

黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因克隆及在毕赤酵母中分泌表达

朱龙宝, 汤斌, 陶玉贵, 葛飞, 魏胜华, 陈涛, 李婉珍

(安徽工程大学 生化学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要: 为大规模制备 β -葡萄糖苷酶, 构建重组酵母工程菌, 实现 β -葡萄糖苷酶的分泌表达。根据已报道黑曲霉 (*Aspergillus niger*) β -葡萄糖苷酶 cDNA 序列设计一对引物, 采用 RT-PCR 扩增, 获得黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因 (*bgl*)。构建了 pMD-18T-*bgl* 克隆载体, *bgl* 亚克隆到质粒 pPIC9K, 构建表达载体 pPIC9K-*bgl*。经 *Bgl* II 线性化后电转入 *Pichia pastoris* GS115, 经过 MD、YPD/G418 平板筛选阳性克隆, 获得分泌表达重组 *P.pastoris* GS115 的工程菌。用终体积分数 1% 的甲醇对其进行诱导表达, SDS-PAGE 和酶活测定结果表明, 重组毕赤酵母分泌了 1 个相对分子质量约 90 000 的蛋白质, 与该酶基因产物的理论值一致。酶催化的最适温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 5.5, 其酶活达到 38 U/mL, 比已报导重组酶产酶水平有较大幅度的提高。

关键词: 黑曲霉; β -葡萄糖苷酶; 毕赤酵母; 基因克隆; 分泌表达

中图分类号: Q 785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)09—0973—05

Cloning and Secreting Expression of the β -Glucosidase Gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* GS115

ZHU Long-bao, TANG Bin, TAO Yu-gui, GE Fei, WEI Sheng-hua, CHEN Tao, LI Wan-zhen

(School of Biochemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Based on the β -glucosidase coding sequences from GeneBank, a β -glucosidase gene was amplified from *Aspergillus niger* by using RT-PCR and vector pMD-18T-*bgl* was constructed. The expression vector pPIC9K-*bgl* was constructed by subcloning the gene into plasmid pPIC9K, and then transformed into *P. pastoris* GS115 through electroporation after linearized by *Bgl* II digestion. The recombinant *P.pastoris* G115 were screened in MD and YPD/G418 plate. The activity of the engineered strain reached to 38 U/mL after induction with the final concentration of 1% methanol. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant *P.pastoris* GS115 had an additional protein band of approximately 90 kD, which was not present in the control, and consistent with the theoretical value of the gene product. The crude enzyme catalysis results indicated that the optimum

收稿日期: 2012-11-23

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2010B014)。

作者简介: 朱龙宝(1979—), 男, 安徽芜湖人, 讲师, 农学硕士, 主要从事生物工程方面的研究。Email: lbzhu2008@126.com

temperature and pH for the activity were about 50 °C and 5.5, respectively.

Keywords: *Aspergillus niger*, β -glucosidase, *Pichia pastoris* GS115, gene cloning, expression

纤维素是重要的可再生生物质资源,在解决能源和环境问题中起到重要作用。纤维素酶高效水解纤维仍然是生物法生产燃料乙醇的一个技术瓶颈^[1]。纤维素被降解为葡萄糖至少需要 3 种纤维素酶,分别是 β -1,4-葡聚糖苷内切酶、纤维二糖水解酶和 β -葡萄糖苷酶,在前两种酶的作用下生成纤维二糖,纤维二糖最终在 β -葡萄糖苷酶的作用下水解成葡萄糖^[2]。纤维二糖和纤维寡糖是纤维素酶系的抑制剂,为了解除其抑制作用,其中的 β -葡萄糖苷酶活性成为纤维素高效降解的关键因素。虽然 β -葡萄糖苷酶也受到自身产物葡萄糖的抑制,但可以通过控制糖化和发酵过程解决^[3]。 β -葡萄糖苷酶对纤维素糖化水解具有关键性作用,但微生物所产纤维素酶系中 β -葡萄糖苷酶所占比例不足 1%,这使得 β -葡萄糖苷酶成为纤维素降解成单糖的关键因素^[4],工业上通过往纤维素酶水解系统中添加 β -葡萄糖苷酶来提高纤维的水解效率^[5]。

