

绿色木霉葡聚糖内切酶 cDNA 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达*

Cloning of the Endoglucanase cDNA Genes from *Trichoderma viride* and Their Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

王利英¹, 刘 一¹, 杨登峰², 黄日波^{1,2**}

WANG Li-ying¹, LIU Yi¹, YANG Deng-feng², HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China;

2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:用 L-山梨糖诱导绿色木霉 (*Trichoderma viride*) AS3. 3711 纤维素酶基因的转录, 提取其总 RNA 反转录获得 cDNA。PCR 扩增葡聚糖内切酶 I (EG I) 和葡聚糖内切酶 III (EG III) 的 cDNA 基因, 将其克隆到酵母载体中, 构建产生纤维素酶的酿酒酵母工程菌。重组菌株能够识别 EG I 和 EG III 自身携带的信号肽而将表达产物分泌到胞外, 故可采用刚果红平板染色法筛选具有羧甲基纤维素酶(CMCCase)活性的重组转化子。重组菌株表达的 EG I 酶活在诱导 70h 时达到最高(为 0.08U/ml), 表达的 EG III 酶活在诱导 60h 时达到最高(为 0.03U/ml)。

关键词:绿色木霉 葡聚糖内切酶 酿酒酵母

中图分类号: Q783.1; X720.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2007)03-0315-05

Abstract: The cellulase genes from *Trichoderma viride* AS3. 3711 were induced with L-sorbose. Its total RNA was extracted. The cDNA was obtained by reverse transcription. The cDNA genes encoding endoglucanases I and III were isolated by PCR, and then they were cloned into a yeast vector to construct the cellulases-producing *Saccharomyces cerevisiae* engineering strains. Recombinant yeast strains can secrete EGs I and III by the guide of the signal peptide themselves. So the expressions of EG I and EG III can be screened by activity plate assays with Congo Red method respectively. The endoglucanase activity was assayed with CMC-Na as a substrate. The results showed that the enzyme activities of EG I and EG III culminated at 0.08 U/ml and 0.03 U/ml respectively when they were induced for 70h and 60h respectively.

Key words: *Trichoderma viride*, endoglucanase, *Saccharomyces cerevisiae*

纤维素(Cellulose)是 D-葡萄糖以 β -1,4-糖苷键相连而成的直链状大分子, 是地球上最丰富的有机物质^[1]。我国每年光农作物秸秆一项就有 5 亿吨之多, 高于全国粮食总产量, 全国草原牧区贮草总和不过 1000 万吨, 只相当于秸秆总量的 2%^[2]。将纤维素转化成乙醇、单细胞蛋白、有机酸等多种代谢产物, 是纤

维素资源再生利用研究的热点。迄今为止, 人们已经从 40 多种细胞和数种真菌中克隆到了纤维素酶基因^[3-5]。纤维素酶基因在大肠杆菌中表达, 存在着两个主要问题, 一是表达产物提取困难; 二是表达水平低^[4,5]。所以在纤维素酶基因的表达方面目前应用较多的是酵母表达系统。酵母是传统工业微生物, 用其表达纤维素酶基因, 其产物高度糖基化, 经正确加工修饰后可直接分泌至培养基, 并且表达水平较高^[6,7]。

本研究从具有较高的水解纤维素能力的绿色木霉 (*Trichoderma viride*) AS3. 3711 中, 克隆葡聚糖内切酶 I (EG I) 和葡聚糖内切酶 III (EG III) 的 cDNA

收稿日期: 2007-05-31

作者简介: 王利英(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物技术研究。

* 国家自然科学基金项目(20666002)和广西科技攻关项目(桂科攻 0537012)联合资助。

** 通讯作者。

基因,并将其在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1 中表达,为构建降解纤维素生产酒精的酿酒酵母工程菌打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

绿色木霉 AS3.3711 购自中国微生物菌种保藏中心;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、酿酒酵母 INVSc1 (*his⁻trp⁻leu⁻ura⁻*)、酿酒酵母大肠杆菌穿梭质粒 pYES2(*amp⁺ura⁺*)均为本实验室保存。

