应用与环境生物学报 2011, 17(6): 892~896
Chin J Appl Environ Biol=ISSN 1006-687X
2011-12-25
DOI: 10.3724/SP.J.1145.2011.00892

黑曲霉耐热木聚糖酶XYNB在毕赤酵母中的高效表达*

李 伟 何 容 高志强 于荣清 赵 锐 曹 毅 乔代蓉**
（四川大学生命科学学院微生物与代谢工程四川省重点实验室 成都 610064）

摘 要 高比活木聚糖酶的高效表达是进一步提高木聚糖酶发酵效价、降低生产成本的有效途径. 将黑曲霉木聚糖酶基因*XynB*（不含信号肽）克隆到分泌型表达载体pPIC9K上，线性化后电击转化巴斯德毕赤酵母GS115，G418和PCR鉴定的阳性转化子经0.5%甲醇、在28 ℃诱导表达. SDS-PAGE分析表明，该蛋白相对分子质量为20×10³左右. 优化的诱导表达条件为，每隔12 h添加0.5%的甲醇，发酵5 d后，比活达4 757 U/mg；其最适温度为55 ℃，最适pH为5.0，80 ℃处理30 min后仍有74%的残余酶活. 图9 参18

关键词 黑曲霉；木聚糖酶；毕赤酵母GS115；甲醇；诱导表达
CLC Q936 : Q786

High Expression of Thermostable Xylanase XYNB from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris**

LI Wei, HE Rong, GAO Zhiqiang, YU Rongqin, ZHAO Rui, CAO Yi & QIAO Dairong**
(*Microbiology and Metabolic Engineering Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University*, Chengdu 610064, China)

Abstract The high expression of xylanase with high specific activity is the effective way to further improve the fermentation potency of xylanase and cut down the production costs. In this study, a recombinant plasmid pPIC9K-XynB was constructed by inserting gene *XynB* (without signal peptide) from *Aspergillus niger* into *Pichia pastoris* secretary vector pPIC9K. Linearized pPIC9K-XynB was transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation. The positive recombinant strain identified by G418 selection and confirmed by PCR analysis was induced by 0.5% methanol at 28 ℃ to express the recombinant xylanase. The SDS-PAGE analysis showed that the protein molecular weight was about 20 000. The enzyme production was high and stable (4 757 U/mg) when the methanol induced time interval was 12 h and the methanol concentration was 0.5%. The optimal temperature and pH of the enzyme activity was 55 ℃ and 5.0, respectively. After treated for 30 min at 80 ℃, there was still 74% residual activity. Fig 9, Ref 18

Keywords *Aspergillus niger*; xylanase; *P. pastoris* GS115; methanol; induction expression
CLC Q936 : Q786

木聚糖是一类广泛存在于植物体内的半纤维素，约占细胞干重的35%[1]. 木聚糖的彻底降解需要多种酶类的共同参与，起主要作用的是内切β-1,4-*D*-木聚糖酶（EC 3.2.1.8），简称木聚糖酶，是当前木聚糖酶类的研究热点. 木聚糖酶具有重要的应用价值，在饲料、制浆造纸、食品医药等行业中有着广阔的应用前景[2]. 木聚糖酶广泛存在于微生物中，自上世纪70年代末开始开展木聚糖酶基因的研究工作以来，已经有上百种来自细菌和真菌的木聚糖酶基因被克隆并在原核和真核中进行了同源和异源重组表达[3~6]. 我国对木聚糖酶的研究最近十几年才开始，但大多都仅限于天然木聚糖酶高产菌株的筛选[7~8]，而运用基因工程手段产业化生产木聚糖酶制剂在国内尚属空白. 我国关于黑曲霉木聚糖酶基因克隆的报道最早见于孙建义的报道[9]，他克隆了β-1,4-xylanase的cDNA片段并分析了序列，但并未见他有关该基因在异源表达系统进行表达的报道. 而关于黑曲霉木聚糖酶基因*XynB*在真核表达系统中的异源表达的相关报道，国内外都相对较少.

