

# 极端嗜热菌海栖热袍菌 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的高效表达和重组酶的纯化

薛业敏<sup>1,2,\*</sup> 毛忠贵<sup>1</sup> 邵蔚蓝<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

<sup>2</sup>(南京师范大学微生物工程重点实验室,南京 210097)

**摘 要**  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶作为木聚糖降解的限速酶之一,在木聚糖类半纤维素的生物转化中起着重要的作用。海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一个嗜极端高温的厌氧细菌,其产生的极耐热性酶类具有非常可观的工业应用前景。但热袍菌属 *Thermotoga* 的基因在大肠杆菌中的表达一般较困难。研究了 *T. maritima* 中的极耐热性  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因在大肠杆菌不同菌株中的表达水平及纯化技术。结果表明 稀有密码子 AGA、AGG 和 AUA 限制了该基因在大肠杆菌中的表达,在大肠杆菌 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL 可得到高效表达,重组蛋白表达量达 20%,比酶活比野生菌株提高 5 倍,重组蛋白经热处理和金属  $\text{Ni}^{2+}$  的亲和层析提纯后,达到了电泳纯,提纯倍数为 5.1 倍,收率为 55.1%。对重组菌诱导表达条件的研究表明,营养丰富的 TB 培养基有助于重组菌的生长,重组菌生长至  $OD_{600}$  为 0.7~0.8 时添加 IPTG 诱导 5h 后重组蛋白的表达量最高。

**关键词** 海栖热袍菌  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶,高效表达,重组酶纯化,酶学性质

**中图分类号** Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)04-0554-07

我国是一个农业大国,每年秸秆产量达 5.7 亿吨,占世界秸秆总产量的 20%~30%,其中大部分用于燃烧或者废弃<sup>[1]</sup>。秸秆中半纤维素的含量占总干重的 25%~50%,其化学结构较纤维素复杂得多,是一条以  $\beta$ -1,4 糖苷键相联的木聚糖主链,上面带有 1,3-阿拉伯糖或 1,2-4-O-甲基葡萄糖醛酸构成的侧枝,被称为阿拉伯葡萄糖醛酸木聚糖。这种木聚糖彻底降解的产物主要是木糖和少量阿拉伯糖、葡萄糖醛酸,可以用作基本碳源生产各种发酵产品,包括有机酸、氨基酸、单细胞蛋白、糖醇、工业酶类、溶剂或燃料<sup>[2]</sup>。但是这类木聚糖的完全降解需要多种酶的协同作用。内切木聚糖酶(endo  $\beta$ -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8)水解木聚糖骨架,产生木寡糖, $\beta$ -木糖苷酶( $\beta$ -1,4-xylosidase, EC 3.2.1.37)从非还原性末端将木寡糖和木二糖分解为木糖。侧链取代基的去除是由水解木糖与侧链取代基之间的糖苷键的酶催化的,如阿拉伯糖苷酶( $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, EC 3.2.1.55)和  $\alpha$ -D-葡萄糖醛酸酶( $\alpha$ -D-glucuronidase, EC 3.2.1.139)和乙酰酯酶( EC3.1.1.6 )<sup>[3,4]</sup>。利用木聚

糖酶水解这类农业废弃物时,阿拉伯糖和 4-O-葡萄糖醛酸侧枝则对木聚糖酶的作用产生空间屏障,使得内切木聚糖酶不能结合和分解邻近这些侧枝的木聚糖而影响水解效率。因此,  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的参与对于低聚木糖的生产、废物的生物处理、食品或饲料养分的提高,以及半纤维素的生物转化起着非常重要的作用<sup>[1,5]</sup>。我国科学家对于半纤维素酶在食品加工、低聚糖制备、饲料加工、溶解纸浆以及纸浆漂白等方面的应用已经展开了研究并取得了可观的进展,对木聚糖降解酶系统中  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的研究未见报道。

海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 是一种生长在 55~90℃ 的海底火山口附近、严格厌氧的细菌,能够分解和利用淀粉、纤维素、半纤维素等多聚糖<sup>[6-10]</sup>,是极耐热性半纤维素酶的重要来源,也是基因工程的理想材料。但是该菌在产生复杂的木聚糖降解酶系的同时还产生大量酶学性质比较相近的淀粉酶、纤维素酶,因此,分离纯化木聚糖降解酶系中的酶非常困难。同时,海栖热袍菌生长条件要求苛刻,细胞

