

DOI: 10.11686/cyxb2016220

http://cyxb.lzu.edu.cn

王艳, 马亚茹, 万学瑞, 王川, 吴润, 刘桂林, 刘原子, 吴自祥. 多粘类芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglB* 和 *bgl* 基因在大肠杆菌中的表达. 草业学报, 2017, 26(5): 189-196.

WANG Yan, MA Ya-Ru, WAN Xue-Rui, WANG Chuan, WU Run, LIU Gui-Lin, LIU Yuan-Zi, WU Zi-Xiang. Expression of β -glucosidase genes *bglA*, *bglB*, and *bgl* from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(5): 189-196.

多粘类芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglB* 和 *bgl* 基因在大肠杆菌中的表达

王艳, 马亚茹, 万学瑞, 王川*, 吴润*, 刘桂林, 刘原子, 吴自祥

(甘肃农业大学动物医学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为了有效地提高 β -葡萄糖苷酶的活性, 本实验将多粘类芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglB* 和 *bgl* (*bglA* 和 *bglB* 基因) 基因分别连接在 pET-28a 上并在大肠杆菌 C41 中表达。将这 3 株重组菌分别命名为 EA、EB 及共表达菌株 EAB, 并将构建好的工程菌 EA 和 EB 按 1:1, 1:2, 2:1 进行混合培养, 分别比较单一酶组分、共表达及混合表达菌株的酶活。SDS-PAGE 电泳图显示 BglA 和 BglB 的大小都为 50 ku, EA 和 EB 混合培养的蛋白大小也为 50 ku, Bgl 大小为 100 ku, 表明 BglA 和 BglB 在体外不能形成蛋白复合物, 只有在生物体内才能形成 Bgl 复合蛋白。酶活测定结果表明共表达 Bgl 与多粘类芽孢杆菌的酶活差异不显著, 但显著高于其他组分酶活 ($P < 0.05$)。刚果红染色结果也表明 Bgl 酶活比单一酶组分的酶活明显提高。本实验为纤维素酶多组分人工组装及集成生物工艺菌种的构建奠定实验基础。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 多粘类芽孢杆菌; 克隆和表达; 共表达; 酶活

Expression of β -glucosidase genes *bglA*, *bglB*, and *bgl* from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*

WANG Yan, MA Ya-Ru, WAN Xue-Rui, WANG Chuan*, WU Run*, LIU Gui-Lin, LIU Yuan-Zi, WU Zi-Xiang
College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: To improve the enzyme activity of β -glucosidase, two β -glucosidase genes from *Bacillus polymyxa* were introduced separately (*bglA* and *bglB*) and together (*bgl*) into the pET-28a vector and expressed in *Escherichia coli* C41. The three recombinant strains were designated as EA, EB, and co-expression EAB. Strains EA and EB were mixed at ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 and their total β -glucosidase activity was compared with those of each single enzyme group, the co-expression strain, and mixed expression strains. The results of SDS-PAGE analyses showed that both BglA and BglB were 50 ku, and the size of these proteins in the EA and EB mixed cultures was also 50 ku. The size of Bgl in the co-expression strain EAB was 100 ku. These results indicated that a Bgl complex was able to form in cells, but not *in vitro*. In an enzyme activity assay, the activity of Bgl from the co-expression strain was not significantly different from that of *bgl* in *B. polymyxa*, but it was significantly higher than those of BglA in EA and BglB in EB ($P < 0.05$). The results of Congo red staining also showed that the enzyme activity of Bgl was significantly higher than those of BglA and BglB. This

收稿日期: 2016-05-27; 改回日期: 2016-07-06

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目(1204NKCA103)和国家自然科学基金青年项目(31500067)资助。

作者简介: 王艳(1991-), 女, 甘肃嘉峪关人, 在读硕士。E-mail: 409193838@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: wurun@gsau.edu.cn, wclwhy@163.com

study lays the foundation for the construction of artificial assemblies, and for the integration of biological technologies in cellulose processing.

Key words: β -glucosidase; *Bacillus polymyxa*; clone and expression; coexpression; enzyme activity

纤维素是植物材料的主要成分,植物通过光合作用的形式使光能以生物能的形式固定下来,其生成量每年高达 2000 亿 t,其中 50%以上为纤维素和半纤维素,这些能量相当于全球人类每年能源消耗量的 20 倍,食物中所含能量的 200 倍,是永远不会枯竭的可再生资源^[1]。但由于纤维素具有水不溶性的高结晶构造,其外围又被木质素层包围,要把它水解成可利用的葡萄糖相当困难,所以到目前为止纤维素仍没有得到很好地应用^[2]。纤维素的降解包括物理法、化学法和生物降解法,其中生物降解法因具有条件温和、成本低廉而且对环境无污染的特点备受关注。

