

宋立立,顿宝庆,张亚楠,等. 果胶裂解酶基因与木聚糖酶基因的共表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):46-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.011

果胶裂解酶基因与木聚糖酶基因的共表达

宋立立¹, 顿宝庆², 张亚楠¹, 张兆英¹

(1. 沧州师范学院生命科学学院, 河北沧州 061000;

2. 中国农业科学研究院作物科学研究所/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:利用重叠引物 PCR 方法将从海栖热袍杆菌中克隆得到的果胶裂解酶基因和从桔青霉 CR-2 菌株中克隆得到的木聚糖酶基因做重叠引物 PCR 扩增, 扩增后得到融合基因 *plyxyl*, 将其构建载体后转化到大肠杆菌菌株 BL21, 克隆子经 IPTG 诱导在原核系统中实现了表达, pH 值为中性, 诱导 6 h 后最高酶活性分别达 30.11 U/mL、2.03 IU/mL。

关键词:果胶裂解酶基因; 木聚糖酶基因; 原核系统; 共表达

中图分类号: S188; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0046-03

在酿酒行业中, 作为原料的粮食外层有纤维素和木聚糖等半纤维素成分, 从而影响对淀粉的利用率。利用木聚糖酶作用于半纤维素层, 降低物料黏度, 有利于提高淀粉的利用率, 增加乙醇的产率^[1]。木聚糖酶通过水解木糖分子 1,4-糖苷键, 将木聚糖水解为木寡糖等低木聚糖及少量木糖和阿拉伯糖, 在食品、饲料、医药、能源、生物转化等行业中有着广泛的应用^[2-4]。果胶酶是可将果胶协同分解为半乳糖醛酸等小分子的一组酶的总称, 存在于高等植物及微生物中, 也分布在某些昆虫和原生动物中。根据果胶酶作用原理分为原果胶酶、果胶酯酶、水解酶、裂解酶^[5], 其中水解酶和裂解酶统称解聚酶。果胶裂解酶在果酒的澄清和提高出酒率方面起着重

要作用^[6]。

近年来, 蛋白融合技术越来越受到人们的关注, 其中基因重叠延伸技术应用最为广泛, 通过重叠 PCR 方法将木聚糖酶基因和果胶裂解酶基因连接在一起, 转入大肠杆菌 BL21 原核系统中, 实现了木聚糖酶-果胶裂解酶双功能酶的分泌表达, 为工业化应用奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

海栖热袍杆菌购自中国农业科学院微生物菌种保藏中心; 木聚糖酶基因来源菌桔青霉 CR-2 由笔者所在实验室筛选得到; pPAL7 表达载体购自 BIO-RAD(美国)公司; 表达菌株 BL21 和克隆宿主菌 *Escherichia coli* DH5 α 由笔者所在实验室保存。限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶均购自 NEB(北京)有限公司; PGEM-Teasy 购自 Promega(北京)生物技术有限公司; DNA 回收试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均购自宝生物

收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(编号: 201503135-16)。

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

干根总 DNA 能够扩增出 *ITS2* 和 *psbA-trnH* DNA 条形码序列。本研究根据不同方法对银柴胡叶片、鲜根和干根 DNA 提取的检测结果, 比较得出相对适合的银柴胡不同材料总 DNA 提取方法, 为后续的 DNA 条形码分子鉴定及分子生物学研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈飞. 银柴胡与其伪品山银柴胡的鉴别[J]. 中医中药, 2013, 11(34): 234-235.
- [2] 李军. 银柴胡的鉴别及应用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(20): 27-28.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 317.
- [4] 鲍瑞, 杨彩霞, 高立原, 等. 银柴胡主要病虫害研究初报[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 381-383.
- [5] Hebert P, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [6] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究
- 方向[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [7] 纪宝玉, 裴莉昕, 陈随清, 等. 山茱萸药材鲜品与干品总 DNA 提取方法比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 70-72.
- [8] 周天华, 陈征, 李康, 等. 开口箭 DNA 提取方法比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 10-13.
- [9] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 14.
- [10] 朱田田, 晋玲, 杜弢, 等. 中麻黄基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 125-128.
- [11] 高慧新, 包道健, 田慧. 广山药总 DNA 提取方法的比较[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(16): 27-29.
- [12] 陆敏佳, 莫秀芳, 王勤, 等. 藜麦基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 42-45.
- [13] 曹文波, 郑璐璐, 谢文海. 一种提取植物基因组 DNA 的方法——改良尿素法[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2008, 42(3): 448-451.
- [14] 侯艳霞, 汤浩茹, 张勇, 等. DNA 提取方法对一串红不同部位 DNA 提取的比较[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 94-100.

