

# 嗜热真菌热稳定性 $\beta$ -葡萄糖苷酶的克隆表达、 纯化及酶学性质

陈卫红 李多川\*

(山东农业大学植物保护学院环境生物系, 泰安 271018)

**摘要** 从嗜热子囊菌光孢变种(*Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*)中克隆出 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 *bgl* II 的全长序列, GenBank 注册号为 EU263992。将该基因插入巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 分泌型表达载体 pPIC9K 中以获得重组质粒, 将重组质粒转入毕赤酵母中, 大量筛选后获得高效表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酵母工程菌株。经甲醇诱导 6 d, 培养基中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力可达 0.23 U/mg。该酶的最适反应 pH 为 5.0, 最适反应温度为 50 °C。通过 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子层析纯化了该重组蛋白质。SDS-PAGE 测得该重组蛋白质分子量约为 118 kDa。

**关键词** 嗜热子囊菌光孢变种; 表达; 纤维素酶; 毕赤酵母; 纯化

$\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase) (EC 3.2.1.21), 它能够水解结合于末端非还原性的 $\beta$ -D-葡苷键, 同时释放出 $\beta$ -D-葡萄糖和相应的配基, 其重要的生物学功能决定了其广阔的应用前景。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的应用非常广, 在水解纤维素<sup>[1]</sup>、生产低聚龙胆糖<sup>[2]</sup>、作为风味酶<sup>[3]</sup>、肿瘤诊断和治疗方面<sup>[4]</sup>都具有巨大的应用潜力, 因此对 $\beta$ -葡萄糖苷酶进行研究是十分必要的, 已成为近几年来人们研究的热点。

长期以来, 酶性质不够优良、酶的产量低及酶的比活力低一直是影响酶实际应用的一个较重要原因。虽然 $\beta$ -葡萄糖苷酶在微生物中广泛存在, 但是真菌、细菌等微生物的产酶效率不高, 难以获得大量产品, 且热稳定性较差。近年来国际上在嗜热 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因研究领域日趋激烈。通过基因重组技术构建工程菌, 分泌表达高活性、热稳定的 $\beta$ -葡萄糖苷酶对研究其应用具有重要意义。

本课题选择嗜热子囊菌光孢变种(*Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*)<sup>[5]</sup>做为研究对象, 分离该菌产生的 $\beta$ -葡萄糖苷酶及其编码基因 *bgl* II, 将该热稳定性 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因导入酵母中, 构建出高效表达该基因的生物工程菌株, 预期能在常温和短时间内高效产生 $\beta$ -葡萄糖苷酶, 以达到降低能耗和提高经济效益的目的, 并为进一步利用和开发 $\beta$ -葡萄糖苷酶、解析其结构与功能的关系打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、JM109 购自上海 Sangon 公司; 质粒 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司; 毕赤酵母 *Pichia Pastoris* GS115 和 pPIC9K 分泌型表达载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶和生化试剂 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; DNA marker DL2000、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等工具酶、氨苄青霉素、胶回收试剂盒等试剂购自 TaKaRa 公司; PCR 引物合成及序列测定由北京博尚生物技术有限公司; YPD、MM、MD、BMGY、BMMY 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

### 1.2 基因的分离

1.2.1 总 RNA 的提取 嗜热子囊菌光孢变种在乳糖诱导培养基上 50 °C 恒温培养 3 d, 取菌体提取总 RNA (参考 Invitrogen Trizol 试剂盒说明)。

1.2.2 基因的克隆 以总 RNA 为模板进行反转录 (参照 TakaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒说明), 获得 cDNA。PCR 所用正向引物 RT-SP1 (5'-ATAATC-TGCTTGTCGGTCGTTTCT-3')和反向引物 RT-SP2 (5'-CTAACTCTCAGGAATCACAACACAAT-3') (根据已报道的子囊菌原种 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因<sup>[6]</sup>保守序列设计引物), PCR 反应条件为 94 °C 4 min 预变性; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min, 共 31 个循环,

收稿日期: 2009-04-02 接受日期: 2009-06-26

国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No.2008AA05Z403, No.2006AA10Z304)

