

易错 PCR 技术提高中性内切葡聚糖酶活性

唐自钟, 刘 珊, 韩学易, 姚友旭, 刘默洋,

陈 惠*, 晋海军, 吴 琦, 单 志

(四川农业大学 生命科学与理学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 近年来随着纤维素酶在食品加工工业中具有广阔应用前景, 而纤维素酶的工业应用一直受酶活性低, 成本高的限制。为了提高中性内切葡聚糖酶的活性, 作者利用易错 PCR 技术对来自枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)C-36 的内切葡聚糖酶基因进行定向进化研究, 构建了在大肠杆菌中的突变体库。通过刚果红平板筛选, 获得了酶活性提高的突变株 F-10, 活力比亲本酶提高 4.2 倍。序列分析表明: F-10 有 5 个碱基发生突变, 两个氨基酸突变: D212V 和 T307S。SDS-PAGE 条带, 表明基因表达正确, 而表达量较原始菌株显著增加。酶学性质分析, 表明该酶的最适反应 pH 为 5.6, 最适反应温度为 45 °C, 在 pH 4.5~10.0 范围内 50 °C 保温 30 min 可保持 80% 的剩余酶活, 在 60~75 °C 酶活力相对稳定, 可保持在最高酶活的 80% 以上, 当温度高于 75 °C 时, 酶开始变性失活, 酶活力迅速下降。研究获得了酶活性提高的内切葡聚糖酶菌株, 为进一步在分子水平研究内切葡聚糖酶的功能和其应用打下了基础, 也为高酶活酶分子在其他高表达系统的表达提供了基础材料。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 内切葡聚糖酶; 易错 PCR; 酶学性质

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)07—0754—08

Improving Endoglucanase Activity from *Bacillus subtilis* by Error-Prone PCR

TANG Zi-zhong, LIU Shan, HAN Xue-yi, YAO You-xu, LIU Mo-yang,

CHEN Hui*, JIN Hai-jun, WU Qi, SHAN Zi

(College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Endoglucanase cooperates with cellobihydrolase and β -1,4-glucosidase to translate cellulose to glucose completely. Now lots of researchers found that low enzymatic activity and high cost are the two main problems that restrict the industrial applications for cellulase. In order to enhance the enzymatic activity of the neutral endoglucanase activity, error-prone PCR strategy was conducted on *Bacillus subtilis* C-36 endoglucanase gene. The mutant F-10 with endoglucanase activity improved 4.2 folds respectively were obtained. The sequence of F-10 showed five nucleotides substitutions to two mutated amino acids. SDS-PAGE showed genes are correctly

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2008Z0150)。

作者简介: 唐自钟(1984—), 男, 四川达州人, 生物工程博士研究生, 主要从事微生物酶工程研究。E-mail: 3530279123456789@163.com

* 通讯作者: 陈 惠(1962—), 女, 四川雅安人, 理学博士, 教授, 主要从事微生物酶工程研究。E-mail: chenhui@sicau.edu.cn

expression. Enzymatic properties of mutant F-10 showed that: The optimal temperature and pH value changed compared with the original enzyme, it's optimal temperature and pH is 45 °C and 5.6, respectively. The enzyme maintained over 80% of the original enzymatic activity after incubated from pH 4.5 to 10.0 at 50 °C for 30 min and the enzyme maintained over 80% of the original enzymatic activity in 60~75°C, but when temperature upon 75 °C, then enzymatic activity decreased sharply.

Keywords: *Bacillus subtilis*, endoglucanase, error-prone PCR, enzymatic properties

近年来,随着纤维素在生产糖、工业酒精、生物质能源替代等应用领域的飞速发展,纤维素酶的市场前景和应用价值更加广阔了。虽然天然纤维素酶种类较多,但由于其催化活性低、生产成本低以及催化条件苛刻等因素,真正能够用于工业生产的却很少。几十年来通过传统的诱变育种技术已获得许多纤维素酶高产菌株,已用于大规模生产,但它们的产酶能力还远远满足不了日益增大的市场需求^[1]。高成本、低酶活已成为制约纤维素酶广泛应用的两大瓶颈,通过基因工程及蛋白质工程在分子水平上对纤维素酶基因进行改造,构建高效表达高活性纤维素酶的基因工程菌,降低纤维素酶生产成本和实用性,成为国内外研究的热点之一。

