应用与环境生物学报 2009, **15** (3): 423~426
Chin J Appl Environ Biol=ISSN 1006-687X
2009-06-25
DOI: 10.3724/SP.J.1145.2009.00423

黑曲霉β–葡萄糖苷酶的筛选、克隆及表达*

唐德芳[1, 2] 裴小琼[1] 李晓璐[1] 胡 承[2] 陈 军[3**] 吴中柳[1**]
([1]中国科学院成都生物研究所 成都 610041)
([2]四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610041)
([3]成都医学院科研实验中心 成都 610083)

摘 要 从曲霉属10株试验菌中筛选得到一株产β-葡萄糖苷酶活性较高的黑曲霉FTA-008. 该菌株在适宜的培养条件下, β-葡萄糖苷酶的最高活性达2.89 U/mL, 适宜产酶周期为3 d. 通过设计特异引物, 以该菌株的总RNA为模板, 采用RT-PCR技术获得大小为2 511 bp的cDNA片段, 该序列与GenBank中AJ132386的β-葡萄糖苷酶序列相比, 氨基酸序列同源性达96.8%. 经毕赤酵母表达, β-葡萄糖苷酶比活力达7.85 U/mg. 图3 表1 参13

关键词 黑曲霉; β-葡萄糖苷酶; 克隆; RT-PCR; 毕赤酵母; 表达
CLC Q936 + Q556.2

Screening, Cloning and Expression of *Aspergillus niger* β-glucosidase*

TANG Defang[1, 2], PEI Xiaoqiong[1], LI Xiaolu[1], HU Cheng[2], CHEN Jun[3**] & WU Zhongliu[1**]
([1]*Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences,* Chengdu 610041, China)
([2]*MOE Laboratory of Bioresource and Environment, College of Life Sciences, Sichuan University,* Chengdu 610041, China)
([3]*Scientific Research Center, Chengdu Medical College,* Chengdu 610083, China)

Abstract From the 10 strains of *Aspergillus*, the strain *A. niger* FTA-008 was selected and it possessed high β-glucosidase activity (2.89 U/mL). The period of β-glucosidase production by this strain was 3 days. A set of primers were synthesized based on the sequence of β-glucosidase gene (*bgl*1) (AJ132386) of *A. niger*. The cDNA fragment was amplified with RT-PCR using the total RNA of *A. niger* FTA-008 as template. The cloned gene fragment was 2 511 bp. Compared with sequence AJ132386, the identity of amino acid sequence was 96.8%. The cDNA was successfully expressed in *Pichia pastori*s and the maximum β-glucosidase activity (7.85 U/mg) was achieved in the BMMY medium containing 0.5% methanol and 240 r/min at pH 6.0 under 30 °C for 108 h. Fig 3, Tab 1, Ref 13

Keywords *Aspergillus niger*; β-glucosidase; gene cloning; RT-PCR; *Pichia pastori*s; expression
CLC Q936 + Q556.2

能源短缺是本世纪面临的重大问题之一. 从长远利益以及能源的可再生性来说, 燃料酒精是一种潜力巨大的生物能源, 可减少温室效益, 缓解大气污染情况. 而利用纤维素生产燃料酒精是一个重要的研究方向. 纤维素作为植物光合作用的主要多糖类产物, 是地球上最为丰富的可再生资源, 占地球总生物量的40%左右. 然而, 目前大约80%的纤维素未被开发利用, 因此具有极为诱人的开发前景[1]. 从高效和环保的角度出发, 纤维素被彻底降解而不会对环境造成污染的一条有效途径便是利用纤维素酶的水解作用. 目前关于纤维素酶生产菌株的研究, 绝大部分集中于纤维素酶系齐全且酶活力较高的木霉如绿色木霉(*Trichoderma viride*)和里氏木霉(*T. reesei*)等菌株[2~4], 但木霉菌发酵产物中存在多种真菌毒素; 另一方面纤维素酶活力较低, 尤其是β-葡萄糖苷酶活力很低, 致使纤维二糖在反应体系中积累而影响酶解效率, 因而其应用范围受到限制. 黑曲霉不产生毒素, 是公认的安全微生物. 在产纤维素酶的真菌中, 黑曲霉所产纤维素酶系中以EG和β-葡萄糖苷酶的活力较高, 特别是β-葡萄糖苷酶和活力较一般菌株高. 所以对黑曲霉纤维素酶的研究主要集中于β-葡萄糖苷酶方面.

