宇佐美曲霉 E001 菌株 *Xyn* II基因的克隆和融合表达*

邬敏辰[a],周晨妍[b],李剑芳[c]
(江南大学 a 医学院,b 生物工程学院,c 食品学院,江苏 无锡 214122)

[摘　要]　以宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) E001 株基因组 DNA 为模板,PCR 扩增了编码木聚糖酶 II(Xylanases,Xyn II)成熟肽的 DNA 片段。构建重组克隆质粒 pUCm-T-Xyn II,并以其为摸板,PCR 扩增 Xyn II成熟肽的 cDNA 片段(555 bp),连接于表达质粒 pGEX-5X-3 的 *Bam*H I和 *Eco*R I酶切位点间,构建重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn II,转化 *E. coli* BL21(DE3),IPTG 诱导表达,并对表达产物进行检测。结果表明,Xyn II DNA 中存在 1 个内含子,长度为 51 bp;融合蛋白 GST-Xyn II主要以包涵体形式存在,相对分子质量约为 50 ku,IPTG 诱导 1,3 和 5 h 融合蛋白 GST-Xyn II的表达量分别约占菌体总蛋白量的 12.6 %,25.3 %和 32.1 %。表明宇佐美曲霉 E001 菌株 Xyn II基因融合表达成功。

[关键词]　宇佐美曲霉;木聚糖酶 Xyn II;基因克隆;融合表达
[中图分类号]　Q786;Q814　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1671-9387(2007)05-0047-06

Cloning and fusion expression of the Xylanase Xyn II gene from Aspergillus usamii E001

WU Min-chen[a],ZHOU Chen-yan[b],LI Jian-fang[c]
(*a School of Medicine,b School of Biotechnology,c School of Food Science and Technology Southern Yangtze University,Wuxi,Jiangsu* 214122,*China*)

Abstract: The DNA fragment of encoding xylanase II(Xyn II) mature peptide was amplified with chromosome DNA isolated from *Aspergillus usamii* E001 by PCR. The recombinant cloning plasmid pUCm-T-Xyn II was constructed,and the cDNA fragment (555 bp in length) by encoding Xyn II mature peptide was obtained from the pUCm-T-xyn II by PCR. The PCR product was digested with *Bam*H I and *Eco*R I,and then inserted into the expressive vector pGEX-5X-3. The recombinant plasmid pGEX-5X-3-Xyn II was transformed into *Escherichia* coli BL21 (DE3) and inducing expressed by IPTG. The expressed products were examined. The results showed that the DNA sequence only contained one intron,and its length was 51 bp. The fusion protein mainly existed in the form of inclusion body,and its relative molecular weight was about 50 ku. The expression levels of pGEX-5X-3-Xyn II in *E. coli* BL21 induced by IPTG for 1 h,3 h and 5 h were about 12.6 %,25.3 % and 32.1 %,respectively. Based on this study,the protein engineering modification of the E001 Xyn II and its high expression in *Pichia pastoris* will be further studied

Key words: *aspergillus usamii*;xylanase Xyn II;gene cloning;fusion expression

木聚糖酶(Xylanases,Xyn)是能专一降解不同　　结构木聚糖的一组酶,通常是指β-1,4-D-木聚糖内

*　[收稿日期]　2006-04-10
[基金项目]　江南大学校级科研项目(210000-52212052)
[作者简介]　邬敏辰(1962-),男,江苏无锡人,副教授,博士,主要从事发酵工程与分子生物学研究。E-mail:bioch@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

切酶(EC 3.2.1.8),其能降解木聚糖主链上木糖残基之间的β-1,4糖苷键,将长碳链骨架降解成短链的木寡糖[1-2]。不同物种来源的木聚糖酶,其氨基酸序列、空间结构、分子质量、等电点及底物特异性等各不相同[3]。从20世纪70年代末开始到目前为止,已有上百种微生物木聚糖酶基因被克隆和表达。多数降解木聚糖的微生物存在多个同工酶,其通常是多个基因编码的产物,也可以是单个基因在翻译前后的加工(翻译前mRNA的剪切加工、翻译后的糖基化和分泌后受宿主细胞蛋白酶的有限水解)产物[4]。

