

宋立立, 顿宝庆, 张亚楠, 等. 木聚糖酶基因的克隆与表达[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 43–46.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.011

# 木聚糖酶基因的克隆与表达

宋立立<sup>1</sup>, 顿宝庆<sup>2</sup>, 张亚楠<sup>1</sup>, 田景汉<sup>1</sup>

(1. 沧州师范学院生命科学学院, 河北沧州 061000;

2. 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/生物质能源研究中心, 北京 100081)

**摘要:**用 PCR 技术从桔青霉基因组 DNA 反转录扩增得到木聚糖酶编码基因 *xyl*, 并构建基因表达载体 *pPAL7-xyl* 重组质粒, 转化受体菌 *E. coli* BL21 进行原核表达分析。IPTG 诱导 6 h 酶活性达到最高, 为 2.07 IU/mL; 表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析, 在 22 ku 处呈现蛋白条带, 与理论的蛋白大小相一致, 37 °C 条件下诱导 6 h 蛋白表达量最高; 同时进行构建基因表达载体 *pPIC9K-xyl* 重组质粒, 转化受体菌毕赤酵母 GS115 作真核表达分析, 经甲醇诱导 96 h 后酶活性达到最高, 为 23.84 IU/mL。

**关键词:**木聚糖酶; 基因克隆; 基因表达; 酶活性

**中图分类号:** S188+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0043-04

木聚糖是植物半纤维素的主要成份, 是除纤维素之外自然界中最为丰富的多糖, 也是自然界中最为丰富的可再生资源之一<sup>[1]</sup>。半纤维素在秸秆中仅次于纤维素, 是可再生资源, 但是大部分被作为废弃物浪费。我国秸秆资源丰富, 将秸秆中的半纤维素转化为可利用资源是一个尚待解决的问题。木聚糖酶是木聚糖降解中最关键的酶, 可以使木聚糖分子中  $\beta$ -1,4 糖苷键断裂, 水解产物为木二糖和木寡糖。木聚糖酶在能源工业、造纸制浆、食品、纺织、饲料等方面具有广阔的应用前景<sup>[2-3]</sup>。用木聚糖酶对含半纤维素的纸浆进行处理, 可以减少漂白工艺中化学的用量, 减轻对环境的污染, 还可以提高纸浆的漂白度; 木聚糖酶还可以作为饲料添加剂来提高饲料的利用率, 改善饲料的营养价值; 制酒工业添加木聚糖酶降低非淀粉多糖的含量, 使后期易于过滤, 酒色变澄清。国内已经成功构建了木聚糖酶工程菌株, 但是和国外相比有着一定的差距, 对木聚糖酶的研究较晚, 因此, 对木聚糖酶工程菌的进一步研究是有必要的。本研究通过分子生物学技术从桔青霉中克隆得到编码木聚糖酶基因, 将其在毕赤酵母 GS115 和大肠杆菌 BL21 进行了表达研究, 为木聚糖酶作为酶制剂应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 培养基** LB 培养基参照《分子克隆实验指南》配制。酵母 YPD 培养基、选择 MD 培养基、诱导表达 BMGY 和 BMMY 培养基均根据 Invitrogen 公司毕赤酵母表达操作手册配制。

**1.1.2 菌株与质粒** 含有木聚糖酶的桔青霉菌株由笔者所在实验室筛选得到; 克隆宿主菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、毕赤酵

母菌 GS115、大肠杆菌 BL21 为实验室保存。表达载体 *pPAL7* 购自 BIO-RAD 公司; *pPIC9K* 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.3 主要酶和试剂** 试验所涉限制性核酸内切酶均购自 NEB 公司; *PGEM-Teasy* 购自 Promega 公司; DNA 回收、DNA 纯化和 DNA 提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司; DNA 连接酶购自 Promega 公司; 质粒小量提取试剂盒购自天根公司; 氨苄青霉素购自 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 缓冲液配制** 配制方法参照《分子克隆实验指南》。

