

张念,林颖颖,祁可丹,等.草酸青霉16 β -葡萄糖苷酶的异源表达[J].江西师范大学学报(自然科学版),2023,47(3): 237-241.

ZHANG Nian, LIN Yingying, QI Kedan, et al. The heterologous expression of *Penicillium oxalicum* 16 β -glucosidase [J]. Journal of Jiangxi Normal University(Natural Science), 2023, 47(3): 237-241.

文章编号:1000-5862(2023)03-0237-05

草酸青霉16 β -葡萄糖苷酶的异源表达

张念,林颖颖,祁可丹,王国平,欧阳蓓,赵喜华*

(江西师范大学生命科学学院,江西 南昌 330022)

摘要:为探究真核菌株草酸青霉16的 β -葡萄糖苷酶(16BGL)在不同宿主中的异源表达情况,该文通过基因克隆技术,将16BGL基因分别与pPIC9K、pET-28a、pGAPZ α A载体进行连接,转化到毕氏酵母GS115或大肠杆菌Rosetta(DE3)上,筛选阳性克隆子,比较并分析其表达情况.结果表明:16BGL-9K未能成功电转到毕氏酵母GS115上;将16BGL-28a转化到大肠杆菌Rosetta上,使用最终物质的量浓度为50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的IPTG和质量分数为1.7%的乳糖在22 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导可实现高水平表达,但极易形成包涵体且无活性.为了消除包涵体的影响,在相同条件下将16BGL的N端加入DsbA分泌信号肽,经SDS-PAGE检验,16BGL有高水平可溶性表达,但无活性;将16BGL-Z α A电转到GS115上,筛选阳性克隆子并接种到含YPG培养基的摇瓶中,结果表明:上清液蛋白质量浓度达到23.723 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,且有活性.真核来源的16BGL基因适合于真核宿主表达.

关键词: β -葡萄糖苷酶;异源表达;酶活

中图分类号:Q 812 **文献标识码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2023.03.03

0 引言

碳水化合物是地球上分布最广、储量最丰富的可再生生物质资源,大量焚烧碳水化合物会造成环境污染和资源浪费^[1-2].因此,将多余的碳水化合物转化为有用的生物燃料和化学物具有重要的研究价值^[3].纤维素是自然界分布最广、含量最多的一种多糖,占植物界碳含量50%以上.水解纤维素的酶包括 β -1,4-内切葡聚糖酶(EG)、纤维二糖水解酶(CBH)和 β -1,4-葡萄糖苷酶(BGL).EG可将长链纤维素水解为纤维糊精和低聚糖,CBH释放纤维二糖单位,BGL将纤维二糖转化为葡萄糖.BGL通常被最终产物葡萄糖抑制,使得纤维二糖的水解成为一个限速步骤.纤维二糖的积累会抑制EG和CBH的作用,减缓整个降解过程^[4-6].因此,获得大量性

质优良的BGL对加速这一过程具有重要意义.

本课题组筛选了一种新的快速生长的野生真菌——草酸青霉16,它能分泌淀粉酶、纤维素酶和半纤维素酶^[2,7],研究了草酸青霉16的BGL的最适温度、最适pH值、酸碱耐受性等,发现16BGL具有较差的有机酸耐受性^[8].16BGL已通过同源建模获得3维结构,也进行了分子对接^[8],但是精确度不如X-衍射^[9]的3维结构.此外,16BGL的催化机制还有待进一步地阐释.想要解决这些问题,关键是要获得16BGL的蛋白晶体.基于X-衍射等技术的结构解析,根据结构决定功能原理,可进行定点突变^[10],以获得耐受有机酸的16BGL突变体,为其应用于纤维素乙醇生产奠定基础.所有这些过程的前提是获得高浓度、高纯度的16BGL蛋白.因此,本文从提高蛋白浓度入手,通过多种手段进行蛋白表达的对比分析.

