

纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C 的构建与表达

陈玲玲, 徐进平* (武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

摘要 [目的]设计和构建一种由 β -糖苷水解酶 Gluc1C 和多功能纤维素酶 EGX 融合而成的纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C。[方法]首先构建了嵌合体的质粒, 采用 GST 标准纯化方法, 分别获得重组蛋白 Gluc1C、EGX、纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C, 并且制备了抗 Gluc1C 的血清。[结果]通过 GST 纯化的 3 个蛋白纯度达 90%, 可以进行后续的酶活检测; 通过 Western blot 验证, 发现抗 Gluc1C 的血清效价很高(稀释比例达 1:5 000)。[结论]该研究可为纤维素酶的工业化应用提供一定理论依据。

关键词 纤维素酶; EGX; Gluc1C; 抗体; 纤维素酶嵌合体

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)01-0102-03

Construction and Expression of the Chimera Cellulase EGX - Gluc1C

CHEN Ling-ling, XU Jin-ping (State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072)

Abstract [Objective] To design and construct chimera cellulase EGX-Gluc1C originated from the fusion of β -glucosidase Gluc1C and a cellulase EGX. [Method] First, we generated the plasmid inserting chimera cellulase. Then, we purified the recombinant Gluc1C, EGX and EGX-Gluc1C according to the standard GST purification manual. We also generated the anti-Gluc1C serum from the rabbit. [Result] The coomassie staining results demonstrated that the purity of these proteins was 90%, which was sufficient for enzyme catalytic assay. Through verification of western blot, the anti-Gluc1C serum produced from rabbit was of high quality and the dilution ratio can be 1:5 000. [Conclusion] The study provided a theoretical basis for the industrial application of cellulase.

Key words Cellulase; EGX; Gluc1C; Antibody; Chimera cellulase

纤维素是陆地环境中最主要的光合作用产物, 也是地球上最丰富的可再生生物资源, 每年纤维素的产量为 1 000 亿 t 左右。纤维素降解无论是在农业生产还是废物处理的过程中, 都显得十分重要, 因为纤维素处理好就能够得到大量可再生生物资源, 处理不好将成为难以降解的生物垃圾^[1-3]。纤维素降解需要多种纤维素酶协同作用, 如果能够使用一个表达系统同时表达纯化 2 种甚至多种纤维素酶, 则可以降低工业生产中酶的经济投入^[4-5]。EGX 是从福寿螺中分离得到的一种多功能纤维素酶, Gluc1C 是从棉铃虫肠道菌中分离得到的一种高效的 β -糖苷水解酶, 由 448 个氨基酸组成, 含糖苷水解酶 GH superfamily 1 结构域^[6]。笔者将 EGX 和 Gluc1C 的基因构建在同一个表达质粒上, 并表达出有生物活性的纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C, 以期能为纤维素酶的工业化应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒。试验所用的菌株包括 *E. coli* TOP10、*E. coli* RIL (DE3), 质粒 pGEX - 6p - 1、pET22b - Gluc1C 和 pET32a - EGX。

1.1.2 生化试剂。DNA *Taq* 酶(康为公司)、KOD Plus Neo 聚合酶(TOYOBO)、限制性内切酶(TOYOBO)、*T₄* DNA 连接酶(Thermo Scientific)、胶回收试剂盒(康为公司)、PCR 回收试剂盒(康为公司)、Tiangen 质粒小提试剂盒、GST resin(Q - Smart 公司)。

1.1.3 引物及核苷酸序列。试验采用的引物用 DNAMAN 软件设计, 引物合成由武汉天一辉远公司完成, 引物名称及序

列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequence

编号 No.	引物名称 Primer name	引物序列 (5'—3') Primer sequence(5'—3')
1	<i>Bam</i> H I - Gluc1C - F	CGCGGATCCATGACGGAGAATAC-CITTTATAT
2	<i>Xho</i> I - Gluc1C - R	ATAGTTTACTCGAGCTAAAAC-CCGTTCTTCGCCATC
3	<i>Eco</i> R I - Gluc1C - F	CGGAATTCATGAGCGAGAATAC-CITTTATAT
4	<i>Bam</i> H I - EGX - F	CCTGGATCCATGCCCTCTGGT-GCTGCTG
5	<i>Xho</i> I - EGX - R	CCGCTCGAGCTAGCTAACATTA-ATGTTGACGG CGGAATTCGAGCCACGCCAC- CACCAGCCACGCCACCCAC-
6	<i>Eco</i> R I - EGX - R	CCGAGCCACGCCACCCAC- CTAGCTAACATTAATGTTG