\* 通讯作者。Tel: 0538-8249071, E-mail: lidc20@sdau.edu.cn

72 °C 延伸 10 min。PCR 产物与 pMD18-T 连接, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选获得阳性克隆, 并进行序列测定。

### 1.3 成熟肽编码基因的扩增及毕赤酵母表达载体的构建

1.3.1 基因的 PCR 扩增 设计一对在上下游引物中分别引入了 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切位点的引物来扩增  $\beta$ -葡萄糖苷酶成熟蛋白编码基因(加下划线处为酶切位点)。上游引物(CD1): 5'-CCGGAATTCGACTCTGTGCCAACCGGCTATG-3' (*EcoRI*), 下游引物(CD2): 5'-TTGCGGCCGCCTAAATATTCCTACTCCCGACC-3' (*NotI*), 扩增产物去除了基因信号肽序列。

1.3.2 毕赤酵母表达载体的构建 将经过测序验证后正确的阳性克隆提取质粒, 经 *EcoRI* 和 *NotI* 双酶切后插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 的多克隆位点, 得到重组质粒, 并对该质粒进行限制性酶切及测序鉴定。

1.3.3 毕赤酵母的电转化 将毕赤酵母菌株 GS115 接种于 YPD 中, 300 r/min 条件下, 培养至  $A_{600}$  值为 1.3, 离心收集菌体, 用预冷的无菌水洗菌体, 4 °C 下 1 500 g 离心 5 min 去上清液, 用预冷的山梨醇悬浮菌体, 离心收集菌体, 然后用 0.5 ml 预冷的山梨醇悬浮菌体。取 80  $\mu$ l 菌液, 加入 10  $\mu$ g 经限制性内切酶 *SaI*I 线性化的重组质粒 pPIC9K/*bgl*, 冰浴 5 min, 根据电转仪提供的优化参数进行电击(电容 25  $\mu$ F, 电阻 200  $\Omega$ , 电压 1 500 V), 电击后立即加入 1 ml 预冷的山梨醇, 混合后取 200  $\mu$ l 菌液涂布于 MD 平板上, 28 °C 培养。

### 1.4 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

1.4.1 重组毕赤酵母的平板筛选 挑取单个菌落分别点种到 MM 和 MD 平板上, 28 °C 倒置培养 4 d, 挑取在 MD 平板和 MM 平板上均能正常生长的阳性转化子, 分别点种于含 1.00、2.00、3.00 和 4.00 mg/ml G418 的 YPD 培养基平板上, 以筛选多拷贝转化子。

1.4.2 PCR 鉴定 提取毕赤酵母基因组 DNA (参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册)。使用酵母 pPIC9K 载体上通用引物(5'AOX1, 3'AOX1,  $\alpha$ -factor) 进行 PCR 鉴定, 扩增反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

### 1.5 重组毕赤酵母工程菌株的诱导表达

挑取 G418 高抗性水平的阳性菌落, 接种于

BMGY 培养基, 28 °C 300 r/min 振荡培养至对数生长期。3 000 g 离心 5 min 回收细胞。弃上清液, 将细胞重悬于 BMMY 培养基中, 至  $A_{600}$  值为 1.0。28 °C 继续培养并开始诱导表达。每隔 24 h 补加 100 % 甲醇至终浓度为 0.5% 以维持诱导。每隔 24 h 取样一次, 直至 6 d。每次取诱导培养液 1 ml 于 1.5 ml 离心管中, 室温下以最大转速离心 3 min。

### 1.6 重组毕赤酵母表达产物分析

1.6.1 SDS-PAGE 和重组酶活力检测 取诱导的粗酶液, 进行 SDS-PAGE, 分析重组蛋白质的表达情况。酶活性测定采用 DNS 法。将 0.1 ml 1% 水杨苷溶液、0.1 ml 适当稀释的酶液、0.1 ml 0.05 mol/L pH 值为 5.0 的醋酸缓冲液混合后, 50 °C 下保温 30 min, 然后加入 0.1 ml 的 DNS 试剂, 置于沸水中煮沸 5 min, 然后用比色法测定产生的还原糖的量。一个酶活力单位(U)定义为每分钟水解水杨苷产生 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需酶的量<sup>[7]</sup>。