收稿日期:2022-11-16

基金项目:国家自然科学基金(22068014,21666010),江西省自然科学基金(GJJ11071)和江西师范大学博士科研启动基金(5451)资助项目.

通信作者:赵喜华(1977—),男,江西玉山人,教授,博士,主要从事酶工程和合成生物学研究. E-mail: xhzhao@jxnu.edu.cn

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

16BGL 基因来源于本实验室, pPIC9K 载体、pET-28a 载体、pGAPZαA 载体、毕氏酵母 GS115 分别由清华大学李春教授和华东理工大学魏东芝教授赠送. 大肠杆菌 Rosetta (DE3) 购自索来宝, 胶回收和质粒提取试剂盒分别购自 Omega 和 Axygen 公司, KOD 酶购自 Toyobo 公司, T4 DNA 连接酶和各种限制性核酸内切酶购自 Takara 公司, lexCapSP6FF

离子交换柱购自天地人和公司, 氨苄西林、卡那霉素、氯霉素、柠檬酸、二水合柠檬酸三钠、氯化钠、IPTG、乳糖、考马斯亮蓝 G-250 等均为分析纯试剂, 它们购自国药集团药业股份有限公司.

1.2 实验方法

1.2.1 16BGL 基因的获取 从 16BGL 基因序列, 根据 pPIC9K、pET-28a、pGAPZαA 载体酶切位点, 使用 Primer5 软件设计引物, 引物序列如表 1 所示, 再使用 T4 DNA 连接酶将双酶切基因和相应载体进行连接.

表 1 与不同载体相连的 16BGL 基因引物

表达系统	引物名称	引物序列(5'-3')	划线处酶切位点
酵母 GS115 甲醇诱导型	16BGL-9K-F	TCCCTCCCGGAATTCAAGGATCTTGCCTA CTCTCCCCCTT	EcoR I
	16BGL-9K-R	TTTTTCCCAAACCTAGGTCAATGGTGATGGT GATGATGCTGCACCTTGGGCAGATCGGC	Avr II
酵母 GS115 组成型	16BGL-ZαA-F	GAATTC AAGGATCTTGCCTACTCTCCCCCT	EcoR I
	16BGL-ZαA-R	GGCGGCCGCCTGCACCTTGGGCAGA TCGG CTGAAAG	Not I
大肠杆菌 IPTG 诱导型	16BGL-28a-F	TGTGTGTGTGGAATTCAAGGATCTTGCCTACTCTC	EcoR I
	16BGL-28a-R	TGTGTGTGTAAAGCTTCTGCACCTTGGGCAGATCG	Hind III
	16BGL-D-28a	GAATTCATGAAAAAATTTGGCTGGCGCTGGCGGG CCTGGTGCTGGCGTTAGCGCTAGCGCCAAGCTT	EcoRI、Hind III

1.2.2 16BGL 酶活性的鉴定 在碱性条件下,β-葡萄糖苷酶以水杨苷为底物,在 50 ℃ 下反应 0.5 h,可产生葡萄糖,还原糖与二硝基水杨酸(DNS)会发生氧化还原反应,生成 3-氨基-5-硝基水杨酸,该产物在煮沸条件下呈棕红色,根据在一定浓度范围内颜色深浅与还原糖含量成比例关系的原理,在540 nm 处测定其吸光度.

在 16BGL 和 pGAPZaA 连接并转化到毕氏酵母 GS115 中表达时,目的蛋白分泌在胞外,只需在培养后离心取上清液鉴定即可. 当转化到大肠杆菌 Rosetta 中表达时,目的蛋白分泌在胞内,只有在诱导后超声破碎离心取上清液才能鉴定.

1.2.3 重组载体的表达 1)GS115 重组菌的表达. 16BGL-ZαA 重组载体经 Avr II 线性化后电转到毕氏酵母 GS115 上,在含博来霉素的 YPD 平板上筛选阳性克隆子,将阳性克隆子接种到 YPG 液体培养基中于 30 ℃ 和 180 rpm 的转速下培养 3~4 d,4 ℃ 离心取上清液测酶活,并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定.

