

学校代码: 10251

学 号: 030090404

華東理工大學

硕 士 学 位 论 文

题 目 耐热内切葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶基因的克隆
及其在枯草杆菌中的共表达

专 业 生物化学与分子生物学

研究方向 生物质能源

姓 名 王远

导 师 辛秀娟 副教授 鲍杰 教授

定稿时间: 2012 年 4 月 10 日

分类号: TQ925 _____ 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学

学位论文

耐热内切葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶基因的克隆
及其在枯草杆菌系统中的共表达

王远

指导教师姓名: 辛秀娟 副教授 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化学与分子生物学

论文定稿日期: 2012-4-10 论文答辩日期: 2012-5-17

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: 魏东芝 教授

评 阅 人: 李新良 研究员

钱江潮 研究员

作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，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

耐热内切葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及其在枯草杆菌中的共表达

摘要

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)作为一种革兰氏阳性菌, 营养需求简单、而且生长快, 可以利用己糖和戊糖, 并具有高效的蛋白分泌能力, 其细胞壁不含内毒素, 无致病性等多种优点, 是生物炼制工业中很有潜力的菌种。将纤维素酶各组分的基因在枯草杆菌中进行分泌型共表达, 对降低生物炼制过程中纤维素酶的使用成本具有重要意义。

本研究首先在枯草杆菌 WB800(WB600)/pMA5 表达系统中, 表达了来自多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)的 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因, 重组菌能够在以纤维二糖为唯一碳源的培养基中生长。另外, 利用克隆有枯草杆菌中性蛋白酶 NprB 信号肽的 pP43JM2 穿梭质粒作为表达载体, 在枯草杆菌 WB800 中分别表达了来自多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因, 并且 *bglB* 基因在枯草杆菌 WB800 中实现了分泌型表达。本研究还将来源于热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 的耐热内切葡聚糖酶 *celA* 基因分别与 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因串联在穿梭载体 pP43JM2 上, 在枯草杆菌 WB800 中进行共表达。结果表明, 内切葡聚糖酶 *celA* 基因与 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因能够在枯草杆菌 WB800 中的共表达。其中, 内切葡聚糖酶 *celA* 和 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 能被分泌到发酵液中, 实现了分泌型共表达。而 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 虽然不能被分泌到胞外, 但在胞内能检测到较强的纤维二糖酶酶活。在枯草杆菌系统中实现纤维素酶各组分基因的共表达, 为构建能生产生物基化学产品和生物质能源炼制的生物菌种方面奠定了一定的实验基础。

关键词: 枯草杆菌; 内切葡聚糖酶基因 *celA*; β -葡萄糖苷酶基因; 胞外分泌; 共表达

Cloning and Coexpression of Thermostable Endoglucanase Gene and β -Glucosidase Genes in *Bacillus subtilis*

Abstract

Bacillus subtilis, a gram-positive bacterium, is considered to be a potential strain in the biorefinery with numerous advantages, such as low-nutrient requirement, growing fast, using hexose and pentose, efficient protein secretion ability, no endotoxin in cell wall, industrial safety, etc. The secretory coexpression of multiple cellulase genes in *B.subtilis* is important to reduce the cost of cellulase using in the biorefinery industrial.

In this study, *bglA* gene from *Bacillus polymyxa* encoding β -glucosidases was cloned into pMA5 and expressed in *B.subtilis* WB600 and WB800. The recombinant strain can grow well in the medium that cellobiose as its only carbon source. In order to realize the secretory expression of cellulase genes, the pP43JM2 shuttle vector which carrying NprB signal peptide of the *B.subtilis* neutral protease was used as the expression vector for expressing the *bglA* and *bglB* genes from *Bacillus polymyxa* encoding β -glucosidases in *B.subtilis* WB800, respectively. The results showed that the *bglB* gene was expressed and secreted into the broth. Cellulase is a kind of multiple enzymes system and requires synergistic effect among various cellulase components, so the secretory coexpression of cellulase genes in *B.subtilis* is beneficial to the high cellulose degradation. In order to realize the secretory coexpression of cellulase genes, the recombinant plasmids harboring the *celA* gene from *Clostridium thermocellum* encoding endoglucanase and the *bglA*, *bglB* genes encoding β -glucosidases were constructed, respectively, and then transformed into *B.subtilis* WB800. The results showed that the coexpression of these enzymes was viable in *B.subtilis* WB800. The endoglucanase and the β -glucosidases encoded by *bglB* were secreted into the culture broth successfully, while the β -glucosidases encoding by *bglA* was not and a high intracellular cellobiase activity of *bglA* was detected. Efficient coexpression of cellulase enzymes into *B.subtilis* paved the way of constructing consolidated bioprocessing strains for bulk chemicals or bioenergy production economically.

Keywords: *Bacillus subtilis*; endoglucanase; β -glucosidase; extracellular secretion; coexpression

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 生物质能源的开发.....	1
1.2 木质纤维素简介.....	2
1.3 木质纤维素的生物炼制.....	3
1.4 纤维素降解微生物.....	3
1.5 纤维素酶系及其协同机制.....	4
1.6 纤维素酶活力表征.....	5
1.6.1 单一纤维素酶组分酶活测定.....	5
1.6.2 总酶活力的测定.....	5
1.7 枯草杆菌表达系统概述.....	6
1.8 纤维素酶在枯草杆菌中的表达.....	8
1.9 课题的研究内容与意义.....	9
第 2 章 材料与方法.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 菌种和质粒.....	10
2.1.2 主要试剂.....	11
2.1.3 实验仪器.....	12
2.1.4 培养基, 培养条件及主要溶液的配制.....	13
2.2 实验及分析方法.....	14
2.2.1 基因组 DNA 的制备和质粒抽提.....	14
2.2.2 目的基因的克隆.....	15
2.2.3 大肠杆菌 DH5 α 感受态的制备和转化.....	18
2.2.4 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体重组质粒的构建.....	19
2.2.5 重组质粒在大肠杆菌中的 PCR 鉴定.....	21
2.2.6 重组质粒在大肠杆菌中的酶活鉴定.....	21
2.2.7 枯草杆菌化学感受态的制备和转化.....	22
2.2.8 枯草杆菌重组菌的鉴定和培养.....	22
2.2.9 枯草杆菌 WB800(WB600)生长曲线的制作.....	23
2.2.10 重组菌对纤维二糖的利用.....	23

2.2.11 重组枯草杆菌的酶活测定	24
第 3 章 实验结果与讨论	28
3.1 多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 <i>bglA</i> 的克隆及其在枯草杆菌中表达	28
3.1.1 β -葡萄糖苷酶基因 <i>bglA</i> 的克隆	28
3.1.2 pMA5- <i>bglA</i> 重组质粒的构建	29
3.1.3 重组质粒 pMA5- <i>bglA</i> 在枯草杆菌中的表达	31
3.2 多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 <i>bglA</i> 的克隆及其在枯草杆菌中的分泌型表达 ...	33
3.2.1 <i>bglA</i> 基因的克隆	33
3.2.2 pP43JM2- <i>bglA</i> 重组表达质粒的构建	34
3.2.3 重组质粒 pP43JM2- <i>bglA</i> 在枯草杆菌中的分泌表达	36
3.3 多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 <i>bglB</i> 的克隆及其在枯草杆菌中的分泌型表达 ...	38
3.3.1 β -葡萄糖苷酶基因 <i>bglB</i> 的克隆	38
3.3.2 pP43JM2- <i>bglB</i> 重组表达质粒的构建	39
3.3.3 重组质粒 pP43JM2- <i>bglB</i> 在枯草杆菌中的分泌型表达	40
3.4 耐热内切葡聚糖酶 <i>celA</i> 与 β -葡萄糖苷酶 <i>bglA</i> 基因在枯草杆菌中的共表达	41
3.4.1 <i>celAbglA</i> 共表达基因的克隆	41
3.4.2 pP43JM2- <i>celAbglA</i> 重组表达载体的构建	42
3.4.3 重组质粒 pP43JM2- <i>celAbglA</i> 在枯草杆菌中的分泌型共表达	43
3.4.4 <i>bglAcelA</i> 共表达基因的克隆	45
3.4.5 pP43JM2- <i>bglAcelA</i> 重组表达载体的构建	46
3.4.6 重组质粒 pP43JM2- <i>bglAcelA</i> 在枯草杆菌中的分泌型共表达	47
3.5 耐热内切葡聚糖酶 <i>celA</i> 与 β -葡萄糖苷酶 <i>bglB</i> 基因在枯草杆菌中的分泌型共表达	48
3.5.1 <i>celAbglB</i> 共表达基因的克隆	48
3.5.2 pP43JM2- <i>celAbglB</i> 重组表达载体的构建	49
3.5.3 重组质粒 pP43JM2- <i>celAbglB</i> 在枯草杆菌中的分泌型共表达	50
3.5.4 <i>bglBcelA</i> 共表达基因的克隆	51
3.5.5 pP43JM2- <i>bglBcelA</i> 重组表达载体的构建	52
3.5.6 重组质粒 pP43JM2- <i>bglBcelA</i> 在枯草杆菌中的分泌型共表达	53
3.6 内切葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶基因在枯草杆菌中的共表达及酶活比较	54
第四章 结论与展望	58
参考文献	60
致谢	64

第 1 章 文献综述

1.1 生物质能源的开发

人们对石油等化石能源的过度开采,使得化石能源储备日益枯竭,而且对化石能源的大量开采和消费也造成了一系列的生态环境破坏和气候持续恶化问题。然而,经济和社会的发展对能源的需求越来越大,对不可再生的化石能源的依赖程度也越来越高,导致石油价格居高不下,石油危机周期性爆发,影响了世界政治格局。我国煤炭储量丰富而石油资源严重不足的,石油依赖进口,据统计,我国的石油消费对外的依存度从 2006 年的 47.3%,到 2008 年已超过 50%,预计到 2020 年会高达 60%-70%^[1]。随着化石能源被大量消耗,也给环境带来了很大的破坏,汽车尾气的大量排放和燃煤等造成酸雨大面积形成和城市大气严重污染,在 2007 年世界碳总排放量中,我国 CO₂ 排放量达 60 亿吨,占 21%^[2]。能源问题是否能很好的解决或改善已经关系到我国环境、社会、经济的可持续发展,甚至外交策略和国家安全。

生物质是指一切可再生的生物有机资源,包括工业有机废弃物、水生植物、农林业作物及废弃物、城市有机垃圾等。生物质能是指利用这些生物质所产生的能量,它具有可运输、可转化成液态燃料和可储存的特点,在可再生能源中占有重要地位。生物炼制是指以可再生生物质为原料来生产生物基化学品和生物能源的一种工业的新型生产模式。

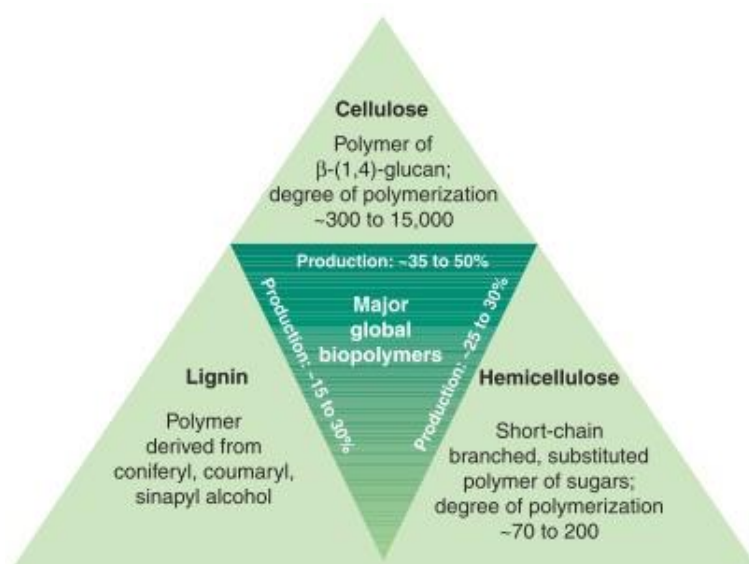


图 1.1 全球的生物质资源主要来源^[3]

Fig.1.1 Key global biomass resources. from herbaceous energy crops, wood, and agricultural residues

全球的可再生性生物资源分布极泛,而且产量极大(图 1.1),如何利用好这些生物质资源也成为了世界各国共同研究与关注的热点。

生物乙醇是一种环保可再生的液态燃料，被认为是最有潜力的可再生车用替代燃料之一，它有极好抗爆性能，能与汽油任意比互溶，并增加汽油内氧以促进充分燃烧，能现有的发动机上直接使用。第一代生物乙醇的原料来源以小麦、玉米等粮食作物为主，生产工艺已经十分成熟，但是因为“与畜争食”、“与人争粮”而引发了很多争议，我国也已经不再批准以粮食为工业原料来源的生物乙醇的生产了。我国有着数量巨大和广泛分布的生物质资源，每年农作物弃用秸秆的量可达 7 亿吨，木质林业弃物的量达 2 亿吨^[4]，而对这种木质纤维素资源的利用率却是极低，多被自然腐烂或焚烧。第二代生物乙醇就是以这些弃用的纤维质等为原料来源生产纤维素乙醇，克服了第一代生物乙醇的不足，成为现代生物能源的重要发展趋势。

1.2 木质纤维素简介

木质纤维素是植物细胞壁的重要组成成分，是地球上数量巨大而且价廉的可再生的生物质资源，它由木质素、半纤维素和纤维素三个部分组成。木质素(lignin)是一种结构致密、坚固的高分子聚合物，由碳碳键将其结构单元苯基丙烷连接组成，它主要分布在木本植物的导管、纤维和管胞中，构成了细胞壁中十分坚固的抗压支架；半纤维素(hemicellulose)是一种结构松散但较复杂的多聚糖，由一些分枝较高、短的糖如木糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖等组成，其具体成分随原料不同差异较大，但一般来说，木糖会占其组成的大部分；纤维素(cellulose)是一种直链多糖，由 β -1,4-糖苷键将葡萄糖残基连接并通过氢键使其平行地缔结为原纤丝，再通过一定次序排列组合为微纤丝，从而进一步形成大纤丝，它结构复杂、牢固，不易降解。如图 1.2 所示，木质素与半纤维素通过共价键连接并覆盖在平行排列的纤维素分子周围交联成复杂网络。

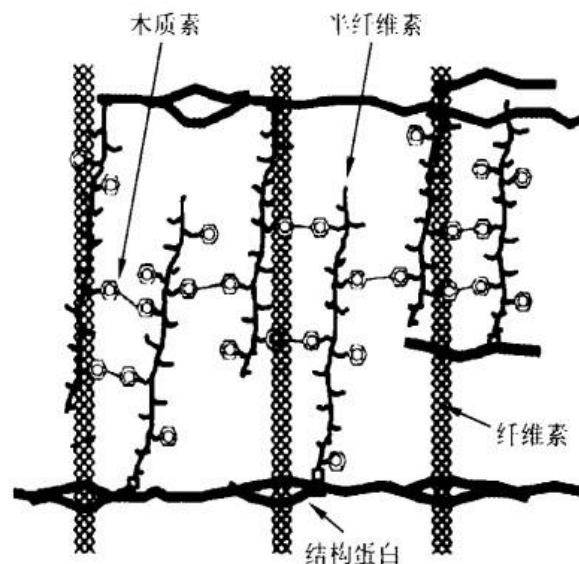


图 1.2 木质纤维素结构示意图^[5]