天然中性或碱性纤维素酶虽然种类较多,但是真正能够用于工业生产的却很少,很多纤维素酶虽然最适 pH 为碱性,但是酶活太低,远远达不到工业应用的要求。近年来一些学者通过分子生物学和蛋白质工程等手段对其进行定向进化,并达到了一定预期效果,为在分子水平和蛋白水平上解释纤维素酶的作用机理以及进一步改良纤维素酶的催化特性奠定了理论基础和技术指导。定向进化技术是通过人为创造特殊的进化条件,模拟天然进化机制,在体外对基因进行广泛的突变,从一个或多个个人工突变酶库中通过一定筛选或选择方法最终获得预先期望的具有某些特性的进化酶^[2]。易错 PCR 以其操作简便、有效等优点成为目前应用最为广泛的进化手段之一^[3]。近几年来,有关内切葡聚糖酶定向进化的研究报道较多,主要集中在最适 pH 和热稳定性等酶学性质改造方面^[4-6],酶活性提高方面也有报道^[7-9]。作者通过定向进化策略对来自枯草芽孢杆菌 C-36 的中性内切葡聚糖酶基因 (GenBank Accession No: DQ782954) 进行定向进化,通过高通量筛选手段获得了高酶活的突变体,并对获得的突变体酶

的三级结构进行模建,分析了酶三级结构变化与酶活之间的关系以及最佳突变株的蛋白表达情况和酶的酶学性质。同时,获得的内切葡聚糖酶基因可进一步在酵母,芽胞杆菌等高表达系统表达,获得可以应用于工业生产的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株与载体列于表 1。

表 1 菌株与载体

Table 1 Strains and vectors

菌株和载体	功能	来源
大肠杆菌 DH5α	克隆宿主细胞	作者所在实验室保存
pMD19-T-Cen	含内切葡聚糖酶基因的克隆载体	作者所在实验室保存
pET32a	大肠杆菌表达载体	购于英骏生物技术有限公司,并于作者所在实验室保存
BL21	大肠杆菌表达宿主	
pET-C36d	内切葡聚糖酶重组表达载体	作者所在实验室构建

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶: 购自大连宝生物公司; DNA marker: 购自天根生化科技有限公司; PCR 纯化试剂盒及质粒纯化试剂盒: 购自美国 OMEGA 公司; MnCl₂: 购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为进口试剂或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 易错 PCR 扩增及突变体库的构建 根据已知的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) C-36 的内切葡聚糖酶基因 (GenBank Accession No: DQ782954) 去除信号肽的部分设计引物: Upstream primer: (5' - TAATCCAACCCGGAATTTCGAGAGACAAAAACGC CAGTAGC-3') Downstream primer: (5' TAGGAAAG

GAAAAAAGCGGCCGCTAATTTGGTTCTGTTCCCC AAA-3'),由上海英骏公司合成,扩增的片段大小为 1 413 bp。

以质粒 pMD19-T-Cen 为模板,反应体系为:14 μL 25 mmol/L MgCl_2 ;5 μL 10xTaq PCR buffer;5 μL 10 X 易错 dNTP 混合物 (2 mmol/L dGTP,2 mmol/L dATP,10 mmol/L dCTP 和 10 mmol/L dTTP);引物各 30 pmol;0.5 μL 的 10 mmol/L MnCl_2 ;模板 20 pmol;Taq DNA 聚合酶为 2.5 U,超纯水至总体积为 50 μL 。PCR 程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,30 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳后,纯化回收目的条带。纯化后的产物和 pET32a 载体经 EcoR I 和 Not I 双酶切过夜后回收,载体回收 5.9 kb 片段,目的基因回收 1.4 kb 片段,回收后的产物按比例混合后加入 T4 DNA 连接酶连接过夜,转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,涂布固体 LB (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Amp) 平板,抗性筛选阳性转化子,此即构建好的内切葡聚糖酶基因突变文库。