工程(大连)有限公司;质粒小量提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;氨苄青霉素购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。试验涉及引物见表 1。

表 1 试验涉及引物

引物名称	引物
P1	5' - CAGTTCATATGCTCATGAGGTTTC - 3' (下划线为 <i>Nde</i> I 酶切位点序列)
P2	5' - ACTTAATCATCTGAGCCGTA - 3'
P3	5' - TACGGCTCAGATGATTAAGT - 3'
P4	5' - GGAATTCTTACTGAGCCGTATTAG - 3' (下划线为 <i>Eco</i> R I 酶切位点序列)

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制 LB 培养基配制方法参照《分子克隆实验指南》^[7]。

1.2.2 目的基因片段的克隆 用 P1 和 P2、P3 和 P4 分别对 2 个基因做 PCR 扩增,将扩增得到的片段电泳检测,条带正确的 1 组将 2 个基因 PCR 组分混合,用两端引物 P1 和 P4 做融合 PCR 扩增,最终得到融合基因序列,扩增物理图谱如图 1 所示。

1.2.3 质粒提取方法 质粒提取方法参照试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 大肠杆菌转化 DH5 α 采用热击转化方法参照《分子

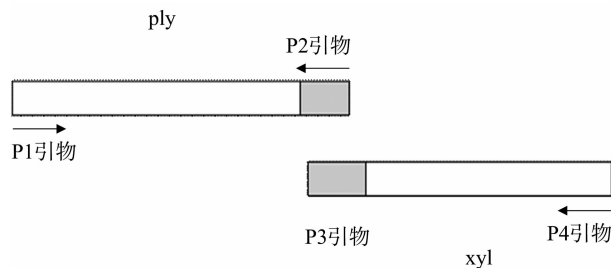


图 1 重叠引物扩增

克隆实验指南》^[7] 进行操作。

1.2.5 表达载体质粒 DNA 酶切鉴定 酶切反应体系 (μ L): Plasmid DNA 2 μ L, 10 \times enzyme buffer 5 μ L, *Nde* I 0.5 μ L, *Eco* R I 0.5 μ L, 补充 ddH₂O 至 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 过夜酶切,产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.6 目的片段和载体连接 目的片段和 pGEM - T easy 连接体系:目的片段 4 μ L, pGEM - T easy 0.5 μ L, 2 \times buffer 5 μ L, Ligase 0.5 μ L, 总体积 10 μ L, 漩涡混匀离心机点离, 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。

1.2.7 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 的制备 制备方法参照《分子克隆实验指南》^[7] 进行操作。