2)Rosetta 重组菌的表达. 将含有 16BGL-28a 重

组载体的阳性克隆子接种到 TB 培养基中,在 180 rpm 和 37 ℃ 条件下培养 5~7 h,再加入最终物质的量浓度为 50 μmol·L⁻¹ 的 IPTG 和最终质量分数为 1.7% 的乳糖,于 180 rpm 和 22 ℃ 条件下过夜诱导,在破碎细胞后取上清验证酶活,并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定.

在 16BGL 的 N 端引入 DsbA 分泌信号肽序列,含有 16BGL-D-28a 重组工程菌的表达操作步骤同上.

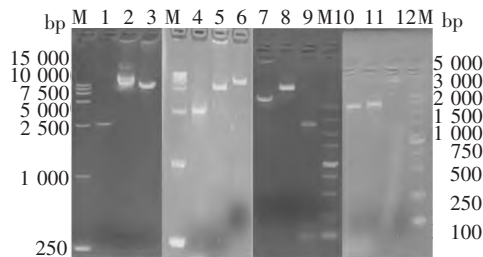
1.2.4 蛋白纯化 使用 5 mL lexCap SP 6FF 离子交换柱和 AKTA 液相色谱分析仪进行蛋白纯化. 蛋白酶液在 10 000 rpm 转速下离心 10 min,用透析袋固装好上清液并放在装有 pH 值为 5.0、物质的量浓度为 25 mmol·L⁻¹ 的柠檬酸缓冲液的烧杯中,用保鲜膜密封好放在 4 ℃ 冰箱中透析 2~3 d,期间最少换 5~7 次缓冲液. 之后收集液在 10 000 rpm 转速下离心 10 min,上清液使用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜抽滤,平衡液与洗脱液也需进行同样处理. 使用 15 mL 不含盐的 pH 值为 5.0、物质的量浓度为 25 mmol·L⁻¹ 的柠檬酸缓冲液以 1 mL·min⁻¹ 的流

速平衡预装柱,然后以相同的流速上样 8 mL 蛋白酶液,室温静置 30 min,使用 20 mL 不含盐的 pH 值为 5.0、物质的量浓度为 25 mmol · L⁻¹ 的柠檬酸缓冲液洗脱部分杂蛋白,最后使用 pH 值为 5.0、物质的量浓度为 25 mmol · L⁻¹ 的低盐柠檬酸缓冲液和物质的量浓度为 500 mmol · L⁻¹ 的高盐柠檬酸缓冲液进行梯度洗脱,直至出现蛋白峰值. 检测每一步收集液的酶活和蛋白浓度,并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定.

2 实验结果

2.1 重组载体的构建

如图 1 所示,16BGL-9K、16BGL-28a、16BGL-D-28a、16BGL-Z α A 都连接成功.

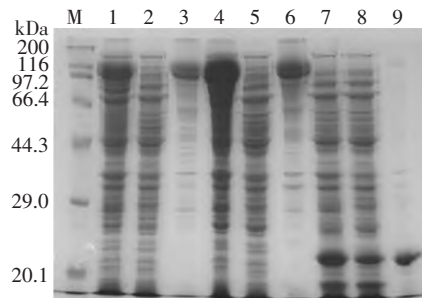


注:M 为 Mark;1、4、9、10 为 16BGL 基因;2 为 BGL-9K 重组质粒;3 为 pPIC9K 空载体;5、7 为 pET-28a 空载体;6 为 BGL-28a 重组质粒;8 为 BGL-D-28a 重组质粒;11 为 pGAPZ α A 空载体;12 为 16BGL-Z α A 重组质粒.