Fig.1.2 The structure of lignocellulose

1.3 木质纤维素的生物炼制

木质纤维素原料中各组分在含量上有一些差异，如：在玉米秸秆中，半纤维素 35%，木质素 15%，纤维素 45%；在玉米芯中，半纤维素 27%，木质素 8%，纤维素 43%；在麦秆中，半纤维素 50%，木质素 15%，纤维素 30%；在高粱秆中，半纤维素 24%，木质素 25%，纤维素 35%^[6]。由于木质纤维素结构复杂而且牢固，现阶段还无法直接对其利用，所以在生物炼制工业中，需要先对木质纤维素进行预处理，打破其抗降解的坚固结构，使纤维素酶能够对它进行水解得到单糖，再通过微生物发酵得到人们所需的产品，以木质纤维素为原料的生物炼制流程如图 1.3 所示，对纤维质原料预处理和糖化过程中使用纤维素酶的花费占在整个过程中所需成本的大部分。

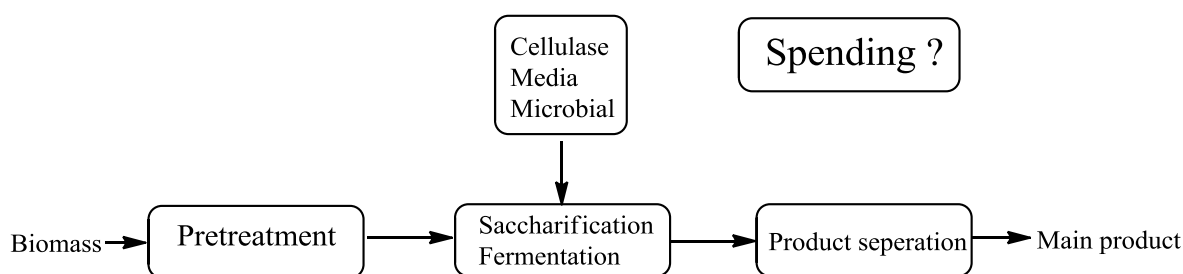


图 1.3 纤维素原料炼制流程

Fig1.3 The biorefinary process from lignocellulose

1.4 纤维素降解微生物

在自然界中有很多微生物都能对植物及其残体进行分解，这种碳循环过程对整个生物圈乃至全球的物质循环至关重要。这些微生物之所以能够利用纤维素物质是因为它们都能分泌纤维素酶，在表 1.1 中列举了这些微生物的主要分类^[7, 8, 9, 10]。

表 1.1 产纤维素酶微生物分类

Table1.1 Classification of microorganism producing cellulase

微生物种类	主要菌属	有较多研究的菌种
真菌 (Fungi)	青霉属 (<i>Penicillium</i>)	如细小青霉、斜卧青霉、绳状青霉、变色青霉等
	木霉属 (<i>Trichoderma</i>)	如康氏木霉、绿色木霉、里氏木霉等
	曲霉属 (<i>Aspergillus</i>)	如黑曲霉、土曲霉、米曲霉等
	漆斑霉属 (<i>Myrothecium</i>)	如疣孢漆斑霉等

细菌 (<i>Bacteria</i>)	厌氧性细菌，在垃圾处理和堆肥中常见，如嗜热厌氧菌，包括热纤梭菌、嗜热堆肥梭菌、嗜纤维梭菌等
	好氧性细菌，能够较好地利用中性或微碱性土壤中的纤维素物质，如假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)、纤维弧菌属(<i>Cellvibrio</i>)、纤维单胞菌属(<i>cellulomonas</i>)等
	瘤胃细菌，如黄化瘤胃球菌、产琥珀拟杆菌、白色瘤胃细菌、小生纤维梭菌、溶纤维丁酸弧菌、小瘤胃杆菌等
放线菌 (<i>Actinomyces</i>)	如小单孢菌属(<i>Micromonospora</i>)、诺卡氏菌属(<i>Nocardia</i>)、高温放线菌属(<i>Thermoactinomyces</i>)、节杆菌(<i>Arthrobacter</i>)、和链霉菌属(<i>Streptomyces</i>)等

1.5 纤维素酶系及其协同机制

几乎没有一种单组分纤维素酶能将结构复杂的天然纤维素降解，纤维素酶是多种酶的复合体系，一般有三种组分^[11]：(1) 内切- β -1,4-葡聚糖酶也称 EG 或 C1 酶(endo- β -1,4-D-glucanase, EC 3.2.1.4)；(2) 外切- β -1,4-葡聚糖酶也称 CBH，纤维二糖水解脱酶或 C_X 酶(exo- β -1,4-D-glucanase, EC 3.2.1.91)；(3) β -葡萄糖苷酶也称 BG 或纤维二糖酶(β -1,4-glucosidase, EC 3.2.1.21)。

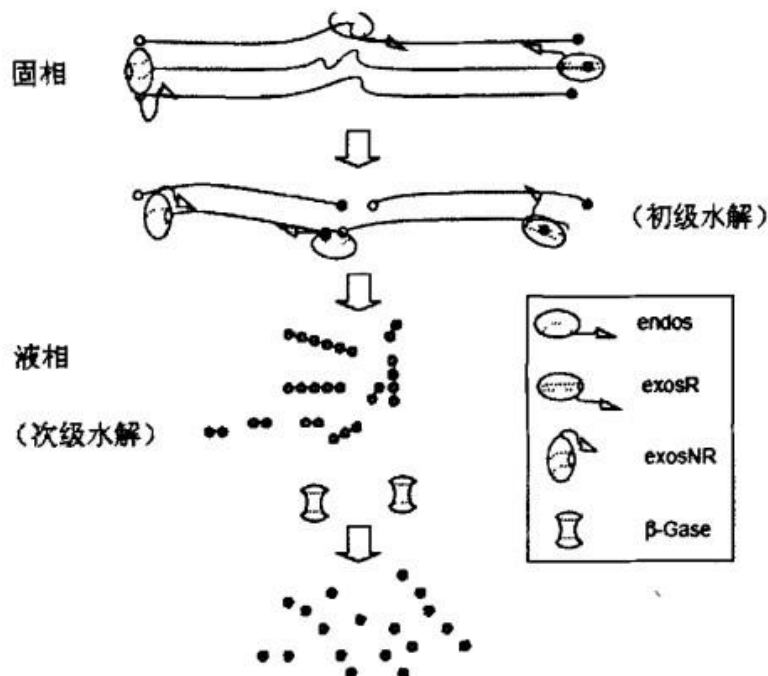


图 1.4 降解纤维素底物模式图

Fig 1.4 Mechanistic scheme of enzymatic cellulose hydrolysis

因为纤维素底物在结构和成分上的差异，纤维素降解菌分泌纤维素酶的组分以及其含量和比例也各有差别。协同作用是指多种纤维素酶组分在混合作用时，要比各酶组分单

独作用于纤维素底物时的酶活力的总和要高的一种现象^[12]。将纤维素结晶完全降解是一个极复杂的过程，需要各纤维素酶组分协同并持续地起作用，纤维素降解机制如图 1.4 所示^[13, 14]，内切葡聚糖酶通过随机水解纤维素链内部的 β -1,4-糖苷键，使其聚合度变低，同时产生的大量还原端和非还原端也给外切葡聚糖酶提供了更多与纤维素链的作用位点，两者水解作用产生的可溶的短链纤维寡糖及纤维二糖等中间产物被 β -葡萄糖苷酶水解生成葡萄糖，解除了中间产物的存在对外切或内切葡聚糖酶的抑制作用^[15]，纤维素酶系水解纤维素底物的这三个步骤几乎同时进行，直至将不溶性纤维素底物完全降解并释放出葡萄糖。

1.6 纤维素酶活力表征

由于纤维素酶系的复杂性及其作用机理尚不完全清楚，以及纤维素质地的物质不均一性和纤维素酶体系在专一的固体底物表面的复杂性(协同作用和竞争作用)，给酶活分析带来了一些挑战，人们也总结了许多测定酶活的方法^[16, 17, 18]，一般根据水解后生成产物的量或消耗底物的量来对纤维素酶活力进行表征，表征方法有测定单一纤维素酶组分的酶活力或纤维素酶的总酶活力。

1.6.1 单一纤维素酶组分酶活测定

1.6.1.1 外切葡聚糖酶酶活力测定方法

通常使用微晶纤维素 PH-105、PH-101 底物，也有使用再生非结晶纤维素 RAC 底物，或对微晶纤维素进行磷酸处理后的 PASC 底物等来测定外切葡聚糖酶酶活力。

另外，一些发色的纤维寡糖如 4-methylumbelliferyl- β -D-lactoside，对硝基苯纤维二糖苷 PNPC 底物 (p-nitrophenyl- β -D-cellobioside)等也常作为测定外切葡聚糖酶酶活力的底物，其特点是检测灵敏。

1.6.1.2 内切葡聚糖酶酶活力测定方法

用羧甲基纤维素 CMC/粘度测定或者用磷酸处理的微晶纤维素底物等来测定内切葡聚糖酶酶活力的方法较为普遍。

也用高压液相色谱 (HPLC)的分析方法或薄层层析 (TLC) 来检测内切葡聚糖酶酶与 methylumbelliferyl- β -D-glucosidases, p-nitrophenyl glucosides 等水溶纤维寡糖底物反应后的变化用于表征其酶活力。另外，基于染料释放半定量的刚果红染色法也常用于产内切葡聚糖酶的菌株的高通量筛选。

1.6.1.3 β -葡萄糖苷酶酶活力测定方法

可以被用于测定其酶活力的底物有很多：水溶的纤维二糖、水杨苷或发色荧光底物如对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷 pNPG (p-nitrophenyl- β -D-glucosidase)等，其中，pNPG 方法是一种初始反应速率分析方法。

1.6.2 总酶活力的测定

总酶活是用不溶性的底物进行测定，不溶底物包括纯的纤维底物，比如 Whatman No.

1 滤纸、细菌纤维素、棉线、海藻纤维素、微晶纤维素等；也包括含纤维素的底物，比如 α -纤维素、干的纤维素以及预处理过的木质纤维素^[15]。

目前,比较被认可的纤维素酶总酶活力的测定方法是在 1987 年 IUPAC (International Union Of Pure and Applied Chemistry)公布的滤纸酶活 FPA 法^[19]。为了让纤维素的结晶与非结晶区都能水解,该方法要求在 1 h 内催化 50 mg 的 Whatman No. 1 滤纸条得到 2 mg 的葡萄糖。由于固体底物的不同,水解过程中还原糖收率和实验混合物中的纤维素酶的量不是线性关系。就意味着,在相同时间内,将酶量扩大一倍并不能使还原糖收率增大一倍。总酶活被描述为每毫升原始酶(未稀释)溶液的滤纸单位(FPU)。这个方法长处在于:(1) 可以运用各种底物;(2) 底物和纤维素酶活的比较容易关联。然而,长期以来,FPA 方法被认为操作复杂并且容易出错^[20]。

还有一种方法是用微晶纤维素作厌氧纤维素酶分析,从厌氧环境下分离得到的一些纤维素酶和纤维小体需要还原剂和金属离子的存在(比如钙离子),以发挥其最大的水解能力,例如从嗜热厌氧细菌 *Clostridium thermocellum* 中得到的纤维小体。Johnson^[21]等建立了基于 0.6g/L 微晶纤维素(FMC RC-591)变化趋势的浊度分析方法,其为微晶纤维素和羧甲基纤维素钠的混合物,但是结果通常变化很大。基于对初始水解阶段可溶性糖释放的测定方法进行修改后用于厌氧纤维小体的酶活分析^[22, 23]。

1.7 枯草杆菌表达系统概述

人们对枯草杆菌表达系统的研究可以说是从 1958 年开始的,因为发现了可转化的枯草杆菌 168 菌株^[24],这个重要发现极大的促进了枯草杆菌遗传学方面工作的开展。随后在 1964 年,汤樊竑等^[25]在进行多种枯草杆菌菌株的转化研究时筛选到一株可转化的枯草杆菌菌株 Ki-2,再通过紫外诱变得得到多种突变体,其中 Ki-2-132 是高频可转化的菌株。但是人们在枯草杆菌中一直找不到可以自主复制的质粒直到在金黄色葡萄球菌中发现一种带抗性标记的小质粒可以以滚环的方式进行复制,这一重要发现突破了枯草杆菌中只有隐秘型质粒的发展瓶颈。人们对枯草杆菌 168 菌株的全基因组序列的测序工作全面展开,在 1997 年已完成,这项工作的完成极大推动了人们对枯草杆菌在基因工程等各领域方面的研究^[26]。

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)是好氧的,嗜中温的细菌,属革兰氏阳性菌,作为表达系统它有众多优点^[27]:对营养需求简单、而且生长很快,能够利用己糖和戊糖,并具有高效的蛋白分泌能力,其细胞壁不含内毒素,安全无致病性等。它在酶制剂生产等领域有着广泛应用,也是生物炼制工业中很有潜力的菌种。然而,它也存在一些不足^[28],比如其质粒稳定性较差,能形成感受态的菌株不多且转化效率有限,大量胞外蛋白酶的分泌易造成外源蛋白的降解等,其中外源蛋白被降解的问题已经通过对几个胞外蛋白酶基因的敲除(如枯草杆菌 WB600, WB800 菌株等)而得到了很好的解决。

一般认为枯草杆菌表达系统中存在 3 种类型的表达质粒^[29, 30]:自主复制质粒,其带抗性标记,能以滚环方式复制,拷贝数高等,缺点是质粒容易丢失;整合型质粒,能将外源

基因整合到枯草杆菌中，整合方式主要有非常规整合、同源序列整合两种，如金黄色葡萄球菌 pE194 质粒是一个温度敏感质粒，它有一个由温度调控的复制子，环境温度合适时，该质粒能在枯草杆菌中自主复制，并通过多个位点进行整合；温度升高时（高于 45℃），复制子不能进行复制，用选择抗性标记的平板可以将成功的整合体筛选出来^[31]；噬菌体，其代表有 sppl 噬菌体、 $\Phi 105$ 噬菌体等。

大肠杆菌(G^-)和枯草芽孢杆菌(G^+)在表达和分泌外源蛋白时，在大肠杆菌中很难将外源蛋白分泌胞外，而在枯草杆菌中能较容易实现外源蛋白的胞外表达，两者不同的性质可能是因为它们各自细胞膜结构的不同而导致（如图 1.5），大肠杆菌通常会将蛋白释放到周质空间中（在两层细胞膜之间），但枯草杆菌在表达外源蛋白时，分泌蛋白跨过一层细胞膜后便可以直接释放到培养基中。