1.1.2 试剂

限制性核酸内切酶 Hind III 和 EcoRI、T₄DNA 连接酶、Primer Star Taq 聚合酶等均为 TaKaRa 公司产品;绿色木霉总 RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司;DNA 回收试剂盒购自 OMEGA 公司;RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;Yeast extract 和 Tryptone 购自 OXOID 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB; YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose); PDA (马铃薯琼脂培养基); Mandels 基本培养基^[8]、诱导培养基 (不含碳源、氮源、其他成分为 25% 含量的 Mandels 基本培养基)、SC-U-G 或 SC-U-β 培养基 (0.67% yeast 基本氮源, 2% 葡萄糖或 2% β-D-半乳糖, 尿嘧啶和必要的氨基酸)。

1.2 实验方 法

1.2.1 绿色木霉产纤维素酶诱导

绿色木霉 AS3.3711 用 PDA 固体培养基 30℃ 培养至产生大量孢子后,用约 3ml 的双蒸水洗涤收集孢子转接到 Mandels 基本培养基中,于 28℃、220rpm 恒温摇床培养 48h。然后用灭菌后的 0.9% NaCl 洗涤菌体 2 次,收集干净的菌体转到诱导培养基中,加终浓度为 2000 μg/ml 的 L-Sorbose, 28℃、220rpm 诱导 9h 后收集菌体,用无菌的 0.9% NaCl 洗涤菌体后,用于提取总 RNA^[9]。

1.2.2 绿色木霉 AS3.3711 总 RNA 的提取以及 cDNA 的获得

用上海华舜生物工程公司 RNA 提取试剂盒提取绿色木霉 AS3.3711 的总 RNA,提取方法参考说明书。以总 RNA 为模板,反转录获得 cDNA,反转录方法参考说明书。

1.2.3 引物设计

参照 GenBank 上^[6]发表的绿色木霉 AS3.3711 EG I 和 EG III 的 mRNA 序列设计扩增 EG I 的

cDNA 基因 (egl1) 和 EG III 的 cDNA 基因 (egl3) 的引物。为便于基因与载体的连接,在上下游分别加入 Hind III 和 EcoR I 酶切位点 (划线部分)。引物如下。

egl1: Sense:

5-ATA AAGCTTGGTACCATGGCGCCCTCAGTTACAC-3

Antisense:

5-CTG GAATTCTGGACAGACCAGAGGCAAGT-3

egl3: Sense:

5-TCT AAGCTTACCATGAACAAGTCCGTGGCTC-3

Antisense:

5-TGC GAATTCTACTTTCTTGCAGACAC-3

1.2.4 egl1 和 egl3 酿酒酵母表达载体的构建

以 cDNA 为模板,PCR 扩增得到目的基因。酶切处理后连接到表达载体 pYES2 中,构建成重组质粒,构建成功的重组质粒命名为 pYES2-egl1 和 pYES2-egl3。

1.2.5 酿酒酵母感受态细胞的制备和转化

酿酒酵母感受态细胞的制备采用 LiAc/SS-DNA/PEG 法^[10]。重组质粒转化酿酒酵母感受态细胞采用化学转化法^[11]。

1.2.6 含 pYES2-egl1 和 pYES2-egl3 重组子的平板筛选

采用刚果红染色法筛选,染色方法参考文献 [12]。吸取 1 μl 酿酒酵母的转化子培养液,点于 SC-U-β-CMC-Na 平板上,30℃ 静置培养 60h。将平板置于 50℃ 反应 4h。加入 0.1% 刚果红溶液覆盖平板表面,室温下染色 30min,而后倒掉刚果红溶液,加入适量 1M 的 NaCl,室温下脱色反应 30min 后观察水解圈。纤维素酶水解羧甲基纤维素底物生成的产物主要是还原性单糖和双糖,所以菌落周围出现水解圈的即为重组子。