**1.2.2 桔青霉 CR-2 的 RNA 提取** 提取方法参照 RNA 提取试剂盒操作说明书。

**1.2.3 RNA 反转录 cDNA** 操作过程参照《分子克隆实验指南》。

**1.2.4 木聚糖酶基因片段的扩增** 根据木聚糖酶基因 cDNA 序列设计引物, 真核表达系统引物为 P1: 5'-TACGTAATGATTAAGTCTAA-3'; P2: 5'-GAATTCCTACCA CACCGTTA-3', 下划线分别为 *SnaB* I 和 *EcoR* I 酶切位点序列。原核表达系统引物为 P1: 5'-CGTCCATATGATTAAG TCTAAAAAG-3'; P2: 5'-GAATTCCTACCACACCGTTA-3', 下划线分别为 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切位点序列。扩增反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.5 质粒提取** 提取方法参照质粒小量提取试剂盒说明书。

**1.2.6 转化大肠杆菌**<sup>[4]</sup>

**1.2.7 酶切验证** 酶切反应体系 ( $\mu$ L): Plasmid DNA 2  $\mu$ L, 10  $\times$  enzyme Buffer 5  $\mu$ L, *SnaB* I 0.5  $\mu$ L, *EcoR* I 0.5  $\mu$ L, 补充 dd H<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。37 °C 过夜酶切(内切酶相应变化), 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.8 感受态制备** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 感受态的制备参照文献[5]; 酵母菌株 GS115 感受态的制备参照文献[6]。

**1.2.9 超声波破碎菌体** 操作过程参照《分子克隆实验指

收稿日期: 2016-12-14

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(编号: 201503135-16); 河北省科技计划(编号: 16273306)。

作者简介: 宋立立(1983—), 女, 河北沧县人, 硕士, 讲师, 主要从事微生物技术研究。E-mail: hbczsl@163.com。

南》。

1.2.10 酵母的电击转化 将 9 μg 的线性化好的 DNA 片段溶解在 12 μL 去离子水中,与 80 μL 的感受态混匀,转入电转化杯中 4 ~ 10 ms 进行电击;电击后,迅速加入 1 mL 1 mol/L 预冷的山梨醇溶液;电击产物放置 30 ℃ 恢复 30 min,涂于 MD 平板上,每 450 μL 涂布 1 块平板,将平板置于 30 ℃ 培养,直至单个菌落出现。

1.2.11 表达质粒载体的线性化 转化前用 *Sca* I 酶切,酶

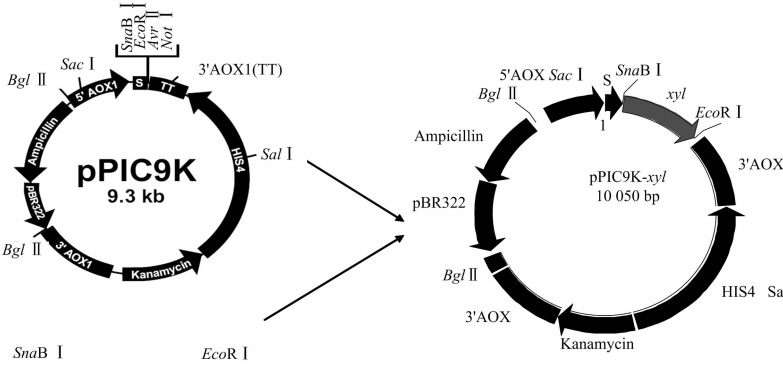


图1 pPIC9K-xyI 载体的构建

1.2.13 毕赤酵母的诱导表达试验 挑选阳性克隆于 20 mL BMGY 培养基摇瓶培养,28 ~ 30 ℃ 培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 2 ~ 6,离心 5 min 收集菌体,用 1/5 原培养体积的 BMMY 重悬菌体;将菌液重新置于 100 mL 的摇瓶 28 ~ 30 ℃ 摇床培养;每隔 24 h 向培养基中添加无水甲醇至终浓度为 1.0%;隔 24 h 取样,128 000 r/min 离心 5 min,收集上清,分析重组菌的活性。取样时间一般为 0、24、48、72、96、120 h。

1.2.14 大肠杆菌的诱导表达试验 挑选正确的菌落,接入 10 mL 含 100 mg/mL 氨苄青霉素 LB 培养液中,37 ℃ 培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.2 ~ 0.6;取 100 μL 样品加入 50 mL 含 100 mg/mL 氨苄青霉素 LB 培养液中,37 ℃ 培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.2 ~ 0.6,加 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/L,37 ℃ 培养,每 2 h 取样,样品超声波破碎后分析其胞内表达情况,利用 SDS - PAGE 等活性试验检测与鉴定重组蛋白的表达。