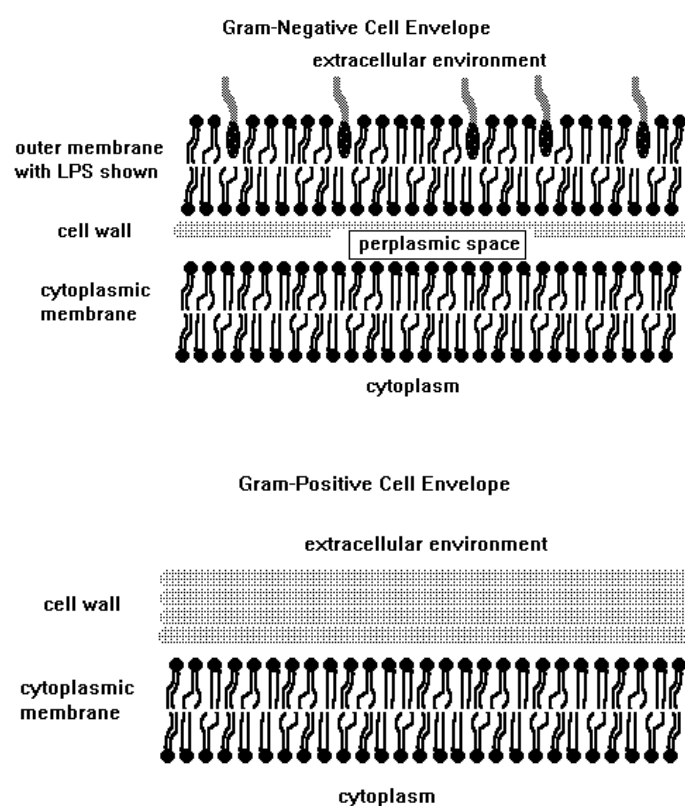


图 1.5 G^- 菌的细胞壁同 G^+ 菌的细胞壁的差异

Fig 1.5 The differences of cell wall between Gram-positive and Gram-negative bacteria

枯草杆菌中的这种独特的分泌蛋白质的方式主要是通过 Tat 和 Sec 途径来进行对分泌蛋白的跨膜运输的^[32]（如图 1.5）。

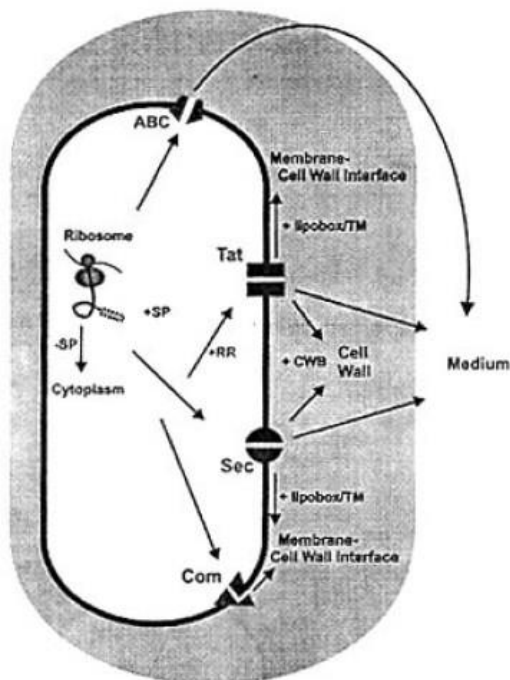


图 1.5 在枯草杆菌中的蛋白分泌途径

Fig 1.5 Protein export pathways in *Bacillus subtilis*.

1.8 纤维素酶在枯草杆菌中的表达

枯草杆菌本身能分泌多种糖基水解酶，如 α -淀粉酶，支链淀粉酶， β -1,4-内切木聚糖酶， 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，等，它们能够降解多糖，但是不能降解纤维素。枯草杆菌 168 菌株无法在 M9 基础培养基上以结晶纤维素或大孔纤维素为唯一碳源进行生长。在枯草杆菌中表达纤维素酶基因一般可以通过质粒导入或染色体整合这两种方法实现。通过质粒导入时要考虑质粒的稳定性和抗生素的使用等情况，用染色体整合方法时要考虑到影响目的基因表达的一些因素，如目的基因的拷贝数，转率和翻译元件的有效性等。

虽然自然界中有很多微生物能够利用纤维素，但是在重构纤维素酶产生菌时仍然有很多困难，往往需要考虑到很多问题，如纤维素酶需要分泌到胞外才能降解底物，也可以通过在细胞膜上进行表面展示；纤维素酶是一种复合酶，需要对其多组分进行融合表达；纤维素酶之间的协同作用复杂，其配比的不同会影响降解效果；纤维素酶的合成需要细胞内有足够的 ATP 等。对于纤维素酶的生产，选择合适的宿主尤为重要。枯草杆菌因为有着高效的胞外蛋白分泌性能和良好的基因表达及发酵基础，从而引起了人们的广泛关注。

到目前为止，人们已经对在枯草杆菌中分泌表达纤维素酶方面进行了研究。Petit^[33]将来自 *Clostridium thermocellum* 的耐热内切葡聚糖酶基因 *celA* 都在 *B.subtilis* *sacU*^h 中表达并能被分泌到培养基中；Yao^[34]将突变后的内切葡聚糖酶 *celA* 在 *B.subtilis* 中也进行了分泌表达；Aminov^[35]将来自 *Clostridium thermocellum* 的内切葡聚糖酶基因 *celE* 在产孢

子的 *B.subtilis* 1A718 菌种中进行表达, 并在发酵液上清能够检测到较高的 CMC 酶活; Zhang^[36]将来自 *Clostridium phytofermentans* 的糖苷水解酶 48 家族中的外切葡聚糖酶 *cpcel48* 基因在 *B.subtilis* 中进行了分泌表达; Cho^[37]将微脚手架蛋白的 *mini-CbpA1* 和来自 *Clostridium cellulolyticum* 的内切葡聚糖酶 *EngB* 在枯草杆菌 WB800 中进行共表达研究, 在体外得到了有活性的纤维小体。Arai^[38]将来自 *Clostridium cellulovorans* 的编码微脚手架蛋白的 *minicbpA* 基因, 编码木聚糖酶 *xynB* 基因和内切葡聚糖酶基因 *engB* 都分别在枯草杆菌中进行了克隆和表达, 再对两种不同的重组枯草杆菌进行共培养, 能够在发酵液中分别检测出有活性的微纤维小体 *miniCbpA-XynB* 或 *miniCbpA-EngB*。Romero^[39]在枯草杆菌中表达了转氢酶和来源于 *Zymomonas mobilis* 的 *pdC* 和 *adhB*, 并敲除了 *alsS* 基因, 破坏了 2,3-丁二醇的生成, 重构后的枯草杆菌的乙醇产量能达 8.9 g/L。Liu^[40]将来自 *Clostridium thermocellum* 热纤梭菌的几个耐热外切葡聚糖酶基因和内切葡聚糖酶基因分别在枯草杆菌 WB800(WB600)中实现了分泌型表达。Zhang^[41]认为枯草杆菌是极具潜力构建 CBP 整合生物工艺平台的菌株, 并且他构建出了可分解纤维素的重组枯草杆菌, 其在厌氧条件下能够利用纤维素生产乳酸, 产量为 4.1 g/L。

1.9 课题的研究内容与意义

本文将来源于多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)的 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因在枯草杆菌系统里分别进行了表达研究, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 不能被分泌到胞外, 其胞内粗酶液对纤维二糖底物有较高的 β -葡萄糖苷酶酶活, 重组枯草杆菌 WB800(pMA5-*bglA*)能够利用培养基中的纤维二糖, 并能在以纤维二糖为唯一碳源的培养基中生长, β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因在枯草杆菌 WB800 中实现了胞外的分泌型表达。本文还将来源于热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)的耐热内切葡聚糖酶 *celA* 基因分别与 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因串联并在枯草杆菌表达系统 WB800/pP43JM2 中进行分泌型共表达研究。在重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglA*)和 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)胞内, 内切葡聚糖酶 *celA* 和 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 都有表达, 并且内切葡聚糖酶 *celA* 还被有效地分泌到了培养基中。在重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglB*)和 WB800(pP43JM2-*bglBcelA*)中, 都实现了内切葡聚糖酶 *celA* 和 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 的分泌型共表达

构建能够降解纤维素的枯草杆菌往往需要胞外分泌表达多种纤维素酶组分, 包括内切葡聚糖酶, 外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶。本课题对纤维素酶基因在枯草杆菌表达系统里的分泌型共表达研究为构建用于生物质能源炼制的整合生物工艺菌种奠定了一定的实验基础。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌种和质粒

菌株 *Bacillus polymyxa* 1.794 来自中国普通微生物保藏中心 (CGMCC), *Bacillus subtilis* WB600 和大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pMA5^[41]为中科院上海植生所杨晟教授惠赠, *Bacillus subtilis* WB800 和大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43NMK^[43]为美国弗吉尼亚理工大学张以恒教授惠赠, pP43JM2 穿梭质粒是本实验室在对 pP43NMk 质粒进行改造后获得。

表 2.1 本研究所涉及的菌株和质粒

Table 2.1 Strains and plasmids in this study

菌株/质粒	特性 ^a	来源/参考文献
Strain/Plasmids	Features ^a	Source/reference
<i>E. coli</i> DH5 α	F, <i>phoA</i> supE44 Δ lac U169 <i>relA1</i> ϕ 80lacZ Δ M15 <i>endA1</i>	Stored in the lab
<i>B. subtilis</i> WB600	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>bpr</i> , <i>epi</i> , <i>nprB::bsr</i> , <i>mpr::ble</i> ,	Sui-Lam Wong
<i>B. subtilis</i> WB800	<i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>bpr</i> , <i>epi</i> , <i>mpr::ble</i> , Δ <i>vpr</i> , <i>nprB::bsr</i> , <i>wprA::hyg</i> .	Sui-Lam Wong
<i>Bacillus polymyxa</i> 1.794		CGMCC
pUC19	克隆载体, <i>Ori</i> (pMB1 mutant), MCS, <i>lacZα</i> , <i>amp^r</i> .	Stored in the lab
pMA5	表达载体 (空载), <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, <i>Km^r</i> .	[42]
pP43NMK	表达载体, <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, <i>Km^r</i> .	[43]
pP43JM2	表达载体 (空载), <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector, <i>Km^r</i> .	Stored in the lab
pP43JM2- <i>celA</i>	Express <i>celA</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	Stored in the lab
pUC19- <i>bglA</i>	Plasmid with <i>bglA</i> subcloned into pUC19, <i>amp^r</i> .	In this study
pUC19- <i>bglB</i>	Plasmid with <i>bglB</i> subcloned into pUC19, <i>amp^r</i> .	In this study
pMA5- <i>bglA</i>	Express <i>bglA</i> in <i>B. subtilis</i> with HpaII promoter, <i>Km^r</i> .	In this study
pP43JM2- <i>bglA</i>	Express <i>bglA</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	In this study
pP43JM2- <i>bglB</i>	Express <i>bglB</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	In this study
pP43JM2- <i>celAbglA</i>	Express <i>celAbglA</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	In this study
pP43JM2- <i>celAbglB</i>	Express <i>celAbglB</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	In this study
pP43JM2- <i>bglAcelA</i>	Express <i>bglAcelA</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	In this study
pP43JM2- <i>bglBcelA</i>	Express <i>bglBcelA</i> in <i>B. subtilis</i> with P43 promoter, <i>Km^r</i> .	In this study

^a 各质粒功能: pMA5 为大肠杆菌-枯草杆菌的空白穿梭质粒; pMA5-*bglA* 为在 pMA5 上克隆有

β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 的重组质粒; pP43JM2 为大肠杆菌-枯草杆菌的空白穿梭质粒; pP43JM2-*bglA* 为在 pP43JM2 上克隆有 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 的重组质粒; pP43JM2-*bglB* 为在 pP43JM2 上克隆有 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 的重组质粒; pP43JM2-*celA* 为在 pP43JM2 上克隆有内切葡聚糖酶基因 *celA* 的重组质粒; pP43JM2-*celAbglA* 为在 pP43JM2 上克隆有 *celAbglA* 双基因的重组质粒; pP43JM2-*celAbglB* 为在 pP43JM2 上克隆有 *celAbglB* 双基因的重组质粒; pP43JM2-*bglAcelA* 为在 pP43JM2 上克隆有 *bglAcelA* 双基因的重组质粒; pP43JM2-*bglBcelA* 为在 pP43JM2 上克隆有 *celBbglA* 双基因的重组质粒。

2.1.2 主要试剂

2.1.2.1 酶类

限制性内切酶、*Pfu* DNA 聚合酶

Fermentas 公司

T₄DNA 连接酶、Premix Taq

日本 TaKaRa 大连分公司;

2.1.2.2 试剂盒

细菌基因组抽提

美国 Omega 生物工程公司

质粒抽提

上海捷瑞生物工程公司

DNA 胶回收

上海捷瑞生物工程公司

PCR 产物纯化

上海生工生物工程公司

葡萄糖试剂盒

上海科欣生物技术研究所

2.1.2.3 药品试剂

DNA 分子量标准品

日本 TaKaRa 大连分公司

蛋白质的分子量标准品

日本 TaKaRa 大连分公司

溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)

美国 Omega 生物工程公司

十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate, SDS)

美国 Omega 生物工程公司

异丙基- β -D-巯基半乳-吡喃糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside, IPTG)

美国 Omega 生物工程公司

Tris-(hydroxymethyl) aminomethane, Tris base

美国 Omega 生物工程公司

对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP)

比利时 Acros Organics 化学公司

西班牙琼脂糖(Biowest, Spain)

微晶纤维素(AVICEL, PH-101 NF)

美国 CHINEWAY 公司

5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-gal)

北京天根公司

胰蛋白胨(Tryptone)和酵母提取物(Yeast extract)

英国 Oxoid 有限公司

和酵母提取物(Yeast extract)

英国 Oxoid 有限公司

酪蛋白水解物(casein hydrolyzate acid)

GENeray BioTech 公司

对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-glucosidase, pNPG)

上海宝曼生物公司(进口分装)

D-(+)-纤维二糖	上海瀚鸿化工科技公司
牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)	北京普博欣生物公司
氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp)	北京普博欣生物公司
卡那霉素 (Kanamycin, Kan)	北京普博欣生物公司
琼脂粉(Agar)	北京普博欣生物公司
其他试剂若无特殊说明	上海凌峰化学试剂公司
均为国产分析纯	或上海国药集团化学试剂公司

2.1.2.4 DNA 分子量标准品电泳后的条带分布

Wide Range DNA Marker(500~120000)(bp)依次: 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 120000;

250 bp DL(bp)依次: 250, 500, 750, 1000, 1500, 1750, 2250, 3000, 4500;

