

山羊瘤胃微生物宏基因组文库中一个新型纤维素酶基因的克隆与表达

姜海琴, 程建波, 王力生, 李吕木, 范彩云*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 通过功能筛选方法, 从安徽白山羊瘤胃微生物宏基因组文库中筛选得到了 6 个纤维素酶的阳性克隆。对其中的 1 个阳性克隆进一步进行亚克隆和序列分析, 获得一个新型纤维素酶基因开放阅读框, 通过 BLAST 对基因全序列进行分析比较, 发现其与来自 *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838 的 hypothetical protein 具有 51% 的序列相似性和 65% 的同源性。并以 pET28a(+) 为载体, *Escherichia coli* BL21(DE3) 为宿主菌, 对新型酶基因进行高效重组表达, 并对该酶表达条件进行优化。

关键词: 瘤胃微生物; 宏基因组; 纤维素酶

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0209-04

Cloning and expression of a new cellulase gene from the metagenomic library of the goat rumen

JIANG Haiqin, CHENG Jianbo, WANG Lisheng, LI Lvmu, FAN Caiyun

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Six positive clones with cellulase activities were isolated from a metagenomic library of the goat rumen using a functional screening method. One positive clone was subject to further subcloning and sequence analysis and a new cellulase gene open reading frame was obtained. After blast analysis, it was found that the cellulase gene showed 51% sequence similarity and 65% homology compared with the hypothetical protein of *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838. Using pET28a (+) as a carrier, *Escherichia coli* BL21 (DE3) as a host strain, the new gene was recombined and expressed efficiently and the expression conditions of the newly-cloned gene were optimized.

Key words: rumen microbes; metagenomic; cellulase

纤维素是由 D-葡萄糖以 β -1,4-糖苷键连接而成的直链状大分子, 是自然界存在的最丰富的可再生资源的生物质。纤维素酶(cellulase)是能将纤维素水解成葡萄糖的一组酶的总称, 分为内切- β -1, 4-葡聚糖酶(endo- β -1, 4-glu-canase, EC 3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(exoglucanase, 又称纤维二糖水解酶 cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91)和 β -葡萄糖苷酶(glucosidase, EC 3.2.1.21)^[1]。内切葡聚糖酶作用于纤维素长链分子的内部将长纤维切成短纤维, 外切葡聚糖酶作用于纤维素分子的一端, 以 2 个葡萄糖

残基为单位进行切割生成纤维二糖, β -葡萄糖苷酶切割纤维二糖生成葡萄糖^[2]。

纤维素酶是一种很重要的工业酶制剂, 它在洗涤、纺织、造纸、饲料、啤酒及乙醇工业中应用广泛, 纤维素酶也是一种重要的饲料用酶制剂, 它在降解纤维素、提高饲料利用率方面发挥重要作用。目前, 尽管有许多的纤维素酶已经从真菌和细菌中发现, 但是由于其稳定性、活性、灵敏度等局限性, 仍无法满足工业的需求^[3]。因此, 发掘新的纤维素酶已成为研究热点。

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(090411019), 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2013A115)和高校博士点基金项目(20133418120002)共同资助。

作者简介: 姜海琴, 硕士研究生。E-mail: hq_j1985@126.com

* 通信作者: 范彩云, 讲师。E-mail: fancaiyunmgbt@163.com

反刍动物能高效利用纤维性饲料,与其瘤胃中的微生物能分泌产生高效降解纤维素的纤维素酶是分不开的。然而,有大约85%的瘤胃微生物无法通过纯培养获得^[4],导致瘤胃中微生物的基因资源难以被充分利用。宏基因组技术是由 Handelsman (1998)首次提出的,是开发未培养微生物基因资源的一条有效途径。目前,利用宏基因组技术筛选新型酶等活性物质在海洋、土壤、极端环境等多领域中广泛应用。

