

文章编号:1673-1689(2009)01-0086-05

短芽孢杆菌耐碱性木聚糖酶(*xyIB*)的 分子生物学研究

胡春霞^{1,2}, 陆平¹, 李卫芬¹, 许梓荣¹

(1. 浙江大学 教育部动物分子营养重点实验室, 浙江 杭州 310029; 2. 绍兴文理学院 元培学院 生命科学系, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 根据已发表的环状芽孢杆菌(*Bacillus circulan*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)木聚糖酶基因序列设计引物,首次扩增出短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)中的 β -1,4-内切木聚糖酶(以下简称木聚糖酶, E. C. 3. 2. 1. 8)基因片段。序列分析表明,该基因与已登录的木聚糖酶基因 AF490979.1 和 AF490980.1 分别有 97% 和 96% 的同源性,与其它芽孢杆菌属的同源性也较高。将此基因片段插入表达载体 pET-30a(+)构建重组质粒,转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)。重组基因工程菌破碎后进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果表明, IPTG 诱导后,木聚糖酶基因在大肠杆菌的胞内获得高效表达,且酶活力最高可达 26.14 U/mL。重组木聚糖酶最适温度为 50 °C,最适 pH 为 9.0。

关键词: 木聚糖酶;克隆;表达;大肠杆菌;短芽孢杆菌

中图分类号: Q 55; Q 785; Q 786

文献标识码: A

Study on Xylanase(*xyIB*) Gene from *Bacillus brevis*

HU Chun-xia^{1,2}, LU Ping¹, LI Wei-fen¹, XU Zi-rong¹

(1. Key Laboratory of Animal Molecular Nutrition, Ministry of Education, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Department of Life Science, Shaoxing University Yuanpei College, Shaoxing 312000, China)

Abstract: In this study, a pairs of primers were designed according to the published nucleotide sequences of putative xylanase genes of *Bacillus circulan* and *Bacillus subtilis*. With the specific primers, a target fragment of the β -1,4-endo-xylanase gene was firstly amplified from *Bacillus brevis* L8. Sequence analyses showed the homology of the cloned gene to AF490979.1 and AF490980.1 were 97% and 96%, respectively. The recombinant expression plasmid was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE demonstrated that the β -1, 4-endo-xylanase protein gene were expressed extracellularly in *E. coli* BL21 (DE3) successfully. A maximum activity of 26.14 U/mL achieved gotten from cellular extract of pET-30a-*xyIB*[BL21] induced by IPTG. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were 9.0 and 50 °C,

收稿日期:2007-12-29

基金项目:浙江省重大科技专项(2006C12086)。

作者简介:胡春霞(1976-),女,河南信阳人,分子生物学博士研究生。

* 通讯作者:李卫芬(1965-),女,江苏张家港人,研究员,主要从事微生物基因工程和酶工程的研究。

Email: wfli@zju.edu.cn

respectively.

Key words: alkaline xylanase, gene cloning and expression, sequence analysis, *Bacillus brevis*, *Escherichia coli*

木聚糖是自然界第二大类杂多糖,是半纤维素的一种主要成分。木聚糖成分复杂,其主链骨架由 β -D-吡喃型木糖残基经 β -1,4-糖苷键连接起来,侧链随来源的不同而异。因此,木聚糖的完全水解需要一系列酶的协同作用^[1]。这些酶包括 β -1,4-内切木聚糖酶, β -木糖苷酶, α -葡糖苷酸酶及酚酸酯酶等。其中 β -1,4-内切木聚糖酶(EC 3. 2. 1. 8)能降解木聚糖主链上木糖残基之间的 β -1,4-糖苷键,将长碳链骨架降解成短链的木寡糖,是水解木聚糖主链糖苷键的关键酶。因此狭义上的木聚糖酶(xylanases)通常只是指 β -1,4-内切木聚糖酶。木聚糖酶广泛存在于细菌、真菌及藻类等微生物中^[2],来源不同其性质也不尽相同。到目前为止,已有近百种来自细菌或真菌的木聚糖酶基因已被克隆或表达^[3-5]。其中芽孢杆菌来源的木聚糖酶基因也有很多报道,但有关短芽孢杆菌(*B. brevis*)的木聚糖酶基因克隆和表达的研究国内外至今尚未见报道。另外,木聚糖酶通常作用 pH 范围是在偏酸性或中性,只有少数在碱性范围^[6-7]。本研究中克隆和在大肠杆菌中表达了 *B. brevis* L8 木聚糖酶基因,并分析了表达产物的酶学特性。研究结果为进一步探讨木聚糖酶结构与功能的关系奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株、载体与主要试剂