β -葡萄糖苷酶,又称 β -D-葡萄糖苷水解酶,属于糖苷水解酶家族 3,能将各种寡糖及纤维二糖降解为葡萄糖,是纤维素水解糖化过程中的限速步骤。它不仅能够水解纤维二糖产生两分子的葡萄糖,更可解除纤维二糖对内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的抑制,提高水解速率和程度。但在纤维素酶系中 β -葡萄糖苷酶所占比例不足 1%,这使其成为纤维素降解成单糖的瓶颈^[3]。有报道指出,当增加纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶活性,能有效提高纤维素的酶解效率^[4]。由于不同来源的 β -葡萄糖苷酶活性差异很大,因此获得比活高、产量大、热稳定性好的 β -葡萄糖苷酶一直是研究纤维素酶水解的热点问题。

有研究指出,多粘类芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)所产 β -葡萄糖苷酶对木质纤维素来源的纤维二糖水专一性较高,这对于研究纤维素的酶解机制有重要意义,因而受到国内外学者的高度重视^[5]。*bglA* 和 *bglB* 基因是 β -葡萄糖苷酶 *bgl* 的两个亚基,单个亚基不足以充分发挥水解纤维素的作用或者对纤维素的水解作用相对较弱,因此本研究选择来源于西北特殊地理环境的多粘类芽孢杆菌作为研究材料,并分别克隆表达了 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 及 *bglB* 基因后又将 *bglA* 和 *bglB* 基因进行了共表达。

本研究将 β -葡萄糖苷酶(*bgl*)的两个亚基 *bglA* 和 *bglB* 分别连接到 pET-28a 上,与此同时将 *bglA* 和 *bglB* 连接在 pET-28a 上,将 3 个重组质粒分别在大肠杆菌 C41 中表达,并比较重组菌株的酶活。本研究对提高 β -葡萄糖苷酶的酶活及纤维素的降解具有极大的现实意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α 、C41 及质粒 pBluescript II KS(+),pET-28a 为甘肃农业大学微生物实验室保藏,多粘类芽孢杆菌为本实验室分离所得。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 和 *Sma* I、T₄ DNA Ligase、T₄ 磷酸化酶(PNK)购于 TaKaRa 公司;镍柱购于 GE 公司;IPTG、X-gal、氨苄青霉素、卡那霉素、FastPfu fly DNA Polymerase 购于北京全式金生物技术有限公司;刚果红、水杨苷、CMC-Na 购于国产分析纯;CTAB 购于 OXOID 公司产品;质粒 DNA 小提试剂盒、胶回收试剂盒购于天根生化科技有限公司。

1.1.3 培养基 培养大肠杆菌 DH5 α 、C41 及多粘类芽孢杆菌的培养基为 LB(Luria-Bertani)培养基^[3],LB-微晶纤维素钠培养基用于多粘类芽孢杆菌的诱导,2 \times YT(2 \times Yeast Tryptone)培养基用于重组菌株的诱导,LB-CMC 培养基^[4]用于刚果红试验检测 β -葡萄糖苷酶的水解能力。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 试验材料为多粘类芽孢杆菌,于 2015 年 3 月 14 日在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 进行振荡培养过夜,收集菌体后采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[6]。

1.2.2 重组质粒 pET-28a::*bglA* 和 pET-28a::*bglB* 的构建 重组质粒 pET-28a::*bglA* 和 pET-28a::*bglB* 的构建策略见图 1A 和图 1B。以多粘类芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,*bglA*-F/R 为引物(表 1)进行 PCR 扩增 *bglA* 片段,PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s;64 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 80 s;共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5

min;以多粘类芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,bglB-F/R 为引物(表 1)进行 PCR 扩增 *bglB* 片段,PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s;61 °C 30 s;72 °C 80 s;共 30 个循环;72 °C 延伸 5 min。用胶回收试剂盒分别回收 PCR 产物后,将目的片段与 pET-28a 同时经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切,酶切后的目的片段与 pET-28a 纯化后通过 T₄ DNA Ligase 进行连接,分别得到重组质粒 pET-28a::*bglA* 和 pET-28a::*bglB*。重组质粒经菌液 PCR 和双酶切验证(*Bam*H I 和 *Xho* I)正确后,送往金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.3 共表达重组质粒 pET-28a::*bgl*(pET-28a::*bglA*::*bglB*)的构建 共表达重组质粒 pET-28a::*bgl*(pET-28a::*bglA*::*bglB*)的构建策略见图 1C。首先将引物 *bglA*-R1 和 *bglB*-F1 磷酸化,然后以多粘类芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,bglA-F/R1 为引物进行 PCR 扩增 *bglA* 片段,PCR 反应条件同上;以多粘类芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,bglB-F1/R 为引物进行 PCR 扩增 *bglB* 片段,PCR 反应条件同上。用胶回收试剂盒分别回收 *bglA* 和 *bglB* 片段,用 *Bam*H I 酶切 *bglA* 片段,*Xho* I 酶切 *bglB* 片段,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切 pBluescript II KS(+),将酶切后的 *bglA*、*bglB* 与 pBluescript II KS(+)纯化后通过 T₄ DNA Ligase 连接得到重组质粒 pBluescript II KS(+>::*bgl*。重组质粒通过 *Sma* I 和 *Bam*H I 双酶切验证正确后,将重组质粒 pBluescript II KS(+>::*bgl* 与 pET-28a 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行酶切,酶切产物纯化后用 T₄ DNA Ligase 进行连接得到重组质粒 pET-28a::*bgl*。经菌液 PCR 和双酶切验证(*Bam*H I 和 *Xho* I)正确后,送往金唯智生物科技有限公司测序。

