、数目的不同导致自由能变化剧烈, 而文献普遍报道^[10,15–17]突变部分碱基或者换用载体, 然后用软件预测目的基因 mRNA 的自定义 TIR

最小生成自由能, 得出其值下降就能提高表达水平的结论, 本文的实验结果至少可以表明这样的做法存在 4 个潜在的问题: (1) TIR 选取缺乏依据; (2) 实验数据偏少, 影响因素太多, 可能存在偶然性; (3) 只给出最小生成自由能及此时的 mRNA 二级结构, 而真实自由能和二级结构并不一定符合软件给出的最优值; (4) 预测软件的算法基于热力学数据, 热力学数据的精确性可能会影响预测的结果。

酵母表达系统具有可以分泌表达的优点, 但是根据目前的文献报道^[4,12], 酵母表达系统有一系列缺点: 生长慢、表达水平低、表达系统可选择范围少, 而且基因来源于原核生物, 所以以后的研究仍应以大肠杆菌为主, 结合前人成功的报道, 想要获得高表达量、高度可溶、高活性和易纯化的稳定生产耐热耐碱木聚糖酶的工程菌, 可能的策略为: 合成一条去除前 57 位碱基并且第 64 位碱基突变的不含稀有密码子的 C 端带有 His 标签的 *xynB* 基因, 然后克隆到由 σ^{32} 识别和启动外源基因表达的卡那抗性载体, 转化 *ompT*、*lon* 和 *rne131* 突变的宿主, 如果可溶性不够可以融合 MBP 或者其他更优的标签(最后可以用相应酶或因子的切除标签), 然后以 TB 培养基为基础, 用响应面法确定最佳培养条件, 最后用高密度发酵方法获得工业化水平的酶产量。

参考文献

- [1] 包怡红. 木聚糖酶工程菌的构建[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2005: 1.
- [2] Komatsu T, Ishihara S, Tsuchida E, et al. Heat-resistant oxygen-carrying hemoproteins consist of recombinant xylanases and synthetic iron(II) porphyrin[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(3): 1489–1494.
- [3] 江正强. 海栖热袍菌 *xynB* 基因的克隆和表达、重组木聚糖酶的提纯及其酶学性质[D]. 北京: 中国农业大学博士毕业论文, 2001.
- [4] 杨梦华, 李颖, 关国华, 等. 极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 236–240.
- [5] Jiang ZQ, Deng W, Zhu YP, et al. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique

- character for industrial applications[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 27(4/6): 207–213.
- [6] 邵蔚蓝, 裴建军, 李相前. 大幅度提高海栖热袍菌木聚糖酶 B 基因表达水平的技术方案[P]. CN, 1451753A. 2003-10-29.
- [7] Kittur FS, Mangala SL, Rus'd AA, et al. Fusion of family 2b carbohydrate-binding module increases the catalytic activity of a xylanase from *Thermotoga maritima* to soluble xylan[J]. FEBS Letters, 2003, 549(1/3): 147–151.
- [8] 江正强, 李里特, 林清, 等. 极端嗜热菌海栖热袍菌木聚糖酶 B 的克隆和表达[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 280–284.
- [9] 薛业敏, 毛忠贵, 邵蔚蓝. 极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11): 20–25.
- [10] Wu HW, Pei JJ, Wu GG, et al. Overexpression of GH10 endoxylanase *xynB* from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(3): 230–234.
- [11] 朱孝霖, 李环, 韦萍. 耐热木聚糖酶发酵培养基的复合合法优化[J]. 西安工程大学学报, 2008, 22(2): 166–170.
- [12] 李颖, 印铁, 关国华, 等. 耐高温木聚糖酶基因在乳酸克鲁维酵母中的表达[P]. CN, 101372694A. 2009-02-25.
- [13] Ihsanawati, Kumasaka T, Kaneko T, et al. Structural basis of the substrate subsite and the highly thermal stability of xylanase 10B from *Thermotoga maritima* MSB8[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2005, 61(4): 999–1009.
- [14] 裴建军, 李迅, 李相前, 等. 大肠杆菌生产重组极耐热木聚糖酶的诱导条件及其酶学性质[J]. 食品与生物技术, 2004, 23(4): 94–97.
- [15] 尹春光, 杜立新, 赵桂平, 等. Mx 基因稀有密码子和 mRNA 结构及大肠杆菌表达优化[J]. 遗传, 2009, 31(1): 75–82.
- [16] 王珊珊, 张荣珍, 耿亚维, 等. mRNA 翻译起始区二级结构优化提高(R)-羧基还原酶的表达及催化效率[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 1907–1913.
- [17] Yin EK, Le YL, Pei JJ, et al. High-level expression of the xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(2): 275–280.
- [18] Waugh DS. Making the most of affinity tags[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(6): 316–320.

书 讯

父亲和我们

——纪念中国首批青霉素的研制者和命名者樊庆笙教授百年诞辰

本书作者樊真美以女儿的视角叙述了父亲坎坷的不平凡的一生,也记录了儿女们受父母的影响和教育曲折的成长过程。凸显了父亲这样一个老一代知识分子赤诚的爱国之心,为实现强国梦付出毕生心血的奉献精神 and 历经磨难的不屈不挠的奋斗精神。

本书由北京时代文献出版社出版。

定价: 38 元

邮费: 1 本 5.5 元, 2 本 7 元, 3 本 9 元(一律加挂号费 3 元)

需购者请与作者樊真美联系。

地址: 南京嫩江路 20 号四季园 23 号 402 室

邮编: 210036

电话: 010-83418856