收稿时间：2010-11-23 接受日期：2010-12-07
*四川省科技支撑计划项目（No. 2008GZ0245）和科技人员服务企业行动项目（No. 2009GJF00033）资助 Supported by the Science & Technology Pillar Program of Sichuan, China (No. 2008GZ0245) and the Project of Scientific and Technical Personnel Servicing Companies (No. 2009GJF00033)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: qiaodr@sohu.com)

本研究将从黑曲霉（*Aspergillus niger*）SCTCC 400264中克隆得到的高比活木聚糖酶基因*XynB*，利用毕赤酵母（*Pichia pastoris*）表达系统实现了高效分泌表达，并对所产重组木聚糖酶的酶学性质进行了初步研究.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及质粒 木聚糖酶基因*XynB*（NCBI序列号AC: FJ772090）为本实验室从四川省微生物资源保藏中心保藏的黑曲霉（*A. niger*）SCTCC 400264中克隆[10]；大肠杆菌菌株*E. coli* JM109为本实验室保存；毕赤酵母（*P. pastoris*）GS115、表达质粒pPIC9K购自Invitrogen公司.

1.1.2 试剂 限制性内切酶*EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ、T4连接酶、Gel Extraction Kit等均购自宝生物（TaKaRa）工程有限公司；木聚糖酶底物桦木木聚糖（Birch wood xylan）购自Sigma公司；无氨基酸的硫酸铵酵母氮源培养基（YNB）、G418购自Ameresco公司；其它生化试剂为国产分析纯.

1.1.3 **培养基**　LB、YPD、MD（Minimal dextrose）、MM（Minimal methanol）、BMGY（富集培养基）、BMMY（诱导培养基）的配制方法见参考文献[11].

1.2 方 法

1.2.1 **酵母重组表达载体的构建及转化子的筛选和鉴定**　根据GenBank中*XynB*基因的序列以及表达载体pPIC9K上的多克隆位点的特征，设计合成了以下一对引物：P_1：5'-GGAATTCTCGACCCCGACCGGCGAGAA-3'；P_2：5'-ATAGCGGCCGCTTACTGAACAGTGATGGAGGAAGA-3'. 引物P_1、P_2分别设计有*EcoR* Ⅰ和*Not* Ⅰ酶切位点（下划线部分）.

PCR扩增得到的木聚糖酶基因*XynB*，经琼脂糖凝胶回收纯化，用*EcoR* Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切，连接到表达载体pPIC9K多克隆位点，得到重组质粒pPIC9K-XynB. 用*Sal* Ⅰ单酶切重组质粒pPIC9K-XynB以及对照空载pPIC9K使之线性化，琼脂糖凝胶回收纯化目的片段并分别电击转化毕赤酵母GS115. 电转化方法参见Invitrogen公司操作手册. 利用MD和MM平板进行甲醇利用快型转化子的筛选，在不同G418浓度（0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、5.00、8.00 mg/mL）的YPD培养基平板进行高拷贝转化子的筛选. 最后经PCR鉴定pPIC9K-XynB的阳性转化子.

1.2.2 **重组毕赤酵母工程菌株的诱导表达及诱导条件的优化**　将PCR鉴定正确的4株高拷贝转化子利用BMGY、BMMY培养基在28 ℃发酵后，测定粗酶活性并对酶活最高者进行初步的SDS-PAGE分析. 同时对其分别进行甲醇诱导浓度（0.5%、0.8%）和诱导间隔时间（12 h、24 h）的优化，并做出产酶曲线.

1.2.3 **重组毕赤酵母表达产物酶学性质分析**　采用DNS法测定木聚糖酶的活性[12]. 酶活定义为，在一定条件下，每分钟产生1 μmol木糖所需的酶量为一个酶活力单位（1 U）. 采用Bradford法[13]测定发酵液中的蛋白含量. 酶活力和酶学性质的测定每组实验设3个重复，取平均值计算.

最适温度和最适pH的测定：分别在不同温度（30~70 ℃）和不同pH（2.0~10.0）条件下测定重组酶活.