1.2.7 转化子的诱导表达以及粗酶液制备

将含有 pYES2-egl1 和 pYES2-egl3 的酿酒酵母阳性克隆接种到 SC-U-G 培养基 (含 2% 葡萄糖) 中,于 30℃、200rpm 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 左右时,以 1:4 的比例转接 SC-U-β (含 2% β-D-半乳糖) 培养基中于 30℃ 诱导 60h,酿酒酵母能够识别内切葡聚糖酶基因前端携带的信号肽序列^[13,14],构建成功的重组菌表达的 EG I 和 EG III 被分泌到胞外,2500rpm 于 4℃ 离心 10min 收集上清液经硫酸铵盐析过夜后,4℃、5000rpm 离心收集沉淀,重溶于 0.05M 的柠檬酸钠缓冲液 (pH 值 4.8) 即为粗酶液。

1.2.8 酶活检测

取 1ml 处理好的酶液,与 1ml 浓度为 1% 的 CMC-Na 柠檬酸钠溶液 (pH 值 4.6) 在 50℃ 反应 1h,加 1.5ml DNS 终止反应,沸水浴 5min 后,在 540nm 处测定吸

光值,以此计算还原糖的生成量(空白对照所用的酶液事先灭活,其他条件不变)。在上述条件下每分钟由底物产生1 μ mol葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活单位,以U/ml表示。

2 结果与分析

2.1 EG I cDNA 基因的获得及重组质粒的构建

绿色木霉 (*T. viride*) AS3.3711的总 RNA (图1),反转录获得 cDNA 后,以 cDNA 为模板 PCR 扩增 egl1 和 egl3 基因,所得 PCR 产物分别为 1.4kb 和 1.25kb,与预期大小相符图2。



图1 绿色木霉 AS 3.3711总 RNA

Fig.1 Total RNA of *T. viride* AS3.3711

1. Total RNA; 2. Total RNA.



图2 egl1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR

1. 1kb Marker, 2. Blank, 3. PCR product of egl1, 4. PCR product of egl3.

重组质粒 pYES2-egl1 和 pYES2-egl3, 转化 *E. coli* JM109, 得到的阳性克隆经双酶切验证, 电泳检测结果 (图3, 4) 与预期相符。将重组质粒委托 TaKaRa 公司进行 DNA 测序的结果显示, 克隆到的 *T. viride* AS3.3711 的 egl1 全长 1377bp, 前端 1~66bp

为信号肽序列; egl3 全长 1250bp, 前端 1~63bp 为信号肽序列。

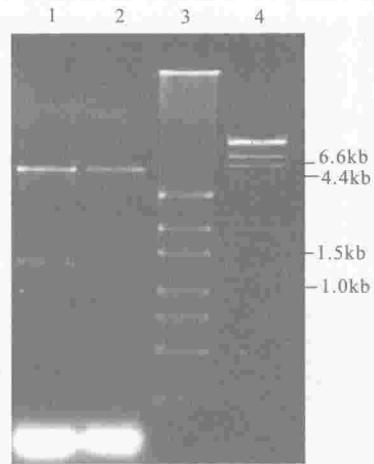


图3 重组质粒 pYES2-egl1 酶切验证

Fig.3 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmids pYES2-egl1 digested with *EcoRI* and *Hind III*

1. pYES2-egl1/ *EcoRI* and *Hind III*, 2. pYES2/ *EcoRI* and *Hind III*, 3. 1kb Marker, 4. λ DNA/ *Hind III* Marker.

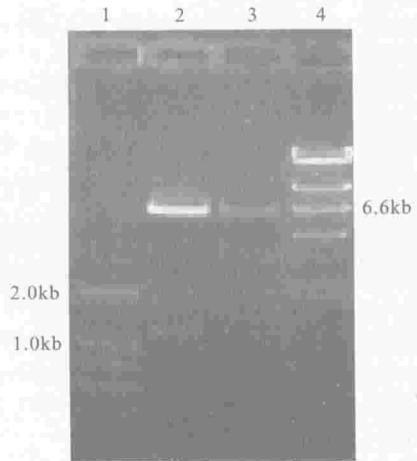


图4 重组质粒 pYES2-egl3 酶切验证

Fig.4 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmids pYES2-egl3 digested with *EcoRI* and *Hind III*

1. pYES2-egl3/ *EcoRI* and *Hind III*, 2. pYES2/ *EcoRI* and *Hind III*, 3. 1kb Marker, 4. λ DNA/ *Hind III* Marker.