图 1 重组表达载体构建凝胶电泳图

2.2 重组蛋白的表达

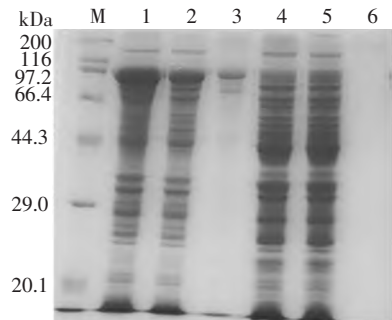
2.2.1 16BGL-28a 在 Rosetta 中的表达 如图 2 所示,16BGL-28a 重组蛋白在大肠杆菌 Rosetta 中实现高水平表达,但目的蛋白均为包涵体,破碎细胞上清液也没有酶的活性.



注:M 为 Mark;1~9 为 16BGL-28a 重组蛋白;1 为目的蛋白①号在破碎后的全细胞,2 为在破碎后的上清液,3 为在破碎后的沉淀;4 为目的蛋白②号在破碎后的全细胞,5 为在破碎后的上清液,6 为在破碎后的沉淀;7 为空载体 pET-28a 在破碎后的全细胞,8 为在破碎后的上清液,9 为在破碎后的沉淀.

图 2 16BGL-28a 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

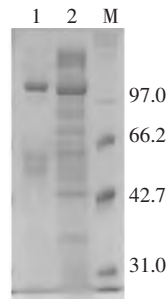
2.2.2 16BGL-D-28a 在 Rosetta 中的表达 如图 3 所示,16BGL-D-28a 重组蛋白在大肠杆菌 Rosetta 中实现了高水平表达,而且在破碎后上清液含有目的蛋白,这表明在胞内可溶性表达,但是酶也无活性. 另外,DNA 测序表明序列连接正确.



注:M 为 Mark;1 为目的蛋白在破碎后的全细胞,2 为在破碎后的上清液,3 为在破碎后的沉淀;4 为空载体 pET-28a 在破碎后的全细胞,5 为在破碎后的上清液,6 为在破碎后的沉淀.

图 3 16BGL-D-28a 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

2.2.3 16BGL-Z α A 在 GS115 中的表达 由于 16BGL-9K 不能电转到 GS115 中,所以后续的表达实验也无法进行. 因此,本文将 16BGL 与 pGAPZ α A 连接,并且成功电转到 GS115 中. 如图 4 和图 5 所示,16BGL-Z α A 重组蛋白在毕氏酵母 GS115 中表达且有活性. 由表 2 可知:蛋白质量浓度达到 23.723 mg · mL⁻¹,经过浓缩纯化后,质量浓度达到 0.646 mg · mL⁻¹;GC 纯度为 75% 左右,但仍达不到 10 mg · mL⁻¹ 的质量浓度和 95% 以上的 GC 纯度的结晶要求.

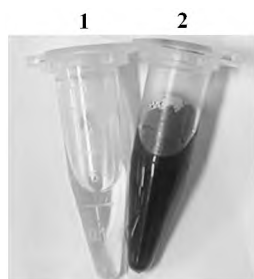


注:M 为 Mark;1 为在纯化后的蛋白酶液;2 为在浓缩后的原始酶液.

图 4 16BGL-Z α A 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

表 2 16BGL-Z α A 的蛋白纯化

蛋白酶液	蛋白质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	<i>O</i> _{D540}
原始酶	23.723	1.77
透析液	21.655	1.65
穿梭液	2.033	1.61
收集液	0.240	1.59
浓缩液	0.646	1.55



注:1 为对照组;50 μL 酶液与 450 μL 底物水杨苷未加热反应,在直接加 500 μL DNS 终止反应后煮沸冷却;2 为实验组:50 μL 酶液与 450 μL 水杨苷在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下加热反应 30 min,在再加 500 μL DNS 终止反应后煮沸冷却。