收稿日期 2003-11-28,修回日期 2004-04-05。

基金项目 国家轻工总局 211 专项基金资助。

\* 通讯作者。 Tel 86-510-5879781; Fax 86-510-5869645; E-mail: wl.shao@pub.wx.jsinfo.net

\* \* 联系方式 Tel 86-25-83598838 Fax 86-25-83598838

密度较低,不适合工业化生产。因此,采用基因工程的技术对极端微生物的重要酶的基因进行高效率的表达,一直是人们研究的热点。目前,已有研究者将这个菌的木聚糖酶基因 *xynB* 和  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因 *aguA* 构建基因工程菌,但其表达水平很低<sup>[7-10]</sup>,因此,构建高效表达极耐热性  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的基因工程菌具有一定的应用前景。本研究采用带有 T7 强启动子的 pET 系列表达载体,选择大肠杆菌的不同菌株为表达宿主,对 *T. maritima* 的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的高效表达进行了尝试,结果在 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 中成功实现 *aguA* 基因的超量表达,该项研究为开发  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶在寡糖制备、清洁生产、食品工业,以及饲料工业的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:** *T. maritima* 购自美国菌种收藏中心,编号为 ATCC43589,大肠杆菌 *E. coli* JM109 和 JM109 (DE3) 购于 Promega (Wisconsin, WI, USA),质粒 pET-28a(+) 和 pET-20b 和 *E. coli* BL21 (DE3) 及 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 购于 Novagen 公司。

**1.1.2 主要试剂:** 限制酶 *Xho* I, *Nco* I, T4 DNA 连接酶和 *Pyrobest* DNA 聚合酶,购自宝生物工程公司, Rapid Affinity Purification Kit 购自 Novagen 公司;蛋白酶 K、溶菌酶、IPTG 购自华美生物工程公司;4-O-甲基葡萄糖醛酸基-D-木聚糖、 $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶购自 Sigma 公司;质粒抽提 QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit 和 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基和培养条件:** 大肠杆菌培养在 LB 或 TB 培养基,电转化用 SOC 培养基,转化子的筛选所用抗菌素的浓度:氨苄青霉素(Amp)为 50~100  $\mu$ g/mL,卡那霉素(Kna)为 30  $\mu$ g/mL,氯霉素(Cam)为 60  $\mu$ g/mL,配方见文献[11]。

培养 *T. maritima* 所用的培养基配方为(每升):可溶性淀粉 0.5 g,树脂天青(resazurin) 1mg, NaCl 28 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.5 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2.7 g, KCl 0.33 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.25 g,  $\text{CaCl}_2$  0.0855 g,酵母膏 0.1 g,微量元素(配方见文献[6,10]) 15 mL, pH 7.0。培养基经加热驱氧、充氮、冷却后加还原剂  $\text{Na}_2\text{S}$  0.5 g/L,并分装于预先充氮的 100 mL 血清瓶中,加盖密封并灭菌。

*T. maritima* 的接种与培养:用注射器按 0.5% 接种量接种于预先还原的培养基中,80℃ 静置培养 8h。菌种于室温厌氧条件下可保存半年。

**1.2.2 基因操作:** 基因组 DNA 提取、DNA 的内切酶水解和连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备,以及基因的高效电转化方法均参照文献[11]。质粒的制备、从琼脂糖凝胶提取 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

**1.2.3 引物设计和 PCR 扩增 *aguA* 基因:** 根据 GenBank 中 *aguA* 序列设计一对引物,N 端引物为(5'-CCGTTCCATGGACTACAGGATGTGC-3')内有一个 *Nco* I 酶切位点,C 端引物为(5'-CCGCTCGAGCGGATATATCTTTCTTCCCTT-3')带有一个 *Xho* I 酶切位点,由上海生工生物工程技术服务公司合成。PCR 扩增参数:先在 95℃ 变性 5min,加 *Pyrobest* DNA 聚合酶;然后 94℃ 变性 50s,62℃ 退火 1.5 min,72℃ 延伸 3 min,循环 35 次后 72℃ 保温 10 min。

**1.2.4 重组表达载体的构建:** PCR 产物和质粒 pET-28a(+) 用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后,用 T4 连接酶连接,构建质粒 pET-28a(+) *aguA* 用于测序。把经测序验证的 pET-28a(+) *aguA* 中的 *aguA* 用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后,连接到同样双酶切的 pET-20b 中,构建表达质粒 pET-20b-*aguA*。