2.2 酿酒酵母转化子的获得和验证

测序正确后,按照 1.2.6 所述的方法将 pYES2-egl1 和 pYES2-egl3 重组质粒和 pYES2 空质粒分别转化酿酒酵母,将重组转化子、pYES2 空质粒的转化子以及不含质粒的酿酒酵母菌株共同接种到 SC-U-G 尿嘧啶缺陷型选择平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 48h 的结果显示,重组转化子以及空质粒的转化子均能生长,不含质粒的宿主菌不能生长。从酿酒酵母的重组转化子中提取质粒,转化大肠杆菌大量复制后提取质粒,用 *Hind III* 和 *EcoRI* 双酶切验证,验证结果与预期相符。由此可证明重组质粒 pYES2-egl1 和 pYES2-egl3 已成功转化至酿酒酵母中。

2.3 EG I 和 EG III 的表达

2.3.1 有 CMCCase 活力重组子的刚果红平板筛选

图5结果显示,将重组质粒的酿酒酵母转化子接种到 SC-U-β-CMC-Na(含2%半乳糖,1%CMC-Na)固体培养基上,30℃诱导培养60h后,置于50℃反应4h,刚果红染色检测发现,pYES2-egl1和pYES2-egl3转化子菌落的周围均出现了清晰的水解圈,而作为对照的空质粒转化子菌落周围不产生水解圈。

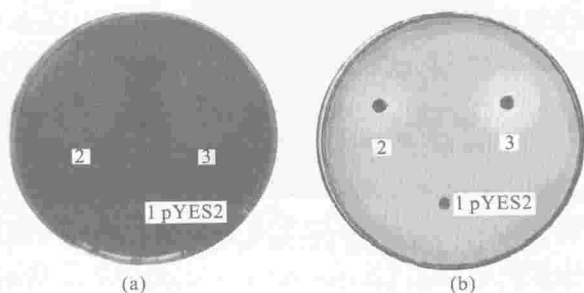


图5 pYES2转化子的刚果红染色平板

Fig. 5 The Congo-Red-CMC-Na plate of transformations
a1. pYES2转化子;a2,a3. pYES2-egl1转化子;b1. pYES2转化子;b2,b3. pYES2-egl3转化子.

a1. pYES2 transformaion a2,a3:pYES2-egl1 transformations

b1. pYES2 transformaion b2,b3. pYES2-egl3 transformations

2.3.2 重组菌株诱导时间与酶活的关系

以 CMC-Na 为底物,分别测定了 pYES2-egl1、pYES2-egl3重组转化子和空质粒 pYES2转化子的诱导时间从24h到120h的 CMCCase,每隔12h测1次的结果如图6所示。

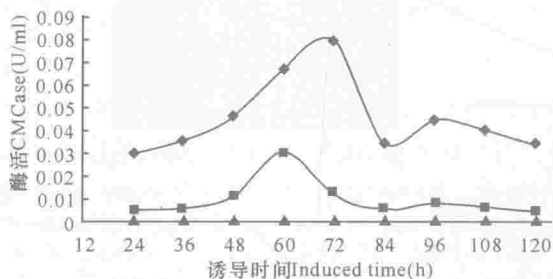


图6 诱导时间与酶活的关系

Fig. 6 Effect of induced time on EG I relative enzyme activity

1. pYES2-egl1转化子;2. pYES2-egl3转化子;3. pYES2转化子.

1. pYES2-egl1 transformation, 2. pYES2-egl3 transformation, 3. pYES2 transformation.

◆:1;■:2;▲:3

图6结果显示,酿酒酵母表达的 EG I 在诱导24h到70h之间,酶活逐步上升,在诱导时间达70h时,CMCase 达到最高,为0.08U/ml;从70h到84h酶活迅速下降,然后基本维持在0.03U/ml左右。EG III 酶活在24h到48h之间没有明显上升,从48h开始迅速上升,在诱导60h时 CMCCase 达到最高,为0.03U/ml,

随后稳定下降,至84h后基本维持在0.006U/ml左右。这些结果表明,酿酒酵母表达的 EG I 酶活要比 EG III 的酶活高出许多,这与报道的 EG I 酶活高于 EG III^[5,13]相符。