50 bp DL(bp)依次: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500。

2.1.3 实验仪器

在实验中所使用到的实验仪器详见表 2.2。

表 2.2 主要仪器

Table 2.2 Experimental instruments

仪器名称	生产厂家	规格
核酸蛋白分析仪	Beckman 公司	DU-800
PCR 仪	Eppendorf 公司	Mastercycler
电热恒温鼓风干燥箱	上海一恒科技有限公司	DHG-9140A
微型摇床	Eppendorf 公司	5430
超低温冰箱	Thermo 公司	86C
pH 计	上海精密科学仪器有限公司	PHS-3C
小型高速冷冻离心机	Eppendorf 公司	5415R
水平电泳槽	Bio-Rad 公司	Mini-Sub Cell GT
立式压力蒸气灭菌器	上海博讯实业有限公司医疗设备厂	YXQ-LS-75S II
超纯水纯化系统	Millipore 公司	Milli-Q
高速冷冻离心机	Beckman 公司	Avanti J-26
电泳槽	Bio-Rad 公司	Mini-PROTEAN Tetra
漩涡混合器	江苏海门市其林贝尔公司	QL-901
手掌型离心机	江苏海门市其林贝尔公司	LX-100
超声波细胞破碎仪	宁波新芝生物科技有限公司	JY92-II
恒温水槽	宁波新芝生物科技有限公司	SDC-6
超净工作台	苏州苏洁净化设备有限公司	SW-CJ-1FD

恒温恒湿培养箱	上海一恒科技有限公司	GHP-9160
落地恒温振荡摇床	太仓华利达有限公司	HZ-9311K
超声波清洗机	科伟达超声波设备有限公司	KWT-100A
制冰机	宁波格兰特制冷设备制造有限公司	XB-100
冰箱	海尔公司	CD-239VC
通用电源	Bio-Rad 公司	Power Pac 3000
气浴恒温振荡器	金坛亿通电子	SHZ-82
电子天平	北京赛多利斯	BS423S
全自动紫外与可见分析装置	复日科技	FR-200A

2.1.4 培养基, 培养条件及主要溶液的配制

本研究中培养大肠杆菌、枯草杆菌使用的是 LB 培养基^[44], 培养基的组分为 5 g/L Yeast extract, 10 g/L Tryptone, 10 g/L NaCl, 加入 1 L 去离子水, 搅拌使充分混合后用 5 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0。在配制 LB 固体培养基时, 要加入 1.5~1.8 % Agar, 115°C 高温灭菌 20 min。培养含有抗性标记质粒的菌株需在接种前于液体培养基中添加一定浓度的相应抗生素。添加抗生素的平板是将灭好菌的 LB 琼脂培养基放置室温下自然冷却不烫手时 (约 60°C), 快速加入该抗生素适量体积的母液, 摇匀后倒入无菌培养皿中, 待培养基凝固后于 4°C 冰箱中保存。卡那霉素的工作终浓度为 100 ug/mL, 氨苄青霉素的工作终浓度为 200 ug/mL。

50 mg/mL 卡那霉素(Kan)母液: 称取 25 mg 卡那霉素的粉末于干净的烧杯中, 往烧杯中加一定量的超纯水, 搅拌使卡那霉素的粉末溶解在水中后, 将溶液转至 25 mL 干净的容量瓶中, 再用超纯水润洗烧杯 2 次, 润洗液也转移到容量瓶, 定容, 反复颠倒容量瓶使充分混合。在超净工作台中将卡那霉素溶液用无菌的 0.22 um 硝酸纤维素滤膜过滤, 分装到无菌的 1.5 mL 离心管 (EP 管) 中, 在 -20°C 冰箱中保存。

50 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)母液: 具体制备过程的操作步骤与制备卡那霉素母液相同。

60 % (v/v)甘油(100 mL): 用干净的量筒量取 60 mL 甘油, 再加入 40 mL 超纯水, 用保鲜膜封口, 反复颠倒量筒让甘油与水充分混合, 然后倒入蓝口瓶中, 115°C 高温灭菌 20 min 后使用。

枯草杆菌生长用基本培养基^[45]: (NH₄)₂SO₄, 0.2%; KH₂PO₄, 0.6%; K₂HPO₄·3H₂O, 1.4%; 柠檬酸三钠, 0.1%; MgSO₄·7H₂O, 0.02%; 50 ug/ml L-tryptophan; casein hydrolyzate acid, 0.02%。配制以纤维二糖为唯一碳源的培养基时, 添加终浓度为 0.5% 的纤维二糖作为碳源。

加富培养基组分 (制备大肠杆菌感受态用): 5 g/L Yeast extract, 10 g/L Tryptone, 10 g/L NaCl, 10 mM MgSO₄, 2.0 g/L 的葡萄糖。用 5 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0, 在三角瓶中的装液量为 150 mL/1 L (注意制备感受态时使用的器皿都要十分干净),

115°C 高温灭菌 20 min。

转化培养基组分（制备枯草杆菌化学感受态用）：

SP-A 盐溶液(1 L)：4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，12 g KH_2PO_4 ，24 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，2 g 柠檬酸三钠，115°C 高温灭菌 20 min。

SP-B 盐溶液(1 L)：0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，115°C 高温灭菌 20 min。

(50 % w/v) 葡萄糖溶液(50 ml)：称取 25 g 葡萄糖于干净的烧杯中，往烧杯中加入一定量的超纯水，搅拌使葡萄糖溶解在水中后，将溶液转至 50 mL 干净的容量瓶中，再用超纯水润洗烧杯 2 次，润洗液也转移到容量瓶，定容，反复颠倒容量瓶使充分混合后，倒入蓝口瓶中，115°C 高温灭菌 20 min。

100×CAYE 溶液(100 ml)：10 g Yeast Extract，2 g Casamino acid，115°C 高温灭菌 20 min。

100×EGTA 溶液：即配制 10 mmol/L EGTA 溶液，用 5 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8.0。

SPI 培养基(200 mL)：98mL SP-A 盐溶液，98mL SP-B 盐溶液，2 mL (50 % w/v) 葡萄糖，2 mL 100×CAYE (注：在 SPI 培养基中葡萄糖和 CAYE 的终浓度都为 1 % V)。

SPII 培养基(100 mL)：98 mL SPI 培养基，1 mL 250 mM MgCl_2 ，1 mL 50 mM CaCl_2 (注：在 SPII 培养基中 MgCl_2 和 CaCl_2 的终浓度都为 1 % V)。

50 mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(Citrate buffer, pH 6.0)：先分别配制好 500 mL 0.05 M 的柠檬酸和 1L 0.05 M 柠檬酸钠溶液，将两者边混合边用 pH 计测定其 pH 值至 6.0。

琼脂糖凝胶核酸电泳：

5×TBE 贮存液（DNA 电泳缓冲液）(1 L)：称取 54 g Tris base，27.5 g 硼酸于干净的烧杯中，加入 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0) 20 mL，往烧杯中加入一定量的去离子水，搅拌使其混匀后，将溶液转至 1 L 容量瓶中，再用去离子水润洗烧杯 2 次，润洗液也转移到容量瓶，定容，反复颠倒容量瓶使充分混合后倒在干净试剂瓶中室温保存，进行 DNA 电泳实验时将 5×TBE 贮存液稀释 10 倍后使用。

0.7 % 的琼脂糖凝胶：称取 0.7 g 琼脂糖于 250 mL 三角瓶中，加入 100 mL 0.5×TBE 溶液，混匀，再加入 20 μL EB 摇匀后用微波炉加热 2 min 让琼脂糖粉末溶解，稍冷却片刻，将配好的溶液倒在插好梳子的模具上，待凝固后可用。

2 % 的琼脂糖凝胶：称取 2 g 琼脂糖于 250 mL 三角瓶中，加入 100 mL 0.5×TBE 溶液，混匀，余下的操作步骤同 0.7 % 的琼脂糖凝胶的配制。

若无特殊说明，实验中一般都使用 0.7 % 的琼脂糖凝胶。

2.2 实验及分析方法

2.2.1 基因组 DNA 的制备和质粒抽提

取一管保藏 *Bacillus polymyxa* 1.794 的冻存管（菌种均保藏在 -80°C 超低温冰箱），用接种环蘸取少量菌液在 LB 琼脂固体平板上划线分离，于 37°C 倒置培养 12 h，待长出单

菌落后,用无菌牙签挑取平板上的单菌落接种到 20 mL LB 液体培养基中,37℃ 200 rpm 摇床培养 16 h 后,收集 3 mL 菌体,用细菌基因组抽提试剂盒(Omega)抽提其基因组,具体操作步骤详见 E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit 说明书。抽提得到的 DNA 的浓度用核酸蛋白分析仪 DU800 于 260 nm 波长下测定。质粒抽提和 DNA 胶回收的具体操作步骤,详见上海捷瑞生物工程公司的质粒 DNA 小量制备试剂盒和 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书。PCR 产物纯化实验的具体操作步骤详见上海生工生物公司的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒说明书。本研究中涉及到的基因组 DNA 和质粒都溶解在无菌的超纯水中,且均保藏在-20℃冰箱中备用。

2.2.2 目的基因的克隆

2.2.2.1 引物设计

需要克隆的基因的 CDS 序列是从在 NCBI 网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公布的信息中获得,通过 Primer premier 5.0 引物设计软件比对质粒和目的基因中的酶切位点信息,选择适合的酶切位点,并通过该软件设计实验所需的引物,设计好的引物均送至上海生工生物工程公司进行合成,得到合成好的引物后,先于 10000 × g, 4℃ 离心 5 min,将引物粉末离心到管的底部,按引物合成单上说明加入一定量无菌的超纯水使引物粉末溶解,配成 10 uM 贮存液,再 10000 × g, 4℃ 离心 5 min 将贮存液离心到管底,在-20℃冰箱中保存备用。本研究中使用到的引物详见表 2.3。

表 2.3 本研究中用到的引物

Table2.3 Oligonucleotides used in this study

Primer No.	Primer name ^a	Sequence ^b
P1、The construction of pMA5- <i>bglA</i>	pMA5- <i>bglA</i> -F	G <u>GGAATTC</u> CATATGACTATTTTTCAATTTCCGCAGG(<i>EcoR I</i> / <i>Nde I</i>)
	pMA5- <i>bglA</i> -R	CGCGGATCCTCAGATCATTCTCTTTGTTTAGCG (<i>BamH I</i>)
P2、The construction of pP43JM2- <i>bglA</i>	P43- <i>bglA</i> -F	GCTCTAGAAATGACTATTTTTCAATTTCCGC (<i>Xba I</i>)
	P43- <i>bglA</i> -R	GGAATTC <u>AAGCTT</u> TTCATTCTCTTTGTTTAGCGTC (<i>Hind III</i> / <i>EcoR I</i>)
P3、The construction of pP43JM2- <i>bglB</i>	P43- <i>bglB</i> -F	GCTCTAGAAATGAGCGAGAATACCTTTATATTTTC (<i>Xba I</i>)
	P43- <i>bglB</i> -R	GGAATTC <u>AAGCTT</u> CCCTTTTCTATTTAAAACCCG (<i>Hind III</i> / <i>EcoR I</i>)
P4、The construction of pP43JM2- <i>celAbglA</i>	P43- <i>o-cAA</i> -A	GCTCTAGATGCAGGTGTGCCTTTTAACAC (<i>Xba I</i>)
	P43- <i>o-cAA</i> -B	CGGAAATTGAAAAATAGTCATTAATAAGGTAGGTGGGGTA
	P43- <i>o-cAA</i> -C	TACCCACCTACCTTATTAATGACTATTTTTCAATTTCCG
	P43- <i>o-cAA</i> -D	GGAATTC <u>AAGCTT</u> TTCATTCTCTTTGTTTAGCGTC (<i>Hind III</i> / <i>EcoR I</i>)
P5、The construction of pP43JM2- <i>celAbglB</i>	P43- <i>o-cAB</i> -A	GCTCTAGATGCAGGTGTGCCTTTTAACAC (<i>Xba I</i>)
	P43- <i>o-cAB</i> -B	TAAAGGTATTCTCGCTCATTAATAAGGTAGGTGGGGTATG
	P43- <i>o-cAB</i> -C	CATACCCACCTACCTTATTAATGAGCGAGAATACCTTTA
	P43- <i>o-cAB</i> -D	GGAATTC <u>AAGCTT</u> CCCTTTTCTATTTAAAACCCG (<i>Hind III</i> / <i>EcoR I</i>)
P6、The construction	P43- <i>o-AcA</i> -A	GCTCTAGAAATGACTATTTTTCAATTTCCGC (<i>Xba I</i>)

of pP43JM2- <i>bglAcelA</i>	P43-o- <i>AcA</i> -B	GTAAAAAGGCACACCTGCCATTAGCGTCTAGTCTCCAAC
	P43-o- <i>AcA</i> -C	GTTGGAGACTAGACGCTAATGGCAGGTGTGCCTTTTAAC
	P43-o- <i>AcA</i> -D	CCCAAGCTTCTAATAAGGTAGGTGGGGTATG (<i>Hind</i> III)
P7、The construction of pP43JM2- <i>bglBcelA</i>	P43-o- <i>BcA</i> -A	GCTCTAGATAGCGAGAATACCTTTATATTTCC (<i>Xba</i> I)
	P43-o- <i>BcA</i> -B	GTAAAAAGGCACACCTGCCATTAACCCGTTCTTCGCC
	P43-o- <i>BcA</i> -C	GGCGAAGAACGGGTTTTAATGGCAGGTGTGCCTTTTAAC
	P43-o- <i>BcA</i> -D	CCCAAGCTTCTAATAAGGTAGGTGGGGTATG (<i>Hind</i> III)

a: F, 上游引物; R, 下游引物; *bglA*、*bglB*, 都为来源于 *Bacillus polymayxa* 的 β -葡萄糖苷酶基因; *cA*, 为来源于 *Clostridium thermocellum* 的内切- β -1,4-葡聚糖酶 *celA* 基因; *cAA*, 为 *celAbglA* 串联基因; *cAB*, 为 *celAbglB* 串联基因; *AcA*, 为 *bglAcelA* 串联基因; *BcA*, 为 *bglBcelA* 串联基因; o, 指通过 overlap PCR 的方法获得串联的目的基因; b: 引物中所含的限制性酶切位点在引物中用下划线标出, 并在括号内有说明。

2.2.2.2 目的基因的 PCR 扩增

以多粘芽孢杆菌 1.794 的全基因组 DNA 为 PCR 体系的模板, 准备好相应的引物, 用 *pfu* DNA Polymerase 对目的基因进行 PCR 扩增。PCR 体系的配制在冰上进行, 使用的水为无菌超纯水, 所使用到 PCR 管、枪头均为无菌的。PCR 体系组成详见表 2.4。

表 2.4 PCR 体系组成

Table 2.4 Composition of PCR system

试剂	用量
无菌超纯水	32.5 μ L
Template DNA	2.0 μ L
Forward primer (10 μ M)	2.5 μ L
Reverse primer (10 μ M)	2.5 μ L
10 \times PCR buffer with MgSO ₄	5.0 μ L
dNTP mixture (2.5 mM/each)	5.0 μ L
<i>pfu</i> DNA Polymerase (2.5 U/ μ L)	0.5 μ L
总体系	50.0 μ L

