

嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶在枯草杆菌中的表达及酶学性质

郑春阳, 刘 珺, 魏国祥, 王 磊

(天津强微特生物科技有限公司, 天津 300384)

摘要: 首先根据 *Thermopolyspora flexuosa* 的内切-1,4- β -木聚糖酶基因设计了引物, PCR 扩增成功后进行酶切消化, 连接载体质粒 pHT43, 经大肠杆菌 DH5 α 扩增后, 挑选阳性克隆, 经菌体 PCR 及测序验证后, 将基因序列测序正确的质粒大量抽提, 经过转化导入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800N 宿主, 培养并经过 1 mmol/L IPTG 诱导表达后, 发酵胞外上清经 SDS-PAGE 电泳证明重组蛋白质成功获得表达。其相对分子质量为 27 kD, 最适反应温度为 80 $^{\circ}\text{C}$, 最适反应 pH 为 6.0。由此得知, 分泌表达的嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶的枯草芽孢杆菌工程菌株构建成功, 这为未来该酶的产业化生产奠定了基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌表达系统; 分泌表达; 耐高温嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶

中图分类号: Q 814; Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)12—1333—05

Expression of Thermophilic Endo-1,4- β -xylanase in *Bacillus subtilis*

ZHENG Chun-yang, LIU Jun, WEI Guo-xiang, WANG Lei

(Robustnique Corporation Ltd., Gongfangshidai II, Huayuan Industrial Area, Tianjin 300384, China)

Abstract: The PCR primers were designed based on the endo-1,4- β -xylanase gene of the *Thermopolyspora flexuosa* was PCR amplified using designed primer. The amplified product was then digested and ligated into plasmid pHT43. After transformation of *Escherichia coli* DH5 α , the positive clones were selected and the correct plasmids were largely extracted and transformed into *Bacillus subtilis* WB800N, the expression was induced by 1mM IPTG. SDS-PAGE electrophoresis of the extracellular supernatant showed that the targeted protein was successfully expressed. The apparent molecular weight of the endo-1,4- β -xylanase is 27 kD. The optimal reaction temperature is 80 $^{\circ}\text{C}$, whereas the optimal pH is 6. Hence, an engineered *B. subtilis* strain which could secrete endo-1,4- β -xylanase was successfully constructed.

收稿日期: 2013-04-08

基金项目: 天津市滨海新区科技小巨人成长计划-科技型企业创新发展(科技创业)项目(2010-BK130070); 天津市科技型中小企业技术创新基金项目(11C26211203970); 天津市滨海新区重大科技项目(2011-BK120014); 天津市科技计划项目(12ZCZDSY01800)。

作者简介: 郑春阳(1976—), 男, 河北唐山人, 工学博士, 高级工程师, 主要从事酶制剂与生物技术研究。

E-mail: chunyang.zheng@gmail.com

Keywords: *Bacillus subtilis* expression system, expression and secretion, thermophilic endo-
-1,4- β -xylanase

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是目前原核表达系统中分泌表达外源蛋白质较理想的宿主。它作为一种表达系统^[1]具有如下明显优势:

1)它是一种安全的表达系统,其安全程度可以达到食品级,这是一般原核表达系统无法比拟的。

2)具有很强的蛋白质分泌功能,蛋白质在细胞内合成后,可以通过特定机制(分泌途径)输出到细胞外培养基中。提取不需要破碎细胞,只需较简单地处理发酵上清液即可得到较纯的目标蛋白质。目前,多种外源蛋白质已在 *B. subtilis* 中实现了分泌表达。

3)没有明显的密码子偏爱性,同时表达产物也不容易形成包涵体。

4)发酵条件简单,产物易于分离纯化。

以上优点使得 *B. subtilis* 成为一种优秀的表达系统。借助于此表达体系,很多重组耐高温 α -淀粉酶、多肽类药物、杀虫蛋白质都已经实现商业化生产^[2]。

