

耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质

张慧敏¹, 李剑芳¹, 邬敏辰^{*2}, 魏喜换¹, 杨严俊¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 将一种 11 家族极端耐热木聚糖酶的密码子优化基因 *Syxy11* 克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 得到重组质粒 pPIC9K-*Syxy11*, 将其经 *Sal* 线性化后转化毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115。经 G418 筛选得到重组工程菌 GS115/*Syxy11*, 用甲醇诱导表达重组木聚糖酶 *SyXyn11*, 酶活可达到 17.74 U/mL。SDS-PAGE 显示, *SyXyn11* 的相对分子质量为 31 000。*SyXyn11* 的最适反应温度为 85 °C, 在 80 °C 以下稳定。最适反应 pH 为 6.5, 在 pH 5.0~7.5 范围内稳定。EDTA 和大多数金属离子对重组酶的活性影响不大。结果表明 *Syxy11* 成功在 *P. pastoris* GS115 中实现表达, 而且重组木聚糖酶的耐热性并未改变。

关键词: 耐热木聚糖酶; 毕赤酵母; 异源表达; 酶学性质

中图分类号: Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)02—0124—05

Expression of A Thermostable Xylanase Gene in *Pichia pastoris* and Its Enzymatic Characterization

ZHANG Hui-min¹, LI Jian-fang¹, WU Min-chen^{*2}, WEI Xi-huan¹, YANG Yan-jun¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A codon-optimized gene encoding a hyperthermostable xylanase belongs to the glycoside hydrolase family 11 (abbreviated as *Syxy11*) has been cloned into the expression plasmid pPIC9K (named pPIC9K-*Syxy11*). The pPIC9K-*Syxy11* was linearized with *Sal* and integrated into the genome of *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant *P. pastoris* GS115/*Syxy11* was screened by G418 and then was induced with methanol to express *SyXyn11*. The *SyXyn11* activity expressed by *P. pastoris* transformant reached 17.74 U/mL. The molecular weight of *SyXyn11* was estimated to be 31 000 by SDS-PAGE. The *SyXyn11* displayed the highest activity at 85 °C and pH 6.5. It was highly stable at a temperature of 80 °C or below, and at a pH range of 5.0~7.5. Its activity was not significantly affected by most of metal ions tested and EDTA. This revealed that *Syxy11* was successfully expressed in *P. pastoris* and remained the high thermostability.

Keywords: thermostable xylanase, *Pichia pastoris*, heterologous expression, enzymatic characterization

收稿日期: 2012-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101229); 2011 年高校博士研究生科研创新计划项目(JUDCF10056)。

作者简介: 张慧敏(1986—), 女, 山东潍坊人, 食品科学博士研究生。E-mail: minmin_911@163.com

* 通信作者: 邬敏辰(1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程方面的研究。

E-mail: bioch@163.com

β -1,4-内切木聚糖酶 (endo- β -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8), 能从木聚糖主链的内部随机切割木糖苷键, 将其降解成寡聚木糖、木二糖和少量木糖。根据催化结构域氨基酸的同源性和疏水簇分析法可将木聚糖酶划分为糖苷水解酶 10 家族和 11 家族^[1]。木聚糖酶在造纸、食品、饲料、纺织等工业领域都有着重要的应用价值, 但由于纸浆漂白、饲料制粒等工艺均需要较高温度, 因此耐热木聚糖酶的研究和开发得到了很多研究者的青睐^[2]。目前已发现了许多能产 11 家族耐热木聚糖酶的微生物, 如 *Thermomyces lanuginosus*^[3], *Paecilomyces varioti*^[4], *Dictyoglomus thermophilum*^[5], *Chaetomium thermophilum* 和 *Nonomuraea flexuosa*^[6]等, 其中许多耐热木聚糖酶基因已被克隆并表达在合适的宿主中^[3,7]。毕赤酵母表达系统由于能高效分泌外源蛋白质到胞外, 并能进行高密度发酵, 因而在木聚糖酶研究中备受关注^[8]。