酶的耐热性试验：重组酶在80 ℃水浴条件下处理2~60 min，迅速冷却后，在其最适反应条件下测定残余酶活，以未处理为100%计.

酶的pH稳定性试验：在37 ℃条件下，将重组酶液在不同pH缓冲液中（pH 2.0~10.0）处理30 min后，在以最适pH缓冲液配制的底物溶液中反应，测定其残余酶活力，以未处理为100%计.

1.2.4 **木聚糖酶表达工程菌的遗传稳定性**　将4号重组酵母传代50次后，取保存的菌株，对每10代进行诱导培养，并对培养过程中菌体密度和木聚糖酶表达量的情况进行测定. PCR鉴定以研究其遗传稳定性.

2 结 果

2.1 毕赤酵母重组表达载体的构建

经PCR扩增得到了大小正确（567 bp）的*XynB*基因（图1）.

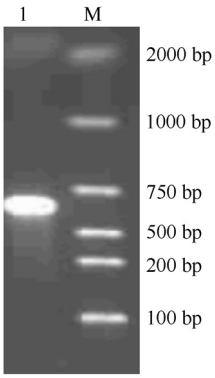


图1 PCR扩增产物的电泳分析

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of PCR product

Lane M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1: XynB PCR产物 PCR product of XynB

*XynB*基因经过*EcoR* Ⅰ和*Not* Ⅰ位点以正确的阅读框架插入到酵母分泌型表达载体pPIC9K的α-因子信号肽序列的下游，得到了重组表达载体pPIC9K-XynB. 经*EcoR* Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切鉴定，得到567 bp的外源片段和9 300 bp的载体片段，证明重组质粒构建正确（图2）.

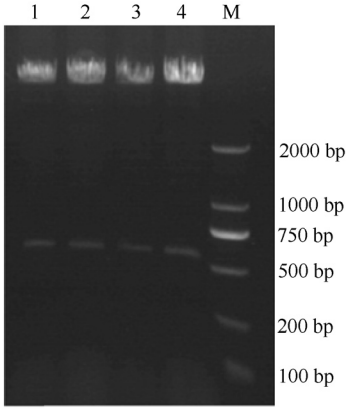


图2 重组质粒pPIC9K-XynB的酶切鉴定

Fig. 2 The restriction analysis of recombinant plasmid pPIC9K-XynB

Lane M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1~4: 重组质粒pPIC9K-XynB的*Eco*R Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切 pPIC9K-XynB digest with *Eco*R Ⅰ and *Not* Ⅰ

2.2 毕赤酵母的电击转化和高拷贝转化子的筛选

电击后AOX-pPIC9K-XynB和his4序列片段以同源重组的方式进入到毕赤酵母GS115染色体上. 另外，表达载体pPIC9K上含有抗卡那霉素G418药物的基因，且研究认为G418抗性与重组转化子的拷贝数之间呈正相关[14]. 因此，可以直接用高浓度的药物G418方便快捷的筛选出含pPIC9K-XynB多拷贝载体的重组菌株.

筛选后共得到20株甲醇利用快型的阳性转化子（Mut^+/His^+）. 经不同浓度G418筛选后，最终在8.00 mg/mL G418的YPD平板上筛选到4株（4、5、15、16号）高拷贝转化子.

2.3 重组毕赤酵母菌株的PCR快速鉴定

将筛选到的4株高拷贝转化子分别提取基因组后，用XynB特异性引物进行PCR扩增，经琼脂糖凝胶电泳分析分别得到了567 bp的XynB基因条带（图3），说明4株转化子构建成功.