2.3.3 反应温度对酶活的影响

反应温度的研究结果(图7)表明,EG I 的最适反应温度约为47℃,当温度从30℃升至38℃时,酶活几乎维持不变,当温度由38℃升至47℃时,酶活迅速升高,在47℃左右达到最高值,随着温度的继续上升,酶活逐渐下降;EG III 由30℃开始,随着温度的增加酶的活力逐渐的增大,在57℃左右达到最高值,随着温度的增加酶活力逐渐下降。这说明,在较高温度(>65℃)和较低温度(<35℃)时,EG I 的酶活迅速降低,而 EG III 的酶活随温度变化下降幅度较小,EG III 对温度的耐受性要比 EG I 好些。

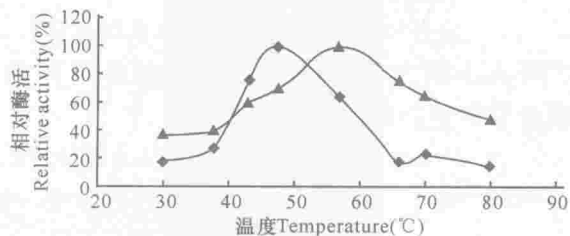


图7 反应温度与相对酶活

Fig. 7 Effect of temperature on EG I and EG III relative enzyme activity

◆:EG I;▲:EG III

2.3.4 反应体系 pH 值对酶活的影响

反应最适 pH 值的研究结果(图8)表明,酿酒酵母重组子表达的 EG I 在 pH 值为5.2左右时,酶活最高,在 pH 值为2.6时,相对酶活仅为19%左右,反应体系 pH 值从2.6升高至5.2时,酶活逐步上升,在 pH 值为5.2左右达到最高值,随着 pH 值的继续上升,酶活迅速下降,在 pH 值为7.5左右几乎完全丧失。EG III 有较宽的 pH 值适应范围,在 pH 值从4升高至5时,酶活变化不明显,但 pH 值从5升高至6时,酶活力迅速下降,在 pH 值为4.8时达到最高值。

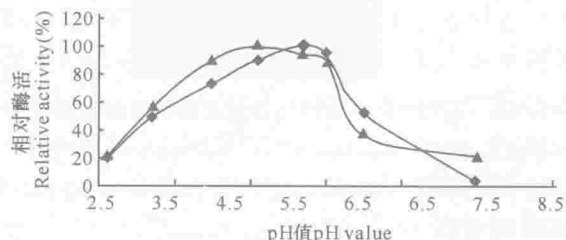


图8 pH 值与相对酶活

Fig. 8 Effect of pH on EG I and EG III relative enzyme activity

◆:EG I;▲:EG III

3 讨论

用酵母表达系统表达外源蛋白时,重要步骤之一是酵母的转化。目前为止研究者已建立起了多种酵母转化方法,主要可分为两种手段:一种是化学方法,即通过用化学物质改变细胞特性,使之吸收外源遗传物质,此类方法如原生质体转化法、完整细胞转化法等;另一种是物理方法,即在短时间内通过物理方法使细胞壁与细胞膜穿孔以引入外源遗传物质,目前比较成熟的有电穿孔转化完整酵母法、基因枪法、超声波法等^[15~17]。

本实验先尝试了电穿孔转化法,结果不太理想;后来改用 LiAc/SS-DNA/PEG 转化法,实现了外源质粒对酿酒酵母细胞的高效转化。LiAc/SS-DNA/PEG 转化法的原理是利用一价金属锂离子增加细胞壁的通透性,促使细胞“感受态”的形成,在载运 DNA, 聚乙二醇(PEG)的联合作用下,将外源质粒 DNA 转入酵母细胞。影响该方法转化率的因素主要包括:LiAc 的浓度及处理时间、载运 DNA 的类型及长度、质粒的浓度及纯度、热激时间、PEG 的聚合度及浓度等。Penttila, M. 等^[5,13]于1986和1988年分别发表了里氏木霉 (*T. reesei*) egl1 和 egl3 的全序列,指明里氏木霉 egl1 和 egl3 的前端分别携带有长度为66bp 和63bp 的信号肽序列。将本文研究的绿色木霉 egl1 和 egl3 与里氏木霉的 egl1 和 egl3 前端信号肽序列进行对比^[5,13],发现二者同源度极高,仅有一个碱基不同。本实验中将携带信号肽序列的 egl1 和 egl3 分别构建于表达载体 pYES2 中,转化酿酒酵母 INVSc1 后,以 β -D-半乳糖诱导外源基因的表达,实验结果表明酿酒酵母能够正确识别绿色木霉 (*T. viride*) EG I 和 EG III cDNA 基因前端携带的信号肽,将表达产物分泌到细胞外,因此在刚果红染色筛选时,无需裂解细胞即可在 CMC-Na 平板上产生清晰的水解圈。

