

里氏木霉木聚糖酶 XYN II 基因在毕赤酵母中的分泌表达



OUYANG Jia

欧阳嘉^{1,2}, 王向明², 张清², 严明², 许琳²

(1. 南京林业大学化学工程学院, 江苏南京 210037;

2. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏南京 210009)

摘要: 采用 RT-PCR 方法克隆到里氏木霉 Rut C-30 木聚糖酶(XYN II)的 cDNA 序列。测序结果表明, XYN II 的 cDNA 基因开放阅读框长度为 669 bp, 编码 223 个氨基酸, N 端 1~19 个氨基酸为潜在的信号肽序列, 删去潜在信号肽序列, 将里氏木霉木聚糖酶的基因(*xyn II*)构建到巴斯德毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K 上, 线性化后电击转化到巴斯德毕赤酵母中, 经 G418 筛选和 PCR 鉴定后的转化子用 1% 的甲醇进行诱导, 对重组木聚糖酶活检测显示该基因能在毕赤酵母中表达有生物活性的 XYN II 并分泌到胞外。发酵液中的酶活在诱导培养 60 h 达到 1.45 IU/mL, 最适酶解温度为 50 °C, 最适 pH 值为 6.0。

关键词: 里氏木霉; 木聚糖酶; 毕赤酵母; 分泌表达

中图分类号: TQ91; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2007)05-0083-06

Secretory Expression of *Trichoderma reesei* XYN II Gene in *Pichia pastoris*

OUYANG Jia^{1,2}, WANG Xiang-ming², ZHANG Qing², YAN Ming², XU Lin²

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The gene of xylanase (XYN II) was amplified by RT-PCR from the total RNA of *Trichoderma reesei* Rut C-30 and sequenced. The gene comprised an open reading frame that encoded a polypeptide of 223 amino acid residues, containing a signal peptide of 19 amino acid residues. A recombinant plasmid pPIC9K-*xyn II* was constructed by inserting gene *xyn II* into *Pichia pastoris* secretory vector pPIC9K. Linearized pPIC9K-*xyn II* was transformed into *P. pastoris* GS115 with the method of electroporation. The recombinant strain identified by G418 selection and confirmed by PCR analysis was induced by 1.0% methanol at 28 °C to express the recombinant xylanase, the highest enzyme activity of 1.45 IU/mL was detected for 60 h incubation. The optimal pH value and temperature of the enzyme activity is 6.0 and 50 °C, respectively.

Key words: *Trichoderma reesei*; xylanase; *Pachia pastoris*; secretory expression

木聚糖酶在制浆造纸工业中有广泛的应用前景,特别是在纸浆生物漂白工序中,添加木聚糖酶对麦草浆进行预处理,在保证纸浆漂后白度的同时,还可以减少 50% 的有效氯^[1],有利于环境保护。然而,传统木聚糖酶主要是由细菌和真菌产生,微生物在合成木聚糖酶的同时常常分泌一定数量的纤维素酶,这些纤维素酶的存在会导致纸浆得率下降和强度降低,因此无纤维素酶活木聚糖酶的制备成为木聚糖酶在造纸工业中应用的关键技术之一^[2-3]。构建高效分泌表达的木聚糖酶重组菌对于发展我国造纸工业用酶具有重大而深远的意义^[4-5]。里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是传统生产木聚糖酶的菌株,所产木聚糖酶在低聚木糖生产和生物漂白中均有显著效果^[2],作者从里氏木霉中克隆到木聚糖酶 XYN II 的基因(*xyn II*),利用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)外源表达体系实现了 XYN II 的分泌表达,并对所产木聚糖酶的酶学进行了初步研究。

收稿日期: 2006-11-25

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2003CB716005, 2007CB707801); 国家高技术研究发展计划(2006AA020204)

