

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2015.05.001

东方肉座菌 GH10 家族木聚糖酶基因的克隆及异源表达

吴金连, 薛 勇, 黎海龙, 刘 健, 甘礼惠, 龙敏南
(厦门大学 能源学院, 厦门 361102)

摘 要 木聚糖酶是降解半纤维素最主要的酶, 对于开发可再生生物能源具有重要的应用价值。分别以东方肉座菌(*Hypocrea orientalis*) EU7-22 的基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 利用染色体步移和 PCR 技术首次克隆获得该菌 GH10 家族木聚糖酶 III 的基因(*xyn III*) 并对其进行生物信息学分析。结果表明: 该基因全长 1283 bp(*gxyn III*), 含有 3 个内含子; CDS 序列为 1044 bp(*cxyn III*) 编码 347 个氨基酸, N 端含有一个 16 aa 的信号肽序列; XYN III 氨基酸序列与 *Trichoderma pseudokoningii* 的 endoxylanase 具有较高的同源性。经生物信息学分析, XYN III 成熟蛋白可能含有 18 个 N-糖基化位点, 其理论等电点(pI) 为 6.14, 蛋白质分子质量为 36.55 ku, 属于亲水性蛋白; SWISS-Model 建模预测, XYN III 成熟蛋白中含有 11 个 α 螺旋, 其核心结构为 8 个 β 折叠片围成一个柱状结构。同时将编码成熟蛋白的基因片段 *mxyn III* 与 pPIC9K 质粒连接构建表达载体后转化毕赤酵母, 对重组子表达产物进行酶活检测显示该基因能在毕赤酵母中表达有生物活性的 XYN III 并分泌到胞外, 发酵液中的木聚糖酶活在诱导培养 168 h 后可达到 127.5 IU/mL。

关键词 东方肉座菌; 木聚糖酶 III; 基因克隆; 生物信息学分析; 异源表达

中图分类号 Q786

文献标识码 A

文章编号 2095-1736(2015)05-0001-06

Cloning and heterologous expression of a novel GH10 xylanase gene from *Hypocrea orientalis* EU7-22

WU Jin-lian, XUE Yong, LI Hai-long, LIU Jian, GAN Li-hui, LONG Min-nan
(College of Energy, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract Endo-1,4-xylanase (E. C. 3.2.1.8) is the major enzyme to the conversion of hemicelluloses into xylo-oligosaccharide. In this research, a novel GH10 xylanase III (*xyn III*) gene was cloned from *Hypocrea orientalis* EU7-22 by chromosome walking and PCR. The results showed that the DNA fragment (1283 bp) encoding *xyn III* (*gxyn III*) contained three introns. The CDS of *xyn III* (*cxyn III*) encoded 347 amino acids of putative mature protein and a 16 aa signal in N terminator. The amino acid sequence of *xyn III* is highly homologous with the endoxylanase of *Trichoderma pseudokoningii*. The bioinformatics analysis showed that the theoretical isoelectric point and the molecular weight of putative mature protein of XYN III were 6.14 and 36.55 ku, respectively. It is a soluble hydrophilic protein containing 18 N-glycosylation sites. The 3D structure predicted with SWISS-Model showed that XYN III protein contained 11 alpha helices and 8 extended strands. A recombinant plasmid pPIC9K-*xyn III* was constructed and then transformed into *Pichia pastoris*. The transformant identified by PCR was induced to produce XYN III enzyme with 1% methanol. And after 168 hours induced expression, the produced crude enzyme was detected to reach a high enzymatic activity of 127.5 IU/mL.

Keywords *Hypocrea orientalis*; xylanase III; gene clone; bioinformatics analysis; heterologous expression

收稿日期: 2015-02-05; 修回日期: 2015-02-25

基金项目: 国家自然科学基金(21303142, 31170067); 福建省海洋高新产业发展专项项目(闽海洋高新[2014]25号); 厦门市海洋经济发展专项资金项目(14GZP59HJ29)

作者简介: 吴金连, 硕士, 研究方向为生物能源, E-mail: jinlwu@foxmail.com; 薛 勇, 博士, 研究方向为生物能源, E-mail: lxylinyu@163.com; 吴金连和薛勇为共同第一作者;

通信作者: 龙敏南, 博士, 研究方向为生物质资源利用, E-mail: longmn@xmu.edu.cn。

半纤维素的结构主要由 β -D-吡喃木糖残基经 β -1,4-糖苷键连接而成的主链以及各种侧链(如葡萄糖醛酸侧链、阿拉伯糖侧链等)组成,因此半纤维素的彻底降解需要木聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、葡萄糖醛酸酶等的协同作用^[1]。其中木聚糖酶是降解半纤维素过程中最重要的水解酶。木聚糖酶(EC 3.2.1.8) 是一类能够作用于木聚糖主链的糖苷键并生成木糖或低聚木糖的水解酶,在食品、造纸、纺织、医药及能源等领域具有重要的潜在应用价值^[2]。木聚糖酶属于糖苷水解酶(Glycosyl Hydrolases, GH) 在 GH5、7、8、10、11、26 和 43 家族中均存在^[3]。其中 GH10 和 GH11 家族是木聚糖酶中被研究得最多的两个家族,目前已从 *Malbranchea pulchella*、*Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1、*Myceliophthora Thermophila*、*Thermoascus aurantiacus* 等微生物中克隆得到了 GH10 木聚糖酶^[4-7]。但是到目前为止,在木霉属中仅有 2 个 GH10 木聚糖酶基因(Accession: EU360940.1 和 AB036796.1) 被克隆。