EvXyn11^{TS} 是一种来源于细菌的极端耐热木聚糖酶突变体 (GenBank 登录号 EU591743), 它的热稳定性非常好, 在 90 °C 下处理 60 min 酶活不下降^[9], 具有适合于工业应用的理想特性。为实现 *EvXyn11^{TS}* 在工业上的应用。拟将该耐热基因在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中的进行分泌表达, 但是由于它来源于细菌, 其密码子偏好性与毕赤酵母有较大差异, 于是对此耐热基因中的稀有密码子进行优化, 并命名为 *Syxyn11*。采用人工方法合成 *Syxyn11* 基因, 后通过分子生物学手段获得重组毕赤酵母基因工程菌, 对重组木聚糖酶进行酶学性质研究, 为耐热木聚糖酶的工业化生产和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

E. coli DH5 α 、*P. pastoris* GS115 和表达质粒 pPIC9K: 由作者所在实验室保藏; pUCm-T 质粒: 购自上海 Sangon 公司; LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基: 参见 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

1.2 主要试剂

rTaq 酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、250 bp DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker: 购于大连 TaKaRa 公司; Tryptone、Yeast

Extract、YNB、G418 和 EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit: 购自上海 Sangon 公司; 标准木糖、榉木木聚糖: 购于 Sigma 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 重组质粒 pUCm-T-Syxyn11 的构建

根据密码子的偏爱性, 宿主细胞能够以不同的速度合成蛋白质。编码蛋白质的基因中有些密码子对应的 tRNA 含量少 (即属于稀有密码子), 所以合成量较少, 宿主以此来控制蛋白质的合成速度。因此按照密码子的偏好性, 对外源蛋白质编码基因进行密码子优化可以有效提高外源蛋白质的表达量^[10]。为实现来源于细菌的耐热木聚糖酶基因 *Evxyn11^{TS}* 在 *P. pastoris* 中的高表达, 对 *Evxyn11^{TS}* 成熟肽基因序列 (585 bp) 进行分析, 发现其密码子的偏好性与毕赤酵母有很大差异。遂对照毕赤酵母密码子偏好性表对 *Evxyn11^{TS}* 中的稀有密码子进行优化, 并在基因两端分别加入 *EcoR*、*Not* 位点, 该基因命名为 *Syxyn11*, 合成后克隆至 pUCm-T 质粒, 获得重组质粒 pUCm-T-*Syxyn11*, 并对其测序, 测序结果与预期相符。

1.4 重组表达质粒的构建

将重组质粒 pUCm-T-*Syxyn11* 进行 *EcoR* 和 *Not* 双酶切, 割胶回收约 600 bp 的目的基因 *Syxyn11*, 与经同样双酶切的质粒 pPIC9K 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经通用引物 (5'-AOX 和 3'-AOX) PCR 筛选鉴定后, 测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K-*Syxyn11*。

1.5 *Syxyn11* 在 *P. pastoris* 中的表达

pPIC9K-*Syxyn11* 经 *Sal* 线性化后, 用电穿孔法将其导入 *P. pastoris* GS115 中, 涂布于 MD 平板上筛选重组毕赤酵母; 将在 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含不同质量浓度 G418 的 YPD 平板上筛选抗高质量浓度 G418 (2.0 mg/mL) 的重组毕赤酵母, 命名为 GS115/*Syxyn11*; 同时电转 pPIC9K 至 *P. pastoris* GS115 做对照, 并命名为 GS115/9K。参照《分子克隆实验指南》中的方法^[11]提取重组子的基因组 DNA。以此为模板, 利用通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR 验证。耐热木聚糖酶基因 *Syxyn11* 的常规诱导表达参见 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

1.6 木聚糖酶的活性测定及分析

木聚糖酶酶活测定采用改良的 DNS 试剂法^[12],

用榉木木聚糖作为底物,其中酶反应温度设定为 65 °C,以在测定的条件下,每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。蛋白质质量分数测定采用考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法),以牛血清白蛋白为标准。并采用 SDS-PAGE 对表达产物进行分析及表观相对分子质量的测定。