作者简介: 欧阳嘉(1972-),女,湖南湘潭人,讲师,博士生,主要从事林产生物化工研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 里氏木霉 Rut C-30、大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 本实验室保存;毕赤酵母表达载体 pPIC9K(Amp⁺ Kan⁺)和毕赤酵母菌株 GS115(His⁻)购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司;RT-PCR 逆转录酶 AMV、限制性内切酶、pGEM-T 载体系统和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;DNA 相对分子质量标准、EX-TaqDNA 聚合酶购自宝生物工程公司(大连);无氨基酸的硫酸铵酵母氮源培养基、抗生素 G418、蛋白质标准购于上海生工生物工程技术有限公司;测序由上海生工生物工程技术有限公司完成;引物由上海申能博彩公司合成;桦木木聚糖、Bradford 试剂购自 Sigma 公司。其他生化试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基 LB 培养基用于大肠杆菌 DH5 α 培养,YPD、MD、BMG 和 BMM 培养基用于毕赤酵母的增殖培养、筛选和表达,具体配方见 Invitrogen 公司的毕赤酵母操作手册;PDA 和 Mandels^[6]培养基用于里氏木霉培养和木聚糖酶表达的诱导。

1.1.4 引物 使用引物序列如表 1。

表 1 实验相关引物

Table 1 Relevant primers used in this study

名称 name	长度/bp length	序列 sequence
F1	20	5'-GAC ATC AAC ATG GTC TCC TT-3'
R1	20	5'-TTA GCT GAC GGT GAT GGA AG-3'
F2	30	5'-GAT GAA TTC GAG GTC GAA TCC GTG GGC TGT-3'
R2	20	5'-CGC CAA GCT ATT TAG GTG AC-3'
5'AOX	21	5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'
3'AOX	21	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'

1.2 方法

1.2.1 里氏木霉的菌体培养及总 RNA 提取 将 PDA 上的 Rut C-30 接种至菌丝液体培养基中,30 ℃,150 r/min 摇床培养活化 36 h 后转接至产酶培养基,于 30 ℃、150 ~ 170 r/min 恒温震荡培养,约 3 ~ 4 d。离心收集菌丝,无菌水冲洗,液氮速冻,研磨后使用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取里氏木霉的总 RNA,具体操作方法参见该试剂的使用说明。

1.2.2 里氏木霉 *xyn II* 基因的获得 获得的总 RNA 使用 AMV Reverse Transcriptase 进行 cDNA 第一链的合成,具体过程参照相应的使用说明。以 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增 *xyn II* 基因。反应体系含 2 μ L 25 mmol/L MgCl₂、2 μ L 10 mmol/L dNTP、0.5 μ L (2.5 U) EX Taq DNA 聚合酶、各 1 μ L 10 μ mol/L 的上下游引物(F1 和 R1)和反转录产物 2 μ L。扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min 后,94 ℃ 变性 1 min,52 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min 30 s,进行 33 个循环;然后在 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经回收纯化,与 pGEM-T 载体连接,转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布在含氨苄青霉素 LB 平板上。将阳性克隆命名为 pGEM-T-*xyn II*。

1.2.3 重组毕赤酵母表达载体的构建和毕赤酵母的转化 以 pGEM-T-*xyn II* 克隆载体为模板,在上游引物 F2 中引入 *EcoRI* 的酶切位点(即表 1 中 F2 的 5'端的 GAATTC),用引物 F2 和 R2 PCR 获得含经 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切位点的目的基因片段,反应体系和条件同前。经双酶切构建到带有高效甲醇诱导启动子 AOX 的毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上,命名为 pPIC9K-*xyn II*。

将活化后的 *P. pastoris* GS115 菌株接种到 200 mL YPD 培养基 200 r/min,30 ℃ 下培养过夜至 OD₆₀₀ 为 1.0 ~ 1.5。4 ℃ 离心收集菌体,用预冷的无菌水和 1 mol/L 山梨醇洗涤菌体两次,将所得菌体悬浮于 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液中。取上述菌悬液 100 μ L 至 0.2 cm 电击杯 (BioRAD 公司),加入 5 ~ 10 μ L 经 *SalI* 线性化的重组表达载体,冰浴 5 min,用电转化仪电击,条件为 1 500 V,25 μ F。电击结束后