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建。以实验室已有的 pET22b - Gluc1C 和 pET32a - EGX 作为模板构建 EGX - Gluc1C 嵌合体。

1.2.2 重组工程菌的制备。将质粒 pGEX - 6p - 1 - EGX - Gluc1C 转化大肠杆菌 BL 21(DE3)感受态细胞, 得到的阳性克隆经 PCR 鉴定为阳性的菌落即为能表达嵌合体纤维素酶 EGX - Gluc1C 的大肠杆菌重组基因工程菌 RIL pGEX - 6p - 1 - EGX - Gluc1C。

1.2.3 重组蛋白的纯化。按照标准 GST 树脂结合标签蛋白的方法纯化目的蛋白。蛋白的表达和纯化通过 SDS - PAGE 以及考马斯亮蓝染色检测。

1.2.4 Gluc1C 抗体的制备。将纯化的纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C 包涵体经过 SDS - PAGE 后, 切割包含目的条带的胶条, 作为抗原, 辅以佐剂 Freund's Adjuvant Incomplete 注射进入新西兰大白兔体内, 总蛋白量为 2 mg, 每隔 14 d 免

作者简介 陈玲玲(1988—), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事微生物学与基因工程药物研究。

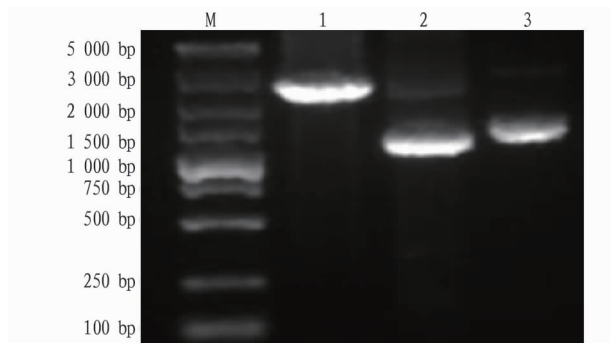
收稿日期 2017-10-30

疫 1 次,共 3 次,制备抗 Gluc1C 的免疫血清。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pGEX - 6P - 1 - EGX - Gluc1C 的构建

以实验室已有的 pET32a - EGXA 作为模板,用引物 4 和 5 扩增 EGX 序列,然后再以这一步得到的 PCR 产物作为模板,用引物 4 和 6 扩增包含 linker 序列的 EGX 序列。使用酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam* H I 将目的序列插入到 pGEX - 6P - 1 载体上(图 1)。接着以实验室已有的 pET22b - Gluc1C 作为模板,用引物 1 和 2 扩增 EGX 序列,回收以后,使用酶切位点 *Xho* I 和 *EcoR* I 将目的序列插入到 pGEX - 6P - 1 - EGX (含 lin

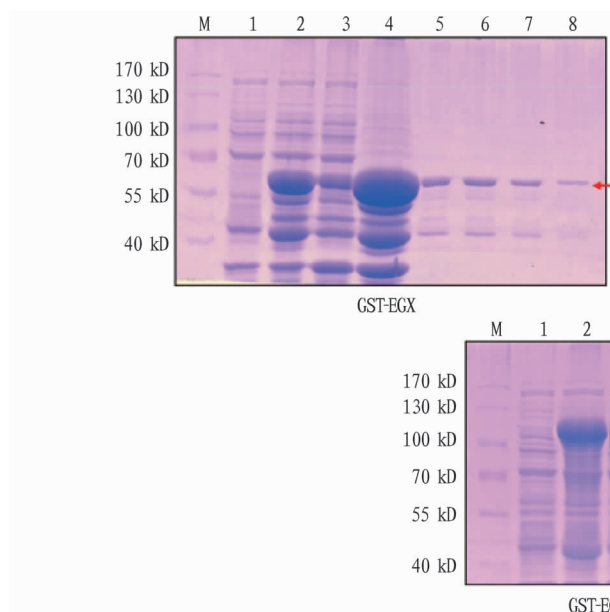


注: M. 1 kb DNA marker, 泳道 1、2、3 分别为 EGX - Gluc1C、EGX、Gluc1C 目的条带

Note: M. 1 kb DNA marker. Lane 1, 2, 3 was the PCR product of EGX-Gluc1C, EGX, Gluc1C respectively