1.7 重组木聚糖酶酶学性质分析

1.7.1 酶的最适反应温度及热稳定性 取适当稀释酶液于 55~95 °C 水浴条件下进行酶解反应,每隔 5 °C 测定酶活,以酶活力最高者为 100%,作温度—相对酶活性曲线;将酶液于不同温度下保温不同时间后,按常规方法测定残余酶活性,以 0 min 时取出的酶液的酶活性为 100%,作温度—相对酶活性曲线。当残余酶活达到 85%以上,即定义为稳定。

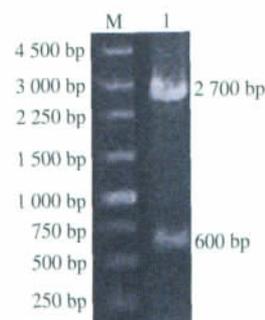
1.7.2 酶的最适 pH 及 pH 稳定性 65 °C 下,分别测定木聚糖酶在不同 pH 值下的酶活性。以酶活力最高者为 100%,作 pH—相对酶活性曲线;将酶在不同的 pH 值条件下于 40 °C 保温 1 h,再分别测定残留酶活性,以酶活力最高者为 100%,作 pH—相对酶活性曲线。当残余酶活达到 85%以上,即定义为稳定。反应所用的缓冲液为:0.1 mol/L 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液 (pH 3.5~8.0) 和 0.05 mol/L 甘氨酸—氢氧化钠缓冲液 (pH 8.5~9.5)。

1.7.3 金属离子对酶活性的影响 将不同金属离子溶液与酶液混合,至终浓度为 2 mmol/L,40 °C 保温 1 h,然后按常规方法测定残余酶活性,以不加金属离子的酶活性定义为 100%,残余酶活与其的比值为相对酶活。

2 结果与讨论

2.1 表达质粒 pPIC9K-Syxy11 的构建

通过密码子优化后获得重组质粒 pUCm-T-Syxy11,将其用 *EcoR* 和 *Not* 双酶切,1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分离。如图 1 所示,在约 2.7 kb 和 0.6 kb 处可见特异性 DNA 条带,分别为线性化的 pUCm-T 和目的基因 *Syxy11*。将 *Syxy11* 与经同样双酶切的质粒 pPIC9K 连接,转化 DH5α。经通用引物鉴定后,筛选得到重组质粒 pPIC9K-Syxy11,测序结果与预期相符,并将该优化序列提交至 GenBank 核酸数据库,登陆号为 JX459567。

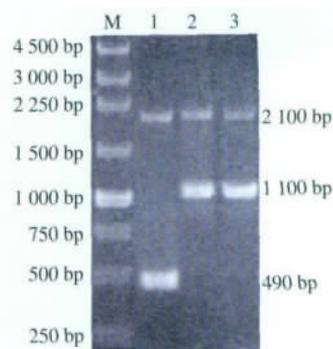


M: 250 bp DNA Ladder Marker;
1: pUCm-T-Syxy11 双酶切产物

图 1 pUCm-T-Syxy11 的 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切电泳图
Fig. 1 Double digestion of pUCm-T-Syxy11 by *EcoR* I and *Not* I

2.2 毕赤酵母重组子的鉴定

以高拷贝重组毕氏酵母 GS115/*Syxy11* 基因组为模板,进行 PCR 扩增鉴定,PCR 产物经 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析,见图 2。GS115/*Syxy11* 的 PCR 产物在 1.1 kb 和 2.1 kb 处可见两条清晰的条带(图 2 泳道 2~3),而对照组 GS115/9K PCR 产物的两条条带大小分别为 0.49 kb 和 2.1 kb (图 2 泳道 1),表明 *Syxy11* 已整合入 GS115/*Syxy11* 基因组内。



M: 250 bp DNA Ladder Marker;
1: GS115/9K; 2-3: GS115/*Syxy11*

图 2 毕赤酵母重组子基因组 PCR 验证

Fig. 2 Verification of *P. pastoris* transformants by PCR
2.3 重组蛋白的表达和鉴定

挑选 GS115/*Syxy11* 菌落和 GS115/9K 菌落进行常规诱导表达 96 h,8 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液,取上清液用改良的 DNS 法测定木聚糖酶活性。结果表明,GS115/*Syxy11* 发酵液上清液木聚糖酶酶活可达到 17.74 U/mL,而 GS115/9K 并未检测到木聚糖酶活性。SDS-PAGE 结果见图 3。GS115/*Syxy11* 的表达产物在相对分子质量 31 000 处有明显的目的蛋白 *SyXyn11* 条带(图 3 泳道 2),而对照