PCR 反应程序一般为: 第一个循环 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 第二个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s; 退火温度根据 Primer premier 5.0 软件设计引物时算出的 T_m 温度加 2 $^{\circ}$ C 或引物合成单上的 T_m 温度减 5 $^{\circ}$ C (T_m 温度可根据实验灵活掌握), 退火时间 50 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸, 延伸时间由目的片段的长度决定, 按 *pfu* 500 bp/min 计算; 从第二个循环起循环 29 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应结束后, 使用 0.7% 的琼脂糖凝胶, 上样 2 μ L 进行电泳检测(注: PCR 扩增时的具体退火温度、退火时间和延伸时间在第 3 章中都分别有提到)。

2.2.2.3 重叠延伸 overlap PCR 扩增共表达基因

用已构建成功的重组质粒 pP43JM2-*bglA*, pP43JM2-*bglB*, pP43JM2-*celA* 为模板, 先分别将需要通过 overlap PCR 串联的两个目的基因片段扩增出来, 其 PCR 体系如表 2.5 所示。

表 2.5 PCR 体系组成

Table 2.5 Composition of PCR system

试剂	用量
无菌超纯水	32.5 μL
Primer A/C (10 μM)	2.5 μL
Primer B/D (10 μM)	2.5 μL
10 \times PCR buffer with MgSO_4	5.0 μL
dNTP mixture (2.5 mM/each)	5.0 μL
Template DNA	2.0 μL
<i>pfu</i> DNA Polymerase (2.5 U/ μL)	0.5 μL
总体系	50.0 μL

图 2.1 为 overlap PCR 原理图, 如下所示。

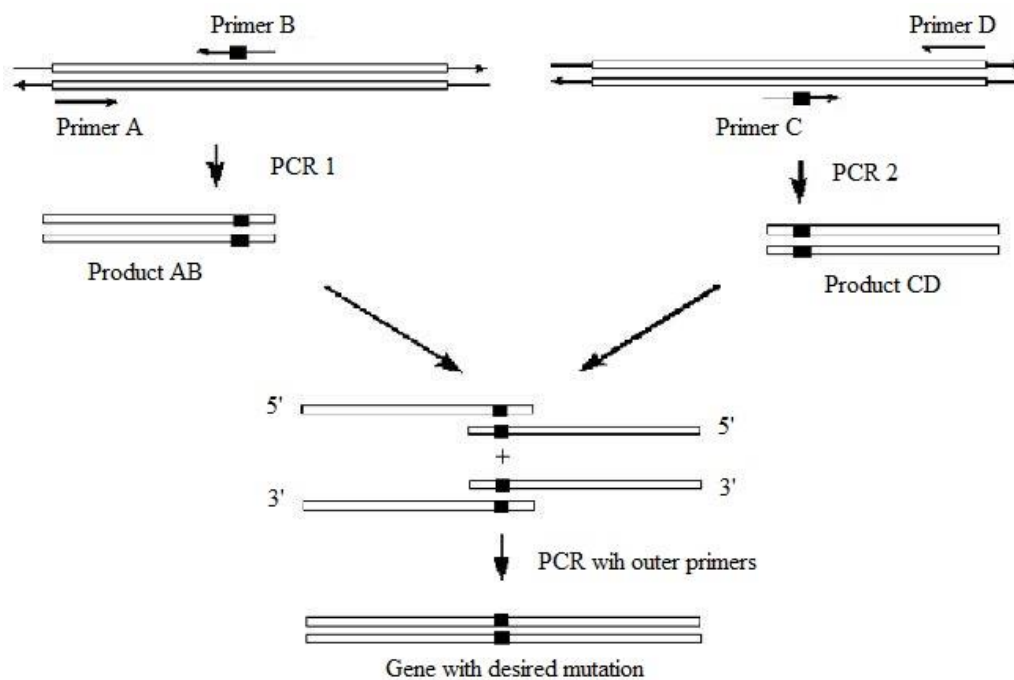


图 2.1 overlap PCR 原理图

Table 2.1 The principle diagram of overlap PCR

其 overlap PCR 具体实验操作过程以共表达基因 *celA**bglB* 为例, 先分别以构建好的重组质粒 pP43JM2-*celA*, pP43JM2-*bglB* 为模板, 用引物 A, B 和引物 C, D 将 *celA* 和 *bglB* 基因片段克隆出来并纯化鉴定, 接着以 PCR 扩增的 *celA* 和 *bglB* 基因片段为模板, 进行 overlap PCR, 反应体系组成见表 2.6, 其中引物 A 和 D 先不加入, 按照 2.2.2.2 的 PCR 循环程序先进行 4~6 个循环后, 再将引物 A、D 加入 overlap PCR 反应体系, 接着进行余下的循环, 总共循环数为 33~37 个。PCR 反应结束后, 使用 0.7% 的琼脂糖凝胶, 上样 2 μL 进行电泳检测 (注: PCR 反应具体程序和条件在第 3 章中有分别说明)。

表 2.6 overlap PCR 体系组成

试剂	用量
ddH ₂ O	32 μL
Primer A (10 μM)	2.5 μL
Primer D (10 μM)	2.5 μL
10 \times PCR buffer with MgSO ₄	5.0 μL
dNTP mixture (2.5 mM/each)	5.0 μL
One Template DNA	1.0 μL
Another Template DNA	1.0 μL
<i>pfu</i> DNA Polymerase (2.5 U/ μL)	1 μL
总体系	50.0 μL

2.2.3 大肠杆菌 DH5 α 感受态的制备和转化

本实验中所使用的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备方法如下^[46]:

(1) 早上取一管保藏的大肠杆菌 DH5 α 的冻存管, 用接种环蘸取少量菌液在 LB 琼脂固体平板上划线分离, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱倒置培养 12 h。

(2) 待长出单菌落后, 用无菌牙签挑取平板上的单菌落接种到 20 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 摇床过夜培养 (约 12~16 h)。

(3) 次日早上从过夜培养物中取 1.2 mL 菌液接种到装有 150 mL LB 加富培养基的 1L 的三角瓶中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 摇床培养。

(4) 当菌液 OD₆₀₀ 生长到 0.4 左右 (一般需要 2~2.5 h), 将培养物取出置于冰上冷却 10 min。

(5) 准备好 1 个预冷的 250 mL 离心杯, 将培养物倒入离心杯中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 2000 \times g 离心 5 min, 收集菌体。在离心杯加入 20~30 mL 预冷的 0.1 M CaCl₂ 溶液, 在冰上轻轻摇晃离心杯使菌体悬浮。

(6) 2000 \times g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集菌体。在离心杯加入 1.5 mL 的预冷的 0.1 M CaCl₂ 溶液, 在冰上轻轻摇晃离心杯使菌体悬浮。

(7) 加入 30 μL 二甲基亚砜(DMSO), 在冰上轻轻摇晃离心杯 15 min 使其混合均匀后, 再加入 30 μL DMSO, 继续在冰上轻轻摇晃离心杯 15 min。

(8) 准备好无菌的 1.5 mL EP 管和枪头, 将制备好的感受态以每 100 μL 的体积分装到 EP 管中, 每分装一管后立即放入液氮中冷冻, 待液氮挥发后转至 -80°C 冰箱中保藏 (注: 本研究所涉及的菌种均在 -80°C 超低温冰箱中进行保藏, 因此在下面实验方法中不再另外说明)。

大肠杆菌的热击转化操作:

(1) 取一管保藏的大肠杆菌 DH5 α 感受态于冰上进行解冻。

(2) 将全部的连接产物或 1 μL 质粒加入到 DH5 α 感受态中, 用枪头轻轻吹打混匀后于冰上静置 30 min。

(3) 在 42°C 水浴中热击 90 s 后取出, 在于冰上冷却 2~3 min。

(4) 加入 800 μL LB 液体培养基, 37°C 100 rpm 摇床培养 60~90 min。

(5) 取 200~300 μL 菌液涂布到含选择性抗性的平板上, 37°C 倒置培养 12~16 h。在以 pUC19 为载体进行转化子 (亚克隆) 的筛选时, 一般将菌液涂布在加有 IPTG, X-Gal 和 Amp 的 LB 平板上, 进行“蓝白斑筛选”。

2.2.4 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体重组质粒的构建

2.2.4.1 穿梭载体重组质粒的构建

纯化回收 PCR 产物, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 条带大小正确后, 对纯化后的 PCR 产物和 pUC19 质粒进行双酶切 (具体所使用的酶切位点见第 3 章中有详细说明, 关于限制性内切酶的具体性质、缓冲液和缓冲液体系的选择、注意事项等详见 Fermentas 限制性内切酶的使用说明书), 双酶切反应体系组成如表 2.7。

表 2.7 PCR 产物与 pUC19 质粒的双酶切体系

Table 2.7 Double digestion system in subclone

试剂	用量
无菌超纯水	5 μL
PCR 产物/pUC19	20 μL
双酶切用 Buffer	3 μL
限制性内切酶 A	1 μL
限制性内切酶 B	1 μL
总体系	30 μL

酶切时间一般为 6~8 个小时, 然后胶回收酶切产物, 将酶切后的目的基因片段与同样酶切后的 pUC19 克隆载体进行连接, 比例在 3:1 至 10:1 之间, 其连接体系的组成如表 2.8。

表 2.8 连接体系。

Table2.8 The ligation system in subclone.

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

连接体系的操作在冰上进行，最后在 EP 管中加入 1 μL T4 DNA ligase，用枪头轻轻吹打混匀，EP 管用封口膜封口，于 16 $^{\circ}\text{C}$ 低温水槽中连接过夜（约 12 h）后，连接产物首先转化大肠杆菌 DH5 α ，转化子涂布在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12 h。菌落/菌液 PCR 鉴定重组子结果正确后（具体实验操作步骤详见 2.2.5），用牙签蘸取少量阳性转化子接种到添加了氨苄青霉素抗性的 4 mL 的 LB 液体培养基的试管中，37 $^{\circ}\text{C}$ 220rpm 摇床培养 12~16 h 后，收集约 2 mL 菌体进行质粒提取，对质粒进行酶切鉴定，酶切时间一般为 1~2 h，酶切体系如表 2.9。

表 2.9 酶切鉴定体系

Table2.9 The digestion system

试剂	用量
无菌超纯水	4 μL
待鉴定质粒	4 μL
酶切用 Buffer	1 μL
限制性内切酶 A	0.5 μL
限制性内切酶 B	0.5 μL
总体系	10 μL

2.2.4.2 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体重组质粒的构建

对含阳性亚克隆载体的菌株菌体进行质粒抽提，然后将提取得到的质粒与大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体(pMA5 或 pP43JM2)同时进行双酶切，一般酶切 6~8 h，然后胶回收目标基因片段和穿梭质粒的载体，利用 T4 DNA 连接酶进行连接，16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 8~12 h 后，在大肠杆菌 DH5 α 中转化全部的连接产物，涂布在含卡那霉素抗性的 LB 选择性平板上，待长出单菌落后，对转化子进行菌落/菌液 PCR 鉴定（具体实验操作步骤详见 2.2.5），和质粒双酶切鉴定（具体实验操作步骤详见 2.2.4.1）。

待鉴定结果都正确，对携带了穿梭载体重组质粒的大肠杆菌 DH5 α 进行酶活检测，鉴定目的基因是否有表达。

在进行双基因的共克隆时，使用和上述实验步骤相同的方法，只是需要先用 overlap PCR 的方法扩增出共表达基因的串联片段，对 overlap PCR 产物和所用的穿梭质粒同样进行双酶切(*Xba* I/*Hind* III)，胶回收双酶切后的目的片段进行连接，连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 中，对转化子进行目标基因的 PCR 鉴定，再对它的质粒进行酶切鉴定，

验证正确后对该阳性重组子（在大肠杆菌 DH5 α 中）进行酶活检测，具体实验操作步骤同上。

2.2.5 重组质粒在大肠杆菌中的 PCR 鉴定

在连接产物或质粒转化大肠杆菌 DH5 α 后，利用那些引物进行 PCR 对重组子进行菌落/菌液鉴定：用接种环从转化后的平板上挑取 8~12 个重组子，分别在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板中划线保存，于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 12 h 至长出单菌落（或接种在添加了氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12~16 h）。以转化子的菌落或菌液为模板，准备好相应的引物，用 *Taq* 酶对目的基因进行 PCR 扩增。PCR 体系的配制在冰上进行，使用的水为无菌超纯水，所使用到 PCR 管、枪头均为无菌的。PCR 体系组成详见表 2.10。

表 2.10 PCR 鉴定体系的组成

Table 2.10 Composition of PCR system

试剂	用量
无菌超纯水	8 μ L
Forward primer (10 μ M)	1 μ L
Reverse primer (10 μ M)	1 μ L
Template DNA (菌体/菌液)	若干
Premix <i>Taq</i>	10 μ L
总体系	20 μ L

PCR 反应条件和程序：在 72 $^{\circ}$ C 延伸中延伸时间按 *Taq* 1000 bp/min 根据目的基因的长度来计算。其他程序步骤与 2.2.2.2 中所述相同。PCR 反应结束后，使用 0.7% 的琼脂糖凝胶，上样 2 μ L 进行电泳检测。

2.2.6 重组质粒在大肠杆菌中的酶活鉴定

穿梭质粒 pMA5/pP43JM2 都是双抗质粒，由于抗性基因起始子的不同，在大肠杆菌中表达时表现出氨苄青霉素抗性，在枯草杆菌中则表现为卡那霉素抗性。在本研究中，亚克隆重组质粒的构建，大肠杆菌-枯草杆菌穿梭载体重组质粒的构建，对重组子进行的筛选，都是在大肠杆菌 DH5 α 中进行的，这是因为在大肠杆菌 DH5 α 中进行基因的克隆操作技术比较成熟，且比在枯草杆菌中要简便，所以选择了能在大肠杆菌和枯草杆菌中进行穿梭的质粒作为目的基因的表达载体，另外，质粒在枯草杆菌化学感受态中的转化效率很低，不适合转化连接产物，这也是选择在大肠杆菌 DH5 α 中进行重组质粒构建的一个重要原因。对大肠杆菌 DH5 α 中的转化子筛选时，菌落/菌液 PCR 鉴定和质粒酶切鉴定的方法分别在 2.2.5 和 2.2.4.1 中有详细描述，而重组质粒在大肠杆菌 DH5 α 中是否能正确表达，还需要对其进行酶活鉴定。