Wakarchuk等[5]在木聚糖酶分子中引入不影响其活性的二硫键,使其耐热性提高了15 ℃。Page等[6]将浅青紫霉的木聚糖酶基因(*Xyn A*)的信号肽序列,分别替换成同一菌株中的甘露聚糖酶基因(*mam A*)和纤维素酶基因(*cel A*)的信号肽序列,结果使木聚糖酶的表达量分别提高了1.5和2.5倍。Sung[7]对来自里氏木霉的Xyn Ⅱ进行了改良,通过点突变、取不同木聚糖酶的片断组成杂合酶(酶的定向进化)、在酶的N末端增加不超过10个氨基酸等的方法,将Xyn Ⅱ的耐热性提高了28 ℃。Moreau等[8]通过不同的点突变,将来源于链霉菌属的XynA酶活性提高了10 %～25 %,半衰期最高提高了47 %,而突变酶的pH性质与天然酶相同。

宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) E001是江南大学医学院分子生物学研究室选育和保藏的一株木聚糖酶高产菌株,邬敏辰等[9]从其固态发酵曲中分离纯化了2种木聚糖酶:Xyn Ⅰ和Xyn Ⅱ;周晨妍等[10]对Xyn Ⅱ的cDNA进行了克隆和序列分析(GenBank登录号为:DQ114485)。本试验在上述研究结果的基础上,进一步对*Xyn* Ⅱ基因进行了克隆和融合表达,以期为对宇佐美曲霉E001菌株Xyn Ⅱ耐热性等酶学特性的改造及*Xyn* Ⅱ基因在毕氏酵母中的高效表达研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 宇佐美曲霉E001菌株由江南大学医学院分子生物学研究室保存;大肠杆菌(*E. coli*) Top10、BL21(DE3)和表达质粒pGEX-5X-3均由复旦大学生命科学学院黄伟达教授惠赠;克隆载体pUCm-T购于Sangon公司;含有Xyn Ⅱ cDNA的重组质粒pUCm-T-Xyn Ⅱ,由江南大学医学院分子生物学研究室构建和保存。

1.1.2 工具酶及主要试剂 反转录试剂盒、X-Gal和IPTG购自TaKaRa公司;T4 DNA连接酶、DNA 100 bp marker购自MBI公司;酵母粉、胰蛋白胨和琼脂糖购自BBI公司;溴化乙锭购自Amresco公司;*Taq* DNA聚合酶、TRIzol试剂和玻璃珠(Silver Beads) DNA胶回收试剂盒购自Sangon公司;限制性内切酶*Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Pst* Ⅰ购自Biolabs公司;SDS-PAGE所用试剂均购自Bio-Rad公司。其他常规试剂均为国产分析纯级。

1.1.3 引物设计与合成 根据宇佐美曲霉E001 Xyn ⅡcDNA核苷酸序列[10],设计了2对PCR引物。第1对的5端外引物NC:5′-CGGGATCCGAAGTGCCGGTATCAACTATGT-3′(下划线示*Bam*H Ⅰ酶切位点),3端外引物XZ:5′-CGGAATTCTTAAGAAGATATCGTGACACTGGCA-3′(下划线示*Eco*R Ⅰ酶切位点),用于完整Xyn ⅡcDNA的扩增、连接以及Xyn ⅡDNA片段的扩增。第2对的5端内引物N2:5′-GTGCAGAACTACAACGGCAAC-3′,3端内引物X2:5′-GTAGGAGCTGGAGCTAGAAGC-3′,位于Xyn ⅡcDNA序列的内部,用于PCR验证以NC和XZ为引物所扩增的PCR产物以及重组表达质粒pGEX-5X-3-xyn Ⅱ。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.4 培养基 (1)宇佐美曲霉E001菌株液体培养基[11]:10 g/L蛋白胨 + 5 g/L酵母膏 + 10 g/L葡萄糖 + 200 mL/L的玉米芯提取液(70 g/L),pH 6.0,121 ℃灭菌20 min备用。(2)L-Broth(LB)液体培养基:10 g/L蛋白胨 + 10 g/L NaCl + 5 g/L酵母粉,调pH 7.4。用于培养四环素抗性(Tc^r)的*E. coli* Top10的LB培养基,需在LB培养基121 ℃灭菌20 min并冷却后,添加100 mg/L四环素(Tc);用于培养含氨苄青霉素抗性(Amp^r)质粒的*E. coli* LB培养基,需添加100 mg/L的氨苄青霉素。(3)LB固体培养基:在LB培养基的基础上添加18 g/L琼脂粉,121 ℃灭菌20 min备用。