GS115/9K 在该处无条带(图 3 泳道 1)。SyXyn11 相对分子质量比前期测出的相对分子质量 (21 000) 大,分析其原因可能是由于 SyXyn11 氨基酸序列中含有 3 个 N-糖基化位点及在 C 末端的两个 O-糖基化位点。

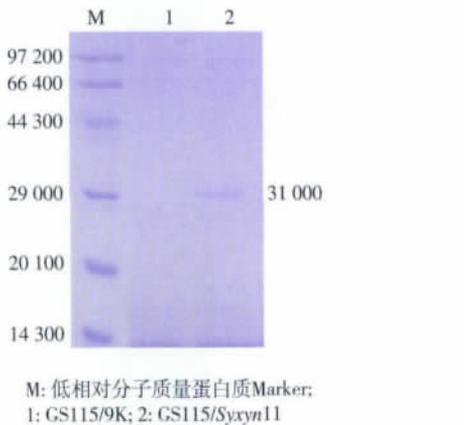


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed products

2.4 重组木聚糖酶酶学性质

2.4.1 酶的最适反应温度及热稳定性 由图 4 可以看出,在 80~90 °C 范围内,SyXyn11 酶活力较高,相对酶活可达 85% 以上,其中最适反应温度为 85 °C;从热稳定性曲线可看出,SyXyn11 在 80 °C 以下较稳定,如在 80 °C 保存 60 min 后,酶活仅损失 14.1%。说明该酶的热稳定性好,在高温下可长时间保持稳定。

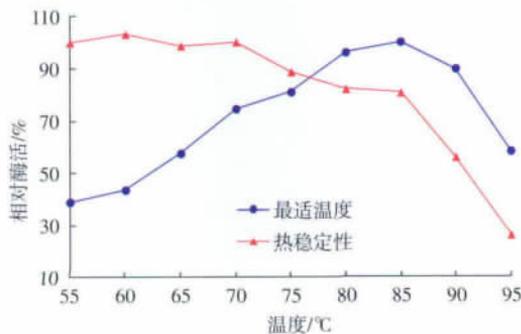


图 4 温度对 SyXyn11 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of the SyXyn11

2.4.2 酶的最适 pH 及 pH 稳定性 在不同 pH 值下进行酶活性检测,结果见图 5。该酶的最适反应 pH 为 6.5,当 pH<5.5 或者 pH>7.5 时,酶活力下降较快;该重组酶在 pH 5.0~7.5 范围内稳定,当 pH 值低于 5.0 或高于 7.5 时,该酶的稳定性较差,如酶液

分别在 pH 4.5 和 pH 8.0 下保存 1 h,酶活分别损失 40%、30%。

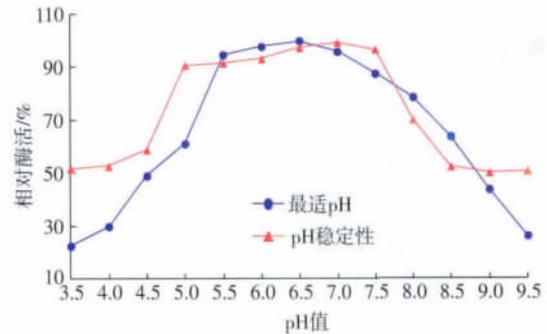


图 5 pH 对 SyXyn11 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity of the SyXyn11

2.4.3 金属离子对酶活性的影响 如图 6 所示,EDTA 和大多数供试金属离子对重组酶的活性影响不大,这说明该酶对大部分金属离子都具有抗性,能够应用于不同的工业加工过程,具有重要的应用价值。