**1.2.5 DNA 测序:** 采用 Sanger 双脱氧末端终止法,由上海基康生物技术有限公司完成。

**1.2.6 重组菌诱导表达条件的优化:** 将构建的重组质粒 pET-28a(+) *aguA* 转化宿主 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL,挑取单菌落接入含有 Kna 和 Cam 的 LB 培养基中,37℃ 培养过夜,取 500  $\mu$ L 过夜培养液接入 100 mL 含 Kna 和 Cam 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养至  $OD_{600}$  达 0.7~0.8,加入诱导剂 IPTG 至浓度 1mmol/L,诱导培养不同时间后,酶活检测 *aguA* 基因的诱导表达的情况,选择不同生长时期加入 IPTG 至浓度 1mmol/L 后,继续培养 5h,检测 *aguA* 基因在原核表达载体中的诱导表达的情况。

**1.2.7  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶活性的测定**(参见文献[10,12]):  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶作用的底物是 4-O-甲基葡萄糖醛酸基木寡糖。在 2% 4-O-甲基葡萄糖醛酸基-D-木聚糖加入 0.05 mg/mL  $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶,置 55℃ 水浴中反应 16 h,反应混合物经 50℃ 真空浓缩 15 倍后,保存于 -20℃。

$\alpha$ -葡萄糖醛酸酶活性测定是利用酶水解反应产生的 4-O-MeGlcA 与砷钼酸钠的显色反应进行比色,具体方法是以 MeGlcAX 为底物,添加适当稀释酶在

适当条件下保温,然后添加铜试剂终止反应。其混合物在沸水浴中加热 10min 后,在冰水浴中冷却,然后添加砷钼酸钠试剂呈蓝色,在 620nm 下用分光光度计测其吸收峰值。 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶活性单位定义为每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 产物的酶量。以  $\alpha$ -葡萄糖醛酸作标准曲线。

纯化重组  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶在不同 pH 值下进行酶促反应测定其最适 pH,保温在不同 pH 缓冲液 40 min 后测其 pH 稳定性。pH 4.5 到 8.0 为 100 mmol/L Tris-咪唑缓冲液, pH 8.5, 9.0 为 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。最适温度定在 pH 5.7 Tris-咪唑缓冲液体系及不同温度下酶促反应 5min 后测酶活,温度稳定性定为将酶保温在 55 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 75 $^{\circ}$ C, 85 $^{\circ}$ C, 95 $^{\circ}$ C 下 1 h (pH 5.7 Tris-咪唑缓冲液),然后测定其残余酶活。

### 1.2.8 重组酶的分离纯化

(1) 重组菌的培养:将质粒 pET-28(+)-*aguA* 转化 *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL,挑单菌落接种于含有 1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1% NaCl、0.003% Kna 和 0.006% Cam 的液体培养基,于 37 $^{\circ}$ C 转速 200r/min 摇瓶培养过夜制备液体菌种,然后以 1% 的接种量接入 4 个装有 250 mL 含有 Kna 和 Cam 的液体 LB 培养基的 1L 三角瓶中。于 37 $^{\circ}$ C, 转速 220 r/min 下培养至  $OD_{600}$  0.6 ~ 0.8 时加 IPTG 至浓度 0.8 mmol/L 继续培养 4 h 4 $^{\circ}$ C 下 5 000  $\times$  g 离心 20 min 收集细胞。

(2) 粗酶液的制备:将细胞用亲和柱结合缓冲液(5mmol/L 咪唑、20mmol/L Hris-HCl, pH 7.9)重悬,经高压细胞破碎仪(French Pressure, Thermo)破碎细胞,9 600  $\times$  g 离心 20 min,取上清于 70 $^{\circ}$ C 下热处理 20 min 后,9 600  $\times$  g 离心 30 min,上清液为粗酶液。

(3) 金属  $Ni^{2+}$  的亲和层析:将粗酶液经 0.45 $\mu$ m 的微孔膜过滤后上亲和层析柱(Novagen  $\chi$  1.6cm  $\times$  2cm)然后用洗涤缓冲液(60mmol/L 咪唑、20mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)洗涤,最后用洗脱缓冲液(1mol/L 咪唑、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)洗脱,流速 0.5 mL/min,以每管 1 mL 分部收集。收集酶活的峰值部分,用截留分子量为 3 万的超滤膜浓缩后,以 SDS-PAGE 凝胶电泳检测纯度。

