

硫色曲霉木聚糖酶基因 *xynA* 与 *xynB* 在大肠杆菌中的融合表达及酶学性质分析*

李一航 乔家运 曹云鹤**

(中国农业大学, 农业部饲料工业中心, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 根据硫色曲霉木聚糖酶基因 *xynA* 和 *xynB* 序列设计引物, PCR 扩增获得 574 bp、594 bp 的目的基因片段. 两段 DNA 分别用 *EcoR* I / *Bam*H I、*Bgl* II / *Hind* III 酶切后, 连接到载体 pET-28a(+) 的多克隆位点, 构建了 *xynA* 和 *xynB* 融合表达载体 pET-*xynAB*, 即在木聚糖酶 A 和 B 之间引入了 7 个氨基酸的寡肽序列(GlyGlyGlySerGlyGlyGly). 将 pET-*xynAB* 转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测到了一条约 50 ku 的特异性表达条带. Ni-NTA 柱纯化后的特异性蛋白经 8 mol/L 脲素变性, 梯度透析使蛋白质复性. 酶学性质分析表明, 该重组木聚糖酶的最适催化温度为 50℃, 最适 pH 值为 4.4. 在 pH 2.4~5.4 范围内, 酶的相对活性都在 75% 以上, 重组酶在 80℃ 保温 30 min 还有近 50% 的残余酶活. 不同种类金属离子对重组酶的活力影响不同.

关键词 硫色曲霉, 木聚糖酶, 融合表达

学科分类号 Q78, Q81

木聚糖是植物细胞中主要的半纤维素成分, 在细胞壁中的含量仅次于纤维素, 约占细胞干重的 35%^[1]. 木聚糖是谷物籽实中主要的非淀粉多糖(NSP)之一, 它的存在使谷物中的营养物质不能充分暴露于动物消化液的表面, 进而影响动物的消化和吸收, 降低了饲料的营养价值.

木聚糖酶是特异性降解木聚糖为低聚木糖和木糖的一类水解酶, 广义的木聚糖酶主要包括 3 类^[2]: a. 内切- β -1,4- 木聚糖酶(EC 3.2.1.8), 作用于木聚糖和长链木寡糖, 从 β -1,4- 木聚糖主链的内部切割木糖苷键, 从而使木聚糖降解为木寡糖, 其水解产物主要为寡聚木糖, 也有少量的木糖和阿拉伯糖; b. 外切- β -1,4- 木聚糖酶(EC 3.2.1.92), 作用于木聚糖和木寡糖的非还原端, 产物为木糖; c. β - 木糖苷酶(EC 3.2.1.37), 该酶通过切割木寡糖末端而释放木糖残基. 狭义的木聚糖酶仅限于内切- β -1,4- 木聚糖酶. 木聚糖酶在饲料、造纸、食品、能源工业和环境科学上有着十分广阔的用途, 具有很大的商业开发价值. 在猪、鸡等动物的日粮中添加木聚糖酶对于提高饲料转化率、促进动物的生长代谢、提高生产水平、节约粮食、提高经济效益、减少环境污染等, 都具有重要的意义.

本实验室克隆并表达了硫色曲霉(*Aspergillus sulphureus*)中的 2 种木聚糖酶基因 *xynA* 和 *xynB*, 对纯化的表达产物进行了酶学性质分析. 其中, 木聚糖酶 A 最适催化温度为 50℃, 最适反应 pH 值为 2.4^[3], 木聚糖酶 B 最适催化温度为 40℃, 最适反应 pH 值为 4.4^[4]. 为了拓宽木聚糖酶的催化 pH 值范围、提高催化效率, 本文将 *xynA* 和 *xynB* 基因在大肠杆菌中进行了融合表达, 并对融合蛋白的酶学性质进行了分析.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种. 大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 和 BL21 均由本实验室保存.

1.1.2 载体. pET28a(+), pET-*xynA* 和 pET-*xynB* 由本实验室保存.

1.1.3 主要试剂. *LA* Taq、*EcoR* I、*Bam*H I、*Bgl* II、

* 国家科技部动物营养与饲料加工创新群体科学基金资助项目(30121004).