1.2.8 融合基因表达载体的构建 pPAL7 表达载体构建方法详见图 2。

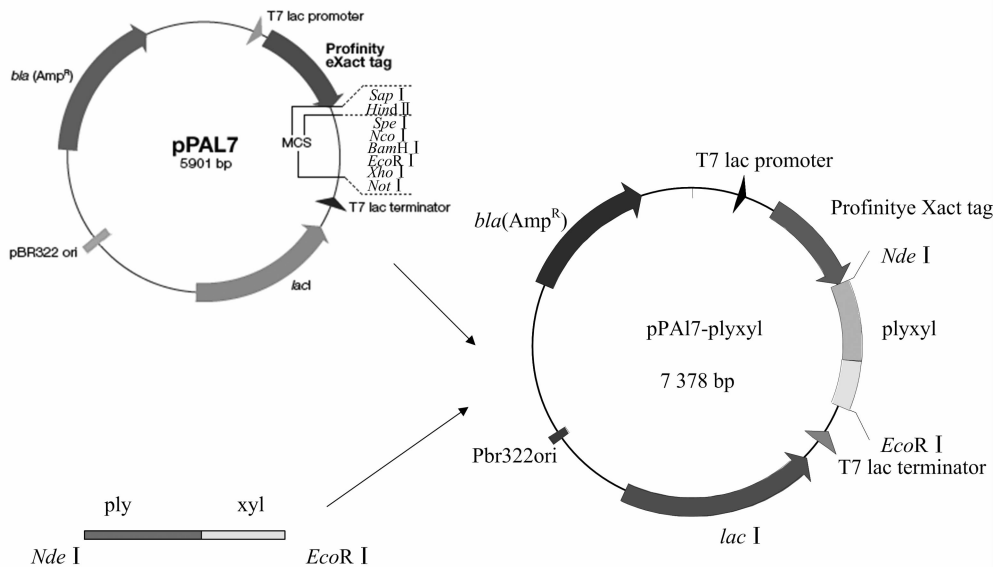


图 2 pPAL7-pxyl 表达载体的构建

1.2.9 大肠杆菌的诱导表达试验 挑选验证正确的单菌落,接入 10 mL 含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.2 ~ 0.6;取 100 μ L 样品加入 50 mL 含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.2 ~ 0.6,加入终浓度达到 0.8 mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 培养,每 2 h 取样;样品超声破碎后测定其酶活性,分析表达情况。

2 结果与分析

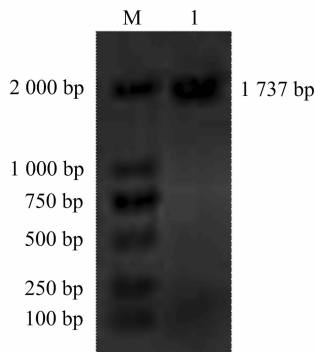
2.1 融合基因的 PCR 扩增

将来源于海栖热袍杆菌的果胶裂解酶基因和来源于桔青霉 CR - 2 的木聚糖酶基因分别做 PCR 扩增,扩增产物经

DNA 纯化试剂盒纯化后等体积混匀,用两端的引物 (P1 和 P4) 做 PCR 扩增得到融合基因,经琼脂糖凝胶鉴定,在 1 737 bp 处有 1 条明显的条带,与 2 个基因的总长度相同(图 3)。回收 PCR 产物连接 PGEM - T easy 测序,测序结果表明,该基因序列中含有果胶裂解酶基因和木聚糖酶基因,提取重组子的质粒双酶切验证,验证后得到 2 条条带:一条带为 1 737 bp,与 PCR 产物带相同;另一条带为 3 000 bp,与载体 pEGM - T easy 的条带大小一致(图 4),结果表明融合基因插入载体的位置正确。

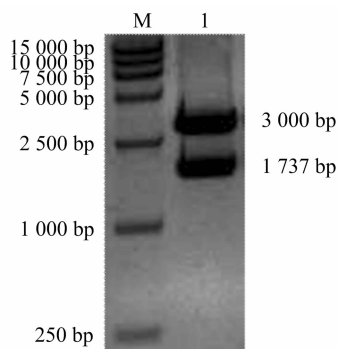
2.2 表达载体的构建

双酶切后回收载体大片段与目的基因连接,转化大肠杆



M—DNA marker DL2000; 1—融合基因 PCR 产物

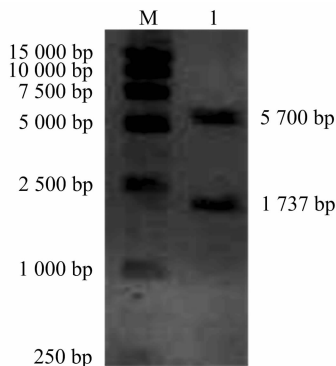
图3 plyxyl 融合基因 PCR 扩增



M—DNA marker DL15000; 1—融合基因 PCR 产物

图4 重组质粒 pGEM-plyxyl 电泳分析

菌 DH5 α , 得到的重组子提取质粒进行双酶切验证, 酶切结果表明, 该重组子中含有该融合基因(图 5)。将该重组子转入受体菌株 BL21 中进行诱导表达试验。



