
分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

细菌纤维素外切酶基因的筛选及耐热
纤维素酶基因在枯草杆菌系统里的表达

刘建明

指导教师姓名: _____ 鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: _____ 硕士 _____ 专业名称: _____ 生物化工 _____

论文定稿日期: _____ 2011-4-1 _____ 论文答辩日期: _____ 2011-5-20 _____

学位授予单位: _____ 华东理工大学 _____

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: (姓名、职称)

评 阅 人: (姓名、职称)

作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

细菌纤维素外切酶基因的筛选及耐热纤维素酶基因

在枯草杆菌系统里的表达

摘要

筛选性能优良的纤维素酶组分和建立高效分泌纤维素酶的表达系统对于木质纤维素的利用和生物炼制行业成本的降低非常重要。构建分泌纤维素酶的重组菌有很多的优势,比如产酶营养需求低,便于在分子水平上对产酶基因进行表达调控等。

本研究首先借助 *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a (+) 表达系统,筛选了来自热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*), 解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 和野油菜黄单孢菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 的近 20 种细菌纤维素外切酶基因,比较了其外切酶的酶活。同时为了实现纤维素酶的胞外分泌表达,建立了枯草杆菌表达系统 *Bacillus subtilis* WB600 (WB800)/pP43JM2, 随后将来源于热纤梭菌的外切葡聚糖酶 CbhA, CelK, Cel48S, Cel48Y, CelO 和内切葡聚糖 CelA 以及欧文氏菌(*Erwinia carotovora* subsp.)的内切葡聚糖酶 CelV, 嗜热放线菌(*Thermomonospora fusca*)的内切酶 CelE 在枯草杆菌表达系统里进行了表达。实验结果表明,除了外切酶 CelO 外,其它四种纤维素外切酶和三种不同来源的纤维素内切酶在枯草杆菌 WB600 和 WB800 中都实现了成功的分泌型表达,以磷酸处理的微晶纤维素为底物,外切酶在枯草杆菌 WB800 表达系统中的酶活要普遍高于相应的 WB600 的酶活,外切酶 CbhA 释放的还原糖的量可以达到 300 mg/L,而 WB600 分泌的内切酶 CelA 释放的还原糖可以高达 1250 mg/L。对于微晶纤维素和稀酸处理的秸秆等结晶度较高的底物,外切酶 CbhA 和内切酶 CelA 呈现良好的协同作用。在枯草杆菌里表达纤维素酶为实现纤维素酶多组分的人工组装以及枯草杆菌整合生物工艺菌种的构建奠定了基础。

关键词: 纤维素酶基因; 热纤梭菌; 枯草杆菌; 穿梭质粒; 协同效应

Screening for Cellobiohydrolase Genes and The Secretion of Thermostable Cellulase in *Bacillus subtilis*

Abstract

The screening for the powerful cellulase components remains to be a challenging work for the biorefinery research and development. The engineered bacterial strains for production of cellulase would provide many advantages, such as the low nutrients requirement, easy manipulation of genetic engineering, etc.

In this study, about 20 cellobiohydrolase genes sourced from *Clostridium thermocellum* DSM 1237, *Clostridium cellulolyticum* DSM 5812 and *Xanthomonas campestris pv. campestris* strain 8004, were tested to be expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+) system for activity evaluation. In order to realize the secretion of cellulases extracellularly, *Bacillus subtilis* WB600 (WB800)/pP43JM2 expression system was constructed. When the targeting genes including cellobiohydrolase genes from *Clostridium thermocellum*, endoglucanase genes from *Clostridium thermocellum*, *Erwinia carotovora subsp.* and *Thermomonospora fusca* were cloned into pP43JM2 and expressed in *B. subtilis* WB600 and WB800, all the cellulases, except for *celO*, were expressed and secreted into the broth and showed the activities with phosphoric acid swollen cellulose as the substrate. For cellobiohydrolases, the enzyme activities from WB800 were much higher than that from WB600, CbhA can produce 300 mg/L reducing sugars. While for endoglucanase CelA, the reducing sugars reached 1250 mg/L. Through the combination of CbhA and CelA, it showed a clear synergistic effect towards Avicel and dilute-acid pretreated corn stover.

The established *B. subtilis* expression system was proven to be a useful platform for secretive expression and would be applied for multiple cellulase production in the future research. Efficient secretion of active cellulase is the first step in the development of *B. subtilis* consolidated bioprocessing cells that can produce cellulase, hydrolyze cellulose, and ferment the soluble sugars to products.

Keywords: cellulase genes; *Clostridium thermocellum*; *Bacillus subtilis*; shuttle vector; synergistic effect

目录

前言.....	1
第 1 章 文献综述.....	3
1.1 纤维素降解型微生物和纤维素酶研究进展.....	3
1.1.1 降解纤维素微生物的种类.....	3
1.1.2 纤维素酶系统的组成和协同作用.....	4
1.1.3 糖基水解酶家族 (Glycoside hydrolase families).....	5
1.1.4 细菌纤维素酶和真菌纤维素酶的区别.....	5
1.2 纤维素酶活力的表征.....	6
1.2.1 外切酶酶活测定方法.....	6
1.2.2 内切酶酶活测定方法.....	6
1.2.3 β -葡萄糖苷酶酶活测定方法.....	6
1.2.4 纤维素酶总活力的测定.....	7
1.3 枯草杆菌表达系统.....	7
1.3.1 枯草杆菌表达系统概述.....	7
1.3.2 枯草杆菌表达系统中的载体.....	8
1.3.3 枯草杆菌中的分泌表达特点.....	9
1.4 纤维素酶在枯草芽孢杆菌中的表达.....	12
1.4.1 游离的纤维素酶在枯草杆菌中的表达.....	12
1.4.2 纤维小体在枯草杆菌中的重构.....	13
1.4.3 整合生物工艺 (Consolidated bioprocessing) 菌种的构建.....	14
第 2 章 材料与amp;方法.....	16
2.1 实验材料.....	16
2.1.1 菌株与载体.....	16
2.1.2 主要试剂.....	16
2.1.3 实验仪器.....	17
2.1.4 培养基, 主要溶液的配制.....	18
2.2 实验及分析方法.....	20
2.2.1 基因组的制备.....	20
2.2.2 PCR 获得目的基因.....	20
2.2.3 目的基因克隆.....	22

2.2.4	大肠杆菌表达载体的构建和重组菌诱导表达.....	24
2.2.5	大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 的构建.....	25
2.2.6	枯草杆菌表达载体的构建和重组菌的培养.....	25
2.2.7	SDS-PAGE 电泳.....	26
2.2.8	酶活测定.....	27
第 3 章 实验结论.....		30
3.1	细菌纤维素外切酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达.....	30
3.1.1	热纤梭菌 (<i>Clostridium thermocellum</i>) 的纤维素外切酶基因的克隆与表达.....	30
3.1.2	解纤维梭菌 (<i>Clostridium cellulolyticum</i>) 纤维素外切酶基因的克隆与表达.....	39
3.1.3	野油菜黄单孢菌中外切酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达.....	43
3.2	枯草杆菌表达系统的建立和外切酶在枯草杆菌中的表达.....	45
3.2.1	大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 的构建.....	45
3.2.2	热纤梭菌外切酶基因在枯草杆菌中的表达.....	47
3.3	内切葡聚糖酶在枯草杆菌中的表达.....	55
3.4	协同作用.....	58
3.4.1	外切酶之间的协同作用.....	58
3.4.2	外切酶与内切酶之间的协同作用.....	59
第 4 章 结论和展望.....		61
参考文献.....		63
致谢.....		67

前言

以木质纤维素为原料制备燃料乙醇或生物柴油被认为是缓解能源危机的一种有效路径，可以从很大程度上推动社会的可持续发展。然而生物质利用的一大部分成本集中在将纤维素，半纤维素等高聚物转化成可发酵的单糖这一糖化步骤中。糖化过程的关键在于综合利用纤维素酶系，廉价高效的产生可利用的底物。纤维素酶系的组成至少需要三种酶的参与：内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4); 外切葡聚糖酶或纤维二糖水解酶 (EC 3.2.1.91); β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)。内切葡聚糖酶从大孔纤维素链的内部随机水解 β -1,4-糖苷键，生成新的还原端或非还原端；外切葡聚糖酶从纤维素链的两端水解下纤维二糖分子； β -葡萄糖苷酶则把纤维二糖降解成葡萄糖。纤维素的完全降解需要上述三种酶的持续性，协同性的发挥作用。但是因为纤维素酶的成本高，木质纤维素的酶解过程成为制约生物质原料利用的一大瓶颈。因此开发高效廉价的纤维素酶系对整个生物炼制行业成本的降低起着举足轻重的作用。

为了降低纤维素酶的生产成本，筛选性能优良的纤维素酶组分，构建分泌纤维素酶的重组工程菌越来越多的引起了人们的重视。在重组菌内表达纤维素酶有很多优势，比如有利于胞外筛选性能高的纤维素酶组分；便于对纤维素酶组分的表达在分子水平上进行调控以及可以直接用工程菌的发酵液作为粗酶液进行水解，大幅度的省却分离的成本等。

过去几年对纤维素酶的分子性能和生化特征上的鉴定和改造得益于完善的大肠杆菌基因操作系统。利用大肠杆菌表达系统固然操作成熟，但是并不能保证所有的外源蛋白都能够实现成功表达。而且利用大肠杆菌表达外源蛋白容易形成包涵体，不易将外源蛋白分泌到细胞外。而对于纤维素酶等水解酶的生产，选择适宜胞外分泌的宿主尤为重要。枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)以其良好的基因表达工具和胞外分泌性能引起了人们的广泛兴趣。另外枯草杆菌属于革兰氏阳性菌，在分泌一些分类学水平相似细菌的外源蛋白方面，有其独特的优势。如热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)的纤维素酶基因 *celA*，食纤维梭菌(*Clostridium cellulovorans*)的纤维素酶基因 *engB*，*xynB* 等基因都在枯草杆菌中成功的实现了的胞外表达。

本研究首先以大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)为表达系统，筛选了来自热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)，食纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)和野油菜黄单孢菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)的近 20 种细菌纤维素外切酶基因，比较了其外切酶的酶活。同时构建高效的枯草杆菌分泌表达的平台 *B.subtilis* WB600 (WB800)/pP43JM2，借助这一平台表达了热纤梭菌的五个外切葡聚糖酶基因 *cbhA*，*celK*，*celO*，*cel48S*，*cel48Y* 和内切葡聚糖基因 *celA* 以及欧文氏菌(*Erwinia carotovora* subsp.)的内切葡聚糖酶 *celV*，嗜热放线菌(*Thermomonospora fusca*)的内切酶 *celE*，目的是从解析众多纤维素酶基因在枯草杆菌表达系统里的分泌水平以及对预处理底物的降解性能，为以

后在枯草杆菌里表达不同的酶组分和不同形式的复合酶创造了条件。利用枯草杆菌表达系统一方面可以直接利用枯草杆菌的发酵液进行糖化，省却了分离纯化的步骤，大幅度的降低了纤维素酶的成本；另一方面由于枯草杆菌能够利用纤维素水解液中的戊糖和己糖，生长速率快，营养需求简单，具有良好的外源蛋白分泌能力，可以尝试在枯草杆菌里构建或强化生物基化学品的生产路径，如乳酸，生物乙醇等，为构建 CBP(consolidated bioprocessing)统一工艺菌种创造了条件。

第 1 章 文献综述

1.1 纤维素降解型微生物和纤维素酶研究进展

木质纤维素的生物炼制过程包括：原材料的收集，预处理，酶解，发酵和蒸馏等单元操作（图 1.1），其中影响这一过程成本的主要因素在于昂贵的纤维素酶的添加和破除生物质的抗降解性所消耗掉的费用^[1]。因此筛选高性能的催化剂，构建高效分泌纤维素酶的微生物成为有效提高生物炼制过程经济性的重要措施。

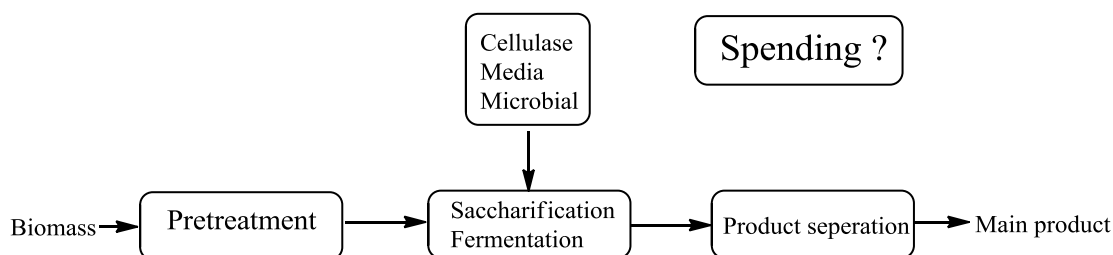


图 1.1 木质纤维素炼制流程

Fig 1.1 The whole biorefinary process from lignocellulose

1.1.1 降解纤维素微生物的种类

纤维素是以纤维二糖为结构单元通过 β -1,4-糖苷键连接而成的高聚物，是自然界中植物的主要组分，大约占植物干组分的 1/3-2/3，每年世界上纤维素的总产量估计可达 $4 \times 10^{10} \text{ t}$ ^[2]。所以纤维素是取之不尽，用之不竭的可再生的资源。在自然界中纤维素是通过纤维素降解菌将其分解的。

纤维素降解菌主要有细菌 (bacteria)，放线菌 (actinomycetes) 和真菌 (fungi)^[3]。但是目前的工业生产中纤维素酶仍然主要由木霉和曲霉两个属的菌株发酵生产。

细菌主要有假单孢菌属，以芽孢杆菌，枯草杆菌，地衣球菌为主的杆菌属，以热纤维梭菌，嗜纤维梭菌为代表的梭菌属等。

放线菌主要有诺卡氏菌，节杆菌，链霉菌，小单孢菌和高温放线菌属等，因为放线菌能形成芽孢，可以在极端的环境中生长，所以放线菌来源的纤维素酶一般是耐高温，耐高酸碱度的纤维素酶。

真菌中产纤维素酶的微生物种类很多，迄今已发现多达 68 个属^[4]，其中主要有里氏木霉，绿色木霉，球毛壳，斜卧青霉，黑曲霉，米曲霉，黄孢原毛平革菌，变色多孔菌等。

另外在一些特殊的环境条件下，多种不同种类的微生物积聚在一起构成了有效的纤维素降解菌群。比如人们从高等蚂蚁的消化道、羊的瘤胃、象的粪便、腐烂的柠檬等生境中分离出多种积聚在一起的纤维素酶分泌型菌株。Sarma^[5]等在森林枯枝落叶层中分离到 *Cytophaga* 和 *Cellulomonas* 的 12 种菌株是降解纤维素的主要细菌；Vancouver 等^[6]

发现 *Ascomycetes*、*Basidiomycetes* 和 *Deuteromycetes* 的 40 株海洋真菌种，对海洋中纤维素的降解具有协同作用。

1.1.2 纤维素酶系统的组成和协同作用

能够降解结晶纤维素的微生物几乎都分泌多种纤维素酶组分的复合体。所以纤维素酶是多种酶组分的总称，一般认为纤维素酶主要有三种组分组成^[7]：外切- β -1,4-葡聚糖酶或称纤维二糖水解酶(exo- β -1,4-glucanase or cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91)，简称为外切酶；内切- β -1,4-葡聚糖酶(endo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4)，简称为内切酶， β -葡萄糖苷酶(β -1,4-glucosidase, EC 3.2.1.21)。纤维素酶降解机制如图 1.2 所示：内切酶从大孔纤维素链的内部随机水解 β -1,4-糖苷键，把长链纤维素降解成短链，聚合度低的纤维糊精，同时生成新的还原端或非还原端；外切酶从纤维素链的两端(还原端或非还原端)水解下纤维二糖分子； β -葡萄糖苷酶则把纤维二糖和可溶性的纤维寡糖降解成葡萄糖。纤维素的完全降解至少需要上述三种酶的持续性，协同性的发挥作用。事实上由于每株菌所要降解的天然纤维素材料的组成和结构有差异，所以其分泌的纤维素酶组分和纤维素酶之间的比例都会有所不同。

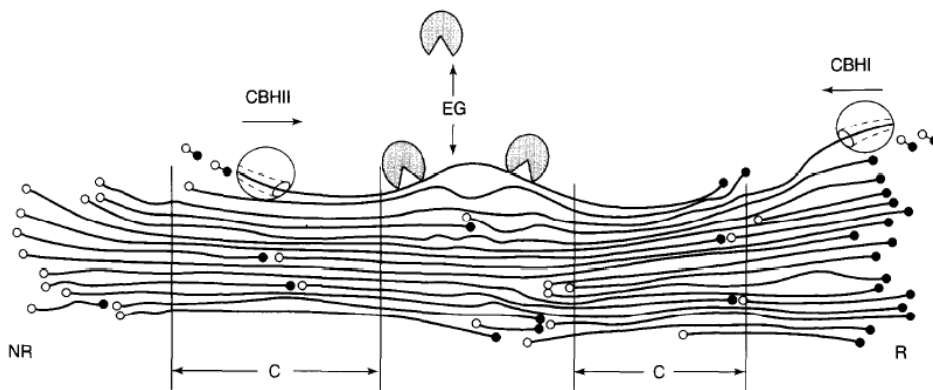


图 1.2 纤维素酶降解机制

Fig 1.2 The mechanism of cellulase degradation

现在工业上用的纤维素酶制剂大多还含有半纤维素酶，其中包括木聚糖酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、角质酶和淀粉酶等。

协同作用是指纤维素酶组分混合而呈现的酶活力要高于各组分酶单独作用的酶活力的总和的一种现象^[8]。目前纤维素酶降解纤维素所表现出的协同作用主要有以下几种方式：(1) 外切酶与外切酶的协同作用，即不同的外切酶分别作用于纤维素链的还原端和非还原端；(2) 内切酶与外切酶的协同作用，传统上认为内切酶使纤维素的聚合度降低，生成了更多的还原端和非还原端，从而增加了外切酶在纤维素表面上的作用位点，但有的外切酶和内切酶则是靠着酶与酶之间的相互结合，形成酶复合物然后增强对纤维素的降解效果；(3) 内切酶与内切酶的协同作用，作用在不同的内切酶之间，多种酶通过相互影响或相互促进来达到更好的酶解效果；(4) 外切酶或内切酶与 β -糖苷酶的协同作用，从而消除纤维二糖或纤维寡糖对纤维素酶的反馈抑制；(5) 纤维素酶催化区域与

纤维素酶锚定区域的协同作用，纤维素酶锚定区域本身没有催化活性，但是它能够将纤维素酶锚定在纤维素的表面，增强了酶的底物浓度，加大了纤维素催化区域与底物的接触机会；(6) 纤维小体，以热纤梭菌为代表的梭菌属大多能够分泌纤维素酶的复合体，它由脚手架蛋白，具有催化活性的纤维素酶，结合蛋白，锚定蛋白等多种蛋白组成，纤维小体介于细菌与纤维素之间，三者呈现出良好的协同作用。

1.1.3 糖基水解酶家族 (Glycoside hydrolase families)

早在 1991 年，Herissat 提出根据糖基水解酶氨基酸序列相似性进行分类的方法^[9]。依据这一方法，人们将糖基水解酶归为不同的家族，每个家族中酶的氨基酸序列相似性很高，酶的三维结构也非常相似。糖基水解酶家族的分类数据库 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) 的更新速度很快，目前已有 122 个家族的

表 1.1 部分糖基水解酶家族的性质

Table 1 Partial characters of Glycoside hydrolase family 5,6,9,48.

Family	GH5	GH6	GH9	GH48
Mechanism	Retaining	Inverting	Inverting	Inverting
Protein donor	Glu	Asp	Glu	Glu
Catalytic Nucleophile	Glu	Asp	Asp	Not known
3D structure	(β/α) ₈	None	(α/α) ₆	(α/α) ₆
Clan	GH-A	None	Formely known as cellulase family E	GH-M

信息。内切酶主要出现在第 5,6,7,8,9,12,44,48 等家族；外切酶则分属于第 5,6,9,48 这四个家族中，其部分特性如 Table 1 所示； β -糖苷酶分布在第 1,3,9,30,116 五个家族中。

1.1.4 细菌纤维素酶和真菌纤维素酶的区别

一般而言，细菌纤维素酶的降解效率低于真菌。但是也有例外，粘细菌具有完全降解天然结晶纤维素的能力，只是迄今对粘细菌降解纤维素的机制仍未清楚^[10]。另外高温厌氧梭菌也具有较弱的纤维素降解能力，如热纤梭菌靠在细胞表面形成纤维小体 (cellulosome) 达到高效降解纤维素的目的。其中纤维小体指的是多酶复合体，由二十几个亚单位组成，分子量一般在 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6 \text{Da}$ ^[11]。纤维小体的形成对于降解纤维素有较高的协同作用，它的一端锚定在细菌表面，另一端结合在纤维素上，这样形成的“纤维素-纤维小体-细菌”复合体能够高效的将纤维素水解得到的糖吸收到细菌内部，避免了糖的分散游离效应，这可能是细菌在进化过程中形成的一种更有利于生存的方式。纤维小体的这种有效降解纤维素的机制对于纤维素酶的开发有重要的意义。

真菌纤维素酶来源广，特别是木酶属，曲霉属，青霉属。而且分泌的酶系组成相对完整，纤维素酶活力往往比细菌高，应用也比较广泛，目前商业用酶大多来源于真菌所产的纤维素酶，但是真菌发酵产纤维素酶往往需要加入价格昂贵的诱导剂，如槐糖等，而且真菌对氧的需求较高，耗能多，生产成本高。

另外细菌纤维素酶和真菌纤维素酶在蛋白质的结构上也有明显的差异^[12], 真菌纤维素酶催化区域和锚定区域之间的连接桥富含 Gly、Ser 和 Thr, 而细菌纤维素酶的连接桥则主要有 Pro-Thr 这样的重复顺序组成。真菌纤维素酶的结合区域由 33-36 个氨基酸组成, 具有较高的同源性(~79%), 而细菌纤维素酶的结合区由 100~110 个氨基酸组成, 同源性较低。细菌纤维素酶的催化区域不吸附纤维素, 对可溶性底物的活力不低于整个纤维素酶的总活力, 真菌纤维素酶的催化区域对纤维素有吸附作用, 其活力达不到整个酶分子相应的活力。

1.2 纤维素酶活力的表征

目前纤维素酶活力的测定方法一是测定纤维素酶的总水解酶活; 另一个是测定纤维素酶系统中各个组分 (外切酶、内切酶和葡萄糖苷酶) 的单独活性。由于纤维质材料本身理化性质的差异和纤维素酶组分的复杂性, 因此纤维素酶酶活测定的方法有很多, 以下列举的是常见的纤维素酶总酶活, 内切酶, 外切酶和 β -糖苷酶的酶活测定方法。

1.2.1 外切酶酶活测定方法

不同的外切酶可以选择性的从纤维素链的还原端或非还原端开始水解。所以微晶纤维素 PH-101, PH-105 等底物常被用来测定外切酶的活力。另外一些大孔纤维素, 如磷酸处理微晶纤维素 PASC (phosphoric acid swollen cellulose), 无定形纤维素 RAC (regenerated amorphous cellulose) 也常被用来测定外切酶的活力。

用发色基团连接的纤维寡糖如对硝基苯纤维二糖苷 PNPC (*p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside), 4-methylumbelliferyl- β -D-lactoside 等物质作为底物也已经广泛用于外切酶活力的测定。PNPC 被外切酶特异性的水解成纤维二糖和 *p*-nitrophenol (PNP), 4-methylumbelliferyl- β -D-lactoside 被水解成乳糖和苯。但这些发光物质只对于那些从非还原端水解纤维素的外切酶有效, 而对于从还原端降解纤维素的外切酶, 不能用这些物质来测定酶活。

1.2.2 内切酶酶活测定方法

内切酶与外切酶的主要区别是内切酶可以快速水解羧甲基纤维素 CMC, 快速降低 CMC 的粘性, 而外切酶从纤维素的两端开始水解, 羧甲基的结合对于外切酶发挥活性具有阻碍作用。

可溶性纤维寡糖以及其发色底物如 *p*-nitrophenyl glucosides, methylumbelliferyl- β -D-glucosidases 等也常用于内切酶活力的测定, 其产物可以通过薄板层析 (TLC) 或高压液相色谱分离 (HPLC) 等方法检测糖链的长度。另外采用刚果红等染料对琼脂糖平板着色也可以测定内切酶的活力, 该方法常用于内切酶的筛选, 高通量样品的测定。

1.2.3 β -葡萄糖苷酶酶活测定方法

β -葡萄糖苷酶可以以纤维二糖或聚合度在 6 以下的纤维寡糖为底物, 通常称为“纤维二糖酶”, 其水解活性随着聚合度的升高而明显降低。

β -葡萄糖苷酶的酶活可以通过水解纤维二糖测定，外切酶和内切酶都不能够水解纤维二糖。另外各种发色或者发荧光的底物如对硝基苯葡萄糖苷 PNPG (p-nitrophenyl- β -D-glucosidase)等也可以用来测定 β -葡萄糖苷酶的酶活。

1.2.4 纤维素酶总活力的测定

最常用的纤维素酶总活力测定方法是 IUPAC (International Union Of Pure and Applied Chemistry) 1987 年确立并公布的^[13]。该方法以 Whatman1 号滤纸作为底物，测定其滤纸酶活 FPA (Filter paper activity)，要求 60 分钟内从 0.050 克的滤纸条上生成 2 mg 的葡萄糖，以保证纤维素的无定形区与结晶区都发生水解，因此在水解之前要反复调整纤维素酶的浓度使其恰能水解生成 2 mg 的葡萄糖。这种方法通用，程序简单，底物易获得。但是该方法酶浓度调整易出现实验误差。

值得说明的是滤纸酶活并不等同于纤维素酶对木质纤维素的糖化能力，在实际应用中，准确测定纤维素酶样品的糖化能力非常困难，为了相对测定纤维素酶对实际底物的水解性能，人们发明了用预处理的木质纤维素、棉纤维、细菌纤维素等实际原料为底物来测定纤维素酶的总酶活。只是这些方法因为底物，反应程序不同，所以一般很难做横向比较。

1.3 枯草杆菌表达系统

1.3.1 枯草杆菌表达系统概述

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 单个细胞 $0.7\sim 0.8\times 2\sim 3\ \mu\text{m}$ ，着色均匀。荚膜，周生鞭毛，可以运动，属于革兰氏阳性菌，细胞壁中不含内毒素，在条件恶劣时能形成芽孢。自 Spizizen 于 1958 年发现枯草杆菌 168 菌株为可转化菌株以来，枯草杆菌遗传学和分子生物学操作不断深入发展。美国俄亥俄州立大学 *Bacillus* 遗传保存中心 (BGSC) (<http://www.bgsc.org/>) 保存的 168 菌株的遗传突变菌株多达近千个。这些突变体涉及到酶，芽孢，感受态的形成， σ 因子，DNA 的重组修复以及正负调控等方面的基因。汤樊竑^[14]等从我国土壤中分离出可转化的菌株 Ki-2，其中包括多种突变体，Ki-2-132 便是高频可转化菌株。随着发现金黄色葡萄球菌的带有抗性标记的质粒可以在枯草杆菌中复制之后，克服了枯草杆菌中只有隐形质粒的问题。另外枯草芽孢杆菌 168 菌株的全基因组序列已经于 1997 年测序完成，相应的基因组学，蛋白质组学，分泌组学和生物信息学等领域的研究得以迅速发展^[15]。

枯草杆菌表达系统的特点^[16]：(1) 枯草杆菌是良好的外源蛋白分泌型宿主，其细胞壁只有一层外膜组成，外源蛋白可以直接分泌到培养基中；(2) 枯草芽孢杆菌自身没有致病性，美国食品和药物管理局 (FDA) 已经将其列为安全的微生物 (GRAS)；(3) 枯草芽孢杆菌高效分泌蛋白的能力源于其自身存在一套高效的分泌信号肽及分子伴侣系统，而且在大多数情况下，芽孢杆菌分泌的重组蛋白质可以具有天然构象和生物活性；(4) 枯草杆菌生长快、遗传背景清楚、基因操作工具相对成熟、营养需求简单，在工农业生产领域广泛应用。

另外枯草杆菌表达系统在表达外源蛋白方面也有一些缺陷：(1) 能自发形成感受态的菌株少，而且感受态易受培养条件的变化而变化，持续时间短，克隆效率不高；(2) 枯草杆菌在发酵后期能够产生大量的胞外蛋白酶，往往对表达产物有一定的降解作用；(3) 质粒不稳定，分为分离不稳定和结构不稳定，且存在限制修饰系统；(4) 没有统一的分泌表达工具，而且真核蛋白的表达量低或不能分泌表达；(5) 当分泌的外源蛋白有毒或对细胞生长不利时，往往在枯草杆菌里得不到有效表达。

1.3.2 枯草杆菌表达系统中的载体

常见的枯草杆菌表达系统的载体主要有三种：自主复制型质粒、整合质粒和噬菌体^[17]。

自主复制型质粒

枯草芽孢杆菌中，第一代自主复制型质粒载体主要来源于金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌。其中使用广泛的包括 pUB110、pE194 等。这些质粒的主要优点包括相对分子质量小，有较高的拷贝数，唯一的酶切位点，合适的抗性标记等。第二代载体是由上述的天然质粒与大肠杆菌质粒 pBR322 及其衍生质粒构成的双功能穿梭质粒，它既能在大肠杆菌中复制，有可以在枯草杆菌中复制。构建穿梭质粒的目的是为了刚开始的克隆工作在大肠杆菌中完成，比较方便。前两代质粒都是利用金黄色葡萄球菌质粒的复制子进行复制的，比较容易出现质粒分离和结构上的不稳定性。这是因为在质粒复制时进行滚环复制，复制过程中产生很多单链 DNA，质粒的丢失正是由于在细胞分裂时出现单链中间体而引起的。第三代质粒载体是由大肠杆菌质粒与枯草杆菌隐性质粒组成的质粒载体，这类载体操作比较稳定。

整合质粒

克服枯草杆菌质粒不稳定性的一种有效方法，是将外源基因整合到宿主染色体上。整合质粒的基本形式是在大肠杆菌质粒的基础上增加了插入的外源基因和抗性标记。质粒构建在大肠杆菌中完成，然后转化进枯草杆菌中，由于整合质粒不含有在枯草杆菌内的复制位点，所以只有成功插入到染色体上的基因片段才能进行复制。在含有整合抗性标记的抗生素培养基上，这种整合体就很容易被筛选出来。另外整合质粒还有含有转座子或温度敏感质粒组成的形式。