2.4 重组蛋白的诱导表达和条件优化

将4株重组毕赤酵母重组菌株以及空载对照菌株分别进

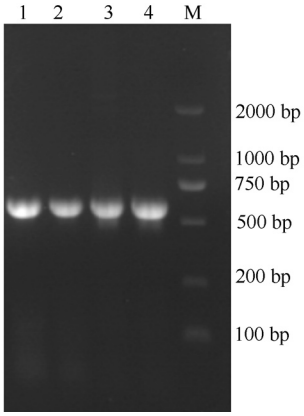


图3 毕赤酵母转化子的PCR鉴定
Fig. 3 PCR identification of the *P. pastoris* transformants
Lane M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1~4: 分别为4、5、15、16号转化子的PCR产物 PCR product of transformants 4, 5, 15 and 16

行摇瓶诱导培养7 d后，初测4株重组子表达蛋白的粗酶活，其中，4号菌株酶活最高（3 594 U/mg），对其进行SDS-PAGE分析（图4）以及诱导条件的优化. 从蛋白电泳图可见，在约20×10^{3}左右有一条明显的蛋白条带（图中箭头所指处），蛋白大小与预测蛋白分子量相符，且除目的条带外，几乎不见其他杂蛋白，同时，空载菌株并未出现目的条带.

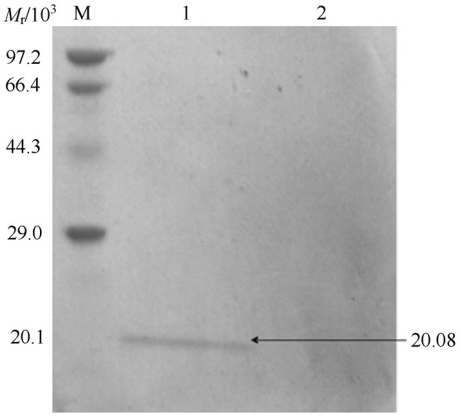


图4 重组木聚糖酶表达的SDS-PAGE图
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant xylanase expression
Lane M: 低分子量蛋白质Marker; Lane 1: pPIC9K-XynB; Lane2: pPIC9K空载对照
Lane M: Standard protein molecular weight; Lane 1: pPIC9K-XynB; Lane2: pPIC9K

对4号菌株进行诱导表达条件的优化. 由图5-A可以看出该菌株采用0.5%的甲醇诱导浓度比采用0.8%的浓度产酶水平高且持久稳定. 从图5-B可以看出，每12 h添加一次甲醇的产酶量要比每24 h添加一次甲醇的产酶量高且持久稳定，说明该重组毕赤酵母菌株甲醇利用速度较快，显著依赖于甲醇的添加.

BMGY培养基富集培养4号菌株后，转入BMMY培养基中进行诱导表达，从转入开始，每12 h添加0.5%甲醇，每24 h取样测酶活，产酶情况如图7所示. 诱导后d 5酶活达到最高，比活力为4 757 U/mg，之后略有降低，但基本保持稳定.