本研究的目的是通过构建山羊瘤胃未培养微生物宏基因组文库,从分子生物学水平对山羊瘤胃未培养微生物的纤维素酶基因资源进行克隆和研究,筛选出新的纤维素酶基因,为后续开发利用新的纤维素酶提供理论基础,为进一步揭示瘤胃微生物降解纤维素的过程与机理、对瘤胃微生物进行调控提供有力借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 酶、质粒、菌株和试剂 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Not* I、*Nde* I、*Xho* I 购于 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶、*Ex Taq* 酶购于 TaKaRa 公司; pUC19 DNA/*Bam*H I 为 MBI 公司产品; pET28a(+) 载体试剂盒购于 Novagen 公司; *Escherichia coli* EPI 300 菌株、CopyControl pCC1 BAC 试剂盒购于 Epicentre 公司; *Escherichia coli* DH5 α 、*Escherichia coli* BL21(DE3) 菌株购于全式金公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒为 Omega 产品; 羧甲基纤维素钠(carboxymethyl llulose sodium, CMC) 购自 Sigma 公司; 其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.2 培养基、培养条件和抗生素及其用量 大肠杆菌的培养基用 *Luria-Bertani* (LB) 培养基和 LA 培养基(含 1.5% 琼脂的 LB)。筛选培养基为含 1% CMC 的 LA 培养基。液体培养于 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养(200 r \cdot min $^{-1}$), 平板培养于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱倒置培养。氨苄青霉素使用浓度为 100 μ g \cdot mL $^{-1}$, 氯霉素使用浓度为 12.5 μ g \cdot mL $^{-1}$, 卡那霉素使用浓度为 100 μ g \cdot mL $^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 山羊瘤胃微生物宏基因组文库构建 采集安徽白山羊瘤胃液, 分离微生物细胞, 通过低熔点琼脂糖包埋裂解制备基因组 DNA, 获得的 DNA 利用 *Hind* III 进行部分酶切, 回收 50 kb 以上的 DNA 片段, 并与 BAC 载体连接, 构建山羊瘤胃微生物宏基因组文库^[5]。

1.2.2 纤维素酶阳性克隆的筛选及鉴定 纤维素酶活性克隆的检测采用刚果红染色法^[6]。将构建好的文库复制到含有 1% CMC 的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h, 用氯仿对文库克隆熏蒸 15 min, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 2 h 后用 1 mg \cdot mL $^{-1}$ 刚果红溶液染色 15 min, 再用 1 mol \cdot L $^{-1}$ 的 NaCl 溶液脱色 2 次, 观察菌落周围出现透明水解圈的即可能为阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒, 再次转化至 *E. coli* EPI 300, 重新涂布功能筛选平板, 菌落周围出现水解圈的确定为纤维素酶基因阳性克隆。将阳性克隆抽提质粒, 并用 *Not* I 于 37 $^{\circ}$ C 酶切, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小。同时用 *Hind* III 和 *Bam*H I 于 37 $^{\circ}$ C 对阳性克隆质粒进行双酶切检测插入片段多样性。

1.2.3 亚克隆及序列分析 6 个阳性克隆质粒通过 *Sau*3A I 部分酶切, 回收 2~5 kb 片段, 并与 pUC 19 DNA/*Bam*H I 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5 α 。将转化菌涂布筛选平板, 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h, 筛选纤维素酶基因阳性克隆。得到的阳性克隆序列测定后利用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 寻找开放阅读框, 利用 NCBI 的 Blast 服务器以及 CAZy (<http://www.cazy.org/>) 进行相似序列搜索及家族预测。

1.2.4 纤维素酶基因表达载体的构建 从 BAC 文库阳性克隆扩增纤维素酶基因(ce128L14), 根据已获得的基因测序结果设计特异性引物 ce128L14 F 以及 ce128L14 R, 并在引物两端分别添加 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。引物序列分别为: ce128L14 F: 5'-GGA ATTCATATGATGTGTGGAGGAGATGACAGTTC AAG-3' (下划线标记 *Nde* I 酶切位点); ce128L14 R: 5'-CCGCTCGAGCCATTCGGTGCTTTGTTATAT ATTG-3' (下划线标记 *Xho* I 酶切位点)。PCR 产物经纯化酶切后, 与经过同样酶切处理的 pET28a(+) 载体连接, 转化至 *E. coli* BL21(DE3), 筛选阳性克隆并测序验证序列的正确性。