** 通讯联系人. Tel: 86-10-62733585, E-mail: caoyh@mafic.ac.cn

收稿日期: 2007-03-01, 接受日期: 2007-05-24

*Hind*Ⅲ、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司；卡那霉素、异丙基硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)和 DNA 纯化试剂盒(UNIQ-10)购自上海生工生物工程有限公司；木聚糖购自 Sigma 公司(Lot: X0627)；其他试剂均为国产分析纯。Ni-NTA 亲和柱购自北京卓冠公司。所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 融合表达载体构建.以 pET-xynA 和 pET-xynB 为模板, 分别用引物 A7-Del-S(5' CG₂GAATTCAGTGCCGGTATCAACTACGT 3', 下划线为 *Eco*R I 位点)、A7-Del-T(5' CGGGATCCAC-CACCAGAAGAGATCGTGACACT 3', 下划线为 *Bam*H I 位点)和 B5-Del-S(5' GAAGATCTGGTG-GTGGTTCGACCCCGAGCTCGACC 3', 下划线为 *Bgl* II 位点)、B5-R-new(5' TCCCAAGCTTTCACTG AACAGTGATGGAGGAAGA 3', 下划线为 *Hind*Ⅲ位点)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μl, 含有 10×缓冲液 5 μl, 模板 1 μl, 上下游引物各 1 μl (0.1 g/L), *LA* Taq 酶 0.5 μl, 5 mmol/L dNTP 1 μl, 灭菌水 40.5 μl。PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环。PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳回收, 过 UNIQ-10 柱纯化。pET-xynA 的扩增产物用 *Eco*R I /*Bam*H I 双酶切, pET-xynB 扩增产物用 *Bgl* II /*Hind*Ⅲ双酶切。2 种酶切片段经 UNIQ-10 柱纯化后与 *Eco*R I /*Hind*Ⅲ处理的 pET-28a(+)载体相连接。连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 涂布含卡那霉素(50 mg/L)的 LB 平板, 过夜培养。挑单菌落划线培养, 经过筛选获得 *xynA* 和 *xynB* 融合表达克隆 pET-xynAB。对 pET-xynAB 质粒用 T7 Promoter 引物测序, 以验证序列融合正确(序列测定由北京三博远志生物技术公司完成)。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达、纯化、变性、复性。

将质粒 pET-xynAB 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 挑取单菌落接种含卡那霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基, 37℃振摇过夜。取 500 μl 培养物转接 50 ml LB 液体培养基(含 50 mg/L 的卡那霉素), 37℃振摇至 A_{600} 约 0.3~0.4, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h 以上。取 1 ml 菌液, 10 000 r/min 离心 30 s 收集菌体, 悬浮于 50 μl 蛋白质上样缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 10%甘油, 2% SDS, 5%巯基乙醇, 0.1%溴酚蓝)中, 沸水浴 5 min, 6 000 r/min 离心 5 min, 取 10 μl

上清液进行 12% SDS-PAGE 分析, 以未诱导的样品做对照。

12 000 r/min 离心收集菌体, 加入 10 ml 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100)悬浮菌体, 超声波裂解, 10 000 r/min 离心 20 min。沉淀用 10 ml 洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L DTT)洗涤 2~3 次后, 用沉淀溶解缓冲液(50 mmol/L PBS 缓冲液 pH 7.4, 8 mol/L 尿素)悬浮, 室温放置 30 min 后过 Ni-NTA 柱纯化。样品上柱后, 先用分别含 10 mmol/L 和 50 mmol/L 咪唑的缓冲液(50 mmol/L PBS 缓冲液 pH 7.4)洗脱杂蛋白, 再用含 400 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱目标蛋白, 12% SDS-PAGE 检测目标蛋白的浓度。

称取一定质量的尿素, 溶于含目标蛋白的洗脱液中, 使之终浓度为 8 mol/L, 室温静置 30 min, 使蛋白质充分变性, 再依次在含有 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L 和 0 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液中透析, 每次透析不少于 12 h。

蛋白质定量采用 Micro-BCA Protein Assay Reagent (Pierce, USA)试剂盒进行。

1.2.3 重组蛋白的酶学性质分析.根据 Lu 等^[9]的方法(DNS 法)测定木聚糖酶的活力。1 个酶活单位(U)定义为: 在最适温度和 pH 值条件下, 每分钟从浓度为 5 g/L 的木聚糖溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为 1 个酶活单位。