图 1 EGX, Gluc1C 和 EGX - Gluc1C 的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 The PCR result of EGX, Gluc1C and EGX-Gluc1C recombinant plasmid



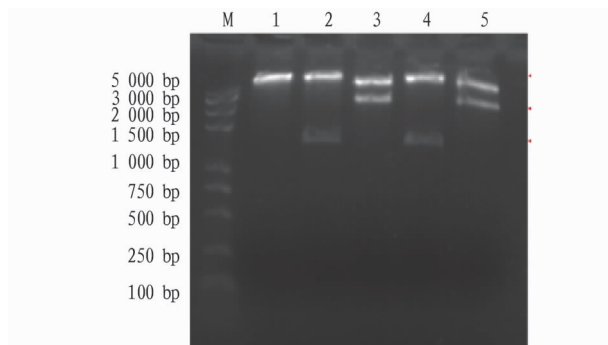
注: M. 蛋白 Marker; 1. 诱导前细胞全液; 2. 诱导后细胞全液; 3. 诱导后细胞超声后的上清; 4. 诱导后细胞超声后的沉淀; 5. 与细胞裂解液结合后的 GST 树脂; 6 - 8 分别为重组蛋白的洗脱组分 E1、E2、E3

Note: M. protein marker, lane 1 was the whole cell extract before IPTG induction, lane 2 was the whole cell extract after IPTG extraction, lane 3 was the supernatant of induced cell lysate after sonication, lane 4 was the pellet of induced cell lysate after sonication, lane 5 was the binding protein sample after GST incubation, lane 6 - 8 were elutes after excessive glutamine elution from GST resin

图 3 纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C 以及 EGX、Gluc1C 在大肠杆菌中表达的考马斯亮蓝染色结果

Fig. 3 The coomassie staining result of recombinant GST-EGX, GST-Gluc1C and GST-EGX-Gluc1C after GST purification

ker) 载体上。图 2 为嵌合体载体双酶切鉴定结果。接着,将测序正确的 3 个质粒 pGEX - 6P - 1 - EGX、pGEX - 6P - 1 - Gluc1C、pGEX - 6P - 1 - EGX - Gluc1C 转入 *E. coli* RIL (DE3), 获得能够表达 3 个相应蛋白的工程菌。

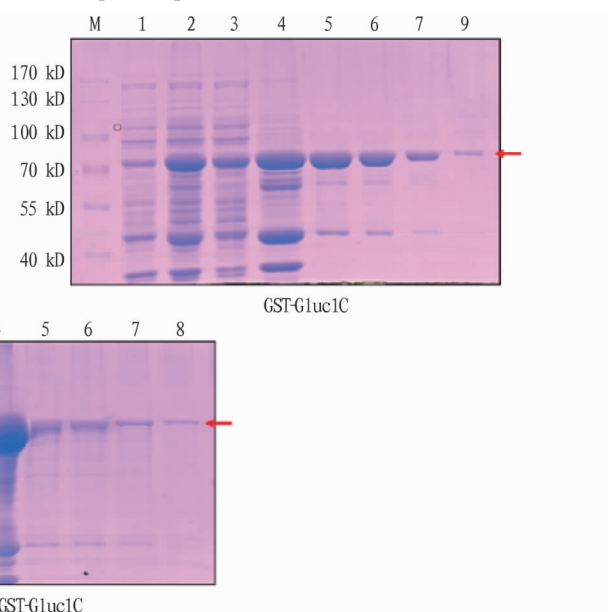


注: M. 1 kb DNA marker; 1. pGEX - 6P - 1 单酶切结果 (*Bam* H I); 2 和 4. *Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切结果, 泳道上方较亮条带为切割的线性质粒, 下方为目的产物 EGX; 3 和 5. *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切结果, 泳道上方较亮条带为切割的线性质粒, 下方为目的产物 EGX - Gluc1C