木聚糖酶在自然界中分布广泛,可从动物、植物和微生物中直接分离纯化或者定向诱导表达获得,目前木聚糖酶的生产多数依靠真菌、细菌等微生物的发酵^[8]。但是木聚糖酶在天然生物中表达水平低,且酶系组分复杂,分离纯化过程较为复杂且成本高限制了其大规模生产应用。利用基因工程技术从天然菌株中克隆木聚糖酶基因并实现其在合适的宿主中高效表达,可以克服以上缺点,同时还能获得特异性的木聚糖酶。而毕赤酵母就是一种较为理想的真核蛋白表达宿主。

东方肉座菌(*Hypocrea orientalis*) EU7-22 是本课题组通过筛选、诱变获得的一株木霉属(*Trichoderma*) 真菌。已有研究表明,该菌株不仅具有较高的滤纸酶、 β -葡萄糖苷酶等纤维素酶活性^[9],而且具有较高的 GH10 和 GH11 家族木聚糖酶活力。通过对该菌株粗酶液进行 SDS-PAGE 及 LC-MS/MS 分析,推测 GH10 木聚糖酶是该菌株表达的主要木聚糖酶^[10]。目前,本课题组已经成功地从该菌株中克隆了外切葡聚糖酶基因、内切葡聚糖酶基因及 β -葡萄糖苷酶基因等纤维素酶基因,并实现了葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中的高效表达^[9-10]。同样地,东方肉座菌 EU7-22 中的两个 GH11 木聚糖酶基因也被成功克隆并在毕赤酵母中重组表达^[12-13],但 GH10 木聚糖酶的基因重组表达仍属空白。因此,有必要从东方肉座菌 EU7-22 中克隆 GH10 木聚糖酶的 *xyn III* 序列(*gxyn III*) 和 CDS 序列(*cxyn III*) ,对其进行生物信息学分析,并利用真核表达技术构建 *xyn III* 的毕赤酵母重组表达菌株,以实现其胞外分泌高效表达,从而为进一步研究 XYN III 的酶学性

质以及蛋白工程研究提供基础材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂

TaKaRa Ex Taq genome walking kit, DNA Marker 和 pMD19-T 载体均购于宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;其他试剂均购于上海生工生物工程技术有限公司和国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 菌株及培养基

菌株: 东方肉座菌(*Hypocrea Orientalis*) EU7-22, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 值 7.2; 固体培养基加入 2% 的琼脂粉。

NN 培养基: 葡萄糖 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, KH₂PO₄ 15 g/L, MgSO₄ 0.6 g/L, CaCl₂ 0.6 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.005 g/L, MnSO₄ · H₂O 0.0016 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 0.0014 g/L, CoCl₂ 0.002 g/L, 121℃ 高压灭菌。

诱导产酶培养基: 玉米芯粉 20 g/L, 麸皮 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, CaCl₂ 5 g/L, MgSO₄ 5 g/L, KH₂PO₄ 2.5 g/L, Tween-80 4 mL/L, 调 pH 值至 5.5, 121℃ 高压灭菌。

YPD、MD、MM、BMMY 培养基见 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取

将东方肉座菌 EU7-22 在 NN 培养基中培养 48 h 后, 过滤收集菌体, 按 CTAB 法提取东方肉座菌 EU7-22 总 DNA^[14-15]。

1.2.2 总 RNA 提取

将东方肉座菌 EU7-22 固体 NN 平板活化后, 转接至诱导产酶培养基培养 36 h, 离心收集菌体; 菌体用液氮充分研磨后转入 1.5 mL 无菌离心管中, 加入 1 mL TRIzol 裂解液, 混匀至无沉淀后, 室温静置 5 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 静置 5 min 后, 12 000 g 4℃ 离心 15 min, 收集上清弃沉淀。加入等体积的异丙醇, 混匀后室温静置 10 min, 离心后弃上清液, 沉淀用 75% 乙醇洗涤后, 用 DEPC 水溶解, -80℃ 保存备用。

1.2.3 *xyn III* 部分片段的克隆

根据 GenBank 中里氏木霉(accession number: AB036796.1) 和康宁木霉(accession number: EU360940.1) 的 GH10 木聚糖酶基因的保守区域设计引物 Pxyn3-F 和 Pxyn3-R(表 1), 以东方肉座菌基因组 DNA 为模板克隆 *xyn III* 的部分序列(*Pxyn III*)。PCR 反

应程序如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经过胶回收后连接到 pMD19-T 载体上, 然后转化到 *E. coli* DH5 α 感受态, 先通过氨苄青霉素 LB 抗性平板筛选, 再以 M13 通用引物对阳性克隆子进行筛选和测序(上海生工), 并将测序结果在 NCBI 中进行比对。