纤维素酶大致由3种水解酶类组成, 分别是β-葡聚糖苷酶、纤维二糖水解酶和β-葡萄糖苷酶, 在纤维素的降解过程中, 从纤维素分解成葡萄糖需要以上3种酶的协同作用. 其中β-葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)将纤维二糖以及纤维素寡糖降解为葡萄糖, 是纤维素水解糖化过程的限速步骤. β-葡萄糖苷酶的研究可追溯到1837年, Liebig和Wohler首次在苦杏仁汁中发现了该酶[5]. 在所有已经发现的微生物中, 黑曲霉是产β-葡萄糖苷酶效率最高的菌种[6]. 但是, 目前黑曲霉β-葡萄糖苷酶的活力仍不能满足工业上的需要, 而且成本较高. 因此, 对β-葡萄糖苷酶基因的克隆与表达, 以成为研究纤维素酶重要环节之一. 到目前为止, 已有上百个微生物β-葡萄糖苷酶基因得到克隆, 许多微生物来源的β-葡萄糖苷酶基因已获得异源表达, 例如最近Hong等从嗜热子囊菌*Thermoascus aurantiacus*中克隆β-葡萄糖苷酶基因, 在毕赤酵母中表达, 并研究了重组β-葡萄糖苷酶性质[7]. 赵林果等[8]克隆和分析了黑曲霉β-葡萄糖苷酶的基因序列.

收稿日期: 2008-11-25 接受日期: 2008-12-15
*中国科学院百人计划项目、四川省青年科技基金项目(No. 08ZQ026-023)和中国科学院知识创新工程重大项目(No. KSCX1-YW-11B2)资助 Supported by the Program of 100 Distinguished Young Scientists of the Chinese Academy of Sciences, the Province Science Foundation for Young Scholars of Sichuan, China (No. 08ZQ026-023) and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX1-YW-11B2)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: chenjpro@163.com; wuzhl@cib.ac.cn)

本文比较了10种菌株产*β*-葡萄糖苷酶能力的大小，筛选得到一株产*β*-葡萄糖苷酶活性较高的黑曲霉FTA-008. 通过设计特异引物，以黑曲霉FTA-008总RNA为模板克隆了*β*-葡萄糖苷酶的cDNA，并成功地在毕赤酵母中实现了表达.

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒与试剂

实验供试菌株曲霉属FTA-001、FTA-002、FTA-003、FTA-006、FTA-034、FTA-035、FTA-036、FTA-008、FTA-044、FTA-045均由实验室筛选保藏，于4 ℃保存于PDA斜面培养基上；*E. coli* DH5α、*Pichia pastoris* GS115和质粒pPIC9K由实验室保存；载体pMT18-T、Taq聚合酶、RT-PCR试剂盒和连接试剂盒购买于Takara公司；dNTP和pfu酶购自Stratagene公司；质粒抽提试剂盒购于QIAGEN公司；T4连接酶和限制性内切酶为NEB公司产品；刚果红购于BBI公司；4-硝基苯基-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷购于Alfa Aesar公司；引物由上海生工合成；其它试剂及溶剂为国产分析纯.

1.2 培养基

实验中所需培养基及配方如下：

PDA斜面培养基：马铃薯200 g，葡萄糖20 g，琼脂15 g，水1 000 mL.

纤维素－刚果红分离固体培养基[9]：CMC-Na 2.0 g，$(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g，$MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.5 g，KH_2PO_4 1.0 g，NaCl 0.5 g，刚果红0.4 g，琼脂0.4 g，水1 000 mL；pH 7.0. 于121 ℃灭菌30 min.

纤维素－刚果红液体富集培养基：CMC-Na 2.0 g，$(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g，$MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.3 g，KH_2PO_4 1.0 g，$CaCl_2$ 0.3 g，$FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 4 mg，$MnSO_4$ 1.6 mg，$ZnCl_2$ 1.7 mg，$COCl_2$ 1.7 mg，刚果红 0.2 g，水1 000 mL；pH 7.0. 于121 ℃灭菌30 min.

黑曲霉产酶培养基：见文献[10].

BMGY或BMMY培养基：1%酵母提取物，2%蛋白胨，100 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH 6.0)，1.34% (*w/V*) YNB，4×10^{-5}% (*w/V*)生物素，1% (*V/V*)甘油或0.5% (*V/V*)甲醇

1.3 高产*β*-葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株筛选

供试菌种在无菌条件下接入PDA平板培养基中，于30 ℃培养箱培养3~7 d. 活化后的菌株在纤维素－刚果红分离固体培养基上进行划线分离，于30 ℃培养3~7 d；并在纤维素－刚果红液体富集培养基里富集培养，于30 ℃、150 r/min下摇床培养3~7 d，观察结果.