Note: M. 1 kb DNA marker. Lane 1 showed the intact size of plasmid after single digestion with *Bam* H I. Lane 2 and lane 4 showed the DNA fragment of chimera construct after *Bam* H I and *Eco* R I digestion, the lighter line above the lane is the cutting linear plasmid, and the lower part is the objective product EGX. Lane 3 and lane 5 showed the DNA fragment of chimera construct after *Bam* H I and *Xho* I digestion, the lighter line above the lane is the cutting linear plasmid, and the lower part is the objective product EGX-Gluc1C

图 2 重组质粒 pGEX - 6P - 1 - EGX - Gluc1C 的酶切鉴定结果

Fig. 2 The restriction enzyme digestion result of recombinant plasmid pGEX-6P-1-EGX-Gluc1C



注: M. 蛋白 Marker; 1. 诱导前细胞全液; 2. 诱导后细胞全液; 3. 诱导后细胞超声后的上清; 4. 诱导后细胞超声后的沉淀; 5. 与细胞裂解液结合后的 GST 树脂; 6 - 8 分别为重组蛋白的洗脱组分 E1、E2、E3

Note: M. protein marker, lane 1 was the whole cell extract before IPTG induction, lane 2 was the whole cell extract after IPTG extraction, lane 3 was the supernatant of induced cell lysate after sonication, lane 4 was the pellet of induced cell lysate after sonication, lane 5 was the binding protein sample after GST incubation, lane 6 - 8 were elutes after excessive glutamine elution from GST resin

图 3 纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C 以及 EGX、Gluc1C 在大肠杆菌中表达的考马斯亮蓝染色结果

Fig. 3 The coomassie staining result of recombinant GST-EGX, GST-Gluc1C and GST-EGX-Gluc1C after GST purification

2.2 融合蛋白的表达与纯化 表达目的蛋白的重组工程菌株 RIL pGEX - 6P - 1 - EGX 的表达条件为 IPTG 0.4 mmol/L, 28 °C 诱导表达 3 h, 培养体积为 1 L。根据标准的 GST 纯化流程进行蛋白纯化。从洗脱组分看, 第 1 次洗脱的蛋白浓度最高, 依次减少, 获得的蛋白较纯, 仅在 40 kD 上方有一处杂带。通过同样的纯化方法, 获得了重组蛋白 EGX, EGX - Gluc1C, 并且浓缩洗脱组分, 最终蛋白浓度统一为 0.5 mg/mL (图 3)。

2.3 抗 Gluc1C 抗体的制备及效价检测 为了能够更深入地研究 Gluc1C 的功能, 制备了抗 Gluc1C 的血清。选择直接用目的蛋白的包涵体作为抗原, 经过 SDS - PAGE 后, 切割包含目的条带的胶条, 注射进入兔子体内。每隔 7 d 免疫 1 次, 共 3 次, 最终获得抗 Gluc1C 的免疫血清, 通过 Western blot 检测了血清的效价。取 Gluc1C 和嵌合体的诱导前、诱导后蛋白进行检测发现, 获得的免疫血清能够很好地识别目的蛋白 Gluc1C, 并且也能识别嵌合体 (图 4)。

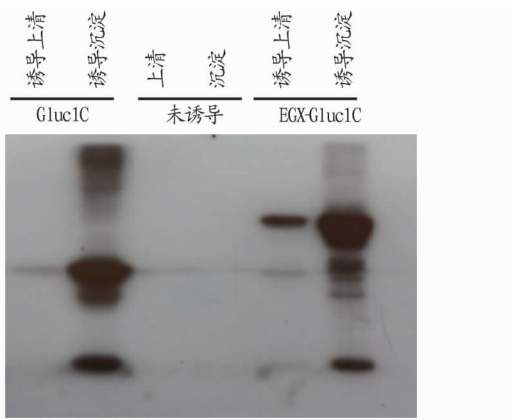


图 4 纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C 的 Western blot 鉴定结果
Fig. 4 The Western blot test result for the chimera cellulase EGX - Gluc1C