微生物中 β -葡萄糖苷酶酶活高的菌种主要是霉菌, *A.niger* 是优良的产 β -葡萄糖苷酶的菌,国内目前对 β -葡萄糖苷酶的研究还主要在 β -葡萄糖苷酶的生产菌种选育和在大肠杆菌中表达,产酶水平低,难以提取纯化^[6-7]。酵母表达系统兼有大肠杆菌表达系统的优势:便于培养,基因操作,成本低,繁殖快,又可对真核基因产物进行翻译后加工,得到有活性的蛋白质。其中选用表达载体 pPIC9K 含有分泌型信号肽,利于胞外表达。通过抗生素浓度梯度筛选得到高拷贝数的基因整合到染色体 DNA 上,在提高表达量的基础上也保证后代的遗传稳定性。唐德芳^[8]在筛选出一株黑曲霉的基础上,进一步构建酵母工程菌,经诱导表达, β -葡萄糖苷酶比活力达 7.85 U/mg,但未报导其发酵产酶水平。陈士华^[9]采用 pPICZaA 载体构建的重组菌在诱导培养 72 h 后,发酵液的酶活力可达到 0.78 U/mL,还不能满足工业化生产要求。为进一步提高产酶水平,作者拟构建酵母工程,实现高效分泌表达 β -葡萄糖苷酶,为解决 β -葡萄糖苷酶产量低、成本高等问题提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

黑曲霉 (*Aspergillus niger*): 购自工业微生物菌种保藏中心; 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115、大肠杆菌 *E.coli* JM109、BL21、pMD-18T 和 pPIC9K 载体: 均购自美国 invitrogen 公司。

1.2 培养基与主要试剂

pfu DNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶、M-MLV 逆转录酶试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、RNA 提取试剂盒、pNPG、DNA marker、G418、琼脂糖、氨苄青霉素、IPTG、X-gal: 均购自上海生工; 各种限制性内切酶: 购自 NEB 公司; LB、YPD、BMGY、BMMY 培养基: 参照 Invitrogen 公司产品使用手册。

1.3 方法

1.3.1 基因克隆 将黑曲霉样品液氮速冻后立即研磨, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 反转录后进行 PCR 扩增, 步骤如下: 将 50 μ L 体系的反应液 (3 μ g RNA, 1 μ L oligodT) 65 °C 变性 5 min, 冰上冷却 5 min。再加入 5 μ L 10 $\times$ buffer, 1 μ L M-MLV 逆转录酶, 0.5 μ L 逆转录酶抑制剂, 37 °C 反应 1 h, 70 °C 变性 10 min。根据 NCBI 数据库中 *Aspergillus niger* 的 *bgl* 基因序列 (GI:159034137), 采用 Premier5 软件设计引物: Primer1: 5'-CGGTAC GATGAGGTTCA CTTTGATCGA-3'; primer2: 5'-CGGCGGCCGCTTAG TGAACAGTAGGCA GAG-3'。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 25 个循环, PCR 产物胶回收, 克隆到 pMD-18T 载体, 构建 pMD-18T-*bgl*, 转化 *E.coli* JM109, 在含有氨苄抗性的 LB 平板挑转化子, 送上海生工测序。

1.3.2 重组表达载体 pPIC9K-*bgl* 的构建 用 *Sna*B I 和 *Not* I 分别双酶切 pMD-18T-*bgl* 和空载体 pPIC9K, 胶回收纯化后于 16 °C 连接过夜, 转化 *E.coli* JM109, 在含有氨苄 (50 μ g/mL) 抗性的 LB 平板挑转化子, 提取重组质粒酶切验证, 阳性克隆即 pPIC9K-*bgl*。

1.3.3 毕赤酵母电击转化、筛选 用 *Bgl*III 线性化重组质粒 pPIC9K-*bgl*, 电转化 100 μ L 感受态毕赤酵母细胞, 对照为 *Bgl*III 线性化 pPIC9K 空载体, 使用 MD 培养基和 MM 培养基对转化子进行初筛, 30 $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落。为获得多拷贝 *bgl* 基因的菌株, 挑取阳性转化子接种于 YPD/G418 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落, G418 质量浓度梯度依次为 0.5、1、2、4 mg/mL, 最后采用 PCR 扩增进行验证。

1.3.4 重组毕赤酵母的培养 将鉴定的阳性克隆单菌落接种至 10 mL YPD 培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 1 mL 培养液接入 50 mL BMGY, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 离心收集菌体, 用 25 mL BMMY 培养基重悬培养, 1% 甲醇诱导表达。分别于 24、48、72、96、120 h 取样, 离心收集上清液, 用 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液在透析袋中过夜透析后测定酶活性。

1.3.5 重组 β -葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 将重组毕赤酵母诱导培养于 50 mL 的 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 72 h。发酵液于 4 $^{\circ}$ C 离心, 8 000 r/min 离心 4 min, 取上清液 40 μ L 于 10 μ L 5 $\times$ 上样缓冲液混合均匀, 水中煮沸 2 min, 取 20 μ L 进行 SDS-PAGE。