电击杯内加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液,取 200 μ L 涂布于缺少组氨酸的 MD 平板,30 $^{\circ}$ C 条件下培养至转化子出现。分别以不含载体的 GS115 和含组氨酸抗性的工程菌 117 为阴性和阳性对照。

1.2.4 重组毕赤酵母的 G418 平板筛选和甲醇表型鉴定 用灭菌牙签挑取转化子分别点种到含 0.25、0.5、1、1.5 和 2 g/L G418 的 YPD 培养基平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d,在高浓度 G418 平板上生长的为高拷贝转化子。获得的高拷贝转化子点种于筛选培养基 MM 和 MD 平板上,确定其甲醇利用表型,在 MD 和 MM 上均能正常生长的转化子为阳性转化子。

1.2.5 重组毕赤酵母菌株的 PCR 快速鉴定 在含 G418 的 YPD 培养基平板上挑单克隆转化子重悬于 20 μ L 无菌水中,加入 2~3 μ L 的 lyticase 酶液 30 $^{\circ}$ C 温育 30 min,浸入液氮 10 min,取出离心后,以上清液作为模板,采用 25 μ L PCR 反应体系,加入 2.5 μ L 细胞裂解液,0.5 μ L dNTP,各 0.5 μ L 5' AOX 和 3' AOX 引物,2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,加入 2.5 U Taq DNA 聚合酶。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,进行 30 个循环;然后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。琼脂糖凝胶分析 PCR 结果。

1.2.6 重组毕赤酵母工程菌株的诱导表达 将阳性转化子接种于含 25 mL BMG 培养基中的 250 mL 的摇瓶中,30 $^{\circ}$ C 下 220 r/min 摇床培养 48 h。离心收集菌体,用无菌水洗 3 次,将菌体转移至 100 mL BMM 诱导培养基中,30 $^{\circ}$ C 220 r/min 继续培养,每 24 h 补加适量甲醇至体积分数 1%。每 12 h 取样,离心 5 min,收集上清液,即为粗酶液。

1.2.7 重组毕赤酵母表达产物分析 利用 Bradford 法^[7]测定发酵液中的蛋白含量;采用 DNS 定糖法测定木聚糖酶的活性^[8]。酶活定义每分钟产生 1 μ mol 木糖所需的酶量为一个酶活力单位(1 IU)。

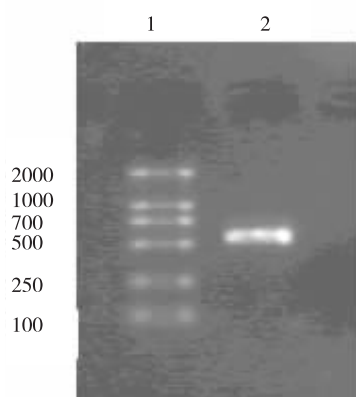
2 结果与讨论

2.1 XYN II 成熟蛋白编码序列的克隆

在含滤纸的 Mandels 培养基培养里氏木霉后,采用 Trizol 试剂提取菌体的总 RNA,并以 RT-PCR 方法扩增得到 *xyn II* 基因,结果如图 1 所示。扩增产物经连接到 pGEM-T 载体上后进行序列测定,表明所扩增的序列长度为 714 bp,含有 669 bp 的 ORF 框。在 NCBI 数据库中 BLAST 分析表明,与文献报道的 *xyn II* 基因序列(Genebank No. S67387)有 4 个碱基不同,分别为 13~15 位 ACC 变为 ACG,259~261 位 GGG 变为 GGC,289~291 位 GGA 变为 GGC,565~567 位 TTC 变为 TCC(以起始密码子 ATG 的 A 为 +1),基因序列同源率为 99.4%,对应的蛋白序列仅第 189 位氨基酸残基由 Phe 突变为 Ser,氨基酸序列同源率达 99.1%,因此将该基因命名为 *xyn II*。所编码木聚糖酶包含 223 个氨基酸,根据 SignalP 3.0 信号肽分析结果显示 N 端 1~19 aa 是潜在的信号肽序列,属分泌型蛋白,保守结构区域分析表明该蛋白属于糖苷水解酶第 11 家族。