噬菌体

Φ105 噬菌体，sppl 噬菌体以及其它的很多噬菌体都可以用作枯草芽孢杆菌的表达载体。其中 Φ105 噬菌体是一个温和噬菌体，应用较多。它的基因组大小约为 39.2 kb，双链 DNA 两端各有一段单链粘性末端，利用鸟枪法可分离得到所需要的 DNA 片段。从 Φ105 噬菌体发展了多个载体，如 Φ105J27，Φ105dcM 等。sppl 噬菌体是一个毒性载体，其中的非必须区占基因组 DNA 的 10% 的序列。spplv 载体是将 sppl 中的非必须区用含有 *Bam* HI 酶切位点的 Linker 所取代，该载体中 DNA 片段的最大尺寸可达 6 kb 左右。

1.3.3 枯草杆菌中的分泌表达特点

枯草杆菌属于革兰氏阳性菌，大肠杆菌属于革兰氏阴性菌，它们细胞膜结构的差异导致它们在蛋白分泌方面有所差异。如图 1.4，大肠杆菌分泌蛋白往往分泌到两层细胞膜之间，即周质空间，而枯草杆菌由于没有外壁，所以蛋白一般直接分泌到培养基中，胞外分泌量最大可以达到 30 g/L。

蛋白质的分泌表达在枯草杆菌中有两种不同的途径^[18]：Sec 分泌途径和 Tat 分泌途径，这两种不同的途径通过行使不同的机制，然后将蛋白分泌到培养基中（图 1.3）。总之分泌过程是一个复杂的分子过程，涉及到多种模块的相互作用，如信号肽，蛋白分泌表达元件，分子伴侣，蛋白酶等。

枯草杆菌分泌蛋白的信号肽有三部分组成^[19]：N 区（带正电荷）、H 区（多个疏水残基）和 C 区（极性氨基酸）。信号肽的平均长度为 30 个氨基酸，而且 N 端带有较多的正电荷。枯草杆菌分泌外源蛋白的信号肽主要来自枯草杆菌自身外源分泌型蛋白和其他革兰氏阳性菌的分泌蛋白，如枯草杆菌胞外蛋白酶的信号肽，蔗糖水解酶信号， α -淀粉酶信号肽，金黄色葡萄球菌链激酶信号肽等。

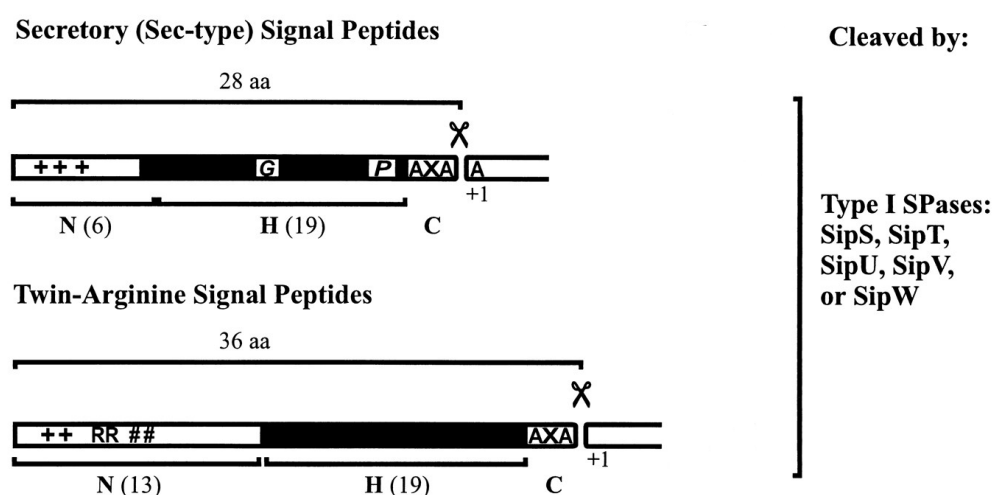


图 1.3 信号肽的特征

Fig 1.3 The characteristics of signal peptide

枯草杆菌有多种信号肽酶，其中 I 型信号肽酶和 II 型信号肽酶最为常见，I 型信号肽酶主要切割大多数分泌蛋白的典型信号肽，II 型信号肽酶主要切割二酰甘油修饰的脂蛋白前体中的信号肽。迄今已经发现枯草杆菌中存在由质粒基因或染色体基因编码的多种 I 型信号肽酶，如 SipU, SipT, SipS, SipV 和 SipW 等。不是所有的信号肽酶都是枯草杆菌分泌蛋白所必须的，而是各个信号肽酶在功能上和作用上互补的。实验表明构建多种信号肽酶缺失的枯草杆菌都能存活，但是 SipS, SipT 不能同时缺失，否则枯草杆菌无法生长。因为不同的信号肽酶有不同的调控模式和迥异的底物特异性，所以枯草杆菌有较强的胞外蛋白分泌能力，而且多个信号肽酶具有调节细胞加工分泌蛋白的能力，以此来适应多变的环境，维持生长。

蛋白质分泌表达的元件包括启动子，终止子，RBS 序列和分泌信号。

启动子是 RNA 聚合酶的识别位点，分为组成型启动子和诱导型启动子。组成型启动子是指持续表达的启动子，诱导型启动子是指加入诱导物后方可诱导表达的启动子。

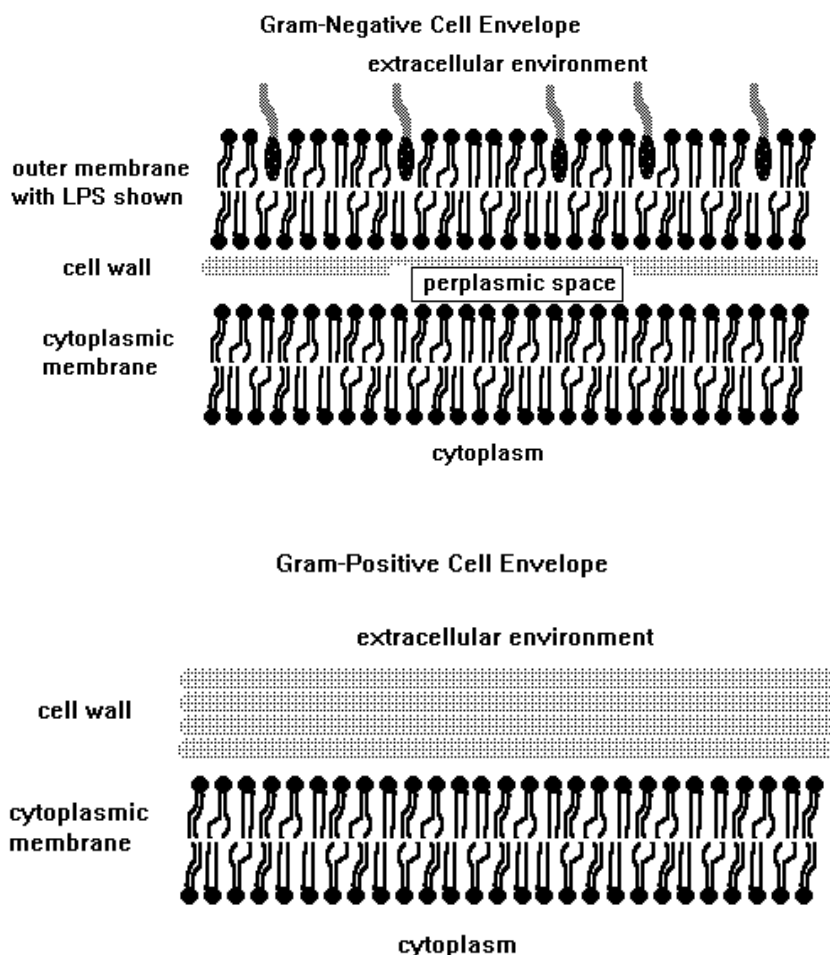


图 1.4 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁的区别

Fig 1.4 The differences of cell wall between Gram-positive and Gram-negative bacteria

枯草杆菌的启动子有两个高度保守的区域，-35 区和-10 区。枯草杆菌 RNA 聚合酶的 σ^A 因子识别的-35 区和-10 区序列分别为“TTGACA”和“TATAAT”，其它 σ 因子的 RNA 聚合酶识别的启动子的保守序列与 σ^A 识别序列存在很大差异，如 σ^B 识别的-35 区和-10 区分别是“AGGATT”和“GGAATTGTTT”， σ^D 识别的-35 区和-10 区为“CTAAA”和“CCGATAT”等。另外在枯草杆菌中，许多启动子-35 区上游和-10 区到+1 区之间的间隔区域都含有丰富的 AT 碱基对。前者能够增强基因的转录，后者便于转录时 DNA 双链的解旋。

迄今发现枯草杆菌启动子的组织形式主要有两种：一是单个的启动子，大多数具有单个启动子的基因多在快速生长时期表达；二是复合启动子，它包括串联启动子和重叠启动子。串联启动子是两个启动子串联在一起，共同启动某一个基因的转录，如在编码

核糖体 RNA 的操纵子中，两个串联启动子的-10 区的间距由一定长度的核苷酸组成。重叠启动子指的是两个启动子的部分序列重叠，如 P43 启动子，编码 *sprE* 的启动子等。这类启动子在枯草杆菌感知外界环境的变化，时序调节，孢子形成和萌发等诸多生命现象中发挥了重要作用。

终止子是终止转录的 DNA 序列，在大肠杆菌中终止子分为依赖 ρ 因子的终止子和不依赖于 ρ 因子的终止子两类。而在枯草杆菌中，只有少数几个基因如 *trp*、*gnt* 和 *spoOA* 等得到了很好的研究。研究发现，它们的终止区都有一个富含 GC 的对称序列，基因转录都是在一串 T 碱基前终止的。枯草杆菌使用的终止子在结构和序列上与大肠杆菌相似，另外有的大肠杆菌的终止结构也可以在枯草杆菌中发挥作用。

RBS 指的是 mRNA 上核糖体的识别位点，在原核生物中，RBS 中包含一段 SD 序列。枯草杆菌中最典型是 SD 序列是“GGAGG”，大肠杆菌中最典型是 SD 序列是“AAGGA”。SD 序列对于蛋白质的翻译必须的。另外 SD 序列与起始密码子之间的间距也会影响基因翻译的效率。一般来说，“GGAGG”中的最后一个 G 和起始密码子的间距为 7~9 个碱基。间隔区的碱基组成通常富含 AT。在枯草杆菌中，多数基因的起始密码子为 AUG，但个别基因由 GUG 起始。

通过上述元件构建组成型表达载体会有以下缺点：若外源基因表达产物有毒，得不到有效的表达；枯草杆菌生长后期分泌的蛋白酶会降解外源基因表达产物；影响质粒的稳定性等。所以构建可调控的表达系统是一种有效的方法。在枯草杆菌中实现可诱导调控表达主要有三种途径：

- 1、利用枯草杆菌自身诱导型启动子实现可控表达，比如果聚糖蔗糖酶基因 (*sacB*) 的启动子为诱导型启动子，它的启动子和结构基因之间有一个颈环结构 (*sacR* 区)，这是一个受蔗糖调控的转录终止序列。当培养基中没有蔗糖时，不能进行转录；只有当蔗糖存在时，*sacR* 区的转录终止作用被解除，转录才能正常进行。因此可以用 *sacR* 区与其它分泌表达元件构建蔗糖诱导分泌表达系统。

- 2、利用 *lac* 元件实现外源蛋白的诱导型分泌表达。一些研究将乳糖操纵子中的操纵子基因 (*lacO*) 插入到枯草杆菌的启动子和信号肽序列之间。并且将调节基因(*lac I*)与这些元件置于同一质粒或不同质粒上，然后构建成可分泌的调控表达载体。如果培养基中没有乳糖或 IPTG 等诱导物，外源基因转录被抑制，当有乳糖或 IPTG 时，转录才顺利进行。

- 3、温度诱导型的可调控表达。当温度发生变化时，启动或阻遏相应的外源蛋白的表达。

另外枯草杆菌在分泌外源蛋白时常需要一些分子伴侣的辅助。分子伴侣指的是细胞质中协助新生肽链折叠的一类蛋白质。分子伴侣有很多家族，如热休克蛋白 70 家族，应激蛋白 90 家族和 T 受体结合蛋白等。同一个分子伴侣可以促进多种氨基酸多肽链折叠成空间结构，性质和功能都不相关的蛋白质。在枯草杆菌的分泌表达过程中，分子伴侣可以和多肽链结合，与信号肽一起使前体蛋白处于可分泌的构象状态。

影响外源蛋白在枯草杆菌中的分泌因素有很多, Bolhuis^[20]等将其归纳为五点: (1) 细胞壁的存在是某些蛋白的分泌障碍, 枯草杆菌细胞壁主要有肽聚糖和某些阴离子(如磷壁酸、糖醛酸磷壁质)组成, 一些大的蛋白分子, 特别是那些表面带正电荷的蛋白分子很有可能会被细胞壁截留, 不能分泌到发酵液中。(2) 信号肽酶作用某些前体蛋白的方式, 对前体蛋白的加工会影响其分泌。信号肽酶切除信号肽是蛋白从细胞膜释放的必要条件, 一些信号肽酶的合成可能满足不了过量表达的外源基因的分泌。(3) 缺乏有效的分子伴侣影响某些外源蛋白的分泌。分子伴侣和信号肽识别颗粒通常能够使前体蛋白维持可分泌的构象, 对于某些外源蛋白, 分子伴侣的缺乏使其不能正确折叠成可转运的状态而在细胞质中形成没有活性包涵体。(4) 枯草杆菌对数生长后期分泌的蛋白酶对外源蛋白的降解作用, 导致外源蛋白产率非常低。(5) 膜外促进蛋白折叠的因子 PrsA 的数量影响外源蛋白的分泌水平。

1.4 纤维素酶在枯草芽孢杆菌中的表达

枯草芽孢杆菌本身能分泌多种降解多糖的酶, 如 α -淀粉酶, 支链淀粉酶, β -1,4-内切甘露聚糖酶, 果胶酶, β -1,4-内切葡聚糖酶, β -1,3 1,4-内切葡聚糖酶, β -1,4-内切木聚糖酶等, 因此它能够把多糖降解成可溶性的糖。依据 Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) database^[21], 枯草杆菌 168 菌株能够分泌 100 多种, 40 多个不同家族的糖基水解酶, 糖基转移酶, 糖酯酶和多糖裂解酶, 除了 CAZy 数据库中的这些酶之外, 枯草杆菌还分泌一种促进纤维素水解的细菌型棒曲霉素, 它本身没有纤维素降解作用, 但是对破坏纤维素的结晶, 溶胀纤维素有一定的作用。

尽管枯草杆菌能够分泌多种糖基水解酶, 但是仍然不能降解纤维素。枯草杆菌 168 不能够在最低营养盐培养基 M9 上以大孔纤维素或结晶纤维素为唯一碳源生长。为了构建纤维分解型的枯草杆菌, 异源纤维素酶在枯草杆菌中的分泌和表达水平以及活性高低应该进行深入的研究。

用枯草杆菌表达纤维素酶理论上有两种方法: 一种是质粒导入, 另外一种染色体插入。前一种方法需要考虑质粒的稳定性, 抗生素的使用与传播情况, 而后一种情况则往往需要考虑转率和翻译元件的有效性, 目的基因在染色体上的拷贝数等影响目的基因表达的因素。

1.4.1 游离的纤维素酶在枯草杆菌中的表达

Ohmiya K^[22]将热纤梭菌的单个纤维素酶内切酶基因 *celE*, Zhang YH^[23]将来源于 *Clostridium phytofermentans* 的纤维素外切酶基因 *cpcel48*, Ehrlich SD^[24]将热纤梭菌的单个热纤梭菌的内切酶基因 *celA* 以及 Liu WF^[25]将内切酶 *celA* 的突变体, 都成功的枯草杆菌里进行了表达, 并且不同程度的实现了胞外分泌。因为枯草杆菌里没有适合于所有外源蛋白的分泌表达工具, 所以针对不同的外源基因要选择不同的启动子和信号肽。研究发现, 枯草杆菌中纤维素酶的生产与枯草杆菌基因组的大小密切相关, Ogasawara^[26]通过缩短枯草杆菌的基因组大小, 显著的提高了纤维素酶的生产, 并且系统研究了纤维

素酶的生产与孢子形成基因，蛋白酶编码基因， σ 因子，胞内葡萄糖代谢相关的基因及代谢物抑制相关基因的关系。

构建能够利用纤维素的枯草杆菌往往需要表达多种纤维素酶组分，包括外切酶，内切酶和糖苷酶。而同时表达多种组分往往造成表达的困难以及对分泌元件的竞争，可以采取质粒插入和染色体导入相结合的方法，部分基因插入染色体中，另一部分基因插入质粒中。对于解决分泌的问题一是可以借助 Tat 分泌系统，另外也可以考虑分子伴侣共表达来优化外源基因的分泌。

为了避免在一个菌中共表达的缺陷，另外一种方案是把单独的纤维素酶克隆到一个菌中，然后把多种菌联合培养，来达到降解纤维素的目的。采用这种方法一定要处理好菌群效应和竞争关系。

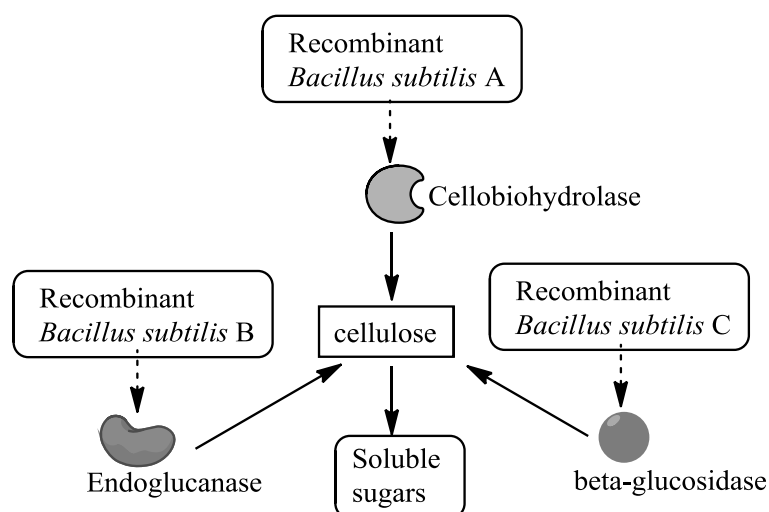


图 1.5 不同的枯草杆菌分泌不同的纤维素酶

Fig 1.5 Different cellulase secretion from different *Bacillus subtilis* strains

1.4.2 纤维小体在枯草杆菌中的重构

为了减少胞外蛋白酶对外源蛋白的降解作用，Wong SL^[27]构建了一系列的蛋白酶缺陷型菌株，其中常见的 WB600，WB700 和 WB800 分别是敲失了 6，7 或 8 个外源蛋白酶的缺陷型菌株，其中 WB800 敲失的 8 个外源基因分别是 *nprE*，*aprE*，*epr*，*bpr*，*mpr::ble*，*nprB::bsr*， Δ *vpr*，*wprA::hyg*。

通过使用蛋白酶缺陷的枯草杆菌宿主，Doi RH^[28]通过枯草杆菌表达来源于食纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 的内切葡聚糖酶 EngB 和微脚手架蛋白(scaffolding protein) 的 mini-CbpA1 在枯草杆菌 WB800 中共表达，成功的在体外重构了有活性的纤维小体。这一研究为在枯草杆菌中分泌纤维素酶，重构纤维小体和降解纤维素提高了可能。

另外 Doi RH^[29]分别在枯草杆菌里表达了来源于嗜纤维梭菌 (*Clostridium cellulovorans*) 的内切葡聚糖酶基因 *engB*，木聚糖酶基因 *xynB*，微脚手架蛋白编码基因 *minicbpA*，当表达 *engB* 和 *minicbpA* 的两种枯草杆菌或表达 *xynB* 和 *minicbpA* 的两种枯

草杆菌共培养时, 通过不同菌分泌蛋白的协同作用, 在发酵液中能够分别检测到微纤维小体 miniCbpA-EngB 或 miniCbpA-XynB 的存在。重构的微纤维小体表现出各自的酶的活性。因此枯草杆菌是纤维小体分泌的良好宿主菌。

1.4.3 整合生物工艺 (Consolidated bioprocessing) 菌种的构建

整合生物工艺菌种指的是既能够分泌纤维素酶, 又能够将酶解得到的单糖转化为有价值的化学品 (乙醇, 丁醇, 长链脂肪酸等) 的菌种。目前整合生物工艺菌种的构建主要有三种方法:

1、将高产纤维素酶的基因转化进产物合成菌株, 这些菌一般都天然具有较高的产物合成性能, 抑制物的耐受性和工业应用上的光谱性, 比如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 运动发酵单孢菌 (*Zymomonas mobilis*) 等。

2、将产物合成的相关基因导入自身分泌纤维素酶的菌种, 如里氏木霉 (*Trichoderma reesei*), 热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*), 食纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 等。这些菌种具有良好的纤维素酶分泌性能和纤维素降解效率, 分泌的纤维素酶系比较完善, 在这些菌种里构建产物合成路径是构建 CBP 微生物的另一种策略。

3、在模式生物里重构纤维素酶和产物合成途径也是构建 CBP 生物的通用可行的方式。这些模式生物分子操作工具成熟, 便于基因水平上的调控, 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等。

尽管从自然环境中已经发现了很多纤维素降解菌, 重构分泌纤维素酶的菌种面临很多的困难, 比如纤维素酶都需要分泌到细胞外或展示到细胞膜上才能发挥作用; 纤维素酶是多组分的复合酶, 常需要多组分融合表达; 酶与酶之间的协同调控复杂; 细胞内必须有足够的 ATP 用于纤维素酶的合成等。迄今为止, 重构的纤维素酶生产菌种都不能以纤维素作为唯一的营养物质进行生长, 都必须额外添加酵母膏, 蛋白胨, 氨基酸等。Van Zyl^[30]将里氏木霉来源的内切酶, 扣囊复膜酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*) 来源的糖苷酶在酿酒酵母里进行了表达, 重组的酿酒酵母可以在添加了 0.5 % 的酵母膏和 1 % 的蛋白胨的大孔纤维素培养基上生长。但是对于低附加值的产品的生产, 添加 0.1 g/L 的酵母膏经济上都是不可接受的。至于在自然产纤维素酶的菌种里重构产物合成路径也比较困难, 因为自然界产纤维素酶的菌种都是长期自然进化, 基因表达工具还远远不能满足要求的菌种, 进行代谢调控和基因操作非常困难。在模式生物大肠杆菌里分泌纤维素酶并且生产目标产物有一定的前景, 但是考虑到工业应用, 大肠杆菌有一些缺点: 在大肠杆菌中过量表达酶容易形成包涵体, 不易将外源蛋白分泌到胞外, 耐抑制物能力差等。所以哪种策略更适合工程菌的构建或者说将来理想的可以工业应用的重组菌来源于何种方法, 至今尚无定论。

最近 Zhang 提出枯草杆菌适宜用于 CBP 工艺菌种的构建^[31]。枯草杆菌细胞膜上有很多寡糖转运蛋白, 这些转运系统使得枯草杆菌能够吸收单糖, 二糖, 寡糖, 氨基糖及它们的乙酰衍生物, 葡萄糖酸和糖基衍生的多醇等物质。许多单糖包括葡萄糖, 果糖, 半乳糖, 甘露糖, 木糖和阿拉伯糖都可以作为单独的碳源使用。这些特定的多糖转运系

统和糖基利用能力使得枯草杆菌可以省去多种糖利用的基因改造，方便了 CBP 工艺菌种的构建。据报道枯草杆菌 168 不能够在以木糖为唯一碳源的培养基上生长，这是因为 168 菌株不能有效的转运木糖，但是木糖转运系统比较容易重构。

枯草杆菌在分泌纤维素酶方面有一定的研究基础，而且在枯草杆菌里进行产物合成路径的重构相对比较容易，欧洲系统生物技术协会已经建立了一个比较完整的枯草杆菌代谢和调控的模型 SubtiPathway (<http://subtiwiki.uni-goettingen.de/subtipathways.html>)，它为在枯草杆菌里进行基因调控提供了工具。同时 BaSyBio 利用噬菌体重组酶技术在枯草杆菌建立了强大的重组工程工具，相信在不久的将来枯草杆菌表达系统会像大肠杆菌和酿酒酵母表达系统那样成熟。

Martinez^[32]成功的在枯草杆菌里表达了转氢酶和来源于运动发酵单孢菌的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶，并且敲除掉 2,3-丙二醇合成路径的相关基因，构建的重组工程菌能够比较高效的生产乙醇。最近系统生物学，代谢工程，蛋白质工程等方面的进展使得对枯草杆菌的改造会变得越来越容易，利用枯草杆菌可以生产的化学品如图

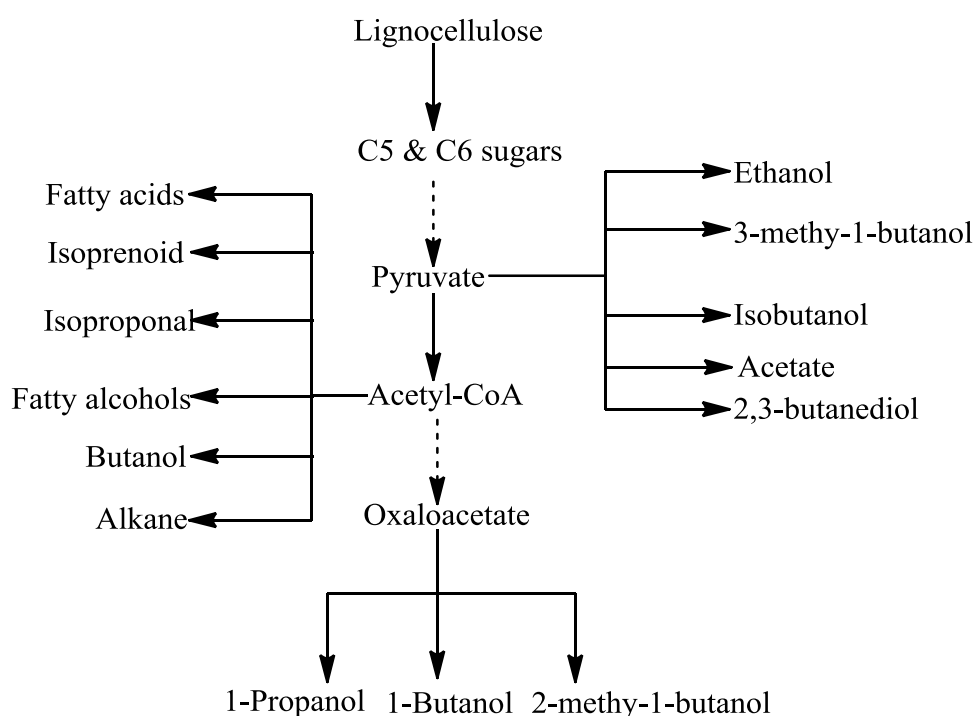


图 1.6 枯草杆菌可以生产的多种生物化学品

Fig 1.6 The potential biocommodities produced from *B. subtilis*.