1.2 宇佐美曲霉E001菌株的培养

将宇佐美曲霉E001菌株试管斜面种子接种到液体培养基中,置30 ℃、200 r/min往复式摇床上振荡培养36 h,抽滤收集菌体,用于E001基因组DNA的提取。

1.3 宇佐美曲霉基因组DNA的提取

宇佐美曲霉基因组DNA的提取按文献[12]的方法并略作改动。将培养至36 h的宇佐美曲霉E001培养液抽滤,用4 ℃、含0.15 mol/L NaCl的

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.1 mol/L EDTA(pH 8.0)溶液洗涤菌体数次。称取 300 mg 菌体,悬浮于 3 mL 上述 EDTA 溶液中,用玻璃匀浆器研磨 3～5 min,依次加入 6 g/L SDS 和 100 mg/L 蛋白酶 K,置于 100 r/min 的摇床上 37 ℃温育 2 h,再加入 20 g/L SDS,60 ℃保温 20 min。加入等体积酚 - 氯仿 - 异戊醇(*V*(酚) ∶*V*(氯仿) ∶*V*(异戊醇) = 25 ∶24 ∶1),以 150 r/min 混匀 30 min;10 000 r/min 离心 10 min,取上清液用氯仿抽提 1 次。氯仿抽提物用 2 倍体积无水乙醇沉淀,体积分数 70 %乙醇洗涤沉淀后自然干燥,最后将提取物溶于 50 μL 含 50 mg/L RNase 的 TE 缓冲液中,55 ℃保温 10 min 后,置 - 20 ℃保存备用。取少量提取物进行琼脂糖电泳检测。

1.4　Xyn ⅡDNA 的 PCR 扩增及重组克隆质粒 pUCm-T-Xyn Ⅱ的构建

1.4.1　PCR 扩增　PCR 反应体系为 50 μL:E001 菌株基因组 DNA 模板 2 μL,10 ×PCR buffer 5 μL,dNTP(1 mmol/L) 5 μL,5′端外引物 NC、3′端外引物 XZ 各 2 μL,ddH_2O 33.5 μL,*Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL。扩增程序为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 60 s,共循环 30 次;最后 72 ℃延伸 10 min。扩增完毕后,取扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳及 PCR(以 N2/XZ 为引物)检测。

1.4.2　pUCm-T-Xyn Ⅱ的构建　割胶回收约 600 bp 的 DNA 条带,利用 A-T 克隆策略直接与载体 pUCm-T 连接,构建重组克隆质粒 pUCm-T-Xyn Ⅱ,转化 *E. coli* Top10 受体菌,蓝白斑筛选,挑选白斑进行 *Pst* Ⅰ酶切或 PCR 鉴定。目的 DNA 片段的回收、连接和转化的具体操作参见文献[10]。

1.5　Xyn ⅡcDNA 的扩增及重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ的构建

PCR 反应体系为 50 μL:pUCm-T-Xyn Ⅱ模板 1 μL,10 ×PCR buffer 5 μL,dNTP(1 mmol/L) 5 μL,5′端外引物 NC、3′端外引物 XZ 各 2 μL,ddH_2O 34.5 μL,*Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL。扩增程序为:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,共循环 30 次;最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物检测方法同上。