1.2.2 阳性克隆的初筛及鉴定 将阳性转化子转移到另一个划线的 LB 固体培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素) 上面 (P1),并同时复制到另一个含有 CMC-Na 并加入 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 诱导固体培养基 (P2) 上面,P1 平板 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取 P1 平板上面的菌株用 pET32a 的通用引物 T7 进行菌落 PCR 鉴定。将 P2 平板 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 进行刚果红染色筛选。用刚果红染色法筛选出水解圈较大的转化子,初步鉴定为阳性转化子。挑取水解圈较大的阳性转化子接种到 10 mL LB 液体培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素) 37 $^{\circ}\text{C}$,170 r/min 培养过夜,按体积分数 1% 接种量接种至 25 mL 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 A 值为 0.6~0.8,为加入 IPTG 使其终浓度 1 mmol/L 诱导培养 3 h。酶活的测定,将 25 mL 菌液,4 $^{\circ}\text{C}$,4 000 r/min 离心 10 min,磷酸盐缓冲液 1 mL (1/15 mol/L pH 6.81) 重悬菌体,超声破碎裂解细胞,裂解液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液一定比例稀释后作为粗酶液测定酶活力。并在相同条件下测定原始菌和突变株,重复测定 3 次,每次 2 个平行,统计数据。

酶活测定参照农业部标准略做改进^[10]。以 1 mL 0.8% 的羧甲基纤维素钠 (用 1/15 mol/L pH 6.8

磷酸盐缓冲液配制) 为底物,加入 1 mL 粗酶液,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min 后,加入 2.5 mL DNS 显色液,沸水浴煮 5 min,取出后在流水下迅速冷却后定容至 25 mL 摇匀,在 540 nm 处测定吸光值。在此实验条件下,1 mL 酶液每分钟产生 1 μmol 还原糖的酶量作为 1 个酶活单位,用 U/mL 表示。

1.2.3 突变基因序列分析及结构预测和突变位点分析 高酶活力突变株 PCR 及酶切验证正确后送上海英骏公司进行序列测定。测序结果进行 BLAST 序列比对,找出突变碱基位点和氨基酸突变。通过在线分子建模系统 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测内切葡聚糖酶成熟蛋白的三维结构^[11] 根据预测的结构信息,运用 DeepView (Swiss-PdbViewer Version 4.0) 软件分析突变位点的突变效应。

1.2.4 突变株内切葡聚糖酶的 SDS-PAGE 分析 取诱导表达后的菌悬液及不含有内切葡聚糖酶基因的空载体菌悬液,按测酶活的方法处理获得粗酶液,取粗酶液加入 2xSDS-PAGE 电泳上样缓冲液混匀,沸水浴处理 3~5 min,冷却,离心后用于 SDS-PAGE 凝胶进行凝胶电泳分析,操作过程见文献^[12]。

1.2.5 突变株 F-10 内切葡聚糖酶学性质分析

1) 突变株 F-10 内切葡聚糖酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性 以 1 mL 不同 pH 值的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液为底物,测定酶活,确定酶的最适反应 pH。将原酶液置于不同 pH 值的缓冲液于 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,在最适 pH 值条件下测定残余酶活力从而测定 pH 稳定性^[13]。

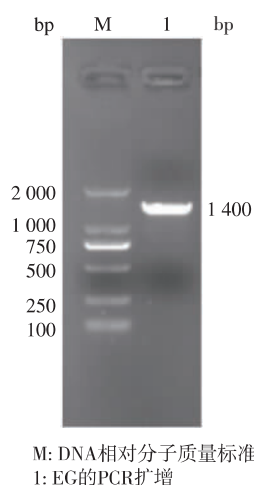
2) 突变株 F-10 内切葡聚糖酶的最适反应温度及热稳定性 在最适反应 pH 环境下,将适当稀释的酶液分别在不同温度梯度下测定酶活,确定酶的最适反应温度。将适当稀释的酶液置于相对稳定的 pH 值,分别在不同温度梯度下保温 30 min,再在 50 $^{\circ}\text{C}$ 测定残余酶活力^[13]。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 扩增及突变文库的构建

一般易错 PCR 的过程中都要提高 Mg^{2+} 浓度,并加入 Mn^{2+} ,以提高 PCR 过程中的突变率。通过调整两种离子的浓度,可以获得合适突变频率的多样性文库。经过条件的初步摸索,最终确定加入终浓度为 7 mmol/L Mg^{2+} 和 0.5 mmol/L Mn^{2+} 为最适的突变

条件。终浓度为 7 mmol/L Mg^{2+} 和 0.5 mmol/L Mn^{2+} 为最适的突变条件。扩增得到中性内切葡聚糖酶基因片段为 1 400 bp 的条带,如图 1



