

瑞氏木霉内切- β -1, 4 葡聚糖酶基因 *Egl1* 的分子改造^{*}

Molecular Modification of Endo- β -1, 4-glucanase Gene *Egl1* from *Trichoderma reesei*

陈小玲, 陈 东, 芦志龙

CHEN Xiao-ling, CHEN Dong, LU Zhi-long

(广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(State Key Laboratory of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 为了提高瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的纤维素酶活力, 用分子改造的方法改造其内切- β -1, 4 葡聚糖酶基因 *Egl1*。用 DNase I 消化 *Egl1*, 回收 50~200bp 的片段, 用 T4 DNA 连接酶连接回收的片段, 进行 PCR 反应, 将 PCR 产物转入瑞氏木霉原生质体, 用比较滤纸酶活力的方法筛选纤维素酶活力提高的菌株。结果筛选到 2 株滤纸酶活力比出发菌株提高的菌株 *Egl*₃6-4 和 *Egl*₃3-4B₂Z₂, 其酶活力分别比出发菌株提高了 2.8 倍和 3.6 倍。

关键词: 瑞氏木霉 纤维素酶 分子改造

中图分类号: Q939.5, Q78 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0264-05

Abstract: Endo- β -1, 4-glucanase gene *Egl1* was digested with DNase I, fragments of 50~200bp were collected and randomly linked with T4 DNA, then were used as templates for sequences amplification by polymerase chain reaction (PCR). The shuffling sequences were transformed to *T. reesei* by protoplast transformation. Two mutants with higher cellulase activity were selected. The filter paper activity (FPA) of two mutants named *Egl*₃6-4 and *Egl*₃3-4B₂Z₂ were 2.8 and 3.6 times higher than that of original strain, respectively.

Key words: *Trichoderma reesei*, cellulase, molecular modification, shuffling

纤维素是地球上分布最广、最丰富的碳水化合物之一, 占植物干重的 35%~50%^[1], 对人类而言, 它是自然界中数量最大的可再生物质。如果能利用纤维素来生产燃料乙醇, 将有效地解决人类当前面临的能源枯竭和环境污染的难题。

纤维素在结构上分为结晶区和非结晶区(又称无定型区)两部分。前者结构稳定, 不容易被微生物降解^[2,3]; 后者结构比较疏松, 容易被微生物降解^[4]。造成纤维素难以被利用的主要原因是纤维素分子链结晶区的氢键(包括分子链内、链间以及分子链与分子表面之间形成的氢键)不能被微生物细胞直接利用,

需要纤维素酶降解后才能被吸收利用。

目前发现, 大约有 53 个属的几千个菌株能产纤维素酶, 其中对细菌和真菌研究得比较多^[5]。细菌的纤维素酶产量不高, 大多数对结晶纤维素没有活性, 并且所产生的酶是胞内酶或吸附在细胞壁上, 不能分泌到细胞外, 增加了提取纯化的难度; 真菌有木霉属、曲霉属和根霉属等^[6], 其产生的纤维素酶一般在酸性或中性偏酸性条件下作用于纤维素底物。木霉产生的纤维素酶酶系全、产量高, 并能分泌到菌体外^[7], 所以被深入研究以及广泛的运用。其中对瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 研究得最多而且最清楚^[8]。*T. reesei* 具有真核的分泌机制^[9], 而且 *T. reesei* 的工业化规模发酵条件已经比较成熟, 这些都促进了对 *T. reesei* 的遗传改造。

研究发现木霉产的纤维素酶主要是葡聚糖内切酶和葡聚糖外切酶。葡聚糖内切酶能水解纤维素衍

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 陈小玲(1982-), 女, 硕士, 主要从事微生物学研究和科技期刊编辑出版工作。

