

常桂英, 王俊玲, 徐亚维, 等. 木聚糖酶 *xynB* 基因序列分析及表达载体构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 31–32.

木聚糖酶 *xynB* 基因序列分析及表达载体构建

常桂英¹, 王俊玲^{1,2}, 徐亚维¹, 杨 闯¹, 刘盼想¹

(1. 吉林农业科技学院生物工程学院, 吉林吉林 132101; 2. 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 吉林长春 130023)

摘要:木聚糖酶在快速降解木聚糖类半纤维素的过程中起重要作用。*Prevotella ruminicola* B 菌株中带有多种木聚糖酶基因, 所产酶类具有潜在的应用前景。利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 将 *xynB* 连接至表达载体 pET-28a 中, 与组氨酸标签融合表达构建重组质粒 pPrxynB, 现已在大肠杆菌中获得高效表达。经分析 XynB 既具有外切酶活力, 又具有 β -木聚糖苷酶活力, 因此 XynB 在木糖制备中具有重要的工业应用价值。

关键词:木聚糖酶; 序列分析; 载体构建

中图分类号: Q556⁺.2; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0031-02

木聚糖(xylan)是植物半纤维素的主要成分, 是仅次于纤维素的第二丰富的可再生资源^[1]。我国作为农业大国, 每年有大量秸秆、玉米芯、甘蔗渣、麦麸等农业废弃物成为环保负担。这些农业废弃物的主要化学成分是纤维素、半纤维素、木质素等物质, 木糖就存在于这些农作物废弃物的半纤维素多缩戊糖中, 是亟待开发的重要可再生资源^[2]。由于半纤维素的结构及其降解复杂的特点, 这些木聚糖类半纤维素完全降解为木糖需要多种酶的协同作用。首先由 β -1,4-内切木聚糖酶(endo β -1,4-xylanase)随机断裂木聚糖骨架, 产生木寡糖, 降低了聚合度, 然后由外切酶 β -木糖苷酶(β -1,4-xylosidase)从非还原性末端将木寡糖和木二糖分解为木糖。同时, 水解木糖与侧链取代基之间的糖苷键的 α -L-阿拉伯糖苷酶(α -L-arabinofuranosidase)和 α -D-葡萄糖醛酸酶(α -D-glucuronidase)也是必不可少的^[3]。

不同来源的木聚糖酶在结构和性质上有很大的差别。有的木聚糖酶只含有单一区域即催化区。有的同时具备催化区和多种非催化区, 包括催化区、纤维素结合区、木聚糖结合区、锚定区、连接序列、重复序列等, 这些区域承担着不同的生理功能^[4]。

Prevotella ruminicola B 菌株中带有多种木聚糖酶基因, 其中有 1 个区域编码具有特异的内切木聚糖酶活性^[5]。*Prevotella ruminicola* B 属革兰氏阴性菌, 为厌氧菌^[6], 表达的木聚糖酶有些存在于细胞内, 有些则分泌表达至细胞间质, 限制了多种木聚糖酶在工业生产中的应用。本研究旨在对该菌株中的 *xynB* 基因序列进行分析并构建带有该目的基因的表达载体, 为进一步研究该酶的生物学功能, 构建工程菌株和农业工业化生产奠定基础。

收稿日期: 2013-04-10

基金项目: 吉林省发改委项目; 吉林农业科技学院大学生创新科研项目(编号: 吉农院合字[2012]第 48 号)。

作者简介: 常桂英(1965—), 女, 吉林吉林人, 硕士, 教授, 主要从事生化与分子生物学方向研究。Tel: (0432)63509055。

通信作者: 王俊玲, 博士研究生, 讲师, 从事分子酶学工程与微生物工程方向研究。E-mail: wangjunling0432@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒转化受体菌大肠杆菌 *Escherichia coli* XL1-Blue、质粒 pET-28a 均由本实验室保存。限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。PrimeSTAR HS DNA Polymerase、DL10000/5000DNA Marker 购自 Takara 公司。质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计 *Prevotella ruminicola* B 的部分基因序列已经测定, 根据 NCBI 上基因簇(GenBank: Z49241)的碱基序列和功能模块的预测, 选定一段基因委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成命名为 *xynB*, 并设计了相应的引物用于后续的表达载体构建, 基因扩增引物按试验要求设计如下:

上游引物 5'-GACACGGATCCATGAAGGC-3'内有 1 个 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物 5'-GACCTCGAGTTTACTGTCTTGATATGACCTTCA-3'内有 1 个 *Xho* I 酶切位点, 上述由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 含目的基因 *xynB* 表达载体构建 以合成的基因片段为模板进行扩增, 选用 PCR 扩增的条件为: 98℃ 预变性 2 min; 98℃ 变性 20 s, 退火温度采用 54、56、58℃ 3 个温度梯度运行 20 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 反应结束后于 4℃ 保存。PCR 反应结束后, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带大小, 经 PCR 回收试剂盒回收纯化。取适量纯化后的 PCR 产物与 pET-28a 质粒用 *Bam*H I/*Xho* I 进行酶切、连接、转化感受态细胞。

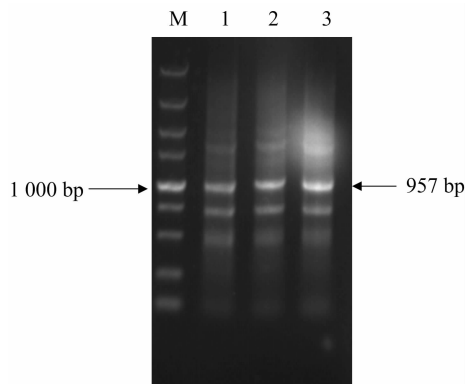
1.2.3 阳性克隆的筛选 待单菌落长出后, 在平板上挑取单菌落接种于含 Kam 的 5 mL 培养液中, 37℃ 过夜培养。离心得到菌体, 提取质粒。所得到的质粒进行 PCR 鉴定, 并以 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 序列测定及分析 将新鲜菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司进行目的片段的双向测序, 测序结果利用 DNAMAN 软件进行处理。

2 结果与分析

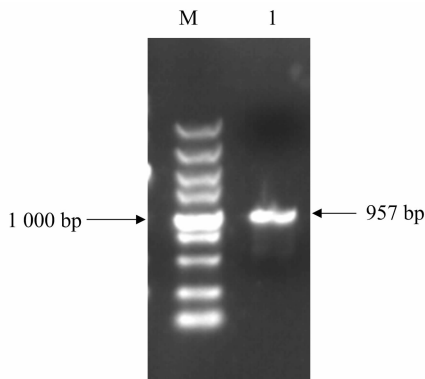
2.1 目的基因的扩增及载体构建

根据目的基因大小和 PCR 扩增结果(图 1),发现采用 58 ℃ 条件下的 PCR 结果较佳,切胶回收 957 bp 左右的条带,将目的基因连接到载体 pET-28a 上转化 *E. coli* XL1-Blue 中,挑取重组子经 PCR 及双酶切鉴定(图 2、图 3),证明所插入片段与扩增片段长度相同,测序结果显示与已发表的 *xynB* 序列完全一致,重组质粒命名为 pPr-*xynB*。



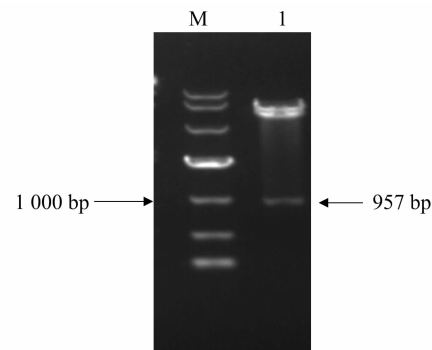
M—DL5000 DNA Marker; 1~3—54、56、58 ℃ 退火温度下 PCR 产物