回收目的基因片段 Xyn ⅡcDNA,用 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切,与经同样双酶切处理的表达质粒 pGEX-5X-3 连接,构建重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ(图 1)。具体操作步骤参照 Sambrook 等[13]的方法进行。

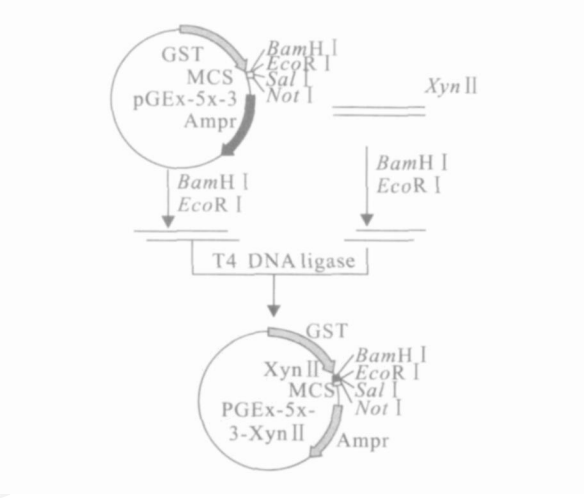

图 1　重组质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ的构建

Fig. 4　Diagram for the construction of the recombinant plasmid

1.6　重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ的融合表达

分别将重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ和空质粒 pGEX-5X-3 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)菌株,得转化菌株 BL21/Xyn Ⅱ和 BL21/pGEX。将 2 种转化菌株分别接种于 1.5 mL 含 Amp(100 mg/L)的 LB 培养基中,于 37 ℃、200 r/min 往复振荡培养过夜,再以 1 ∶100(体积比)的比例转接种于 3 mL 含 Amp 的新鲜 LB 中。37 ℃继续培养至对数生长中期(OD_{600} 为 0.6～1.0),加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 进行诱导表达,并于 1、3 和 5 h 时取培养液备用。

1.7　融合表达产物(融合蛋白 GST-Xyn Ⅱ)的 SDS-PAGE 鉴定

将上述培养液 5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 1 ×蛋白电泳加样缓冲液溶解,振荡均匀,于沸水浴中煮沸 3～5 min,8 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液进行 SDS-PAGE 鉴定[14]。

2　结果与分析

2.1　Xyn ⅡDNA 片段的扩增和克隆

由图 2 可知,以 NC/XZ 为引物可扩增出 600 bp 的条带,根据 Xyn ⅡDNA 片段的预计长度及以 N2/XZ 或 NC/X2 为引物的嵌式 PCR 验证结果(图 2),可初步确证该条带就是目的基因。重组克隆质粒 pUCm-T-Xyn ⅡPCR 扩增结果显示,在 600 bp 处有特异性条带(图 3)。

2.2　Xyn ⅡDNA 片段胶及其编码的氨基酸序列分析

将克隆的 Xyn ⅡDNA 片段测序结果(Genbank

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

登录号:DQ191144),与 Xyn ⅡcDNA(Genbank 登录:为 DQ114485)进行序列对比分析。由图4可知,在 Xyn ⅡDNA 编码区内仅存在一个内含子,其长度为51 bp。将 E001 菌株 Xyn Ⅱ的氨基酸序列与其他木聚糖酶的氨基酸序列同源性进行比较,结果表明其与 *Aspergillus niger* 木聚糖酶(Genbank 登录:为 ANU39784)的同源性为89%、与 *Penicillium purpurogenum* 木聚糖酶(Genbank 登录号:AAK50762)为73%、与 *Aureobasidium pullulans* 木聚糖酶(Genbank 登录号:AAD51950)为68%,说明 E001 Xyn Ⅱ是一种新发现的木聚糖酶。对 Xyn Ⅱ的分析结果表明,在 Xyn Ⅱ中存在4个保守盒(SSSYLAVYGWV(63～73 bp)、PQAEYYIVED(76～85 bp)、SDGSTYQVCTDTR(103～115 bp)和 HFNFWAQHGFGNS(148～160 bp))和2个催化残基 E(分别位于85位和170位)。