表 1 β-葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因扩增引物

Table 1 Primers of β-glucosidase gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>bglA</i> -F	CGCGGATCCATGACTATTTTTCAATTTCCGC (<i>Bam</i> H I)
<i>bglA</i> -R	CGCCTCGAGTCATTTCTCTTTGTTTAGCGTC (<i>Xho</i> I)
<i>bglB</i> -F	CGCGGATCCATGAGCGAGAATACCTTTATATTTC (<i>Bam</i> H I)
<i>bglB</i> -R	CGCCTCGAGCCCTTTTCTATTTAAAACCCG (<i>Xho</i> I)
<i>bglA</i> -R1	TCATTTCTCTTTGTTTAGCGTC
<i>bglB</i> -F1	AAGAAGGAGATATACATATGAGCGAGAATACCTTTATATTTC (RBS)

1.2.4 重组质粒的转化及培养 将测序正确的重组质粒 pET-28a::*bglA*、pET-28a::*bglB* 及 pET-28a::*bgl* 转化至大肠杆菌 C41 感受态细胞中,在含有卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 固体培养基上 37 °C 过夜培养后,筛选阳性克隆^[7]。

1.2.5 β-葡萄糖苷酶的诱导表达 将筛选出的重组菌菌落接种到 3 mL 含卡那霉素的 LB 中,37 °C 220 r/min 过夜培养,按 1:100 加入到 100 mL 2×YT 培养基中,37 °C 培养 2.5 h,加入 IPTG 到终浓度 1 mmol/L,28 °C 低温诱导 14 h。将菌液用 Loading buffer 洗涤两次后,超声破碎细胞:功率 292.5 W,每超声 5 s 间隔 5 s,至菌液澄清后 4 °C 8000 r/min 离心 30 min 收集上清液,用 GE 公司的 Ni-NTA 柱进行蛋白纯化^[8]。以诱导前的重组菌株为对照进行 SDS-PAGE 电泳^[9],分析重组蛋白表达情况。

1.2.6 重组 β-葡萄糖苷酶的定量分析和酶活力的测定 通过 BCA 试剂盒绘制 562 nm 下的蛋白浓度标准曲线,并测定样品的 OD_{562 nm} 值,通过标准曲线,计算样品的总蛋白浓度。

通过 DNS 法测定 β-葡萄糖苷酶酶活^[10-11]。酶活定义:每分钟内分解底物生成 1 μg 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活单位,以 U/mL 表示。试验组取 0.5 mL 粗酶液(BglA 为 110 mg 蛋白)与 1 mL 1%水杨苷柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L,pH 4.8),于 50 °C 保温 60 min 后,加入 1.5 mL DNS 煮沸 10 min,定容至 25 mL,测定 OD_{540 nm}。同时取粗酶液煮沸灭活测 OD_{540 nm} 作为对照组,平行试验重复 3 次,样品酶活值为试验组酶活值与对照组酶活值之差,并使用 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences, version 13.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)软件进行显著性差异分析。

通过 LB-CMC 培养基进行刚果红染色,并根据水解圈的大小判断 β -葡萄糖苷酶的水解活性^[12]。

2 结果与分析

2.1 *bglA* 和 *bglB* 克隆与表达载体的构建

通过 PCR 方法克隆得到了多粘类芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglB* 基因,测序结果表明 *bglA* 和 *bglB* 大小分别为 1361 和 1358 bp,所得 *bglA* 基因序列与多粘类芽孢杆菌的 *bglA* 基因(GenBank 登录号 M60210.1)序列比对同源率为 99%,*bglB* 基因序列与多粘类芽孢杆菌的 *bglB* 基因(GenBank 登录号 M60211.1)序列比对同源率为 99%。将 *bglA*、*bglB* 分别连接 pET-28a,转化大肠杆菌 DH5 α ,构建的重组质粒 pET-28a::*bglA* 和 pET-28a::*bglB* 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切验证无误后分别转化大肠杆菌 C41,质粒双酶切验证图谱如图 1D,该结果说明重组质粒 pET-28a::*bglA* 和 pET-28a::*bglB* 已成功转入大肠杆菌 C41 中。将得到的大肠杆菌重组菌株分别命名为 EA(pET-28a::*bglA*)和 EB(pET-28a::*bglB*)。