第 2 章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与载体

大肠杆菌 DH5 α (*Escherichia coli* DH5 α), *E. coli* BL21 由本实验室保存, *Bacillus subtilis* WB600 和 *Bacillus subtilis* WB800, 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43NMK 分别由中科院上海植生所杨晟教授和美国弗吉尼亚理工大学张以恒教授惠赠。

表 2.1 菌株和质粒

Table 2.1 Strains and plasmids

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁺ ,supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15) <i>relA1</i>	Stored in the lab
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁺ <i>ompT hsdSB(rB⁻mB⁻) dcm gal</i> (DE3)	Stored in the lab
<i>B. subtilis</i> WB600	<i>nprE, aprE, epr, bpr, mpr::ble, nprB::bsr</i>	Sui-Lam Wong
<i>B. subtilis</i> WB800	<i>nprE, aprE, epr, bpr, mpr::ble, nprB::bsr, Δvpr, wprA::hyg.</i>	Sui-Lam Wong
pUC19	<i>Ori</i> (pMB1 mutant), <i>amp^r</i> , MCS, <i>lacZα</i> .	Stored in the lab
pMD-19T	<i>amp^r</i> , <i>lacZα</i> .	Takara Biotechnology
pET-28 a (+)	<i>Km^r</i> , <i>ori</i> pMB1, T7 promoter/terminator	Novagen
pP43NMK	<i>Km^r</i> , <i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle vector	Zhang XZ

2.1.2 主要试剂

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、*Pfu* DNA 聚合酶为 Fermentor 公司产品 (Vilnius, Lithuania); PCR 所用试剂购自 TaKaRa 公司 (Takara Biotechnology Co. Ltd., Japan); 细菌基因组抽提试剂盒 (Qiagen DNeasy Tissue Kit) 购自美国 Qiagen 公司 (Valencia, CA, USA); PCR 产物纯化试剂盒 (PCR Purification Kit), 胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 和质粒抽提试剂盒 (Plasmid Mini Kit) 均购自美国 Omega 生物工程公司 (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA); 卡那霉素 (Kanamycin, Km), 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp), 异丙基- β -D-巯基半乳-吡喃糖苷 (Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside, IPTG), 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS), 溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB), 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-gal) 均购自美国 Amresco 公司 (Cleveland, OH, USA); 西班牙琼脂糖 (Biowest, Spain) 和对硝基苯酚 (p-nitrophenol) 购自比利时 Acros Organics 化学公司 (Geel, Belgium); 酵母提取物 (Yeast extract, YE) 和胰蛋白胨 (Tryptone) 购自英国 Oxoid 有限公司 (Oxoid Ltd.,

Basingstoke, Hampshire, England); 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA), 对硝基苯纤维二糖苷 (p-nitrophenyl- β -D-cellobioside, PNPC) 购自美国 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。其它试剂如无特殊说明均为国产分析醇, 均购自上海国药化学试剂集团或凌峰化学试剂公司。

DNA 分子量标准品购自于日本 TAKARA 大连分公司或天跟生物科技有限公司。蛋白质分子量标准品购自于日本 TAKARA 大连分公司。研究中所用的寡核苷酸皆由 Primer 5.0 软件依据 NCBI 公布的核苷酸序列设计, 并由上海生物工程技术有限公司合成。

2.1.3 实验仪器

实验中用到的主要实验仪器如表 2.2。

表 2.2 主要实验仪器

Table 2.2 Experimental instruments

仪器名称	规格	生产厂家
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
PCR 仪	Mastercycler	Eppendorf 公司
小型高速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
微型摇床	5430	Eppendorf 公司
核酸蛋白分析仪	DU-800	Beckman 公司
水平电泳槽	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad 公司
电泳槽	Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad 公司
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
全自动紫外与可见分析装置	FR-200A	复日科技
高速冷冻离心机	Avanti J-26	Beckman 公司
漩涡混合器	QL-901	江苏海门市其林贝尔公司
手掌型离心机	LX-100	江苏海门市其林贝尔公司
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博讯实习有限公司医疗设备厂
超声波细胞破碎仪	JY92-II	宁波新芝生物科技有限公司
恒温水槽	SDC-6	宁波新芝生物科技有限公司
制冰机	XB-100	宁波格兰特制冷设备制造有限公司
恒温恒湿培养箱	GHP-9160	上海一恒科技有限公司
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达有限公司
超声波清洗机	KWT-100A	科伟达超声波设备有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科技有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司

冰箱	CD-239VC	海尔公司
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子
通用电源	Power Pac 3000	Bio-Rad 公司

2.1.4 培养基，主要溶液的配制

大肠杆菌和枯草杆菌培养所用的培养基为 Luria broth (LB) 培养基^[33]: 10 g/L NaCl, 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物。用 5 M NaOH 调节 pH 值为 7.0, 与 115 °C 高温灭菌 20 min。如需配制琼脂固体培养基, 则需要添加 1.0~1.5 % 琼脂粉。含有质粒的抗性菌株则在含有相应抗生素的培养基上生长, 氨苄青霉素的终了浓度是 100 ug/mL, 卡那霉素的终了浓度是 50 ug/mL。抗性平板则需要在灭菌的琼脂培养基冷却至 60 °C 左右, 添加相应的抗生素倒入 9 cm 的培养皿中, 冷凝后置于 4 °C 保存待用。

热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum* DSM 1237) 培养用的培养基^[34]: KH_2PO_4 , 1.5 g/L; K_2HPO_4 , 2.9 g/L; Urea, 2.1 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mg/L; L-Glutathione reduced, 0.5 g/L; Cellobiose, 5 g/L; Morpholinopropane sulfonic acid, 10.0 g/L; Yeast extract, 6.0 g/L; Sodium citrate.2H₂O, 3.0 g/L。

解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum* DSM 5812) 培养用的培养基参见 DSMZ 配方: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.3 g/L; KH_2PO_4 , 1.5 g/L; K_2HPO_4 , 2.9 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mg/L; Yeast extract, 2.0 g/L; Cellobiose, 5 g/L; Cysteine-HCl, 0.5 g/L。

大肠杆菌感受态细胞制备的培养基: 10 mM MgSO_4 , 2.0 g/L 的葡萄糖, 10.0 g/L NaCl, 5.0 g/L 酵母提取物, 10 g/L 胰蛋白胨。培养基以 5 M NaOH 调节培养基 pH 为 7.0, 装液量为 100 mL/1 L。115 °C 高温灭菌 20 min 待用。

枯草杆菌感受态制备用的培养基如下: SP 盐: 0.2% (W/V) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4% (W/V) K_2HPO_4 , 0.6% (W/V) KH_2PO_4 , 0.02% (W/V) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% (W/V) 柠檬酸钠; SPI 培养基: SP 盐溶液加入 1% 体积浓度为 50% 葡萄糖溶液, 1% 体积 100×CAYE 溶液; SPII 培养基: SPI 培养基加入 1% 体积 50mmol/L CaCl_2 溶液, 1% 体积 250mmol/L MgCl_2 溶液。

SP-A Salts Solution (500 ml Solution): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 14 g, KH_2PO_4 6 g, Trisodium Citrate Dihydrate 1 g, 121 °C 灭菌 20 min。

SP-B Salts Solution (500 ml Solution): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 121 °C 灭菌 20 min。
100×CAYE Solution (100 ml Solution): Casamino acid 2 g, Yeast Extract 10 g, 121 °C 灭菌 20 min。

SPI Medium (20 mL): 9.8mL SP-A Salts Solution, 9.8mL SP-B Salts Solution, 200 μL (1% V) Glucose (50% w/v, 115 °C 灭菌 20 min), 200 μL (1% V) 100×CAYE。

SPII Medium (6 mL): 5.88mL SPI Medium, 60 μL (1% V) 50 mM CaCl_2 , 60 μL (1% V) 250 mM MgCl_2 。

100×EGTA Solution: 10mM EGTA 溶液, 溶解时需加少量 NaOH 至 pH 8.0。

氨苄青霉素贮存液: 将 1.00 g 氨苄青霉素粉末溶于 50 mL 超纯水中, 缓慢摇匀直至药物粉末完全溶解, 最后定容到 100 mL, 然后用 0.22 μm 的无菌硝酸纤维素滤膜过滤除菌, 分装贮存于 -20 °C 避光保存待用。

卡那霉素贮存液: 浓度和具体操作步骤参考氨苄青霉素贮存溶液的制备。

琼脂糖电泳缓冲液: 5×TBE 贮存液: 54 g Tris 碱, 27.5 g 硼酸, 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 溶于 1 L 去离子水, 用时稀释 10 倍。

0.7%的琼脂糖凝胶: 称取 0.7 g 琼脂糖于 100 mL 0.5×TBE 中, 用微波炉加热置溶液澄清为止, 加入 20 μL EB, 混匀后即可使用。

蛋白电泳液:

2 M Tris-HCl 的 500 mL 贮存液: 121 g Tris base 然后加 350 mL 超纯水溶解, 用玻璃棒搅拌约 1 min, 缓慢加入浓盐酸 (11.8 M) 20 mL, 继续搅拌, 使 Tris 全部溶解, 待溶液澄清后, 补齐超纯水至 500 mL, 贮存在无色玻璃试剂瓶中, 4°C 冰箱保存。

SDS 溶液 (100 g/L): 10 g 高质量的 SDS 加入到 100 mL 超纯水中, 微波加热溶解, 不要爆沸, 间歇用玻璃棒搅拌以加速溶解, 待溶解完全后, 倒入无色玻璃试剂瓶中, 4°C 冰箱保存。

75% (v/v)甘油: 量取分析纯甘油 300 mL, 加超纯水 100 mL, 用一次性塑料手套封口, 颠倒量筒使甘油完全溶解, 然后倒入无色玻璃试剂瓶中, 4°C 冰箱保存。

10 g/L 溴酚蓝溶液: 取 500 mg 溴酚蓝加超纯水 50 mL, 搅拌溶解, 倒入棕色玻璃试剂瓶中, 4°C 冰箱保存。

4×分离胶缓冲液 500 mL: 于 500 mL 洁净的量筒中, 依次加入 375 mL 2 M Tris-HCl, 100 g/L SDS 溶液 20 mL, 最后加入适量超纯水至 500 mL。倒入无色玻璃试剂瓶中, 4°C 冰箱最少可保存 12 个月。

4×堆积胶缓冲液 100 mL: 50 mL 1M Tris-HCl, 4 mL 100 g/L SDS 溶液, 21 mL 的水。

100 g/L 过硫酸铵溶液 (ammonium persulfate, AP) 20 mL: 2 g 过硫酸铵加 20 mL 超纯水, 倒入无色塑料试剂瓶中, 4°C 冰箱最少可保存 10 个月。注意配胶时不要交叉污染 TEMED, 以 5 mL 分装到 4 个无色塑料试剂瓶中分别保存。

TEMED 成品液: 购买后分装成 2 或 5 mL 小管装使用。

5×样品缓冲液, 100 mL: 依次加入 50 mL 75% (v/v) 甘油, 20 mL 100 g/L SDS 溶液, 10 mL 10 g/L 溴酚蓝溶液, 5 mL 2 M Tris-HCl, 5 mL 巯基乙醇, 9 mL 超纯水。混合后的母液倒入无色玻璃试剂瓶中, 4°C 冰箱至少可保存 12 个月, 可分装成 10 mL 使用。

10×电泳缓冲液 1000 mL: 称取 10 g SDS, 30 g Tris base, 144 g 甘氨酸于 1000 mL 的烧杯中, 加水约 700 mL 溶解, 可微波炉加热以促进溶解, 不要使其沸腾, 加热至烧杯烫手即可, 间歇用玻璃棒搅拌。分装至无色玻璃试剂瓶中, 室温最少可保存 6 个月,

其 pH 值约为 pH 8.4±0.1。

考马斯亮蓝染色液 1000 mL: 先称取考马斯亮蓝 R250 1.0 g 于 1000 mL 试剂瓶内, 加入甲醇 450 mL 溶解, 再加冰醋酸 100 mL 和超纯水 450 mL 至大约 1000 mL。染色液可倒入专用的回收试剂瓶, 届时加入适量甲醇、考马斯亮蓝和大约 10 g/L 的三氯乙酸后可重复使用。

10% 分离胶的配制 (5 mL): 丙烯酰胺溶液, 1.67 mL; 分离胶缓冲液, 1.25 mL; 水, 2.08 mL; TEMED, 10 μ L; AP, 50 μ L。

5% 堆积胶的配制 (4 mL): 丙烯酰胺溶液, 0.67 mL; 堆积胶缓冲液, 1.25 mL; 水, 2.3 mL; TEMED, 5 μ L; AP, 30 μ L。

2.2 实验及分析方法

2.2.1 基因组的制备

热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum* DSM 1237) 在上述提到的培养基中 60 °C 厌氧环境中培养, 解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum* DSM 5812) 在 35 °C 厌氧环境中培养, 培养方式如图 2.1 所示。培养 24~36 h 后, 用 Qiagen 基因组抽提试剂盒提取基因组。



图 2.1 自制厌氧瓶

Fig 2.1 Self-made anaerobic jar

2.2.2 PCR 获得目的基因

分别以梭菌的基因组为模板, 利用设计好的引物进行 PCR。本实验中所有使用的引物见表 2.3。其中购买的引物先于 4 °C, 10000×g 离心 10 min, 使引物沉降到离心管的底部。然后用灭过菌的超纯水悬浮引物使之浓度达到 25 μ M 贮存液, 置于 -20 °C 冰箱

表 2.3 本文中所用到的引物

Table 2.3 The primers used in this study

Primer ^a	Target gene ^b	Sequence ^c	Host ^d
1-cs	<i>cbhA-S</i>	GCTAGCATGTATATACTTCCGCAGCCTGATGTACG (NheI)	<i>E. coli</i>
2-cs	<i>cbhA-A</i>	CTCGAGCTCGTCAAGATAAGCTGTAACCCATG (XhoI)	<i>E. coli</i>
3-cs	<i>cbhAC-S</i>	GGAATTCCATATGATCTATACTCAGATGAAATATGATGC (NdeI)	<i>E. coli</i>

4-cs	<i>cbhA</i> -A	CCCAAGCTTCTCGTCAAGATAAGCTGTAACC (HindIII)	<i>E. coli</i>
5-cs	<i>celK</i> -S	GGGGTACCATGCATTGGCATTCTTCTATC (KpnI)	<i>E. coli</i>
6-cs	<i>celK</i> -A	GCTCTAGACTCGAGTTATTTATGTGGCAATACATC(PstI)	<i>E. coli</i>
7-cs	<i>celKC</i> -S	GCTAGCCCTGTTGAATATGTACTTCCGC (NheI)	<i>E. coli</i>
8-cs	<i>celKC</i> -A	CTCGAGAGCTGTAACCCATGCAAACG (XhoI)	<i>E. coli</i>
9-cs	<i>celY</i> -S	GCTAGCATGTCCGACAGGTTTATAGCTCTTTTTG (NheI)	<i>E. coli</i>
10-cs	<i>celY</i> -A	CTCGAGAAAAGAAAATGTGATACATGGCGTTG (XhoI)	<i>E. coli</i>
11-cs	<i>celS</i> -S	GGGGTACCATGGTAAAAAGCAGAAAGATTTC (KpnI)	<i>E. coli</i>
12-cs	<i>celS</i> -A	AACTGCAGTTAGTTCTTGTACGGCAATGTATC (PstI)	<i>E. coli</i>
13-cs	<i>celO</i> -S	CGGGATCCATGCCAAACAACGACTGGCT (BamHI)	<i>E. coli</i>
14-cs	<i>celO</i> -A	CGGAATTCTCGAGTCCCTCCAGCGGTATTACATG (EcoRI/XhoI)	<i>E. coli</i>
15-cc	<i>cel9p</i> -S	CGGGATCCAATATGCAAAAATTATTACAGTACTACAAT (BamHI)	<i>E. coli</i>
16-cc	<i>cel9p</i> -A	CCGCTCGAGTGCCTGGCTCCAACAAAT (XhoI)	<i>E. coli</i>
17-cc	<i>cel9Q</i> -S	CGGGATCCAATTATGGCGAAGCCATGC (BamHI)	<i>E. coli</i>
18-cc	<i>cel9Q</i> -A	CCGCTCGAGAGCCAGACAGCCTACAAAACC (XhoI)	<i>E. coli</i>
19-cc	<i>cel9H</i> -S	GGAATTCCATATGTCTGCAACAGCTGCTTTTAAC (EcoRI)	<i>E. coli</i>
20-cc	<i>cel9H</i> -A	CGCGGATCCTGACAAATCAAGTGTATAGTAATAGAC (BamHI)	<i>E. coli</i>
21-cc	<i>cel9M</i> -S	CGGGATCCGATTATTCAACTGCTTTAAAGGAC (BamHI)	<i>E. coli</i>
22-cc	<i>cel9M</i> -A	CCGCTCGAGTGCAAGTACACCACAAGAC (XhoI)	<i>E. coli</i>
23-cc	<i>cel_0755</i> -S	CGGGATCCATTTACGCGAATCCCTTTAAAACA (BamHI)	<i>E. coli</i>
24-cc	<i>cel_0755</i> -A	CCGCTCGAGAGCCAAAGCATAAATCAATGCAC (XhoI)	<i>E. coli</i>
25-cc	<i>cel_2226</i> -S	GGAATTCCATATGGATAATGTATATTCAAAGCTTGGTGAC (NdeI)	<i>E. coli</i>
26-cc	<i>cel_2226</i> -A	CGCGGATCCTTATAATAATCTATTTGAGTTTAAATAACC (BamHI)	<i>E. coli</i>
27-cc	<i>ccelE</i> -S	GCTAGCCTTTTTACTCAAATGAAATACGATTCAAT (NheI)	<i>E. coli</i>
28-cc	<i>ccelE</i> -A	CTCGAGAGCTGATATCCATACAAGAGGAGC (XhoI)	<i>E. coli</i>
29-xc	<i>xcc8004</i> -S	CGGGATCCATGTCATCTTCGACAAACC (BamHI)	<i>E. coli</i>
30-xc	<i>xcc8004</i> -A	CCCAAGCTTTCACCGATGCGGTGTC (SalI)	<i>E. coli</i>
31-xc	<i>xcc1005</i> -S	CGGGATCCGTGCCCTCAAGCGAAAAT (BamHI)	<i>E. coli</i>
32-xc	<i>xcc1005</i> -A	CCGCTCGAGCTACTTGTTCGGCCGGG (XhoI)	<i>E. coli</i>
33-cs	<i>is</i> -S	AACTGCAGCTCTAGACCGACAGGTTTATAGCTCTTTTT(PstI/XbaI)	<i>B. subtilis</i>
34-cs	<i>is</i> -A	CCCAAGCTTCTCGAGTTATTCCGTTCTTTATTTCCGG(HindIII/XhoI)	<i>B. subtilis</i>
35-cs	<i>cbhA</i> -S	GCTCTAGAAGCCTGTTGAATATATACTTCCGC (XbaI)	<i>B. subtilis</i>
36-cs	<i>cbhA</i> -A	CCCAAGCTTTTACTCGTCAAGATAAGCTGTAACC (HindIII)	<i>B. subtilis</i>
37-cs	<i>celK</i> -S	GCTCTAGAAGCCTGTTGAATATGTACTTCCGCAG (XbaI)	<i>B. subtilis</i>
38-cs	<i>celK</i> -A	CCCTCGAGTTAAGCTGTAACCCATGCAAACG (XhoI)	<i>B. subtilis</i>
39-cs	<i>cel48Y</i> -S	AACTGCAGTCTATTCCGACAGGTTTATAGC (PstI)	<i>B. subtilis</i>
40-cs	<i>cel48Y</i> -A	CCCAAGCTTTTAAAAGAAAATGTGATACATGG (HindIII)	<i>B. subtilis</i>
41-cs	<i>cel48S</i> -S	AACTGCAGATGGGACATCTTATAAGGATCTTT (PstI)	<i>B. subtilis</i>
42-cs	<i>cel48S</i> -A	CCAAGCTTTTAGAAGTATGTAGCCAATACACCC (HindIII)	<i>B. subtilis</i>
43-cs	<i>celO</i> -S	AACTGCAGAACCGACACCTCCGCC (PstI)	<i>B. subtilis</i>
44-cs	<i>celO</i> -A	GATACCCGGGTTATCCTCCAGCGGTATTACAT (XmaI)	<i>B. subtilis</i>
45-cs	<i>celA</i> -S	GCTCTAGATGCAGGTGTGCCTTTTAACAC (XbaI)	<i>B. subtilis</i>
46-cs	<i>celA</i> -A	CCCAAGCTTCTAATAAGGTAGGTGGGGTATG (HindIII)	<i>B. subtilis</i>
47-ec	<i>celV</i> -S	AACTGCAGCCACGCCAGTAGAAACGC (PstI)	<i>B. subtilis</i>
48-ec	<i>celV</i> -A	CCCAAGCTTACGGCTCCACACCCCAT (HindIII)	<i>B. subtilis</i>

49-tf	<i>celE-S</i>	AACTGCAGCCGGTCTCACCGCCACAG (PstI)	<i>B. subtilis</i>
50-tf	<i>celE-V</i>	CCAAGCTTTCAGGACTGGAGCTTGCTCCG (HindIII)	<i>B. subtilis</i>

a: the gene was cloned from cs, cc, xc, ec, tf. cs, *clostridium thermocellum*; cc, *clostridium cellulolyticum*; xc, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (strain 8004); ec, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*; tf, *Thermomonospora fusca*. b: S, sense primer; A, anti-sense primer. c: introduced restriction enzyme site elucidated in the bracket. d: the host for the gene expression.

中保存待用。

PCR 体系在冰浴上配置, 具体组成如表 2.4 所示, 最后加入 DNA 聚合酶。盖上 PCR 管管盖后, 轻弹管底部 3~5 下使反应体系混合均匀。将含有 PCR 溶液的 PCR 管于掌上离心机快速离心 5 s, 然后迅速置于预热热盖的 PCR 仪上进行 PCR 反应。

PCR 反应参数为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 45 s, 退火温度一般由引物订单上的温度 $T_m - 5$ °C 确定, 时间为 1 min, 72 °C 延伸, 延伸时间根据目的片段的长度和选用的 DNA 聚合酶确定, 一般是 Taq 1000 bp/min; pfu 500 bp/min。30 个循环后, 72 °C 再延伸 10 min, 4 °C 保存。反应结束后取 2 μ L PCR 产物进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2.4 PCR 反应体系

Table 2.4 Composition of PCR

试剂名称	用量
ddH ₂ O	32.5 μ L
10 \times PCR buffer	5.0 μ L
25 mM MgCl ₂	2.0 μ L
Forward primer (25 μ M)	1.0 μ L
Reverse primer (25 μ M)	1.0 μ L
dNTP mixture (2.5 mM/each)	6.0 μ L
模板 DNA	2.0 μ L
Taq or LATaq (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L
Total volume	50.0 μ L

2.2.3 目的基因克隆

将 PCR 产物用相应的限制性内切酶酶切, 根据 Fermentas 所提供的分子克隆用酶说明书, 选择合适的酶缓冲液, 一般酶切 8 h, 然后与经过同样的限制性内切酶酶切的克隆载体 pUC19 连接。也可以通过 AT 连接, 将 PCR 产物通过胶回收, 直接与 pMD-19T 载体做连接。连接体系如表 2.5。

表 2.5 目的基因与 pMD19-T Vector 克隆载体的连接体系

Table 2.5 The ligation system

试剂名称	用量
胶回收 PCR 产物	4 μ L

pMD19-T Vector	1 μL
Solution I	5 μL
Total volume	10 μL

连接产物直接转化大肠杆菌 DH5 α 感受态，DH5 α 感受态的制备方法和转化方法^[35]如下所述。

大肠杆菌 DH5 α 感受态的制备:

(1) 取大肠杆菌 DH5 α 冻存管，取少量菌液划线于 LB 固体平板上，在 37 °C 恒温培养箱中培养 12-16 h 直至长出肉眼明显可见的菌落。

(2) 用无菌的牙签将单个菌落接种于 20 mL 液体 LB 培养基中，于 37 °C 恒温摇床 220 rpm 过夜培养。

(3) 取 1 mL 过夜培养物接种于 100 mL 大肠杆菌感受态液体培养基中，置于 37 °C 恒温摇床 220 rpm 培养。

(4) 当 OD₆₀₀ 达到 0.35~0.4 时，大肠杆菌 DH5 α 一般要长 2~2.5 h。将三角瓶取出立即放于冰水混合物中冷却 10 min。

(5) 然后将菌体离心，2000 g \times 5 min，所有的操作都在 4 °C 下进行。离心后倾去上清液，并加入 25 mL 预冷的 CaCl₂ 溶液，轻摇离心杯将菌体悬浮起来。

(6) 2000 g \times 5 min 离心，弃去上清液，然后加入 1 mL 预冷的 CaCl₂ 溶液，悬浮菌体。

(7) 在离心管中缓缓加入 20 μL DMSO，混合均匀，在冰上轻摇 15 min；然后再加入 20 μL DMSO，在冰上轻摇 15 min。

(8) 按照 100 μL 的体积分装到 1.5 mL 的无菌离心管中，并迅速将离心管放入液氮中速冻，然后贮存在 -80 °C 冰箱中备用。

大肠杆菌的转化:

(1) 从 -80 °C 超低温冰箱中取出一管大肠杆菌 DH5 α 感受态，置于冰上解冻。

(2) 将上述通过粘性末端连接或 AT 连接的连接产物全部加入到上述离心管中，并轻轻混匀。

(3) 将离心管放置冰上 30 min。

(4) 然后将离心管在 42 °C 环境中热击 90 s。

(5) 然后迅速取出在冰上静置 1~2 min 后，加入 500 μL 或 900 μL LB 液体培养基，置于 37 °C 恒温摇床 100 rpm 培养 90 min，使细菌复苏并表达质粒编码的抗性基因。

(6) 取 150~200 μL 菌液涂布到含有相应抗生素的抗性平板上，置于 37 °C 培养箱中过夜培养。

以 pUC19 或 pMD-19T 作为亚克隆的质粒，可以通过“蓝白斑筛选”初步鉴定。将连接菌液涂布在含有 Xgal, IPTG, Amp 的固体 LB 平板 (LIXA) 上，如果目的基因插入到质粒的多克隆位点上，则会破坏完整的 β -半乳糖苷酶的形成，因此会在 LIXA 上形成白斑，否则形成蓝斑。

挑取白斑接种到 LB 液体培养基上，培养 12 h 后，可以通过菌液 PCR 或质粒 PCR

进一步进行验证, 阳性克隆一般能够通过 PCR 获得目的条带, 阴性对照没有。PCR 体系用菌液或质粒作为模板, 其它的组分与获得目的基因的 PCR 条件相同。最后可以通过质粒酶切验证, 如果质粒通过单酶切或双酶切大小合适, 能够切除目的条带, 一般就认为目的基因已经成功的连接到克隆载体上。酶切体系为: 质粒 5 μL , 相应的内切酶 1 μL , buffer 1 \times 或 2 \times , H_2O 补齐 10 μL 。

质粒测序可以进一步了解连接的情况及目的基因突变的情况, 为下一步正确构建表达载体奠定基础。

2.2.4 大肠杆菌表达载体的构建和重组菌诱导表达

将上述挑出的阳性克隆在 LB 液体培养基上培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后, 10000 rpm \times 1 min, 离心收集菌体, 利用 Omega 质粒抽提试剂盒抽提质粒, 通过对重组质粒进行相应的限制性内切酶酶切, 酶切体系一般取 20 μL 。然后将酶切的质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 从凝胶中回收大小合适的目的片段, 回收的目的片段两端都含有粘性末端。

在大肠杆菌中选用的表达载体为 pET-28a (+), 用切割上述质粒得到目的基因的相同限制性内切酶切割 pET-28a (+), 37 $^{\circ}\text{C}$ 切割 3 h, 通过胶回收回收酶切的 pET-28a (+), 与酶切的目的基因片段做连接。连接体系如表 2.6, 目的片段与载体片段的摩尔比为 3:1~10:1 之间。

表 2.6 连接体系

Table 2.6 The ligation system

表达载体/ μL	目的基因/ μL	T4 DNA ligase/ μL	连接 buffer/ μL	总体系/ μL
V	8-V	1	1	10

上述连接体系于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 最后涂布在含有 Kan 的 LB 固体平板上。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养, 挑取转化子接种到含有 Kan 的 LB 液体培养基中, 借助菌液 PCR, 质粒酶切验证来挑选重组子。

确认质粒连接正确后, 取 10 μL 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, BL21 感受态细胞的制备与 DH5 α 感受态制备方法相同。

从含有 Kan 的 LB 固体平板上挑取阳性克隆菌落 BL21, 接种到含有 Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 3 mL 的 LB 液体培养基中, 培养过夜按照 1% 的接种量转接到 20 mL 的 LB 液体培养基中 (Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 当 OD_{600} 达到 0.4 后, 加入诱导剂 IPTG (50 mg/mL) 50 μL 至 IPTG 的终了浓度为 0.5 mM, 放置于 16 $^{\circ}\text{C}$, 150 rpm 的摇床中诱导表达 12 h。

加入 IPTG 的原理: pET 载体含有 T7 lac 启动子, 该启动子与 T7 RNA 聚合酶专一性的结合从而启动下游外源基因的转录, 但 T7 RNA 聚合酶的编码基因位于 BL21 (DE3) 的基因组上, 且处于 lac 操纵子的后面, lac 阻遏物编码基因也位于 BL21 (DE3) 的基因组上, 因此若不加入诱导物, T7 RNA 聚合酶编码基因的转录便会受到抑制, 当加入 IPTG 后, IPTG 和 lac 阻遏物结合, 使阻遏物的构想发生变化, 便不能结合到 lac 操纵子上, T7 RNA 聚合酶编码基因便得到转录和翻译, 然后 T7 RNA 聚合酶和 T7 启动子结合,

目的基因便得到了表达。

2.2.5 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 的构建

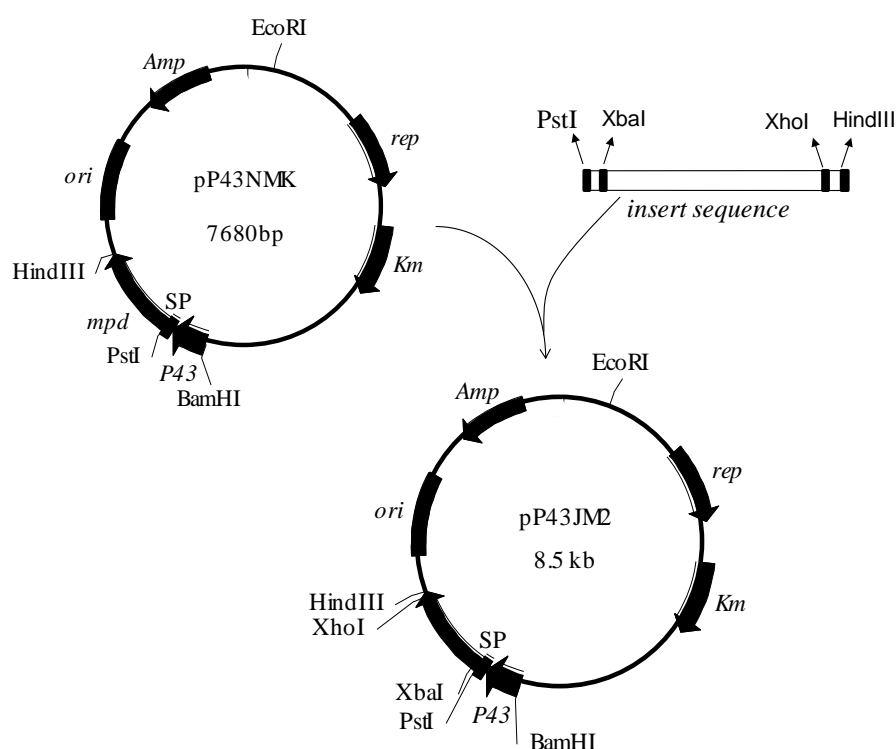


图 2.2 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 构建过程

Fig 2.2 The construction of *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector pP43JM2

大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 (*E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector) pP43NMK 由美国弗吉尼亚理工大学张以恒教授惠赠。为了便于连接，我们又在 pP43NMK 的基础上进行了改造，利用来自热纤梭菌的一段序列（上下游引物分别引进了 PstI, XbaI, XhoI, HindIII）取了甲基对硫磷酶基因 (*mpd*)，构建成了含有多克隆位点的大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2，构建过程如图 2.2 所示。

2.2.6 枯草杆菌表达载体的构建和重组菌的培养

枯草杆菌感受态细胞的制备及化学转化方法^[36]如下所述：于第一天上午取一管新鲜的枯草芽孢杆菌甘油菌划 LB 平板，37 °C 培养箱培养 12 h；挑单菌落至 3 mL LB 培养基中，37 °C，250 rpm 培养过夜；第二天上午取 160 μl 培养液转接至 8 ml SPI 培养基中，37 °C，250 rpm 培养至对数生长末期（约 4~5 h）；取 0.2 ml 培养液至 2 ml SPII 培养基中，37 °C，100 rpm 培养 90 min；加入 20 ul 10 mM EGTA，再于 37 °C，100 rpm 培养 10 分钟；分装成 500 μl 每管，各加入 10~30 ul 质粒，再于 37 °C，250 rpm 培养 90 min，取菌液涂布筛选平板。