目前在纸浆蒸煮过程中,国外主要采用木聚糖酶切断木质素同纤维素之间的联系物(木聚糖或半纤维素),使木质素游离,再用碱蒸煮后,由纸浆游离出的木聚糖可再次吸附在纤维的表面,用木聚糖酶将其分解,可增加孔隙,氯素的浸透性提高,从而使木质素容易从纸浆内部浸提出来。此工艺活性氯用量可减少30%以上。但造纸用木聚糖酶中不允许纤维素酶的活性过高^[2],否则会在酶处理过程中引起纸浆黏度和纤维强度的下降。碱蒸煮是一个高温过程,同时高温条件更有利于木质素溶出,因此开发在碱性条件下具有高活性的嗜热木聚糖酶将更有应用价值。此外,在食品焙烤及果蔬加工业中嗜热木聚糖酶具有重要的潜在应用价值,比如在面包生产中,耐热木聚糖酶^[3]能够明显改善面团的稳定性,提高入炉急胀性能和增大烘烤后面包体积等功能,展现了良好的酶学性能。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

Thermopolyspora flexuosa 基因组, 购自美国

ATCC 公司(No.35864)。大肠杆菌 DH5 α 、枯草芽孢杆菌表达宿主 *Bacillus subtilis* WB800N 及质粒 pHT43, 购自 MoBiTec 公司。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 蛋白胨 1 g/dL, 酵母提取物 0.5 g/dL, NaCl 1 g/dL; 重组质粒克隆时使用^[3]。

1.2.2 2 $\times$ YT 培养基 胰蛋白胨 1.6 g/dL, 酵母提取物 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL。

1.2.3 抗生素质量浓度 用于培养含有 AMP^r 质粒的 *E. coli* 时, 质量浓度为 100 μ g/mL; 用于培养含有 Cm^r 质粒的 *B. subtilis* 时, Cm^r 质量浓度为 5 μ g/mL。

1.3 试剂

Phusion 高保真 DNA 聚合酶, 限制性内切酶(Xba I, Sma I), 均购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶, 作者所在公司自产; 质粒提取试剂盒及 PCR 产物回收试剂盒, 购自天根生化科技有限公司; DNA marker, 购自 TAKARA 公司; Protein Marker, 购自 Fermentas 公司; 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)和氯霉素, 购自上海生工集团。

1.4 PCR 引物设计与基因扩增

在 NCBI 上搜索目的基因, 找到该基因的 DNA, 在 CDS 选项中, 找到编码区所在位置, 据此设计构建重组质粒的引物序列如下:

P1: 5'-CAACACTCTAGAATGGATACAACAATCACACA-3' (下划线处为 Xba I 酶切位点); P2: 5'-ATCATTCCTCCGGTCAAAGTGTAGCAACGC-3' (下划线处为 Sma I 酶切位点)。以 *T. flexuosa* 基因组为模板, 采用 phusion 高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。使用质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 重组表达载体的构建与转化

将 PCR 扩增产物回收后, 得到内切-1,4- β -木聚糖酶基因片段, 并与枯草表达载体 pHT43 使用 Xba I 和 Sma I 双酶切后, 回收产物经 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 通过 100 μ g/mL 氨苄青霉素抗性筛选重组质粒, PCR 鉴定阳性

克隆并送至北京六合华大基因测序。

1.6 枯草芽孢杆菌感受态的制备及转化

取保存的 WB800N 菌株划线于 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养。挑取单菌落于 5 mL SPC (10×T-base, 25 g/dL Glucose, 1.2 g/dL MgSO₄, 10 g/dL yeast extract, 1 g/dL casamino acids) 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 过夜培养。次日, 取 1 mL 过夜培养物转接至 8 mL SPC 培养基中, 37 °C, 200 r/min 继续培养, 当培养物生长到 OD₆₀₀=1.2~1.6 时, 按 1:1 的体积比例转接到 SPII (10×T-base, 25 g/dL Glucose, 1.2 g/dL MgSO₄, 10 g/dL yeast extract, 1 g/dL casamino acids, 100 mmol/L CaCl₂) 培养基中, 37 °C, 200 r/min 继续培养 2 h 后停止培养, 快速把培养物转移到冰上, 加入终质量分数为 10% 的甘油, 分装成每管 0.5 mL, 得到感受态细胞于 -80 °C 保存。取 4 μL 待转化的质粒加入到 *B. subtilis* 感受态细胞中, 于 37 °C, 200 r/min 复苏 30 min, 向复苏的细胞中添加 0.3 mL LB 液体培养基, 继续在相同条件下培养 30 min, 把培养物在 2 500 r/min 离心 1 min, 适当浓缩后把转化产物涂布于 5 μg/mL 的 LB 平板 37 °C 过夜培养。