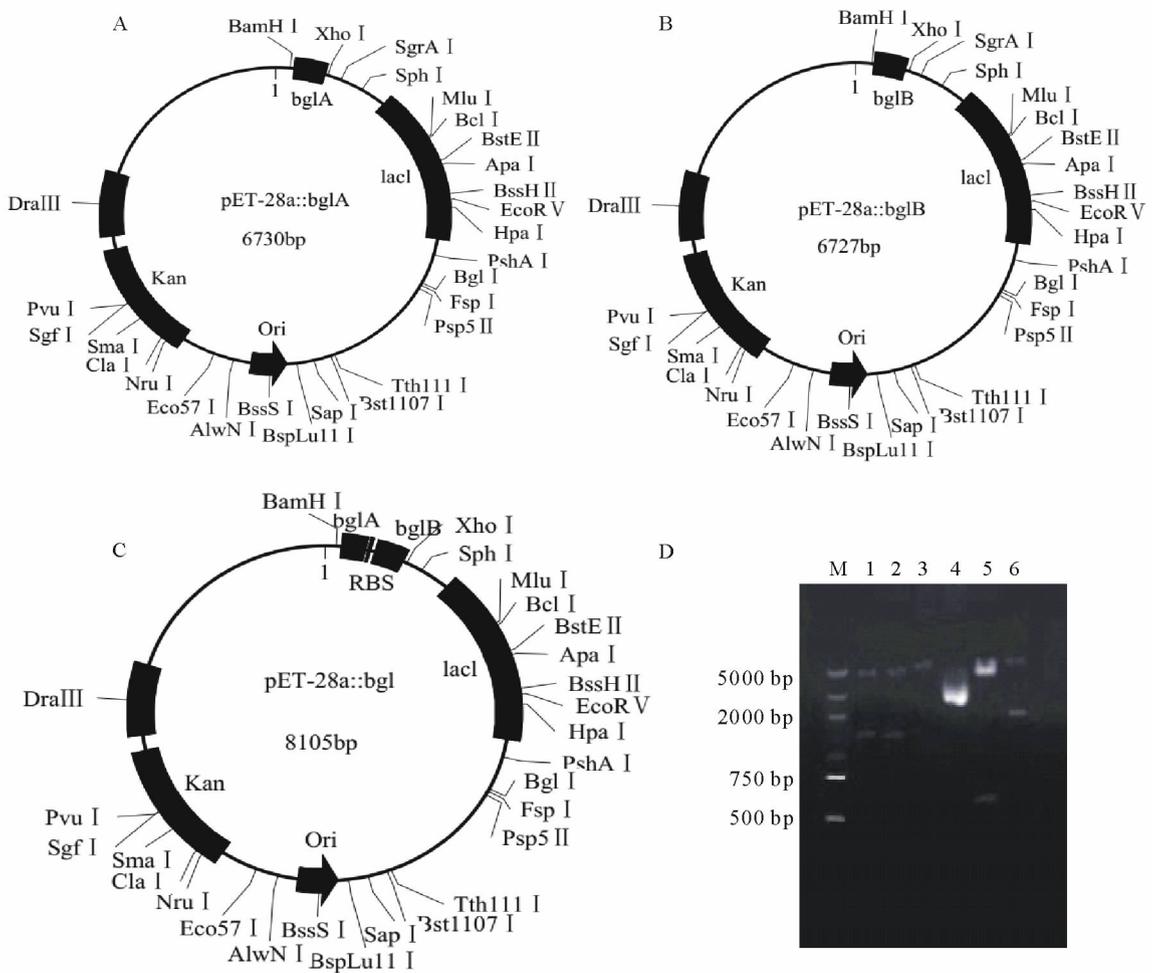


图 1 重组质粒图谱及 β -葡萄糖苷酶基因的双酶切验证

Fig. 1 Plasmids map and β -glucosidase gene recombinant plasmid digested from *Bacillus polymyxa*