2 结 果

2.1 融合表达载体的构建

根据硫色曲霉木聚糖酶基因 *xynA* (GenBank 登录号: DQ355509)和 *xynB* (GenBank 登录号: DQ168666)的末端序列分别设计引物 A7-Del-S/A7-Del-T 和 B5-Del-S/B5-R-new, 在引物末端分别引入 *Eco*R I /*Bam*H I 和 *Bgl* II /*Hind*Ⅲ限制性内切酶位点。PCR 扩增后, 经琼脂糖凝胶电泳纯化获得长度分别为 574 bp、594 bp 的目的基因片段(图 1), 再用相应的限制性内切酶酶切。*Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切产生的粘性末端可以互补, 过柱纯化后, 两酶切的 DNA 片段与 *Eco*R I /*Hind*Ⅲ处理的载体 pET-28a(+)进行 3 片段连接。连接产物转化大肠杆菌后, 经过筛选获得 *xynA* 和 *xynB* 基因融合的克隆 pET-xynAB(图 2)。以 T7 promoter 引物对质粒 pET-xynAB 测序, 结果表明, 序列融合与预期结

果相符. 在 *xynA* 3' 端和 *xynB* 5' 端之间插入了一段 21 nt 序列, 即 5' GGTGGTGGATCTGGTGGTGGT 3'. 翻译成相应的氨基酸序列后, 木聚糖酶 A 和木聚糖酶 B 之间由一段 7 肽 (GlyGlyGlySerGlyGlyGly) 序列连接.

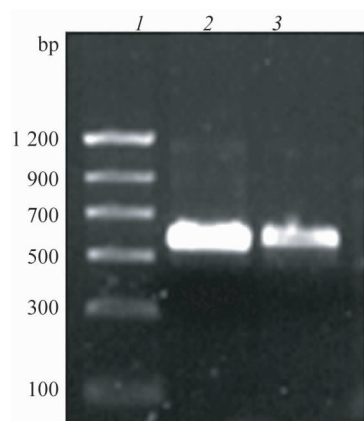


Fig. 1 PCR amplification of *xynA* and *xynB* of *Aspergillus sulphureus*

1: DNA molecular mass marker; 2: *xynB* amplified with primers B5-Del-S and B5-R-new; 3: *xynA* amplified with primers A7-Del-S and A7-Del-T.

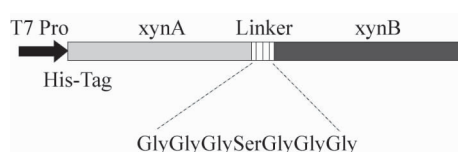


Fig. 2 Organization of in-fusion expression vector pET-xynAB

In-fusion DNA fragment of *xynA* and *xynB* was cloned downstream of T7 promoter sequence of pET28a(+).

2.2 融合蛋白的诱导表达、纯化、变性和复性

将原核表达载体 pET-xynAB 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 重组菌株经 IPTG 诱导, 12% SDS-PAGE 分离菌体总蛋白, 考马斯亮蓝染色. 与未加 IPTG 诱导的对照菌体相比, 诱导的菌体有一条约 50 ku 的特异性表达条带(图 3), 与预期蛋白的大小相符. 由于菌体裂解的上清液中检测不到木聚糖酶活性, 因此, 该融合蛋白是以包涵体的形式存在于菌体中. 重组蛋白的上游带有载体的

His-Tag 序列, 采用 Ni-NTA 柱进行了纯化处理, 纯化后的蛋白质经 SDS-PAGE 检测没有非特异性条带(图 3). 为了使目的蛋白恢复成正确的空间构象, 首先用 8 mol/L 尿素使之变性, 再逐渐降低透析液中尿素的浓度, 使重组蛋白缓慢复性. 透析后的蛋白质溶液经离心后去除未正确折叠的非可溶部分, 用试剂盒定量蛋白质浓度, 与复性前的蛋白质浓度比较, 复性产率约为 38.7%.