1.2.5 重组质粒表达条件的优化 以每升发酵菌合成目标蛋白量为指标, 以培养温度、诱导剂 IPTG 终浓度以及诱导时间为变量, 即温度为 17 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C, 起始菌密度(OD₆₀₀) 为 0.6, IPTG 终浓度为 0.10、0.20、0.40、0.80 和 1.00 mmol \cdot L $^{-1}$, 诱导时间为 3、4、5、6 和 7 h, 在相同起始菌密度条件下, 加入不同终浓度的 IPTG 进行诱导, 确定 IPTG 终浓度以及培养温度。在上述优化 IPTG 终浓度以及培养温度条件下, 优化诱导时间。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶阳性克隆的筛选及鉴定

通过功能筛选, 从包含 12672 个克隆的宏基因组文库中共筛选出 6 个纤维素酶阳性克隆。同时对这 6 个阳性克隆提质粒再次转化到 *E. coli* EPI 300 中, 涂布后发现这 6 个克隆均有水解圈 (图 1)。对 6 个阳性克隆提质粒, 用 *Not* I 对其进行酶切 (图 2), 结果显示这 6 个克隆均连接到 pBAC 载体 (8000 bp) 上, 而且克隆片段大小均在 23 kb 左右, 说明连接到 pBAC 载体上的片段都比较大。用 *Hind* III 和 *Bam*H I 对阳性克隆质粒进行双酶切片多样性分析 (图 3), 结果显示连接到 pBAC 载体上的 6 个阳性克隆片段除了 2 和 5 泳道的相同外, 其他均不同。

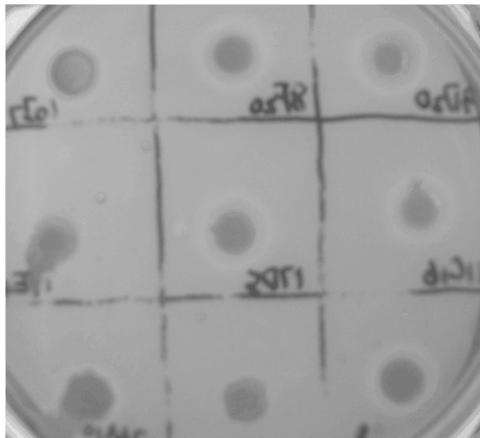
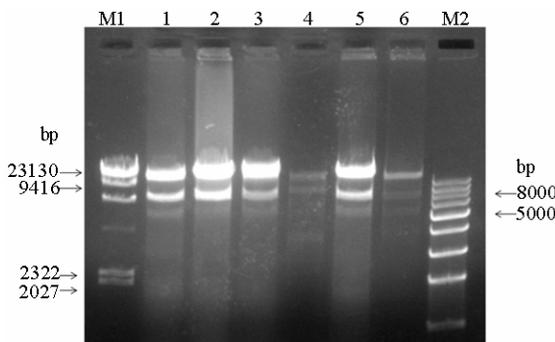


图 1 从宏基因组文库中筛选出 6 个阳性克隆

Figure 1 Six positive clones screened from the metagenomic library



M1: 分子质量标准 λ *Hind* III; 1-6: 6 个阳性克隆单酶切; M2: 分子质量标准 1 kb

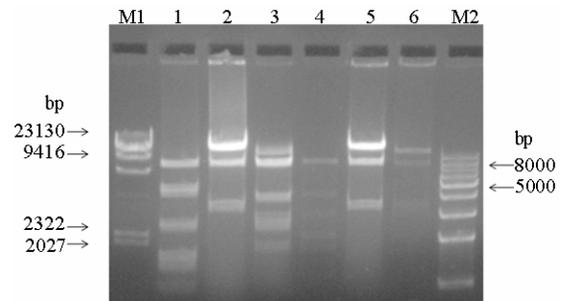
M1: λ *Hind* III Marker; 1-6: six positive clones were single-digested; M2: 1 kb Marker