短芽孢杆菌(*B. brevis*) L8、*E. coli* Top10、*E. coli* BL21(DE3)和质粒 pET-30a(+)由作者所在实验室保存;pUCm-T vector 购自 Promega 公司;木聚糖购自 Sigma 公司;X-Gal、IPTG、T₄DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶和各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司(大连);DNA Marker 购自 MBI 公司(Maryland);DNA 抽提试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司;质粒提取试剂盒、PCR 清洗试剂盒、割胶回收试剂盒和 PCR 试剂均为 Sangon(上海)公司产品;其它常规试剂均为国产分析纯。

1.2 PCR 扩增

参照 Genbank 上环状芽孢杆菌(*B. circulans*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的多个木聚糖酶基因序列,设计了一对引物,由上海英骏生物技术有限公司合成,序列及酶切位点如下:

5*PxydB*:5'-AGGGGATCCATGTTTAAGTT
TAAAAAGAAT-3'(*Bam*H I)

3*PxydB*:5'-GATCTCGAGTTACCACACTG
TTACGTTA-3'(*Xho*I)

以短芽孢杆菌基因组为模板进行木聚糖酶基因的扩增反应。PCR 反应体系(50 μ L)为:10 \times PCR 缓冲液(含 Mg²⁺)5 μ L, dNTP(10 mmol/L)1 μ L,引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, Taq plus (2.5~5.0 U/ μ L)0.5 μ L,无酶水 40.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,进行 32 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应在 PTC-200 型热循环仪上进行。质量分数 1%琼脂糖电泳,紫外灯下观察结果,自动凝胶成像扫描仪分析。

1.3 目的片段的克隆及测序

割胶回收目的片段,与 pUCm-T Vector 连接后,转化 *E. coli* Top 10 感受态细胞,在涂有 IPTG 和 X-gal 的含 Amp⁺ 的 LB 平板上涂布进行蓝白斑初步筛选,挑取白色菌落提取质粒 PCR 鉴定为阳性后送往上海英骏生物工程公司测序,阳性克隆子命名为 pUCm-T-*xydB*。

1.4 重组表达质粒及基因工程菌的构建

分别用 *Bam*HI/*Xho*I 双酶切 pET-30a(+)质粒与 pUCm-T-*xydB*,回收酶切好的载体和目的片段,T4 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接,CaCl₂ 法转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布于含 100 μ g/mL Kana⁺ 的 LB 平板上,随机挑取菌落,抽提重组质粒,进行双酶切鉴定。阳性重组表达质粒命名为 pET-30a-*xydB*,阳性重组基因工程菌命名为 pET-30a-*xydB*[BL21]。

1.5 目的蛋白质的 SDS-PAGE

将重组基因工程菌 pET-30a-*xydB*[BL21]和对照 pET-30a[BL21](空质粒 pET-30a 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)菌株)接种于 2.0 mL 含 Kana⁺ (终质量浓度为 100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡培养过夜,再以 1:50 的体积比转接于 50 mL 含 Kana⁺ 的新鲜 LB 中,220 r/min 摇培至 OD₆₀₀ 到 0.6 左右,经终浓度为 1 mmol/L IPTG 的诱导培养 6 h。菌液 4 $^{\circ}$ C 离心收集细菌,菌体用磷酸盐缓冲液悬浮、超声波破碎处

理后,加入5×SDS-PAGE上样缓冲液裂解,沸水浴变性10 min,4℃12 000 r/min离心10 min,取上清液10 μL按常规方法在小型蛋白电泳仪上进行SDS-PAGE恒压凝胶电泳。浓缩胶质量分数为5%,分离胶质量分数为12%,电压为80 V。

1.6 木聚糖酶学特性

1.6.1 粗酶液的制备 阳性表达子诱导表达后,收集菌体。用超声波破碎后,4℃12 000 r/min离心10 min,取上清液即为粗酶液,用于酶活力测定和酶学特性分析。