A:pET-28a::*bglA* 重组质粒图谱 Plasmid map of pET-28a::*bglA*; B:pET-28a::*bglB* 重组质粒图谱 Plasmid map of pET-28a::*bglB*; C:pET-28a::*bgl* 重组质粒图谱 Plasmid map of pET-28a::*bgl*; D: β -葡萄糖苷酶基因的双酶切验证 β -glucosidase gene recombinant plasmid digested; M: DNA marker; 1:pET-28a::*bglA* 重组质粒双酶切(*Bam*H I 和 *Xho* I) pET-28a::*bglA* digested by *Bam*H I and *Xho* I; 2:pET-28a::*bglB* 重组质粒双酶切(*Bam*H I 和 *Xho* I) pET-28a::*bglB* digested by *Bam*H I and *Xho* I; 3:pET-28a; 4:pBluescript II KS(+); 5:pBluescript II KS(+); *bgl* 重组质粒双酶切(*Sma* I 和 *Bam*H I) pBluescript II KS(+); *bgl* digested by *Sma* I and *Bam*H I; 6:pET-28a::*bgl* 重组质粒双酶切(*Bam*H I 和 *Xho* I) pET-28a::*bgl* digested by *Bam*H I and *Xho* I.

2.2 *bgl* 克隆与表达载体的构建

利用 PCR 获得 *bglA*、*bglB* 基因片段,酶切连接到 pBluescript II KS(+) 获得重组质粒 pBluescript II KS(+)::*bgl*,通过 *Sma* I 和 *Bam* H I 酶切验证无误后(图 1D),将 *bgl* 基因从 pBluescript II KS(+)::*bgl* 上切下连接 pET-28a,获得重组质粒 pET-28a::*bgl*,通过 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切验证无误后(图 1D)转化大肠杆菌 C41,挑选阳性重组子提取质粒,DNA 测序后证明所得片段正确,说明共表达重组质粒 pET-28a::*bgl* 已成功转入大肠杆菌 C41 中。将得到的大肠杆菌共表达重组菌株命名为 EAB(pET-28a::*bgl*)。

2.3 BglA、BglB 及 Bgl 的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳

将 EA、EB、EAB、EA 与 EB 等体积混合的重组菌株经 IPTG 诱导,超声破碎后进行纯化,得到蛋白 BglA、BglB、BglA 与 BglB 等体积混合蛋白及 Bgl,并进行 SDS-PAGE 电泳检测。SDS-PAGE 分析表明(图 2),诱导前无特异条带,诱导后出现特异条带,纯化后条带单一。诱导后的 BglA、BglB、BglA 与 BglB 等体积混合的蛋白在 50 ku 处有明显的蛋白表达带,与文献中报道的多粘类芽孢杆菌所产 β -葡萄糖苷酶分子量为 50 ku 相符^[13],诱导后的 Bgl 蛋白在 100 ku 处出现明显的蛋白表达带。根据蛋白大小可知,BglA 与 BglB 等体积混合蛋白并没有形成完整的复合蛋白,还是以两个相等大小的单体存在,而诱导后的共表达蛋白 Bgl 在生物体内形成了一个完整的蛋白复合体。