1.2.9 SDS-PAGE 分析蛋白质纯度及分子量:12% 的聚丙烯酰胺,考马斯亮蓝 R250 染色,用复日 FR200 电子扫描系统分析蛋白相对含量。

1.2.10 蛋白质浓度:用 Bradford 法测定蛋白质浓

度,以牛血清白蛋白(Sigma Inc.)作为标准蛋白<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *aguA* 基因扩增与测序

图 1 第 6 泳道为 PCR 结果,在 2 kb 附近有一条很亮的扩增带与报道的 *aguA* 基因大小相同。质粒 pET-28a(+)用 Sanger 双脱氧法测序,结果证明 PCR 产物的序列与文献 10 报道的一致。

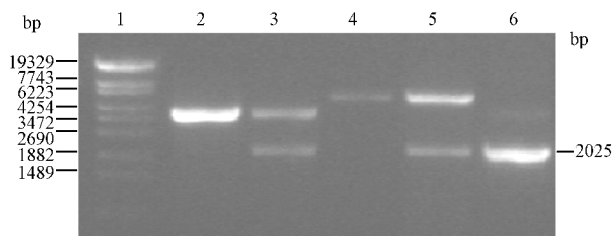


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of DNA

1  $\lambda$ -EcoT141 digest DNA marker; 2 pET-20b/Nco I, Xho I; 3: pET-20b-*aguA*/Nco I, Xho I; 4 pET-28a(+)Nco I, Xho I; 5: pET-28a(+) -*aguA*/Nco I, Xho I; 6: PCR amplified fragments

### 2.2 原核表达质粒的构建与鉴定

图 2 为重组表达质粒的构建图。图 1 第 3 泳道为重组质粒 pET-20b-*aguA* 用 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切的结果,第 5 泳道为重组质粒 pET-28a(+)用同样酶双酶切,重组质粒均能被 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切下一条与 PCR 扩增片段大小一致的片段(如图 1),结果表明 *aguA* 基因已插入表达质粒 pET-20b 和 pET-28a(+)中。

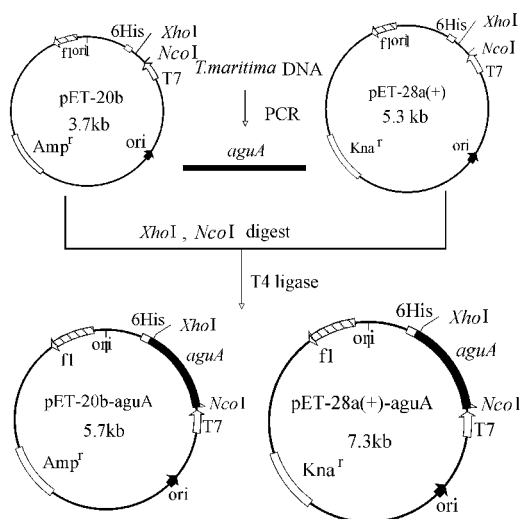


图 2 重组表达载体的构建示意图

Fig.2 Construction of plasmid pET-20b-*aguA* and pET-28a(+) -*aguA*

2.3 *aguA* 基因在不同表达载体和宿主中的表达

将构建的重组质粒 pET-20b-*aguA*、pET-28a( + )-*aguA* 分别转化大肠杆菌 JM109( DE3 ) BL21( DE3 )和 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL , IPTG 诱导表达后 ,并以转化空载体为对照 ,收集菌体细胞进行全细胞 SDS-PAGE( 分离胶的浓度为 12% ) ,考马斯亮蓝染色的结果见图 3。从电泳图谱上可以看出 ,*aguA* 基因无论是克隆至分泌型表达质粒 pET-20b ,还是克隆至非分泌型表达质粒 pET-28a( + ) ,其在常规大肠杆菌 JM109( DE3 ) BL21( DE3 )中的表达量均很低 ,而在 pET-28a( + )-*aguA* 转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL 的泳道中明显多出一条蛋白表达带 ,分子量约为 72kD ,与预计的结果基本一致 ;酶活检测结果表明( 见表 1 ) ,比酶活比野生菌株 *T. Maritima* 提高 5 倍 ,比国外报道的提高约 10 倍<sup>[10]</sup> ,密度扫描计算可知 ,目标蛋白 *AguA* 的表达量占全菌蛋白的 20%。由此可见 ,*aguA* 基因在 pET-28a( + )这一载体中获得超量表达。