1.6.2 酶的分离纯化 将提取的粗酶液用 85% 饱和度的硫酸铵沉淀 24 h 后, 4 °C 8 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 用适量的缓冲液 A (50 mmol/l Tris-HCl 缓冲液, pH 值为 8.0) 回溶, 并在相同的缓冲液中透析 24 h, 4 °C 8 000 r/min 离心 30 min, 取上清液。将上清液施与经缓冲液 A 平衡的 DEAE Sepharose 柱, 酶液先用 5 倍床体积的缓冲液 A 洗脱至  $A_{280}$  不变后, 再用 100 ml 缓冲液 A 和 100 ml 含 0.3 mol/L NaCl 的相同缓冲液进行线形梯度洗脱, 流速为 3 ml/min, 每 1 min 收集 1 管。对活性管酶液进行电泳确认纯度。将纯化的酶液经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白质带, 表明纯化后的  $\beta$ -葡萄糖苷酶为单一组分, 已达到电泳纯。

1.6.3 重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的生物学特性 (1) 重组的  $\beta$ -葡萄糖苷酶反应最适温度及热稳定性 不同温度下(30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C)测酶活性, 得出酶的最适反应温度; 将重组蛋白质在不同温度(60 °C、70 °C、80 °C)下保温处理不同时间(10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min)后, 立即在 0 °C 冰浴中冷却, 然后检测剩余酶活。(2) 重组酶的最适 pH 热稳定性 在不同 pH 值缓冲液中测定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活, 检测酶作用的最适 pH 值; 在不同的 pH 缓冲液中 50 °C 保温 30 min, 检测剩余酶活力。

## 2 结果

## 2.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

以总 RNA 为模板进行 RT-PCR, 获得片段与预期大小相符(图 1)。将目的带切下纯化后克隆测序。全长 cDNA 序列为 2 876 bp, GenBank 注册号为 EU263992。基因编码产物的理论等电点为约为 5.0, 推测该蛋白质是酸性蛋白质, 属于糖苷水解酶家族 3, 该基因表达的氨基酸序列与嗜热子囊菌(原种)中克隆出耐热的  $\beta$ -葡萄糖苷酶氨基酸序列同源性高达 99%<sup>[6]</sup>。 *Aspergillus fumigatus* A1163 与 *Neosartorya fischeri* NRRL 181 同源性也高达 99%, 可见不同种的真菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶同源性较高。将推测的蛋白质产物序列与数据库中已注册的不同种属真菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶氨基酸序列进行多序列同源比较, 结果表明,

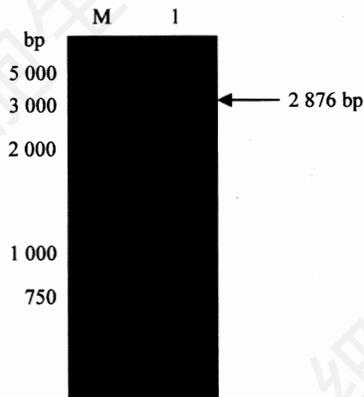


Fig.1 Electrophoresis patterns of PCR product from thermo-stable  $\beta$ -glucosidase gene

M: marker DL2000; 1: RT-PCR.

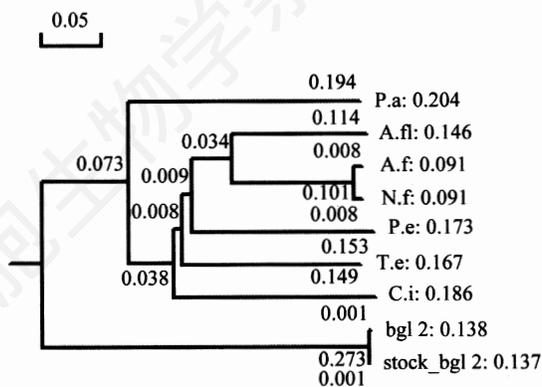


Fig.2 Homology tree between *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* bgl II and other  $\beta$ -glucosidase

C.i: *Coccidioides immitis* RS; A.f: *Aspergillus fumigatus* A1163; N.f: *Neosartorya fischeri* NRRL 181; A.fl: *Aspergillus flavus* NRRL3357; P.e: *Penicillium decumbens*; T.e: *Talaromyces emersonii*; P.a: *Podospora anserina*; stock\_bgl 2: *Thermoascus aurantiacus*.