1.4 酶活的测定

参见文献[11]. 以15 μL 50 mmol/L的4-硝基苯基-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷为底物与45 μL 0.1 mol/L乙酸钠缓冲液(pH 4.8)预先于50 ℃平衡，将1 mL培养菌液离心，取30 μL上清液加入底物中，于50 ℃反应30 min，反应用600 μL 0.4 mol/L甘氨酸缓冲液(pH 10.8)终止，以30 μL沸水灭活酶液作空白对照测$D_{430\ nm}$. 定义在最适反应条件下每分钟催化底物水解产生1 μmol对硝基苯酚的酶量为1个酶活单位.

酶蛋白量的测定采用Bradford法[4]，以BSA为参照.

1.5 RT-PCR扩增*β*-葡萄糖苷酶cDNA

总RNA提取采用CTAB法，具体步骤参考文献[12]. RT-PCR正向引物为FTAF：5'-TCCCCACCGTATTACCCATCC-3'，反向引物为FTAR：5'-TTAGTGAACAGTAGGCAGAGACG-3'. 第一步反转录反应组成为：1 μL 10 mmol/L dNTP、1 μL 2.5 μmol oligdT Primer、1 μL黑曲霉FTA-008总RNA及7 μL ddH_2O；混合物在65 ℃下处理5 min后冷却到4 ℃；然后加入4 μL 5×Prime Script™ Buffer、0.5 μL 40 U/μL Rnase inhibitor、0.5 μL Rtase及5 μL ddH_2O，混匀后在 42 ℃下处理20 min后冷却到4 ℃. 第二步PCR反应为50 μL体系，其中含有5 μL 10×PCR buffer、2 μL dNTP (10 mmol/L each)、10 μmol引物各0.5 μL、0.5 μL 5 U/μL TaKaRa Ex Taq™ HS和5 μL反转录反应液. 反应条件：94 ℃ 30 s；58 ℃ 30 s；72 ℃ 3 min；30个循环. PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测并用回收试剂盒回收约2.5 kb片段.

1.6 *bgl*1基因的克隆和序列分析

将PCR扩增产物纯化后连接到pMD18-T克隆载体上，转化到*E. coli* DH5α感受态细胞. 筛选得到含*bgl*1基因的阳性克隆，进行酶切鉴定和送Invitrogen公司序列测序分析. 序列已保存在 NCBI GenBank，收录号为FJ431207.

1.7 *bgl*1基因在毕赤酵母中的表达

测序正确的阳性克隆经*Bsal* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切与pPIC9K (经*EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切)重组构建表达载体pPIC9K-bgl1，再*Pme* Ⅰ线性化重组子，电转化到*P. pastoris* GS115，MD平板于30 ℃培养2 d. 通过G418筛选得到多拷贝子重组单菌落GP26，依据毕赤酵母表达手册，将多拷贝子GP26接种于25 mL的BMGY培养基，于30 ℃、240 r/min培养24 h，然后收集菌体，以等体积的含0.5%甲醇的BMMY培养基重悬菌体，于30 ℃、240 r/min诱导表达*β*-葡萄糖苷酶. 每24 h取样，补加甲醇至终浓度为0.5%，通过测定酶活及SDS-PAGE检验表达效果.

2 结果与分析

2.1 供试菌株产*β*-葡萄糖苷酶能力的比较与筛选

以曲霉属FTA-001、FTA-002、FTA-003、FTA-006、FTA-034、FTA-035、FTA-036、FTA-008、FTA-044、FTA-045

表1 *β*-葡萄糖苷酶产生菌筛选结果

Table 1 *β*-glucosidase activities of different *Aspergillus* strains

测定菌种 Tested strain	发酵周期 Fermentation cycle (*t*/d)	平板有无透明圈 Transparent circle on flat (yes or no)	液体培养基颜色变化[a] Change in color of liquid culture medium [a]	*β*-葡萄糖苷酶活力 *β*-glucosidase activity (A/U mL^{-1})
FTA-001	3	Yes	++	2.051
FTA-002	5	Yes	+	0.640
FTA-034	3	Yes	+—+	0.592
FTA-003	6	Yes	+—+	1.037
FTA-035	4	Yes	+	1.434
FTA-036	5	Yes	+	0.088
FTA-006	5	Yes	+	0.265
FTA-044	5	Yes	+—+	0.286
FTA-045	5	Yes	+	0.243
FTA-008	3	Yes	+—+	2.885

a)：“+”，液体培养基颜色变浅；“++”，变浅较快；“+—+”，变浅较慢

a): “+” showing change of lighter color of the liquid culture medium, “++” faster change and “+—+” slower change