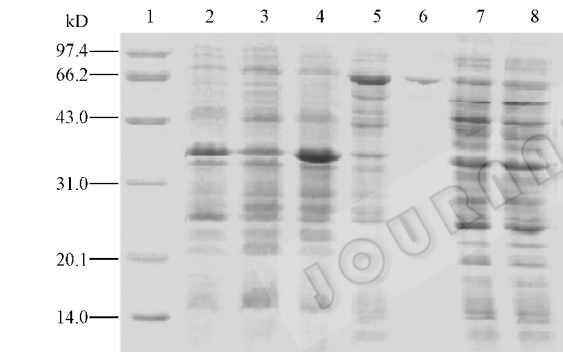


图 3 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 图谱  
Fig.3 SDS-polyacrylamide gel( 12% ) of  $\alpha$ -glucuronidase after induced expression  
1 molecular mass markers ; 2 : *E. coli* BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/pET-28a( + ) ; 3 : *E. coli* JM109( DE3 )pET-28a( + )-*aguA* ; 4 : *E. coli* BL21( DE3 )pET-28a( + )-*aguA* ; 5 : *E. coli* BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/pET-28a( + )-*aguA* ; 6 : purified products ; 7 : *E. coli* BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/pTrc99A-*aguA* ; 8 : *E. coli* BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL / pET-20b-*aguA*

表 1 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶活性检测			
Table 1 Analysis of $\alpha$ -glucuronidase from engineered strain			
Expressed product	BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28( + )	BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28( + )- <i>aguA</i>	Wild strain
Enzyme activity ( u/mg )	0.0	9.3	2.1

2.4 重组菌 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/pET-28a( + )-*aguA* 诱导条件的优化

选择不同培养基对重组菌 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28a( + )-*aguA* 进行培养 ,结果表明重组菌在 LB 中培养具有普通细菌的生长规律( 见图 4 ) ,在经过约 1 ~ 2 h 的延迟期后进入对数生长期 , $OD_{600}$  值迅速增加 ,5 h 后达到对数生长后期 ,接着进入平稳期 , $OD_{600}$  值不再增加。整个生长周期重组菌的生长密度高出 LB 培养基 1 倍 ,这意味着采用 TB 培养基有望提高重组蛋白的产率。

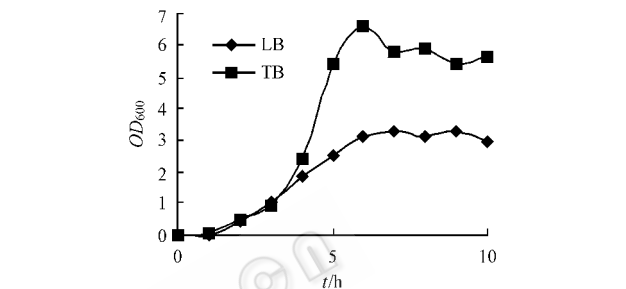


图 4 重组菌 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28a( + )-*aguA* 生长曲线  
Fig.4 Growth curve of recombinant BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28a( + )-*aguA*

由图 5a 可见 ,诱导时间的长短对外源基因的表达有明显的影 响 ,当加入 IPTG 后培养 5 h 时重组酶的表达水平最高 ,之后表达量有所下降。这可能是随着诱导时间的延长 ,菌体产酶会趋于饱和 ,表达量不但不会再继续增加 ,反而会被产生的蛋白酶降解使表达量降低。

根据重组菌生长曲线 ,选择  $OD_{600}$  值为 0.815、3.05、5.20、6.66 ,即对数生长期的前期、中期、后期和稳定期时添加 IPTG ,然后诱导 5 h 进行诱导时机研究 ,结果见图 5b ,IPTG 在  $OD_{600}$  为 0.815 时加入诱导表达效果最好 , $OD_{600}$  值高于 3.05 后重组蛋白的表达量明显降低 ,这说明菌体生长密度的提高并不一定能使目标蛋白的表达量也提高。因此 ,进一步选择  $OD_{600}$  值在 0.7 ~ 3.0 之间对重组蛋白进行诱导表达试验 ,结果表明( 见表 2 ) , $OD_{600}$  值在 0.7 ~ 0.8 时添加 IPTG ,目标蛋白的表达效果最好。