1.3.6 温度和 pH 值对重组 β -葡萄糖苷酶的影响 将重组 β -葡萄糖苷酶酶液在不同 pH 缓冲液中 (pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 50 $^{\circ}$ C 保温 30 min; 在不同温度下 (30、40、50、60、70、80 $^{\circ}$ C) 保温 30 min 后加入 100 μ L 三氯乙酸终止反应, 检测酶活力。

1.3.7 β -葡萄糖苷酶酶活测定 pNPG 为底物测定 β -葡萄糖苷酶活性, 最适反应条件下每分钟催化底物水解产生 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量为 1 U^[10]。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR 结果

将提取的总 RNA 上琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1A), 可以看到 rRNA 清晰的 3 条带: 28S, 18S, 5S, RNA 样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 2.0 左右, RNA 质量较好, 能满足 RT-PCR 实验要求。使用目的基因特异性引物, 进行 RT-PCR, 得到 2.5 kb 左右的一条 DNA 条带 (图 1B)。

2.2 pMD-18T-*bgl* 重组子筛选与检测

重组质粒 pMD-18T-*bgl* 转化到感受态 *E.coli* JM109 后用蓝白斑的方法进行筛选, 随机挑取 3 个白斑培养, 提取质粒电泳检测, 见图 2。根据相对分

子质量的大小, 其中有 2 个可能是阳性克隆子。将这 2 种质粒进行 PCR 验证, 得到了约 2.5 kb 左右的条带, 与目的基因条带一致, 初步表明 RT-PCR 产物 TA 克隆成功。测序结果表明: 该基因的 cDNA 阅读框 2583 bp, 将 cDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对分析。通过同源性比较可知, 该 cDNA 与 GenBank 中已公布的黑曲霉 *Aspergillus niger* CBS513.88 β -葡萄糖苷酶基因的核苷酸序列同源性高达 99%^[11], 证明该 cDNA 全序列是黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因。

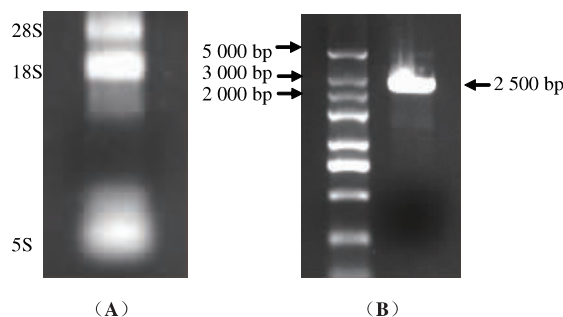


图 1 总 RNA 电泳图片 (A) 和 RT-PCR 产物电泳图 (B)
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *Aspergillus niger* (A) and RT-PCR production of *bgl* gene (B)

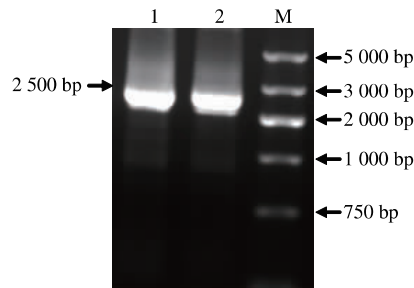


图 2 重组质粒 PCR 验证结果
Fig.2 PCR production of pMD-18T-*bgl* plasmid

2.3 pPIC9K-*bgl* 分泌表达载体的构建

用 *Sna*B I 和 *Not* I 分别双酶切 pMD18-T-*bgl* 和 pPIC9K 表达载体, 连接后转化大肠杆菌 *E.coli* JM109。筛选氨苄抗性的重组克隆提取质粒, 用 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切验证重组克隆中含有 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl*, 结果见图 3。重组表达质粒 pPIC9K-*bgl* 可以用于毕赤酵母的转化。

2.4 毕赤酵母转化子的筛选与 PCR 验证

通过 G418 抗菌素平板上筛选出的阳性重组子, 在 MD、MM 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养观察其生长情

况。选择其中表型为 His⁺Mut^s 进行进一步验证和酶活测定分析。挑取 3 个阳性克隆至 YPD 培养基中, 30 ℃、150 r/min, 培养 36 h, 提取基因组 DNA, 以 primer1 和 primer2 为引物进行 PCR, 电泳结果见图 4。阳性转化子均含有 β -葡萄糖苷酶基因片段。