M: DNA 相对分子质量标准
1: EG 的 PCR 扩增

图 1 易错 PCR 的电泳图

Fig. 1 Patterns of error-prone PCR

PCR 纯化产物和 pET32a(+)载体分别经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切过夜纯化回收后 16 °C 连接过夜,转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 含 100 μ g/mL 的 Amp 平板抗性筛选后获得易错 PCR 转化子 2 000~3 000 株,所有转化子构成内切葡聚糖酶基因突变体库。

2.2 阳性克隆的初筛及鉴定

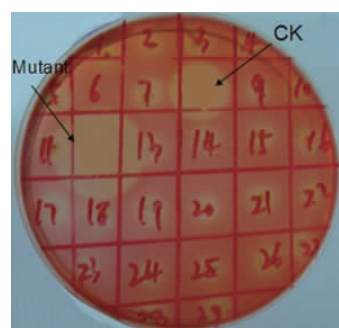
利用通用引物 T7 进行菌落 PCR 结果显示每一个阳性转化子均扩增出 1 400 bp 的条带,说明其中性内切葡聚糖酶基因已成功导入到 BL21 菌株中,对 P2 平板诱导 3 d 后进行 1 mg/mL 的刚果红溶液,染色 30 min,再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗涤多次。若转化子具有酶活性,则菌落周围会出现清晰的淡黄色透明圈,透明圈直径与菌落直径的比值越大说明转化子酶活越高^[14],如图 2。筛选得到一株高酶活的阳性转化子,命名为 F-10。

挑取 F-10 突变体,进行扩大培养后,并将原始菌进行同时诱导培养,经超声波破碎后利用上清测酶活,结果见表 2。其羧甲基纤维素钠水解活力分别为 (4.2 $\pm$ 0.13) U/mL,该突变株平均酶活相比野生型内切葡聚糖酶的 (0.98 $\pm$ 0.10) U/mL 分别提高了 4.2 倍(表 2)。

2.3 突变基因序列分析及结构预测和突变位点分析

突变基因的序列分析见表 3, F-10 基因共有 5 个碱基发生了突变,其中有 3 个是转换,只有 2 个

是颠换,3 个转换也均发生在 A、T 之间,2 个颠换也均发生在 A、G 之间。



Mutant: 突变菌株 F-10; CK: 原始菌

图 2 刚果红平板筛选结果

Fig. 2 Screening result in Congo red staining plates

表 2 相对酶活性

Table 2 Relative enzymatic activity

菌株	酶活性	提高倍数
原始	0.98 $\pm$ 0.10	1.0
F-10	4.2 $\pm$ 0.13	4.2

表 3 突变体的测序结果

Table 3 Sequencing results of the mutants

突变菌株	突变核糖核苷酸碱基	突变氨基酸
F-10	A635T/A684G/A831G/ A919T/A1251T	D213V/T308S

运用并 Swiss-model 模拟内切葡聚糖酶的三维空间模型,分别以蛋白质结构数据库中的 *Bacillus agaradhaerens* 纤维素催化结构域 (7a3h) 和 *Clostridium cellulolyticum* 的纤维素结合结构域 (1G43) 为模型,模拟出内切葡聚糖酶的催化结构域 (cellulase domain, CD) 和结合结构域 (carbohydrate-binding domain, CBD) 的三维结构图,预测结果显示枯草芽孢杆菌内切葡聚糖酶的催化结构域包含 294 个氨基酸残基 (aa36~329),属于糖基水解酶第五家族,具有典型的 (β/α)₈ 桶状结构;结合结构域含 146 个氨基酸残基 (aa354~499),具有碳水化合物结合域第三家族的特征,为数条 β 折叠片形成的三明治结构。

用 DeepView (Swiss-PdbViewer Version 4.0) 软件分析模拟的三维结构信息,可知 F-10 突变酶的突变位点位于成熟蛋白的催化结构域 (CD) 212 位。

对催化结构域三级结构的分析表明在 212 位 D212V 的突变使酶三级结构氢键改变,从而使酶蛋白刚性降低,引起该部位相关氨基酸残基侧链柔性增加,从而更加有助于底物向活性部位靠近,促成酶催化效率的提高。T307S 突变发生在连接区,此变化有可能增加连接区蛋白的柔性,使酶的结合结构域和催化结构域更容易靠近,使酶的催化效率提高,见图 3 和图 4。