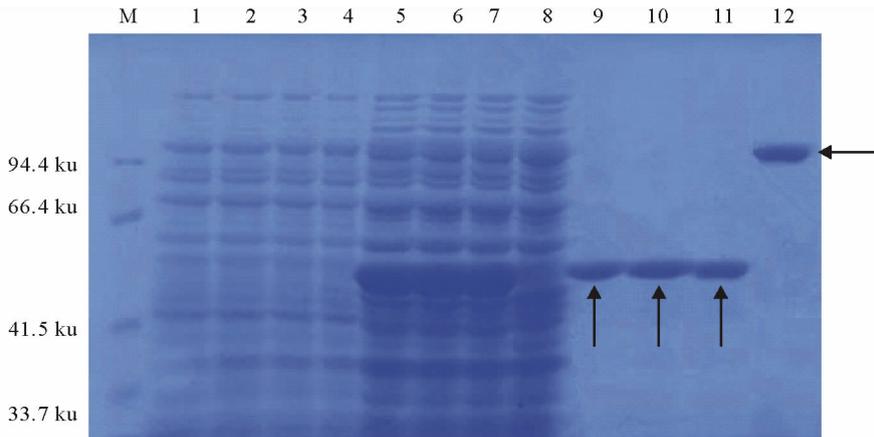


图 2 SDS-PAGE 电泳

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis

M:蛋白 Marker Protein marker;1:EA 诱导前 EA before induction;2:EB 诱导前 EB before induction;3:EA 和 EB 混合表达诱导前 EA and EB cultivation by mixed proportion 1 : 1 before induction;4:EAB 诱导前 EAB before induction; 5:EA 诱导后 EA after induction; 6:EB 诱导后 EB after induction; 7:EA 和 EB 混合表达诱导后 EA and EB cultivation by mixed proportion 1 : 1 after induction; 8:EAB 诱导后 EAB after induction; 9:EA 纯化后 EA after purification;10:EB 纯化后 EB after purification;11:EA 和 EB 混合表达纯化后 EA and EB cultivation by mixed proportion 1 : 1 after purification;12:EAB 纯化后 EAB after purification. EA: *bglA* 基因连接 pET-28a 后转入 C41 感受态细胞的重组菌株 Recombination strains of *bglA* was linked with pET-28a and expressed in *Escherichia coli* C41;EB: *bglB* 基因连接 pET-28a 后转入 C41 感受态细胞的重组菌株 Recombination strains of *bglB* was linked with pET-28a and expressed in *Escherichia coli* C41;EAB: *bglA*、*bglB* 基因连接 pET-28a 后转入 C41 感受态细胞的重组菌株 Recombination strains of *bglA*、*bglB* was linked with pET-28a and expressed in *Escherichia coli* C41. 下同 The same below.

2.4 DNS 法测定重组 β -葡萄糖苷酶酶活

用 DNS 法测定重组 β -葡萄糖苷酶酶活见表 2。通过 SPSS 软件分别比较 Bgl 与多粘类芽孢杆菌、BglA、BglB、EA 和 EB(1 : 1)、EA 和 EB(1 : 2)及 EA 和 EB(2 : 1)的酶活值。结果显示,Bgl 与多粘类芽孢杆菌的酶活值差异不显著($P > 0.05$),但显著高于 BglA、BglB、EA 和 EB(1 : 1)、EA 和 EB(1 : 2)及 EA 和 EB(2 : 1)的酶活值($P < 0.05$),是由于 Bgl 的 *bglA* 和 *bglB* 两个亚基形成了完整的复合蛋白,因此酶活值大大提高;而 EA 和 EB 混合表达的酶活值与单个表达的酶活值差异不显著,是由于 EA 和 EB 混合培养时 *bglA* 和 *bglB* 两个亚基没有形成完整的复合蛋白。

表 2 DNS 法测定酶活值

Table 2 DNS method for the determination of enzyme activity

U/mL

样品 Sample	对照组酶活 Control group activity	试验组酶活 Enzyme activities in the test group	酶活值 Enzyme activities
<i>Bacillus polymyxa</i>	1.052±0.188	5.186±0.371	4.134±0.216*
BglA	0.197±0.035	1.468±0.140	1.271±0.125#
BglB	0.169±0.050	1.193±0.199	1.024±0.173#
Bgl	0.188±0.078	4.113±0.239	3.925±0.262*
EA+EB(1:1)	0.165±0.054	1.264±0.090	1.099±0.144#
EA+EB(1:2)	0.174±0.033	1.378±0.498	1.204±0.466#
EA+EB(2:1)	0.183±0.017	1.281±0.411	1.098±0.426#

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), # 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: * means significant difference ($P < 0.05$). # means no significant difference ($P > 0.05$).

2.5 刚果红染色

将样品按顺序加入 CMC-Na 的 LB 平板孔中, 37 °C 过夜培养, 经刚果红染色、NaCl 溶液脱色后出现水解圈, 根据水解圈直径的大小即可判断水解活性的强弱。结果显示(图 3), EA 上清、EB 上清、EAB 上清、EA 和 EB(1:1)混合表达上清没有出现水解圈, 说明在上清中不存在蛋白, 不能将蛋白分泌到细胞外。超声破碎后样品的水解圈大于纯化后蛋白样品的水解圈, 是因为破碎后蛋白含有许多杂蛋白, 而纯化后的蛋白只含有单一的蛋白条带, 因此形成的水解圈更小。将 BglA 和 BglB 按 1:1, 2:1, 1:2 混合后形成的水解圈, 差别并不明显, 但将共表达蛋白 Bgl 加入到平板孔中, 发现所产生的水解圈大于混合表达及单一酶组分所产生的水解圈, 说明共表达 β -葡萄糖苷酶 Bgl 的水解活性最强。

3 讨论

β -葡萄糖苷酶作为纤维素降解过程中的一个重要酶组分, 在医疗、食品、生物质转化等领域具有重要的应用价值, 特别是随着近年来环境能源等危机的加重, 纤维素作为自然界最广泛的碳源受到了各国政府的高度重视。本试验采用多粘类芽孢杆菌为试验材料, 克隆表达了 β -葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglB* 及 *bgl* 基因, 希望能够解决 β -葡萄糖苷酶酶活低的问题。