图 2 6 个阳性克隆被 *Not* I 单酶切分析插入片段

Figure 2 Analysis of inserted fragments by *Not* I single enzyme digestion of the six positive

2.2 亚克隆筛选及序列分析

对其中一个水解圈较大的进行亚克隆分析 (图 4), 命名为 cel28L14。提取质粒并送至华大基因测序。测序结果分析, 发现一个编码纤维素酶基因的开放阅读框 (ORF), 命名为 cx28a。cx28a 全长 1596 bp, Vector NTI 软件分析表明其 G+C 含量为 46.37%, 编码的蛋白 cx28a 由 531 个氨基酸组成, 蛋白分子量为 57 kD, 理论等电点为 5.13。Signal-P 分析显示该蛋白序列在 1~22 间含信号肽序列。通过 BLAST 对 cx28a 全序列进行分析比较, 发现其与来自 *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838 的 hypothetical protein 具有 51% 的序列相似性和 65% 的同源性。

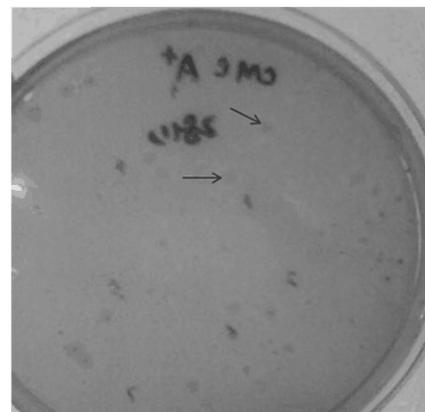


M1: 分子质量标准 λ *Hind* III; 1-6: 6 个阳性克隆双酶切; M2: 分子质量标准 1 kb

M1: λ *Hind* III Marker; 1-6: Six positive clones were double-digested; M2: 1 kb Marker

图 3 6 个阳性克隆被 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切进行多样性分析

Figure 3 Diversity analysis of the six positive clones by *Hind* III and *Bam*H I digestion



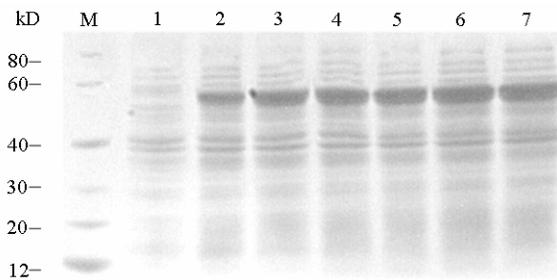
箭头所示为水解圈 Arrows show the positive clone would form a halo against a red background

图 4 一个较强亚克隆分析图

Figure 4 Analysis of a subclone with relatively strong hydrolysis ability

2.3 纤维素酶基因的克隆及表达

构建了表达载体 pET28a(+)-cx28a, 并实现重组纤维素酶 cx28a 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的高效表达。对重组蛋白表达的条件进行了优化, 结果为 17°C 条件下表达的蛋白以活性溶解状态存在, 而 37°C 表达的蛋白主要以包涵体形式存在。当使用初始浓度为 1 mmol·L⁻¹ IPTG (图 5) 时, 在 17°C 条件下诱导培养 7 h (图 6); 能够获得最大的目标蛋白表达效率, 纯化后获得的重组蛋白达到 225 mg·L⁻¹ 发酵液。