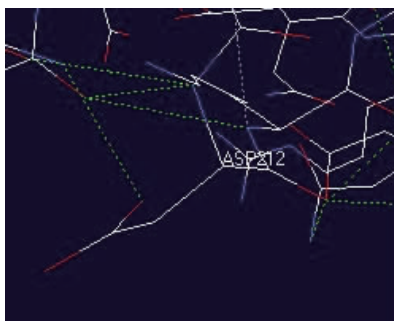


图 3 原始酶 212 位天冬氨酸化学结构图

Fig. 3 Endoglucanase 212ASP chemical structure



图 4 突变株 f-10 酶 212 位缬氨酸化学结构

Fig. 4 Mutated 212VAL chemical structure

2.4 突变株内切葡聚糖酶的 SDS-PAGE 分析

图 5 中泳道 1,2,3,4 依次为: 转入 pET32a 空质粒的 BL21 菌株,原始菌株,突变株 F-10 1,2 破壁产物依照超声波破碎方法分别对重组大肠杆菌 pET-C36 的细胞裂解物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,如图 5 所示,其相对分子量为 73 000,与理论计算大小相符(载体 pET-32α 中硫氧还原蛋白的大小约为 20 000)。另外,在含空载体大肠杆菌的细胞裂解物中,不存在大小约 73 000 的条带,与预期结果相符。而且 F-10 表达量明显多于原始酶。

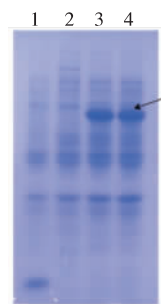


图 5 酶表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expression of endoglucanase gene in E.coil BL21

2.5 突变株 F-10 酶学性质分析

2.5.1 突变株 F-10 酶的最适反应 pH 以不同 pH 值的缓冲液配置底物(CMC-Na),取不同 pH 值的底物与适当稀释的酶液 50 °C 条件下反应 30 min,测得不同 pH 值下的酶活力。重复测定 3 次结果表明:该突变体的最适反应 pH 值为 5.6。而在 pH 4~4.6 时酶活力迅速降低,在 pH 8.4~10 时酶活可维持最高酶活的 60%。该酶反应的 pH 值具有较宽范围,即在 pH 4.6~8.0 范围内酶活可达最高酶活的 70% 以上,结果见图 6。

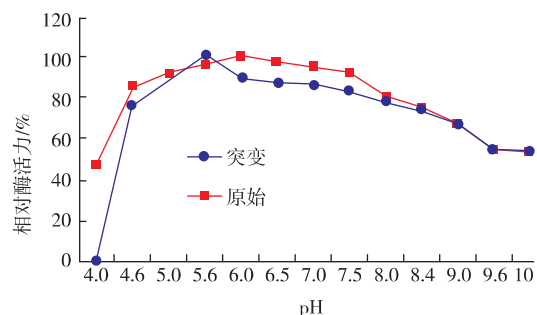


图 6 突变酶的最适反应 pH 值

Fig. 6 Optimal reaction pH of mutation endoglucanase

2.5.2 突变株 F-10 酶的 pH 稳定性 将酶液置于不同 pH 值的缓冲液于 50 °C 保温 30 min,测定剩余酶活力,以最高酶活作为 100%,重复测定 3 次,测得不同 pH 处理下的酶活力(图 7)。结果表明:内切葡聚糖酶在 pH 4~5 的缓冲溶液中 50 °C 处理 30 min 后相对酶活力迅速降低,而当 pH 5~10 时,酶活力相对稳定,可保持在最高酶活的 80% 以上。

2.5.3 突变株 F-10 酶的最适反应温度 在 pH 6.8 条件下,将酶液分别在 40、45、50、55、60、65、70、75 °C 环境下与底物反应 30 min 后测定酶活力(图 8)。

结果表明:该酶反应温度有 45 ℃和 65 ℃两个峰值,最适反应温度为 45 ℃,在 40~70 ℃范围内酶活可维持在最高酶活的 60%以上,当温度大于 75 ℃时,酶迅速失活。