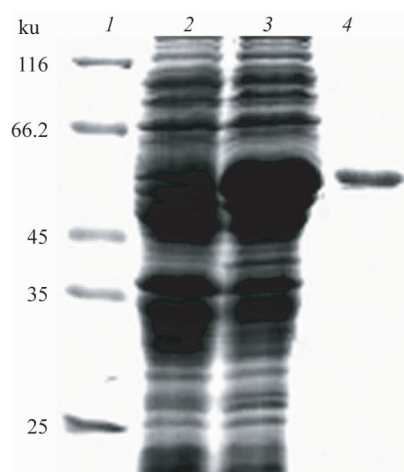


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein induced by IPTG

1: Protein molecular mass marker; 2: Total proteins of the transformant without IPTG induction; 3: Total proteins of the transformant induced with IPTG; 4: Recombinant protein purified by Ni-NTA column.

2.3 重组酶的最适温度和温度稳定性

在 pH 4.4 的条件下, 分别于 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃和 80℃下测定酶的活性. 结果表明(图 4), 在 50℃时酶的催化活性最高. 40℃时的酶活是 50℃时的 85%. 超过 50℃后, 酶的活性快速下降, 到 70℃时, 几乎没有活性.

为了研究酶的温度稳定性, 将重组酶分别置于 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃和 80℃水浴中保温 30 min, 然后再在 50℃和 pH 4.4 的条件下测酶活(图 4). 在 20~40℃保温 30 min, 酶活性损失很小. 在 40~60℃间, 酶的活性逐渐下降, 但超过 60℃后, 却出现了酶活性反弹的现象. 80℃时保温 30 min, 还有近 50%的酶活.

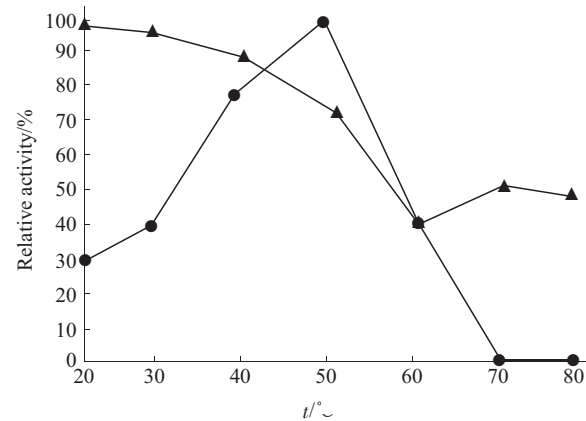


Fig. 4 Effect of temperature on the activity of the recombinant xylanase

Optimal temperature of the purified recombinant xylanase was determined using standard activity assay at various temperatures from 20 to 80°C. To estimate the temperature stability, the purified xylanase was incubated at various temperatures for 30 min and then the residual activity was determined at 50°C and pH 4. ●—●: Optimal temperature; ▲—▲: Temperature stability.

2.4 重组酶的最适 pH 值及酸稳定性

在 50°C 条件下, 测定重组木聚糖酶在 pH 2.4、3.4、4.4、5.4、6.4 和 7.4 缓冲液中的催化能力. 结果表明 (图 5), 酶在 pH 4.4 时的活性最高. 在 pH 2.4~4.4 之间, 酶的相对活性都在 90% 以上. 在 pH 5.4 时, 重组酶还有 75% 的活性. 在 pH 5.4 以上, 酶的催化活性逐渐降低, 在 pH 6.4 的近中性条件下还保持 30% 以上的酶活, 但到 pH 7.4 的弱碱性条件下, 基本没有催化活性.

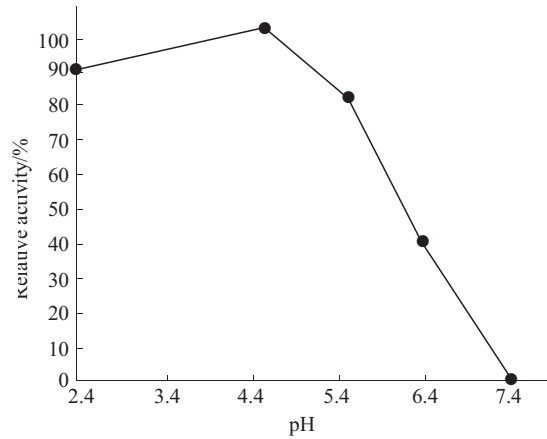


Fig. 5 Effect of pH on the activity of the recombinant xylanase

Optimal pH of the purified recombinant xylanase determined using standard activity assay at 50°C and different pH buffers.