2.2 毕赤酵母重组表达载体的构建

以获得的重组载体 pGEM-T-*xyn II* 为模板,按照 1.2.2 节方法进行 PCR 扩增反应,由于毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中含有酵母 α 因子的信号肽编码序列,因此在设计 PCR 引物时删去 1~19 aa 的信号肽序列。所得产物经过限制性内切酶 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切后,与 pPIC9K 载体经限制性内切酶切得到的约 9.3 kb 载体片段连接,得到重组表达载体 pPIC9K-*xyn II*(9 883 bp)(重组表达载体构建过程如图 2)。使用 5' AOX 和 3' AOX 引物对重组表达载体 PCR 扩增结果如图 3 所示,*xyn II* 基因已经正确构建到毕赤酵母分泌型表达载体 pPIC9K 的多克隆位点,并位于信号肽序列的下游。



1. 2 kb DNA 相对分子质量标准品 2 kb DNA M_r Marker;
2. PCR 产物: 编码基因 *xyn II* PCR product: the encoding sequence of *xyn II* gene

图 1 RT-PCR 方法获得里氏木霉 *xyn II* 基因
Fig. 1 The *xyn II* gene isolated from *T. reesei* through RT-PCR amplification

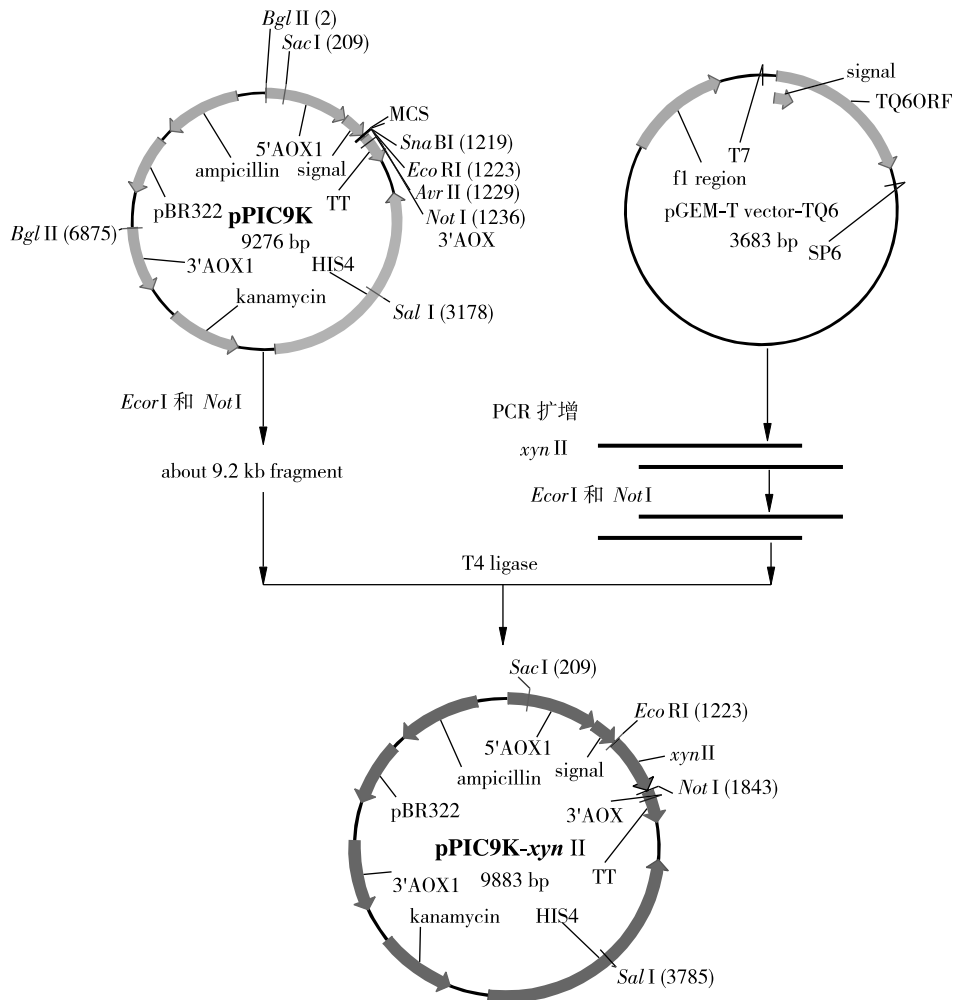


图 2 重组载体 pPIC9K-xyn II 的构建过程

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pPIC9K-xyn II

2.3 高拷贝重组毕赤酵母的筛选和鉴定

在 MD 筛选培养基上筛选到 60 个阳性转化子,分别点种到不同浓度的 G418-YPD 平板上,在含有 2 g/L G418 的平板上获得了 7 个阳性转化子。使用 AOX 进行 PCR 鉴定。原始菌 GS115 的 PCR 产物为 2 kb 附近。结果表明空质粒 pPIC9K 整合到 GS115 后,阴性对照 1 的 PCR 产物 500 bp 左右,为一条带,是甲醇缓慢利用型 (Mut^s);阴性对照 2 的 PCR 结果为两条带,是甲醇利用型 (Mut⁺)。pPIC9K-xyn II 整合到宿主菌 GS115 后获得的阳性转化子 PCR 结果为两条带,约 1.1 和 2.0 kb,这表明目的基因已整合到毕赤酵母基因组中(图 4),并全部为甲醇利用型。