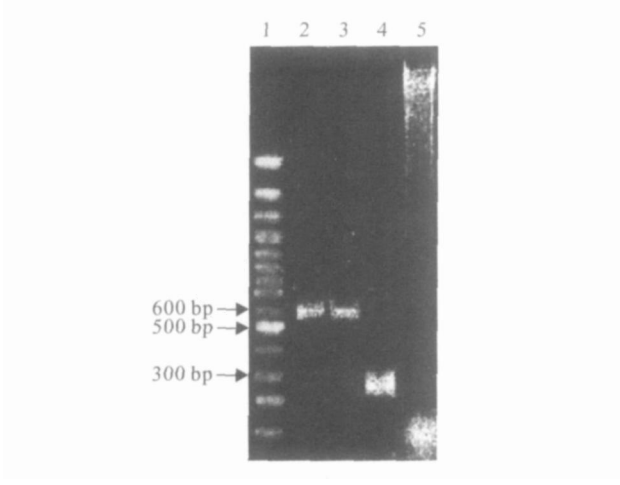

图2 Xyn ⅡDNA 片段扩增产物电泳图

1. DNA 100 bp marker;2. 以 NC/XZ 为引物;3. 以 N2/XZ 为引物;4. 以 NC/X2 为引物;5. E001 菌株基因组 DNA

Fig. 2 Analysis of the Xylanase Xyn ⅡDNA fragment amplified by PCR on 1% agarose gel

1. DNA 100 bp marker;2. Primers of NC/XZ;3. Primers of N2/XZ;4. Primers of NC/X2;5. Chromosome DNA of the E001 strain

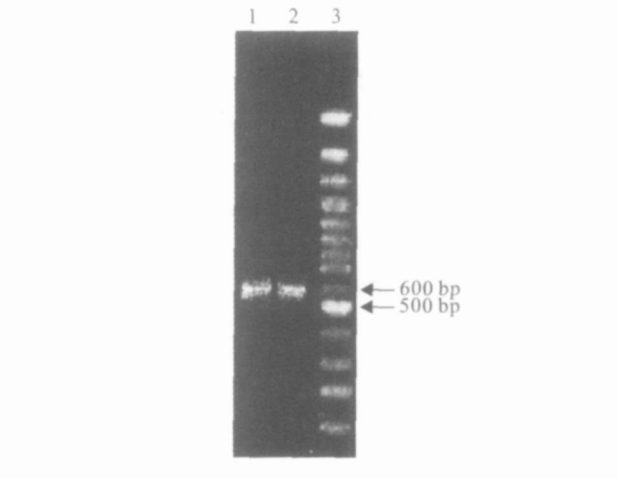

图3 重组克隆质粒 pUCm-T-Xyn ⅡPCR 产物电泳图

1. 以 NC/XZ 为引物;2. 以 N2/XZ 为引物;3. DNA 100 bp marker

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid containing Xyn ⅡDNA fragment by PCR