将重组酶置于 pH 2.4 的酸性条件下保持 120 min, 在不同的时间点取样测酶活, 结果表明 (图 6), 在 90 min 内酶的相对活性保持在 77% 以上.

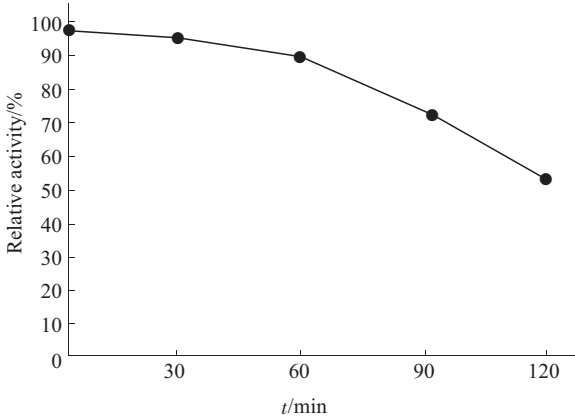


Fig. 6 Effect of acidophilic buffer (pH 2.4) on the activity of recombinant enzyme.

To estimate pH stability, the recombinant enzyme was incubated in buffer of pH 2.4 at room temperature from 0 to 120 min, and then the residual xylanase activity was determined at pH 4.4 and 50°C. The activity determined under the standard conditions of pH 4.4 and 50°C was defined as 100% relative activity.

2.5 金属离子及 EDTA 对重组酶活性的影响

在酶的反应体系中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的不同金属离子, 测定的结果表明 (表 1), K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Zn²⁺ 对酶的活性影响不大, EDTA 使酶的活性降低近 22%, Mn²⁺ 使酶的活性降低 50% 以上, 而 Cu²⁺ 可以完全抑制酶的活性.

Table 1 Effect of metal ions on activity of recombinant xylanase

Metal ions	Na ⁺	Zn ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	EDTA
Relative activity/%	100	100.7	90.7	89.9	45.3	0	78.4

The recombinant enzyme was mixed with various metal ions and EDTA (10 mmol/L), respectively. The residual activity was measured at pH 4.4 and 50°C.

3 讨 论

木聚糖酶是木聚糖水解酶系中重要的成员之一, 不同来源的木聚糖酶的分子质量变化较大, 在 8~145 ku 之间. 关于木聚糖酶的分类并没有统一的标准, Henrissat 和 Sapag 等^[6,7]根据催化结构域氨基酸的同源性和疏水簇分析法将木聚糖酶分成 F 族 (10 族) 和 G 族 (11 族). F 族和 G 族之间在氨基酸序列上无明显的同源性, 表明这两个家族在进化上来

源于不同的祖先. 根据序列的分析, 本文研究的硫色曲霉木聚糖酶 A 和 B 均属于 G 族(11 族)木聚糖酶, 但在氨基酸序列上并没有显著的同源性. 本实验室分别在 *E. coli* 中表达了 *xynA* 和 *xynB*. 纯化的木聚糖酶 A 最适催化温度为 50℃, 最适反应 pH 值为 2.4, 在酸性条件(pH 2.4)下放置 30 min, 还有 85% 以上的酶活, 在 70℃ 保温 30 min 完全丧失酶活性; 纯化的木聚糖酶 B 最适催化温度为 40℃, 最适反应 pH 值为 4.4, 酶的耐酸性很好, 在 pH 2.4 缓冲液中 4 h, 酶活几乎不损失, 80℃ 保温 30 min 还有 40% 以上的酶活.

近年来, 随着麦类作物在动物饲料中的广泛应用, 木聚糖酶逐渐成为酶制剂研究的热点之一. 由于猪等单胃动物消化道中 pH 值变化较大, 而现有的木聚糖酶催化的 pH 范围较窄, 因此, 利用基因工程手段进行酶学性质的改造越来越受到研究者的重视. 本研究将来源于硫色曲霉的 2 种木聚糖酶用 1~7 个氨基酸的寡肽进行了融合表达, 并对融合蛋白的酶学性质进行了研究. 结果表明, 该重组酶的最适催化温度为 50℃、最适 pH 为 4.4. 在 pH 2.4~5.4 之间. 重组酶的相对酶活都在 75% 以上, 而单独表达的木聚糖酶 A 在 pH 5.4 时仅有 50% 的酶活, 单独表达的木聚糖酶 B 在 pH 2.4 时酶活低于 50%. 重组酶在 pH 6.4 的近中性条件下还有约 40% 的酶活. 重组酶 pH 范围的拓宽可能是由于 2 种酶活性叠加的结果, 但也不排除酶分子相互影响的结果, 其机制还有待于进一步研究.