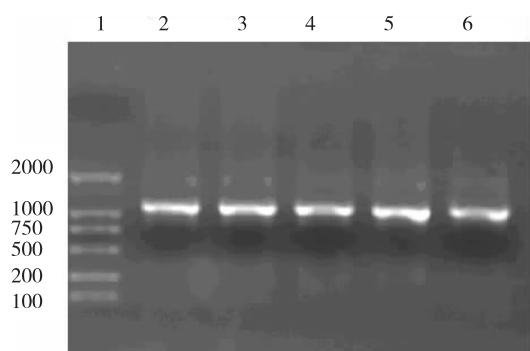
2.4 重组毕赤酵母的诱导表达

以 1% 甲醇为碳源诱导表达重组毕赤酵母,木聚糖酶随时间变化的曲线如图 5。由图 5 可知,培养基所含的木聚糖酶活力在诱导培养 60 h 后达到高峰,酶活力为 1.45 IU/mL(图 5),培养液中的酶蛋白量为 30 mg/L,比活力为 48.333 IU/mg。

2.5 重组木聚糖酶 XYN II 的最适温度和最适 pH 值

以 pH 值 5.5 的柠檬酸缓冲液配制桦木木聚糖底物溶液,分别在 30、40、50、60、70 和 80 °C 测定所得木聚糖酶的活力。结果表明(如图 6(a))重组木聚糖酶在 50 °C 后酶活随温度下降较快,80 °C 时仅具 30% 酶活性。分别以 pH 值 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液配制桦木木聚糖底物溶液,在 50 °C 反应温度下测定酶活力,测得其最适反应 pH 值为 6.0,且在中性 pH 值范围内稳

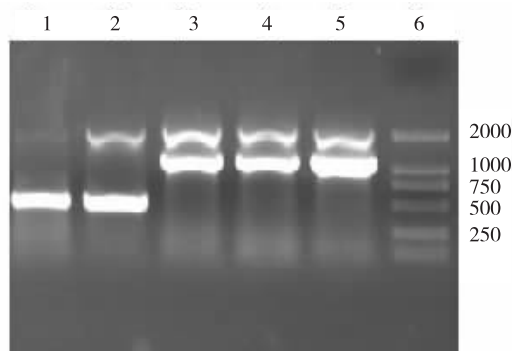
定性较好,见图6(b)。



1. DNA 相对分子质量标记 DNA M_r marker;
2~6. 5'AOX 和 3'AOX 引物的PCR扩增产物
PCR product by 5'AOX and 3'AOX primers

图3 重组质粒 pPIC9K-xyn II 的 PCR 检验

Fig.3 PCR amplification of the recombinant plasmid pPIC9K-xyn II



1. 阴性对照1 GS115/9K negative control 1 GS115/9K(Mut^S);
2. 阴性对照2 GS115/9K negative control 2 GS115/9K(Mut⁺);
3~5. *P. pastoris* 转化子 *P. pastoris* transformants;
6. DNA相对分子质量标记 DNA M_r marker