2.5 重组酶酶学性质的分析

如图7-A所示，该重组酶最适温度为55 ℃，高于55 ℃后酶活略有下降，60 ℃以后下降较快，70 ℃时残余酶活仅为

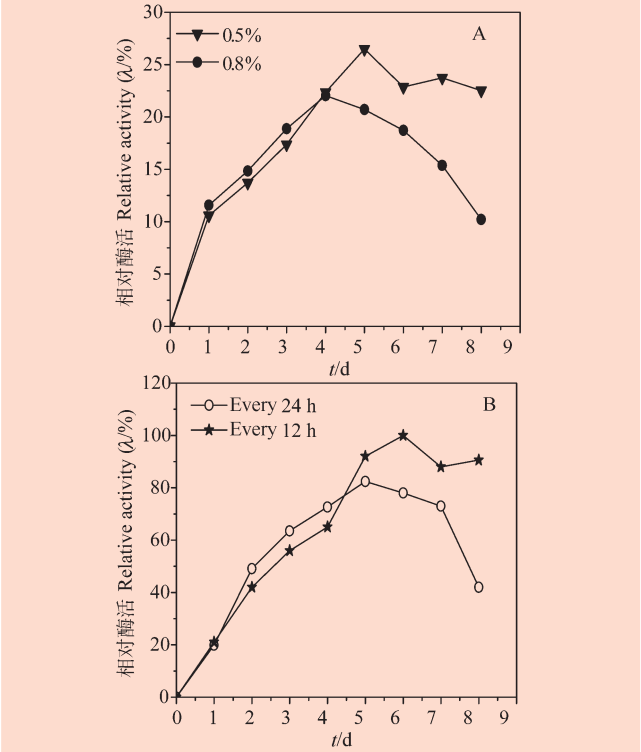


图5 不同甲醇终浓度（A）及添加间隔时间（B）的产酶水平比较
Fig. 5 Enzyme productions with different methanol concentrations (A) and methanol added intervals (B)
▼: 0.5%甲醇; ◆: 0.8%甲醇; ○: 每24 h; ★: 每12 h
▼: 0.5% methanol; ◆: 0.8% methanol; ○: every 24 h; ★: every 12 h

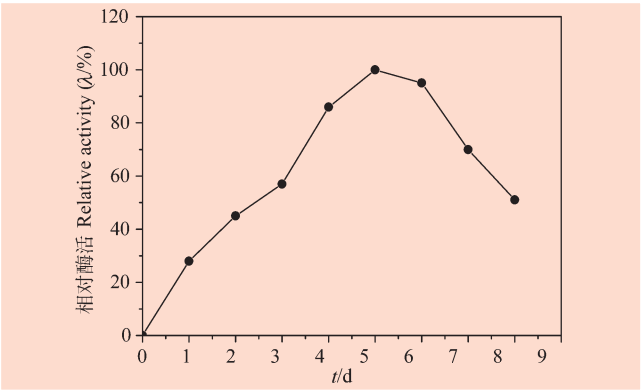


图6 重组毕赤酵母的产酶曲线
Fig. 6 Curve of enzyme production by recombinant *Pichia pastoris*

27%. 结果显示该重组酶最适反应pH为5.0，且在酸性pH范围内酶活性相对较高，结果见图7-B.

酶的耐热性测定结果如图8-A所示，处理10 min后还存在高达86%的残余酶活，30 min后仍有74%的残余酶活，60 min后仍然有40%的残余酶活存在. 该重组酶的pH稳定性如图8B所示，整体较好，都存在70%以上的残余酶活，pH 5.0时最高，为92%.

2.6 木聚糖酶表达工程菌的遗传稳定性

结果表明，每一代中的各项指标基本保持稳定. 对第10、20、30、40、50代酵母基因组DNA的PCR鉴定结果见图9. 由图可见，567 bp附近有一条明亮的特异性扩增条带，证明经过50次传代后，*XynB*基因仍然稳定地整合在毕赤酵母的基因