为供试菌种，在最适宜的培养基和培养条件进行β-葡萄糖苷酶的产酶实验，并比较各菌株的产酶活力. 由结果(表1)可知，10种实验菌株均能分泌β-葡萄糖苷酶，但能力相差较大：5株黄曲霉产酶周期均为5 d，其中FTA-044所产的β-葡萄糖苷酶相对较高，为0.29 U/mL；3株黑曲霉产酶周期均为3 d，其中FTA-008的β-葡萄糖苷酶表达量为2.89 U/mL，几乎是FTA-044的10倍. 图1显示了菌株FTA-008的产酶周期，其最高比活力达到31.8 U/mg. 以下研究均围绕β-葡萄糖苷酶高产菌株FTA-008展开.

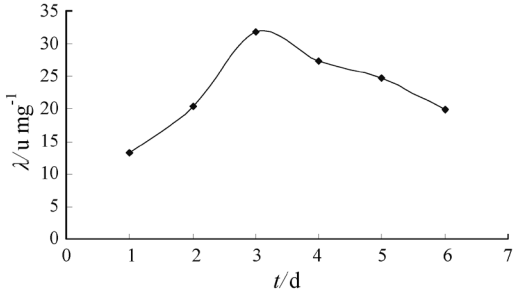

图1 黑曲霉FTA008产酶曲线
Fig. 1 Fermentation production curve of *A. niger* FTA008

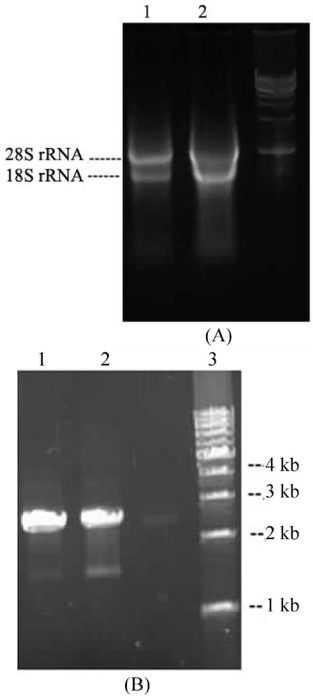

图2 黑曲霉FTA-008总RNA电泳图(A)和RT-PCR扩增产物电泳图(B)
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *A. niger* FTA-008 (A) and agarose gel electrophoresis of RT-PCR products (B)
A：1~2，提取的总RNA. B：1~2，RT-PCR产物；3：分子量标记
A: Lanes 1~2, Extracted total RNA. B: Lanes 1-2, RT-PCR products; Lane 3, Marker

2.2 黑曲霉β-葡萄糖苷酶cDNA的获得

采用CTAB法提取的总RNA电泳后进行凝胶成像，结果如图2-A所示. 其中两个样品28S和18S的条带都很整齐，亮度比接近2 : 1，$A_{260\ nm} : A_{280\ nm} = 1.999$，说明RNA完整性很好，在提取过程中没有降解现象发生，而且纯度很高，可以进行RT-PCR扩增. 利用RT-PCR技术进行扩增后，产物电泳图如图2-B所示. 两个平行反应均得到2 500 bp左右的产物，特异性强，片段大小与目的基因相符.

2.3 *bgl*1 cDNA的序列测定与分析

将PCR纯化产物连接到pMD18-T上的阳性克隆，进行酶切鉴定和序列测定分析，所得目的基因片段大小为2 511 bp (NCBI accession No. FJ431207)，其中A 528个、T 555个、G 738个、C 690个，GC含量为56.9%. 将该序列与GenBank中AJ132386进行比较分析，发现两者的核苷酸序列同源性达到93.4%，氨基酸序列同源性达到96.8%，同源性较高. 将FTA-008 *bgl*1序列在NCBI上Blast，得到17个同源性较高的序列，其中XM 001816779.1、AP007150.1、AB225648.1的同源性为75%，该3个序列均为*Aspergillus oryzae*的基因序列，而其余同源性在95%以上的8个序列都为*A. niger*的*bgl*1基因序列，其中DQ220304.1、AM270402.1、AM270402.1的同源性高达100%，所以克隆得到的目的基因为*A. niger*的*bgl*1基因，该基因可编码一个836个氨基酸的蛋白质，预测相对分子质量(M_r)为91×10^3.