图4 毕赤酵母转化子的 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of the *P. pastoris* transformants

本研究中只是在摇瓶中实验,采用的是基本培养基,没有对表达条件进行优化,是造成酶活较低的主要原因。一般来说,巴斯德毕赤酵母可进行高密度发酵,在发酵罐中的 OD_{600} 可达到 300 左右^[9],而目前摇瓶 OD_{600} 仅在 10 左右,因此,今后对重组菌株发酵条件进一步优化,大幅提高其表达水平,有望实现其在造纸工业上的应用。

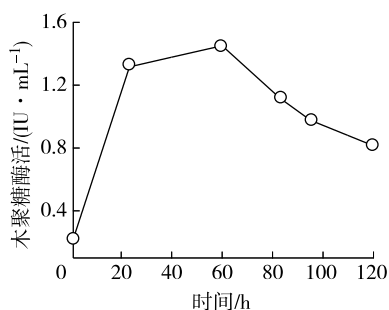


图5 重组毕赤酵母的产木聚糖酶历程

Fig.5 Time course of xylanase production of transformants *P. pastoris*

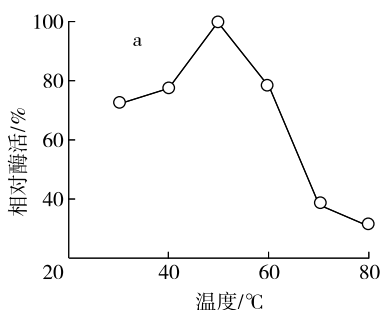
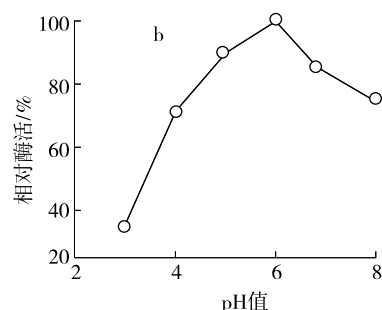


图6 温度(a)和 pH 值(b)对重组内切木聚糖酶的影响

Fig.6 Effect of temp. (a) and pH value (b) on the activity of recombinant XYN II



3 结论

巴氏毕赤酵母表达系统是一种较为理想的真核蛋白表达系统^[10],目前尚未见有用于里氏木霉木聚糖酶基因表达的报道。本实验首次成功地对里氏木霉木聚糖酶基因 *xyn II* 进行了克隆及在毕赤酵母表达系统表达,通过 RT-PCR 方法从里氏木霉体内克隆了木聚糖酶基因 *xyn II*,该基因与 GenBank No. S67387 只存在 4 个碱基的差异。采用啤酒酵母 α -因子信号肽,实现里氏木霉木聚糖酶 XYN II 在毕赤酵母中的分泌表达。在摇瓶试验中,甲醇诱导 60 h 木聚糖酶活力达到高峰,为 1.45 IU/mL,培养液中的酶蛋白量为 30 mg/L,比活力为 48.33 IU/mg。对重组酶学性质的考察显示该酶最适反应温度为 50 °C, pH 值为 6.0,在中性环境下具较高的稳定性,适宜应用在生物漂白过程。

参考文献:

[1] 顾 阳,王 艳,勇 强,等. 低纤维酶活力木聚糖酶对麦草浆的辅助漂白作用[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2006,30(3):19-22.