^{*} 广西科技攻关项目(桂科转 10123005-17), 广西科学院基本科研业务费项目(10YJ25SW12)资助。

生物和部分降解纤维素,但不能单独作用于结晶的纤维素。它在纤维素长链内部随机切割,能迅速降低纤维素结构的完整性,是纤维素酶系的重要组成部分^[10,11]。本研究对 *T. reesei* 内切- β -1,4 葡聚糖酶基因 *Eg11* 进行改造,希望为工业化生产纤维素酶提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

瑞氏木霉 (*T. reesei*) 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏室。

PDA 培养基: 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 土豆 200g 切片, 煮沸 0.5h 后取汁, 定容至 1L。

CM 培养基: 酵母粉 10g, 蛋白胨 10g, 葡萄糖 10g, 定容至 1L。

MENDEL 培养基: 微晶纤维素 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g, KH_2PO_4 2.0g, CaCl_2 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, 吐温 80 1.0g, 尿素 0.3g, 蔗糖 5g, 刚果红 0.3g, 琼脂粉 22g, 定容至 1L。

微量元素: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0mg, ZnCl_2 1.4mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0mg, 定容至 1L。

1.2 主要试剂

所用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司, 琼脂糖购于 Sigma 公司, PCR 反应所用的酶以及试剂、DNA 分子量标准 DL2000、DNase I 购自 Fermentas 公司, 胶回收、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工, PCR 引物合成、转化子序列测定委托上海生工进行, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 *T. reesei* 菌丝的培养与收集: 参照文献[12] 进行。

1.3.2 *T. reesei* 染色体 DNA 的制备: 用液氮研磨后, 用 CTAB 法大量提取染色体 DNA^[13]。

1.3.3 *Eg11* 基因的克隆: 以 *T. reesei* 总 DNA 为模板, PCR 扩增 *Eg11* 基因。50 μ l 反应体系: 1 \times PCR buffer、2 mmol/L MgCl_2 、0.2 mmol/L dNTPs、引物 (F: GGCTCGCTCTACCTGTCTCAG, R: TTCT-TCTGTACGCAGGCGG) 各 0.4 μ mol/L、0.025 U/ μ l Taq 酶、约 2.5 ng/ μ l 基因组 DNA。循环参数为: 94 $^\circ\text{C}$ 5 min; 98 $^\circ\text{C}$ 30s, 60 $^\circ\text{C}$ 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。

1.3.4 *Eg11* 基因的 shuffling 改造: *Eg11* 基因用 DNase I 消化 5~30min, 电泳检测产生的片段大小。用胶回收试剂盒回收纯化 50~200bp 的 DNA 片段,

用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物作为模板进行 PCR 反应(循环条件同上), 获得新基因片段。

1.3.5 *T. reesei* 原生质体的制备: 参照文献[13] 进行。

1.3.6 *T. reesei* 突变体库的构建: 将改造后的 *Eg11* 基因电击转化 *T. reesei* 原生质体, 将原生质体转入含 0.7M 蔗糖的 CM 培养基, 30 $^\circ\text{C}$ 、130r/min 培养 2d, 将培养液点于刚果红平板, 培养 2~3d, 获得突变体文库。

1.3.7 纤维素酶滤纸酶活的测定: 从突变体库中, 挑选相对水解圈较大的菌株, 接入 CM 培养基(葡萄糖改成 1%的蔗糖), 30 $^\circ\text{C}$ 、160r/min, 培养 2~3d, 所得上清液即为粗酶液。取小试管, 在其中加入 50mg 折成 M 状的新华一号滤纸条, 加入 2ml 0.05M/L 的柠檬酸缓冲液和 2ml 粗酶液, 在 180r/min、50 $^\circ\text{C}$ 下保温 1h 后立即取出加入 2ml DNS 试剂(每 L 含 3,5-二硝基水杨酸 5.3g, NaOH 9.9g, 酒石酸钾钠 153g, 苯酚 3.8ml, 焦亚硫酸氧钠 4.15g), 在沸水中反应 10min, 冷却后离心, 取上层清液、于 540nm 波长下测定吸光度。每个样品分别做有粗酶液无滤纸和有粗酶液有滤纸各 1 管, 每次测量有滤纸无粗酶液和无粗酶液无滤纸各做 1 管。