1.2.4 *Pxyn* III 上游和下游片段克隆

根据 TaKaRa 的染色体步移试剂盒说明书, 结合文献 [6], 设计扩增 *Pxyn* III 片段上下游序列的巢氏引物, 如表 1 所示: Pxyn3-U1, Pxyn3-U2, Pxyn3-U3 为克隆 *Pxyn* III 上游序列的巢氏引物; Pxyn3-D1, Pxyn3-D2, Pxyn3-D3 为克隆 *Pxyn* III 下游序列的巢氏引物。PCR 反应体系和 PCR 反应程序都根据染色体步移试剂盒的说明书来设计。通过 3 次巢氏 PCR 得到的 *Pxyn* III 上下游片段分别经过胶回收后连接 pMD19-T 载体并转化 *E. coli* DH5 α 感受态, 然后通过氨苄青霉素抗性平板筛选, 再以 M13 通用引物对阳性克隆子进行筛选和测序(上海生工)。

1.2.5 *cxyn* III 的克隆

通过 DNAMAN 软件分析 *Pxyn* III 及其上下游片段的序列并对其进行拼接, 得到包括 *xyn* III 和其上下游片段的序列, 将此序列通过 NCBI 比对确定 *gxyn* III 序列。根据 *gxyn* III 序列设计引物 xyn3-F 和 xyn3-R 扩增 *xyn* III 的 CDS 序列。PCR 的模板是通过 PrimeScriptTM II Reverse Transcriptase 试剂盒反转录得到的单链 cDNA。PCR 程序如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 80 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经过胶回收后连接 pMD19-T 载体并转化 *E. coli* DH5 α 感受态, 先通过氨苄青霉素抗性平板筛选, 再以 M13 通用引物对阳性克隆子进行筛选和测序(上海生工), 并将测序结果在 NCBI 中进行比对。

表 1 东方肉座菌木聚糖酶 III 基因克隆引物

Table 1 The primers used for cloning *xyn* III from *Hypocrea orientalis* EU7-22

引物名称	引物序列(5'-3')
Pxyn3-F	ACGTCATCTTGTGCTCCTG
Pxyn3-R	AAACAGAAGAGGGTTGGTGC
Pxyn3-U1	CATGCTGTTCTCCGGCGTCACC
Pxyn3-U2	GTGCCGAAGTAGAGCTTGCTCTG
Pxyn3-U3	CTTGCCGGTCCCAGAGGCTG
Pxyn3-D1	TGTGTGGGGTATCAGTGACAAGGTG
Pxyn3-D2	CACCGACGAATGATTACACGCAAG
Pxyn3-D3	GAGAGACCTTCTACAGGTAGCCAATC
xyn3-F	ATGAAGGCAAACGTCATCTTGT
xyn3-R	CTACTGTAAGATGCTAACAAATGCTG
cxyn3-F	GGAATTCCTCCACCGAGCCCAT
cxyn3-R	ATAAGAATCGCGCCGCTACTGTAAGATGCTAACAAATGCTG

注: 下划线分别为 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点序列。

1.2.6 *xyn* III 序列的生物信息学分析

将克隆获得的 *gxyn* III 序列与 *cxyn* III 序列用 DNAMAN 软件分析基因内含子; 将 *gxyn* III 序列与 *cxyn* III 在 GenBank 数据库中进行同源性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 SignalP 4.1 软件分析 N-末端信号肽序列(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 分子进化树的构建使用软件 MEGA6.06 软件中的 Neighbor-Joining 法完成; 用 ProtParam 工具分析 *cxyn* III 编码蛋白质的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点等理化性质(<http://web.expasy.org/prot-param>); 利用 NetNGlyc 软件进行蛋白质 N-糖基化位点预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>); 利用 Prosite motif search 对蛋白质的功能位点进行检索(<http://prosite.expasy.org/>); 利用 SWISS-Model 在线软件预测和模拟蛋白质的三级结构(<http://swiss-model.expasy.org/workspace/index.php?>)^[11,15]。

1.2.7 *xyn* III 在毕赤酵母中的表达

根据 *cxyn* III (去掉信号肽) 的基因序列设计含有 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点的引物 cxyn3-F/R, 利用该引物克隆 *xyn* III 并构建含有 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点的 T 载体 pMD19-T-*xyn* III, 具体方法步骤参照 1.2.5。将 pMD19-T-*xyn* III 接种于 LA 液体培养基扩大培养, 大量提取 pMD19-T-*xyn* III 质粒, 用 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切, 胶回收目的片段, 定向插入到带有高效甲醇诱导启动子 AOX 的毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上的 *Eco*R I 和 *Not* I 位点之间, 形成重组质粒 pPIC9K-*xyn* III。重组质粒均经酶切和测序鉴定。

将重组质粒 pPIC9K-*xyn* III 用 *Sal* I 线性化后, 电击转化毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 感受态细胞后, 涂布于缺少组氨酸的 MD 平板, 28℃ 条件下培养 2~3 d 至转化子出现。MD 平板上长出的转化子用 pPIC9K AOX 通用引物和 cxyn3-F/R 引物进行菌落 PCR 验证。根据扩增出的 PCR 产物片段的大小就可判断目的基因的插入是否存在。