- [2]毛连山,勇强,姚春才,等. 纸浆漂白用木聚糖酶的选择性合成[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(1): 56-60.
- [3]勇强,尤纪雪,顾祺萍,等. 木聚糖酶的定向制备及其在制浆造纸工业中的应用[J]. 中国造纸学报, 2004, 119(2): 44-47.
- [4]李春华,李翔,马立新. 酸性木聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 89-95.
- [5]刘明启,孙建义,翁晓燕,等. 重组毕赤酵母产木聚糖酶条件的优化[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(2): 222-226.
- [6]MANDEL S M. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulose culture filtrates under use condition [J]. Biotechnol Bioeng, 1981, 23: 2009-2026.
- [7]BRAFFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 31: 426-428.
- [8]GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Appl Chem, 1987, 59(2): 257-268.
- [9]邓宁,向军俭,陈文吟,等. 人源性抗 HBsAg Fab 抗体的发酵生产研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 800-804.
- [10]JOAN L C, JAMES M C. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24: 45-66.

本刊信息

《林产化学与工业》2007年增刊要目

《林产化学与工业》2007年增刊共刊发论文34篇,摘要3篇,约150页,每本定价20.00元(含邮资)。需要者请直接汇款至《林产化学与工业》编辑部订阅。地址:210042 江苏省南京市锁金五村16号林化所内《林产化学与工业》编辑部;联系电话:025-85482493; <http://lchx.chinajournal.net.cn>; E-mail:lchx@chinajournal.net.cn; 银行信汇:中国林业科学研究院林产化学工业研究所4301012509001028549 工商银行南京板仓分理处。

增刊目次如下:

文章题目	文章题目
毛杨梅树皮提取物抗氧化及清除自由基活性初步研究	高效毛细管电泳法检测印楝素A的初步研究
核桃桃树皮的没食子酸、鞣花酸及水解单宁成分(英文)	不同工艺提取栀子黄色素的比较研究
酸功能化离子液体磺烷基咪唑对甲苯磺酸盐催化合成松香甲酯的研究	歧化松香胺 Schiff 碱-铜配合物催化苯乙烯氧化反应的研究
我国主要植物多糖胶资源组成比较研究	虎杖不同组织部位及其愈伤组织中白藜芦醇含量的测定
马尾松树皮提取物抗脑缺血和抗脑肿瘤作用的研究	桦木醇丁二酸酯的合成
银杏叶聚戊烯醇对荷瘤鼠延命率的研究	阿拉伯半乳糖-5-氟脲嘧啶的合成与缓释性能
虫白蜡制备高级烷醇混合物研究	微波辐照提取板栗壳棕色素的研究
酸功能化离子液体磺烷基咪唑磷酸盐催化合成乙酸松油酯的研究	微波辅助提取桔皮中天然抗氧化剂的研究
泡桐(原变种)果实中抑菌性苯丙素苷成分的研究(英文)	地榆根提取低聚原花青素的研究
葡萄籽提取物对黄连木生物柴油抗氧化稳定性影响的研究	超声波辅助提取旱柳树叶中的总黄酮
叶绿素铜钠对亚麻纤维的染色性能研究	超临界二氧化碳下 $\text{SO}_4/\text{Zr-MCM-41}$ 催化 α -蒎烯水合反应研究
超临界二氧化碳萃取杨梅仁油的研究	竹醋液中酚类化合物的 Folin-Ciocalteu 法测定
辣椒籽的超临界提取物对辣椒红色素抗氧化作用的研究	杉木根干馏油提取杉木精油及化学成分分析
红外光谱技术在槐米总黄酮提取过程中的应用	超声波技术在生物质资源加工领域的应用研究进展(综述)
均匀设计法优化桦木醇微波辅助提取工艺	喷雾冷冻干燥在植物提取和医药中的应用(综述)
水竹叶总黄酮的提取及纯化工艺研究	醌类色素的特性和研究进展(综述)
八角茴香渣生物转化法制莽草酸的初步研究	红榿木叶抑菌活性物提取分离研究(摘要)
核桃桃叶乙醇提取物的抑菌活性及活性成分分析	正交试验法优选香椿叶总黄酮的提取工艺(摘要)
	美国杂交柳树综合利用及研究进展(摘要)