1.6.2 酶活力测定和特性分析 测定参照 Miller 等文献^[8]。酶活力单位(U)定义:每秒钟产生1 μmol木糖的酶量为1个单位的木聚糖酶活力。

酶的最适温度及热稳定性:在pH 7.0,反应20 min的条件下,于40~90℃范围内,每隔10℃,分别测定酶活,以最高酶活为100%计算相对酶活,由此确定酶的最适作用温度。酶热稳定性测定,酶液分别在40、50、60、70、80℃处理20 min后,立即冰浴;按常规方法测定残余酶活性,以未保温(4℃保存)的酶样活性为100%。

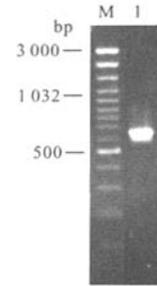
最适pH及pH稳定性:在最适反应温度下,分别测定不同pH条件下酶活,以酶活最高为100%计算相对活性,由此确定酶的最适pH值。酶液在不同pH值条件下于40℃保温1 h,再分别测定残留酶活性。反应所用的缓冲液为0.1 mol/L磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 3.0~7.0),磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH 8.0)和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0~10.0)。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆和序列分析

以短芽孢杆菌基因组为模板进行PCR扩增,产物经质量分数1%的琼脂糖凝胶电泳,结果如图1所示,在约650 bp处有条带出现,与预期大小一致。阳性克隆子的测序结果及分析表明:短芽孢杆菌木聚糖酶基因大小为642 bp,登录号为DQ100303。经Blast同源性分析,该序列与已登录的枯草芽孢杆菌和环状芽孢杆菌木聚糖酶基因(*B. subtilis* AF490979.1, *B. circulans* AF490980.1)的同源性分别为97%和96%,与其它芽孢杆菌属的同源性也较高。这是有关短芽孢杆菌木聚糖酶基因的第一次报道。经DNATool 5.1和SignalP 3.0 Server分析,表明该基因编码213个氨基酸残基,理论分子量为23.3 kD,等电点为10.30,前28个氨基酸为信号肽序列,具有典型的信号肽特征,成熟肽的理

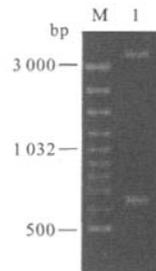
论分子量为20.2 kD,等电点为9.93。



M. 3000 bp DNA marker; 1. *xyIB* 基因 PCR 产物
图1 短芽孢杆菌 *xyIB* 基因的 PCR 扩增电泳图谱
Fig. 1 PCR amplification of *xyIB* gene of *B. brevis*

2.2 木聚糖酶基因表达和 SDS-PAGE 分析

目的片段与 pET-30a(+) 分别经 *Bam*H 和 *Xho*I 双酶切后连接,连接产物转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,挑斑进行菌液 PCR 鉴定,得阳性表达子,重组表达载体命名为 pET-30a-*xyIB*。将重组表达质粒 pET-30a-*xyIB* 经 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切后,得到一条目的条带,见图2。与预期结果相符,说明重组表达质粒成功转入大肠杆菌,重组菌命名为 pET-30a-*xyIB*[BL21]。



M. 3000 bp DNA marker; 1. pET-*xyIB* digested by *Bam*H I/
*Xho*I

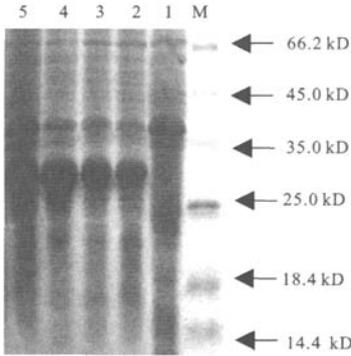
图2 重组质粒 pET-*xyIB* 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction pattern of pET-*xyIB*

重组菌 pET-30a-*xyIB*[BL21] 经 IPTG 诱导表达,木聚糖酶活力最高可达 26.14 U/mL。SDS-PAGE 电泳结果显示(见图3):与只含空质粒的对照相比,经终浓度为 1 mmol/mL IPTG 的诱导表达,重组菌的冰道有一条约为 29 kD 的特异性条带,与融合表达产物大小相当,且条带浓度随诱导时间一致渐深。说明酶的表达量呈时间梯度增加,至 16 h 达最高。

2.3 重组木聚糖酶的性质

2.3.1 重组木聚糖酶的最适温度和热稳定性 该重组酶的反应最适温度为 50℃(见图4),反应温度



M. protein marker; 1. pET-30a[BL21]; 2. pET-30a-xyI/B [BL21] induced 2 h; 3. pET-30a-xyI/B [BL21] induced 4 h; 4. pET-30a-xyI/B [BL21] induced 8 h; 5. pET-30a-xyI/B [BL21] induced 16 h.