2.4 β-葡萄糖苷酶BGL1在毕赤酵母中的表达

通过双酶切构建重组表达质粒pPIC9K-bgl1，随后线性化重组子并电转化入毕赤酵母GS115中，获得的重组单菌落通过MD平板和G418筛选得到多转化子GP26. 活力测试表明，此蛋白成功实现了外泌表达，细胞中没有检测到β-葡萄糖苷酶活力，而培养液中活力较高，比活力达到7.85 U/mg. 对培养液中的蛋白进行SDS-PAGE，结果(图3)进一步证明了BGL1在毕赤酵母中成功表达，M_r为115×10^3. 这与预测分子量略有差异，主要原因是毕赤酵母中蛋白转录后的修饰所增加的寡糖链长度为平均每个支链8~14个甘露糖残基，从而导致了实际表达蛋白分子量与预测分子量之间的差异.

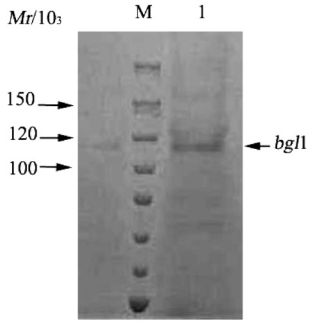

图3 毕赤酵母表达BGL1的SDS-PAGE图
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of BGL1 secreted from *P. pastoris*

3 结 论

β-葡萄糖苷酶作为纤维素酶中的一个重要组分，在医药、食品、生物转化中具有重要的应用价值[13]，特别是随着近年来环境能源等危机的加重，作为生物能源重要材料之一的木质纤维素含有最广泛的碳源，越来越受到各国政府的高度重视. 本文通过对10株曲霉属菌种进行筛选，得到一个高产β-葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株FTA-008，其酶活达2.89 U/mL，适宜产酶周期为3 d. 通过初步的筛选为进一步优化培养条件和基因工程高效表达奠定了一定的基础.

β-葡萄糖苷酶是纤维素彻底降解为单糖的一个瓶颈，但它在纤维素酶系中含量很低，对它能将纤维二糖降解为单糖的催化机制了解得也不是很清楚，因此开展关于*β*-葡萄糖苷酶基因方面克隆和表达的研究具有重要的意义. 本实验通过对*bgl*1基因的克隆及在毕赤酵母中的表达，比活力达到7.85 U/mg，为大规模生产黑曲霉的*β*-葡萄糖苷酶制剂，有效降解纤维二糖工艺成本的可能性提够了理论依据. 目前我们正在开展该酶的体外分子定向进化、结构功能关系等研究，有关研究结果将进一步报道.

References

1 Wang JP (王建平), Chen XE (陈小娥). A survey study on cellulose. *J Zhejiang Coll Fish* (浙江水产学院院报), 1996, **15** (2): 140~144

2 Zhang HY (张鸿雁), Chen XS (陈锡时). 微生物纤维素酶分子生物学研究进展. *Biotechnology* (生物技术), 2003, **613** (3): 41~42

3 Wang TH (汪天虹), Wu J (吴静), Zou XX (邹小霞). Advances of molecular biology of *Trichoderma reesei*. *Mycosystema* (菌物系统), 2000, **19** (1): 147~152

4 Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, Uozumi T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochemistry*, 1999, **125** (4): 728~736

5 Gu WM (顾卫民). The chatacteristic of *β*-glucosidase and its application in food industry. *Jiangsu Food & Fermentation* (江苏食品与发酵), 2003, **112** (1): 5~7

6 Brumbauer A, Reczey K. Beta-glucosidase production of two different *Aspergillus* strains. *Acta Alimentaria*, 1999, **28** (4): 361~370

7 Jiong H, Hisanori T, Hidehiko K. Cloning and functional expression of thermostable *β*-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. *Appl Microbiol Biotechnol* (工业微生物), **2007, 73** (6): 1331~1339

8 Zhao LG (赵林果), Zhou TC (周潭澈), Meng P (孟鹏). Screening of *β*-glucosidase producing strain and analysis of cellulase composition. *Ind Microbiol*, 2007, **37** (5): 47~50

9 Ye JY (叶姜瑜). A new differential medium for cellulose decomposing microorganisms. *Microbology* (微生物学通报), **1997, 24** (4): 251~252

10 Montenecourt BS, Eveleigh DE. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **34** (6): 777~782

11 Thomas M, Wood K, Bhat M. Methods for measuring cellulose activities. *Methods Enzymol*, 1988, **160** (9): 87~111

12 Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA minipreparеation: Version Ⅱ. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, **1** (4): 19

13 Michael EH, Mark FR, Charles E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10** (4): 358~364