1. Primers of NC and XZ;2. Primers of N2 and XZ;3. DNA 100 bp marker

1 AGTGCCGGTATCAACTACGTGCAGAACTACAACGGCAACCTTGGTGACTTCACCTACGAC
61 GAGAGTACCGGGACATTTTCCATGTACTGGGAGGATGGAGTCAGTTCCGACTTCGTCGTT
121 GGTTTGGGCTGGACCACTGGCTCCTCTAAGTGGGTGACTGTACCCTTTAGGCTAAATCTC
181 TAGGATCTAACGGTTGTCAGATCTATCACCTACTCTGCCCAATACAGCGCTTCTAGCTCC
241 AGCTCCTACCTGGCTGTCTACGGCTGGGTCAACTCTCCTCAGGCCGAATACTACATCGTC
301 GAGGATTACGGTGATTACAACCCTTGCAGCTCGGCCACGAGCCTTGGTACCGTGTACTCT
361 GATGGAAGCACCTACCAAGTCTGCACCGACACTCGGACGAACGTGCCATCTATCACAGGA
421 ACAAGCACGTTCACGCAGTACTTCTCCGTTCGTGAAAGTACACGCACATCCGGAACAGTG
481 ACTATCGCCAACCATTTCAATTTCTGGGCGCAGCATGGGTTCGGCAATAGCAACTTCAAT
541 TATCAGGTCATGGCGGTGGAGGCATGGAACGGTGCTGGCAGTGCCAGTGTCACGATATCT
601 TCT*TAA*

图4 Xyn ⅡDNA 片段序列和内含子的剪接位置

—.表示内含子;斜体碱基为终止密码子

Fig. 3 DNA fragment sequence of Xyn Ⅱand splice position of intron

—. represents intron;italic base is termination codon

2.3 重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ的鉴定

重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn ⅡPCR 扩增(以 NC/XZ 或 N2/X2 为引物)结果(图5)表明,所构建的重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ含有目的基因

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Xyn ⅡcDNA。

2.4　pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ的融合表达

由图 6 可见,泳道 2 在 28 ku 处有一明显条带,这是 BL21/pGEX 菌株在 IPTG 诱导下所表达的 pGEX-5X-3 自身 GST 蛋白;泳道 4,5,6 在 50 ku 处比其他泳道多出一蛋白条带,这是 BL21/*xyn* Ⅱ菌株诱导表达的 GST-Xyn Ⅱ融合蛋白,说明加入 IPTG 后融合蛋白在胞内得到了表达,且随着诱导时间的延长蛋白表达量逐渐升高。将凝胶电泳经计算机扫描,以低分子量标准蛋白为标准,根据蛋白条带染色的强度,利用 Quantity One 凝胶分析软件进行定量分析,结果表明诱导 1,3 和 5 h 时,融合蛋白的表达量分别约占细菌总蛋白量的 12.6 %,25.3 % 和 32.1 %。