枯草芽孢杆菌也可以采用电转方案^[37]进行转化：接种 *B. subtilis* 于 3 ml LB 培养基中培养过夜，取 2.6 ml 种子液接入 40 ml LB 和 0.5 M 山梨醇中，37°C，200 rpm 培养至 OD₆₀₀ 达到 0.85~0.95 时，将菌液冰浴 10 min，然后 5000 rpm，5 min，4°C 离心收集菌体，用 50 ml 预冷的电转培养基，重新悬浮菌体，5000 rpm，5min，4°C 离心弃上清，

如此漂洗 4 次，将洗涤后的菌体吹悬于 1 ml 电转培养基中；将 60 μ l 感受态细胞中加入 50 ng DNA，冰上孵育 2 min，加入预冷的电转杯中，电击一次。电击完毕取出杯子并立即加入 1ml RM，37 $^{\circ}$ C，200 rpm，复苏 3 h 后，涂平板，37 $^{\circ}$ C，过夜培养。

电转仪设置：2.0 kv，1 mm，电击 1 次，时间常数=4.5~5.0 ms。

枯草杆菌表达载体的构建过程是在大肠杆菌中完成的，因此整个构建的流程包括 PCR 获得目的基因，酶切，连接 pMD19-T 或 pUC19，转化大肠杆菌 DH5 α ，重组质粒酶切获得目的片段等操作都与大肠杆菌构建表达载体的过程前半部分相似。当获得含有粘性末端的片段之后，然后与经过相同限制性内切酶酶切的大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 连接，连接液转化 DH5 α ，在含有 Amp 的平板上筛选阳性克隆。然后将单菌落接种到含有 Amp (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基上，提取质粒，通过质粒酶切进一步验证重组质粒的正确性。

重组质粒验证无误后，采用上面提到的化学转化或电转方法将重组质粒转化进枯草杆菌 WB600 和 WB800，枯草杆菌 WB600 和 WB800 分别是缺失了 6 个或 8 个外源蛋白酶缺陷型的菌株，分别由上海植生所杨晟教授和美国弗吉尼亚大学张以恒教授惠赠。然后在含有 Kan (50 μ g/mL) 的 LB 固体平板上筛选转化子，由于大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 是双抗质粒，在大肠杆菌中表现出氨苄抗性，在枯草杆菌中表现出卡那抗性。所以只有含有质粒的枯草杆菌才能在含有 Kan 的培养基上生长。为了进一步验证重组质粒在枯草杆菌中的正确与否，抽取枯草杆菌的质粒进行酶切，切出大小合适的目的基因片段便证明了重组枯草杆菌构建成功。枯草杆菌中质粒的抽提方法与大肠杆菌质粒的抽提方法基本相同，只是在前期菌体用 20 μ g/mL 的溶菌酶在 30 $^{\circ}$ C 处理 10 min，以破除厚的肽聚糖层。

重组枯草杆菌在含有 Kan (50 μ g/mL) 的液体培养基上培养，用分光光度计 DU800 测定菌体浓度 OD₆₀₀ 以表征菌体生长情况。由于 pP43JM2 上的 P43 启动子为组成型启动子，所以无需加入诱导剂，外源蛋白持续表达。

2.2.7 SDS-PAGE 电泳

对于大肠杆菌，重组菌诱导培养 12 h 后，各取 5 mL 菌液于 2 个离心管中，10000 rpm \times 1 min 离心收集菌体，一个离心管中直接加入 100 μ L 上样缓冲液，105 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min，10000 rpm \times 5 min 离心，上清液作为全细胞上样样品。另一个离心管收集的菌体悬浮在 1 mL pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液中，然后超声裂解，超声波破碎大肠杆菌的条件：以 Φ 3 超声波破碎仪探头进行细胞破碎，100 W，每工作 3 s，间歇 10 s，工作次数 20 次。细胞破碎液于 10000 rpm \times 10 min 离心，上清液倒入一个新的离心管中，然后加入无水乙醇至浓度 50 % (V/V)，振荡 2 h 后，12000 rpm \times 10 min 离心，弃上清液，沉淀蛋白溶解于 100 μ L 上样缓冲液中，以作为诱导细胞的可溶性组分；细胞破碎液离心后的沉淀直接悬浮在 100 μ L 上样缓冲液，作为诱导细胞内的不可溶组分，105 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min，10000 rpm \times 5 min 离心，然后都取 10 μ L 上样电泳。

对于枯草杆菌，一般培养 24 h 后，取 20 mL 发酵液离心，将上清液转移到另一支离

心管中, 然后加入无水乙醇至终了浓度 50 % (V/V), 常温振荡 2 h 后, 12000 rpm \times 10 min 离心, 弃上清液, 沉淀蛋白溶解于 100 μ L 上样缓冲液中, 以此作为枯草杆菌分泌的胞外蛋白组分, 105 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 10000 rpm \times 5 min 离心, 然后都取 10 μ L 上样电泳。

SDS-PAGE 所用的蛋白 Marker 有两种:

Low molecular weight (KDa): 97.2, 66.4, 44.3, 29.0, 20.1, 14.3。

Unstained Molecular Weight Marker (KDa): 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4。

2.2.8 酶活测定

外切酶酶活测定所用的底物选取了 PNPC 和 PASC, 其中 PASC 的制备方法为^[38]:

取 0.2 g 微晶纤维素 Avicel-PH101 置于 50 mL 的离心管中, 然后加入 0.6 克蒸馏水, 使微晶纤维素与水混合成为糊状物。然后将遇冷的浓磷酸缓缓的加入到上述糊状物上, 边加边搅拌, 当加入 8 mL 浓磷酸时, 充分搅拌, 使之成为混合均匀的均相物, 避免结块的纤维素的形成, 然后再加入 2 mL 浓磷酸, 混合物在几分钟内由浑浊变透明。将离心管放到冰上 1 h, 其间要多次搅拌混匀。接下来将大约 40 mL 的冰冷水加入到离心管里, 每加 10 mL 要剧烈搅拌一次, 其间会发现白色絮状沉淀的形成。5000 g, 4 $^{\circ}$ C, 离心 20 min。倒掉上清, 把沉淀的微晶纤维素重新悬浮在 40 mL 冰冷的水中, 5000 g, 4 $^{\circ}$ C, 离心 20 min, 如此反复洗涤 4 次。然后加入约 0.5 mL 的 2 M Na₂CO₃ 以中和掉残存的磷酸。再次加入 45 mL 冰冷的水悬浮纤维素, 5000 g, 4 $^{\circ}$ C, 离心 20 min, 弃上清, 然后加入 40 mL 常温蒸馏水, 洗涤纤维素, 离心, 重复两次直到 pH 为 5~7。最后磷酸处理的微晶纤维素溶解在 20 mL 的蒸馏水中, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

粗酶液有两种, 一种是重组大肠杆菌裂解制备的酶液, 另一种是枯草杆菌发酵液浓缩制备的酶液。

大肠杆菌酶液的制备:

当加入诱导剂 IPTG 后, 16 $^{\circ}$ C, 150 rpm 低温诱导 12 h, 然后取 5 mL 菌液, 10000 rpm \times 1 min 离心收集菌体, 然后悬浮在 1 mL pH 6.0, 0.5 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, 进行超声裂解, 超声破碎条件: 电压, 100 V; 每超声 3 s, 间隔 10 s, 超声 20 次。超声裂解液 10000 rpm \times 5 min 离心, 上清液便作为大肠杆菌粗酶液。

枯草杆菌酶液的制备:

重组枯草杆菌一般培养 24 h (除非文中特殊说明), 然后取 20 mL 菌液 10000 rpm \times 1 min 离心, 上清液用 40% 饱和度的(NH₄)₂SO₄ 沉淀, (NH₄)₂SO₄ 沉淀应在冰水混合物上进行, 避免过多酶活的损失。然后低温离心, 10000 rpm \times 10 min, 沉淀的蛋白悬浮在 1 mL pH 6.0, 0.5 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, 以此作为枯草杆菌粗酶液。

当用 PNPC 测定外切酶酶活时, 取 50 μ L 1 mg/mL 的 PNPC, 然后加入 100 μ L 粗酶液, 50 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 反应完毕后立即加入 100 μ L 1% (W/V) Na₂CO₃ 溶液终止反应。尽快测定 420 nm 处的吸光度的值。其中底物对照和酶液对照分别为 50 μ L PNPC+ 100 μ L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 50 μ L 缓冲液+100 μ L 粗酶液。

PNP 标准曲线的制作方法如表 2.7, 标准曲线如图 2.3。

表 2.7 PNP 标准曲线制作方法

Table 2.7 Fabrication of standard curve for PNP

	1	2	3	4	5	6	7	8
PNP(30ng/ μ L) (μ L)	0	10	20	30	40	50	60	70
Citrate buffer (μ L)	150	140	130	120	110	100	90	80
A/420	0	0.1309	0.2694	0.3989	0.5257	0.673	0.8	0.941

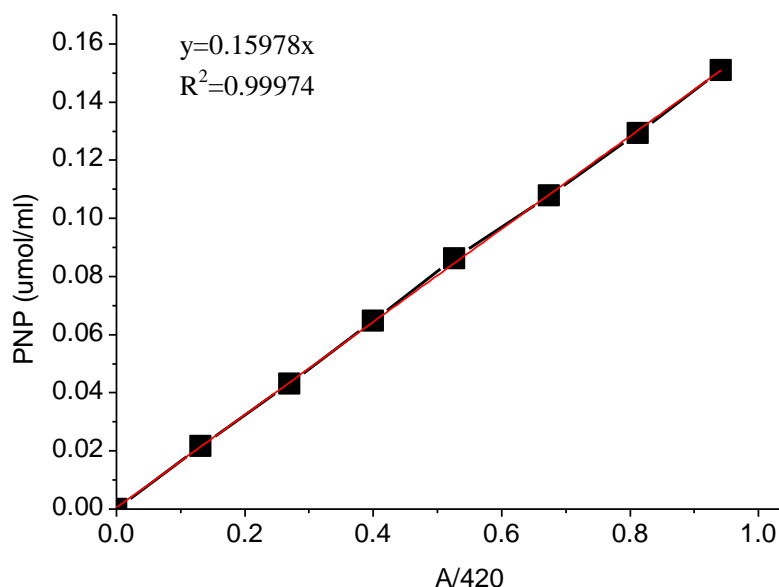


图 2.3 PNP 标准曲线

Fig 2.3 The standard curve for PNP

当用 PASC 测定外切酶酶活时，取 1 mL 1% (W/V) PASC，然后加入 1 mL 大肠杆菌或枯草杆菌粗酶液，60 °C 孵育 1 h，5000 rpm \times 1 min 离心，上清转移到试管中用 DNS 法测定生成的还原糖的量，对照是 1 mL PASC +1 mL 柠檬酸钠缓冲液，1 mL 蒸馏水+1 mL 粗酶液。

另外含有原始质粒的菌的酶活情况同样进行了测定，如含有 pET-28a (+)的大肠杆菌 BL21，含有空质粒 pP43JM2 的枯草杆菌 WB600 和 WB800。

PASC 标准曲线的制作

量取 1 mL 不同浓度的葡萄糖，然后加入 1 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，60 °C 孵育 1 h，再加入 3 mL DNS，沸水浴 5 min。取 200 μ L 加入到 2.5 mL 的水中，于 540 nm 处测定吸光度值。

表 2.8 PASC 标准曲线的制作方法

Table 2.8 Fabrication of standard curve for PASC

	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (mg/mL)	0	0.625	1.00	1.25	1.67	2.50	3.33

A/540	0	0.1657	0.2749	0.336	0.4235	0.6115	0.8135
-------	---	--------	--------	-------	--------	--------	--------

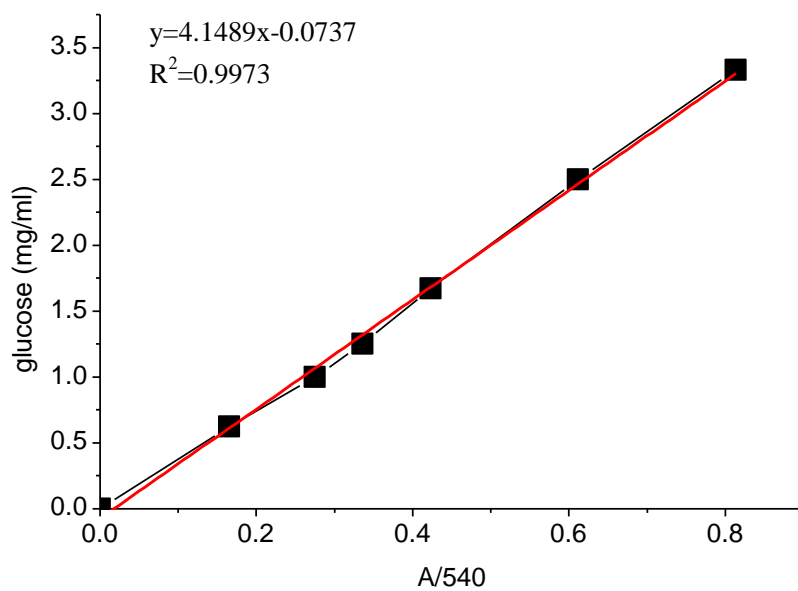


图 2.4 PASC 标准曲线

Fig 2.4 The standard curve for PASC

第 3 章 实验结论

3.1 细菌纤维素外切酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达

纤维素外切酶是唯一一种对纤维素结晶区发挥作用的水解酶，在结晶纤维素的降解过程中发挥着重要的作用，它从纤维素的还原端或非还原端水解纤维素，生成纤维二糖或纤维寡糖。

3.1.1 热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的纤维素外切酶基因的克隆与表达

热纤梭菌是革兰氏阴性菌，近些年来受到越来越多的重视。它能够分泌高效的纤维小体和游离的纤维素酶，纤维小体是多种纤维素酶和脚手架蛋白的复合体，它的一端锚定在菌体的细胞膜上，另一端靠脚手架蛋白上的粘附区域或纤维素酶自带的锚定区域吸附在纤维素的表面，通过吸附，协同达到高效降解纤维素的目的；热纤梭菌分泌的游离的纤维素酶指的是非纤维小体组分，它以单独的形式发挥作用^[39]。所以我们选取了热纤梭菌中所有的纤维素外切酶基因 (如表 3.1)，包括组成纤维小体的形式和游离的形式，在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中进行了表达^[40-44]。

表 3.1 来源于热纤梭菌的纤维素外切酶基因

Table 3.1 the cellobiohydrolases cloned from *Clostridium thermocellum*

Strain	Gene name	GHs ^A	Length (kbp)	MW ^B (KDa)
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>cbhA</i>	9	1.8	68.3
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>cbhAC</i>	9	1.5	44
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>celK</i>	9	1.8	68.8
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>celKC</i>	9	1.5	44
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>celS</i>	48	1.9	82
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>cel48Y</i>	48	1.9	71.7
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>celO</i>	5	1.2	44.4

A: GHs, glycoside hydrolase families; B: MW, molecular weight.

用 Qiagen 基因组抽提试剂盒 (Valencia, CA, USA) 提取了 *C. thermocellum* 的基因组，浓度为 150 ng/μL。以此为模板进行了后续基因的扩增。

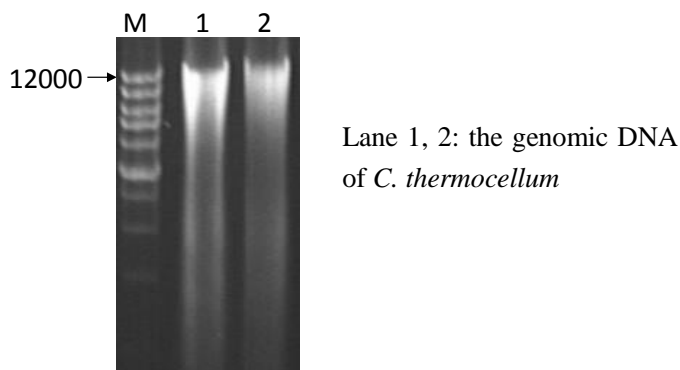


图 3.1 提取的热纤梭菌的基因组

Fig. 3.1 The genomic DNA extracted from *C. thermocellum*.

cbhA 在 *E. coli* BL21 (DE3) 的表达

如图 3.2 (a) 所示, 首先以热纤梭菌的基因组为模板扩增目的基因 *cbhA*, 然后将 *cbhA* 通过限制性内切酶酶切连接到克隆载体 pUC19 上, 转化 *E. coli* DH5 α , 涂布 LIVA (LB+0.5 mM IPTG+40 μ g/mL Xgal+100 μ g/mL Amp) 平板, 通过蓝白斑筛选选取白斑, 在含有 Amp (100 μ g/mL) 的 LB 培养基中培养, 提取质粒, 双酶切重组质粒 pUC19-*cbhA*, 酶切结果如图 3.2 (b)。切胶回收 1.8 kb 大小左右的目的基因片段, 然后将此片段与经过相同限制性内切酶酶切的表达载体 pET28a 做连接, 将连接产物全部转化 *E. coli* DH5 α , 涂布在 LK (LB+50 μ g/mL Kan) 平板上, 挑取长出的菌落在含有 Kan (50 μ g/mL) 的 LB 培养基中培养, 提取质粒, 质粒 PCR 结果如图 3.2 (c) 所示, 1~3 泳道能 PCR 出目的片段, 而对照没有, 所以 1~3# 菌便是重组菌。进一步单酶切验证重组质粒大小为 pET28a (5369 bp) 和 *cbhA* (1821 bp) 的总长 7.2 kb 左右 (图 3.2 (d))。

将连接好的重组质粒 pET28a-*cbhA* 转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3), 重组菌 BL21 (pET28a-*cbhA*) 在 LB 培养基中培养, 其中含有 50 μ g/mL Kan, 待菌体浓度 OD600 达到 0.4 后, 加入 0.5 mM IPTG, 在低温 16 $^{\circ}$ C 诱导表达 12 h 后, 取样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 含有空质粒 pET28a 的 *E. coli* BL21 (DE3) 作为对照菌株同样进行了上述处理。如图 3.3 所示, 在相同的细胞处理量的条件下, 1# 泳道与对照 4# 泳道相比, 在约 69 KDa 处有一条明显的蛋白粗条带, 且该条带的蛋白分子量与 *cbhA* 基因编码的 CbhA 分子量 68.3 KDa 大小相符, 因此可以初步判断目的基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株内得到了成功的表达。为了进一步确认表达产物的可溶性, 我们同时将收获的细胞在 Tris-HCl 缓冲液中进行了超声破碎裂解, 并对裂解的上清液和不可溶的蛋白组分同时进行了 SDS-PAGE 电泳。2#, 3# 泳道表明过量表达的蛋白一部分以可溶的形式存在, 一部分存在在不可溶的组分中, 这可能是由于外源多肽在强启动子 T7 启动子的作用下, 一部分多肽有效折叠速率慢于翻译速率, 便相互聚集沉积下来, 或者是在超声破碎的过程中蛋白失活变性形成不可溶的沉淀, 5#, 6# 泳道分别是空载的上清, 沉淀对照。

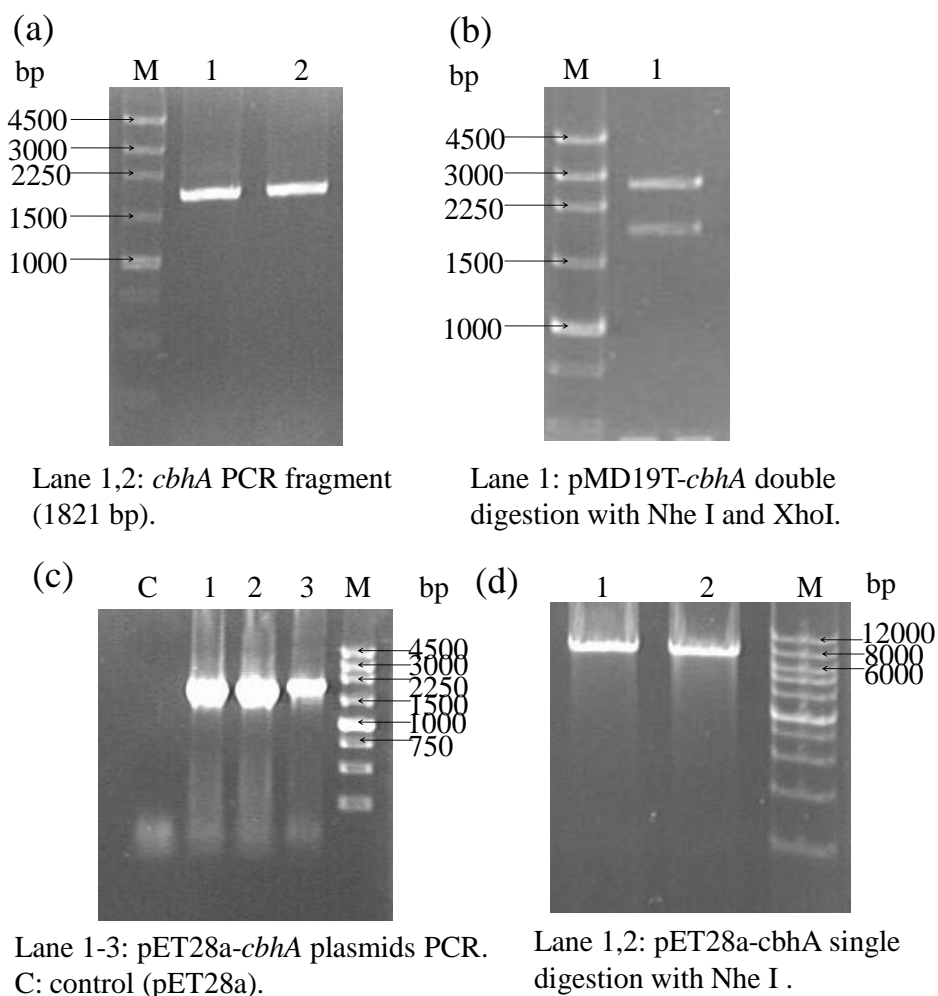


图 3.2 pET28a-*cbhA* 构建过程

Fig. 3.2 The construction of pET28a-*cbhA*

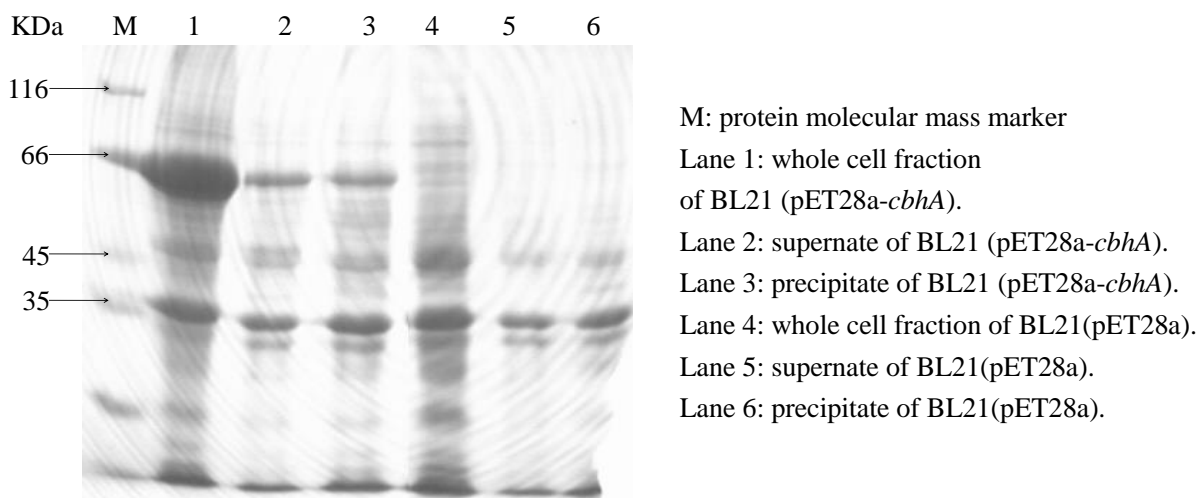


图 3.3 重组菌 BL21 (pET28a-*cbhA*)蛋白电泳

Fig. 3.3 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-*cbhA*).

celK 在 *E. coli* BL21 (DE3) 的表达

整个构建过程与 *cbhA* 构建过程相似，如图 3.4 (a)，先通过 PCR 获得 *celK* 基因，然后连接到 pUC19 上，双酶切重组质粒 pUC19-*celK*，酶切结果如图 3.4 (b) 所示，切胶回收 1.7 kb 大小左右的目的片段，然后与经过相同限制性内切酶酶切的表达载体 pET28a 做连接。阳性克隆的筛选是通过质粒 PCR 获得的，如图 3.4 (c)，1~4#泳道能通过 PCR 获得目的条带，是阳性菌，5#泳道以空质粒 pET28a 作为模板进行的对照，没有大小在 1.7 kb 的目的条带。

重组质粒转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)，诱导表达后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，经 IPTG 诱导表达的大肠杆菌 BL21 (pET28a-*celK*)菌株及其对照菌 BL21 (pET28a) 的 SDS-PAGE 电泳如图 3.5 所示，在相同的细胞上样量体积下 1#泳道与 4#泳道相比，在约 69 KDa 处有一条明显的蛋白条带，且大小与 *celK* 编码的目的蛋白 CelK 分子量 68.8 KDa 相符，因此初步判断克隆到 pET28a 上的 *celK* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株内得到了成功表达。为了进一步确认表达蛋白可溶性分布情况，同时对收获细胞进行了超声波破碎，细胞裂解液与沉淀组分同时进行了 SDS-PAGE，2#，3#泳道表明过量表达的蛋白大多以包涵体的形式存在，可溶性组分比例较少，对照中未发现相应的目的条带。

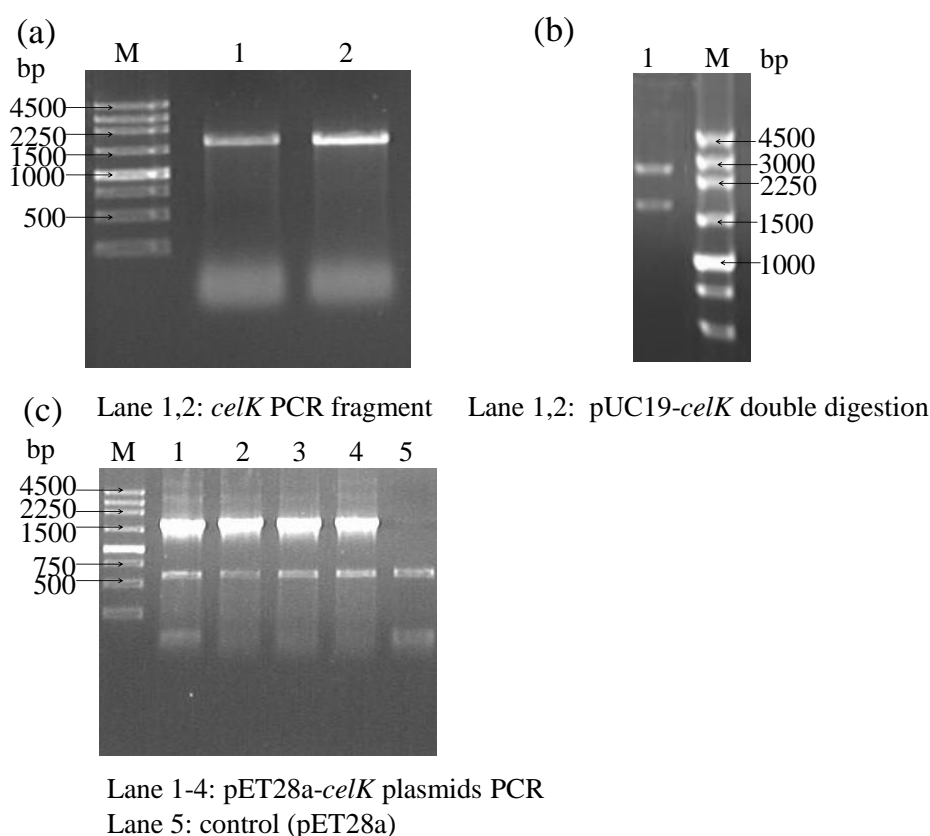
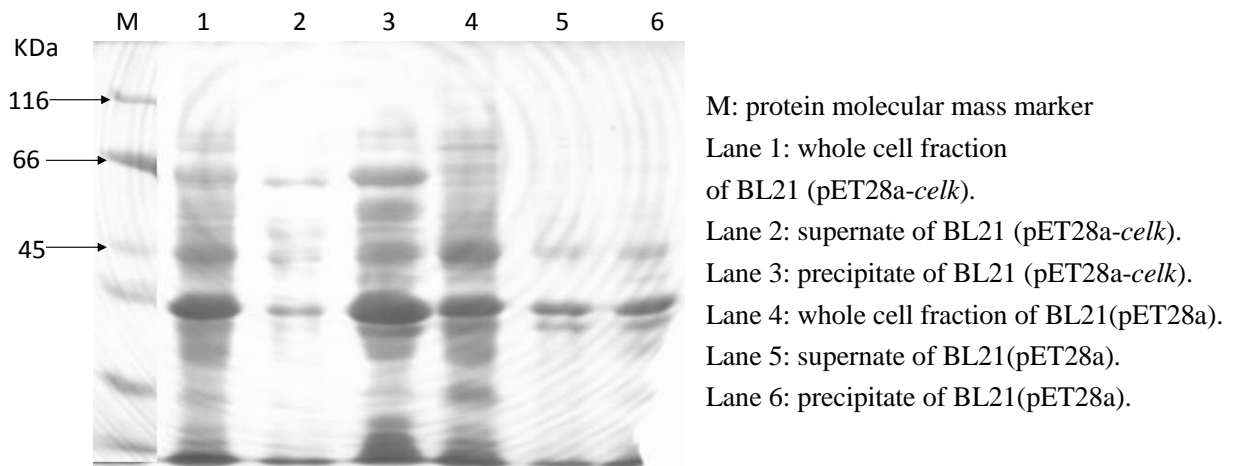


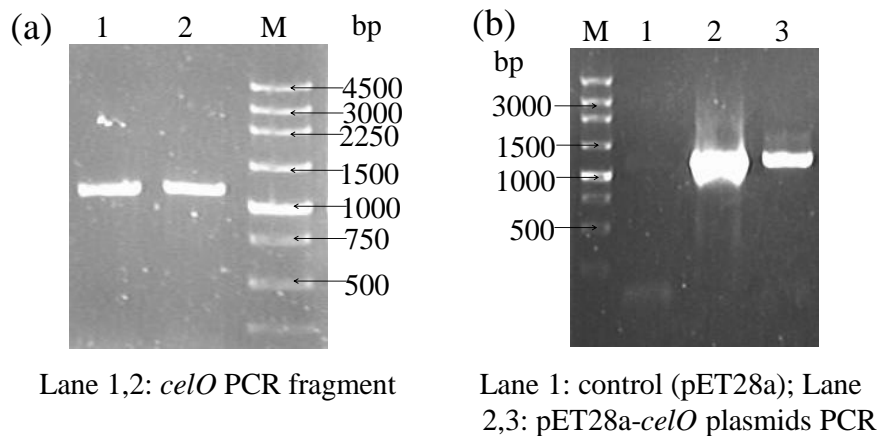
图 3.4 pET28a-*celK* 构建过程

Fig. 3.4 The construction of pET28a-*celK*.