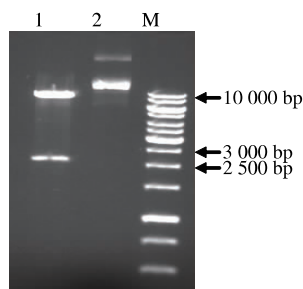


图 3 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切验证重组质粒 pPIC9K-*bgl*
Fig.3 Restriction analysis of recombinant plasmid pPIC9K-*bgl*

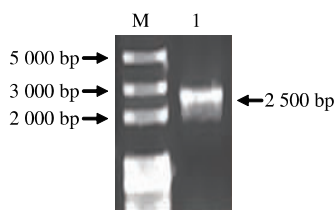


图 4 重组表达载体 PCR 产物
Fig.4 PCR production of pPIC9k-*bgl* plasmid from *P. pastoris* GS115

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 分析

酵母转化子经甲醇诱导培养后, 上清液进行 SDS-PAGE。图 5 聚丙烯酰胺凝胶电泳图表明, β -葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母 GS115 中得到表达, 重组子诱导培养后, 上清液 SDS-PAGE 上出现明显的条带, 对照菌株毕赤酵母(pPIC9K)无此条带。

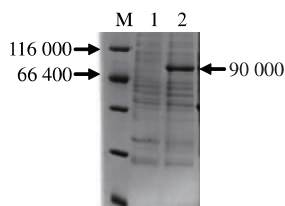


图 5 表达产物的 SDS-PAGE 电泳图
Fig.5 SDS-PAGE of expressing product

2.6 不同发酵时间内重组 β -葡萄糖苷酶的酶活

挑选酶活最高的重组酵母再进行诱导培养, 每隔 24 h 测定一次酶活, 其产酶曲线见图 6。可以看出, 其 β -葡萄糖苷酶酶活在连续诱导的前 72 小时

一直呈增长趋势, 72 h 以后便不再增长, 呈缓慢下降趋势。

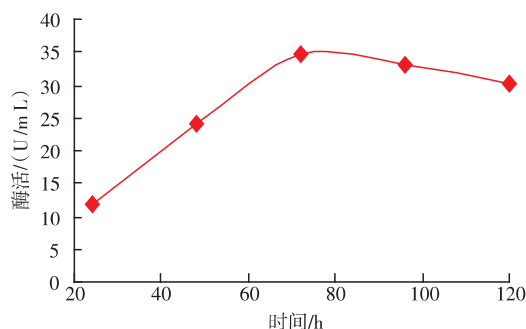


图 6 *P.pastoris* GS115 β -葡萄糖苷酶酶活测定曲线
Fig.6 Curve of *P.pastoris* GS115 β -glucosidase activity

2.7 温度和 pH 值对重组 β -葡萄糖苷酶的影响

将重组酵母诱导培养 72 h 后, 在不同 pH 值反应条件下测得酶活力。以 pH 值为横坐标, 酶活力为纵坐标, 作出 pH 曲线, 见图 7。从图 7 可以看出, β -葡萄糖苷酶的最适 pH 为 5.5。在 pH 4.0~7.0 的范围内, β -葡萄糖苷酶均有活性。在最适 pH 值条件下, 分别在 30~80 ℃温度条件下测定重组 β -葡萄糖苷酶的活力, 该酶最适反应温度为 50 ℃, 在 30~70 ℃之间均有酶活性。

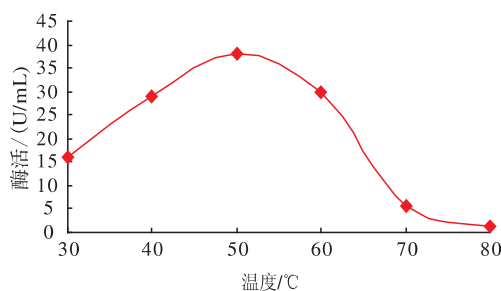
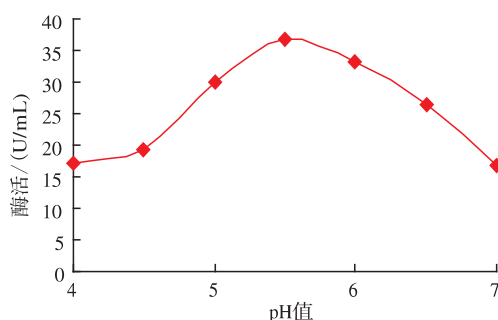


图 7 温度和 pH 值对重组 β -葡萄糖苷酶的影响
Fig.7 Effect of temperature and pH on the activity of recombinant β -glucosidase