2.5 重组蛋白的纯化

将 IPTG 诱导表达后的 BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL / pET-28a( + )-*aguA* 菌体细胞裂解 ,并经 70℃ 20min 热处理 ,上清液经 0.45  $\mu$ m 的微孔膜过滤后上 Poly-His 亲和层析柱 ,SDS-PAGE 检测表明 ,目标蛋白经热处理后 ,纯度达到 90% 以上 ,亲和层析柱纯化后 ,纯度达到电泳均一( 见图 6 )。

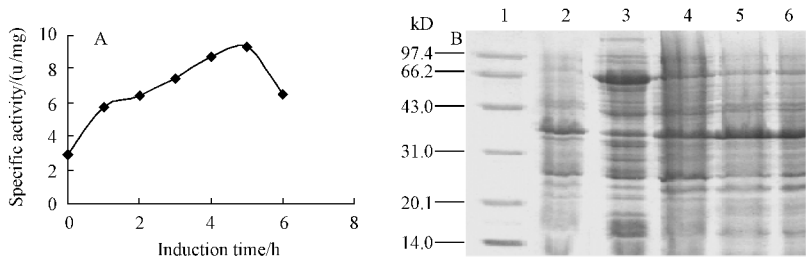


图 5 重组酶表达的最佳诱导条件

Fig.5 The optimum induction conditions of the expression of the recombinant enzyme

A :effect of induction duration on the synthesis of  $\alpha$ -glucuronidase ; B : effect of induction time on the synthesis of  $\alpha$ -glucuronidase

表 2 诱导时机对重组酶表达的影响

Table 2 Effect of induction time on the synthesis of  $\alpha$ -glucuronidase

No.	$OD_{600}^a$	$OD_{600}^b$	Enzyme activity/( u/mL )	Specific activity/( u/mg )
1	0.714	1.030	1.192	9.3
2	1.249	3.285	1.147	3.2
3	1.76	3.46	1.071	2.9
4	2.115	3.075	0.811	2.6
5	2.77	5.18	0.833	1.5
6	3.925	5.15	0.852	1.6

a :cell density before induction ; b : cell density in the end of induction

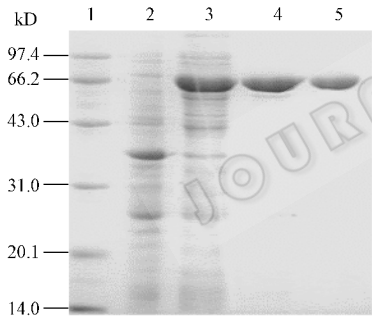


图 6 热稳定性  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶纯化过程的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 6 SDS-polyacrylamide gel ( 12% ) of thermostable  $\alpha$ -glucuronidase purification steps

1 :molecular mass markers ; 2 :crude extract of *E. coli* BL21-CodonPlus ( DE3 )-RIL / pET-28a( + ) ; 3 :crude extract of *E. coli* BL21-Condon Plus( DE3 )-RIL/pET-28a( + )-aguA ; 4 :crude extract of *E. coli* BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28a( + )-aguA after heat precipitation ; 5 : immobilized metal affinity chromatography

纯化步骤以及相应的纯化效果列于表 3 ,最终提纯倍数为 5.1 倍 ,收率为 55.1%。

2.6 纯化重组酶的酶活性检测

对重组  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶进行初步酶学性质研究 结果表明( 图 7-a , b , c ),该酶反应最适 pH 为 6.0 ,最适温度为 85℃ ,重组酶热稳定性为 85℃ 保温 1h 酶活力保持在 70%。用不同浓度的 NaCl 对  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶进行处理 ,发现其活性在 NaCl 超过 0.2 mol/L 时被降低 ( 图 7-d ),与报道的来源于 *T. maritima*的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基本一致。

表 3 重组热稳定性  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶纯化结果

Table 3 Purification of thermostable  $\alpha$ -glucuronidase from engineered Strain

Step	Total protein/mg	Specific activity/( u/mg )	Total activity/u	Recovery/%	Purification fold
Crude extract	123.1	4.9	610.8	100	1
Heat treatment	39.7	11.5	455.8	74.6	2.3
Immobilized metal affinity	13.5	24.9	336.2	55.1	5.1