图 3.5 重组菌 BL21 (pET28a-*celk*)蛋白电泳Fig 3.5 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-*celk*).

celO 在 *E. coli* BL21 (DE3) 的表达

通过 PCR 获得目的片段 *celO* (图 3.6 (a)), 然后与 pMD-19T 连接, 切胶回收的目的片段 *celO* 与表达载体 pET28a 连接, 质粒 PCR 结果如图 3.6 (b) 所示, 表明 2#, 3#菌能 PCR 出 1.2 kb 大小相近的目的条带, 证明 2#, 3#菌为重组菌株, 1#样品是空质粒 pET28a 对照。

图 3.6 pET28a-*celO* 构建过程Fig. 3.6 The construction of pET28a-*celO*.

经 IPTG 诱导表达的大肠杆菌 BL21 (pET28a-*celO*)菌株及其对照菌 BL21 (pET28a) 的 SDS-PAGE 电泳图如图 3.7 所示, 在相同的细胞上样量体积下 1#泳道与 C#泳道相比, 在约 44 KDa 处有一条明显的蛋白条带, 且大小与 *celO* 编码的目的蛋白 CelO 分子量 44.4 KDa 相符, 因此初步判断克隆到 pET28a 上的 *celO* 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株内得到了过量表达。为了进一步确认表达蛋白可溶性分布情况, 同时对收获细胞进行了超声波破碎, 细胞裂解液与沉淀组分同时进行了 SDS-PAGE, 2#, 3#泳道表明过量表达的蛋白大多以包涵体的形式存在, 可溶性组分比例很少, 对照中未发现相应的目的条带。

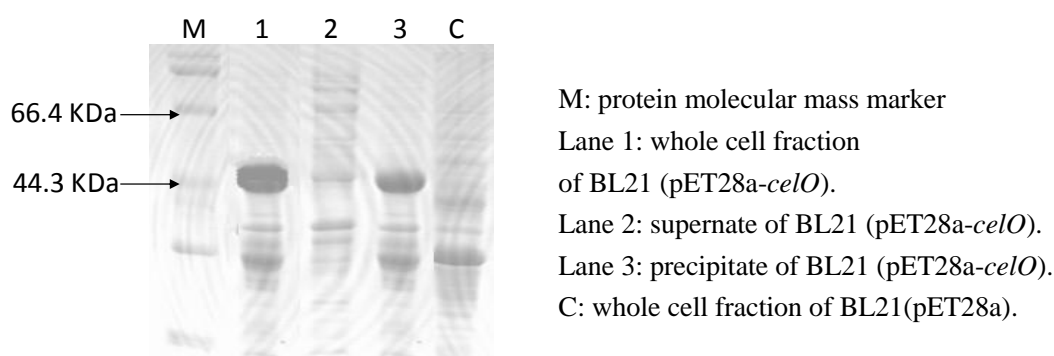


图 3.7 重组菌 BL21 (pET28a-*celO*)蛋白电泳图.

Fig. 3.7 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-*celO*).

celY 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

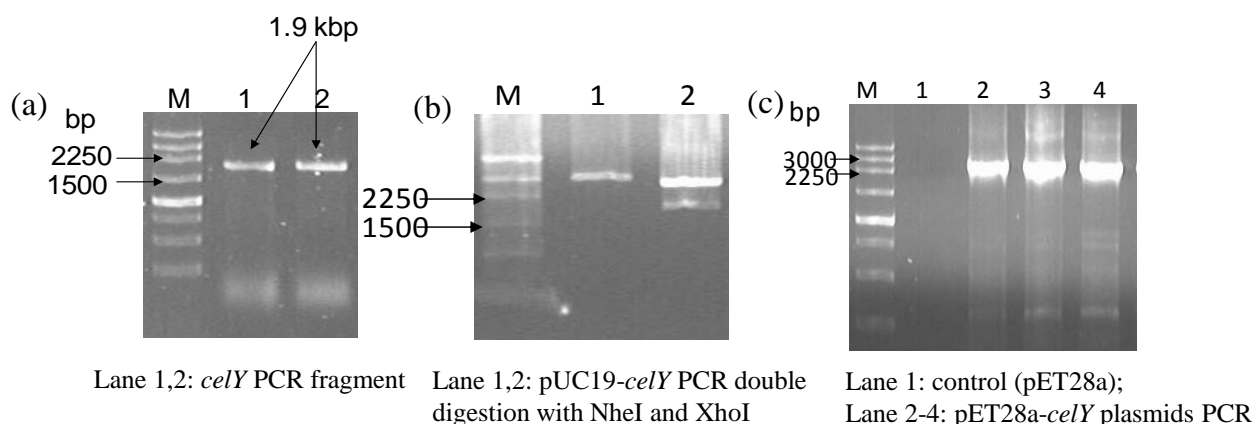


图 3.8 pET28a-*celY* 的构建过程

Fig. 3.8 The construction of pET28a-*celY*.

celY 目的条带如图 3.8 (a) 所示,对 PCR 产物进行酶切纯化,然后连接到 pUC19 上,通过 NheI 和 XhoI 双酶切。如图 3.8 (b), 2#泳道切出正确大小的条带,上面那条核酸条带是 pUC19,下面那条是目的片段。1#泳道未能切出目的条带,是假阳性。回收 1.9 kb 大小的目的片段与 pET28a 连接,从图 3.8 (c)质粒 PCR 结果可以看出, 2~4#菌是阳性克隆,对照质粒没有 PCR 出相应的目的条带。

将含有 pET28a-*celY* 重组菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳,同时为了考察过量表达蛋白的可溶性及在细胞中的分布,我们同时将细胞裂解液及不溶性蛋白进行了电泳操作,从图 3.9 看出, *celY* 在重组菌中成功表达,但是几乎所有的外源蛋白都是以包涵体的形式存在,原因可能是外源蛋白在强 T7 启动子的作用下来不及有效折叠,便多肽链聚积从而沉降成没有活性的包涵体形式。

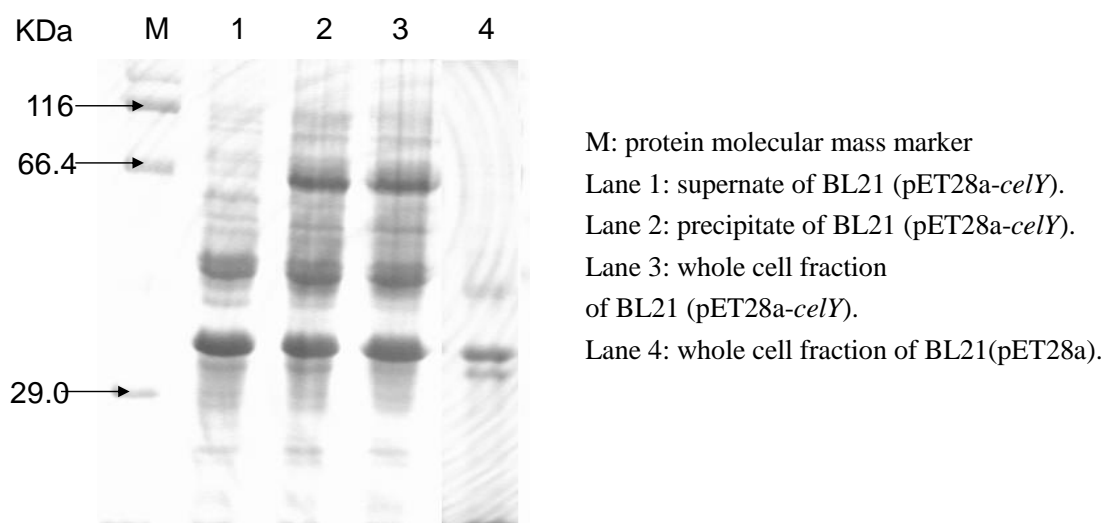


图 3.9 重组菌 BL21 (pET28a-*celY*) 的蛋白电泳图

Fig. 3.9 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-*celY*).

celS 在 *E. coli* BL21 (DE3) 表达

celS 编码的外切酶 CelS 属于糖基水解酶第 48 家族，隶属于组成纤维小体的成员，是热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 中主要的外切酶，但是 Lynd 小组发现缺失了该酶后，热纤梭菌仍能够在以纤维素为基质的培养基上生长。

celS 核酸长度大小为 2.2 kb，通过 PCR 获得该目的基因片段 (图 1)，然后酶切连接到克隆载体 pUC19 上，对 pUC19-*celS* 进行双酶切，回收目的基因片段，连接到 pET28a 上，对 pET28a-*celS* 进行单酶切和双酶切验证，图 3 表明 *celS* 基因已经成功的连接到表达载体 pET28a 上。

含有 pET28a-*celS* 重组菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳，同时为了考察过量表达蛋白的可溶性及在细胞中的分布，我们同时将细胞裂解液及不溶性蛋白进行了电泳操作，从图 3.11 看出，全细胞 1#泳道和沉淀组分 3#泳道中都有过量表达的蛋白条带的出现，大小为 66 KDa 左右，而 *celS* 编码蛋白 CelS 根据 NCBI 上公布的序列应该为 82 KDa，所以大肠杆菌中表达的 CelS 可能表达后被大肠杆菌分泌的蛋白酶降解或者是翻译过程中提前终止，但是同样 2#泳道细胞内可溶性组分中未发现过量表达的蛋白条带的出现，相反沉淀中有浓厚的蛋白条带，证明编码的 CelS 也几乎全部是以包涵体的形式存在。

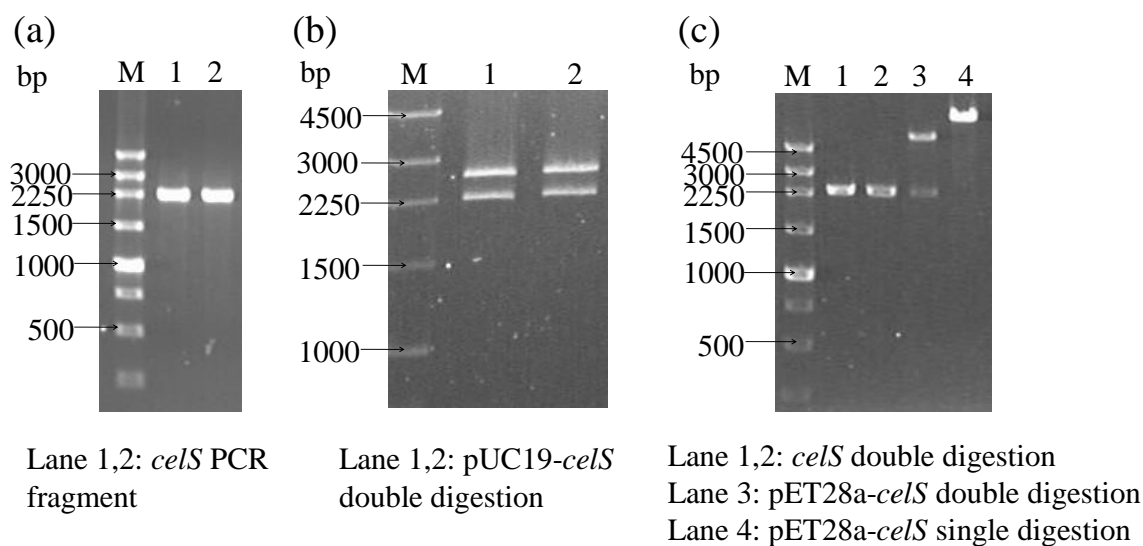


图 3.10 pET28a-*celS* 的构建过程

Fig. 3.10 The construction of pET28a-*celS*.

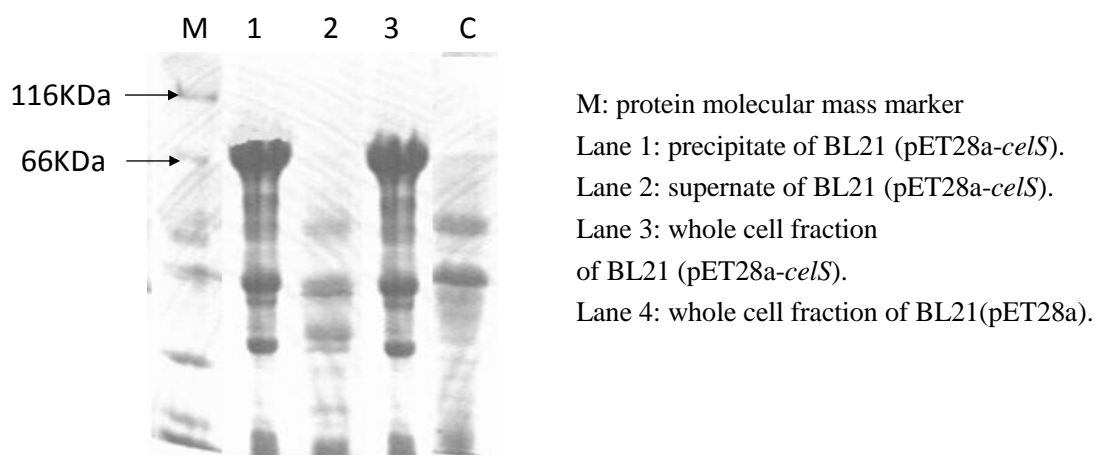
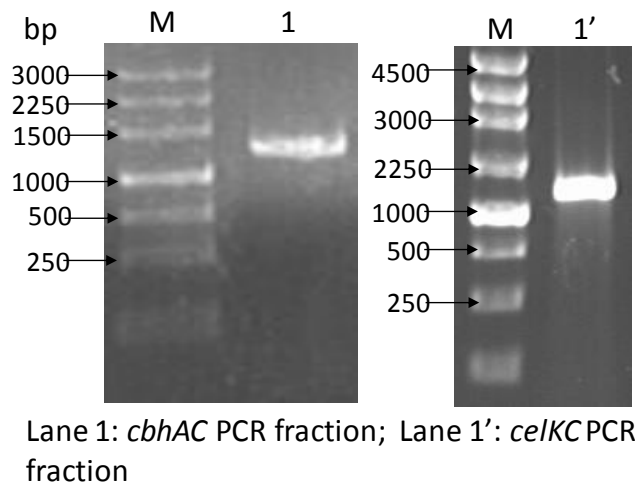


图 3.11 重组菌 BL21(pET28a-*celS*)的 SDS-PAGE 电泳图

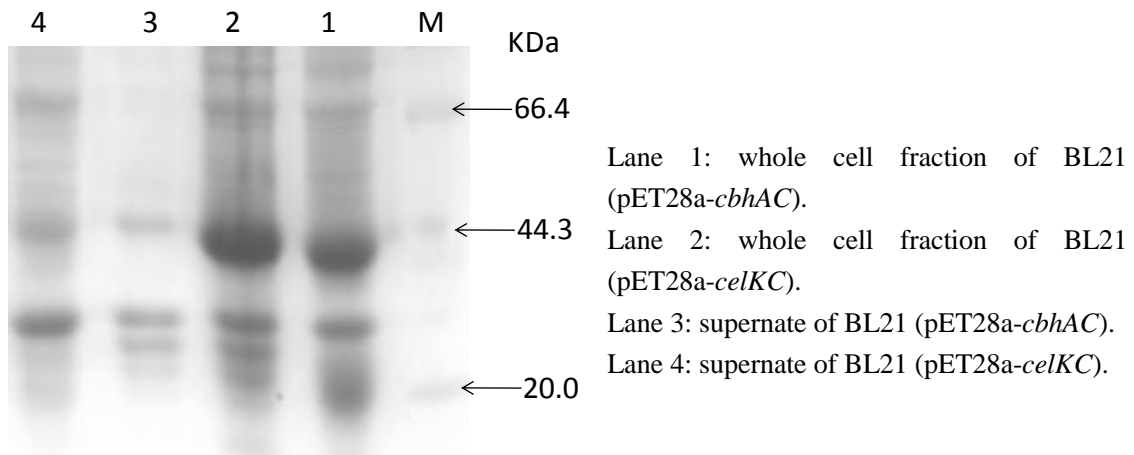
Fig. 3.11 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-*celS*).

cbhAC 和 *celKC* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 的克隆与表达

cbhA, *celK* 分别是包含了催化区域 (catalytic domain) 和无明确功能区域 (immunoglobulin-like, IgD)的基因片段, 而 *cbhAC* 和 *celKC* 是仅包含催化区域的基因片段, 其大小都分别是 1.2 kb, PCR 克隆的目的基因如图所示。

图 3.12 *cbhAC* 和 *celKC* 的 PCR 目的片段Fig. 3.12 The PCR fragment of *cbhAC* and *celKC*.

将目的基因分别连接到 pMD19-T 上，然后酶切回收目的片段并与表达载体 pET28a 做连接，筛选阳性克隆，将 BL21 (pET28a-*cbhAC*) 和 BL21 (pET28a-*celKC*) 以及它们各自的上清裂解液进行 SDS-PAGE 电泳。从电泳图上看 *cbhAC* 和 *celKC* 都成功的在 BL21 (DE3) 里进行了表达，且表达外源蛋白大小 (44 KDa) 与 NCBI 数据库计算得到的分子量相当。另外 3#，4#泳道表明两种外源蛋白都有微弱的可溶性的表达。

图 3.13 重组菌 BL21 (pET28a-*cbhAC*)和 BL21 (pET28a-*celKC*)的电泳Fig. 3.13 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-*cbhAC*) and BL21 (pET28a-*celKC*).

热纤梭菌中外切酶酶活的测定

用对硝基苯纤维二糖 (PNPC)和磷酸处理的微晶纤维素 (PASC)分别测定了大肠杆菌表达系统中分泌的外切酶的酶活。

PNPC 适用于测定从非还原端水解纤维素的外切酶的酶活测定，比如据文献报道 CbhA, CelK 都是从纤维素的非还原端水解纤维素的，CelS, CelO, CelY 是从纤维素的还原端水解纤维素的。所以 CbhA, CbhAC, CelK, CelKC 对 PNPC 起作用，而另外三

种酶对 PNPC 无效。而且 CelS, CelY 基本上在 BL21 (DE3)里都是以包涵体的形式存在, 没有生物活性。

从表中看出, CbhAC, CelKC 由于缺少了 IgD 区域, 无论是 PNPC 活力还是 PASC 活力, 活性都要比相应的 CbhA, CelK 低很多。IgD 区域与催化区域据报道在三维结构上相互交错形成有活性的空间结构, 如果单独表达催化区域, 由于缺少 IgD 区域上的活性辅助位点而没有生物活性。对于磷酸处理的微晶纤维素, 由于各个外源蛋白在 BL21 (DE3)里的可溶性情况以及酶本身的性质差异, 所以酶活性上的区别是上述多种因素综合影响的结果。CbhA 和 CelK 可溶性蛋白多, 生成较多的还原糖。CelS, CelY 可溶性很差, 几乎检测不到还原糖的生成。CelO 据文献报道的最适底物是 β -1,3-1,4-交替连接的燕麦葡聚糖, 而且可溶性差, 所以检测不到酶活性的存在。

表 3.2 外切酶酶活测定结果

Table 3.2 The determination results of cellobiohydrolases activities

Protein	Solubility	PNPC/A420 ^A	PNP ($\mu\text{mol/mL}$)	PASC/A540	Glu (mg/L)
CbhAC	Y	0.36	0.0575	0.025	30
CbhA	Y	0.5049 (10)	0.806	0.2458	950
CelKC	Y	0.1751	0.0280	0.021	13.4
CelK	Y	0.6353 (5)	0.507	0.1721	640
CelS	N	ND	ND	0.027	40
CelO	Y	ND	ND	ND	ND
CelY	N	ND	ND	0.033	60

A: The dilution factors are in the bracket.

3.1.2 解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 纤维素外切酶基因的克隆与表达

解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 是嗜中温的纤维素降解菌, 正如热纤维梭菌等真正的纤维降解菌一样, 解纤维梭菌也能够细菌表面分泌多种酶的复合体-纤维小体。然后靠纤维小体将纤维素等物质降解成可被菌体直接利用的纤维寡糖来支持菌体的生长和代谢。迄今为止已经在该菌中发现了 12 种纤维小体成员, Cel48F, Cel8C, Cel9G, Cel9E, Cel9H, Cel9I, Man5K, Cel9M, Rgl11Y, Cel5N, Cel5A 和 Cel5D。鉴于该菌的良好纤维素酶分泌性能, 我们选择了 *cel9H*, *cel_2226*, *cel9P*, *cel9Q*, *cel9M*, *cel_0755* 和 *ccelE* 等确定或假定的纤维素酶基因进行了克隆和表达。

表 3.3 解纤维梭菌的纤维素酶基因

Table 3.3 The selected cellulases from *C. cellulolyticum*.

Strain	Gene name	GHs ^A	Length (bp)	MW ^B (KDa)
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cel9H</i>	9	1710	64
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cel_2226</i>	9	1356	50
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cel9P</i>	9	1424	53

<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cel9Q</i>	9	1275	47
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cel9M</i>	9	1269	46
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cel_0755</i>	9	1302	47
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	<i>cceIE</i>	9	1494	54

A: GHs, glycoside hydrolase families; B: MW, molecular weight.

cel9H 和 *cel_2226* 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

首先按照实验方法中提到的培养基, 在 37 °C 厌氧环境中培养解纤维梭菌, 培养 36 h 后收集菌体, 用 Qiagen 基因组抽提试剂盒 (Valencia, CA, USA) 提取基因组。然后以该基因组为模板通过 PCR 获得目的基因 *cel9H* 和 *cel_2226*, 如图 3.14 (a)。将目的基因 *cel9H* 和 *cel_2226* 酶切纯化后连接到 pUC19 上, 通过亚克隆获得高拷贝数的重组质粒 pUC19-*cel9H* 和 pUC19-*cel_2226*, 然后酶切获得含有粘性末端的目的片段 *cel9H* 和 *cel_2226*, 再于经过同样的限制性内切酶酶切的表达载体 pET28a 做连接, 构建成重组质粒 pET28a-*cel9H* 和 pET28a-*cel_2226*, 对重组质粒 pET28a-*cel9H*, pET28a-*cel_2226* 双酶切验证如图 3.14 (b) 所示, 1#, 2#泳道分别能够切下 1.7 kb 大小和 1.3 kb 大小的片段, 证明重组质粒构建成功。

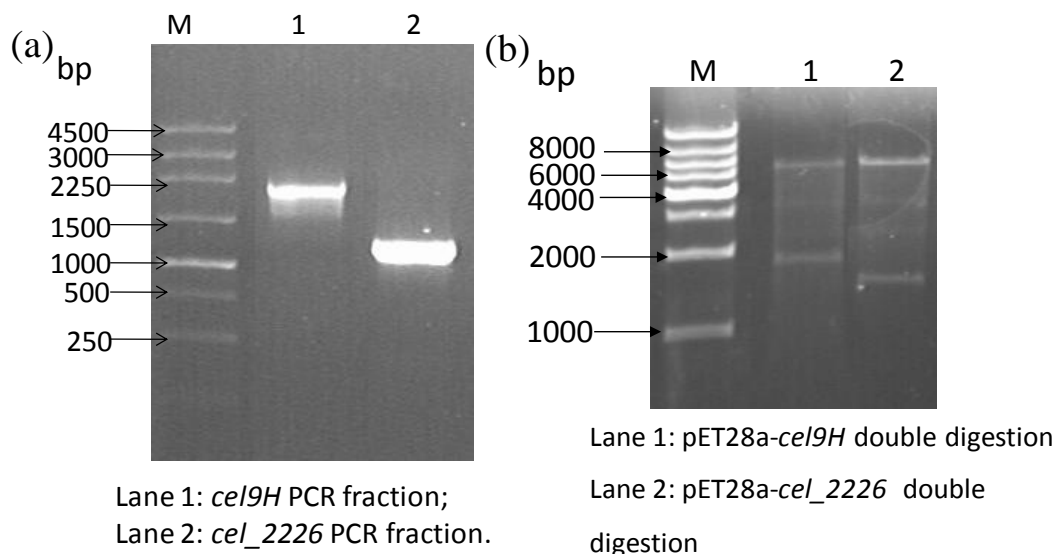


图 3.14 pET28a-*cel9H* 和 pET28a-*cel_2226* 的构建

Fig. 3.14 The construction of pET28a-*cel9H* and pET28a-*cel_2226*.

将上述构建好的质粒转化进大肠杆菌 BL21(DE3) 进行诱导表达, SDS-PAGE 电泳图如图 3.15 所示, 由 1#泳道可以看出, 全细胞样品 BL21 (pET28a-*cel9H*) 在 66.4 KDa

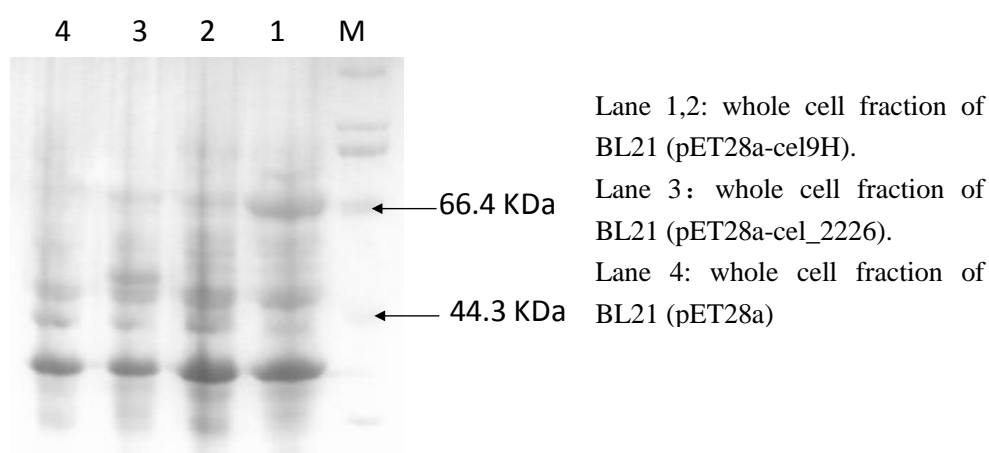


图 3.15 重组菌 BL21 (pET28a-cel9H)和 BL21 (pET28a-cel_2226)的电泳图

Fig. 3.15 The SDS-PAGE of recombinant BL21 (pET28a-cel9H) and BL21 (pET28a-cel_2226).

附近有一条过量表达的条带，与 *cel9H* 编码的蛋白 Cel9H 分子量 64 KDa 大小相符。3# 泳道 BL21 (pET28a-cel_2226)全细胞样品在 50 KDa 附近有一条明显表达的条带，与 *cel_2226* 编码的外切酶 Cel_2226 大小 47 KDa 相符，对照是含有空质粒 pET28a 的大肠杆菌 BL21 (DE3)。

cel9p, *cel9Q*, *cel_0755*, *cel9M*, *ccelE* 的克隆与表达

以解纤维梭菌基因组为模板，分别通过 PCR 得到了目的基因 *cel9p* (1424 bp), *cel9Q* (1275 bp), *cel_0755* (1302 bp), *cel9M* (1269 bp) 和 *ccelE* (1494 bp), 如图 3.16 (a)。

将上述获得的目的基因通过亚克隆之后，最后各自连接到 pET28a 表达载体上，然后对重组质粒 pET28a-*cel9p*, pET28a-*cel9Q*, pET28a-*cel9M*, pET28a-*cel_0755*, pET28a-*ccelE* 分别进行单酶切，双酶切验证，如图 3.16 (c)和 3.16 (d)，单酶切大小合适，双酶切能够切下相应的目的条带，证明质粒构建成功。

同理将上述质粒转化进表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3)，对重组菌 BL21(pET28a-*cel9p*), BL21(pET28a-*cel9Q*), BL21(pET28a-*cel9M*), BL21(pET28a-*cel_0755*)和 BL21 (pET28a-*ccelE*) 进行诱导表达后，取全细胞样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。

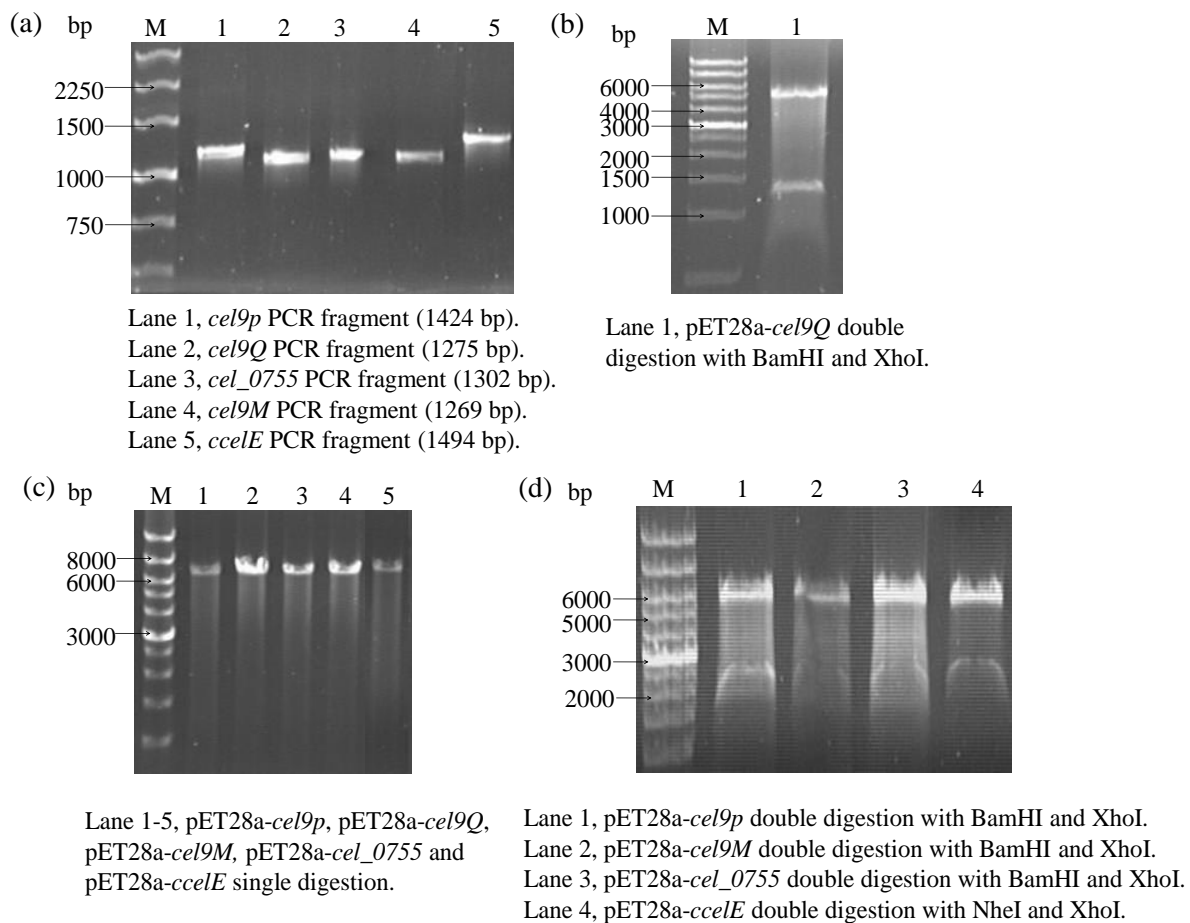
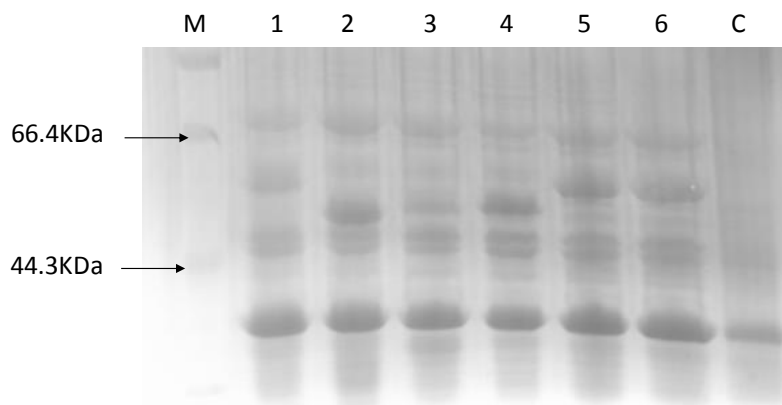


图 3.16 重组质粒的构建过程

Fig. 3.16 The construction of recombinant plasmids



Lane 1: Cel9p (53 KDa) Lane 2: Cel9Q (47 KDa);
 Lane 3: Cel9M (46 KDa) Lane 4: Cel_0755(47 KDa)
 Lane 5,6: CcelE(54 KDa)

图 3.17 重组菌的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3.17 The SDS-PAGE of recombinant bacterias.