图 3 重组木聚糖酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the recombinant expressed xylanase by SDS-PAGE

为 80 °C 时,其相对酶活力为 21%,但到 90 °C 时,相对酶活只有 4.6%。由图 5 可知,在温度低于 50 °C 时该酶活性较稳定,当温度高于 50 °C 时,酶活性下降较快,酶液在 60 °C 处理 20 min 其残余酶活力仅为 5.2%。

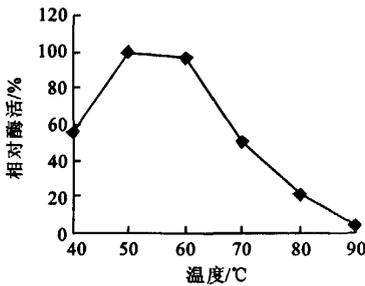


图 4 温度对重组表达木聚糖酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on xylanase activity

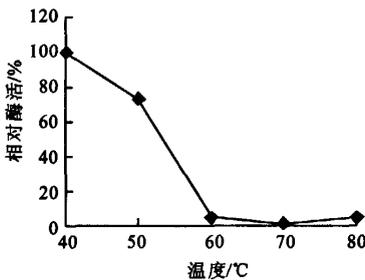


图 5 重组表达木聚糖酶的热稳定性

Fig. 5 Thermostability of xylanase

2.3.2 重组木聚糖酶的最适 pH 和 pH 稳定性
该重组酶的最适反应 pH 为 9.0(见图 6),属于耐碱性木聚糖酶;当 pH < 6 时,相对酶活几乎为零。由

图 7 可知,该木聚糖酶在 pH 5.0~10.0 的范围内较稳定。当 pH < 5 时,该酶的稳定性很差,酶液在 pH 4.0、40 °C 下保存 1 h,酶活损失将近 90%。

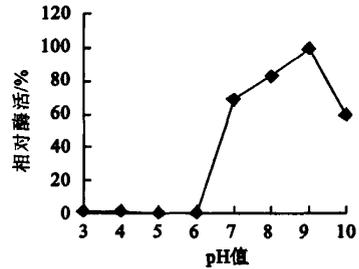


图 6 pH 值对重组表达木聚糖酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on xylanase activity

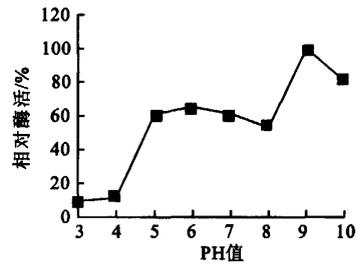


图 7 重组表达木聚糖酶的 pH 值稳定性

Fig. 7 Effect of pH on enzyme stability

3 结 语

自 20 世纪 60 年代开始,木聚糖酶应用领域不断扩大,其在食品、饲料、造纸、纺织、酿酒、医药、环境和能源等工业中都有应用,特别是在食品和饲料工业中已得到了广泛的应用,前景十分看好。本研究中首次从短芽孢杆菌中成功克隆到木聚糖酶基因,序列分析发现其与已登录的其它芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌、环状芽孢杆菌等均具有很高的同源性。这些基因之间的高同源性说明芽孢杆菌木聚糖酶的进化保守性,同时又有一定的差异,赋予了各自特异性的进化,以适应各自的生活史。作者成功地利用大肠杆菌异源表达了具有生物学活性的重组木聚糖酶。而且还融合了 6 个组氨酸作为标签,为下一步通过金属离子亲和层析柱纯化得到单一的木聚糖酶打下了基础。重组表达木聚糖酶的最适温度和最优 pH 均与刘伟丰等^[9]报道的短小芽孢杆菌来源和 Nakamura 等^[6]报道的嗜碱芽孢杆菌来源的木聚糖酶性质相似。说明酶分子 N 端的融合肽对其酶学特性没有显著影响。