3 讨论与结论

纤维素是地球上现存分布最广和含量最丰富的碳水化合物^[7]。对人类而言, 纤维素也是自然界中数量最大的可再生资源, 它的降解和再利用无疑是自然界碳素循环的中心环节。纤维素酶作用于纤维素的分子机制至今没有完全研究清楚, 纤维素酶产生菌的产酶能力不足, 以及所产生的纤维

素酶的组分不全是导致这一领域的研究与实际应用存在一定距离的主要原因^[8]。不同的微生物合成的纤维素酶不仅在组成上有显著的差异, 而且对纤维素的水解能力也大不相同, 原核生物和真核生物均能产纤维素酶^[9-10]。该研究构建了纤维素酶嵌合体 EGX - Gluc1C, 其中 EGX 是从福寿螺胃液中分离得到的一种多功能纤维素酶, 同时具有多种纤维素酶活性, Gluc1C 是从类芽孢杆菌中分离出的一种 β - 糖苷水解酶。中间以甘氨酸和丝氨酸构成的柔性肽重复序列 (G4S)₃ 连接, 保证了 2 个蛋白之间的空间结构不受影响。共获得了纯度较高的 3 种蛋白, 浓缩以后, 3 种蛋白的浓度统一确定为 0.5 mg/mL。同时还获得了效价很高的抗 Gluc1C 的兔血清, 为将来嵌合体的活性研究提供了基础。未来的研究还会涉及到嵌合体在毕赤酵母系统中表达是否会增强其活力; 嵌合体在 pH 耐受、热稳定性方面是否有提高。

参考文献

- [1] ADDEN R, NIEDNER W, MULLER R, et al. Comprehensive analysis of the substituent distribution in the glucosyl units and along the polymer chain of hydroxyethylmethyl celluloses and statistical evaluation [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(4): 1146 - 1157.
- [2] PERCIVAL ZHANG Y H, HIMMEL M E, MIELENZ J R. Outlook for cellulase improvement; Screening and selection strategies [J]. *Biotechnology advances*, 2006, 24(5): 452 - 481.
- [3] ADSUL M G, SINGHVI M S, GAIKAIWARI S A, et al. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technol*, 2011, 102(6): 4304 - 4312.
- [4] BAYER E A, MORAG E, LAMED R. The cellulosome: A treasure-trove for biotechnology [J]. *Trends Biotechnol*, 1994, 12(9): 379 - 386.
- [5] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure Appl Chem*, 1987, 59: 257 - 268.
- [6] ADLAKHA N, SAWANT S, ANIL A, et al. Specific fusion of β -1,4-endoglucanase and β -1,4-glucosidase enhances cellulolytic activity and helps in channeling of intermediates [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2012, 78(20): 7447 - 7454.
- [7] AKCAPINAR G B, GUL O, SEZERMAN U. Effect of codon optimization on the expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Progr*, 2011, 27(5): 1257 - 1263.
- [8] ALPER H, STEPHANOPOULOS G. Engineering for biofuels: Exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(10): 715 - 723.
- [9] ANDERSON T D, ROBSON S A, JIANG X W, et al. Assembly of Minicellulosomes on the surface of *Bacillus subtilis* [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77(14): 4849 - 4858.
- [10] ANGENENT L T, KARIM K, AL-DAHMAN M H, et al. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(9): 477 - 485.

(上接第 77 页)

- [10] 张新献, 古润泽, 陈自新, 等. 北京城市居住区绿地的滞尘效益 [J]. *北京林业大学学报*, 1997, 19(4): 12 - 17.
- [11] 王效科, 冯宗炜. 中国森林生态系统中植物固定大气碳的潜力 [J]. *生态学杂志*, 2000, 19(4): 72 - 74.
- [12] LI H, ZHAO W Z, GU R Z. Effects of three different green lands in plantation structure on the O₂-emitting, CO₂-fixing, heat-absorbing and temperature-decreasing in residential quarters [J]. *Environ Sci*, 1999, 20(6):

41 - 44.

- [13] WANG X R. Ecological park and urban environment protecting [J]. *Chinese landscape architecture*, 1998, 14(2): 14 - 16.
- [14] 徐阳. 上海市五种主要绿化树种三维绿量、叶面积指数等生态指标相关研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [15] 韩焕金. 城市绿化植物的固碳释氧效应 [J]. *东北林业大学学报*, 2005, 33(5): 68 - 70.