如图 3.17, 由 1#泳道与 C#泳道对比可以看出, 在 53 KDa 附近有一条明显的蛋白条带, 与 *cel9p* 基因编码的蛋白 Cel9p 53 KDa 大小相符, 证明该外源基因成功的在 T7 启动子的作用下进行了表达。同理 2#, 3#, 4#, 5#泳道分别在 47 KDa 和 54 KDa 附近各有一条特异性的条带, 且与所分泌的蛋白 Cel9Q, Cel9M, Cel_0755 和 CcelE 分子量大小相当。但是对细胞裂解液上清和不可溶的组分进行 SDS-PAGE 分析发现, 几乎所有的外源蛋白都是以包涵体的形式存在, 只有 Cel9H 和 Cel_2226 在大肠杆菌内有微溶的少许蛋白。

酶活测定

以 PNPC 和 PASC 为底物, 分别测定了纤维素酶 Cel9P, Cel9H, Cel_2226, Cel9Q, Cel9M, Cel_0755 和 CcelE 的酶活, 由 Table 可以看出, 五种酶对 PNPC 没有活性, 原因可能是 PNPC 只适用于对于从非还原端降解纤维素的酶有效, 而对于从解的酶不能发挥作用。另外在大肠杆菌里表达的外源酶大多没有经过有效的折叠便沉降聚集下来, 主要以没有生物活性的包涵体的形式存在, 所以检测不到酶活。对于 PASC, Cel9H, Cel_2226 分别能够生成 110 mg/L 和 101 mg/L 的还原糖, 其它的酶生成少许或没有还原糖量的生成, 主要也是因为没有可溶性外源纤维素酶的存在

表 3.4 外切酶酶活数据表征

Table 3.4 The characters of expressed cellobiohydrolases from *C. cellulolyticum*

Protein	Solubility	PNPC/A420	PASC/A540	Glu (mg/L)
Cel9H	Y	ND	0.0449	110
Cel_2226	Y	ND	0.0425	101
Cel9P	N	ND	0.021	10
Cel9Q	N	ND	0.022	10.5
Cel9M	N	ND	0.031	50
Cel_0755	N	ND	ND	ND
CcelE	N	ND	0.017	ND

3.1.3 野油菜黄单孢菌中外切酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达

根据 Genbank 公布的基因组序列, 发现野油菜黄单孢菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* XCC8004) 基因组中存在编码纤维素外切酶的基因 *xcc8004* 和 *xcc1005*。其大小分别为 1701 bp 和 1488 bp。

首先要提取野油菜黄单孢菌的基因组, 如图 3.18 (a), 其核酸浓度为 180 ng/ μ L。然后以该基因组为模板, 通过 PCR 获得相应的目的基因片段 *xcc8004* 和 *xcc1005*, 如图 3.18 (b-c)。将目的基因片段酶切后直接连接到经过相同的限制性内切酶酶切的表达载体 pET28a 上, 构建成重组质粒 pET28a-*xcc8004* 和 pET28a-*xcc1005*。对重组质粒进行双酶切验证, 图 3.18 (d) 表明 2#质粒双酶切后能够看到两条带, 其中一条与酶切的 pET28a

大小相当，另一条与目的基因片段 *xcc8004* 大小相符合。同理图 3.18 (e) 表明 pET28a-*xcc1005* 质粒双酶切也能够切出大小相符的两条带，由此证明重组质粒 pET28a-*xcc8004* 和 pET28a-*xcc1005* 构建成功。

将构建成功的质粒 pET28a-*xcc8004* 和 pET28a-*xcc1005* 分别转化进大肠杆菌 BL21 (DE3)，构建成重组菌 BL21(pET28a-*xcc8004*)和 BL21(pET28a-*xcc1005*)，然后重组菌在 LB 培养基中培养，加入诱导剂 IPTG 后，低温诱导 16 h 后，进行 SDS-PAGE 电泳和酶活测定。从图 3.19 可以看出，1#，2#泳道对比发现，在 1#细胞裂解液的上清液中，在 60 KD 附近没有响应的蛋白条带的出现，而在 2# 泳道 60 KD 附近有明显的过量表达的外源蛋白带的出现，可以推测外切酶 XCC1005 在 BL21 (DE3)中，主要以包涵体的形式存在；由 3#和 4#泳道可以看出，4#不溶蛋白组分中有明显的过量表达的条带，而上清样品中未发现，所以 XCC8004 也可能主要是以包涵体的形式存在。这与蛋白可溶性预测网站 <http://biotech.ou.edu/>的预测是相符的：对于 XCC8004，当在大肠杆菌中过量表达时，有 93.1% 的可能性是不可溶的；对于 XCC1005，当在大肠杆菌中过量表达时，存在 91.1% 的可能性也是以包涵体的形式存在的。

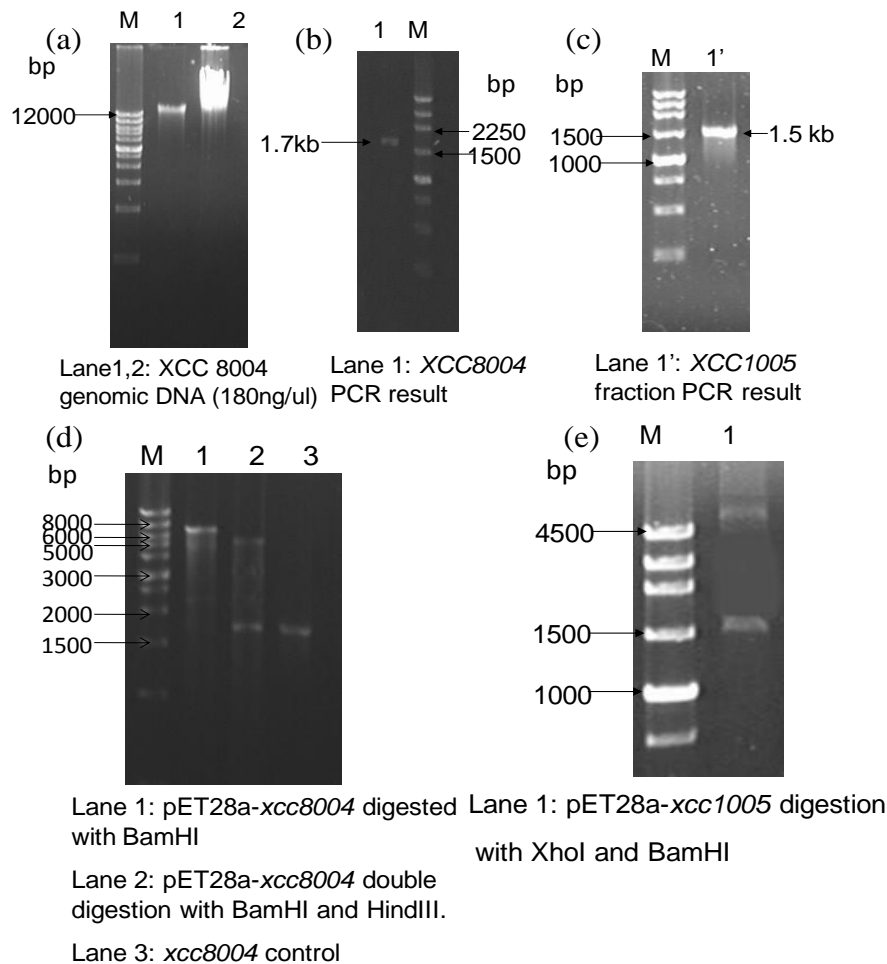


图 3.18 pET28a-*xcc8004* 和 pET28a-*xcc1005* 的构建过程

Fig. 3.18 The construction of pET28a-*xcc8004* and pET28a-*xcc1005*.

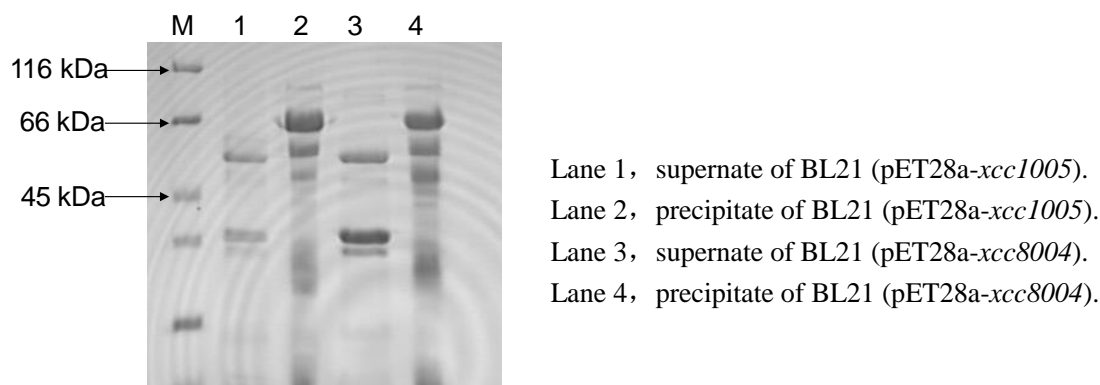


图 3.19 重组菌 BL21 (pET28a-xcc8004)和 BL21 (pET28a-xcc1005)蛋白电泳

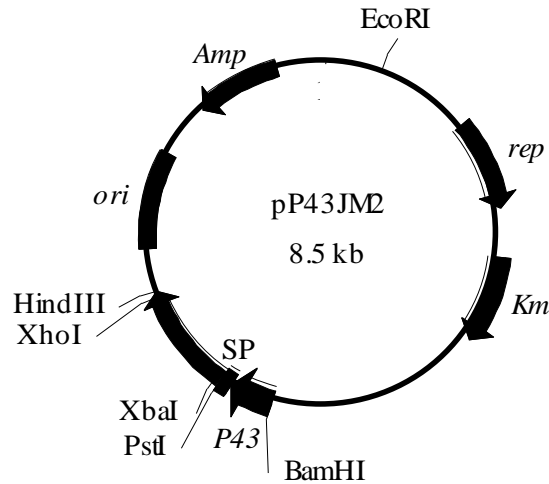
Fig. 3.19 The SDS-PAGE of recombinant bacterias.

大肠杆菌基因操作系统固然成熟，但是在大肠杆菌里使用强启动子表达外源蛋白往往形成包涵体，没有生物活性，而且很难将外源蛋白分泌到胞外培养基中^[45]。一种方法我们可以采取包涵体复性或者是在大肠杆菌里表达有助于多肽折叠的分子伴侣；或者是使可溶性标签与外源基因共表达等，这些方法繁琐，或者是对于辅助蛋白的要求严格，对多种纤维素酶的筛选不具有可操作性。另一种方法是使用中等强度或弱的启动子，避免包涵体的形成。但是弱的启动子往往对于目标蛋白的生产是不利的。第三种方法是选择其他的分泌表达系统。因为大肠杆菌表达系统除了易形成包涵体外，还有一个很大的缺点，便是大肠杆菌不适合作为外源分泌表达的宿主，而对于外源纤维素酶的表达，因为纤维素酶的底物通常是长链多聚糖，底物一般很难进入到细胞内部，所以选择适合胞外分泌的宿主非常重要。

3.2 枯草杆菌表达系统的建立和外切酶在枯草杆菌中的表达

3.2.1 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 的构建

大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43NMK^[46]仅含有两个限制性内切酶酶切位点 PstI 和 HindIII，大大限制了它的使用。所以我们对 pP43NMK 进行了修饰：将一段来自热纤梭菌的片段 (1714 bp)，通过上下游引物各引入了 PstI, XbaI, XhoI, 和 HindIII，替换掉了 pP43NMK 上原来的基因片段 mpk，构建成功了含有多个限制性内切酶位点，枯草杆菌本身强启动子 P43 和中性蛋白酶信号肽 NprB 的工具质粒，pP43JM2。

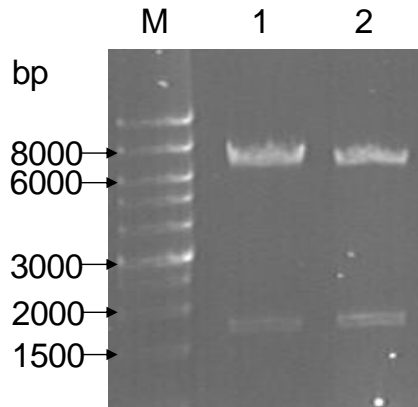


- GTAAGAGAGGAATGTACAC
RBS
- ATG·CGC·AAC·TTG·ACC·AAG·ACA·TCT·CTA·TTA·CTG·
GCC·GGC·TTA·TGC·ACA·GCG·GCC·CAA·ATG·GTT·TTT
GTA·ACA·CAT·GCC·TCA·GCT·GCA·GCT·CTA·GA*
A S A A

图 3.20 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 及部分序列

Fig. 3.20 The *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector pP43JM2 and part of its sequences

大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 上 P43 启动子的 RBS 和 NprB 信号肽编码基因如图所示，信号肽酶的切割位点为 ASA-A 处。



Lane 1: pP43JM2 double digestion with XbaI and HindIII.

Lane 2: pP43JM2 double digestion with XbaI and XhoI.

图 3.21 pP43JM2 双酶切验证图

Fig. 3.21 Double-digestion of pP43JM2.

而且 PstI 识别位点 CTGCAG 和 XbaI 识别位点之间隔了一个 C 碱基，外源基因了连接要置于 GA 碱基的后面，且外源基因的核苷酸与前面的 GA 组成一个完整的密码子，后面的序列才是完整的编码序列。

3.2.2 热纤梭菌外切酶基因在枯草杆菌中的表达

我们将来源于热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum* DSM1237) 的外切酶基因 *cbhA*, *celK*, *cel48S*, *cel48Y* 和 *celO* 在枯草杆菌表达系统里进行了分泌性表达的尝试。

首先以热纤梭菌的基因组为模板, 通过 PCR 扩增获得相应的目的基因片段 *cbhA*, *celK*, *cel48S*, *cel48Y* 和 *celO*。然后将上述质粒分别连接到克隆载体 pMD19T 上, 构建成质粒 pMD19T-*cbhA*, pMD19T-*celK*, pMD19T-*cel48S*, pMD19T-*cel48Y* 和 pMD19T-*celO*, 对上述质粒进行双酶切并且回收相应的目的基因片段, 然后再与经过相同的限制性内切酶酶切的大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 做连接, 构建成重组质粒, 然后转化枯草杆菌 WB600 和枯草杆菌 WB800, 在含有 kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 固体培养基上筛选阳性菌落, 为了验证在抗性平板上生长的菌落的确是含有质粒的目的菌, 我们又从该枯草杆菌中抽取质粒, 酶切验证, 进一步证实重组枯草杆菌的正确性。构建的重组质粒和重组菌如表 3.5。

cel48Y 的 PCR 片段如图 3.22 (a) 所示, 连接到 pMD19T 上后, 双酶切 pMD19T-*cel48Y*, 如图 3.22 (b)。将高拷贝数的含有粘性末端的目的片段 *cel48Y* 连接到大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 的 PstI 和 HindIII 之间, 然后转化 *E. coli* DH5 α , 质粒 PCR 结果验证如图 3.22 (c), 以重组质粒为模板, 能够 PCR 出 1.7 kb 左右的片段, 而以空质粒为模板, 不能 PCR 出相应的条带。进一步用 PstI 和 HindIII 双酶切, 可以看到与目的条带大小合适的片段, 如图 3.22 (d)。将上述构建的质粒转化进 *B. subtilis* WB600 和 WB800, 从重组枯草杆菌 *B. subtilis* WB600 和 WB800 中提取的质粒再经过双酶切验证如图 3.23 所示。

表 3.5 重组质粒和重组菌

Table 3.5 The recombinant plasmids and strains

Genes	MW (KDa)	Plasmids	Recombinant strains
<i>cbhA</i>	68.3	pP43JM2- <i>cbhA</i>	WB600 (pP43JM2- <i>cbhA</i>) and WB800 (pP43JM2- <i>cbhA</i>)
<i>celK</i>	68.8	pP43JM2- <i>celK</i>	WB600 (pP43JM2- <i>celK</i>) and WB800 (pP43JM2- <i>celK</i>)
<i>cel48S</i>	71.1	pP43JM2- <i>cel48S</i>	WB600 (pP43JM2- <i>cel48S</i>) and WB800 (pP43JM2- <i>cel48S</i>)
<i>cel48Y</i>	71.7	pP43JM2- <i>cel48Y</i>	WB600 (pP43JM2- <i>cel48Y</i>) and WB800 (pP43JM2- <i>cel48Y</i>)
<i>celO</i>	44.4	pP43JM2- <i>celO</i>	WB600 (pP43JM2- <i>celO</i>) and WB800 (pP43JM2- <i>celO</i>)
<i>celA</i>	52.6	pP43JM2- <i>celA</i>	WB600 (pP43JM2- <i>celA</i>) and WB800 (pP43JM2- <i>celA</i>)
control		pP43JM2	WB600 (pP43JM2) and WB800 (pP43JM2)

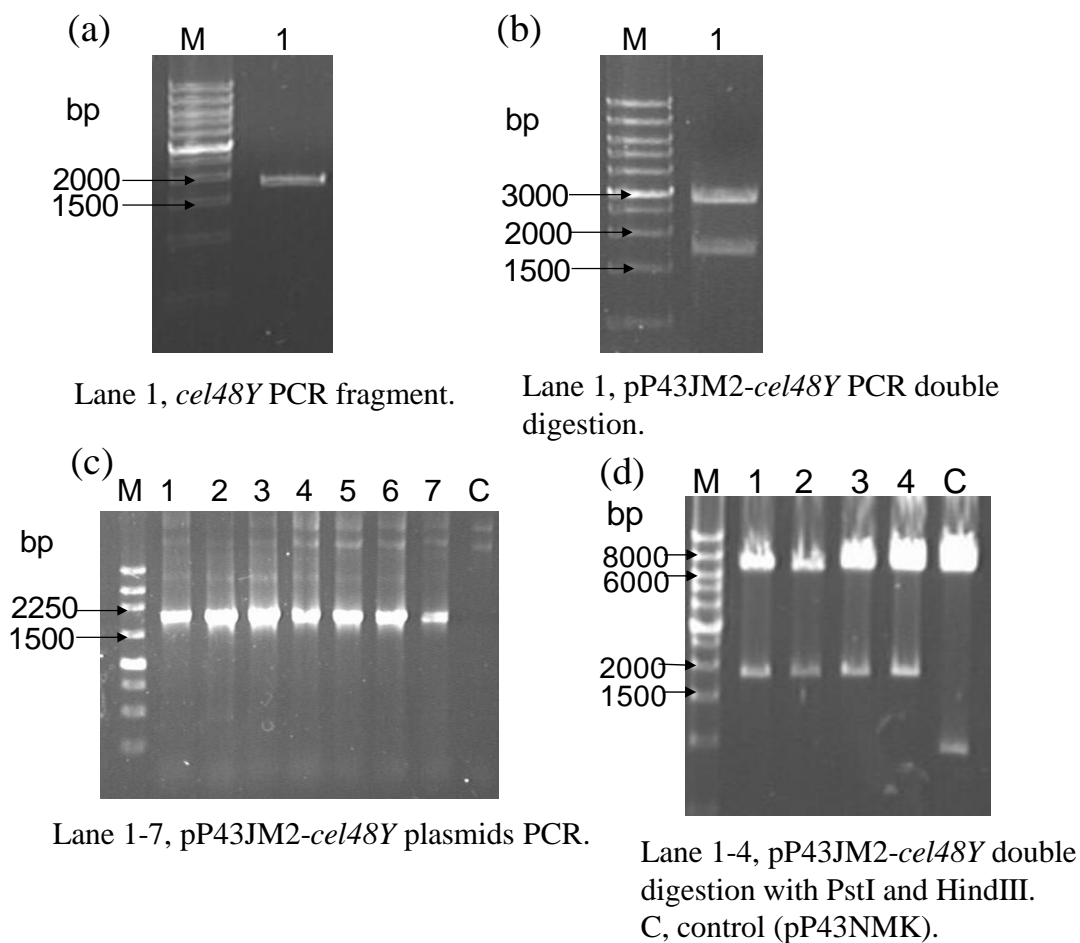


图 3.22 pP43JM2-*cel48Y* 的构建过程

Fig. 3.22 The construction of pP43JM2-*cel48Y*.

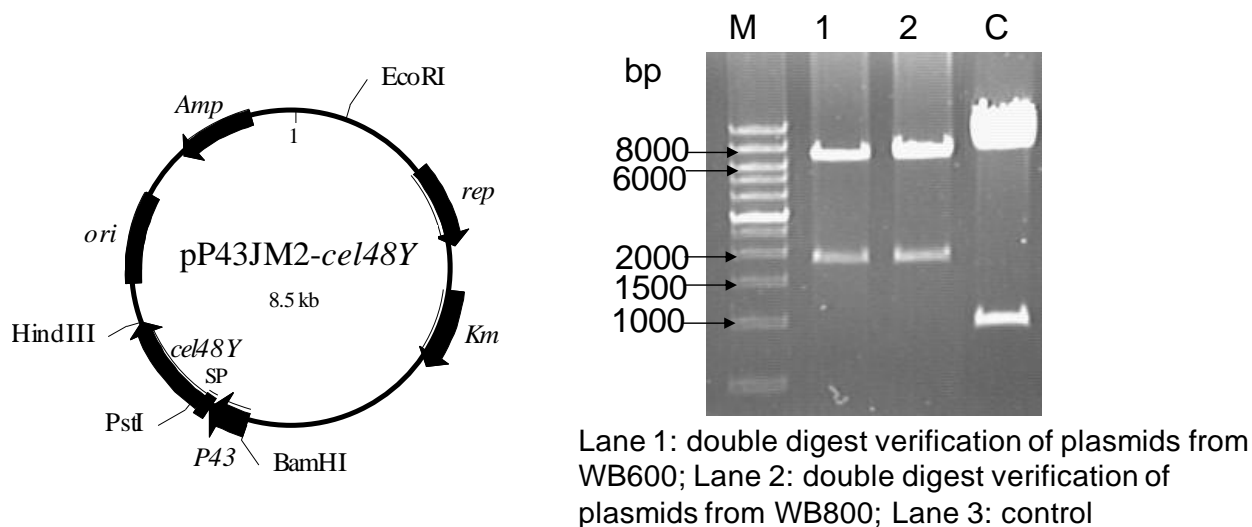


图 3.23 重组质粒 pP43JM2-*cel48Y* 图谱及酶切验证

Fig. 3.23 The map of pP43JM2-*cel48Y* and its identification.

如图 3.24 所示, 将 PCR 获得的目的片段 *cel48S* 与 pMD19T 做连接, 双酶切 pMD19T-*cel48S* 回收两端都带有粘性末端的 *cel48S*, 然后连接到 pP43JM2 上, 对重组质粒 pP43JM2-*cel48S* 酶切验证如图 3.24 (c)所示, 1,2,3#泳道都能够切出相应的 1.8 kb 的条

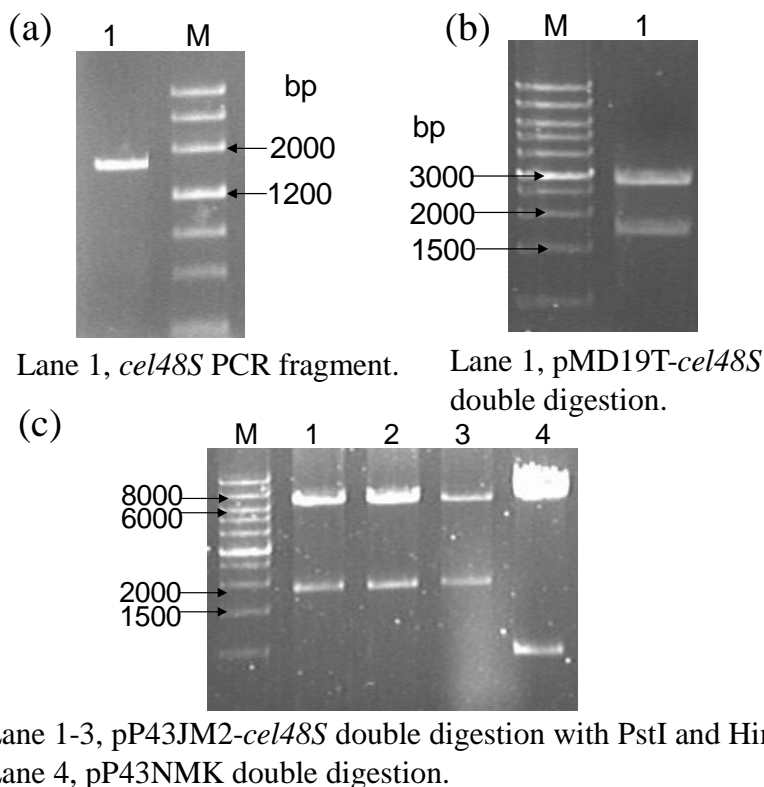


图 3.24 重组质粒 pP43JM2-*cel48S* 的构建

Fig. 3.24 The construction of pP43JM2-*cel48S*.

带, 而对照没有。从重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*cel48S*)和 WB800 (pP43JM2-*cel48S*) 提取的质粒再进行 PstI 和 HindIII 双酶切验证, 同样能够切出目的条带, 如图 3.25 证明了重组菌构建完成。

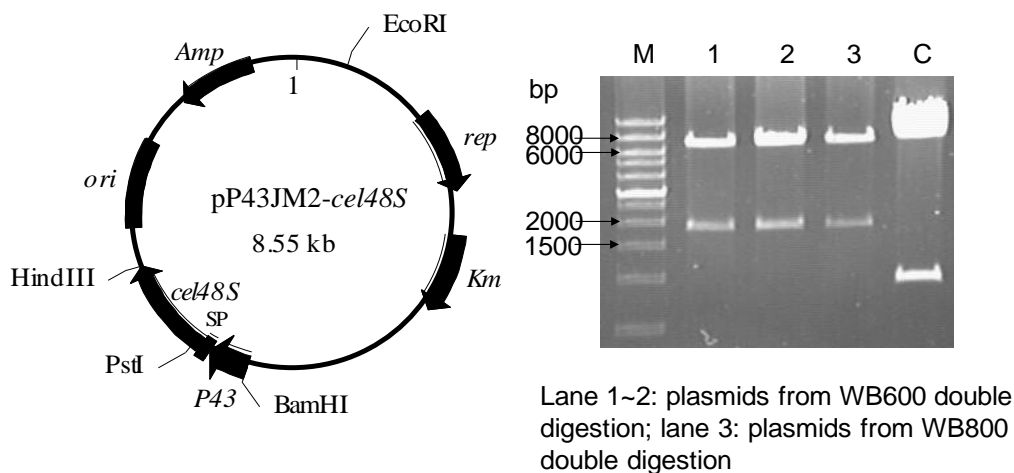


图 3.25 重组质粒 pP43JM2-*cel48S* 图谱及酶切验证

Fig. 3.25 The map of pP43JM2-*cel48S* and its identification.

celO 基因的核酸长度为 1155 bp，将目标片段通过粘性末端连接最终连接到大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 上，通过对重组质粒 pP43JM2-*celO* 用 PstI 和 HindIII 酶切，可以看到有三条带的出现，这是因为在 *celO* 基因的内部有一个 HindIII 的酶切位点，而且 pP43JM2 多克隆位点上也存在一个 HindIII 位点。6000 bp 处的一条带是 pP43JM2 上 PstI 和 HindIII 之间的大片段，1000 bp 和 500 bp 处的条带分别指的是 *celO* 基因上的 PstI 和 HindIII 之间的序列和另外两个 HindIII 之间的序列，如图 3.26 (b)。

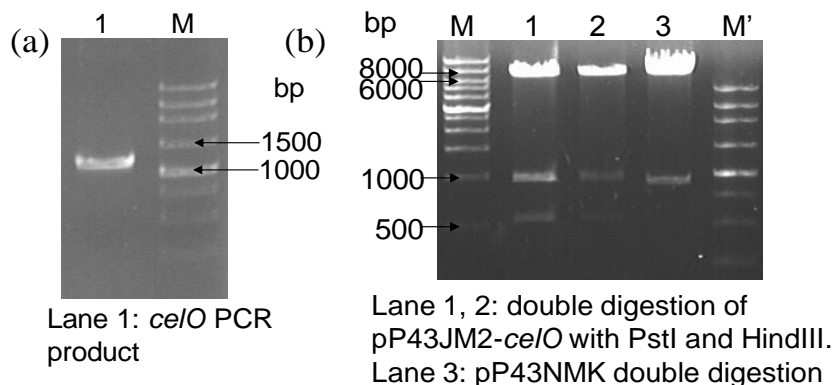


图 3.26 pP43JM2-*celO* 的构建

Fig. 3.26 The construction of pP43JM2-*celO*.