用灭过菌的牙签挑取阳性单克隆菌落接种到 20 mL 添加了氨苄青霉素抗性(200

$\mu\text{g/mL}$)的 LB 液体培养基中, 37°C 220 rpm 摇床培养 20 h, 再 $10000 \times g$ 4°C 下离心 5 min 收集菌体, 用预冷的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗涤菌体 2 次, 再用 1 mL 该缓冲液将菌体悬浮, 通过超声波破碎法得到大肠杆菌细胞裂解上清液, 即为粗酶液。破碎条件为: 超声破碎仪 F3 探头在 100 W 的功率下, 工作 3 s, 间歇 10 s, 一共工作 17 次。超声破碎结束后, 细胞破碎液在 $10000 \times g$ 4°C 下离心 5 min, 取裂解上清液检测其酶活。

2.2.7 枯草杆菌化学感受态的制备和转化

本实验中所使用的枯草杆菌化学感受态细胞的制备和转化方法如下^[47]:

(1) 早上取一管保藏的枯草杆菌 WB800 (WB600) 的冻存管, 用接种环蘸取少量菌液在 LB 琼脂固体平板上划线分离, 于 37°C 倒置培养 12~14 h。

(2) 用牙签挑取平板上的单菌落接种到 20 mL LB 液体培养基中, 37°C 220 rpm 摇床培养约 12~16 h。

(3) 次日早上从过夜培养物中取 200 μL 菌液接种到装有 10 mL SPI 培养基的 100 mL 三角瓶中, 于 37°C 220 rpm 摇床培养。

(4) 当菌体生长到对数生长末期时 (一般需要 3~4 h), 开始测菌体浓度 OD600, 当 OD600 在 1.8~2.6 之间时快速取 400 μL 菌液接种到 100 mL 三角瓶的 4 mL SP II 培养基中, 于 37°C 100 rpm 摇床培养 90 min。

(5) 加 40 μL 10 mM EGTA 溶液, 37°C 100 rpm 摇床培养 10 min。用无菌 EP 管分装, 600 μL 一管, 此为枯草杆菌 WB800(WB600)的化学感受态。

(6) 每管加入 5~10 μL 质粒, 用枪头轻轻吹打混匀后, 37°C 100 rpm 摇床培养 30 min。

(7) 将 EP 管移至 37°C 250 rpm 摇床, 培养 90 min。

(8) $4000 \times g$ 离心 3 min, 留 200~300 μL 上清液重悬菌体, 涂布到选择性抗性的平板上, 37°C 倒置培养 12~16 h。

2.2.8 枯草杆菌重组菌的鉴定和培养

鉴定重组质粒在大肠杆菌 DH5 α 中能成功表达目的基因后, 再将该重组质粒导入枯草杆菌 WB800(WB600)中, 枯草杆菌化学感受态制作和转化方法如 2.2.7 所述, 转化后涂布在含卡那霉素抗性(100 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 平板上。

由于枯草杆菌是革兰氏阳性菌, 其细胞壁中肽聚糖层较厚, 直接的菌落/菌液 PCR 鉴定往往不能成功, 需要通过反复冻融法对菌体进行处理, 具体操作为: 收集 3 mL 待鉴定的枯草杆菌重组菌的菌体, 用 500 μL 超纯水将菌体悬浮后, 再用液氮对菌体进行反复冻融, 然后将其在 $10000 \times g$ 4°C 下离心 5 min, 取 1 μL 上清液为模板, 进行对枯草杆菌重组菌的 PCR 鉴定。同时对重组菌进行质粒抽提后的酶切鉴定, 其质粒抽提过程较大肠杆菌等革兰氏阴性菌有所不同, 需要在质粒抽提前先用溶菌酶对细胞进行处理, 本研究中实验条件为: 枯草杆菌重组菌在添加了卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中培养了 20 h 后, 收集 3 mL 的培养液离心得到菌体, 在菌体中加入 20 μL 50mg/mL 的溶菌酶溶液, 混匀后, 37°C 下孵育 15 min。

挑取阳性转化子的单克隆菌落接种到添加了卡那霉素抗性的 20 mL LB 液体培养基

中, 37°C 220 rpm 摇床培养。24 h 后收集菌体, 于研钵中用液氮冷冻菌体, 对菌体进行研磨破碎, 在用 1 mL 预冷柠檬酸缓冲液溶解研磨物, 在 10000 ×g 4°C 下离心 5 min 后取上清液进行酶活检测。

2.2.9 枯草杆菌 WB800(WB600)生长曲线的制作

取保藏的枯草杆菌 WB800(WB600)的冻存管, 用接种环分别蘸取少量菌液在 LB 琼脂固体平板上划线分离, 于 37°C 倒置培养 12~14 h。待长出单菌落后用无菌牙签挑取 LB 平板上的单菌落接种到 5 mL LB 液体培养基中, 37°C 220 rpm 摇床培养约 12~16 h。次日早上, 按 2% 的接种量, 将枯草杆菌 WB800(WB600)的培养物分别接种到 LB 和 SPI 液体培养基中, 在 37°C 220 rpm 摇床培养, 于不同的时间点取样, 测定其菌浓 OD600, 检测菌体的生长情况。

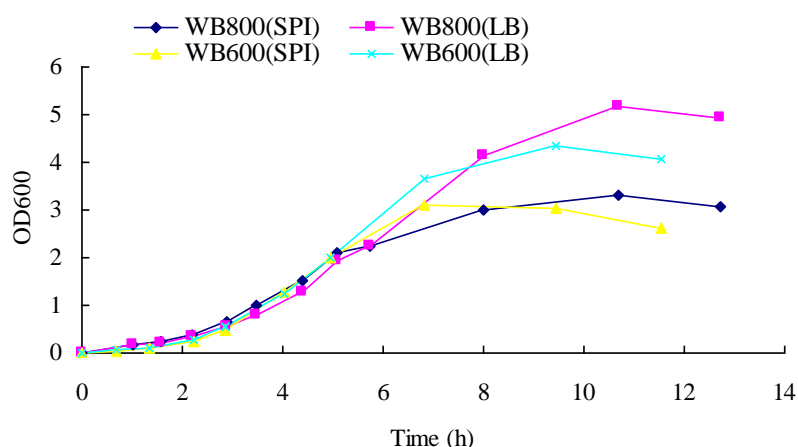


图 2.2 枯草杆菌 WB800 和 WB600 的生长曲线

Table 2.2 The growth curve of *B. subtilis* WB800 and WB600

根据图 2.2 枯草杆菌 WB800 和 WB600 的生长曲线图所反映的菌体的生长情况, 估计在枯草杆菌化学感受态制备中菌体生长到对数生长末期所需的时间。

2.2.10 重组菌对纤维二糖的利用

2.2.10.1 重组菌对纤维二糖消耗量的测定

(1) 配制含纤维二糖的培养基(200ml): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.39 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.7 g; KH_2PO_4 , 1.12 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g; Trisodium Citrate Dihydrate, 0.2 g; cellobiose, 3 g。培养基用无菌的 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤除菌。

(2) 从 WB800(pMA5), WB600(pMA5), WB800(pMA5-*bglA*)和 WB600(pMA5-*bglA*)的平板上挑取单克隆菌落接种到添加了卡那霉素抗性的 20ml LB 液体培养基中, 于 37°C 220rpm 摇床培养 20 h。次日从过夜培养物按 4% 的接种量分别接种到装有 15ml 纤维二糖液体培养基的三角瓶中, 混匀, 取初始样后, 于 37°C 220rpm 摇瓶培养过夜。每隔

12h 取样, 其中, 空白对照为不接菌的纤维二糖培养基, 阴性对照为携带了空质粒的枯草杆菌, 均在相同条件下进行培养并每隔一段时间取样, 取出 1 mL 的发酵液于 10000 ×g 5min 离心后, 将发酵液上清进行 10 倍稀释, 用 0.22 μm 硝酸纤维素滤膜过滤, 以纤维二糖标样为参比进行液相分析, 测定纤维二糖的量。

2.2.10.2 重组菌在以纤维二糖为唯一碳源的培养基中培养

从枯草杆菌重组菌 WB800(pMA5-*bglA*)、WB600(pMA5-*bglA*)和携带了空质粒的枯草杆菌阴性对照菌 WB800(pMA5)、WB600(pMA5)的平板上用无菌牙签挑取单克隆菌落接种到以纤维二糖为唯一碳源的液体培养基(配制方法见 2.1.4)中, 于 37°C 220rpm 摇床培养 36 h, 观察菌体各自的生长情况。

2.2.11 重组枯草杆菌的酶活测定

2.2.11.1 枯草杆菌胞内、外粗酶液的制备

枯草杆菌重组菌的培养方法与其生长曲线制作时菌的培养方法相同, 按 4%的接种量将培养了 20 h 的种子液接种到 50 mL 含卡那霉素抗性(100 μg/mL)的 LB (LK)液体培养基中(250 mL 三角瓶装), 在 37°C 220 rpm 摇床中培养 24 h 后, 10000 ×g, 4°C 下离心 10 min 得到发酵液上清和菌体。

(1) 胞内粗酶液的制备: 将菌体于研钵中用液氮冷冻碾磨破碎后, 用 2.5 mL 预冷的 50 mM 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)将研磨后的固体粉末溶解, 再 10000 ×g, 4°C, 离心 5 min, 得到的上清裂解液即枯草杆菌胞内粗酶液。

(2) 胞外粗酶液的制备: 将发酵液上清倒入 100 mL 三角瓶中, 和冰浴的 1 L 量杯一同置于磁力搅拌器上, 用研磨后硫酸铵固体粉末按 50 %饱和度将发酵液上清中的蛋白沉淀下来, 10000 ×g, 4°C 下离心 10 min, 蛋白沉淀用 2.5 ml 预冷的 50 mM 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)溶解, 即为枯草杆菌胞外粗酶液。

2.2.11.2 底物的制备

磷酸处理的微晶纤维素(PASC)^[48]: 称取 0.2 g 微晶纤维素于 50 mL 的离心管中, 然后加入 600 μL 的超纯水润湿微晶纤维素粉末, 一直搅拌使其成为糊浆状。先加入 8 mL 预冷的 86.2%的浓磷酸, 注意浓磷酸要缓缓的滴加到糊状物上, 并且要快速搅拌, 使其混合均匀, 避免纤维素形成结块, 然后再加入 2 mL 浓磷酸, 期间也要一直保持搅拌, 浑浊物几分钟后会变得透明。将离心管置于冰上 1 h, 期间需多次搅拌。然后将约 40 mL 预冷的超纯水缓缓加入到离心管里, 每 10 mL 加, 要一直搅拌, 会发现白色絮状物的生成。5000 ×g 4°C, 离心 20 min。弃上清, 用 40 mL 预冷的超纯水将微晶纤维素沉淀重新悬浮, 5000 ×g 4°C, 离心 20 min, 这样反复洗涤沉淀 4 次。然后加入约 0.5 mL 2 M Na₂CO₃ 溶液, 使残存的磷酸中和。再加入 45 mL 预冷的超纯水悬浮沉淀, 5000 ×g 4°C, 离心 20 min, 弃上清。加 40 mL 常温超纯水两次, 洗涤纤维素, 离心, 直至 pH 为 5~7。最后, 加 20 mL 超纯水使微晶纤维素沉淀溶解其中, 在 4°C 冰箱中保存。

PNPG 溶液(40 mmol/L): 称取 0.0723 g PNPG 粉末于小烧杯中, 加入 6 mL 柠檬酸柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)使其溶解后, 分装到 EP 管中, 在 4°C 冰箱中保存。

纤维二糖溶液(80 mmol/L): 称取 0.6846 g 纤维二糖粉末于烧杯中, 加入 15~20 mL 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)使其溶解, 移至容量瓶, 用一定量缓冲液多次润洗烧杯, 定容至 25 mL, 反复颠倒混匀后, 倒入洁净试剂瓶中, 在 4℃冰箱中保存, 最好现配现用。

2.2.11.3 酶活测定方法

β -葡萄糖苷酶酶活检测方法^[49]: 400 μ L 粗酶液+200 μ L pNPG 底物 (其中, 底物空白为: 400 μ L 粗酶液+200 μ L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; 酶空白为: 400 μ L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液+200 μ L pNPG 底物), 37℃ 反应 10 min, 后用 400 μ L 1M Na_2CO_3 溶液终止反应, 在 405 nm 处测其吸光值。

β -葡萄糖苷酶酶活测定方法 (纤维二糖酶酶活): 1 ml 粗酶液+1ml 纤维二糖底物 (其中, 底物空白为: 1 ml 粗酶液+1 ml 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; 酶空白为: 1 ml 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液+1ml 纤维二糖底物), 37℃反应 1 h, 用葡萄糖试剂盒测定葡萄糖生成量。

内切葡聚糖酶酶活测定方法: 1 ml 粗酶液+1 ml PASC 底物 (其中, 底物空白为: 1 ml 粗酶液+1 ml 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; 酶空白为: 1 ml 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液+1ml PASC 底物), 50℃反应 1 h, 加入 3 ml DNS 试剂后, 沸水浴 5 min, 立刻取出置于冰水浴中冷却, 取 400 μ L 反应液于 2 ml 水中混匀, 测其在 540 nm 处的吸光值。

2.2.11.4 标准曲线的测定

(1) 对硝基苯酚(PNP)标准曲线的测定: 为了计算出酶活测定方法中 400 μ L 粗酶液+200 μ L pNPG 底物 37℃反应生成 PNP 的量, 用 50 mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制 0.25 μ mol/mL 的 PNP 溶液, 并按不同的比例稀释后, 加入 400 μ L 1M Na_2CO_3 溶液, 混合均匀, 测定其在 405 nm 处的吸光值, 其标准曲线的制作如表 2.10。

表 2.11 PNP 标准曲线的测定

Table2.11 Fabrication of standard curve for PNP

管号	0.25 μ mol/mL PNP 溶液 (μ L)	Citrate buffer (μ L)	PNP (μ mol/mL)	A/405 nm
1	0	600	0.01	0
2	24	576	0.02	0.1569
3	48	552	0.03	0.3422
4	72	528	0.04	0.5257
5	96	504	0.05	0.7053
6	120	480	0.06	0.8973
7	144	456	0.07	1.0864

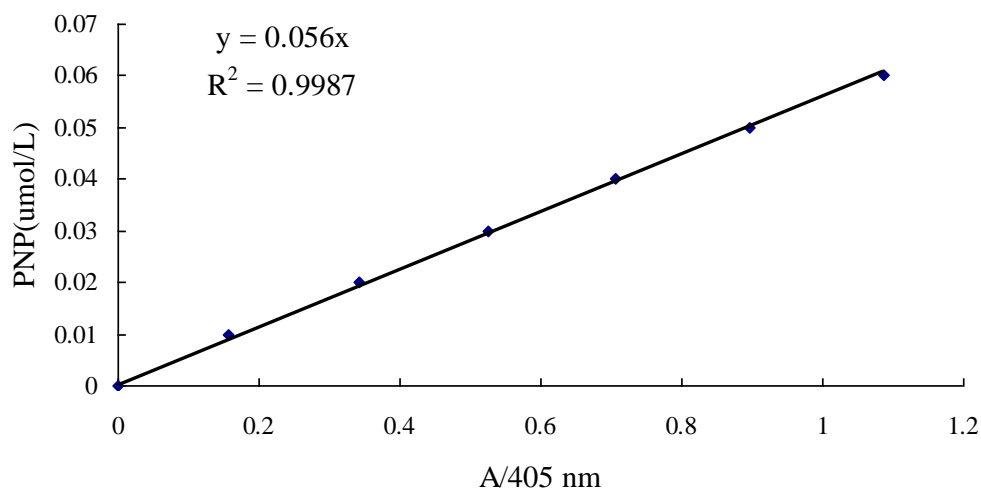


图 2.3 PNP 标准曲线

Table2.3 The standard curve of PNP

(2)葡萄糖标准曲线的测定：配制 2 mg/mL 葡萄糖标准溶液，取不同浓度的葡萄糖溶液 2 mL，加入 3 mL DNS 溶液，混匀后，沸水浴反应 5 min，立即置冰水中冷却。取 400 μ l 反应液加到 2 ml 水中，充分混匀后，以空白管为对照，在 540 nm 处测定其吸光值。