2 结果与分析

2.1 突变体库的构建以及突变体的筛选

用 DNase I 消化 PCR 获得的 *Eg11* 基因, 回收并纯化大小为 50~200bp 的 DNA 片段(图 1), 用 T4 DNA 连接酶进行相互连接, 将连接产物作为模板进行 PCR 反应, 结果扩增到了不同长度的 DNA 片段(图 2), 即为 shuffling 改造后的基因片段。

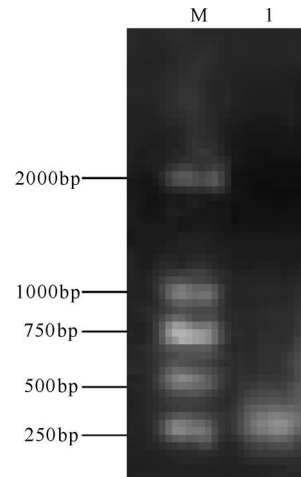


图 1 纯化的 *Eg11* 片段

Fig. 1 Redclaming fragment of *Eg11*

M; DL2000, 1; *Eg11* 小片段。1; Fragment of *Eg11*.

回收一定大小的新基因片段, 转入 *T. reesei* 原生质体, 培养后获得 *Egl1* 突变文库。将突变体在刚果红培养基上培养 2~3d, 挑选水解圈较大的菌株, 用 CM 培养基培养后, 取上清进行滤纸酶活的测定。由于反应液吸光度的变化与酶活的变化相关并呈线性关系, 因此本研究用吸光度提高的倍数来表征酶活提高的倍数。经多次筛选纯化, 得到酶活比出发菌(CK)提高的菌株 *Egl3-6-4* 和 *Egl3-4B2Z2*, 酶活分别提高了 2.8 倍(表 1)和 3.6 倍(表 2)。

表 1 菌株 *Egl3-6-4* 和 CK 酶活测定结果(OD_{540})

Table 1 Result of enzyme activity mensuration for *Egl3-6-4* and CK (OD_{540})

菌株 Strain	无滤纸的吸光度 Absorbance with- out filter paper	有滤纸的吸光度 Absorbance with filter paper	提高倍数* Rasied mul- tiple
CK	0.762±0.075	1.021±0	—
<i>Egl3-6-4</i>	0.845±0	1.846±0	2.867

* 提高倍数 = $[(B_{Egl3-6-4} - A_{Egl3-6-4}) - (B_{CK} - A_{CK})] / (B_{CK} - A_{CK})$; Ai: 无滤纸的吸光度, Bi: 有滤纸的吸光度。

Rasied multiple = $[(B_{Egl3-6-4} - A_{Egl3-6-4}) - (B_{CK} - A_{CK})] / (B_{CK} - A_{CK})$; Ai: Absorbance without filter paper, Bi: Absorbance with filter paper.

表 2 菌株 *Egl3-4B2Z2* 和 CK 酶活测定结果(OD_{540})

Table 2 Result of enzyme activity mensuration for *Egl3-4B2Z2* and CK (OD_{540})

菌株 Strain	无滤纸的吸光度 Absorbance with- out filter paper	有滤纸的吸光度 Absorbance with filter paper	提高倍数* Rasied mul- tiple
CK	0.172±0	0.355±0	—
<i>Egl3-4B2Z2</i>	0.133±0.004	0.987±0	3.664

* 提高倍数 = $[(B_{Egl3-4B2Z2} - A_{Egl3-4B2Z2}) - (B_{CK} - A_{CK})] / (B_{CK} - A_{CK})$; Ai: 无滤纸的吸光度, Bi: 有滤纸的吸光度。

Rasied multiple = $[(B_{Egl3-4B2Z2} - A_{Egl3-4B2Z2}) - (B_{CK} - A_{CK})] / (B_{CK} - A_{CK})$; Ai: Absorbance without filter paper, Bi: Absorbance with filter paper.