图 5 16BGL-Z α A 酶活检测图

3 讨论

能源在国家发展中被视为经济增长的重要推动力,有着举足轻重的作用^[11]。但化石等能源为不可再生资源且储量有限,在使用过程中容易造成环境污染问题。用可再生资源替代化石能源,可以减少化石燃料的使用并减少对环境的污染^[12-13]。木质纤维素在可再生生物质资源中占比最大(40% ~ 50%),其以纤维素生物质为原料,可转化为各种化学品(如乙二醇等)^[14]。纤维素需要 EG、CBH 和 BGL 协同降解,其中 BGL 是整个水解反应的限速酶,它可将纤维二糖转化为葡萄糖^[15],通过催化末端非还原性 β -D-葡糖基残基的水解并释放 β -D-葡萄糖。BGL 在许多领域(如纤维素降解、食品风味的改善等)中具有重要的应用价值,它存在于自然界许多植物、酵母、曲霉、木霉^[16]等细菌体内,可参与生物体的糖代谢,对维持生物体正常生理功能起着重要作用^[17]。此外,BGL 还能将在水果、蔬菜、茶叶中的风味前体物质水解为具有浓郁天然风味的香气物质。因此,近年来 BGL 受到学术界广泛关注,具有重要的理论和实用价值。

本文以 16BGL 为出发点,研究它与不同载体连接后在不同宿主上的表达情况。通过实验成功地筛选到了阳性克隆子,但在验证后发现表达情况各不相同。16BGL-9K 未能电转到毕氏酵母 GS115 上,其原因可能是重组载体片段过大;16BGL-28a 转化到大肠杆菌 Rosetta 上,筛选阳性克隆子接种到 TB 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 180 rpm 条件下培养 5 ~ 7 h,使用最终物质的量浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG^[18]和最终质量分数为 1.7% 的乳糖在 22 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜诱导可实现高水平表达,但极易形成包涵体且无活性。为了消除包涵体,可使重组蛋白分泌至周质空

间,周质空间的周质蛋白不仅能帮助重组蛋白正确折叠还有利于二硫键的生成。因此,在设计 16BGL 引物时,N 端加了分泌信号肽序列 DsbA^[19-20]。16BGL-D-28a 在相同条件下可实现高水平可溶性表达,但表达的酶经鉴定无活性;16BGL-Z α A 电转到毕氏酵母 GS115 中,涂板到 YPD 平板(含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 博来霉素)上,筛选阳性克隆子接种到 YPG 烧瓶中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 180 rpm 条件下培养 3 ~ 4 d,最终能组成分泌表达且有酶的活性,但蛋白纯化后的质量浓度较低,仅为 0.240 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。为了获得蛋白结晶,未来工作应集中于发酵罐小试研究,以获得更多的 16BGL。

从构建的重组表达载体在不同宿主中的表达情况来看,来源于真核菌株的基因在原核宿主中很难表达出有活性的蛋白,因为原核宿主缺乏蛋白翻译后修饰的功能,所以目的蛋白不能折叠为正确的 3 维结构,最终导致蛋白无活性。这为之后的研究提供了一些思路:来源于真核菌株的基因应在真核宿主中表达,尽量避免使用原核宿主。

4 参考文献

- [1] WATTG D. A new future for carbohydrate fuel cells [J]. Renewable Energy, 2014, 72(6): 99-104.
- [2] ZHAO Xihua, YI Shi, LI Hanxin. The optimized co-cultivation system of *Penicillium oxalicum* 16 and *Trichoderma reesei* RUT-C30 achieved a high yield of hydrolase applied in second-generation bioethanol production [J]. Renewable Energy, 2019, 136(1): 1028-1035.
- [3] GUO Hongliang, CHANG Yingju, LEE D J. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: research focuses [J]. Bioresource Technology, 2018, 252(12): 198-215.
- [4] SINGHANIA R R, PATEL A K, SUKUMARAN R K, et al. Role and significance of β -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production [J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 500-507.
- [5] SING A, PATEL A K, PANDEY A, et al. Genetic modification: a tool for enhancing β -glucosidase production for biofuel application [J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1352-1361.
- [6] TEUGJAS H, VÄLJAMÄE P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification [J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 105-117.
- [7] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. A colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Biochemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [8] HUANG Qiuxia, WANG Kexin, LI Hanxin, et al. Enhanc-