1.2.15 重组蛋白 SDS - PAGE 检测 重组蛋白 SDS - PAGE 检测操作步骤见参考文献[7],蛋白电泳主要试剂配制方法见参考文献[8 - 9]。

1.2.16 木聚糖酶活性测定方法 配制 10.0 mg/mL 的木糖溶液:称取无水木糖 1.000 g,加入去离子水后定容至 100 mL。取 8 支试管按表 1 加入试剂,稀释木糖标准液,再加入 3 mL DNS 试剂;充分摇匀置于沸水中煮 5 min;流动冷水冷却后,将显色液以 4 000 r/min 离心 5 min。取上清液,用 0 号试管作对照,在 540 nm 下测其他试液的吸光度  $D_{540\text{ nm}}$ 。以吸光度为纵坐标,以木糖浓度为横坐标绘制标准曲线。

木聚糖酶活性测定方法:取 3 支试管各加 0.5 mL 中性木聚糖底物,与待测酶液一起在 50 ℃ 水浴中预热 5 min。在第 1、2 试管中加入 0.5 mL 待测酶液,50 ℃ 水浴中反应 15 min。加入 3 mL 的 DNS 试剂,在第 3 支试管中加入 0.5 mL 的待测酶液,沸水浴 5 min。将显色液(包括空白)以 4 000 r/min 离心 5 min。取上清液以第 3 支试管为对照在 540 nm 条件下测第 1、2 试管样的吸光度  $D_{540\text{ nm}}$ 。吸光度以在 0.2 ~ 0.3 为宜,

切体系(μL):pPIC9K - *xyI* 80 μL,10 × Buffer 20 μL,*Sca* I 10 μL,补加 dd H<sub>2</sub>O 至 200 μL。

1.2.12 真核表达载体的构建 将连有 *xyI* 基因的克隆用 LB 液体培养基活化并提取质粒。用 *Sna*B I 和 *Eco*R I 双酶切质粒与 pPIC9K 载体,回收 *xyI* 片段及载体大片段,将 2 个回收产物连接构建表达载体 pPIC9K - *xyI*,构建过程如图 1。转化大肠杆菌 DH5α,得到的转化子用 *Sna*B I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定,鉴定正确的转化子用于下一步试验。

表 1 酶活性测量用木糖标准曲线溶液配制

试管号	缓冲液加入量(μL)	1.0% 中性木糖底物(μL)	木糖标准液加入量(μL)	木糖含量(μg)
0	500	500	0	0
1	490	500	10	100
2	480	500	20	200
3	475	500	25	250
4	470	500	30	300
5	465	500	35	350
6	460	500	40	400
7	455	500	45	450

若不在此范围可改变稀释倍数重做。

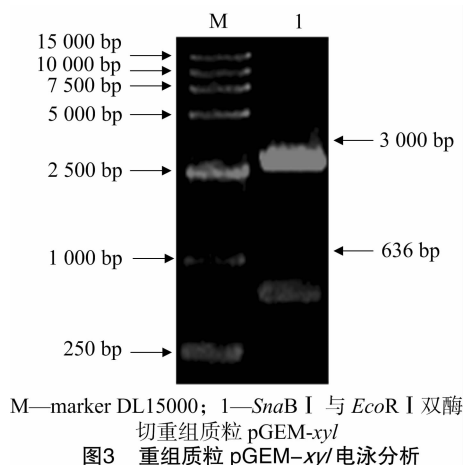
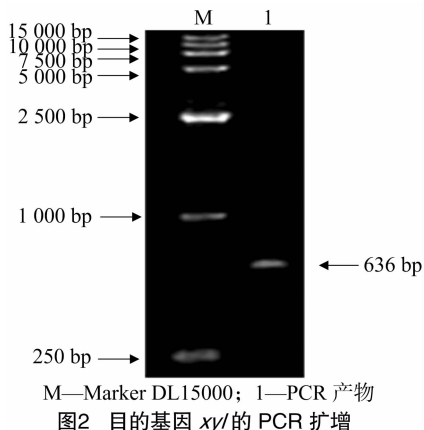
酶活性的计算:酶活性(IU/mL 或 IU/g) = 木聚糖等量值 ÷ 150 ÷ 15 ÷ 0.5 ×  $n$ 。