表 2.12 葡萄糖标准曲线的测定

Table2.12 Fabrication of standard curve Glucose

管号	2 mg/mL 葡萄糖标准溶液(mL)	蒸馏水(mL)	DNS(mL)	Glucose (mg)	A/540 nm
1	0	2	3	0	0
2	0.1	1.9	3	0.2	0.0941
3	0.2	1.8	3	0.4	0.2264
4	0.3	1.7	3	0.6	0.3667
5	0.4	1.6	3	0.8	0.5011
6	0.45	1.55	3	0.9	0.5747
7	0.5	1.5	3	1.0	0.6429
8	0.55	1.45	3	1.1	0.7227

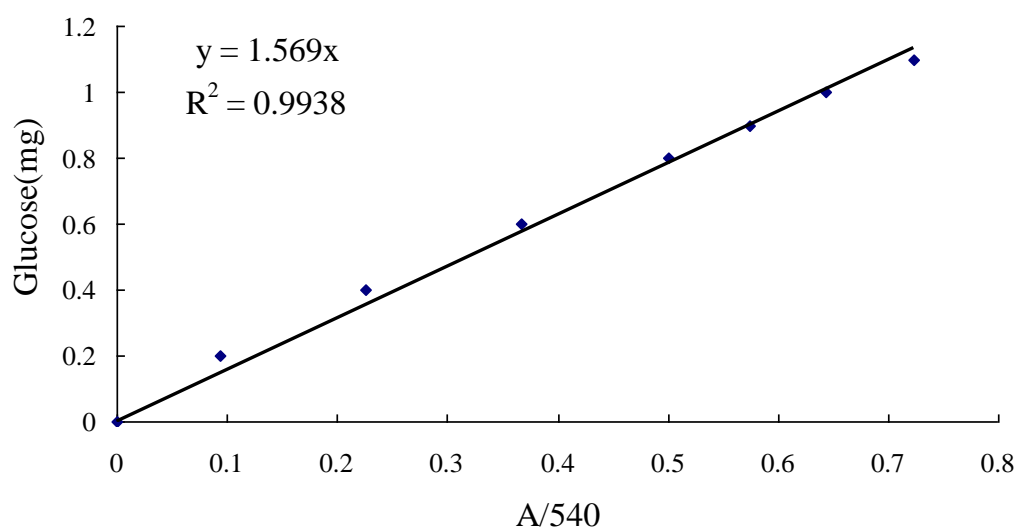


图 2.4 葡萄糖标准曲线

Fig2.4 The standard curve of Glucose

第 3 章 实验结果与讨论

3.1 多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 的克隆及其在枯草杆菌中表达

β -葡萄糖苷酶是纤维素酶系不可缺少的一部分，它能够将纤维二糖、纤维糊精等水解生成葡萄糖。在实际生产中， β -葡萄糖苷酶经常被添加到由真菌分泌的降解纤维素的酶复合物中来提高降解木质纤维素过程的糖化效率，从而减少纤维二糖的积累及其对酶解过程的反馈抑制，并产生更多可被利用的葡萄糖。多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)产生的 β -葡萄糖苷酶对木质纤维素来源的纤维二糖的水解有较高专一性，因此受到很多关注，也对纤维素降解机理的研究提供重要参考。多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中已经成功地进行克隆和表达并研究了其主要结构和酶学功能，并且在酿酒酵母中的表达也有一些研究。

3.1.1 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 的克隆

用细菌基因组抽提试剂盒(Omega, USA)提取多粘芽孢杆菌的基因组，用核酸蛋白质分析仪(DU800)检测出其浓度为 100 ng/ μ L，图 3.1 中该基因组的 DNA 电泳结果表明该基因组 DNA 大小在 12 kb 以上。

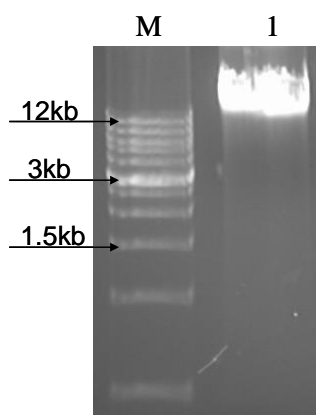


图 3.1 多粘芽孢杆菌的基因组

Fig.3.1 The genomic DNA extracted from *Bacillus polymyxa*.

Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane1: the genomic DNA of *Bacillus polymyxa*.

根据 NCBI 上公布的多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA*(GI:142579)的 CDS 序列(长度为 1347 bp)设计特异性引物，上游引物(pMA5-*bglA*-F)的 5'端含 *EcoR* I 和 *Nde* I 两个酶切位点，下游引物(pMA5-*bglA*-R)的 5'端含 *BamH* I 酶切位点(详见引物序列列表 2.3 中的 P1 引物)。以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板，用引物 pMA5-*bglA*-F

和 pMA5-*bglA*-R 对 *bglA* 基因进行 PCR 扩增,反应条件为:先 94℃ 预变性 3 min;再 94℃ 变性 50 s, 59℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 2.5 min, 循环 30 次后, 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物进行 DNA 电泳鉴定,结果如图 3.2, 所获得的 PCR 产物大小在 1.4 kb 左右, 和 *bglA* 基因的长度接近,说明 *bglA* 基因已被成功扩增,然后将 PCR 产物进行纯化回收。

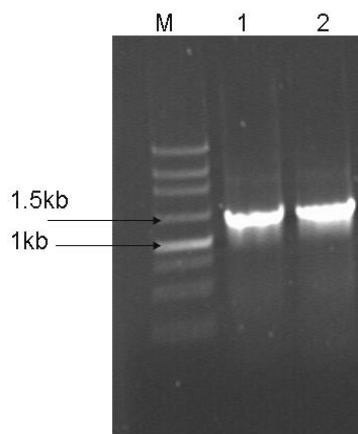
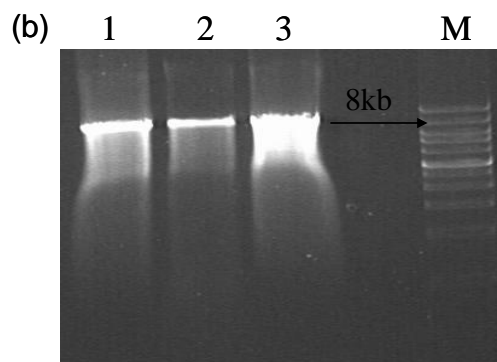
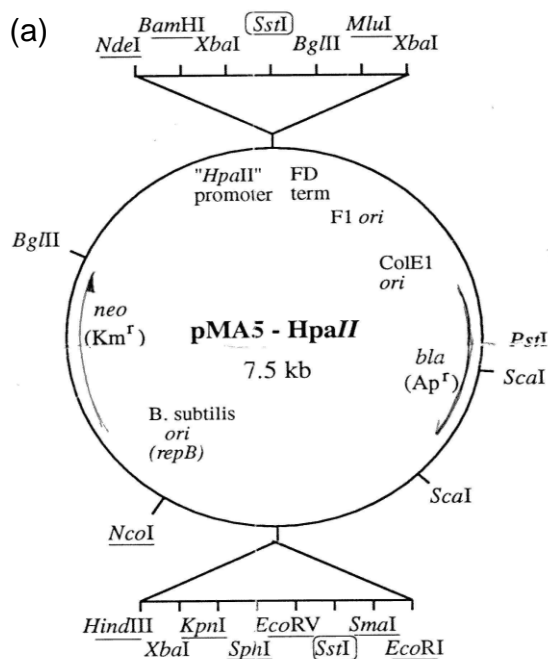


图 3.2 *bglA* 基因的 PCR 扩增

Fig.3.2 *bglA* PCR fragment

Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1~2: *bglA* PCR 扩增产物。

3.1.2 pMA5-*bglA* 重组质粒的构建



Lane 1~3: pMA5质粒被 *BamH* I 和 *Nde* I 双酶切后产物。

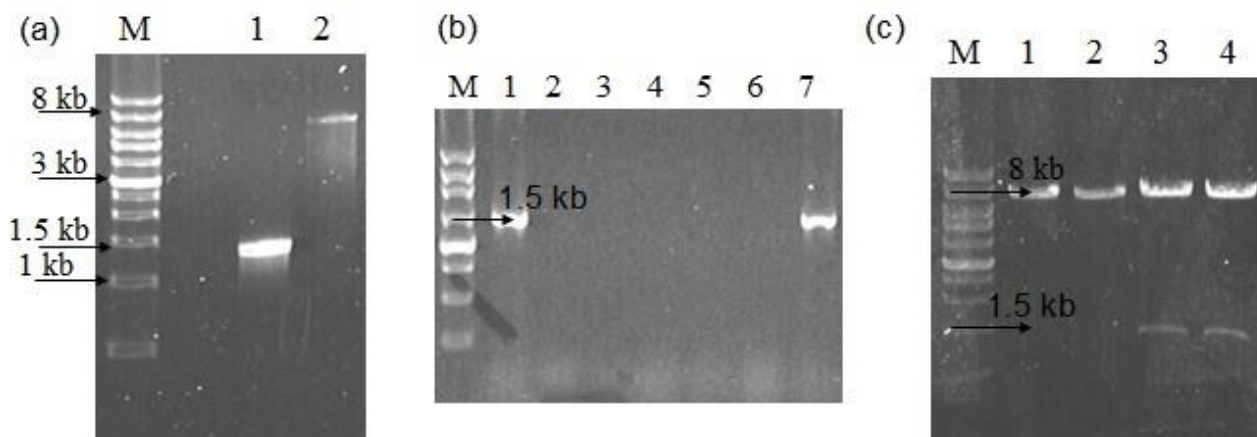
(a) pMA5质粒图谱

(b) pMA5质粒酶切鉴定电泳图

图 3.3 pMA5 质粒图谱和酶切鉴定信息

Fig.3.3 The plasmid map of pMA5 and digestion with BamHI and NdeI for its identification.

在图 3.3 (a)中为 pMA5 (大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒) 的质粒图谱, 在构建重组质粒 pMA5-*bglA* 时, 选择 pMA5 质粒上的 *Nde* I、*Bam*H I 这两个酶切位点, 先用这两个酶对 pMA5 质粒进行酶切鉴定, 在琼脂糖凝胶电泳上的鉴定结果如图 3.3 (b)所示, pMA5 质粒大小在 8 kb 左右, 说明 pMA5 质粒的大小与其图谱中的信息符合。

图 3.4 pMA5-*bglA* 的构建Fig.3.4 The construction of pMA5-*bglA*

(a) *bglA* PCR 产物与 pMA5 质粒双酶切胶回收纯化后琼脂糖凝胶电泳鉴定图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: *bglA* PCR 产物双酶切(*Nde* I / *Bam*H I); Lane 2: pMA5 质粒双酶切(*Nde* I / *Bam*H I); (b) 大肠杆菌 DH5 α (pMA5-*bglA*)菌液 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-7: 选取的重组子。(c) 大肠杆菌 DH5 α (pMA5-*bglA*)质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1-2: 重组子 1 的质粒双酶切鉴定(*Nde* I / *Bam*H I); Lane 3-4: 重组子 7 的质粒双酶切鉴定(*Nde* I / *Bam*H I);。

利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 对 *bglA* 的 PCR 扩增产物进行同样的双酶切操作, 琼脂糖凝胶纯化酶切产物, 回收到的 *bglA* 基因片段, 和表达载体 pMA5 的 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切产物进行连接, 得到重组质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α 。在图 3.4 (a)中是 *bglA* PCR 产物与 pMA5 质粒双酶切胶回收纯化后的电泳结果, 对其浓度比进行分析后得出其相对浓度分别为 0.873 和 0.127, 再根据目的片段与载体 7: 1 的连接比例, 计算出实际连接中要加入目的片段与载体的量。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上培养, 待长出单菌落后, 挑取平板上的单克隆菌落, 在添加了氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中培养, 通过 PCR 的方法鉴定重组子。如图 3.4 (b)所示, Lane 1 和 Lane 7 能扩增出目的条带, 在 1.4 kb 左右, 与目的条带大小符合。挑取阳性重组子 1 和 7 的单克隆菌落在添加了氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中培养, 抽提质粒进行双酶切鉴定, 结果如图 3.4 (c)所示, 在 Lane 1-2 中, 重组子 1 的质粒双酶切没有切出目

的基因的条带，为假阳性；在 Lane 3-4 中，重组子 7 的质粒双酶切切出两条带，在 8 kb 左右是载体质粒的条带，在 1.4 kb 左右时目的基因 *bglA* 的条带，大小都符合，质粒双酶切验证重组子 7 的质粒结果正确。

由于 pMA5 质粒可以在大肠杆菌和枯草杆菌之间穿梭表达，大肠杆菌是革兰氏阴性菌，其细胞壁没有枯草杆菌厚，破壁方法较简单。可直接用超声波仪对其进行超声破碎，而不需要加溶菌酶对细胞壁进行处理，容易对细胞内的酶进行活性测定。所以对构建好的 pMA5-*bglA* 重组质粒可以先在大肠杆菌 DH5 α 中进行 β -葡萄糖苷酶酶活的鉴定。用 PNPG 底物对大肠杆菌重组菌的裂解上清液进行酶活检测（具体酶活检测方法见 2.2.11.3），大肠杆菌 DH5 α 的空白对照，发现大肠杆菌 DH5 α (pMA5-*bglA*) 的裂解上清液与底物作用后有明显的黄色变化，说明重组质粒 pMA5-*bglA* 已构建成功并可以在大肠杆菌中正常表达。

3.1.3 重组质粒 pMA5-*bglA* 在枯草杆菌中的表达

将阳性 pMA5-*bglA* 重组质粒转入枯草杆菌中，对重组子进行质粒抽提并酶切鉴定。

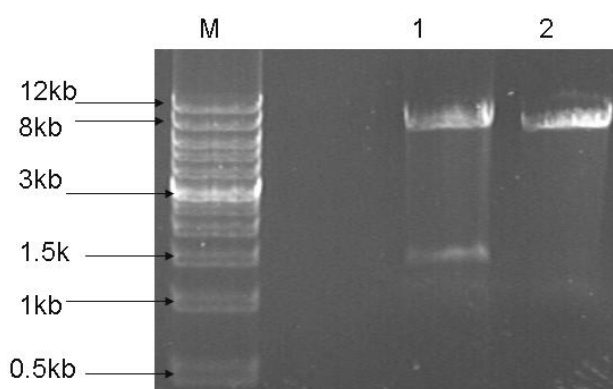


图 3.5 枯草杆菌 WB800 中 pMA5-*bglA* 质粒酶切验证

Table3.5 The verification of pMA5-*bglA* plasmids digestion in *B.subtilis* WB800

Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: double digestion of pMA5-*bglA*(*Nde* I / *Bam*H I); Lane2: control (double digestion of pMA5) (*Nde* I / *Bam*H I).