将 PCR 验证正确的转化子菌株进行扩大培养后, 利用 1% 甲醇进行诱导表达, 每隔 24 h 取样并测定粗酶液的木聚糖酶活力。

1.2.8 木聚糖酶活性测定

采用改进的 DNS 法测定^[17] 木聚糖酶活。取 0.2 mL 适当稀释的粗酶液于具塞试管中, 加入 1.8 mL 1% 山毛榉木聚糖底物, 于 50℃ 下温育 10 min 后加入 3 mL DNS 试剂终止反应。沸水浴 5 min 显色后, 冷却至室温, 定容, 测 $D_{540\text{nm}}$ 吸光值。同时, 以加入 0.2 mL 离子

水代替粗酶液为空白对照。

木聚糖酶活力的定义为:在上述反应条件下,每分钟水解1%木聚糖底物释放1 μmol 还原糖所需的酶量为1个酶活力单位(IU)。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶III基因部分片段的克隆

以东方肉座菌 EU7-22 DNA 为模板,利用 Pxyn3-F 和 Pxyn3-R 以引物获得的东方肉座菌木聚糖酶III基因的部分片段大小约1.2 kb(图1A),测序后得到的 Pxyn III 大小为1216 bp,通过 NCBI 比对结果分析得到这个基因片段是属于木聚糖酶III基因的部分片段。

2.2 Pxyn III 上游和下游片段克隆

以引物 Pxyn3-U1 和 genome-walking 试剂盒提供的简并引物 AP1、AP2、AP3、AP4 进行第1次巢氏 PCR,然后将产物进行适当稀释后为模板,利用 Pxyn3-U2 和简并引物 AP1、AP2、AP3、AP4 进行第2次巢氏 PCR,最后以第2次巢氏 PCR 的产物为模板,利用 Pxyn3-U3 和简并引物 AP1、AP2、AP3、AP4 进行第3次巢氏 PCR。对3次 PCR 结果进行电泳分析,发现选择 AP2 简并引物时能得到 Pxyn III 的上游片段,AP2 引物和 Pxyn3-U1、Pxyn3-U2、Pxyn3-U3 3次巢氏 PCR 的结果见图1B。从图中可知第3次巢氏 PCR 得到了相应的条带,胶回收第二泳道的1.2 kb左右的条带,通过测序该得到1203 bp的片段。以引物 Pxyn3-D1、Pxyn3-D2、Pxyn3-D3 和简并引物 AP1、AP2、AP3、AP4 克隆 Pxyn III 下游序列,实验过程同上游序列的克隆过程。经过3次巢氏 PCR 后发现下游克隆最适合的简并引物也为 AP2 3次巢氏 PCR 的结果见图1C,从图中可以看出第3次巢氏 PCR 的产物浓度也很低,胶回收第二泳道的 PCR 产物(约1.6 kb)进行后续实验,测序得到1654 bp的基因片段。

2.3 cxyn III 的克隆

将 Pxyn III (1216 bp) 和染色体步移法得到的 Pxyn III 上游序列(1203 bp)和下游序列(1654 bp)通过 DNAMAN 比对和拼接后得到3923 bp,将此序列通过 NCBI 比对和 DNAMAN 等软件分析得到东方肉座菌木聚糖酶III在基因组上的长度为1283 bp,其上游序列为1164 bp,下游序列为1476 bp。以引物 xyn3-F 和 xyn3-R 从东方肉座菌基因组 DNA 克隆 gxyn III 序列(图1D)并从 cDNA 克隆 cxyn III 序列(图1E),其大小分别约为1.2 kb和1.0 kb,测序得到大小分别为1283 bp和1044 bp。之后将 cxyn III 序列信息成功提交到 GenBank 数据库,登录号为:KP641167。

2.4 木聚糖酶基因序列的生物信息学分析

2.4.1 木聚糖酶基因序列内含子及同源性分析

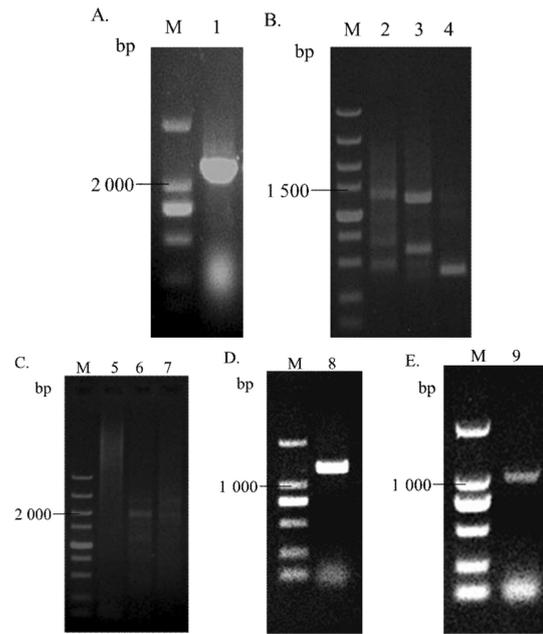


图1 xyn III 片段的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Cloning of xyn III

M—DNA Marker; 1—Pxyn III; 2—4—Pxyn III 上游第1,2,3次 PCR; 5—7—Pxyn III 下游第1,2,3次 PCR; 8—gxyn III; 9—cxyn III。