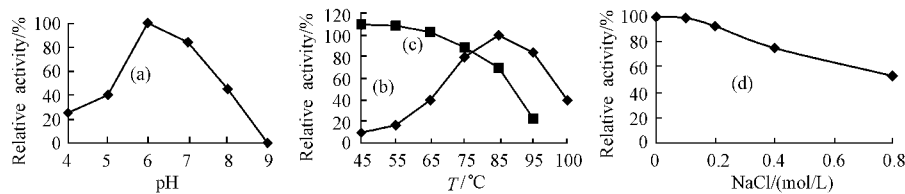


图 7 重组  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的最适 pH (a)、最适反应温度 (b)、热稳定性 (c) 和 NaCl 浓度的抑制作用 (d)

Fig.7 The optimal pH (a), the optimal temperature (b) and thermostability (c) of expressed  $\alpha$ -glucuronidase and inhibiting effect from NaCl (d)

3 讨论

构建合适的极端菌的外源基因表达系统,高效率表达一些耐热耐碱酶蛋白,一直是人们研究的热点。但是欲达到外源基因的高效表达,选择一个好的大肠杆菌表达系统非常重要。*T. maritima* 的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因在大肠杆菌中的表达是很低的,甚至采用 T7 强启动子和具有合适的转录、翻译起始序列的表达载体也未实现高效表达<sup>[10]</sup>。本文选用大肠杆菌的高效表达载体 pET-28a(+)作为接受载体,以大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 为表达宿主,使  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因得到了高效表达,蛋白的表达量约占总蛋白的 20%,1L 培养液得到 90% 纯度的目标蛋白约 40mg,电泳纯蛋白 13.5mg,而国外的学者将 *aguA* 基因克隆到表达载体 pT7-7 中,10L 培养液可得到 3.3mg 的纯蛋白<sup>[10]</sup>。*AguA* 重组酶在大肠杆菌中实现了高效表达,将有助于进一步开展  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶的应用性研究。

实验过程中,我们将构建的重组质粒 pET-28a(+) *aguA* 转化大肠杆菌的不同宿主中发现,在常规大肠杆菌 JM109(DE3) 和 BL21(DE3) 中,未能实现  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因的高表达。而转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 中,非分泌型表达质粒 pET-28a(+) *aguA* 却得到高效表达。通过对海栖热袍菌的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因序列分析发现,该基因的密码子偏性与高表达的大肠杆菌基因明显不同,其中极端稀有密码子 AGG、AGA、AUA、CCC 使用频率达 9.4%。而 AGG 和 AGA 在 *aguA* 基因的偏好性达 85%。大肠杆菌宿主菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 是针对外源基因含有大量大肠杆菌使用的稀有密码子(如 AGA、AGG)和影响大肠杆菌产蛋白量密码子 AUA、CUA、CCC 的特点,使其带有大肠杆菌稀有 tRNA 基因额外拷贝,如 *argU* tRNA、*ileY* tRNA 和 *leuW* tRNA,以识别 AGA/AGG、AUA、CUA,在常规大肠杆菌中表达低的 *aguA* 却在 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 中高水平地表达。因此,推测 *aguA* 基因

中的极端稀有密码子 AGA、AGG、AUA、CCC 可能限制了该基因的大量表达<sup>[14,15]</sup>。

同时我们将已构建的分泌型重组质粒 pET-20b-*aguA* 也转化 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 菌株,却未实现该基因的高表达,分析其原因,可能是 pET-20b 自身所带信号肽使目标蛋白分泌到周质或在细胞膜上发生堵塞,结果对细胞产生毒性而抑制了该基因的表达。这也恰好证实了 *Thermotoga* 属的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶基因的表达不仅与其密码子的偏好性有关,还与信号肽、翻译起始区的二级结构等因素有关。

对重组菌诱导表达条件的研究表明,选用营养丰富的 TB 培养基培养,重组菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL/pET-28a(+) *aguA* 的生长密度可高达 6.63,但重组菌高密度培养的实现并未得到外源基因的高表达。分析其原因,可能是在重组菌生长后期由于外源基因的本底表达时因竞争利用物质、能源和核糖体等干扰宿主细胞的正常代谢活动,可能造成质粒丢失,同时随着细胞的成熟,自身蛋白酶的水解能力增强,也有可能使表达量下降<sup>[16]</sup>。

在实验过程中,利用在常温菌 *E. coli* 中表达的  $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶对热的稳定性,加之重组蛋白表达量的大幅度提高,使得 *AguA* 重组酶通过 70°C 20min 的热处理后,纯度达到 90% 以上,酶活收率为 74.6%。这一结果表明该酶在今后工业化制备中是可以采用此低成本的方法的,也为重组酶的大规模工业化提取奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Sunna A, Autranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Review in Biotechnology*, 1997, 17(1): 39-67