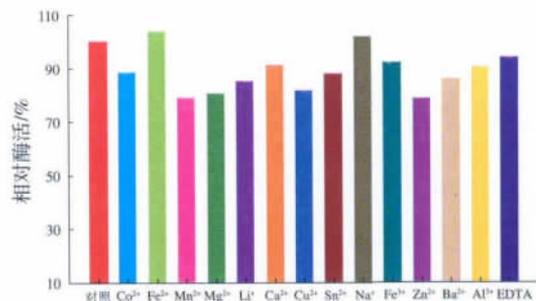


图 6 金属离子和 EDTA 对 SyXyn11 酶活力的影响

Fig. 6 Effects of various metal ions and EDTA on the activity of the SyXyn11

3 结 语

由于耐热木聚糖酶具有重要的工业应用价值,通过基因工程实现耐热木聚糖酶的异源高效表达是降低其工业应用成本、适应工业应用条件的有效手段。目前,已经有许多耐热木聚糖酶基因在毕赤酵母中实现了分泌表达。Ghaffar 等克隆了来自于 *C. thermophilum* 的耐热木聚糖酶基因 xyn11A,并在 *P. pastoris* GS115 中进行了表达,其最高酶活可达到 15.6 U/mL^[7]。

作者成功实现了 11 家族耐热木聚糖酶基因 Syxyn11 在 *P. pastoris* GS115 中的分泌表达,通过甲醇诱导发酵,酶活可高达 17.74 U/mL。通过 SDS-

PAGE 鉴定出重组木聚糖酶 *SyXyn11* 的相对分子质量在 31 000 左右。酶学性质研究表明,该重组酶的最适反应温度为 85 °C,80 °C 以下稳定;最适反应 pH 6.5,并在 pH 5.0~7.5 时稳定;EDTA 和大多数供试金属离子对重组酶的活性影响不大。据文献报道的最耐热木聚糖酶是 *N. flexuosa* 所产的 Xyn11A,

其最适温度为 80 °C^[6],而 *SyXyn11* 比以往报道的任何 11 家族木聚糖酶具有更高的耐热性,使得该酶在许多工业领域中可能具有一定的应用潜力和优势。然而该酶在 *P. pastoris* 中的表达量并不高,因此如何提高它的表达量将是下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Polizeli M L T M, Rizzatti A C S, Monti R, et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2005, 67: 577-591.
- [2] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases [J]. **FEMS Microbiol Rev**, 2005, 29: 3-23.
- [3] Damaso M C T, Almeida M S, Kurtenbach E, et al. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69: 6064-6072.
- [4] Kumar P R, Eswaramoorthy S, Vithayathil P J, et al. The tertiary structure at 1.59 Å resolution and the proposed amino acid sequence of a family-11 xylanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces varioti* bainier[J]. **J Mol Biol**, 2000, 295: 581-593.
- [5] McCarthy A A, Morris D D, Bergquist P L, et al. Structure of XynB, a highly thermostable beta-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* R146B.1, at 1.8 Å resolution[J]. **Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr**, 2000, 56: 1367-1375.
- [6] Hakulinen N, Turunen O, Janis J, et al. Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*[J]. **Eur J Biochem**, 2003, 270: 1399-1412.
- [7] Ghaffar A, Khan S A, Mukhtar Z, et al. Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115[J]. **Mol Biol Rep**, 2011, 38: 3227-3233.
- [8] Zhou C Y, Wang Y T, Wu M C, et al. Heterologous expression of xylanase II from *Aspergillus usamii* in *Pichia pastoris* [J]. **Food Technol Biotechnol**, 2009, 47: 90-95.
- [9] Dumon C, Varvak A, Wall M A, et al. Engineering hyperthermostability into a GH11 xylanase is mediated by subtle changes to protein structure[J]. **J Biol Chem**, 2008, 283: 22557-22564.
- [10] 金光泽, 段作营, 张莲芬, 等. 重组融合人血清白蛋白-人白介素-2 C125A 突变体在毕赤酵母中的表达[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29: 595-601.
JIN Guang-ze, DUAN Zuo-ying, ZHANG Lian-fen, et al. Expression of the fusion protein human serum albumin/mutant human interleukin 2C125A in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29: 595-601. (in Chinese)
- [11] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [12] Zhou C Y, Bai J Y, Deng S S, et al. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*[J]. **Biores Techno**, 2008, 99: 831-838.