总 DNA 克隆得到的木聚糖酶III基因 gxyn III 全长1283 bp,总 RNA 克隆得到的木聚糖酶III基因 cxyn III 全长1044 bp, DNAMAN 软件分析得知 gxyn III 基因含有3个内含子,位于515~600 bp、837~926 bp和1129~1191 bp处,3个内含子都符合 GT-AG 规则。利用 Primer Premier 5.0 将 cxyn III 翻译成相应氨基酸序列(命名为 XYN III)并利用 NCBI 中的 Protein blast 分析,结果显示:cxyn III 编码的蛋白质属于糖苷水解酶(GH)10 家族,与拟康氏木霉 *Trichoderma pseudokoningii* 内切木聚糖酶(Accession: ABY71931.1)氨基酸序列同源性最高,达到98%。选择与 XYN III 同源性大于60%以上的21个木聚糖酶和3个糖苷水解酶11家族的木聚糖酶,使用 MEGA6.06 软件的 NJ 法构建包括 XYN III 在内的25个酶的系统进化树(图2)。从图2中可以看出 XYN III 与拟康氏木霉 *Trichoderma pseudokoningii* 内切木聚糖酶进化上最接近,其次是里氏木霉的木聚糖酶(Accession: XP 006962419.1),与其他木霉的 GH10 家族的木聚糖酶都在同一个分支,说明 XYN III 是木霉属的 GH10 家族木聚糖酶。

2.4.2 信号肽分析

用 SignalP 4.1 软件分析 cxyn III 编码的氨基酸序列 XYN III 结果显示:该酶蛋白含有一个信号肽,由 N-末端的前1~16个氨基酸(MKANAILCLLAPLIAA)组成。由此推测,东方肉座菌 EU7-22 XYN III 的成熟蛋白有331个氨基酸。

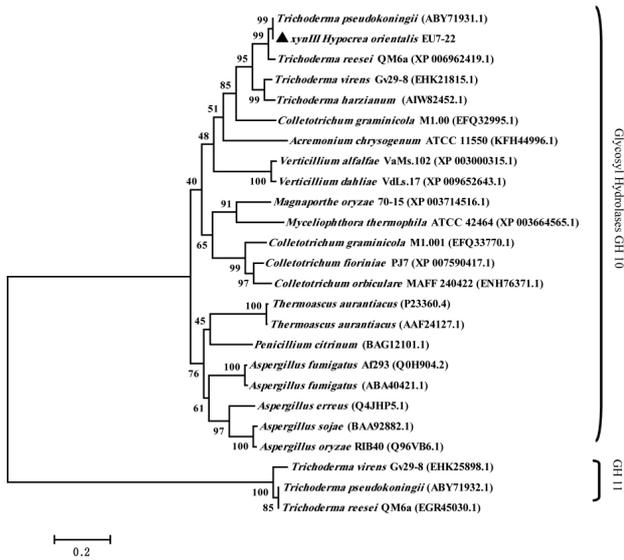


图 2 木聚糖酶 III 基因的系统进化树分析

Fig 2 Phylogenetic tree analysis of *xyn III*

注: 使用 MEG6.06 软件以 Neighbor-Joining 法构建 25 个木聚糖酶氨基酸序列的系统进化树, 节点的数值代表步长值。

2.4.3 基本理化性质分析

ProtParam 分析表明, 东方肉座菌 EU7-22 *XYN III* (去掉信号肽) 有 331 个氨基酸, 该蛋白理论相对分子质量为 36.55 ku, 等电点 pI 为 6.14。负荷残基总数 (Asp + Glu) 为 33, 正电荷残基总数 (Arg + Lys) 为 31, 分子式为 $C_{1624}H_{2551}N_{497}O_{497}S_3$, 原子总数为 5134; 脂防系数为 92.24, Grand average of hydropathicity (GRAVY) 亲水性评估为 -0.320, 为亲水性蛋白。

2.4.4 糖基化分析

NetNGly 分析显示, 东方肉座菌 EU7-22 *XYN III* 酶蛋白可能含有 18 个 N-糖基化位点 (N^4 VIL, N^{34} LTE, N^{77} AAI, N^{92} SMK, N^{101} NQG, N^{102} QGQ, N^{107} WGD, N^{116} FAQ, N^{121} GKL, N^{141} NIN, N^{142} INN, N^{144} NAD, N^{145} ADT, N^{175} EIF, N^{179} EDG, N^{217} DYN, N^{220} LDS, N^{230} GLK, N^{291} DYT, N^{302} VSK, N^{325} PLL, N^{332} FNP, N^{334} PKP 和 N^{340} SIV), 见图 3。

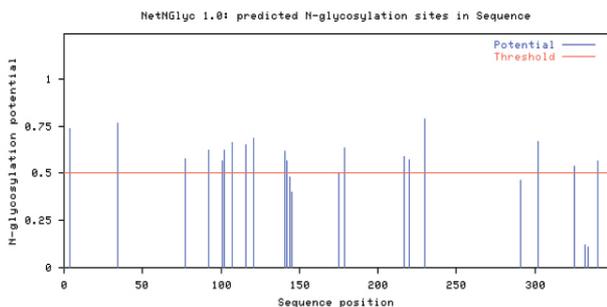


图 3 *XYN III* 酶蛋白 N-糖基化位点分析

Fig 3 N-glycosylation analysis of the enzyme of *XYN III*

注: Threshold = 0.5, 为 N 糖基化位点的临界值, 数值超过 0.5 可能为糖基化位点, 数值越高, 引起 N 糖基化的可能性越大。

2.4.5 蛋白 Prosite motif search 分析及三级结构预测

利用 Prosite motif search 对蛋白质的功能位点进行 分析, 分析发现: 该 *XYN III* 蛋白可能含有 2 个 N-糖基化位点 (N^{18} LTE 和 N^{286} VSK), 8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 5 个 N-豆蔻酰化位点。