- cing cellulosic ethanol production through coevolution of multiple enzymatic characteristics of β -glucosidase from *Penicillium oxalicum* 16 [J]. *Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(19): 8299-8308.
- [9] SUN Tianxi, DING Xunliang. Confocal X-ray technology based on capillary X-ray optics [J]. *Reviews in Analytical Chemistry*, 2015, 34(1/2): 45-59.
- [10] 李琦,童欣怡,姜云鹏,等. 定点突变提高 β -木糖苷酶 Xln-DT 的酶活 [J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(2): 41-48.
- [11] ZANGOEI S, SALEHNIA N, KHODAPARAST M K, et al. Comparative study on the effect of alternative and fossil energy consumption on economic growth and foreign direct investment in selected countries using SUR approach [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(16): 19799-19809.
- [12] ZUO Miao, JIA Wenlong, FENG Yunchao, et al. Effective selectivity conversion of glucose to furan chemicals in the aqueous deep eutectic solvent [J]. *Renewable Energy*, 2021, 164(1): 23-33.
- [13] CAO Xincheng, LONG Feng, WANG Fei, et al. Chemoselective decarboxylation of higher aliphatic esters to diesel-range alkanes over the NiCu/Al₂O₃ bifunctional catalyst under mild reaction conditions [J]. *Renewable Energy*, 2021, 164(16): 1-13.
- [14] GU Jing, ZHANG Jun, WANG Yazhuo, et al. Efficient transfer hydrogenation of biomass derived furfural and levulinic acid via magnetic zirconium nanoparticles: experimental and kinetic study [J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 145: 112133.
- [15] SINGHANIA R R, PATEL A, PANDEY A, et al. Genetic modification: a tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1352-1361.
- [16] WEN Zhiyou, LIAO Wei, CHEN Shulin. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(9): 3087-3094.
- [17] ARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35(1): 58-66.
- [18] MA Zhiyu, ZHANG Jie, GUO Junpei, et al. Construction of expression vector for porcine gastrin-releasing peptide fusion protein [J]. *Agricultural Biotechnology*, 2022, 11(3): 72-74.
- [19] SONNENDECKER C, WEI Ren, KURZE E, et al. Efficient extracellular recombinant production and purification of a *Bacillus cyclodextrin* glucanotransferase in *Escherichia coli* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 87.
- [20] ZHOU Yizhou, PETER L, GAN Yutian, et al. Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 47.

The Heterologous Expression of *Penicillium oxalicum* 16 β -Glucosidase

ZHANG Nian, LIN Yingying, QI Kedan, WANG Guoping, OUYANG Bei, ZHAO Xihua *

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: The heterologous expression of β -glucosidase (16BGL) of a eukaryotic strain *Penicillium oxalicum* 16 in different hosts is explored. The 16BGL gene is ligated with pPIC9K, pET-28a, and pGAPZ α A respectively, and transformed into *Pichia pastoris* GS115 or *Escherichia coli* Rosetta (DE3), the positive clones are screened, and their expression is compared and analyzed. 16BGL-9K can not be successfully transferred into GS115 by electroporation. 16BGL-28a in Rosetta achieves a high level of expression after induction at 22 °C with IPTG at a final concentration of 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 1.7% lactose, but it is very easy to form inclusion bodies without activity. In order to eliminate the influence of inclusion bodies, a secretion signal peptide DsbA is added in the N-terminal of 16BGL, 16BGL achieves a high level of soluble expression under the same conditions, but no activity is detected by SDS-PAGE. 16BGL-Z α A is transferred to GS115, the positive clones are screened and inoculated into YPG, and the supernatant possesses a protein concentration of 23.723 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and shows an enzymatic activity. The eukaryotic gene 16BGL is suitable for expression in eukaryotic hosts.

Key words: β -glucosidase; heterologous expression; enzymatic activity

(责任编辑:刘显亮)