图1 PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳



M—DL5000 DNA Marker; 1—阳性重组质粒 PCR 条带

图2 PCR鉴定琼脂糖凝胶电泳



M—DL10000 DNA Marker; 1—阳性重组质粒双酶切条带

图3 双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳

2.2 木聚糖酶基因 *xynB* 的序列分析

通过 NCBI 对该基因中的开放阅读框进行分析,结果显

示,该基因编码 319 个氨基酸,序列如图 4 所示。经 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 推测分子量为 38.57 ku, 等电点为 4.82。

```

MKAKYVFPSDYMADPAANVFDGKLYIYPSHDYDSG
ECFDDDDGGHFQMKDYHVLICIDGDPMEQDAKDCGK
QFGIEDIPWVEKQLWDNDCVEKDGKYYLIYSAKDYT
GVFHLGVAADKPEGPFVPEADPIRGSSYIDPCVFKD
DDGEIYVYFGGIWGGQLQWYKDNKMLKAEHLPEGK
EDPLPSRVARMTGDKVQFAEAPRAVIVDETGKPLPA
DDPHRFEEASWMHKYNGKYYFSYSTGDTLLCYAV
GDNPYGPFTYQGIVLEPVVGWTHHSIVEYKKGWYL
FHHDCVPSNDTTWLRLSKVAELEYDAEGHIKTVK

```

图4 *xynB* 基因编码的氨基酸序列

将木聚糖酶 XynB 成熟肽完整的氨基酸序列与 GenBank 中其他微生物来源的木聚糖酶一级结构进行同源性比较,结果表明,它与 GH43 家族的木聚糖酶具有较高的同源性。该蛋白 N 端不含信号肽,与 *Bacteroides ovatus* (GenBank: ZP_06619157.1) 和 *Capnocytophaga* sp. (GenBank: ZP_08449934.1) 中的木聚糖酶有较高同源性。

3 结论

本研究以合成基因 *xynB* 为模板,采用 PCR 扩增技术构建得到重组质粒 pPr-*xynB*,基因全长 957 bp,编码得到 319 个氨基酸,经蛋白参数预测该酶属于 GH43 家族的木聚糖酶,既具有外切酶活力,又具有 β -木聚糖苷酶活力^[7],因此, XynB 在木糖制备中具有重要的工业应用价值。后续工作将对此木聚糖酶进行进一步性质表征,旨在为农业废弃物的资源利用开辟新途径,并为木聚糖降解酶在植物残体上的生物转化、清洁生产以及饲料工业中应用打下基础^[8]。

参考文献:

- [1] 余元莉,李秀婷,宋焕禄,等. 微生物木聚糖酶的研究进展[J]. 中国酿造,2009(2):1-4.
- [2] 薛业敏,于瑾瑾,戴军,等. 耐热 β -木糖苷酶的构建及在木糖制备中的应用[J]. 中国食品学报,2007,7(6):6-12.
- [3] 邵蔚蓝,薛业敏. 以基因重组技术开发木聚糖类半纤维素资源[J]. 食品与生物技术,2002,21(1):88-93.
- [4] 周平发,史宝军,崔细鹏,等. 木聚糖酶的研究进展及在生产上的应用[J]. 广东饲料,2011(5):24-27.
- [5] Matsushita O, Russell J B, Wilson D B. Cloning and sequencing of a *Bacteroides rumenicola* B14 endoglucanase gene[J]. J Bacteriol, 1990,172:3620-3630.
- [6] Gasparic A, Marinsek-Logar R, Martin J, et al. Isolation of genes encoding beta-D-xylanase, beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activities from the rumen bacterium *Prevotella rumenicola* B1(4)[J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 125(2/3): 135-141.
- [7] Gasparic A, Martin J, Daniel A S, et al. A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella rumenicola* B(1)4; sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta-(1,4)-xylosidase activities[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(8): 2958-2964.
- [8] 刘欣,石鹏君,杨培龙,等. 双功能木聚糖酶研究进展[J]. 中国农业科技导报,2010(2):50-56.