利用 SWISS-Model 对 *XYN III* 蛋白质进行同源建模。通过 SWISS-Model 在线预测, *XYN III* 与蛋白质数据库 (PDB) 编号为 1K6A (来自 *Thermoascus aurantiacus* xylanase I^[18]) 的相似度为 65.89%。以 PDB: 1K6A 为模板序列, 预测 *XYN III* 第 30~331 位氨基酸残基的三级结构, α 螺旋和 β 折叠分别标记为红色和黄色, 不规则卷曲为白色, 得到东方肉座菌 EU7-22 *XYN III* 蛋白的三维结构模型 (见图 4)。该模型含有 11 个 α 螺旋, 其核心结构为 8 个 β 折叠片围成一个柱状结构。

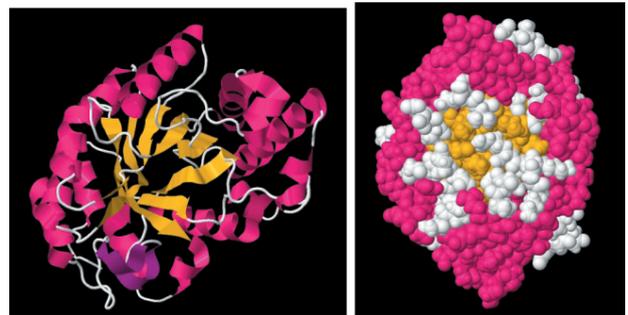


图 4 *XYN III* 蛋白的三维结构模拟图

Fig 4 Simulation of *XYN III* protein three-dimensional structure

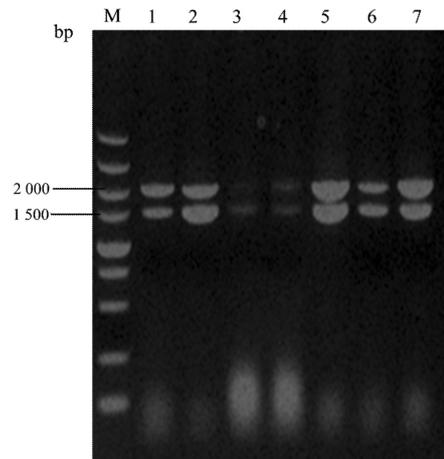


图 5 菌落 PCR 鉴定阳性转化子

Fig 5 Identification of the recombinant transformants by colony PCR. M—Protein marker; 1—7—The transformants; 注: 1500 左右的条带为与目的基因相关的片段, 2000 左右的条带为 AOX1 基因片段。

2.5 *xyn III* 在毕赤酵母中的表达

成功构建了 pPIC9K-*mxyn III* 重组表达质粒, 成功地转化进毕赤酵母中, 经过 MD 平板筛选后的转化子利用菌落 PCR 鉴定, 结果如图 5。由图 5 可知, 获得了

若干株阳性转化子,将这些阳性转化子用 G418 抗性筛选出高拷贝转化子,高拷贝的转化子再点接于 MM 平板上进行甲醇利用表型的鉴定。筛选的高拷贝转化子用 YPD 培养基扩大培养后,用 1% 甲醇诱导表达,在上清液均检测到木聚糖酶活力。筛选出产木聚糖酶活较高的菌株进行甲醇诱导表达,每隔 24 h 取样收集到的上清液按照 1.2.8 所述的方法测定木聚糖酶活性,实验结果(图 6)表明: *xyn III* 在毕赤酵母中实现了异源高效表达,随着诱导时间的增加,发酵液中的木聚糖酶活也不断增加,在诱导培养 168 h 后达到了 127.5 IU/mL。

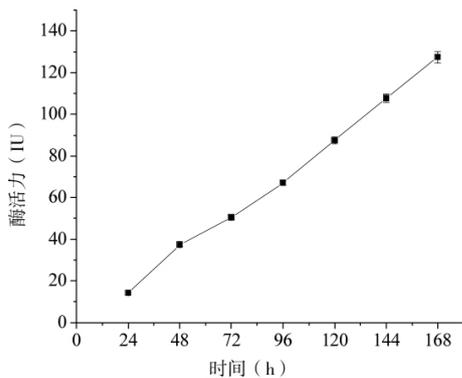


图 6 重组转化子 GS115(pPIC9K-*mxyn III*) 的诱导产酶曲线

Fig 6 Time course of xylanase production of GS115 (pPIC9K-*mxyn III*) transformants

3 讨论

本研究使用染色体步移等基因克隆技术,首次从东方肉座菌 EU7-22 基因组中克隆得到了 GH10 家族木聚糖酶的 cDNA 序列,该序列编码一个由 331 个氨基酸组成的蛋白,N 端包括一个由 16 个氨基酸组成的信号肽(见图 7)。经过生物信息学分析,该基因编码的蛋白酶属于 GH10 家族木聚糖酶,且与拟康氏木霉内切木聚糖酶有最高的同源性。