M—DNA marker DL15000; 1—融双酶切产物

图5 重组质粒 pPAL7-plyxyl 的电泳分析

2.3 重组质粒在大肠杆菌中的表达

将含有融合基因的重组子进行 IPTG 诱导, 间隔时间取样, 采用 DNS 法^[8]测定其酶活性。果胶裂解酶和木聚糖酶的活性均在诱导 6 h 时达到最高, 分别为 30.11 U/mL、2.03 IU/mL(图 6、图 7)。

3 结论

将来源于海栖热袍杆菌的果胶裂解酶基因和来源于桔青酶的木聚糖酶基因构建融合基因, 转化受体菌 BL21, 经 IPTG 诱导, 2 个基因实现了在大肠杆菌中的共表达。本研究所构

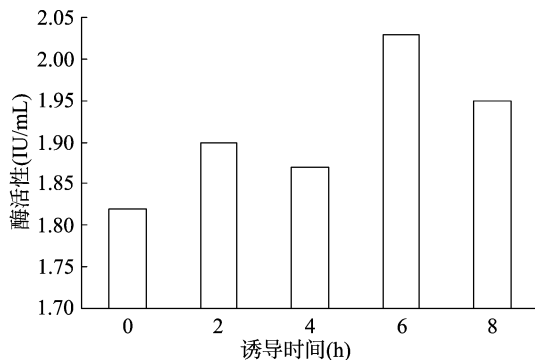


图6 木聚糖酶不同诱导时间的酶活性

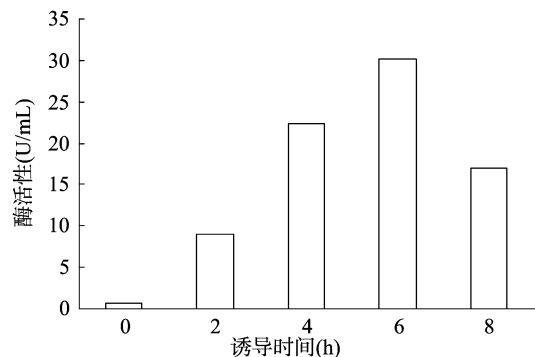


图7 果胶裂解酶不同诱导时间的酶活性

建的基因工程菌所产的木聚糖酶的反应温度为 50 ℃, pH 值为中性, 有比较稳定的活性, 诱导 6 h 时酶活性能达到最高, 为 2.03 IU/mL; 果胶裂解酶基因在诱导 6 h 后酶活性最高达到 30.11 U/mL。

本研究果胶裂解酶基因和木聚糖酶基因均比其他文献中单个基因的表达量低, 其原因可在今后的工作中继续研究。

参考文献:

- [1] 王 智, 宋立立, 顾金刚, 等. 米根霉糖化酶、类芽孢杆菌木聚糖酶融合蛋白的真核分泌表达[J]. 生物技术进展, 2011, 1(4): 276-281.
- [2] Bajpai P. Application of enzymes in the pulp and paper industry[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15(2): 147-157.
- [3] Luttig M, Vanzyt W H, Pretorius I S. Cloning of two beta-xylanase-encoding genes from *Aspergillus niger* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(5): 411-415.
- [4] 向亚萍, 罗楚平, 周华飞, 等. 枯草芽孢杆菌分泌表达极耐热木聚糖酶及其酶学性质[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1037-1042.
- [5] 李 琦, 李国高, 刘 绍, 等. 果胶酶应用的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 258-262.
- [6] 郭育齐, 赵良忠, 尹乐斌, 等. 微生物果胶酶研究及其在食品加工中的应用进展[J]. 邵阳学院学报(自然科学版), 2013, 10(2): 68-73.
- [7] 格林 M R, 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2013.
- [8] Ghose T. Measurement of cellulose activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.