[2] Xue YM(薛业敏), Mao ZG(毛忠贵), Liu HL(刘海丽) et al. Advances in the studies on  $\alpha$ -glucuronidase. *Forestry Chemistry and Industry*(林产化学与工业) 2002, 22(4): 75-79

[3] Xue YM(薛业敏), Shao WL(邵蔚蓝), Mao ZG(毛忠贵). The xylan-degrading enzymes system from microorganism. *Biotechnology*(生物技术), 2003, 13(1): 36-38

- in exploiting the resource of hemicellulose. *Journal of Food Science and Biotechnology* (食品与生物技术), 2002, **21**(1): 88–93
- [ 5 ] Beg QK, Kapoor M, Mahajan L *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 326–338
- [ 6 ] Rober H, Thomas AL, Helmut K *et al.* *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90°C. *Arch Microbiol*, 1986, **144**: 324–333
- [ 7 ] Christoph W, Wolfgang L. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1810–1815
- [ 8 ] David JS, Liam CW, Rosalind AR *et al.* Sequence and expression of xylanase gene from sp strain Fjss3-B.1 and characterization of recombinant enzyme and its activity on kraft pulp. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 4110–4113
- [ 9 ] Jiang ZQ (江正强), Li LT (李里特), Lin Q (林清) *et al.* Cloning and expression of an *xynB* gene in *E. coli* from the extreme-thermophilic *thermotoga maritima*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2002, **8**(3): 280–284
- [ 10 ] Ruile P, Winterhalter C, Liebl W. Isolation and analysis of a gene encoding  $\alpha$ -glucuronidase, an enzyme with a novel primary structure involved in the breakdown of xylan. *Mol Microbiol*, 1997, **23**: 267–279
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 12 ] Milner Y, Avigad G. A copper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. *Carbohydr Res*, 1967, **4**: 359–361
- [ 13 ] 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**: 5848–5853
- [ 14 ] Spanjaard RA, Chen K, Walker JR *et al.* Frame shift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA<sup>Arg</sup>. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 5031–5036
- [ 15 ] Spanjaard RA, Duin J. Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 7967–7971
- [ 16 ] Li YY (李育阳). *Gene Expression Technology*. Beijing: China Science Press, 2001

## Expression and Purification of Thermostable $\alpha$ -Glucuronidase from *Thermotoga maritima*

XUE Ye-Min MAO Zhong-Gui SHAO Wei-Lan\*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract** The xylanolytic enzymes found in *Thermotoga maritima* showed extremely high thermostability and considerable potential in industrial application. Yet expression level of the genes encoding these enzymes was very low. The  $\alpha$ -glucuronidase gene *aguA* from *T. maritima* ATCC 43589 was cloned and expressed in several *E. coli* strains with different vector. The  $\alpha$ -glucuronidase was overexpressed in *E. coli* BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL with plasmid pET-28a(+), and made up about 20% of the total proteins present in the intracellular soluble fraction. The results proved the assumption that rare codons for arginine (AGA/AGG) and isoleucine (AUA) affect the expression of *aguA* gene from hyperthermophilic bacterium *T. maritima* in *E. coli*. Purification procedure included two steps, heat treatment and immobilized metal affinity chromatography, and over 13.5mg of pure enzyme was obtained from 1L of induced culture. The purified enzyme showed a single band on SDS polyacrylamide gel electrophoresis with a purification of 5.1 fold, and a yield of 55.1%. The optimum activity of recombinant  $\alpha$ -glucuronidase was found at pH 6.0 and 85°C, the enzyme retained 70% of its activity after 1 h of incubation at 85°C. The induction conditions for expression of recombinant strain BL21-CodonPlus( DE3 )-RIL/ pET-28a-*aguA* were studied on induction time and duration by IPTG. The results showed that the activity of thermostable  $\alpha$ -glucuronidase reach the maximum in 5-hour after inducted at the exponential phase ( $OD_{600}$  of 0.7 ~ 0.8).

**Key words** *Thermotoga maritima*,  $\alpha$ -glucuronidase, gene overexpression, recombinant enzyme purification, characterization

Received: 11-28-2003

This work was supported by Grant from 211 Fund of Ministry of Light Industry of Country.

\* Corresponding author. Tel: 86-510-5879781; Fax: 86-510-5869645; E-mail: wl.shao@pub.wx.jsinfo.net