嗜碱性木聚糖酶(包括嗜热、嗜碱和嗜酸等)在提高效率、降低成本、稳定性提高及减少环境污染方面有着很大的优势。如在食品工业中,很多加工

都离不开热处理,这就要求木聚糖酶即使在较高的温度下仍不会大幅度地丧失活性;在造纸工业中,木聚糖酶应用在纸浆漂白的环境为碱性,酶在高 pH 值的环境下依然能保持较高的活性便成为关键因素^[10]。因此,通过基因工程技术构建木聚糖酶高产工程菌以及改良木聚糖酶性质已是目前研究方向之一^[11]。对木聚糖酶基因进行突变可以改变木聚糖酶的性质,如酶活性、热稳定性和 pH 稳定性等,对该酶在工业生产上的应用具有十分重要的意义。Umemoto 等比较了碱性木聚糖酶 XynJ 和中

性木聚糖酶的蛋白质结构,发现在 XynJ 的催化部位存在几个特殊的盐键。将构成特殊盐键的氨基酸 Arg48、Lys51 和 Lys52 均突变成 Gln 以破坏这些盐键,结果发现,突变酶最适 pH 由亲本酶的 9 变成了 7,得出结论这几个盐键对该木聚糖酶的耐碱性有一定的贡献^[12]。目前作者所在实验室也正在进一步研究木聚糖酶结构与功能之间的关系,尝试通过定点突变等方法对酶活力及热稳定性进行改造,试图进一步提高酶的活性或耐碱性能,为该酶的工业应用提供基础材料。

参考文献(References):

- [1] 怀文辉,何秀萍,郭文洁,等. 微生物木聚糖酶降解酶研究进展及应用前景[J]. 微生物学通报,2000,27(2):137-139.
HUAI Wen-hui, HE Xiu-ping, GUO Wen-jie, et al. Advance and prospect of microbial xylanolytic enzyme system [J]. *Microbiology*, 2000, 27(2): 137-139. (in Chinese)
- [2] Beg Q K, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications; a review[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 56(3-4): 326-338.
- [3] la Grange D C, Pretorius I S, van Zyl W H. Expression of a *Trichoderma reesei* beta-xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl. Environ Microbiol*, 1996, 62(3): 1036-1044.
- [4] Lee T H, Lim P O, Lee Y E. Cloning, characterization, and expression of xylanase A gene from *Paenibacillus* sp. DG-22 in *Escherichia coli*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(1): 29-36.
- [5] 邬敏辰,符丹丹,朱劭,等. 宇佐美曲霉木聚糖酶的纯化和性质[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 29-33.
WU Min-chen, FU Dan-dan, ZHU Jie, et al. Purification and some properties of two xylanases from *Aspergillus usami* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6): 29-33. (in Chinese)
- [6] Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, et al. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(7): 2311-2316.
- [7] Taberner C, Sanchez J, Perez P, et al. Cloning and DNA sequencing of *xynA*, a gene encoding an endo- β -1,4-xylanase from an alkaliphilic *Bacillus* strain(N137) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(6): 2420-2424.
- [8] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [9] 刘伟丰,毛爱军,祝令香,等. 短小芽孢杆菌 β -1,4-木聚糖酶基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 455-459.
LIU Wei-feng, MAO Ai-jun, ZHU Ling-xiang, et al. Overexpression of bacillus pumilus β -1,4-Xylanase gene (*xynA*) in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(4): 455-459. (in Chinese)
- [10] 黄六莲,陈礼辉,张建春,等. 碱性木聚糖酶在中小径竹 KP 浆漂白中的应用[J]. 林业科学, 2007, 43(3): 96-102.
HUANG Liu-lian, CHEN Li-hui, ZHANG Jian-chun, et al. Bleaching of bamboo kraft pulp with alkaline xylanase[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2007, 43(3): 96-102. (in Chinese)
- [11] Yang J H, Park J Y, Kim S H, et al. Shifting pH optimum of *Bacillus circulans* xylanase based on molecular modeling [J]. *J Biotechnol*, 2007(10): 30.
- [12] Umemoto H, Ihsanawati, Inami M, et al. Contribution of salt bridges to alkaliphily of *Bacillus* alkaline xylanase[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 2007, 51: 461-462.

(责任编辑:秦和平,李春丽)