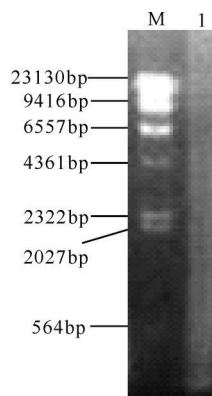


图 2 Shuffling 改造后的 *Egl1* 基因

Fig. 2 Novel gene from shuffling

M: DL2000 1: 改造后的基因片段。1: Reconstructed DNA fragment.

2.2 突变体 *Egl3-6-4* 和 *Egl3-4B2Z2* 的序列分析

分别提取突变菌株 *Egl3-6-4* 和 *Egl3-4B2Z2* 的总

DNA, PCR 扩增 *Egl1* 基因(图 3, 图 4), 送交上海生工进行序列测定。将改造前后 *Egl3-6-4* 的基因序列(改造前 765bp, 改造后 755bp)在 NCBI 上进行 Blast 分析, 发现改造后 *Egl1* 增加了 1 个碱基“C”(图 5), 造成该基因的移码突变。说明改造的基因成功地转入 *T. reesei*, 并且整合到染色体的 *Egl1* 基因上; 将改造前后 *Egl3-4B2Z2* 的基因序列(改造前 765bp,

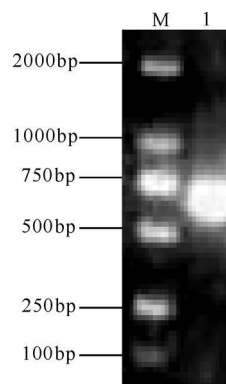


图 3 从 *Egl3-6-4* PCR 扩增获得的 *Egl1* 基因

Fig. 3 PCR production of *Egl1* from *Egl3-6-4*

M: DL2000, 1: *Egl1* 基因。1: *Egl1* gene.

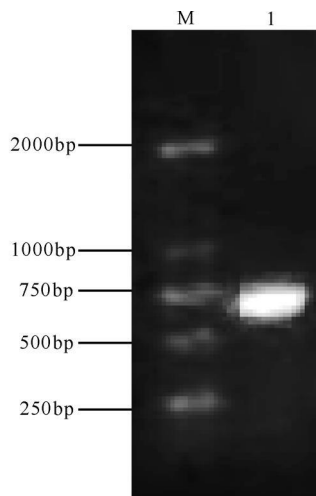


图 4 从 *Egl3-4B2Z2* PCR 扩增获得的 *Egl1* 基因

Fig. 4 PCR production of *Egl1* from *Egl3-4B2Z2*

M: DL2000, 1: *Egl1* 基因。1: *Egl1* gene.

```

B 721 ACTGCGCCCCCGCCCCGCCTGCGTAC-AGAAGAAA 755
A 730 ACTGCGCCCCCGCCCCGCCTGCGTACCAGAAGAAA 765
  
```

图 5 *Egl3-6-4* *Egl1* 基因改造前后的序列比对分析(主要显示发生变化的部分)

Fig. 5 *Egl1* gene analysis of *Egl3-6-4* between before and after reconstruction(mainly display the changed sequence)

B: 改造前, A: 改造后。B: Before reconstruction, A: After reconstruction.

Score = 1389 bits(752), Expect = 0.0, Identities = 755/756(99%), Gaps = 1/756(0%), Strand = Plus/Plus.

B 675 CACTGAGCATCGCAGTAGCCGCTCCCGTAGTT 706
 A 64 CACTGAGCATCGCAGTAGCCGCTCCCGTAGTT 33
 B 707 GGCACCGGCCGTGTTATACTGGTTGGCGCCCC 739
 A 32 GGCACCGGCCGTGTTATACTGGT-GGCGCCCC 1

图6 *Egl3-4B₂Z₂Egl1* 基因改造前后的序列比对分析 (主要显示发生变化的部分)

Fig. 6 *Egl1* gene analysis of *Egl3-4B₂Z₂* between before and after reconstruction (mainly display the changed sequence)

B: 改造前, A: 改造后。 B: Before reconstruction, A: After reconstruction.