在真核微生物中所产的木聚糖酶被糖基化是比较普遍的,通常认为糖基化不仅利于酶抵御极端环境,而且也是木聚糖酶多样性的重要原因之一^[2]。预测蛋白的 N 糖基化和理化性质,对于蛋白的酶学性质测定具有重要的指导作用。如表达的酶蛋白实际分子量大小以及出现多个蛋白条带的原因、酶活性的高低、不同 pH 值下酶活高低等,可能与酶蛋白的糖基化或理化性质有关。因此,对 *XYN III* 进行了 N 糖基化预测分析和理化性质分析。此外,通过对东方肉座菌 *XYN III* 蛋白功能位点预测以及蛋白三级结构模拟,不仅有利于对 *xyn III* 和 *XYN III* 的进一步了解,而且为今后构建具有高催化活性的酶蛋白突变体提供依据^[19]。在此基础上,本研究首次成功地对东方肉座菌 GH10 家族木聚糖酶

基因 *xyn III* 进行了克隆以及实现了其在毕赤酵母中的高效表达,为 *XYN III* 的蛋白功能研究奠定了基础。获得该酶的酶学性质是该酶大规模生产及应用的前提,因此,该酶的酶学性质以及一些潜在的特性有待进一步研究。

```
1 ATGAAGGCAAACGTCATCTTGTGGCTCTGGCCCTCCGCCCCCTAA TCGCCGCCCTTCCCACCGAG
[M K A N V I L C L L A P L I A A ] L P T E
61 CCCATCCCCCTCGACCCCGA GCTCGCCGCCCTCCGCGCA ACCTACCGA GCGCACCC
P I P L D P E L A A L R A N L T E R T P
121 GACCTCTGGGACCCCAAGCGCCCAAGCATCGACCGCTCATCAAGCGCAGAGGCAAG
D L W D R Q A A Q S I D Q L I K R R G K
181 CTCTACTTCGGCACGGCCACCGACCGGGCTCTCCAGCGGAGAAGAA CGCGGCATC
L Y F G T A T D R G L L Q R E K N A A I
241 ATCCAGGCGGACTCGGCCAGGTGACGCGGAGAACAGCATGAAGTGGCAGTCGCTCGAG
I Q A D L G Q V T P E N S M K W Q S L E
301 AACAAACAGGGCCAGTACAACCTGGGGAGACGCGACTACCTGTCAACTTTGCCACGAG
N N Q G Q Y N W G D A D Y L V N F A Q Q
361 AACGGGAAGCTGATTCGCGCCACACGCTCATCTGGCATTGCGAGTCCGCTGGTGGT
N G K L I R G H T L I W H S Q L P A W V
421 AACAAATCAATAACCGGATACGTTGCGG CAGGTTCATAGGACGCTGT TCTACTGTT
N N I N N A D T L R Q V I R T H V S T V
481 GTTGGGCGGTACAAGGGCAA GATTCGTGCTTGGGACGTGGTCAATGAAATCTTCAACGAG
V G R Y K G K I R A W D V V N E I F N E
541 GACGGAACACTGCG GTCTTCGCTTTCCAG GCTCCTAGGCGA GGAGTTGTCTCGATT
D G T L R S S V F S R L L G E E F V S I
601 GCCTTCGCGCTGCTGAG A CGCGACCTTCTGCCGTCTTACATCAA CGACTACAAT
A F R A A R D A D P S A R L Y I N D Y N
661 CTCGACGCGCCACTTATG GCAAGGTCAATGGTGAAGTCTTACGTTTCCAAGTGGATT
L D S A T Y G K V N G L K S Y V S K W I
721 TCTCAAGGAGTGCCCATGACGGCATTGGTAGCCAATCTCATCTGAGCC CGCGGGAGCT
S Q G V P I D G I G S Q S H L S P G G A
781 TCCGGCACCTGGGTGCGCTT CAGCAGCTGGCGACGGTCCGCTACCGA GGTGGCCATT
S G T L G A L Q Q L A T V P V T E V A I
841 ACCGAGCTTGATATTCAGGGCGCACGCAATGATTACGCAAGTTGT TCAAGCGTGC
T E L D I Q G A P T N D Y T Q V V Q A C
901 TTGAATGTCTCAAGTGGTGGGATTCAGTGAGGATCAAGTGGGATCAAGTGGGATCGTGG
L N V S K C V G I T V W G I S D K D S W
961 CGTGACGACCAACCTCTTCTGTTTGAITCAACTCAACCCCAAGCC GGCATACAAC
R A S T N P L L F D S N F N P K P A Y N
1021 AGCAATGTTA GCATCTTACAGTAG
S I V S I L Q
```

图 7 *xyn III* cDNA 序列和氨基酸序列

Fig 7 cDNA and amino acid sequence of *xyn III*

注:带有下划线的表示起始密码子和终止密码子;带有方框的表示信号肽序列。

参考文献:

- [1]吴金莲,薛勇,黎海龙,等.半纤维素侧链降解酶—— α -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 新能源进展,2014,2(5):327-333.
- [2]Kulkarni N, shendye A, Mala R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23: 411-456.
- [3]Juturu V, Wu J C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(6): 1219-1227.
- [4]Kolenova K, Vrsanska M, Biely P. Mode of action of endo-beta-1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides[J]. J Biotechnol, 2006, 121(3): 338-345.
- [5]Ribeiro L F C, De Lucas R C, Vitcosque G L, et al. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 115.
- [6]Hung K S, Liu S M, Tzou W S, et al. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(6): 1257-1263.