将重组质粒 pP43JM2-*celO* 分别转化进枯草杆菌 WB600 和 WB800，然后再重新从转化的枯草杆菌中提取质粒进行双酶切验证，如图 3.27，重组质粒也是切出了三条带，而对照质粒只有两条带。所以重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celO*)和 WB800 (pP43JM2-*celO*)构建成功。

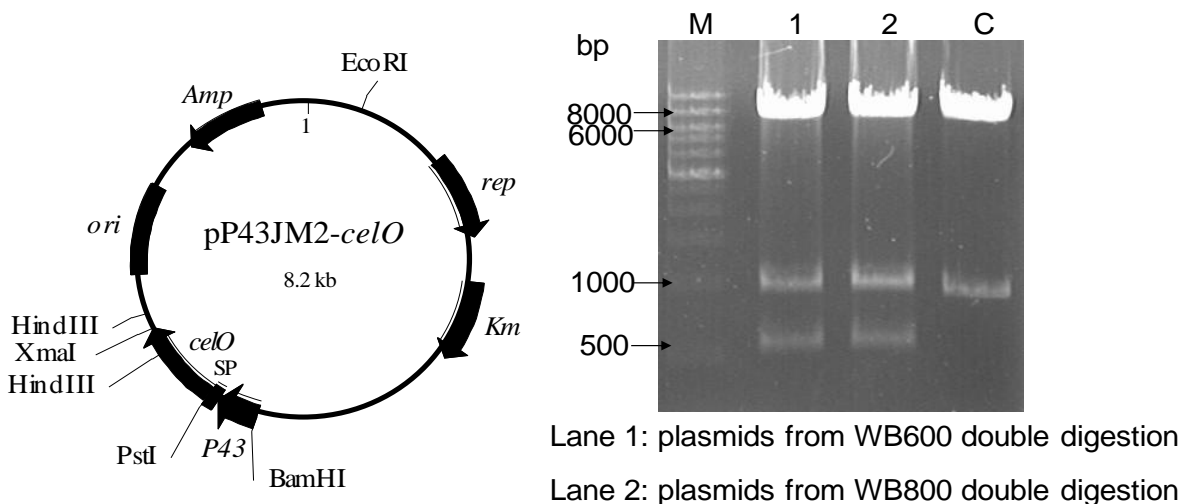


图 3.27 重组质粒 pP43JM2-*celO* 图谱及酶切验证

Fig. 3.25 The map of pP43JM2-*celO* and its identification.

cbhA 基因的核酸长度为 1821 bp，如图 3.28 (a)，其 PCR 产物纯化后连接到 pMD19T 上，然后通过 XbaI 和 HindIII 酶切回收目的片段 *cbhA*，与同样的 XbaI 和 HindIII 酶切的 pP43JM2 连接，转化 *E. coli* DH5 α ，重组质粒 pP43JM2-*cbhA* 酶切验证如图 3.28 (b)

所示, 验证无误后分别转化进 *B. subtilis* WB600 和 WB800, 从转化株里提取质粒同样进行酶切, 图 3.29 表明重组质粒 pP43JM2-*cbhA* 已经成功的转进枯草杆菌中。

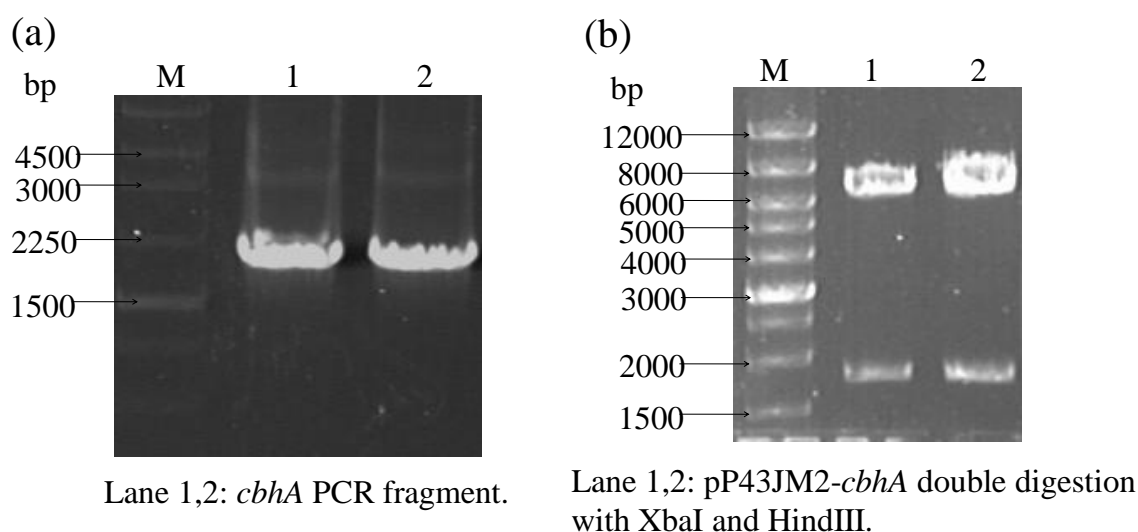


图 3.28 pP43JM2-*cbhA* 的构建

Fig. 3.28 The construction of pP43JM2-*cbhA*.

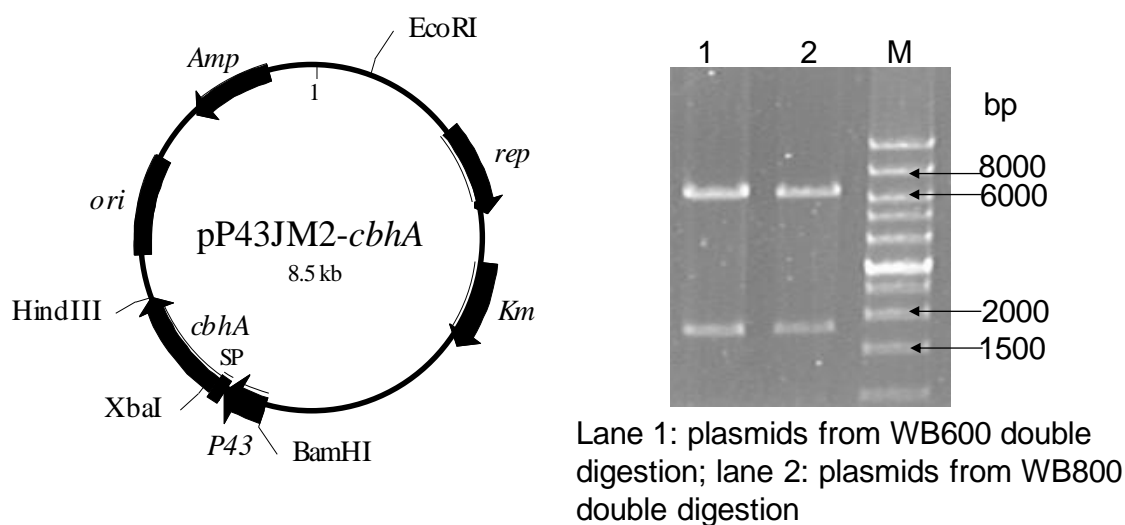


图 3.29 重组质粒 pP43JM2-*cbhA* 图谱及酶切验证

Fig. 3.29 The map of pP43JM2-*cbhA* and its identification.

如图 3.30 (a) 所示, *celK* (1839 bp) 通过 PCR 得到, 构建方法与其它的目的基因相同。连接到穿梭质粒 pP43JM2 上之后, 双酶切 (XbaI 和 HindIII) 验证如图 3.30 (b) 所示, 能够切下 1.8 kb 大小的条带, 然后重组质粒 pP43JM2-*celK* 分别转化枯草杆菌 WB600 和 WB800, 同样对转化子验证, 如图 3.31 能够通过酶切切出大小合适的片段。因此重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celK*) 和 WB800 (pP43JM2-*celK*) 构建成功。

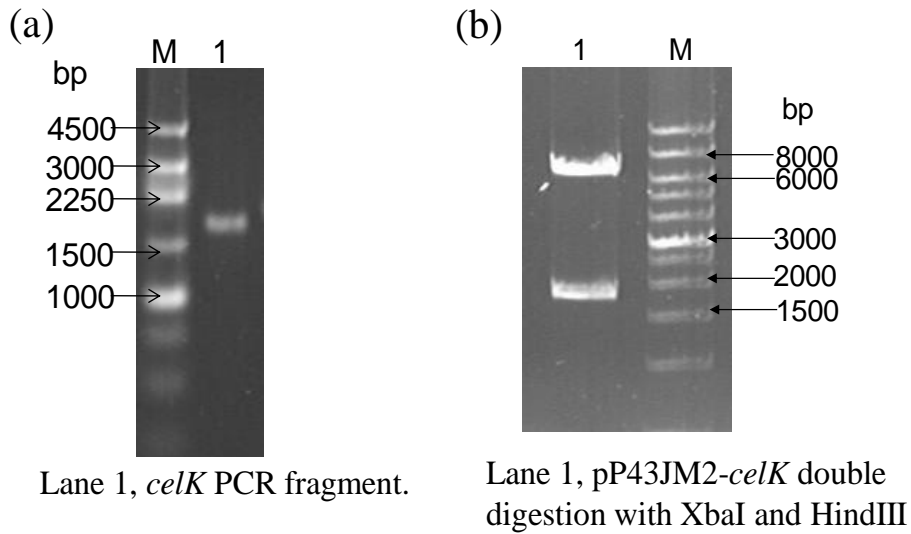


图 3.30 pP43JM2-*celK* 的构建

Fig. 3.30 The construction of pP43JM2-*celK*.

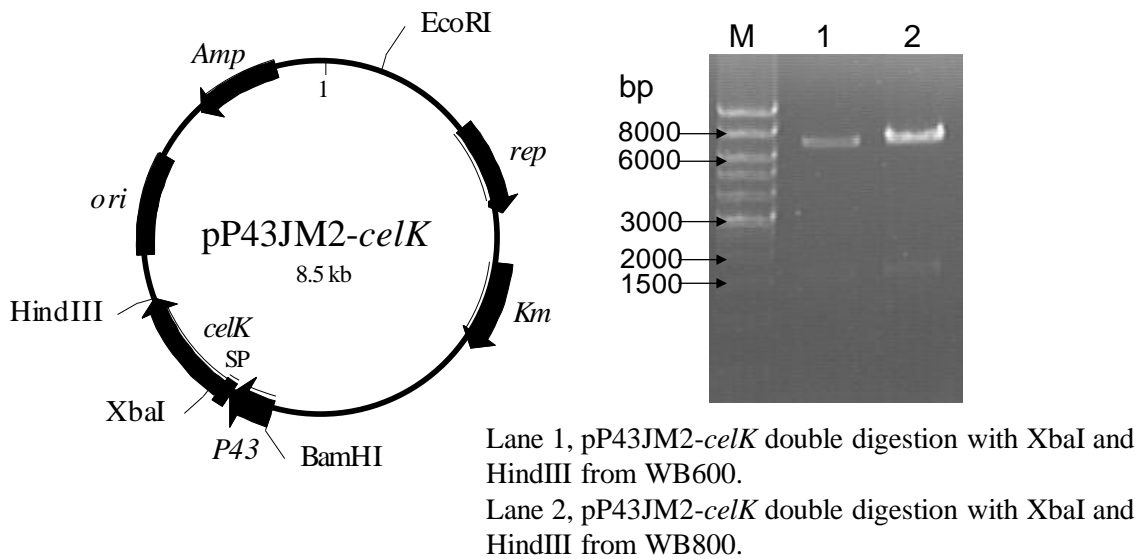


图 3.31 重组质粒 pP43JM2-*celK* 图谱及酶切验证

Fig. 3.31 The map of pP43JM2-*celK* and its identification.

将含有质粒 pP43JM2-*cbhA*, pP43JM2-*celK*, pP43JM2-*cel48S*, pP43JM2-*cel48Y* 和 pP43JM2-*celO* 的重组枯草杆菌和含有空质粒 pP43JM2 的对照菌株在 100 mL LB 培养基上培养, 其中各含有 kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。培养 24 h 后, 各取 20 mL 菌液 8000 rpm \times 5 min 离心, 收集上清, 然后用无水乙醇沉淀的样品悬浮在 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 各取 10 μL 样品进行 SDS-PAGE 电泳, 如图 3.32 所示。

图 3.32 (a)表明, 1# WB600 (pP43JM2-*cbhA*)样品, 2# WB800 (pP43JM2-*cbhA*) 样品各在 69 KDa 附近有一条比较明显的蛋白电泳带, 且蛋白条带的大小与外切酶 CbhA 的分子量 69 KDa 大小相当。由此初步推断 CbhA 可以在 P43 启动子和信号肽 NprB 的作

用下成功表达并且分泌到发酵液中。图 3.32 (b)显示在 1#, 2#泳道在 69 KDa 附近也有一条特异的条带, 与所表达的 CelK 分子量 69 KDa 相符, 初步证明外切酶 CelK 也可以分泌到枯草杆菌 WB600 和 WB800 的发酵液中。同样图 3.32 (c-d)也表明, 表达 Cel48Y 和 Cel48S 的枯草杆菌也可以在 SDS-PAGE 蛋白电泳图上清晰的看到一条特异性的条带, 分子量大小在 71 KDa 附近, 与目标蛋白的分子量相当。而对于外切酶 CelO, 无论是重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celO*) 和 WB800 (pP43JM2-*celO*)都没有在电泳图上发现相应的条带, 与对照菌电泳条带基本没有区别, SDS-PAGE 图没有附上。这可能是由于 CelO 不能被现有的枯草杆菌分泌表达的元件分泌到胞外培养基中。

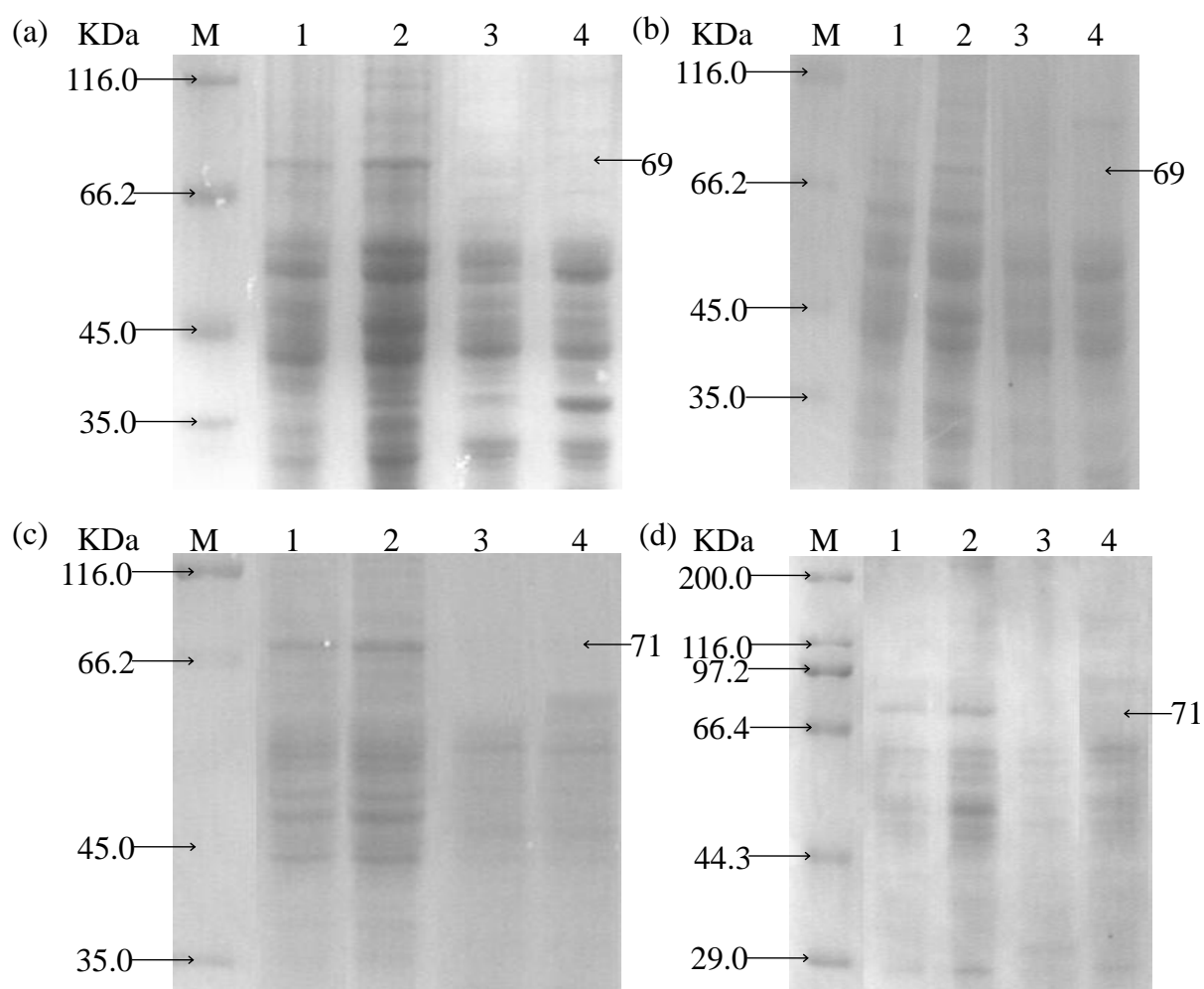


图 3.32 重组枯草杆菌蛋白电泳图

Fig. 3.32 The SDS-PAGE of recombinant *B. subtilis* strains. M, molecular marker; 3, WB600 (pP43JM2); 4, WB800 (pP43JM2); (a) 1, WB600 (pP43JM2-*cbhA*); 2, WB800 (pP43JM2-*cbhA*); (b) 1, WB600 (pP43JM2-*celK*); 2, WB800 (pP43JM2-*celK*); (c) 1, WB600 (pP43JM2-*cel48S*); 2, WB800 (pP43JM2-*cel48S*); (d) 1, WB600 (pP43JM2-*cel48Y*); 2, WB800 (pP43JM2-*cel48Y*);

为了进一步验证重组菌的分泌情况, 我们把表达不同外切酶的重组枯草杆菌进行了发酵实验, 实验在含有 kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基上培养, 然后分别在 18 h, 24 h 和 28 h 取出 20 mL 发酵液, 通过用 40% 饱和度的硫酸铵沉淀发酵液上清中的蛋白, 然后溶

解到 1 mL pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液中 (0.05 mM), 与 1mL 1% (w/v) 磷酸处理的微晶纤维素混合, 在 60°C 孵育 1 h, 再用 3,5-二硝基水杨酸测定生成的还原糖。实验结果如图 3.33 所示, 对于重组菌的生长, 枯草杆菌 WB600 要普遍优于 WB800, WB600 的细胞密度比 WB800 的细胞密度高 5%~15%, 但是对于各种重组菌, 胞外外切酶的酶活 WB800 要比 WB600 高, 对于 CbhA 和 CelK, WB800 分泌的外切酶的酶活大约比 WB600 分泌的外切酶的酶活有 30% 的提高, 而对于 Cel48Y, WB800 分泌的外切酶释放的还原糖的量是 WB600 的两倍, WB800 分泌的 Cel48S 的酶活也要比 WB600 高出约 20%。另外以培养了 24 h 的重组枯草杆菌 WB800 的酶活为例, CbhA 和 CelK 可以分别释放 300 mg/L 和 250 mg/L 的还原糖, Cel48Y 释放的还原糖大约为 160 mg/L, 仅是 CbhA 释放的还原糖量的一半, Cel48S 释放的还原糖的量大概为 100 mg/L。对于重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celO*) 和 WB800 (pP43JM2-*celO*), 使用同样的方法没有检测到酶活, 这也验证了 SDS-PAGE 的结果, *CelO* 没有被有效的分泌到培养基中。含有空质粒 pP43JM2 的枯草杆菌 WB600 和 WB800 同样进行了酶活测定, 以 PASC 为底物没有检测到还原糖的生成。

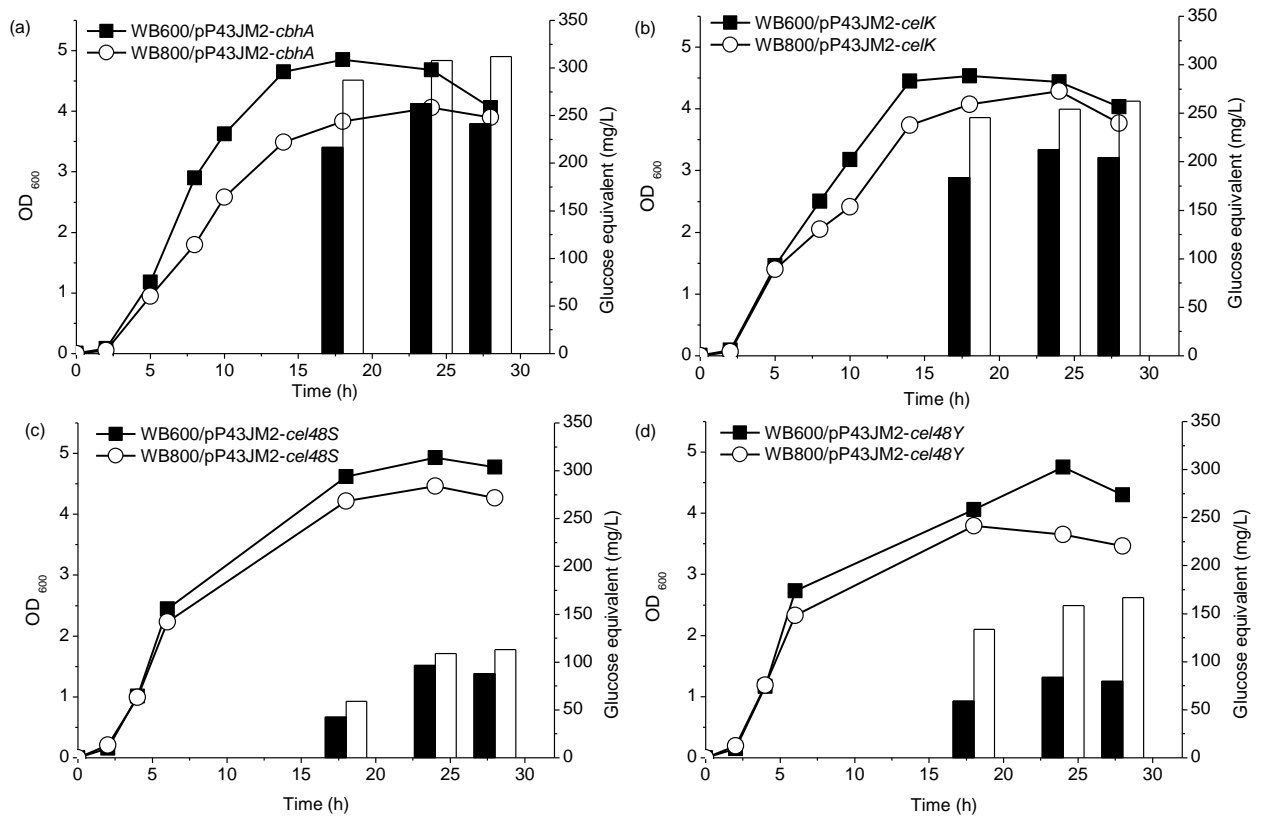


图 3.33 重组枯草杆菌过程酶活测定

Fig. 3.33 The time-course enzymatic determination.

借助枯草杆菌 WB600 (WB800)/pP43JM2 分泌表达的平台, 成功的实现了外切酶 CbhA, CelK, Cel48Y 和 Cel48S 的胞外分泌表达。且以磷酸处理的微晶纤维素为底物, 都能够检测到相应的还原糖的生成, 其中 CbhA 释放的还原糖的量浓度最高, 达到 300 mg/L。在外切酶基因的选择中, 我们只克隆和表达了其中的催化区域 (catalytic domain),

所以如果在以后的实验中表达包含纤维素锚定区域和催化区域的全酶，估计酶活还会有进一步提升的空间。

3.3 内切葡聚糖酶在枯草杆菌中的表达

内切酶是在长链纤维素的内部，非结晶区随机水解 β -1,4-糖苷键生成纤维寡糖的纤维素酶，在纤维素的降解过程中发挥着非常重要的作用。同时为了考察所建立的枯草杆菌表达系统 WB600 (WB800)/pP43JM2 的广适性，我们选择了来源于欧文氏菌 (*Erwinia carotovora subsp. Carotovora*) 的内切酶 CelV，耐热放线菌 (*Thermomonospora fusca*) 的内切酶 CelE 和热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的内切酶 CelA 在枯草杆菌里进行表达。

表 3.6 选取的内切酶的性质

Table 3.6 The characters of selected endoglucanases

Bacteria	Gene	Length (bp)	MW (KDa)	GH
<i>Erwinia carotovora subsp. Carotovora</i>	<i>celV</i>	1515	51.4	5
<i>Thermomonospora fusca</i>	<i>celE</i>	1398	46	5
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>celA</i>	1434	49.2	8

重组质粒 pET43.1a-*celE* 和 pET43.1a-*celV* 是由许建和老师课题组惠赠 (华东理工大学, 上海)。所以我们分别以 pET43.1a-*celE*, pET43.1a-*celV* 和热纤梭菌的基因组为模板，通过 PCR 扩增得到目的基因 *celE*, *celV* 和 *celA*，如图 3.34 (a-b)。然后将上述各个目的基因经过纯化后分别连接到 pMD19T 上，再从连接好的质粒上酶切，琼脂糖凝胶回收带有粘性末端的目的片段。最后与经过相应的限制性内切酶酶切的穿梭质粒 pP43JM2 做连接。构建成重组质粒 pP43JM2-*celE*, pP43JM2-*celV* 和 pP43JM2-*celA*。如图 3.34 (c)，

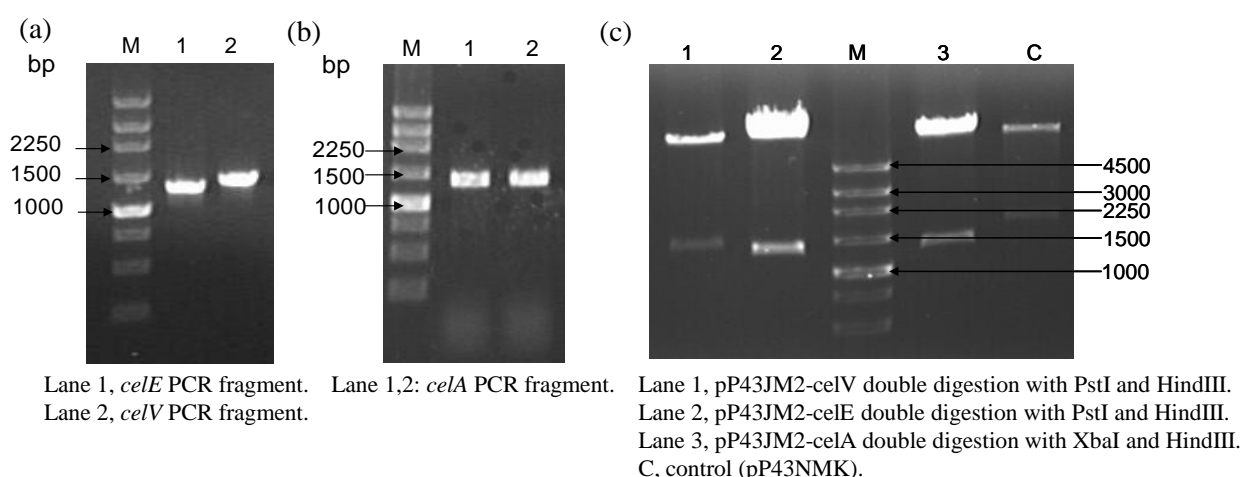


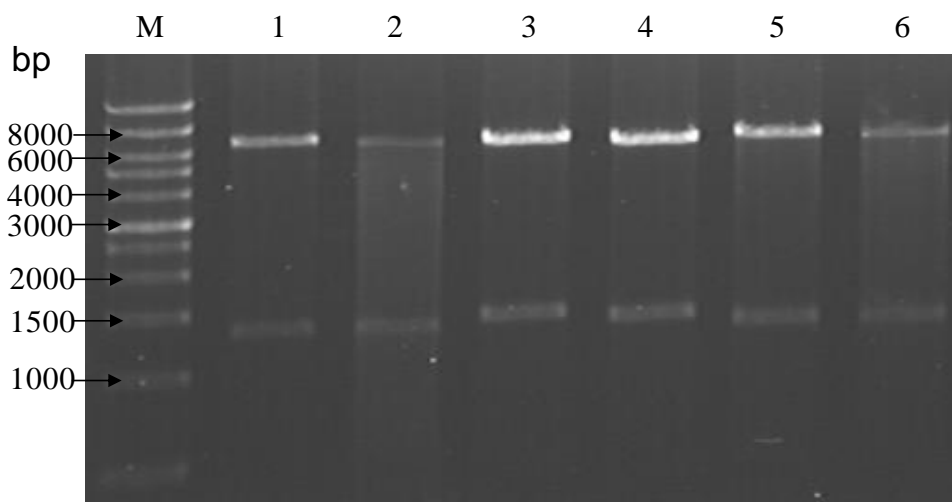
图 3.34 重组质粒 pP43JM2-*celA*, pP43JM2-*celV* 和 pP43JM2-*celE* 的构建过程。

Fig. 3.34 The construction of plasmids pP43JM2-*celA*, pP43JM2-*celV* and pP43JM2-*celE*.

pP43JM2-*celE* 和 pP43JM2-*celV* 用 PstI 和 HindIII 酶切，pP43JM2-*celA* 用 XbaI 和 HindIII 酶切，通过琼脂糖凝胶电泳都能够观察到相应的两条带，其中一条与载体片段大小合适，

另外一条与各自相应的目的片段大小适当。证实上述重组质粒都构建成功。

将质粒在大肠杆菌构建完成后，然后转化到枯草杆菌 WB600 和 WB800，长出的转化子在含有 kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基上培养，离心收集菌体，提取质粒进一步进行双酶切验证，如图 3.35，都能够在核酸电泳图上看到相应的目的条带。如此证实了重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celE*) 和 WB800 (pP43JM2-*celE*)，WB600 (pP43JM2-*celV*) 和 WB800 (pP43JM2-*celV*)，WB600 (pP43JM2-*celA*) 和 WB800 (pP43JM2-*celA*) 构建成功。



Lane 1: pP43JM2-*celE* from *B. subtilis* WB600 double digestion with PstI and HindIII.
 Lane 2: pP43JM2-*celE* from WB800 double digestion with PstI and HindIII
 Lane 3: pP43JM2-*celV* double digestion with PstI and HindIII (WB600)
 Lane 4: pP43JM2-*celV* double digestion with PstI and HindIII (WB800)
 Lane 5: pP43JM2-*celA* double digestion with XbaI and HindIII (WB600)
 Lane 6: pP43JM2-*celA* double digestion with XbaI and HindIII (WB800)

图 3.35 重组枯草杆菌的质粒酶切验证

Fig. 3.35 The verification of recombinant strains by plasmids digestion.