本实验所用的诱导剂为 β -D-半乳糖,它同葡萄糖一样为还原糖,能与 DNS 发生显色反应,其在培养基中的浓度高达2%,远远高于重组子表达的 EG 分解 CMC-Na 产生的葡萄糖的含量,因此 β -D-半乳糖的存在对酿酒酵母重组子表达 EG 的酶活检测,具有严重干扰。我们在实验中采取硫酸铵盐析法将 EG I 酶蛋白从培养基中沉淀下来,重悬于柠檬酸钠缓冲液后,用于检测酶活。

单一的葡聚糖内切酶并不能利用纤维素为碳源生长,因此进一步研究纤维素酶系的共表达或者不同纤维素酶的酿酒酵母重组子的混合发酵,是构建能够降解纤维素类材料的工程菌的有效方法。

参考文献:

- [1] 文漪,杨柳燕,程树培. 废物乙醇化处理进展[J]. 环境科学进展,1994,2(3):58-64.
- [2] 杨谦,SOYTONG K. 城市生活垃圾中易堆腐物的生物降解初步研究[J]. 环境卫生工程,2000,3(8):111-113.
- [3] 张磊,吴兴泉. 木霉纤维素酶基因的克隆与表达研究进展[J]. 纤维素科学与技术,2004(12):4.
- [4] SALOHEIMO A, HENRISSAT B, HOFFREN A M, et al. A novel, small endoglucanase gene, egl5, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast [J]. Mol Microbiol, 1994, 13: 219-228.
- [5] ENTTILA M, LEHTOVAARA P, NEVALAINEN H, et al. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene [J]. Gene, 1986, 45(3): 253-263.
- [6] 刘纯强,王祖农. 纤维素酶基因克隆及应用前景[J]. 生物工程进展,1991,11(3):8-15.
- [7] 刘文,胡巍. 酵母表达基因工程产物特性分析[J]. 生物工程进展,2001,21(2):74-76.
- [8] BOLLOK M, RECZEY K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources [J]. Acta Alimentaria, 2000, 29(2): 155-168.
- [9] NOGAWA M, MASAHIRO GOTO, Hirofumi Okada, Yasushi Morikawa, L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* [J]. Springer-Verlag, 2001: 329-334.
- [10] 郑荣. LiAc/SS-DNA/PEG 法高效转化酵母[J]. 湖北三峡学院学报,1997,19(1):82-86.
- [11] GIETZ R D, SCHIESTL R H, WILLEMS A R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure [J]. Yeast, 1995, 11(4): 355-60.
- [12] RONALD M THATHER, PETER J WOOD. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rument [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(4): 777-780.
- [13] SALOHEIMO M, LEHTOVAARA P. EG III, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme [J]. Gene, 1988, 63(1): 11-22.
- [14] OKADA H, TADA K, SEKIYA T, et al. Molecular-characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414 [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 555-563.
- [15] 宋宏新,李敏康. 酵母分子生物学理论及应用研究进展 [J]. 西北轻工业学院学报, 2001, 19(4): 78-83.
- [16] VORONOVSKY A A, ABBAS C A, FAYURA L R, et al. Sibirny development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata* [J]. FEMS Yeast Research, 2002, 2(3): 381-388.
- [17] 王正祥,方慧英,诸葛健. 酵母细胞的高效转化方法 [J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(3): 1-3.

(责任编辑:邓大玉)