1.7 重组枯草芽孢杆菌工程菌 pHT43 的分泌表达

接种重组芽孢杆菌于 2 瓶 50 mL 的 2×YT 培养基中 (一瓶含 5 μg/mL Km^r, 另一瓶无抗性), 37 °C, 200 r/min 过夜培养。次日, 将过夜的菌液转接到新的 2×YT 培养基中, 测得起始 OD₆₀₀ 约为 0.15, 37 °C, 200 r/min 继续培养。当培养至 OD₆₀₀=0.7~0.8 时, 分装为 2 瓶, 一瓶用 1 mmol/L IPTG 诱导, 另一瓶作为对照, 不加诱导剂。分别收集 1、2、3 h 的菌体 1 mL, 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取胞外上清。胞外清液经 TCA-DOC^[4] 沉淀、丙酮清洗后, 用 40 μL 的 50 mmol/L Tris HCl (pH 8.0) 溶解, 加入 10 μL 的 5×SDS 上样缓冲液, 经 100 °C 加热处理后, 采用质量分数 10% SDS-PAGE 分析培养基中蛋白质表达情况。

1.8 重组嗜热内切-1,4-β-木聚糖酶酶学性质的分析

测定酶活力的方法为 DNS 试剂法: 以 10 mg/mL 的榉木木聚糖 (Xylan from beechwood, SIGMA) 为底物, 其中酶反应温度设为 80 °C, 以在测定条件下每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

1.8.1 酶的最适反应温度

取适当稀释酶液于 50~

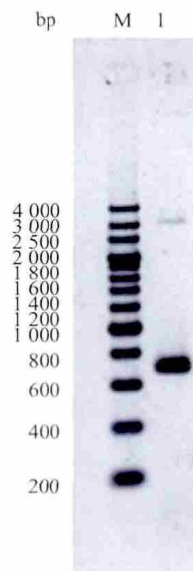
100 °C 水浴进行酶解反应, 每隔 10 °C 测定酶活, 以酶活力最高者为 100%, 作温度—相对酶活性曲线。

1.8.2 酶的最适反应 pH 配制 pH 6.0~8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 pH 8.5~10.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。在 80 °C 下, 分别测定重组嗜热内切-1,4-β-木聚糖酶在不同 pH 值下的酶活性。以测得最大值为 100%, 作 pH—相对酶活性曲线。

2 结果与分析

2.1 重组内切-1,4-β-木聚糖酶基因的 PCR 扩增

PCR 扩增产物经质量分数 1% 琼脂糖电泳分析表明, 出现约 700 bp 扩增产物, 与预期结果一致, 见图 1。



M: DNA marker; 1: PCR product of the thermophilic endo-1,4-β-xylanase

图 1 重组嗜热内切-1,4-β-木聚糖酶基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of the DNA of the thermophilic endo-1,4-β-xylanase

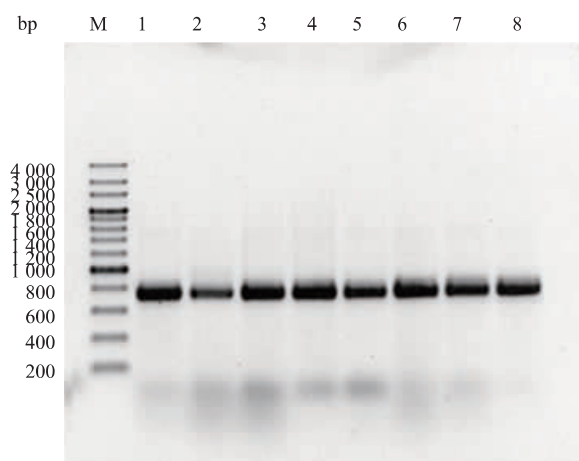
2.2 重组质粒的 PCR 鉴定

目的基因扩增产物经 Xba I 及 Sma I 双酶切后, 连接到载体 pHT43, 转化大肠杆菌 DH5α 后, 挑取转化子抽提质粒进行 PCR 鉴定, 确定目的基因已转入宿主细胞中, 如图 2 所示。重组质粒经抽提测序后, 经 BLAST 比对, 与目的基因序列相符, 未发生任何突变。