2.5　融合蛋白 GST-Xyn Ⅱ的 SDS-PAGE 结果

按文献[9]的方法测定木聚糖酶活性,结果显示,表达的融合蛋白 GST-Xyn Ⅱ没有木聚糖酶活性。

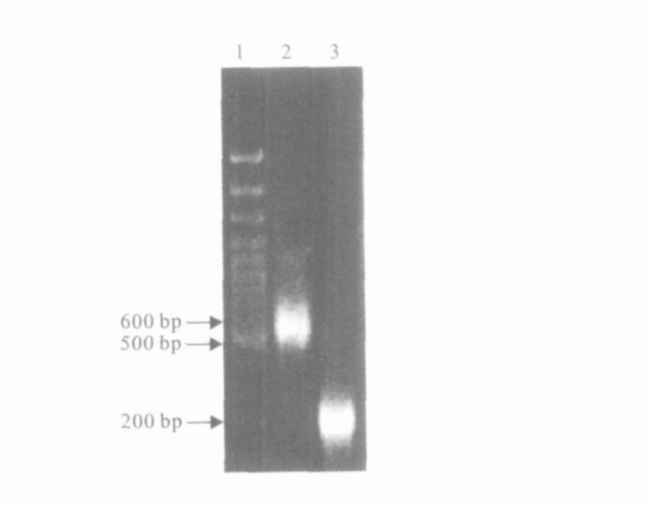

图 5　重组表达质粒 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ PCR 产物电泳图

1.100 bp DNA 标样;2.以 NC/XZ 为引物;3.以 N2/X2 为引物

Fig.5　Gel electrophoresis of PCR products amplified from plasmid pGEX-5X-Xyn Ⅱ

1.DNA100 bp marker;2.primers of NC and XZ;3.primers of N2 and X2

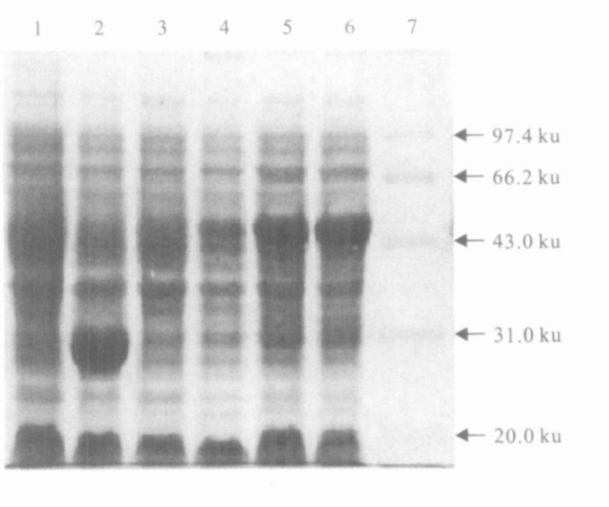

图 6　pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ在 *E. coli* BL21 中表达产物 R 的电泳图

1.BL21/pGEX;2.BL21/pGEX 诱导 5 h;3.BL21/xyn Ⅱ;4～6 分别为 BL21/xyn Ⅱ诱导 1,3 和 5 h 的产物;7.低分子量蛋白标样

Fig.6　SDS-PAGE pattern of the products of pGEX-5X-3-Xyn Ⅱexpressed in *E. coli* BL21

1.BL21/pGEX;2.BL21/pGEX induction 5 h;3.BL21/Xyn Ⅱ;4.Induced 1 h by BL21/Xyn Ⅱ;5.Induced 3 h by BL21/Xyn Ⅱ;6.Induced 5 h by BL21/Xyn Ⅱ;7.Low molecular weight marker

3　讨　论

对真核微生物基因组而言,由于大多数结构基因是不连续的,所以在已知木聚糖酶 Xyn ⅡcDNA 核苷酸序列[10]的基础上,有必要进一步测定编码该木聚糖酶的 DNA 核苷酸序列,以确定 Xyn Ⅱ编码基因 DNA 中是否含有内含子及内含子的剪接位置、数目和长度。Kitamoto 等[15]对米曲霉(*Asp. oryzae*)的木聚糖酶基因 *xynF*1 进行了克隆和表达,结果发现该基因长度为 1 484 bp,包含 10 个内含子,编码一个由 327 个氨基酸残基组成的酶蛋白(相对分子质量为 35 402 ku)。本研究将木聚糖酶 Xyn ⅡDNA 的测序结果(Genbank 登录号:DQ191144)与其所对应的 cDNA 序列(Genbank 登录号:DQ114485)进行了对比分析,结果发现宇佐美曲霉木聚糖酶 Xyn ⅡDNA 中仅存在 1 个内含子,其长度为 51 bp。E001 菌株 Xyn Ⅱ氨基酸序列与其他木聚糖酶氨基酸序列的同源性比较结果表明,其与 *Aspergillus niger* 木聚糖酶(Genbank 登录号:ANU39784)的同源性最高,为 89 %;与 *Penicillium purpurogenum* 木聚糖酶(Genbank 登录号为:AAK50762)的同源性为 73 %;与 *Aureobasidium pullulans* 木聚糖酶(Genbank 登录号:AAD51950)其同源性为 68 %,说明 E001 Xyn Ⅱ是一种新发现的木聚糖酶。

2002 年,Sapag 等[16]对已经发表的 G/11 家族木聚糖酶共 82 个成熟蛋白的氨基酸序列进行了计算机分析,结果发现有 4 个保守盒和 2 个存在于活