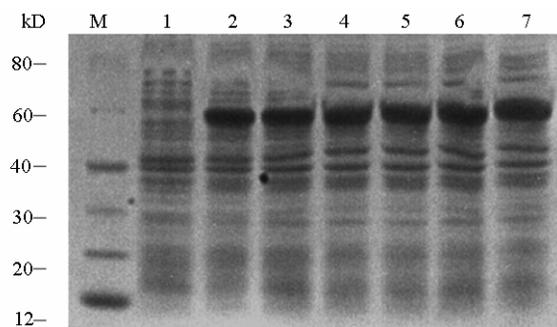


M: 蛋白分子量标准; 1: 未加诱导剂蛋白表达; 2-7: 诱导剂分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1 和 1.5 mmol·L⁻¹ 时的蛋白表达量

M: Molecular weight standards indicated in kD; 1: expression of protein with IPTG; 2-7: The expression of cx28a after inducing with IPTG of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1 and 1.5 mmol·L⁻¹

图 5 不同诱导剂条件下蛋白表达量

Figure 5 The expression of cx28a with different induction amount of IPTG



M: 蛋白分子量标准; 1: 未加诱导剂的蛋白表达; 2-7: 分别为 2、3、4、5、6 和 7 h 时的蛋白表达量

M: Standard molecular weight; 1: expression of protein without inducer; 2-7: The expression of cx28a after inducing for 2-7 h with 1mM IPTG

图 6 IPTG 诱导不同时间的蛋白表达量

Figure 6 The expression of cx28a after induction with IPTG for different time

3 讨论

本试验首次从山羊瘤胃微生物宏基因组文库中获取特定基因, 采用添加羧甲基纤维素钠的培养基对山羊瘤胃未培养微生物进行培养。阳性克隆质量

鉴定表明, 该文库克隆外源片段的随机性较高, 6 个阳性克隆单酶切结果显示片段均插入到载体上, 而且插入片段较大; 多样性分析 6 个阳性克隆, 除 2 个相似外, 其余均不相同。本试验通过 BLAST 对筛选的纤维素酶 cx28a 全序列进行分析比较, 发现其与来自 *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838 的 hypothetical protein 具有 51% 的序列相似性和 65% 的同源性, 说明从该宏基因组文库中克隆并鉴定出的是一个新型的纤维素酶基因。

本研究中, 通过序列分析以及结构预测, 可知 cx28a 具有 GH5 家族蛋白特有的保守氨基酸序列, 目前已有一些纤维素酶基因被发现来自牛瘤胃微生物^[7-8], 而这是首次报道来自山羊瘤胃微生物的 GH5 家族的纤维素酶。序列分析结果显示, 该基因产物与已经报道的所有纤维素酶基因产物在氨基酸序列上的一致性和相似性都很低, 说明从该宏基因组文库中克隆并鉴定出的是一个新型的纤维素酶基因。表达产物 cx28a 在诱导剂为 1 mmol/L, 诱导时间为 7 h, 蛋白有大量表达。目前正在对该酶的酶学性质作更深入的研究。

参考文献:

- [1] Lee R L, Paul J W, Willem H V Z, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(3): 506-577.
- [2] Tomme P, Warrenra J, Gil K R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi[J]. *Adv Microbiol Physiol*, 1995, 37: 1- 81.
- [3] Ko K C, Han Y, Choi J H, et al. A novel bifunctional endo-/exo-type cellulase from an anaerobic ruminal bacterium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(5): 1453-1462.
- [4] Krause D O, Denman S E, Mackie R I, et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2003, 27(5): 663-693.
- [5] 安娜, 李吕木, 许发芝, 等. 山羊瘤胃微生物宏基因组 BAC 文库的构建与分析[J]. *激光生物学报*, 2010, 5(19): 659-662; 694.
- [6] Teather R M and Wood P J. Use of Congo red- polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(3): 777-780.
- [7] Bao L, Huang Q, Chang L, et al. Screening and characterization of a cellulase with endocellulase and exocellulase activity from yak rumen metagenome[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 73(1/4): 104- 110.
- [8] Liu L, Feng Y, Duan C J, et al. Isolation of a gene encoding endoglucanase activity from uncultured microorganisms in buffalo rumen[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(6): 1035-1042.