2.3 重组嗜热内切-1,4-β-木聚糖酶的分泌表达

将不同时期发酵上清液采用 TCA 法浓缩后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 由图 3 可以看出, 在 27 kD 处

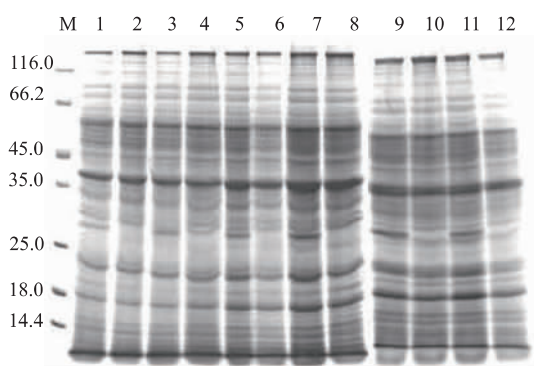
经诱导后有一明显蛋白质条带得到表达。与目的蛋白质大小相一致,表明嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶在枯草芽孢杆菌中成功得到整合分泌表达。同时可知,蛋白质表达随着诱导时间的延长,胞外蛋白质表达量也在逐步增高,由于此次浓缩 25 倍并加上诱导分泌表达时间短,导致背景蛋白质比较高,相信随着培养诱导时间的延长和发酵工艺的优化,目的蛋白质在胞外表达的量还会进一步得到提高。



M:DNA marker; 1—8:PCR products of the recombinant pHT43-Xyn11A

图 2 重组质粒 pHT43-Xyn11A 的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant pHT43-Xyn11A



M:Protein marker; 1:Cm+with IPTG+; 2:Cm+with IPTG-; 3:Cm-with IPTG+; 4:Cm-with IPTG-; 5:Cm+with IPTG+; 6:Cm+with IPTG-; 7:Cm-with IPTG+; 8:Cm-with IPTG-; 9:Cm+with IPTG+; 10:Cm+with IPTG-; 11:Cm-with IPTG+; 12:Cm-with IPTG-

图 3 重组嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the thermophilic endo-1,4- β -xylanase expressed in *B. subtilis* by SDS-PAGE

2.4 重组嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶酶学性质

2.4.1 酶的最适反应温度 图 4 显示了不同反应温度下测定的木聚糖酶活力。结果表明,在反应温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ 时,酶活力最高。以 80 $^{\circ}\text{C}$ 时的酶活性为标准,在 50~80 $^{\circ}\text{C}$ 范围内相对酶活均高于 90%。随着反应温度的升高,酶活性逐渐降低,当反应温度提高至 100 $^{\circ}\text{C}$ 时,相对酶活性仅为 21% 左右。

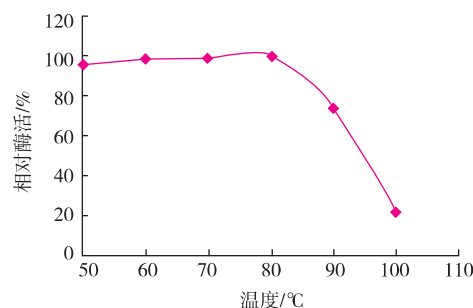


图 4 温度对重组嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity of the thermophilic endo-1,4- β -xylanase

2.4.2 酶的最适反应 pH 木聚糖酶在不同 pH 值下作酶活性的检测,结果如图 5 所示。该酶的最适反应 pH 为 6。该酶的最适温度和最适 pH 均比文献报道略低 [7-8]。从图 5 中可以看出,该酶在 pH 6~7 时,酶的相对活性较为稳定,维持在 95%~100% 之间。当 pH>7 时,酶活性下降较快,在 pH 值为 8.0 时,剩余酶活性约为 39%。当 pH 值到达 10.0 以后,相对酶活性下降到 18% 并趋于稳定,无明显变化。

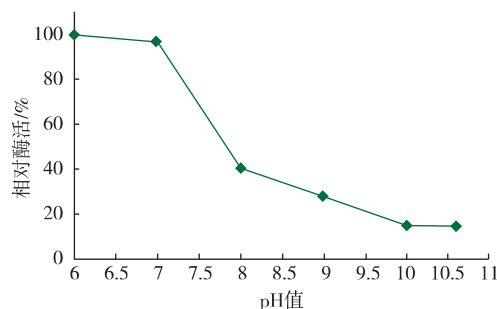


图 5 pH 对重组嗜热内切-1,4- β -木聚糖酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity of the thermophilic endo-1,4- β -xylanase