式中:150 指木糖从微量换算成微克分子数;15 指待测液与底物的反应时间;0.5 指与底物反应的待测酶液量; $n$  指原酶液(或固体原酶)的稀释倍数

2 结果与分析

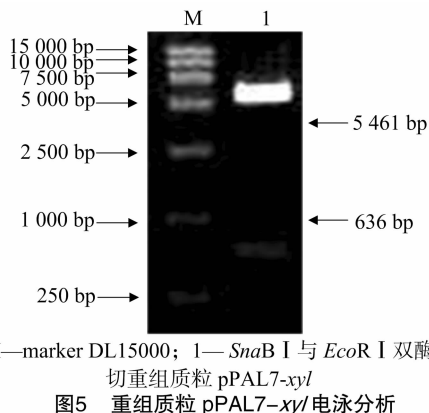
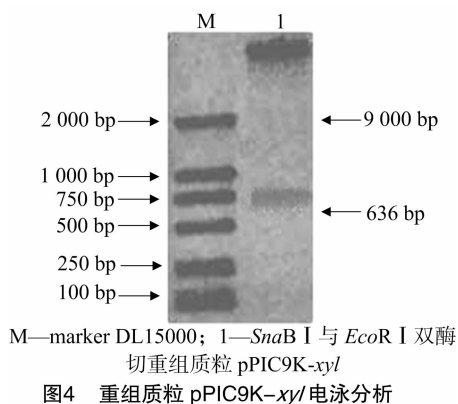
2.1 目的基因的片段克隆结果

PCR 产物电泳鉴定结果表明,在 636 bp 的位置有一明显条带,与公布的基因片段大小相一致(图 2)。回收扩增片段连接 pGEM - Teasy 测序,所测序列与 GenBank 中报道的木聚糖酶基因序列同源性为 99.99%,编码 212 个氨基酸。将所得到的木聚糖酶基因作原核表达和真核系统表达,重组质粒 pGEM - *xyI* 经 *Sna*B I 和 *Eco*R I(真核表达)、*Nde* I 和 *Eco*R I(原核表达)双酶切验证,酶切后电泳鉴定出 2 条带:一条带为 636 bp,与 PCR 产物带相同;另一条带为 3 000 bp,与载体 pEGM - Teasy 的条带大小一致(2 个图大小相一致,以真核表达系统酶切图为例,图 3)。结果表明,初步获得了木聚糖酶编码基因 *xyI*。



## 2.2 表达载体的构建

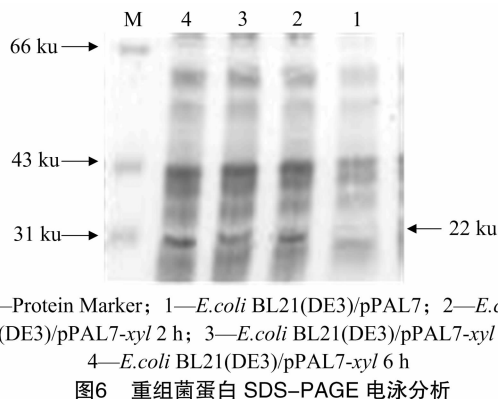
原核表达载体 (pPAL7) 和真核表达载体 (pPIC9K) 的构建方法一致,同时双酶切载体质粒和 pGEM-*xyl* 阳性转化子质粒,酶切产物同时回收,回收产物和表达载体过夜酶连,连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ;重组子经双酶切验证,在真核表达载体中,质粒经 *Sna*B I 和 *Eco*R I 双酶切电泳检测如图 4 所示,在 636、9 000 bp 有 2 条明显的条带,分别与扩增产物和载体大小相一致;在原核表达系统中,重组子质粒经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切电泳检测,在 636、5 461 bp 处有 2 条与预期大小相一致的条带 (图 5),初步表明,该重组子含有木聚糖酶编码基因。验证正确的质粒分别转化大肠杆菌 BL21 和酵母 GS115 进行诱导表达试验。