在试验过程中我们发现重组木聚糖酶的比活性与单独表达的 2 种木聚糖酶相比, 并没有明显的提高(结果未显示), 并不是我们预期的 2 种酶活性叠加的结果. 可能原因主要有 2 种: a. 变性的融合蛋白在复性过程中, 不能实现 100% 的正确折叠; b.

由短肽连接的两木聚糖酶蛋白在催化过程中会相互影响.

大肠杆菌表达系统所表达的蛋白由于表达量大而倍受研究者的青睐, 但却因表达的蛋白容易形成包涵体, 不利于下游的纯化加工. 近年来, 毕赤酵母表达系统越来越受到人们的关注, 已有多种外源基因成功地实现了在该系统中高效分泌表达. 我们将进一步致力于融合木聚糖酶基因在毕赤酵母分泌表达研究, 为开发高活性、宽 pH 范围的木聚糖酶奠定基础.

参 考 文 献

- Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanase. FEMS Microbiol Rev, 2005, **29** (1): 3~23
- Coughlan M P, Hazlewood G P. β -1, 4-D-xylan degrading enzyme system: Biochemistry, molecular biology and applications. Biotechnol Appl Biochem, 1993, **17** (6): 259~289
- 曹云鹤, 陈小玲, 贺平丽, 等. 硫色曲霉木聚糖酶基因 *xynA* 的克隆、表达及酶学性质分析. 生物技术通讯, 2006, **17** (6): 878~881
- 曹云鹤, 贺平丽, 陈小玲, 等. 硫色曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 的克隆、表达及酶学性质分析. 中国生物工程学报, 2006, **26** (增): 95~100
- Cao Y H, He P L, Chen X L, et al. Letters in Biotechnology, 2006, **17** (6): 878~881
- Lu W Q, Li D F, Wu Y B. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. Enzyme and Microbiol Tech, 2003, **32** (2): 305~311
- Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J, 1993, **293** (Pt3): 781~788
- Sapag A, Wouters J, Lambert C, et al. The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. J Biotechnol, 2002, **95** (2): 109~131

In-fusion Expression of Xylanase Genes *XynA* and *XynB* From *Aspergillus sulphureus* in *E. coli* and Characterization of The Recombinant Enzyme*

LI Yi-Hang, QIAO Jia-Yun, CAO Yun-He**

(Ministry of Agriculture Feed Industry Center, State Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Two sets of primers were designed according to the sequences of *xynA* and *xynB* from *Aspergillus sulphureus*, and the DNA fragments composed of 574 bp and 594 bp were amplified by polymerase chain reaction (PCR), respectively. The two PCR products respectively digested with *EcoR* I / *Bam*H I and *Bgl* II / *Hind* III were ligated into multiple cloning sites of pET-28a(+). The resulting plasmid is pET-xynAB, in which xylanase A and B are ligated by a 7-amino acid peptide (GlyGlyGlySerGlyGlyGly). *E. coli* BL21 transformed with pET-xynAB was induced by IPTG, and a special protein band about 50 ku was detected by SDS-PAGE. The protein purified with Ni-NTA column was denatured by 8 mol/L urea and dialyzed for refolding. The recombinant xylanase showed optimal activity at 50°C and pH 4.4. The enzyme retained above 75% of its activity at the range of pH 2.4~5.4. The xylanase displayed about 50% retained activity after incubating at 80°C for 30 min. Various metal ions have different effects on activity of the recombinant xylanase.

Key words *Aspergillus sulphureus*, xylanase, in-fusion expression

* This work was supported by a grant from Science Fund for Creative Research Groups, National Natural Science Foundation of China (30121004).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62733585, E-mail: caoyh@mafic.ac.cn

Received: March 1, 2007 Accepted: May 24, 2007