3 讨论

极端耐热木聚糖酶具有最适反应温度高、热稳定性好,以及在偏碱性条件下稳定的特点,非常适合于工业应用。通过原始菌株获得的该酶表达量很

低,菌株培养困难,所以原始菌株不适用于直接工业生产。此类极端耐热木聚糖酶也曾在大肠杆菌、酵母中表达,但是因为该酶不能外泌、须进行破壁提取、表达水平不高、工程菌株不稳定等原因,限制了其在工业上的应用^[9-12]。有相关文献证实,在枯草芽孢杆菌中整合外泌表达极端耐热木聚糖酶具有表达水平高^[7],基因稳定性较高等特点,在工业生产上具有一定的优势。通过此次试验,利用基因构建和蛋白质诱导表达技术,获得了嗜热木聚糖酶枯草芽孢杆菌分泌型工程菌株,同时异源嗜热酶蛋白质也获得了很好的表达,但作为未来大规模工业用菌

株而言,采用 IPTG 作为诱导剂进行表达,成本仍十分昂贵。因此,非常有必要进行进一步筛选和考察枯草芽孢杆菌的组成型、温度或蔗糖等经济诱导型启动子,用于代替目前的 IPTG 诱导型启动子,这将在今后有助于进一步降低未来投产时的生产成本。同时,就异源表达而言,蛋白质表达在不同的表达体系中可能存在着不同程度的翻译后修饰,这将对酶蛋白质的催化活性产生影响。因此,还有必要进一步进行相关的一系列实验来确认和评价修饰后的影响。

参考文献:

- [1] Wolfgang Schumann Lab. *B. subtilis* expression vectors-product information and instructions[Z]. Bayreuth:University of Bayreuth,2005.
- [2] Wu X C, Lee W, Tran L, et al. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(16):4952-4958.
- [3] Bertani G. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1952, 62:293-300.
- [4] Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials[J]. *Anal Biochem*, 1976, 70(1):241-250.
- [5] 毛连山,余世袁. 木聚糖酶在纸浆漂白中应用的研究现状[J]. 中国造纸学报, 2006, 21(3):93-97.
MAO Lian-shan, YU Shi-yuan. Present situation of research on utilization of xylanase in biobleaching[J]. *Transactions of China Pulp and Paper*, 2006, 21(3):93-98. (in Chinese)
- [6] 李秀婷,李里特,江正强,等. 耐热木聚糖酶对面包老化作用探讨[J]. 食品发酵与工业, 2006, 32(1):23-27.
LI Xio-ting, LI Li-te, JIANG Zheng-qiang, et al. Effect of a thermostable xylanase on bread-staling[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(1):23-27. (in Chinese)
- [7] 张伟,李冠,娄恺. 极端耐热木聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的整合表达[J]. 生物技术, 2010, 20(1):15-18.
ZHANG Wei, LI Guan, LOU Kai. Expression of an extreme-thermostable xylanase B from *Dictyoglomus thermophilum* in *B. subtilis* 168[J]. *Biotechnology*, 2010, 20(1):15-18. (in Chinese)
- [8] Zhang L, Siika-Aho M, Puranen T, et al. Thermostable recombinant xylanase from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus auranticus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2011(4):12.
- [9] Matsui H, Ban-Tokuda T. Studies on carboxymethyl cellulose and xylanase activities of anaerobic fungal isolate CR4 from the bovine rumen[J]. *Curr Microbiol*, 2008, 57(6):615-619.
- [10] Ulrich A, Klimke G, Wirth S. Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application[J]. *Microb Ecol*, 2008, 55(3):512-522.
- [11] 邵蔚蓝,薛业敏. 以基因重组技术开发木聚糖酶类半纤维素资源[J]. 食品与生物技术学报, 2002, 21(1):88-93.
SHAO Wei-lan, XUE Ye-min. Molecular biotechnology in exploiting the resource of hemicellulose[J]. *J Food Sci and Biotech*, 2002, 21(1):88-93. (in Chinese)
- [12] 余小红. 海栖热袍菌和重组毕赤酵母发酵产极耐高温木聚糖酶及酶的化学修饰[D]. 北京:中国农业大学, 2004.