本实验先后将 β -葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglB* 和 *bgl* 分别连接 pET-28a, 并在大肠杆菌 C41 中实现了表达, 实验表明 BglA、BglB 和 Bgl 3 个蛋白都为可溶性的蛋白。将重组菌株 EA、EB、EA 和 EB(1:1)混合表达后进行 SDS-PAGE 实验的蛋白条带差别不大, 都在 50 ku(BglA 蛋白大小)的位置上有蛋白条带, 可能是 EA 和 EB(1:1)混合表达在体外不能形成完整的复合蛋白。

目前, 纤维素酶活力的测定方法缺乏一个统一标准, 所用的方法与底物各有不同, 测得的酶活差异较大, 因此



图 3 刚果红染色水解圈

Fig. 3 Congo red stain hydrolysis circle

1:EA 上清 EA supernatant; 2:EB 上清 EB supernatant; 3:EA 和 EB(1:1)混合上清 EA and EB 1:1 supernatant; 4:共表达上清 EAB supernatant; 5:EA 纯化后蛋白 EA protein after purification; 6:EB 纯化后蛋白 EB protein after purification; 7:EA 和 EB(1:1)混合表达纯化后蛋白 EA and EB 1:1 protein after purification; 8:EA 破碎后 EA after breaking; 9:EB 破碎后 EB after breaking; 10:EA 和 EB(1:1)混合表达破碎后 EA and EB 1:1 after breaking; 11:共表达破碎后 EAB after breaking; 12:共表达纯化后蛋白 EAB protein after purification; 13:BglA 和 BglB(1:1) BglA and BglB 1:1; 14:多粘类芽孢杆菌 *B. polymyxa*; 15:BglA 和 BglB(2:1) BglA and BglB 2:1; 16:BglA 和 BglB(1:2) BglA and BglB 1:2.

不具有可比性^[14]。赵云等^[15]从多粘类芽孢杆菌(*B. polymyxa* 1.794)中克隆得到 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA*, 将其构建在 pET-28a 上, 转化大肠杆菌 BL21, 通过 β -对硝基酚葡萄糖苷(β -pNPG)为底物测定酶活, 重组 β -葡萄糖苷酶的酶活为 24.7 IU/mL。胡开蕾等^[16]从嗜热脱氮土壤芽孢杆菌中克隆得到 *bglB* 基因, 将该基因连接到 pGEX-2TL 上并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达, 通过 β -pNPG 为底物测定酶活, 在最适反应条件下该酶比活力为 0.043 IU/mg。为了更方便的比较酶活, 本实验使用国内较便宜的水杨苷(salicin)作底物, 也能准确地反映 β -葡萄糖苷酶的活力^[17]。BglA 与 BglB 单一酶组分用 DNS 法比较酶活时, BglA 的酶活值比 BglB 的大, Gonzalez 等^[13]研究表明来自多粘类芽孢杆菌的 *bglA* 基因编码的 β -葡萄糖苷酶相比 *bglB* 基因对纤维二糖底物的水解作用更强。将 EA、EB 诱导产生的蛋白纯化后, 其酶活值较低, 且水解圈也不明显, 究其原因可能是在 IPTG 诱导时蛋白合成速度较快, 空间折叠不充分而影响其活性, 也可能是与大肠杆菌 C41 胞内成分发生了协同作用, 研究表明错误折叠的重组蛋白与其正确折叠的蛋白相比, 其酶活显著下降^[18]。而影响其酶活最主要的原因是 BglA 和 BglB 没有形成复合蛋白, 试验表明, 当 BglA 和 BglB 形成完整的复合蛋白后才能更好地发挥水解活性。目前大部分研究是将 β -葡萄糖苷酶和其他的酶进行共表达, 王远等^[19]将 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 和 *bglB* 分别与内切葡聚糖酶基因 *celA* 在枯草芽孢杆菌 WB800 中共表达, 共表达重组菌 WB800(pP43JM2-*celA**bglA*)的胞内酶液与纤维二糖底物作用释放出 317.4 mg/L 的葡萄糖, 其胞外酶液和纤维二糖底物反应释放出 24 mg/L 的葡萄糖; 唐自钟等^[20]将 β -葡萄糖苷酶基因和内切葡聚糖苷酶基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中共表达, 酶活力可达 1196.8 U/mL。

4 结论

本研究将 β -葡萄糖苷酶两个亚基 *bglA* 和 *bglB* 在大肠杆菌 C41 中共表达后, 其酶活比单一酶组分及混合表达的酶活提高了 4 倍, 与原始菌株酶活差别不显著, 这一研究结果对纤维素降解及基因的共表达提供了实验材料。

参考文献 References:

- [1] Xiong L G, Chai S M, Li W. Research progress of cellulase and its application. Jiangxi Feed, 2008, (4): 23-27.
熊立根, 柴士名, 李旺. 纤维素酶及其应用研究进展. 江西饲料, 2008, (4): 23-27.
- [2] Wang W Y, Zhu J H, Wu S Y. Research progress of cellulose science and cellulose. Journal of Jiangsu University of Science and Technology, 1998, (3): 20-28.
汪维云, 朱金华, 吴守一. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展. 江苏理工大学学报, 1998, (3): 20-28.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Hu S, Wang W, Zhan F Q, et al. Screening and identification of a strain producing cellulase. Biotechnology, 2008, (5): 36-38.
胡爽, 王炜, 詹发强, 等. 一株产纤维素酶细菌的筛选鉴定. 生物技术, 2008, (5): 36-38.
- [5] Shewale J G. β -Glucosidase: Its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. International Journal of Biochemistry, 1982, 14(6): 435-443.
- [6] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria[M]//Ausubel F M, Bent R. Current Protocols in Molecular Biology. New York(NY): John Wiley & Sons, 1987.
- [7] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Guo H, Feng Y, Mo X C, et al. Cloning, expression and characterization of EG gene *umcel3G* from the rumen of Buffalo. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, (2): 232-238.
郭鸿, 封毅, 莫新春, 等. 水牛瘤胃宏基因组的一个新的 β -葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 的克隆、表达及其表达产物的酶学特性. 生物工程学报, 2008, (2): 232-238.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [10] Cui Y, Chen H M, Shang H L, et al. Screening of neutral cellulase producing strain and optimization of its culture medium and characterization of the enzyme. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2006, (2): 214-217.

- 崔琰, 陈红漫, 尚宏丽, 等. 中性纤维素酶产生菌的筛选及其培养基的优化和酶学性质研究. 浙江农业科学, 2006, (2): 214-217.
- [11] Ding K, Luo W G, Ding P P, *et al.* Fused secretory expression of double cellulase gene in *Lactic acid bacteria*. Food Science, 2014, (15): 127-131.
丁轲, 罗伟光, 丁盼盼, 等. 双纤维素酶基因在乳酸杆菌中的融合分泌表达. 食品科学, 2014, (15): 127-131.
- [12] Yang P X, Zheng R D, Luo J F, *et al.* Screening and identification of 1 strains of cellulase producing fungi and optimization of enzyme production conditions. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2015, (1): 186-191.
杨培新, 郑锐东, 罗集丰, 等. 1株产纤维素酶真菌的筛选鉴定及其产酶条件优化. 江苏农业学报, 2015, (1): 186-191.
- [13] Gonzalez Candelas L, Aristoy M C, Polania J. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(12): 3173-3177.
- [14] Hao S O, Cho H Y, Yukawa H. Regulation of expression of cellulosomes an noncellulosomal (hemi) cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. Journal of Bacteriology, 2004, 186: 4218-4227.
- [15] Zhao Y, Liu W F, Mao A J, *et al.* Expression, purification and characterization of *Bacillus polymyxa* BG gene in *Escherichia coli*. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, (5): 741-744.
赵云, 刘伟丰, 毛爱军, 等. 多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析. 生物工程学报, 2004, (5): 741-744.
- [16] Hu K L, Han J, Liu W F, *et al.* Cloning and recombinant expression and characterization of recombinant protein from *Bacillus* sp. Microbiology, 2012, (7): 891-900.
胡开蕾, 韩剑, 刘伟丰, 等. 嗜热脱氮土壤芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶的克隆与重组表达及其酶学性质研究. 微生物学通报, 2012, (7): 891-900.
- [17] Li X H, Zhu M J, Guo Q J. Establishment of a method for measuring the activity of β -glucosidase in crude cellulose. Modern Food Science and Technology, 2010, 26: 323-325.
李旭辉, 朱明军, 郭启军. 一种测定粗纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶酶活方法的建立. 现代食品科技, 2010, 26: 323-325.
- [18] Chang J J, Ho C Y, Ho F J, *et al.* A synthetic biology tool for engineering a cellulolytic yeast. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5: 53.
- [19] Wang Y, Gao Q Q, Xin X J, *et al.* The expression of *beta-glucosidase* gene and *endo-glucanase* gene in *Bacillus polymyxa*. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, (6): 990-996.
王远, 高秋强, 辛秀娟, 等. β -葡萄糖苷酶基因和内切葡聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达. 应用与环境生物学报, 2013, (6): 990-996.
- [20] Tang Z Z, Liu S, Han X Y, *et al.* Co-expression of recombinant *beta-glucosidase* gene and *endo-glucanase* gene in *Escherichia coli*. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 189-194.
唐自钟, 刘姗, 韩学易, 等. 重组 β -葡萄糖苷酶基因和内切葡聚糖苷酶基因在大肠杆菌中的共表达. 食品工业科技, 2013, 34(24): 189-194.