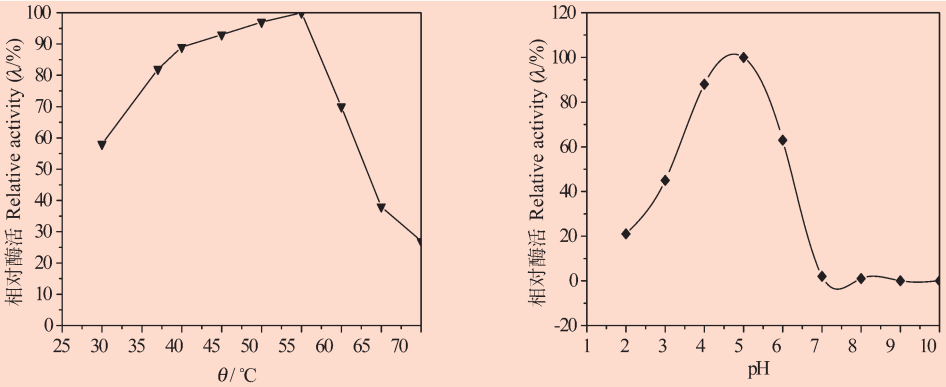


图7 重组木聚糖酶的最适反应温度（A）和最适pH（B）

Fig. 7 Temperature (A) and pH (B) dependence of the recombinant xylanase

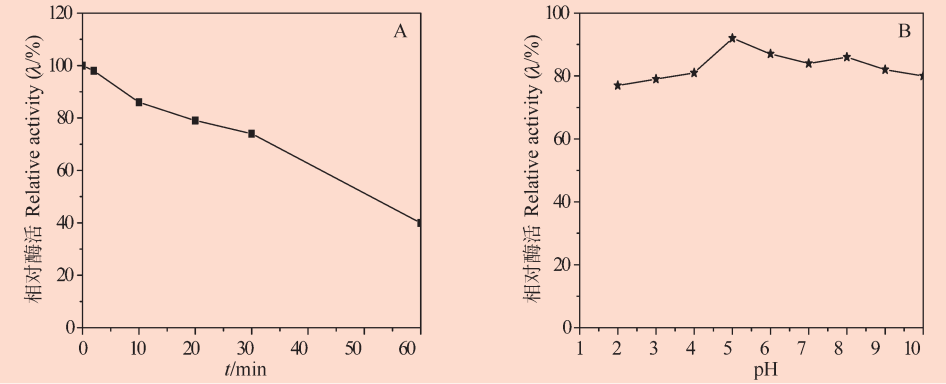


图8 重组木聚糖酶在80 ℃的热稳定性（A）及pH稳定性（B）

Fig. 8 Stability at 80 ℃ (A) and acid-alkali stability (B) of the recombinant xylanase activity

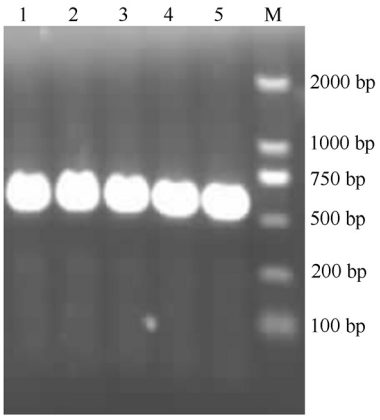


图9 重组质粒PCR鉴定

Fig. 9 PCR identification of recombinant plasmid

Lane M: DL 2000 DNA Marker; Lane 1~5: 第10、20、30、40、50代重组质粒pPIC9K-XynB PCR结果 The 10th, 20th, 30th, 40th, and 50th generation cells with pPIC9K-XynB respectively

组上. 通过以上两个试验结果证明，该4号基因工程菌具有良好的遗传稳定性，实现了木聚糖酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效异源表达.

3 讨 论

巴斯德毕赤酵母表达系统是近年来公认的最有效的新型外源蛋白真核基因表达系统之一，该表达系统具有高表达、高稳定、高分泌、高密度发酵以及容易大规模生产等特有优点，已有多种外源蛋白在该宿主系统中获得了成功表达[15]，潜力巨大.

本工作中，将从黑曲霉（*A. niger*）SCTCC 400264中克隆得到的木聚糖酶基因*XynB*（不含自身启动子）插入pPIC9Kα-因子分泌信号下游，利用AOX1高效启动子，使目的基因在毕赤酵母中得到了高效分泌表达. 经过优化诱导条件后，重组菌pPIC9K-XynB木聚糖酶产量达到4 757 U/mg，比原始出发菌株提高了约4倍，且表达产物具有生物学活性，为进一步的工业化发酵生产提供了良好的出发菌株. 同时，由于本研究尚未在发酵罐中进行相关实验，在下一步的发酵罐实验中，其酶活应该还有较大的提高.

该木聚糖酶的最适温度为55 ℃，最适pH为5.0，与Vasimon Ruanglek等所报道的在毕赤酵母中表达的黑曲霉木聚糖酶*XylB*基因[16]相同. 但其耐热性却显著高于同类木聚糖酶，在80 ℃下处理30 min后仍有74%的残余酶活，而来源于橄榄绿链霉菌A1的XynB在毕赤酵母中重组酶在70 ℃处理30 min仅能保持20%的残余活性[17].

由于在饲料中应用的木聚糖酶要求在动物正常体温（37 ℃）的胃肠道中具有较高活性[18]，而该重组木聚糖酶在37 ℃时拥有82%的残余酶活，在pH 4~6范围内存在50%以上的酶活性，符合以上要求. 在饲料制粒过程中都有一个短暂的高温过程，所以真正在饲料中推广应用的木聚糖酶必须有良好的热稳定性. 本工作中得到的重组木聚糖酶在80 ℃下处理30 min后仍有74%的残余酶活，具有较好的热稳定性的同时pH

稳定性也较好. 重组酶优良的耐热性大大扩大了木聚糖酶的应用范围, 为其工业应用的开发奠定了基础.