将构建好的重组菌在含有 Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 100 mL LB 液体培养基上培养，监测菌体的生长状况，并且在第 18 h, 24 h, 28 h 分别取 20 mL 菌悬液，离心收集上清液，用 40% (w/v) 饱和度的硫酸铵沉淀分泌的蛋白，然后悬浮在 1 mL pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液中，与磷酸处理的微晶纤维素 (PASC) 混合后测定生成的还原糖的量。

图 3.36 (a) 表明，对于内切酶 *CelV*，重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celV*) 20 h 前菌体密度要高于 WB800 (pP43JM2-*celV*)，20 h 后 OD₆₀₀ 都在 3.0~3.5 之间，呈现下降趋势。WB800 分泌出的内切酶的酶活要普遍比 WB600 高处 20% 左右，WB800 第 24 h 分泌出的内切酶以 PASC 为底物，则可以释放高达 960 mg/L 的还原糖。

对于来自于耐热放线菌的 *CelE*，如图 3.36 (b)，重组枯草杆菌 WB600 (pP43JM2-*celE*) 的菌体密度要比 WB800 (pP43JM2-*celE*) 高出大约 15%，重组菌 WB600 稳定期 OD₆₀₀ 能达到 3.5，而重组菌 WB800 稳定期的 OD 值大概为 3.0 左右。但是与 *CelV* 不同的是，

WB600 分泌的 CelE 要比 WB800 分泌的 CelE 酶活高很多，比如第 24 h 和第 28 h 的样品，WB600 分泌的 CelE 分别能够释放约 1100 mg/L, 1000 mg/L 的还原糖，而对于 WB800 的 CelE，得到的还原糖的量约为 824 mg/L 和 780 mg/L，分别高出了 33% 和 28%。

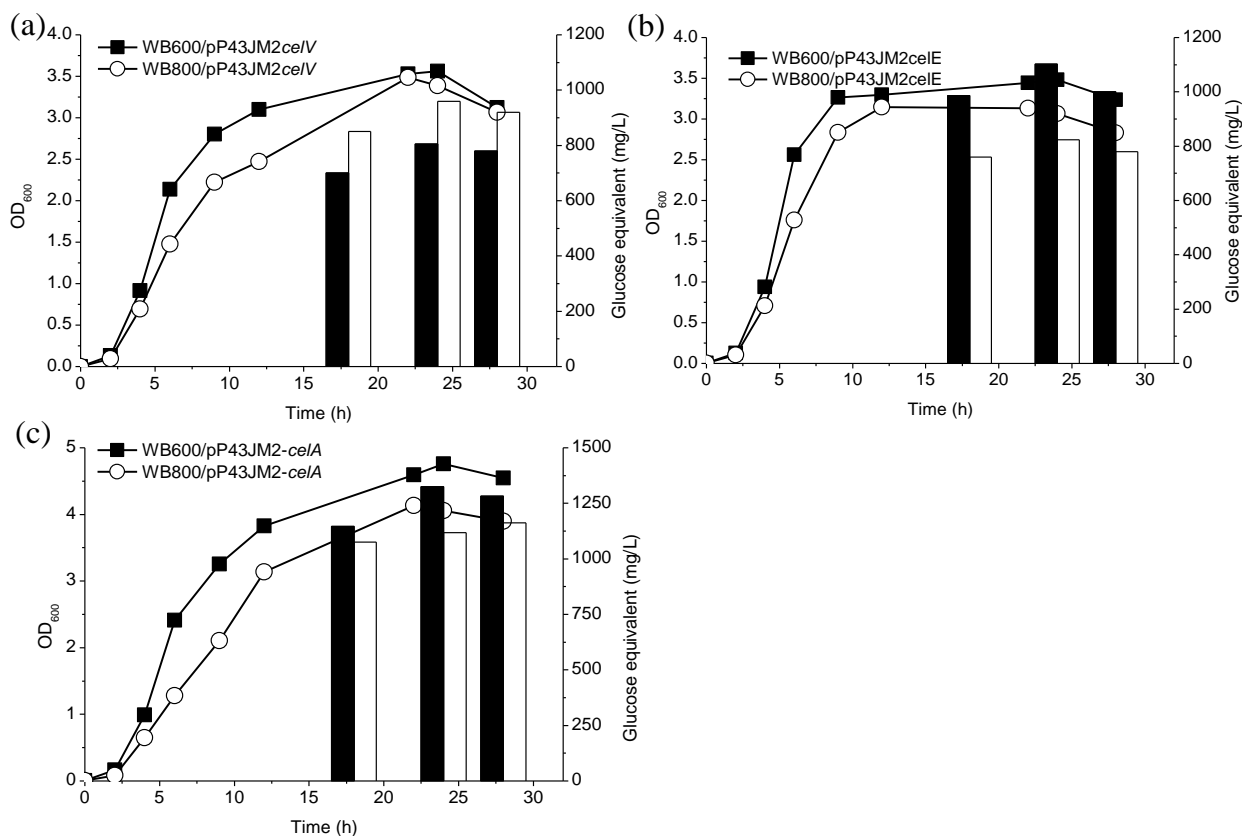


图 3.36 内切酶酶活表征

Fig. 3.36 The enzymatic activities of endoglucanases from recombinant *B. subtilis*.

如图 3.36 (c), CelA 在枯草杆菌里的分泌情况与 CelE 相似, WB800 (pP43JM2-celA) 的生长密度要比 WB600 (pP43JM2-celA) 低 15%, 生长后期 WB600 菌体密度达到 4.5 左右, 而 WB800 的 OD 约是 4.0。同样对于 CelA, 重组菌 WB600 分泌的酶的酶活要比 WB800 分泌的酶的酶活高, 培养 24 h 的重组 WB600 以 PASC 为底物可以生成 1324 mg/L 的还原糖, WB800 生成的糖的量则是 1117 mg/L; 在第 28 h, 生成的糖的量都略有下降, 重组 WB600 能够释放 1280 mg/L, WB800 能够释放 1162 mg/L。

内切酶 CelE 和 CelA 在枯草杆菌 WB600 中的分泌酶活要显著高于 WB800 表达系统分泌的酶活, 这与 CelV 和外切酶的分泌性质是不同的。这可能是因为 WB800 中多缺失的两个外源蛋白酶对 CelE 和 CelA 没有降解作用, 而 WB600 细胞的菌体密度要高于 WB800, 所以培养同样时间的菌体, WB600 可以收集更多的目标蛋白, 因而释放更多的还原糖。

总体来说, 无论外切酶 CbhA, CelK, Cel48S 和 Cel48Y, 还是内切酶 CelA, CelE

和 CelV, 都能够借助所建立的枯草杆菌表达系统 WB600 (WB800)/pP43JM2 有效的分泌到胞外培养基中。宿主菌 WB800 比 WB600 多缺失了两个外源蛋白酶, 生长上呈现一定的劣势, 但是对于某些外源蛋白的分泌有一定的优势。因为 WB800 多缺失的蛋白酶并不是对所有的蛋白都有降解作用, 因此对于表达与此蛋白降解无关的外源产物, WB600 可能也是一种很好的选择。Wong^[47]曾经用枯草杆菌 WB700 和 WB800 分别表达来源于 *Clostridium cellulovorans* 的纤维素酶 EngB, 结果发现在 WB700 中得不到完整的 EngB 蛋白, 而在多缺失了一个蛋白酶的 WB800 中可以获得完整的 EngB 蛋白, 作者解释这可能是因为 WB800 较 WB700 多缺失的蛋白 WprA 对所表达的 EngB 有降解作用。

在枯草杆菌里表达纤维素酶, 不仅对于纤维素酶的筛选, 纤维素酶的胞外生产有非常重要的意义, 而且从另一个角度考虑, 纤维素酶的分泌对于构建整合生物工艺菌种迈出了很重要的一步。整合生物工艺菌种指的是菌种本身能够降解木质纤维素的原料而且将水解得到的纤维寡糖直接利用来生产有用的生物基化学品, 所以在枯草杆菌里表达分泌纤维素酶有助于利用纤维质原料这一可再生的资源, 获得可被细胞利用的寡糖或单糖, 然后下一步再考虑将水解得到的单糖通过菌体代谢或者是外源途径的引进生产目标产品。

3.4 协同作用

3.4.1 外切酶之间的协同作用

协同作用指的是各种酶混合后呈现的酶活要比酶单独作用表现出来的酶活的总和要高的现象。而协同效应因子指的是混合酶的酶活与单独酶酶活总和的比值。对于纤维素外切酶, 据报道有的酶从纤维素的非还原端水解纤维素, 比如来自热纤梭菌的 CbhA, CelK; 有的酶从纤维素的非还原端降解纤维素, 比如热纤梭菌来源的 Cel48S 和 Cel48Y。所以当水解机制不同的外切酶混合时, 纤维素的两端可以被同时水解, 酶与酶, 酶与底物之间呈现出良好的协同效应。

我们将重组枯草杆菌 WB800 (pP43JM2-*cbhA*), WB800 (pP43JM2-*cel48S*) 和 WB800 (pP43JM2-*cel48Y*) 在 LB 液体培养基中 (含 Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养 24 h, 各取 20 mL 发酵液, 8000 $\text{g} \times 10 \text{ min}$ 离心, 上清液通过 40% 的硫酸铵沉淀, 悬浮在 500 μL pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液中 (0.5 mM), 当单独测定外切酶的酶活时, 每种酶液的体积固定在 1 mL, 通过往 500 μL 的粗酶液中加入 500 μL 的柠檬酸钠缓冲液。而对于两种外切酶酶活的测定, 把相应的两种酶混合后即能得到 1 mL 的混合酶液。对于三种酶的混合则可以把三种单独的酶分别溶解在相应的体积中, 然后混合在一起维持酶液的总体积为 1 mL。然后再分别于 PASC 混合以测定生成的糖的量。

从图 3.37 中可以看出, 单独的外切酶 CbhA, Cel48Y 和 Cel48S 分别处理 PASC 时, 生成的还原糖的量分别大约是 300 mg/L, 150 mg/L 和 100 mg/L。而当 CbhA 和 Cel48S 混合后, 总糖的量有明显的提高, 达到 510 mg/L 左右; 当 CbhA 和 Cel48Y 混合后, 生成的还原糖的量达到了 600 mg/L, 这两种组合方式的协同效应因子分别是 1.3 和 1.35。

当三种酶混合到一起时，混合酶生成的糖的总量略微比单独酶酶活的总和高，协同效应因子只有 1.06。

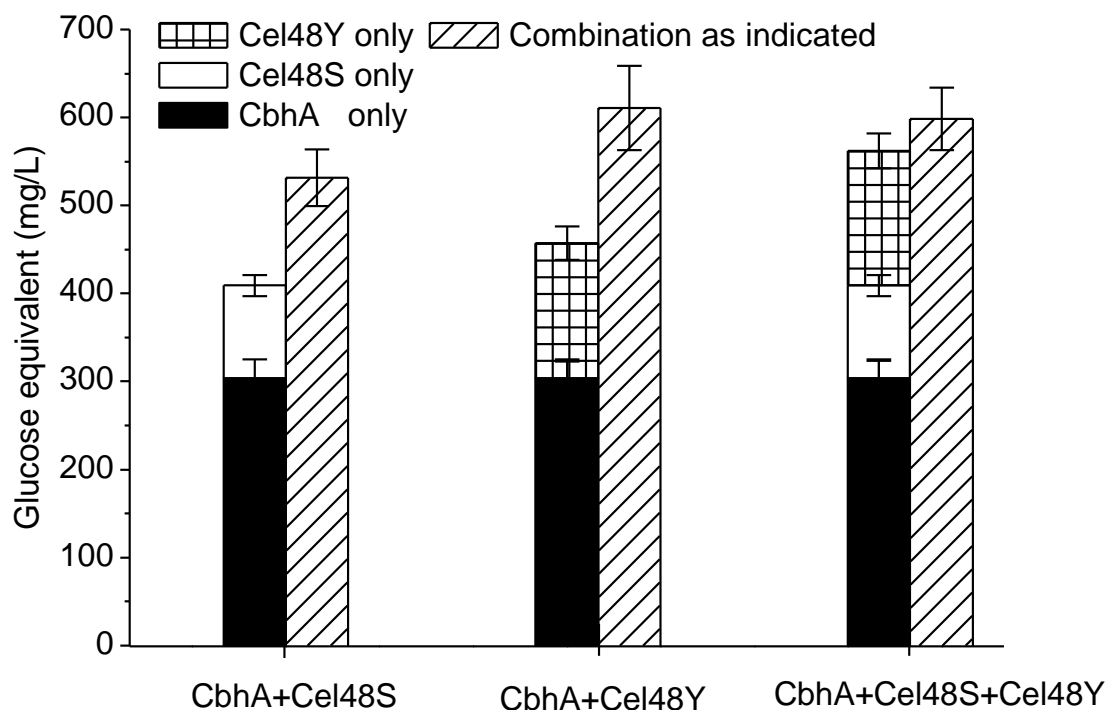


图 3.37 外切酶之间的协同作用

Fig. 3.37 The synergistic effect of cellobiohydrolases

3.4.2 外切酶与内切酶之间的协同作用

纤维素的完全降解需要多种酶的协同作用，外切酶和内切酶的混合对于纤维质底物的降解发挥着至关重要的作用。

酶液的制备是通过 20 mL 培养了 24 h 的重组枯草杆菌发酵液浓缩到 1 mL 的柠檬酸钠缓冲液中进行的，单独的酶活的测定是取一定体积的粗酶液，然后用柠檬酸钠缓冲液定容到 1 mL，对于混合粗酶液的制备，是分别取一定体积的酶液混合，然后用柠檬酸钠缓冲液定容到 1 mL。所有粗酶液的体积都固定在 1 mL。然后与 PASC 混合，60 oC 孵育 1 h，对于以微晶纤维素 Avicel PH101 和稀硫酸处理的秸秆 (DACS) 为底物，1 mL 粗酶液与 1 mL 2% (w/v) 的底物混合，在 60 oC 下孵育 12 h，然后用 DNS 测定生成的还原糖的量。

图 3.38 (a) 表明，外切酶只能够水解 PASC 生成相应的还原性的糖，且随着酶浓度的提高，糖的浓度有一定程度的提高，但对于 Avicel PH101 和 DACS 无效。内切酶 CelA 单独处理 Avicel PH101 和 DACS，仅能生成很低浓度的还原糖，大约只有 23 mg/L 和 14 mg/L，而当加入 CbhA 后，还原糖的浓度有一个明显的提高，当加入 150 μ L CbhA 时，对 Avicel pH101 而言还原糖的量达到 71 mg/L，而对于 DACS 其糖浓度能达到 32 mg/L，其协同效应因子分别达到 3 和 2.26。而对于底物 PASC，协同效应不是很明显，混合酶

得到的酶活总量与单独酶的总和几乎一致。并且随着 CbhA 的浓度提高, Avicel PH101 和 DACS 水解得到的糖的总量进一步提高, 当加入 500 μL CbhA 时, 其糖浓度则达到了 107 mg/L 和 67 mg/L, 且后续酶活增加的趋势变得平缓。

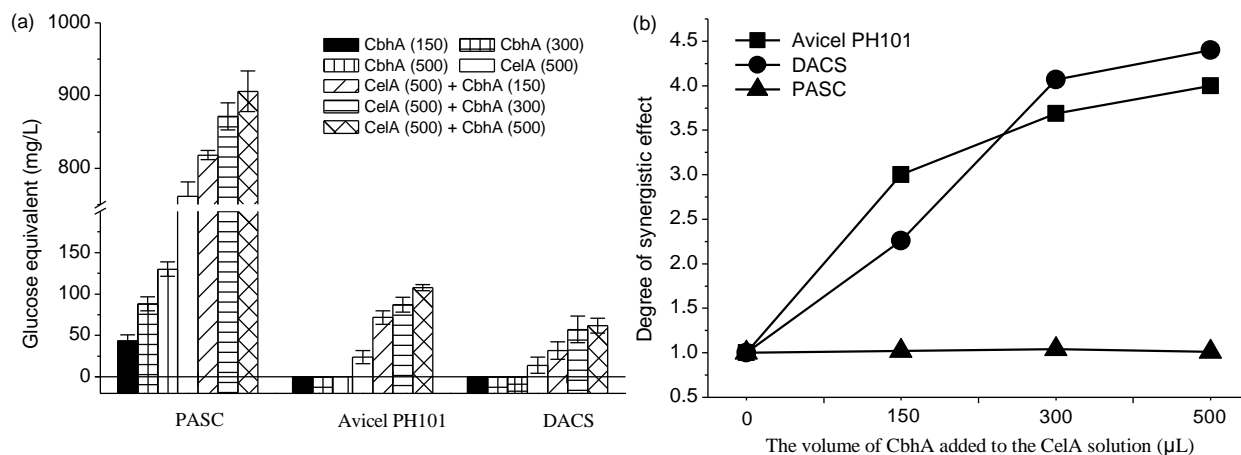


图 3.38 外切酶与内切酶之间的协同作用

Fig. 3.38 The synergistic effect between endoglucanases and cellobiohydrolase

如图 3.38 (b)所示, 对于磷酸溶胀的纤维素, 其协同效应值明显低于其它的两种结晶度高的底物, 这与以前的文献报道也是一致的, 多种因素诸如底物的特征, 酶的用量, 反应时间等对协同效应都会有明显的影响。

第 4 章 结论和展望

- (1) 借助大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-28a(+) 表达系统,将来源于热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*) 的外切酶基因 *cbhA*, *celK*, *cel48Y*, *cel48S*, *cbhAC*, *celKC* 和 *celO*, 解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 的外切酶基因 *cel9P*, *cel9Q*, *cel_0755*, *cel_2226*, *ccelE*, *cel9H* 和 *cel9M*, 野油菜黄单孢菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* XCC8004) 的外切酶基因 *xcc_8004* 和 *xcc_1005* 在大肠杆菌里进行了表达, 其中 *cbhA*, *celK*, *cbhAC*, *celKC*, *cel9H* 和 *cel_2226* 在大肠杆菌中过量表达时可以以部分可溶的形式存在, 其它基因主要以没有生物活性的包涵体的形式存在。*cbhA* 和 *celK* 编码的产物对对硝基苯纤维二糖苷 (PNPC) 和磷酸处理的微晶纤维素 (PASC) 都有一定的活性, *cbhAC* 和 *celKC* 编码的产物蛋白由于缺乏 IgD 区域, 单独表达的活性区域没有生物活性, 这与文献报道是一致的。
- (2) 在大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43NMK 的基础上, 重新构建了极大方便克隆的工具质粒 pP43JM2, pP43JM2 上有枯草杆菌自身的强启动子 P43 和中性蛋白酶信号肽 NprB 等分泌表达的元件和含有 PstI, XbaI, HindIII, XhoI 的多克隆位点。针对枯草杆菌胞外分泌的外源蛋白容易被生长后期枯草杆菌自身分泌的蛋白酶降解掉等问题, 我们选择了分别缺失了 6 个和 8 个的枯草杆菌胞外蛋白酶缺陷型菌株 WB600 和 WB800。
- (3) 将来源于热纤梭菌的外切酶基因 *cbhA*, *celK*, *celO*, *cel48Y* 和 *cel48S* 在枯草杆菌表达系统 WB600 (WB800)/pP43JM2 里进行了表达, 除了 *celO* 外, 其它 4 个外切酶都能够有效的分泌到胞外培养基中, 且以磷酸处理的微晶纤维素为底物, 都呈现出一定的活性。对于各个重组菌的生长, 枯草杆菌 WB600 要普遍优于 WB800, WB600 的细胞密度比 WB800 的细胞密度高 5%~15%, 但是对于各种重组菌, 胞外外切酶的酶活 WB800 要比 WB600 高, 对于 CbhA 和 CelK, WB800 分泌的外切酶的酶活大约比 WB600 分泌的外切酶的酶活有 30% 的提高, 而对于 Cel48Y, WB800 分泌的外切酶释放的还原糖的量是 WB600 的两倍, WB800 分泌的 Cel48S 的酶活也要比 WB600 高出约 20%。另外以培养了 24 h 的重组枯草杆菌酶活为例, CbhA 和 CelK 可以分别释放 300 mg/L 和 250 mg/L 的还原糖, Cel48Y 释放的还原糖比 Cel48S 得到的还原糖的量高出 34%, 但是只是 CbhA 释放的还原糖量的一半。
- (4) 来源于欧文氏菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*) 的内切酶 CelV, 耐热放线菌 (*Thermomonospora fusca*) 的内切酶 CelE 和热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的内切酶 CelA 在枯草杆菌表达系统 WB600 (WB800)/pP43JM2 里进行表达。对于培养了 24 h 的重组枯草杆菌, 以磷酸处理的微晶纤维素为底物, 来源于 WB800 (pP43JM2-celV) 的 CelV 可以释放高达 960 mg/L 的还原糖, 而对于 CelE 和 CelA 的生产, WB600 表达系统要优于 WB800 表达系统, WB600 分泌的 CelE 能够释放约

1100 mg/L 的还原糖的量, WB800 的 CelE 水解得到的还原糖的量约为 824 mg/L。重组菌 WB600 分泌的 CelA 水解可以生成 1324 mg/L 的还原糖, WB800 生成的糖的量则是 1117 mg/L。

- (5) 对磷酸处理的微晶纤维素, 外切酶 CbhA, Cel48Y 和 Cel48S 之间存在明显的协同作用。但是对同样的底物, 内切酶 CelA 与外切酶 CbhA 的协同效应不明显。而对于微晶纤维素 Avicel PH101 和稀酸处理的玉米秸秆, 单独使用外切酶没有检测到还原糖的生成, 单独内切酶只能生成微量的还原糖, 而 CelA 和 CbhA 的混合物却能够生成较高的还原糖的量, 其协同效应非常明显。
- (6) 对于在枯草杆菌里同时表达纤维素外切酶和内切酶, 考虑到质粒大小和枯草杆菌感受态的短暂性, 存在一定的困难。但是在同种菌里表达纤维素酶的复合物, 对于构建整合生物工艺菌种(Consolidated Bioprocessing)非常重要。所以下一步可考虑将不同的纤维素酶基因通过质粒导入和染色体整合相结合的方法, 来实现多纤维素酶基因在枯草杆菌里共表达的问题。

参考文献

- [1] So K, Brown R. Economic analysis of selected lignocellulose-to-ethanol conversion technologies[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 79(1):633-640
- [2] Pierre, Beguim. Molecular biology of cellulose degradation[J]. *Ann. Rev. Microbiol*, 1990, 44: 219-248
- [3] Tor-Magnus, Enari. Microbial cellulase. In: William M. F(ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*[M]. London and New York: Applied Science Publishers, 1983, 183-223
- [4] 贾丙志, 范运梁, 程文静. 纤维素降解菌筛选的研究进展[J]. *现代农业科技*, 2008, 21: 315-317.
- [5] Sarma, N.T.C.Bhalla. Bacteria from forest litter[J]. *India J. Microbiol*, 1992, 32:213-215
- [6] Rohrmann, S. Molitoris, HP. Screening for wood-degrading enzymes in marine fungi[J]. *Can.Bot./Rev.Can.Bot*, 1992, 70(10): 2116-2123
- [7] Sharrock K: Cellulase assay methods: a review[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1988, 17(2):81-105.
- [8] Nidetzky B, Hayn M, Macarron R, Steiner W: Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses[J]. *Biotechnology Letters*, 1993, 15(1):71-76.
- [9] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities[J]. *Biochem.J*, 1991, 280:309-316
- [10] 侯配斌. 粘细菌纤维堆囊菌降解纤维素多酶复合体的确证和性质分析[D]. 山东大学, 2006
- [11] Doi R, Kosugi A, Murashima K, Tamaru Y, Han S. Cellulosomes from mesophilic Bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 18: 5907-5914
- [12] 阎伯旭, 曲音波, 高培基. 真菌和细菌纤维素酶的差别及内外切葡聚糖苷酶的底物专一性 [J]. 1999, 11: 61-64
- [13] Ghose T. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure Appl Chem*, 1987, 59(2):257-268.
- [14] 汤懋站, 童克中, 陈慎等. 枯草杆菌转化的研究 I.受体菌株的筛选[J]. *微生物学报*, 1964, 10: 189-194
- [15] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. *Nature*, 1997, 390: 249-256
- [16] Simon M, Palva I. Protein secretion in *Bacillus* species [J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57: 109-137
- [17] 彭清忠, 张惟材, 朱厚础. 枯草杆菌表达系统的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2001, 12: 220-225
- [18] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus*

- subtilis [J]. *Mol Gen Genet*, 1988, 213: 444-448
- [19] von Heijne G, Abrahmsen L. Species-specific variation in signal peptide design, Implication for protein secretion in foreign hosts [J]. *FEBS Lett*, 1989, 244: 439-446
- [20] Bolhuis A, Tjalsma H, Smith H E. Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2934-2941
- [21] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database):D233-D238.
- [22] Aminov RI, Golovchenko NP, Ohmiya K. Expression of a celE gene from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus*[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 6: 530-537
- [23] Zhang X, Zhang Z, Zhu Z, Sathitsuksanoh N, Yang Y, Zhang Y. The noncellulosomal family 48 cellobiohydrolase from *Clostridium phytofermentans* ISDg: heterologous expression, characterization, and processivity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(2):525-533
- [24] Petit MA, Joliff G, Mesas JM, et al. Hypersecretion of a cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis* by induction of chromosomal DNA amplification[J]. *Nature Biotechnology*, 1990, 8: 559-563
- [25] Yao Q, Sun T, Chen G, Liu W. Heterologous expression and site-directed mutagenesis of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1243-1247
- [26] Morimoto T, Kadoya R, Endo K, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*[J]. *DNA Res*, 2008, 15: 73-81
- [27] Wu X, Lee W, Tran L, Wong S: Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(16):4952.
- [28] Cho H, Yukawa H, Inui M, Doi R, Wong S: Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9):5704.
- [29] Arai T, Matsuoka S, Cho H, Yukawa H, Inui M, Wong S, Doi R: Synthesis of *Clostridium cellulovorans* minicellulosomes by intercellular complementation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(5):1456.
- [30] Den Haan R, Rose SH, Lynd LR, van Zyl WH. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metab Eng*, 2007, 9: 87-94
- [31] Zhang XZ, Zhang YH. One-step production of biocommodities from lignocellulolytic

- biomass by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*: Opportunities and challenges[J]. *Eng Life Sci*, 2010, 5: 398-406
- [32] Romero S, Merino E, Bolivar F, Gosset G, Martinez A. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 5190-5198
- [33] Luria S, Delbrück M: Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus Resistance[J]. *Genetics*, 1943, 28(6):491
- [34] Johnson E, Madia A, Demain A: Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(4):1060
- [35] Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (ed.). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed [M]. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [36] Spizizen J: Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1958, 44(10):1072
- [37] Matsuno Y, Ano T, Shoda M. High-efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer by electroporation [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 4: 261-264
- [38] Zhang Y, Cui J, Lynd L, Kuangs L: A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(2):644-648
- [39] Vazana Y, Morais S, Barak Y, Lamed R, Bayer EA: Interplay between *Clostridium thermocellum* Family 48 and Family 9 Cellulases in Cellulosomal versus Noncellulosomal States[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10):3236-3243
- [40] Zverlov V, Velikodvorskaya G, Schwarz W, Bronnenmeier K, Kellermann J, Staudenbauer W: Multidomain structure and cellulosomal localization of the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(12):3091.
- [41] Berger E, Zhang D, Zverlov V, Schwarz W: Two noncellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel9I and Cel48Y, hydrolyse crystalline cellulose Synergistically[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 268(2):194-201
- [42] Wang W, Kruus K, Wu J: Cloning and expression of the *Clostridium thermocellum* celS gene in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 42(2):346-352

- [43] Kataeva I, Li X, Chen H, Choi S, Ljungdahl L: Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(17):5288-5295
- [44] Zverlov V, Velikodvorskaya G, Schwarz W: A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose[J]. *Microbiology*, 2002, 148(1):247
- [45] Makrides S: Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(3):512
- [46] Zhang X, Cui Z, Hong Q, Li S: High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(7):4101
- [47] Murashima K, Chen C, Kosugi A, Tamaru Y, Doi R, Wong S: Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(1):76.

致谢

本文是在导师鲍杰教授的指导下完成的。导师丰富的学识，精益求精的治学态度，无私的敬业精神和诲人不倦的品德使我感到发自内心的钦佩，令我受益匪浅。谨此向他致以最衷心的感谢！同时实验室辛秀娟老师在我实验过程中给予精心的指导，在遇到困难时给予莫大的鼓舞，在此表示由衷的感谢。

实验过程中感谢胡凤仙老师，董宏伟，张建，楚德强师兄的指导，也得到王远，孟郊，黄潇，张怀庆，王玉梅等众多师兄弟的帮助，在此一并致谢！