(下转 10 页)

域蛋白难于结晶的问题 我们设计了一系列 μ HD 蛋白截短体均未能获得可溶性蛋白或晶体,仅 622 ~ 891 截短体不影响蛋白可溶性表达且能结晶,说明其氮端前 13 个氨基酸会影响晶体的形成。 μ HD(622 ~ 891) 蛋白含 3 个 Cys,由于 Cys 侧链巯基易氧化,导致蛋白性质不均一,因此分别将第 647、761 和 889 位 Cys 突变成 Ser,发现 647 和 761 位 Cys 突变后蛋白出现不溶,说明 647 和 761 位的 Cys 对其正确折叠是必需的。因此,仅将第 889 位 Cys 氨基酸突变为 Ser,使蛋白性质更加均一。目的蛋白 N 端连接 $6 \times$ His 标签,便于利用镍柱亲和层析纯化,提高了纯化效率,再经后续离子交换和分子筛层析纯化,蛋白纯度达到 95% 以上。

本研究通过构建 μ HD 原核表达质粒并表达,经亲和层析、离子交换和分子筛层析,获得了浓度、纯度和均一性均达到结晶要求的 FCHO1 μ HD 结构域蛋白,并筛选出晶体。多次优化结晶条件后,获得分辨率约 2.1 Å 的高分辨率蛋白晶体,为解析人源 FCHO1 μ HD 结构域的晶体结构,进一步了解其结构与功能的关系奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] Doherty G J, McMahon H T. Mechanisms of endocytosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 857 - 902.
[2] McMahon H T, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(8): 517 - 533.

(上接 6 页)

[7] van Gool M P, van Muiswinkel G C, Hinz S W, et al. Two GH10 endo-xylanases from *Myceliophthora thermophila* C1 with and without cellulose binding module act differently towards soluble and insoluble xylans [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 119: 123 - 132.
[8] Subramanian S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(1): 33 - 64.
[9] 成奕瑾, 张婷, 黎海龙, 等. β -葡萄糖苷酶的异源表达及与纤维素酶协同降解竹纤维 [J]. *新能源进展*, 2013, 3(1): 230 - 235.
[10] Li H, Liu J, Wu J, et al. Comparative analysis of enzymatic hydrolysis of *Miscanthus* xylan using *Aspergillus niger*, *Hypocrea orientalis* [J]. *BioResources*, 2014, 9(2): 2191 - 2202.
[11] 龙传南, 成奕瑾, 邬小兵, 等. 东方肉座菌 EU7-22 纤维素酶基因的克隆及序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2012(11): 110 - 117.
[12] 龙传南, 蒋凤姣, 邬小兵, 等. 东方肉座菌 EU7-22 木聚糖酶和木糖苷酶基因克隆及生物信息学研究 [J]. *生物信息学*, 2013, 11(1): 58 - 64.

[3] Marsh M, McMahon H T. The Structural era of endocytosis [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 215 - 220.
[4] Kirchhausen T, Owen D, Harrison S C. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(5): a016725.
[5] 范真真, 陈虹, 黄秉仁. 细胞内吞的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2014, 34(4): 492 - 499.
[6] Henne W M, Boucrot E, Meinecke M, et al. FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis [J]. *Science*, 2010, 328(5983): 1281 - 1284.
[7] Tucker J A, Mintzer K A, Mullins M C. The BMP signaling gradient patterns dorsoventral tissues in a temporally progressive manner along the anteroposterior axis [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(1): 108 - 119.
[8] Uezu A, Horiuchi A, Kanda K, et al. SGIP1 α is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(36): 26481 - 26489.
[9] Reider A, Barker S L, Mishra S K, et al. Sypl1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation [J]. *EMBO J*, 2009, 28(20): 3103 - 3116.
[10] Traub L M. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9): 583 - 596.
[11] Taylor M J, Perrais D, Merrifield C J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin mediated endocytosis [J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(3): e1000604.
[12] Umasankar P K, Sanker S, Thieman J R, et al. Distinct and separable activities of the endocytic clathrin coat components Fcho1/2 and AP-2 in developmental patterning [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(5): 488 - 501.
[13] Li H, Wu J, Jiang F, et al. Functional expression and synergistic cooperation of xylan-degrading enzymes from *Hypocrea orientalis* and *Aspergillus niger* [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2014, DOI: 10.1002/jctb.4521.
[14] 黄恒, 王晓丽. 采用 CTAB 与 SDS 法提取白术 DNA 的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(7): 2860 - 2861.
[15] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321 - 4325.
[16] 梁成真, 张锐, 郭三堆. 染色体步移技术研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009(10): 75 - 87.
[17] Cai H, Shi P, Bai Y, et al. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1 [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(12): 2341 - 2346.
[18] Teixeira S, Lo L, Pickersgill R, et al. Anisotropic refinement of the structure of *Thermoascus aurantiacus* xylanase I [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57(3): 385 - 392.
[19] Paes G, Berrin J G, Beaugrand J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(3): 564 - 592.