## 2.3 木糖酶在原核系统和真核系统中的表达分析

### 2.3.1 SDS-PAGE 分析 (原核表达系统)

用 IPTG 对重组菌进行不同时间的诱导,表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析,在 22 ku 处呈现表达蛋白条带,与理论蛋白大小相一致 (图 6),根据诱导时间与表达量的关系,37  $^{\circ}$ C 条件下诱导 6 h 蛋白表达量最高。



### 2.3.2 木糖标准曲线

由图 7 可知,标准曲线方程为  $y = 0.0054x - 1.0776$  ( $x$  轴为木糖浓度,  $y$  轴为  $D_{540\text{ nm}}$ ),根据标准方程可以计算出还原糖浓度,根据木聚糖酶酶活性计算公式求出酶活性,酶活性单位为 IU/mL。

### 2.3.3 木聚糖酶基因在原核系统中的表达

在原核表达系统中,重组子经 IPTG 诱导,每隔 2 h 取样,测定其酶活性 (图 8),诱导 6 h 时酶活性最高,达到 2.07 IU/mL。

### 2.3.4 木聚糖酶基因在真核系统中的表达

在真核表达系统中,重组子经甲醇诱导,每间隔 24 h 取样,测定其酶活性,诱导 96 h 时酶活性最高,达到 23.84 IU/mL (图 9)。

### 2.3.5 木聚糖酶基因氨基酸保守序列分析

根据 NCBI 比对木聚糖酶氨基酸的保守序列分析,该酶属于 11 家族糖基水解酶,保守序列有 28~211 个氨基酸序列,与许多菌种的氨基酸保守序列同源性很高 (图 10)。

## 3 小结

根据已经报道的桔青霉菌中木聚糖酶基因的同源序列设计引物,提取桔青霉菌的 RNA,通过 RT-PCR 扩增得到木聚糖酶的编码基因 *xyl*,结果进行比对分析,阅读框编码 212 个氨基酸,表达蛋白分子量大小为 22 ku。