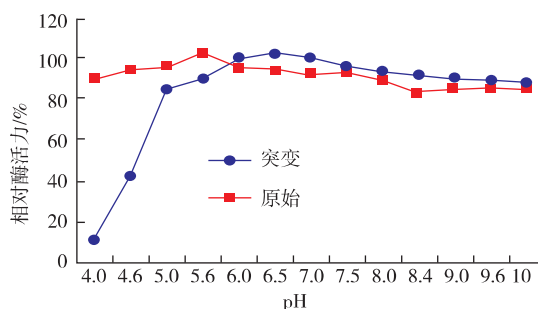


图 7 突变酶的 pH 稳定性

Fig. 7 Effect of pH on the stability of mutation endoglucanase

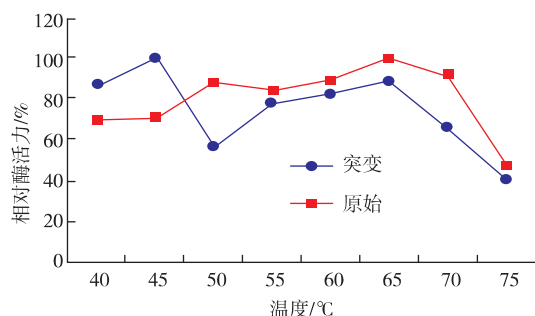


图 8 突变酶的最适反应温度

Fig. 8 Optimal reaction temperature of endoglucanase

2.5.4 突变株 F-10 酶的热稳定性 将酶液分别置于 60、65、70、75、80、85、90 ℃环境下保温 5 min,再于 50℃测定残余酶活力,以最高酶活作为 100%(图 9)。结果表明:内切葡聚糖酶在 70 ℃处理 5 min 后酶活力最高,当温度高于 75 ℃时,酶开始变性失活,酶活力迅速下降。在 60~75 ℃酶活力相对稳定,可保持在最高酶活的 80%以上。

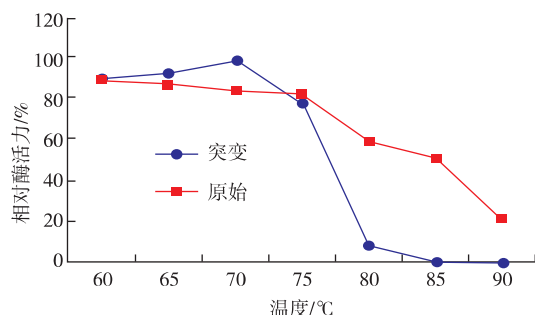


图 9 突变酶的热稳定性

Fig. 9 Effect of temperature on the stability of endoglucanase

比较原始酶(最适温度为 65 ℃,最适 pH 为 6.0),突变酶的最适温度和最适 pH 都发生了变化,酶反应温度有 45 ℃和 65 ℃两个峰值,最适反应温度为 45 ℃这有利于突变酶在实际中的应用,突变酶能在低温下更好的发挥作用;节约能源。突变酶的最适 pH 偏向于酸性,增大了酶的作用范围。突变酶的热稳定性及 pH 稳定性,没发生太大的变化。而在碱性范围内广泛的 pH 稳定性和高酶活有利于该酶在工业中的实际应用。

3 讨论

作者自主筛选到一株高产内切葡聚糖酶的枯草芽胞杆菌,并克隆出该基因,但原始酶存在酶活性不高等问题。采用易错 PCR 技术对此基因进行定向进化,在分子水平上改造了该酶,筛选得到酶活性提高的突变株。本研究结果发现,突变大多发生在 A、T、G 核苷酸之间,而且突变中转换多于颠换,表明易错 PCR 方法介导的突变具有一定的偏向性,与文献报道相符^[15]。

定向进化中,往往有益突变只占有所有突变子的一小部分,从有大量突变株的突变体库中筛选有益克隆是一项非常繁琐的工作,这需要高通量、高灵敏度方法的建立。作者采用的刚果红平板染色法^[16]简单可行,而且灵敏度、准确性及可重复性都较好,不需要昂贵的仪器设备,是内切葡聚糖酶体外定向进化高通量的筛选的有效方法。通过实验发现:此筛选方法中,平板形成的水解圈大小和酶活性高低成一定的正相关。合适的诱导剂浓度和合理的培养时间是高通量筛选的关键,诱导剂浓度过大或培养时间过长会使产生的水解圈重合,给筛选带来不便,浓度过小或培养时间太短会导致酶未充分表达,水解圈不明显。内切葡聚糖酶成熟蛋白由一个长 82aa 的底物结合结构域 CBM 和一个长 253aa 的催化结构域 CD 组成,中间有 55aa 连接肽(Linker)的连接区。枯草芽胞杆菌内切葡聚糖酶属于糖基水解酶第五家族,第五家族糖基水解酶含有一些非常保守且空间位置相近的氨基酸残基位点,其中 169 位谷氨酸和 257 位谷氨酸是酶催化过程的主要活性残基^[17-19]。突变酶 F-10 的两个氨基酸突变位点分别位于催化结构域和连接区。其中 D212V 突变导致结构域此位点形成的氢键减少,氢键的变化可能有利于酶的柔性,增加酶的催化效率。此外