$\beta$ -葡萄糖苷酶的同源性较高(图 2)。

## 2.2 成熟蛋白编码序列的克隆及毕赤酵母重组载体的构建

切除基因中信号肽的编码序列, 得到的片段长度为 2 535 bp, 编码 844 个氨基酸。用 *EcoRI* 和 *NotI* 对重组质粒 pMD18-T/bgl 产物进行双酶切, 与同样双酶切酵母表达质粒 pPIC9K 进行体外连接, 获得重组质粒 pPIC9K/bgl, 重组质粒转化大肠杆菌 JM109, 提取质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定(图 3)。

## 2.3 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

挑选酵母转化子提取基因组 DNA 进行进一步 PCR 鉴定, 筛选到多株重组酵母菌。将重组酵母菌点种到含 1.00、2.00、3.00 和 4.00 mg/ml G418 的 YPD 平板上, 选取 G418 高抗性水平的酵母工程菌株接种到 BMGY 的培养基中, 菌体生长 48 h 后转入 BMMY 培养基中进行诱导表达。分别取诱导培养的上清液进行活性检测, 发现各转化子都具有  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, 其中筛选出一株酵母工程菌培养 6 d 后活力最高, 可达到 0.23 U/mg。

## 2.4 重组表达产物分析和分离纯化及生物学特性

### 2.4.1 重组表达产物分析和重组表达产物的分离纯化

将重组工程菌株甲醇诱导培养, 每隔 24 h 收集酶液, SDS-PAGE 分析重组酶表达情况, 结果得知重组酶的表达量随着时间的增加而增高, 诱导 6 d 后表达量达到最高, 随后保持稳定不再增加。收集的 1 000 ml 粗酶液经硫酸铵沉淀, 用 A 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 值为 8.0)回溶并透析后得到约 56

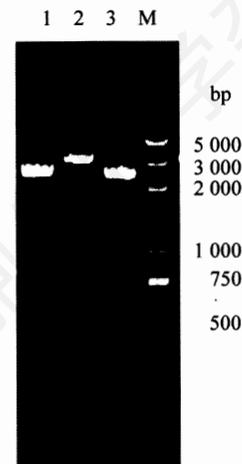


Fig.3 Identification of *P. pastoris* vector by PCR

M: marker DL2000; 1: PCR product amplified with 5'AOX1 and 3'AOX1 primers, 2 900 bp; 2: PCR product amplified with  $\alpha$ -factor and 3' AOX1 primers, 3 184 bp; 3: PCR product amplified with CD1 and CD2 primers, 2 684 bp.

ml 酶液, 上柱到经缓冲液 A 平衡的 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱进行阴离子交换层析, 得到纯化的重组酶。取纯酶液进行 SDS-PAGE, 电泳结果表明, 表达的  $\beta$ -葡萄糖苷酶分子量约为 118 kDa<sup>[8]</sup>(图 4)。

**2.4.2 重组酶最适温度及温度稳定性** 在不同温度条件下测定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力, 发现该酶最适反应温度为 50 °C (图 5)。将重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶液分别在不同温度下保温 30 min, 检测剩余的酶活力。该酶在 50 °C 的条件下保温 60 min 后仍具有 99% 的酶活力(图 6)。

**2.4.3 重组酶最适 pH 及 pH 稳定性** 在不同 pH 反应条件下分析重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力, 表明该酶最适 pH 为 5.0 (图 7)。将该酶在不同 pH 值的缓冲液中 50 °C 保温 30 min, 检测剩余的酶活力, 发现该酶在 pH 4.0~9.0 的条件下保温 30 min 酶活力约为 75% (图 8)。

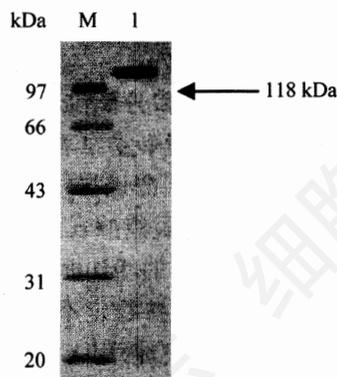


Fig.4 SDS-PAGE of the purified  $\beta$ -glucosidase

M: molecular weight markers; 1: purified  $\beta$ -glucosidase (118 kDa).