木聚糖酶的表达活性分析中,同时测定了在原核系统和

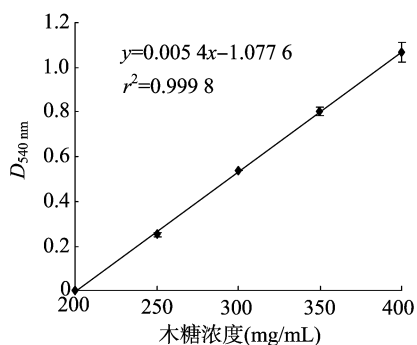


图7 木糖标准曲线

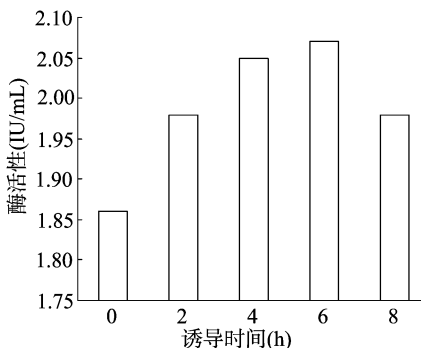


图8 不同诱导时间木聚糖酶活性

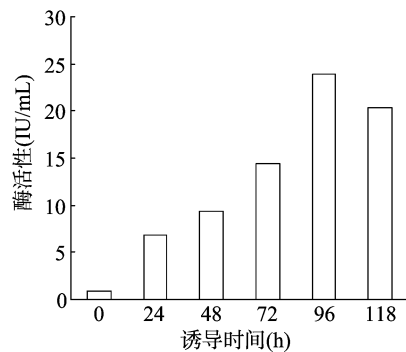


图9 不同诱导时间木聚糖酶活性

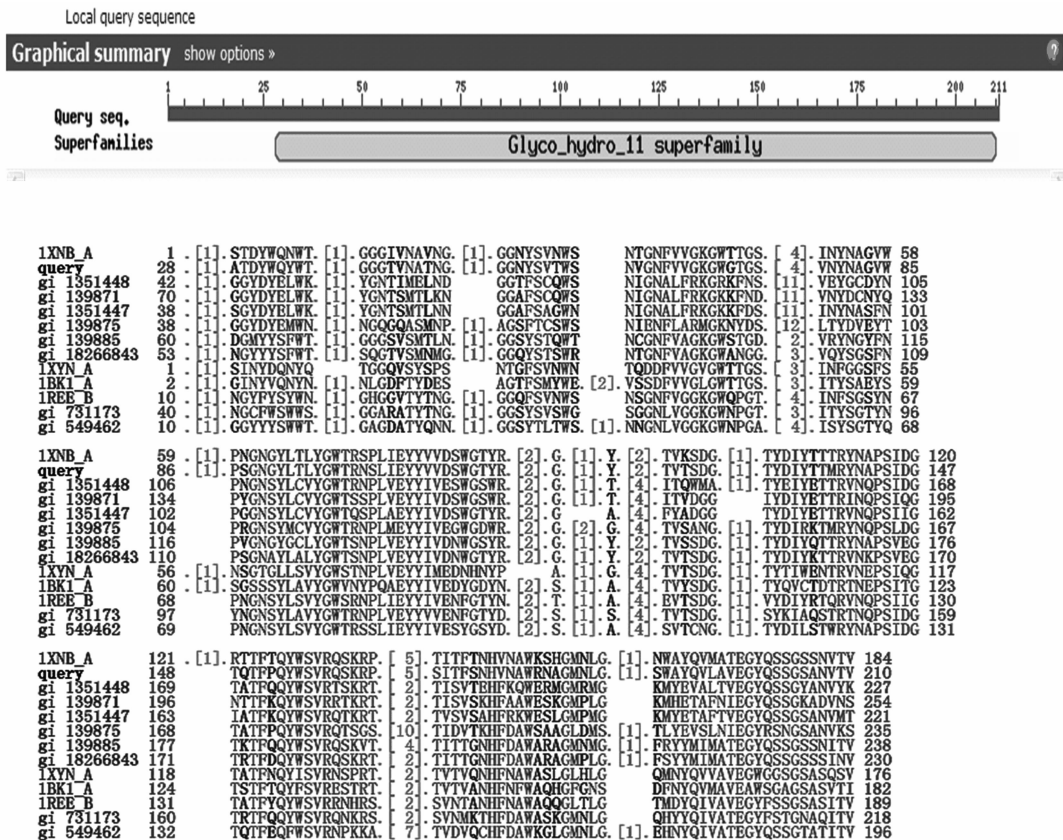


图10 木聚糖酶基因氨基酸保守序列比对

真核系统中酶的表达量,发现木聚糖酶在真核表达系统中的酶活性(23.84 IU/mL)远远要高于原核表达系统中的酶活性(2.07 IU/mL),推测可能原因为该基因来源于真核生物,所以在真核系统中更容易实现表达。本试验研究木聚糖酶基因的克隆与表达,该工程菌在没有对载体和基因改造的情况下,对产酶条件未进行优化,表达量不是很高。本研究侧重克隆表达,后续的研究中可通过对该基因和载体进行改造、优化其产酶条件来提高酶的活性。

#### 参考文献:

- [1] 杨梦华,李颖,关国华,等. 极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报,2005,45(2):236-239.
- [2] 张桂敏,饶犇,叶戈,等. 棉花黄萎病真菌 *Verticillium dahliae* 木聚糖酶基因的克隆、表达和酶学性质分析[J]. 微生物学报,

2008(6):765-771.

- [3] Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M, et al. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties[J]. Journal of Biotechnology,1997,57(1/2/3):151-166.
- [4] 杨立泉,马春晓,戴晓军,等. 一个新的葡萄糖淀粉酶基因在大肠杆菌中的分泌表达[J]. 生物学通报,2007,42(3):55-57.
- [5] 许正宏. 微生物耐碱性木聚糖酶的合成、调控及底物降解方式的研究[J]. 无锡:江南大学,2005.
- [6] 张八生. 东亚飞蝗和金龟子绿僵菌丁质基因的克隆与表达研究[D]. 重庆:重庆大学,2008.
- [7] 曲小爽. 高效枯草芽孢杆菌筛选及酶学初探[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.
- [8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2005:54-157.
- [9] 赵永芳. 生物化学技术原理及其利用[M]. 北京:科学出版社,2000:1-502.