由酸性的天冬氨酸突变为中性的缬氨酸,导致催化结构域此位点电荷性质发生变化,使酶活发生变化。T307S 突变发生在连接区,此突变氨基酸侧链并未发生太大变化,减少一个甲基,此变化有可能增加连接区蛋白的柔性,使酶的结合结构域和催化结构域更容易靠近,使酶的催化效率提高。目前关于第五家族内切葡聚糖酶基因结合结构域的报道较少,主要在其与催化域的活性和稳定性的关系^[20-21],作者获得一株结合结构域突变而酶活性提高的菌株,说明结合结构域与内切葡聚糖酶酶活性有关系,对其深入的研究将有助于对纤维素酶催化原理的进一步阐明,为纤维素酶的分子改造提供理论指导。

SDS-PAGE 分析表明,同等培养条件下,突变酶的表达量明显地提高,表现为条带增粗,这可从密码子优化来阐明:枯草芽孢杆菌编码甘氨酸时 GGA 为偏爱密码子,而大肠杆菌中 GGA 则为稀有密码子。测序结果显示,两个无义突变(277 GGA-GGG 甘氨酸、417GGA-GGT 甘氨酸)优化了大肠杆菌的稀有密码子,所以导致在大肠杆菌中表达量

的变化,表现为酶活的提高。

内切葡聚糖酶的改造国内外近年来研究报道较多,Wang 等对里氏木霉的内切葡聚糖酶进行定向进化,获得了一株最适 pH 提高了 0.6 的突变体^[4],Liu 等对来自 *Clostridium phytofermentans* 的内切葡聚糖酶 Cel5A 进行了定向进化,筛选得到 CMC 酶活在 60 °C 半衰期分别提高 92%、36% 和 46% 的突变株^[6]。Kim 等人通过 LB-Amp-IPTG 平板方法筛选纤维素酶的突变库,获得提高 5.0 倍和 2.2 倍的突变株^[9]。林凌等通过易错 PCR 和 DNA Shuffling 技术对来自枯草芽孢杆菌的内切葡聚糖酶进行了定向进化,获得了酶活性分别提高 2.68 和 2.03 倍的突变体,并对内切葡聚糖酶的三维结构与酶活性关系做了分析^[18]。作者通过体外定向进化技术,通过一轮易错 PCR,获得了内切葡聚糖酶催化活性分别提高 4.2 倍的突变株,更重要的是,关于内切葡聚糖酶结合结构域的研究为进一步阐明纤维素酶的催化机理积累了实验数据,同时也为构建高效表达基因工程菌用于中性内切葡聚糖酶工业化生产提供了基础材料。

参考文献:

- [1] 刘杰凤,薛栋升,何可可,等. 一株耐盐纤维素酶海洋曲霉的筛选及产酶条件研究[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(7):711-718.
- LIU Jie-feng,XUE Dong-sheng,HE Ke-ke,et al. Screening of a cellulase producing halotolerant strain marine *Aspergillus* sp and its fermentation conditions[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(7):711-718.(in Chinese)
- [2] Li H M,Mei L H,Urlacher V B,et al. Cytochrome P450 BM-3 evolved by random and saturation mutagenesis as an effective indole-hydroxylating catalyst[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2008,144(1):27-36.
- [3] Huang Y,Cai Y,Yang J,et al. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR [J]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**,2008,24(3):445-51.
- [4] Wang T,Liu X,Yu Q,et al. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*[J]. **Biomol Eng**,2005,22(1-3):89-94.
- [5] Qin Y,Wei X,Song X,et al. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum[J]. **J Biotechnol**,2008,135(2):190-5.
- [6] Liu W,Zhang X Z,Zhang Z,et al. Engineering of *Clostridium phytofermentans* Endoglucanase Cel5A for improved thermostability [J]. **Appl Environ Microbiol**,2010,76(14):4914-7.
- [7] Nakazawa H,Okada K,Onodera T,et al. Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2009,83(4):649-57.
- [8] Lin L,Meng X,Liu P,et al. Improved catalytic efficiency of endo-beta-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2009,82(4):671-9.
- [9] Kim Y S,Jung H C,Pan J G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants[J]. **Appl Environ Microbiol**,2000,66(2):788-93.
- [10] 谯仕彦,陆文清,刘兴海. 饲料添加剂纤维素酶活力的测定(分光光度法)[S]. NY/T 912-2004.
- [11] Kiefer F,Arnold K,Kunzli M,et al. The SWISS-MODEL Repository and associated resources [J]. **Nucleic Acids Res**,2009,37