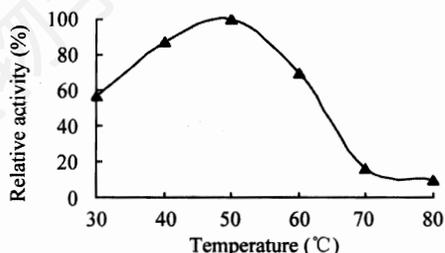


Fig.5 Effect of temperature on the activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase

**2.4.4 重组酶的底物特异性** 在标准条件下, 用 1% 的不同底物(水杨苷、乳糖、纤维二糖、蔗糖、麦芽糖)与酶液反应, 重复操作 5 次。从表 1 中可以看到, 以乳糖底物时酶活最高, 以麦芽糖、纤维二糖和水杨苷为底物时酶活次之, 以蔗糖为底物时酶活最低。

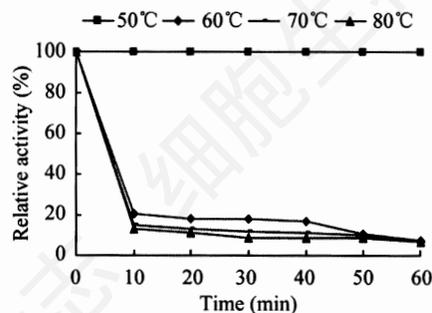


Fig.6 Temperature stability of recombinant  $\beta$ -glucosidase

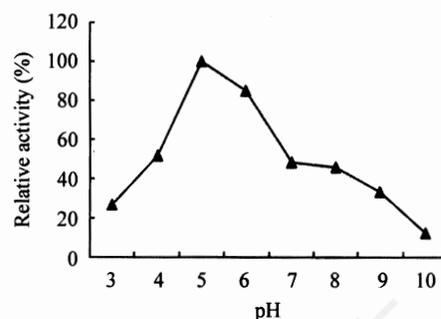


Fig.7 Effect of pH on the activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase

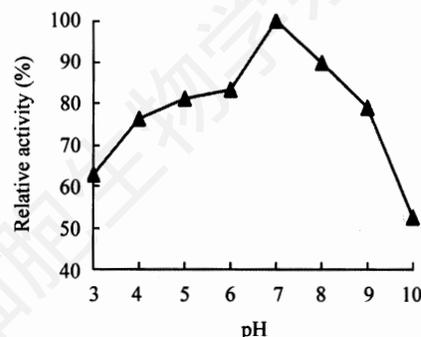


Fig.8 pH stability of recombinant  $\beta$ -glucosidase

Table 1 Effect of substrate on the activity of recombinant  $\beta$ -glucosidase

Substrate	Lactose	Cellobiose	Maltose	Salicin	Sucrose
Enzyme activity	1.31 U/mg	1.27 U/mg	1.27 U/mg	0.65 U/mg	0.06 U/mg
Relative enzyme activity	100.00%	97.21%	96.98%	49.57%	4.49%

### 3 讨论

综上所述,利用巴斯德毕赤酵母表达系统其本身的特点, $\beta$ -葡萄糖苷酶基因在异源宿主中进行了高效表达。 $\beta$ -葡萄糖苷酶广泛存在与微生物中,但是含量低,难以获得大量产品,价格昂贵,从而一直限制着 $\beta$ -葡萄糖苷酶的推广利用。通过基因工程的手段,在酵母中高效表达 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因,可望达到大幅度提高 $\beta$ -葡萄糖苷酶产量的目的,是解决 $\beta$ -葡萄糖苷酶工业化廉价生产这一问题的最有效途径。