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性中心的催化残基 E。本研究结果表明,在 Xyn Ⅱ中的相应位置上也同样存在 4 个保守盒(分别为 SSSYLAVYGWV (63～73 bp)、PQAEYYIVED (76～85 bp)、SDGSTYQVCTDTR (103～115 bp) 和 HFNFWAQHGFGNS(148～160 bp))和 2 个催化残基 E(位于 85 和 170 位),说明本研究得到的 Xyn Ⅱ属于木聚糖酶 G/11 家族。

本研究结果表明,虽然 pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中得到了高效表达,其中诱导 5 h 的融合蛋白表达量约占细菌总蛋白的 32.1%,但所表达的融合蛋白(GST-Xyn Ⅱ)未能检测到木聚糖酶活性,这与作者先前对圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶基因的研究结果相似[17]。推测可能存在以下几个方面的原因:(1) 融合的 GST 蛋白影响了木聚糖酶 Xyn Ⅱ空间结构的形成;(2) pGEX-5X-3-Xyn Ⅱ在 *E. coli* BL21 中所表达的融合蛋白,绝大部分形成了不溶性的包涵体,在细胞破碎、包涵体溶解和酶蛋白复性过程中易丧失活性;(3) Xyn ⅡcDNA 在 *E. coli* BL21 中的复制、转录和翻译等过程与原宿主菌宇佐美曲霉 E001(真核微生物)存在显著差异。鉴于以上可能原因,下一步的研究工作是将 Xyn ⅡcDNA 在大肠杆菌表达体系中进行非融合表达,以及在毕赤酵母(真核微生物)表达体系中进行分泌表达。

[参考文献]

[1] Gregory A C E, O'Connell A, Bolwell P G. Xylans[J]. Biotechnology and Gentic Engineering Reviews, 1998, 15: 439-455.

[2] 杨梦华,李 颖,关国华,等. 极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 236-240.

[3] 周晨妍,邬敏辰. 木聚糖酶的酶学特性与分子生物学[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 89-92.

[4] Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23: 411-456.

[5] Wakarchuk W W, Sung W L, Campbell R L, et al. Thermostabilization of the bacillus circulans xylanase by the introduction of disulfide bonds[J]. Protein Eng, 1994, 7: 1379-1386.

[6] Page N, Kluepfel D, Shareck F, et al. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in streptomyces lividans[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 109-144.

[7] Sung W L. Xylanases with enhanced thermophilicity and alkalophilicity: Austrilian, WO/046169 [P]. 2003-07-10 [2006-01-15]. http://pericles ipaustralia gov au/ols/searching/patsearch.

[8] Moreau A, Shareck F, Kluepfel D, et al. Increase in catalytic activity and thermostability of the xylanase A of streptomyces lividans 1326 by site-specific mutagenesis[J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16: 420-424.

[9] 邬敏辰,符丹丹,朱劼,等. 宇佐美曲霉木聚糖酶的纯化和性质[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 29-33.

[10] 周晨妍,符丹丹,邬敏辰,等. 宇佐美曲霉木聚糖酶基因的克隆和序列分析[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 29-32.

[11] 邵佩兰,徐明,朱晓红. 影响玉米芯木聚糖提取的因素探讨[J]. 宁夏农学院学报, 2002, 23(2): 56-57.

[12] Garber R C. Isolation of DNA from filamemtous fungi and separation into nuclear mitochondrial, ribosomal, and plasmid components[J]. Anal Biochem, 1983, 135: 416-422.

[13] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2 nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[14] 吴冠芸,潘华珍. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京:科学出版社, 1999.

[15] Kitamoto N, Yoshino S, Ito M, et al. Repression of the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in Aspergillus oryzae by introduction of multiple copies of the xynF1 promoter[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50: 558-563.

[16] Sapag A, Wouters J, Lambert C, et al. The endoxylanases from family 11: Computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships[J]. J Biotechnol, 2002, 95: 109-131.

[17] 邬敏辰. 圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵生产、分离纯化及基因克隆和表达[D]. 上海:复旦大学, 2000.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net