- (Database issue):D387-92.
- [12] 张龙翔. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1982.
- [13] 胥兵,陈惠,韩学易. 枯草芽胞杆菌 C-36 纤维素酶的纯化及酶学性质[J]. 四川农业大学学报,2006,24(4):398-401.
XU Bing, CHEN Hui, HAN Xue-yi. Purification and properties of cellulase from *Bacillus subtilis* C-36 [J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**, 2006, 24(4):398-401. (in Chinese)
- [14] 吴振芳,陈曾民. 内切葡聚糖酶基因在毕赤酵母中高效表达研究[J]. 农业生物技术学报,2009,17(3):529-35.
WU Zhen-fang, CHEN Hui, ZENG Min. Over-expression of endoglucanase gene in pichia pastoris [J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**, 2009, 17(3):529-35. (in Chinese)
- [15] 张秀艳. β -葡聚糖酶的定向进化及热稳定性研究[J]. 浙江大学学报,2006:7-17.
ZHANG Xiu-yan. Studies on the directed evolution and thermostability of β -glucanase [J]. **Journal of Zhejiang University**, 2006:7-17. (in Chinese)
- [16] 高凤菊,陈惠,吴琦. 产纤维素酶芽胞杆菌 C-36 的分离筛选及其鉴定[J]. 四川农业大学学报,2006,24(2):175-7.
GAO Feng-ju, CHEN Hui, WU Qi. Selection and Identification of Cellulase-producing *Bacillus* C-36 [J]. **Journal of Sichuan Agricultural University**, 2006, 24(2):175-7. (in Chinese)
- [17] Zhang Y Z, Liu J, Gao P J, et al. Structure investigation of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma pseudokoningii* S38 with a scanning tunneling microscope[J]. **Appl Phys A**, 1998, 67(4):483-5.
- [18] Liu G, Tang X, Tian S-L, et al. Improvement of the cellulolytic activity of trichoderma reesei endoglucanase IV with an additional catalytic domain[J]. **World J Microbiol Biotechnol**, 2006, 22(12):1301-5.
- [19] 曾炳佳,陈曹杜. 同源建模在纤维素酶分子改造中的应用[J]. 生物物理学报,2008,2:85-92.
ZENG Bin-kun, CHEN Cao-du. The Application of homology modeling in the cellulase molecule evolution [J]. **Acta Biophysica Sinica**, 2008, 2:85-92. (in Chinese)
- [20] Zhang S, Yin Q Y, Li Y H, et al. Molecular and biochemical characterization of Ba-EGA, a cellulase secreted by *Bacillus* sp. AC-1 from *Ampullaria crosseans*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2007, 75(6):1327-34.
- [21] Fukuda T, Ishikawa T, Ogawa M, et al. Enhancement of cellulase activity by clones selected from the combinatorial library of the cellulose-binding domain by cell surface engineering[J]. **Biotechnol Prog**, 2006, 22(4):933-8.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第二届工业企业微生物安全控制技术与实践国际研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 生物技术与生物工程

开始日期: 2013-08-21 结束日期: 2013-08-23

所在城市: 北京市 东城区 主办单位: 国家微生物资源平台

承办单位: 中国工业微生物菌种保藏管理中心 中国食品发酵工业研究院 中国微生物学会工业微生物学专业委员会 发酵行业生产力促进中心

联系人: 胡育骄 联系电话: 010-64645554, 18600736797 传真: 010-64616613

E-MAIL: jane@china-cicc.org 会议网站: http://www.china-cicc.org/index_hy.htm

会议名称(中文): 第十六次全国环境微生物学学术研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 环境科学

开始日期: 2013-08-21 结束日期: 2013-08-23

所在城市: 甘肃省 兰州市 主办单位: 中国微生物学会环境微生物学专业委员会

承办单位: 兰州大学 议题: 大会主题: 环境微生物与污染治理

全文截稿日期: 2013-07-20 联系人: 甘桔王勇 联系电话: 0931-8912560

传真: 0931-8912561 E-MAIL: lzuemconference@163.com

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=1968>