Score= 1332 bits (721), Expect= 0.0, Identities= 724/725 (99%), Gaps= 1/725 (0%), Strand= Plus/Minus.

改造后 762bp) 在 NCBI 上进行 Blast 分析, 发现改造后 *Egl1* 缺失了 1 个碱基“T”(图6), 造成该基因的移码突变。说明改造的基因成功地转入 *T. reesei*, 并且整合到染色体的 *Egl1* 基因上。

3 讨论

本研究借鉴国内外已有的纤维素酶研究经验, 形成一套完整的 *T. reesei* 纤维素酶基因改造方法。该方法中, 在各步骤的选择上有一定的依据或经过可行性分析。

DNA shuffling 作为基因组合方式。DNA shuffling, 即 DNA 改组, 是通过改变单个基因(或基因家族)原有的核苷酸序列, 创造出新的基因, 并改变酶蛋白的功能^[14]。这种方法可以使酶的两个或多个已经优化的性质合为一体, 是蛋白定向进化的一种重要方法。

以 *T. reesei* 为表达宿主。几乎所有已克隆到的纤维素酶基因都在 *E. coli* 中得到了表达, 但分泌表达水平比较低, 表达没有活力或者活力很低。Okada H等^[15] 成功将内切葡聚糖酶基因在 *E. coli* 中进行表达, 但产生的大部分酶没有活性, 不利于工业化生产。丝状真菌表达系统是生产具有生物活性的真核生物蛋白的重要途径, 与原核表达系统相比, 它可以进行特定翻译后修饰。所以本研究将改造后的 *Egl1* 基因在 *T. reesei* 中进行表达, 期望为纤维素酶生产的工业化提供参考。

以电转化的方式将新基因转入表达宿主。外源基因进入丝状真菌并通过重组整合染色体的频率不高, 所以建立高效的转化方法至关重要。最常用的转化方法是将丝状真菌的原生质体作为感受态细胞, 与要转化的 DNA 混合后, 在一定浓度的金属阳离子、聚乙二醇(PEG)等的作用下进行转化^[16]。

微晶纤维素以及滤纸的选择。在测定纤维素酶

内切酶活力时, 常以 CMC 酶活力表示。但是, 由于羧甲基纤维素钠(CMC-Na)是可溶性的纤维素, 而天然的纤维素结构复杂, 不溶于水, 因此 CMC 酶活力并不能真实地反映菌株分解纤维素的能力。而微晶纤维素的性质更接近木质素, 所以对其水解的能力更能接近酶对预处理木质素的水解能力^[17]。滤纸是聚合度和结晶度都居中等的天然纤维材料, 滤纸酶活(FPA)可以表征菌株分解纤维素的能力以及其纤维素酶系的协同作用^[18]。因此本研究中, 纤维素酶活力以 FPA 为主。

测定条件的统一。影响纤维素酶活力测定结果的因素很多, 包括未知的因素和已知的因素。未知因素: 不同微生物产生的纤维素酶在组成和性质方面不尽相同。作为底物的天然纤维素不溶于水, 并且其化学结构各不相同, 而且纤维素酶降解纤维素的机理并未清楚; 已知因素: 培养时间、反应时间、温度、底物及其浓度、底物的质量以及测定方法都会影响测定结果。为了更准确地测定酶活, 本研究中的各次试验均严格按相同的条件进行。

本研究中, 筛选得到酶活提高的菌株 *Egl3-6-4* 和 *Egl3-3-4B₂Z₂*, 但提高的程度有限。说明仅对 *T. reesei* 单个纤维素酶基因进行改造, 产酶活力提高的程度是有限的。下一步研究中, 需将酶的两个或多个已优化的性质合为一体, 才有可能达到满意的结果。

参考文献:

- [1] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization; fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002, 66(3): 305-577.
- [2] 王建平. 纤维素酶的研究进展及趋向[J]. *舟山师专学报*, 1995(3): 42-47.
- [3] Bungay H R, Belfort G. *Advanced biochemical engineering* [M]. Sons New York; John Wiley, 1987: 79-85.
- [4] 谢占玲, 吴润. 纤维素酶的研究进展[J]. *草业科学*, 2004 (4): 72-77.
- [5] 孟雷, 陈冠军, 王怡. 纤维素酶的多型性[J]. *纤维素科学与技术*, 2002, 10(2): 47-55.
- [6] 关铜, 张世华. 纤维素酶在饲料工业中的研究与应用[J]. *贵州畜牧兽医*, 2003, 27(5): 7-9.
- [7] Knowles J, Lehtovaara P, Teeri T T. Cellulase family and their genes[J]. *Trends Biotechnology*, 1987, 5(9): 255-261.
- [8] Mintz P J, Kim J, Do K A. Fingerprinting the circulating repertoire cancer patients[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 57-63.

- [9] Salovuori I, Makarow M, Rauvala H, et al. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma Reesei* [J] . Nature Biotechnology, 1987, 5: 152-156.
- [10] Gao P J, Yinbo Q, Zunong Wang. Effects of endoglucanase from *Trichoderma Viride* A10 in cellulose hydrolysis[J] . Progress in Natural Science, 1992, 2(5): 449.
- [11] Wang H, Jones R W. Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase - encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina Phaseolina* [J] . Gene, 1995, 158(1): 125-128.
- [12] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法 [J] . 菌物系统, 2001, 20(4): 575-577.
- [13] 艾云灿, 赵学慧, 汪履绶. 黑曲霉与里氏木霉原生质体形成和再生条件选择 [J] . 华中农业大学学报, 1993, 12(4): 376-381.
- [14] Qi X H, Huang R B. Improve and application of DNA shuffling on microbiology enzyme [J] . Biotechnology, 2005, 14: 72-74.
- [15] 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(2): 555-563.
- [16] Olmedo-Monfil V, Cortés-Penagos C, Herrera-Estrella A. Three decades of fungal transformation: key concepts and applications [J] . Methods Mol Biol, 2004, 267: 297-313.
- [17] Zhang Y H, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems [J] . Biotechnol Bioeng, 2004, 88(7): 797-824.
- [18] 傅力, 丁友昉, 张箴. 纤维素酶测定方法的研究 [J] . 新疆农业大学学报, 2003, 23(2): 45-48.

(责任编辑: 尹 闯)

(上接第 263 页 Continue from page 263)

- [4] 李燕红, 赵辅昆. 纤维素酶的研究进展 [J] . 生命科学, 2005, 17(5): 392-397.
- [5] Watanabe H, Tokuda G. Animal cellulases [J] . Cellular and Molecular life Sciences, 2001, 58: 1167-1179.
- [6] Sugimura M, Watanabe H, Lo N, et al. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* [J] . European Journal of Biochemistry, 2003, 270(16): 3455-3460.
- [7] Lee S J, Kim S R, Yoon H J, et al. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari* [J] . Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 139(1): 107-116.
- [8] Lee S J, Lee K S, Kim S R, et al. A novel cellulase gene from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*: gene structure, expression, and enzymatic activity [J] . Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 140: 551-560.
- [9] Wei Y D, Lee K S, Gui Z Z, et al. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 145(2): 220-229.
- [10] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J] . Pure and Applied Chemistry, 1987, 59: 257-268.
- [11] 蒋书楠, 殷幼平, 王中康. 几种天牛纤维素酶的来源 [J] . 林业科学, 1996, 32: 441-446.
- [12] 殷幼平, 程惊秋, 蒋书楠. 桑粒肩天牛纤维素酶的性质研究 [J] . 林业科学, 1996, 32: 454-459.

(责任编辑: 陈小玲)