References

1 Shao WL (邵蔚蓝), Xue YM (薛业敏). Molecular biotechnology in exploiting the resource of hemicellulose. *J Food Sci & Biotechnol* (食品与生物技术), 2002, **21** (1): 88~93

2 Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanase: enzymology, molecular biology and application. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, **22** (1): 33~64

3 Nicolas P, Dieter K, Francois S. Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: Dependence on number of ribosome-binding sites. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 756~759

4 Ruiz-Amibas A, Femandez-Abalos JM, Sanchez P. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xysl) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **61** (6): 2414~2419

5 Rose SH, van Zyl WH. Constitutive expression of the Trichoderma reesei beta-1,4-xylanase gene (xyn2) and the beta-1,4-endoglucanase gene (egl) in *Aspergillus niger* in molasses and defined glucose media. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58** (4): 461~468

6 Zhang HL, Yao B, Wang YR. **Expression of xylanase gene xynA from** *Streptomyces olivaceoviridis* A in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Chin J Biotechnol*, 2003, **19** (1): 76~80

7 Tang HM (汤海妹), Zeng FY (曾凡亚), Zhang YZ (张义正). Cloning and characterization of genes encoding xylanase from *Bacillus* sp. BT-7. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5** (1): 60~63

8 Liu XM (刘相梅), Qi M (祁蒙), Wu ZH (吴志红), Lin JQ (林建强), Qu YB (曲音波). Study on alkali-tolerant xylanase genefrom *Bacillus pumilus* A230. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, **7** (1): 61~65

9 Sun JY (孙建义), Li WF (李卫芬), Gu SH (顾赛红), Xu ZR (许梓荣). Cloning and sequence analysis of xylanase and β-1,3-1,4-glucanase cDNA fragments from *Aspergillus niger* FS6. *J Zhejiang Univ* (浙江大学学报), 2001, **27** (3): 352~354

10 Yi XL, Shi Y, Xu H, Li W, Xie J, Yu RQ, Zhu J, Cao Y, Qiao DR . Hyperexpression of two *Aspergillus niger* genes in *Escherichia coli* and characterization of the gene products. *Brazilian J Microbiol*, 2010, **41**: 778~786

11 Zhang HL, Yao B, Wang YR. **Expression of xylanase gene xynA from** *Stretomyces olivaceoviridis* A1 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* . *Chin Biotechnol*, 2003, **19** (1): 76~80

12 Ghose TK. Measurement of cellulose activities. *Pure & Appl Chem*, 1987, **59** (2): 257~268

13 Braford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **31**: 426~428

14 Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology*, 1994, **12** (2): 181~184

15 Yi SX (易绍萱), Wu J (吴军), Jiang Q (姜庆),Wang XH (王锡华), Li Y (李彦), Liu ZG (刘志刚), Zhang N (张宁), Xiao GX (肖光夏). **Cloning** of extracellular region of human CTLA-4 and construction of Ig fusion protein expression vector. *Acta Acad Med Militaris Tertiae* (第三军医大学学报), 2000, **22** (9): 834~837

16 Ruanglek V, Sriprang R. **Cloning, expression,characterization, and** high cell-density production of recombinant endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme & Microb Technol*, 2007, **41**: 19~25

17 He YZ (何永志), Yao B (姚斌), Wang YR (王亚茹), Yuan TZ (袁铁铮), Luo HY (罗会颖). Overexpression of *Streptomyces olivaceoviridis* A1 xylanase with high specific activity and analysis of enzymic properties. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2004, **44** (3): 340~344

18 Fang LY (方洛云), Zou XT (邹晓庭), Xu ZR (许梓荣). Molecular biology and gene engineering on xylanase gene *China Feed* (中国饲料), 2002 (7): 970