但是要提高毕赤酵母表达水平,还需对发酵罐高密度发酵的条件进一步摸索,进行基因工程菌的工业化发酵工艺的研究,提高酶的产量。

本实验在研究重组酶的底物特异性时发现 $\beta$ -葡萄糖苷酶对乳糖、纤维二糖、麦芽糖的水解能力大大高于对水杨苷的水解能力,其中以纤维二糖为底物时酶活力达到1.27 U/mg,远高于嗜热子囊菌原种*Thermoascus aurantiacus*<sup>[6]</sup>的酶活力0.36 U/mg。由于纤维素是地球上最丰富的碳水化合物,可被纤维素酶降解转化成为葡萄糖。纤维素由内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶分解产生纤维二糖,后者再由 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解成葡萄糖。 $\beta$ -葡萄糖苷酶可防止纤维二糖的积累,从而能够消除纤维二糖的抑制作用,提高酶水解效率<sup>[1,9,10]</sup>,而水解成的葡萄糖,再通过发酵可生产乙醇、丙酮、丁醇等有机化工原料和燃料,也可以生产饲料、食物和药物等。本研究将继续筛选水解纤维二糖的高活性菌株,为纤维素酶的工业化生产打下理论基础。

本研究只针对性的对于几项主要指标进行了测定,今后将在以下几个方面进行深入研究:可以针对性进行定点和非定点突变,构建突变体,进一步研究纤维二糖水解酶的催化功能及对底物纤维素结合能力;酶的糖基化作用与表达蛋白的热稳定性和活力有一定的关系,可以进行该酶糖基化位点的改造的探讨,筛选水解纤维二糖的高活性菌株;运用结构分子生物

学和生物信息学的原理和技术对纯化蛋白质的二级结构、三级结构及晶体结构进行进一步的分析,建立该蛋白质空间结构模型及功能结构域,为研究该蛋白质性质进一步提供更多的结构信息支持;根据酵母的密码子偏好性对*Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因进行改造,提高重组*Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶水解活力。

### 参考文献(References)

- [1] Bhat KM, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnol Adv*, 1997, 15(3-4): 583-620
- [2] 刘玲玲,朱松,朱婷,等。重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶生产龙胆低聚糖的工艺条件优化, *微生物学报*, 2009, 49(5): 597-602
- [3] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, et al. A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and precursors of wines and fruit juices, *J Agric Food Chem*, 1996, 44(8): 2336-2340
- [4] 邵金辉,韩金祥,朱有名,等。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在工农医领域的应用, *生命的化学*, 2005, 25(1): 22-24
- [5] 王冬梅,李多川。四个嗜热真菌中国新纪录种, *菌物学报*, 2005, 24(1): 19-23
- [6] Hong J, Tamaki H, Kumagai H. Unusual hydrophobic linker region of  $\beta$ -glucosidase (BGLII) from *Thermoascus aurantiacus* is required for hyper-activation by organic solvents, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73(1): 80-88
- [7] 楚春雪,李多川,郭润芳。一株嗜热毛壳菌 $\beta$ -葡萄糖苷酶分离纯化及特性, *菌物学报*, 2004, 23(3): 397-402
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [9] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M. Molecular cloning and expression of the novel fungal  $\beta$ -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*, *J Biochem*, 1999, 125(4): 728-736
- [10] Machida M, Ohtsuki I, Fukui S, et al. Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular  $\beta$ -glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(12): 3147-3155

## Cloning, Expression, Purification and Analysis of Enzymic Properties of Thermostable $\beta$ -glucosidase from the Thermophilic Fungus

Wei-Hong Chen, Duo-Chuan Li\*

(Department of Environmental Biology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract** The  $\beta$ -glucosidase *bg*/III gene was cloned from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. The accession number in GenBank is EU263992. The gene was ligated with the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K, resulting in the recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transformed into *P. pastoris*. Highly efficient  $\beta$ -glucosidases from project strain were achieved through massive screening. The project strain was induced with methanol in 6 d. The  $\beta$ -glucosidase was expressed and secreted into the culture with activity of 0.23 U/mg. The  $\beta$ -glucosidase exhibited optimum catalytic activity at 50 °C and pH 5.0. The recombinant  $\beta$ -glucosidase was purified by using DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography. A molecular mass of the purified enzyme is 118 kDa determined by SDS-PAGE.

**Key words** *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*; expression; cellulose; *Pichia pastoris*; purification

Received: April 2, 2009 Accepted: June 26, 2009

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2008AA05Z403, No.2006AA10Z304)

\*Corresponding author. Tel: 86-538-8249071, E-mail: lidc20@sdau.edu.cn