3 结 语

β -葡萄糖苷酶在医药、食品、饲料、造纸、印染、纺织、石油开采及生物技术研究等多方面得到了广泛的应用,构建的工程酵母来高效表达 β -葡萄糖苷酶,以解决目前 β -葡萄糖苷酶产量低、成本高等问题。由于酿酒酵母细胞膜上缺少通透酶,使得纤维二糖不能进入胞内,因此需使编码 β -葡萄糖苷酶的外源基因带有信号肽能够被分泌到胞外,从而增加工程酵母菌株降解纤维素的能力,以便更好利用纤维素及纤维二糖来生产乙醇,为纤维素高效降解、生产燃料乙醇提供有效的解决途径。采用 RT-PCR 技术成功扩增出 β -葡萄糖苷酶全长基因 *bgl*, 构建克隆载体 pMD-18T-*bgl*。测序结果表明:*bgl* 全长 2

583 bp,可编码一个 860 个氨基酸的蛋白质,与 β -葡萄糖苷酶基因(XM001398779.1)核苷酸序列同源性为 99%,氨基酸序列同源性为 99%,属于 β -葡萄糖苷酶。将重组 pMD-18T-*bgl* 中的 *bgl* 插入酵母分泌表达载体 pPIC9K 中,构建了表达载体 pPIC9K-*bgl*,成功实现在 *Pichia pastoris* GS115 高效表达,获得与预期大小相一致的重组蛋白质。陈士华采用 pPICZaA 载体构建的重组菌在诱导培养 72 h 后,发酵液的酶活力可达到 0.78 U/mL。作者所构建的工程菌发酵上清液中 β -葡萄糖苷酶的最高酶活达到 38 U/mL,提高近 50 倍。发酵上清液中蛋白质主要是酶蛋白,杂蛋白质较少,后续的分离纯化过程就相对简单,分离步骤较少,为后续的发放大提供实验依据。

参考文献:

- [1] Van Maris A J A, Annot D T, Bellissimi E, et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 90 (4): 391-418.
- [2] Kim K H, Brown K M, Harris P V, et al. A proteomics strategy to discover beta-glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two dimensional page in gel activity assay and tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(12): 4749-4757.
- [3] Leontina G I, Álvaro L, Julio P, Julia M N. Fermentation of cellobiose to ethanol by industrial *Saccharomyces* strains carrying the β -glucosidase gene (BGL1) from *Saccharomycopsis fibuligera*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 5229-5236.
- [4] 石彩蕊,王义强,陈介南. 产 β -葡萄糖苷酶微生物育种研究进展[J]. *生物技术通报*, 2011, 3:59-65.
SHI Cai-rui, WANG Yi-qiang, CHEN Jie-nan. Research progress of breeding for β -glucosidase strain[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 3:59-65. (in Chinese)
- [5] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66:506-577.
- [6] 朱婧,覃拥灵,陈桂光,等. 葡萄糖苷酶高产菌株的选育及酶法转化葡萄糖生产龙胆低聚糖[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(4):21-24.
ZHU Jing, QIN Yong-ling, CHEN Gui-guang, et al. Selection of the high β -glucosidase mutant and production of gentiooligosaccharide[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(4):21-24. (in Chinese)
- [7] 张益波,王娟,何欢,韩微,等. β -葡萄糖苷酶新型高产菌株筛选及其液态发酵培养基的优化[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(6): 809-815.
ZHANG Yi-Bo, WANG Juan, HE Huan, HAN Wei, et al. Production of β -glucosidase by a novel isolated strain *Tolypocladium cylindrosporum* syzx4 and statistical optimization of fermentation media[J]. *Microbiology*, 2011, 38(6):809-815. (in Chinese)
- [8] 唐德芳,裴小琼,李晓璐,等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的筛选、克隆及表达[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15 (3): 423-426.
TANG De-fang, PEI Xiao-qiong, LI Xiao-lu, et al. Screening, cloning and expression of *Aspergillus niger* β -glucosidase[J]. *Journal of Applied & Environmental Biology*, 2009, 15 (3): 423-426. (in Chinese)
- [9] 陈士华,耿瑞凡,薛珍,等. 黑曲霉 *bgl* 基因在毕赤酵母中的表达研究[J]. *河南工业大学学报:自然科学版*, 2010, 31(5):42-45.
HEN Shi-hua, GENG Rui-fan, XUE Zhen, et al. Research on the expression of *bgl* gene of *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Henan University of Technology*, 2010, 31(5): 42-45. (in Chinese)
- [10] 李华,高丽. β -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(2):107-112.
LI Hua, GAO Li. Research advance on methods of determining β -glucosidase activity[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*[J]. 2007, 26(2):107-112. (in Chinese)
- [11] Pel H J, Winder J H, Archer D B. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2), 221-231.