从枯草杆菌 WB800 重组菌中抽提的质粒能够被 *Nde* I 和 *Bam*H I 切出两条带，如图 3.5 中 Lane 1，在 1.5 kb 左右的条带为目的基因 *bglA*，在 8 kb 左右的条带为质粒 pMA5；Lane 2 是 pMA5 空载对照，酶切后切出一条在 8 kb 左右的 pMA5 载体的条带，大小符合，相比空载对照，构建的重组质粒 pMA5-*bglA* 中能够切出目的基因的条带，说明重组质粒 pMA5-*bglA* 已经成功转入枯草杆菌中。

枯草杆菌重组菌(pMA5-*bglA*)鉴定成功后，用无菌牙签从含卡那霉素抗性的 LB 平板上挑取其单克隆菌落接种到添加了卡那霉素抗性的 50 mL LB 液体培养基中进行发酵培养，培养 24 h 后，将发酵液离心取上清液，再用 50% 饱和度的硫酸铵将发酵液上清中的蛋白进行沉淀，离心沉淀。用 2.5 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液将蛋白沉淀溶解，得到

枯草杆菌胞外粗酶液。以纤维二糖底物，检测其 β -葡萄糖苷酶酶活（具体酶活测定方法见 2.2.11.3），酶活测定结果如表 3.1 所示。

表 3.1 重组枯草杆菌(pMA5-*bglA*)的胞外 β -葡萄糖苷酶酶活测定

Table 3.1 The enzymatic activities of β -glucosidase from recombinant *B.subtilis*(pMA5-*bglA*)

Strains	Cellobiase (Glucose equivalent mg/L)
WB800(pMA5) (Extracellular)	5.4
WB800 (pMA5- <i>bglA</i>) (Extracellular)	6.2
WB600(pMA5) (Extracellular)	4.3
WB600 (pMA5- <i>bglA</i>) (Extracellular)	5.5

从表 3.1 结果中可看出，在枯草杆菌空载(pMA5)和枯草杆菌重组菌(pMA5-*bglA*)的发酵液上清中都检测不到 β -葡萄糖苷酶的酶活，用胞外粗酶液与 PNPG 底物反应也无黄色变化。收集 50 mL 重组枯草杆菌(pMA5-*bglA*)的菌体于研钵在液氮中，进行研磨破碎提取胞内粗酶液，将胞内粗酶液与 PNPG 底物混合，发现有明显的黄色变化（具体酶活检测方法见 2.2.11.3）。

从酶活测定结果可以看出， β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 只在枯草杆菌胞内有表达，没有被分泌到胞外。这是因为 pMA5 质粒中不含枯草杆菌合适分泌的信号肽，所以不能将 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 分泌到枯草杆菌胞外。为了进一步验证 *bglA* 基因在枯草杆菌中的表达情况，在培养枯草杆菌重组菌(pMA5-*bglA*)、枯草杆菌空载对照菌(pMA5)的培养基、不接菌的空白培养基对照中加入纤维二糖，通过 HPLC 来分析培养基中纤维二糖的消耗情况。

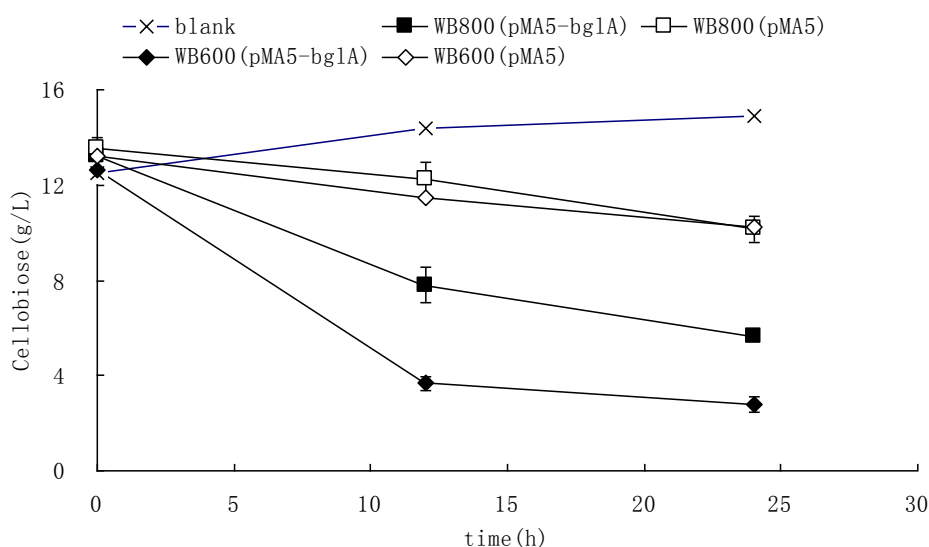


图 3.6 纤维二糖消耗曲线

Table 3.6 Cellobiose consumption curve

从图 3.6 中可以看出, 在没有接入种子液的空白对照中, 随着发酵时间的延长, 纤维二糖的浓度稍有增加, 可能是在培养过程中水分蒸发的原因, 也说明了在培养过程中不会造成纤维二糖的自然降解; 枯草杆菌空载 WB800(pMA5)和 WB600(pMA5) 在培养了 12 h 时分别消耗纤维二糖的量为 1.31 g/L 和 1.73 g/L, 在培养了 24 h 时分别消耗纤维二糖的量为 3.39 g/L 和 3.02 g/L。枯草杆菌空载 WB800(pMA5)和 WB600(pMA5)在培养过程中对纤维二糖略有消耗, 这与文献中提到的枯草杆菌自身存在 β -葡萄糖苷酶基因一致, 但其对纤维二糖的利用还十分有限; 枯草杆菌重组菌 WB800(pMA5-*bglA*)和 WB600(pMA5-*bglA*)对纤维二糖的消耗明显, 在培养了 12 h 时分别消耗纤维二糖的量为 5.41 g/L 和 8.98 g/L, 在培养了 24 h 时分别消耗纤维二糖的量为 7.55 g/L 和 9.82 g/L。枯草杆菌 WB600(pMA5-*bglA*)对纤维二糖的消耗速率要比 WB800(pMA5-*bglA*) 快, 可能是 WB600 只敲除了 6 个胞外蛋白酶基因, 其代谢负担较 WB800 敲除了 8 个胞外蛋白酶基因的要小一些, 所以能更快地利用纤维二糖。

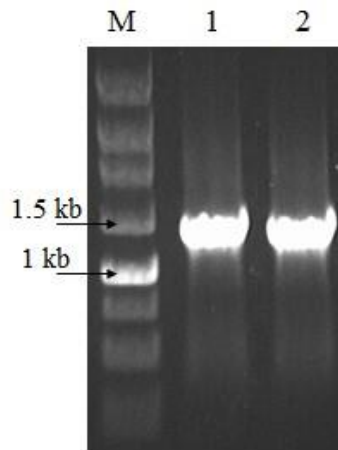
另外, 我们还配制了以纤维二糖为唯一碳源的培养基, 在培养基中分别接入枯草杆菌对照 WB600 和 WB800, 枯草杆菌空载 WB800(pMA5)和 WB600(pMA5), 枯草杆菌重组菌 WB800(pMA5-*bglA*)和 WB600(pMA5-*bglA*), 结果发现只有 WB800(pMA5-*bglA*)和 WB600(pMA5-*bglA*)能够在以纤维二糖为唯一碳源的培养基中生长。

以上实验表明 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 在枯草杆菌胞内可以被成功地表达, 枯草杆菌重组菌(pMA5-*bglA*)能较快地消耗纤维二糖, 并能够在以纤维二糖为唯一碳源的培养基上生长。但是, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 不能被分泌到胞外。

3.2 多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 的克隆及其在枯草杆菌中的分泌型表达

3.2.1 *bglA* 基因的克隆

根据多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 的 CDS(GI:142579)序列(长度为 1347 bp)设计特异性引物, 上游引物(P43-*bglA*-F)的 5'端含 *Xba* I 酶切位点, 下游引物(P43-*bglA*-R)的 5'端含 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切位点(详见引物列表 2.3 中的 P2 引物)。以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板, 用引物 P43-*bglA*-F 和 P43-*bglA*-R 对 *bglA* 基因进行 PCR 扩增, 反应条件为: 先 94°C 预变性 3 min; 再 94°C 变性 45 s, 58°C 退火 50 s, 72°C 延伸 2.5 min, 循环 30 次后, 72°C 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物进行 DNA 电泳鉴定, 结果如图 3.7, *bglA* 基因大小在 1.4 kb 左右, 说明 *bglA* 基因已被成功扩增, 然后将 PCR 产物进行纯化回收。

图 3.7 *bglA* 基因的 PCR 扩增Fig.3.7 *bglA* PCR fragmentLane M: Marker(250 bp); Lane 1~2: *bglA* PCR 扩增产物。

3.2.2 pP43JM2-*bglA* 重组表达质粒的构建

如图 3.8(a)所示,质粒 pP43JM2^[40]是通过对大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43NMK^[43]进行了一些改造后,构建成功的质粒含枯草杆菌自身强启动子 P43、中性蛋白酶信号肽 NprB 和多个限制性内切酶位点的工具质粒(本实验室保存)。

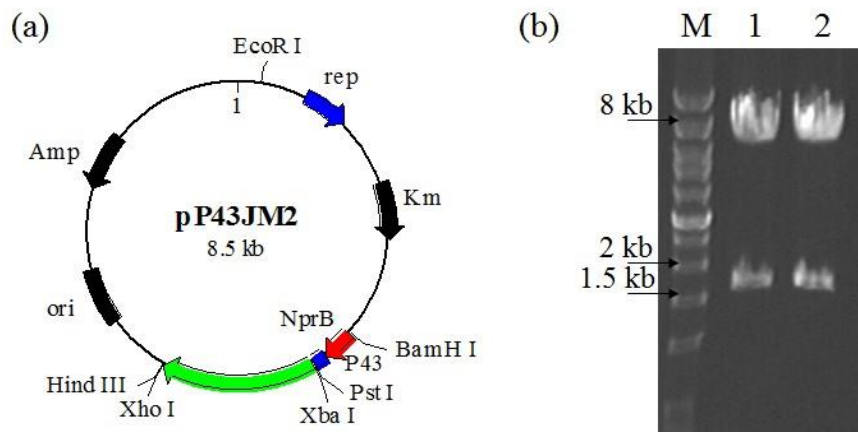


图 3.8 pP43JM2 质粒图谱及酶切鉴定信息

Fig3.8 The plasmid map of pP43JM2 and double digestion for its identification

(a) pP43JM2 质粒图谱, P43 promoter and NprB signal peptide; (b) pP43JM2 质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: double digestion of pP43JM2(*Xba* I/*Hind* III); Lane 2: double digestion of pP43JM2(*Pst* I/*Xho* I)。

在图 3.8 (a)中为 pP43JM2 (大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒)的质粒图谱,其中 P43 启动子是一个强的重叠启动子, NprB 为枯草杆菌自身中性蛋白酶 *nprB* 基因编码的信号

肽,能较好的促进外源蛋白在枯草杆菌中的分泌。pP43JM2 质粒是在穿梭质粒 pP43NMK 的基础上利用来源于热纤梭菌的一段在 1.7 kb 左右大小的片段将 pP43NMK 质粒中 *mpd* 基因替换掉,并在 pP43NMK 质粒上增加了 *Pst* I、*Xba* I、*Xho* I、*Hind* III 这 4 个限制性酶切位点,以方便目标基因的亚克隆操作。如图 3.8 (b)中所示,分别用 *Xba* I/*Hind* III 和 *Pst* I/*Xho* I 双酶切 pP43JM2 质粒,均能切出在 7 kb 左右的载体(实际大小为 6.8 kb)的条带和 1.7 kb 大小的片段的条带,质粒双酶切验证结果与图谱中的质粒信息符合。

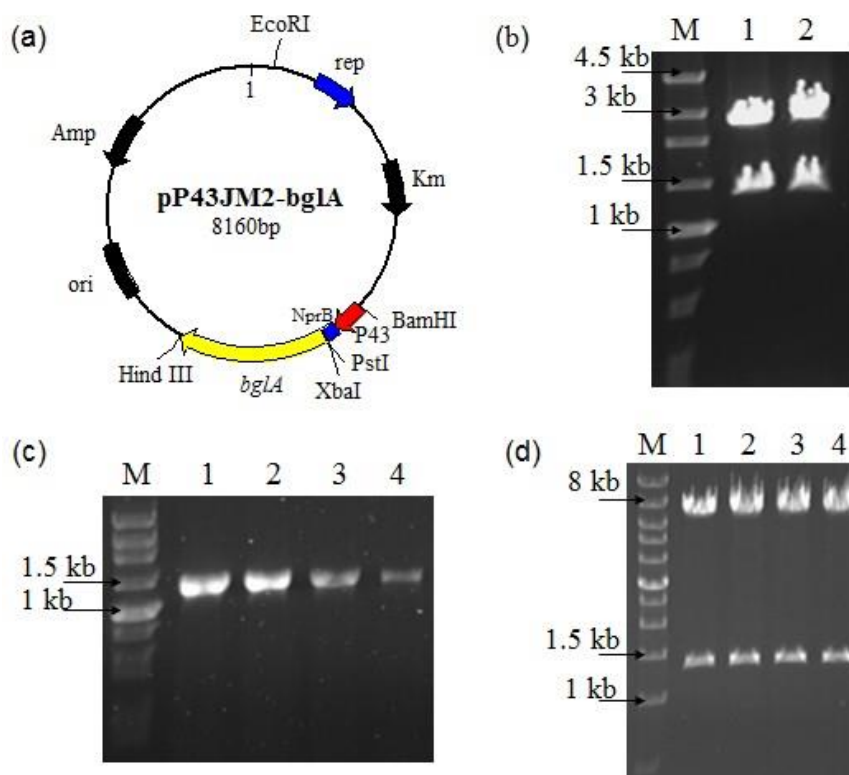


图 3.9 pP43JM2-*bglA* 的构建

Fig.3.9 The construction of pP43JM2-*bglA*

(a) pP43JM2-*bglA* 的质粒图谱; (b) pUC19-*bglA* 质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: pUC19-*bglA* double digestion with *Xba* I and *EcoR* I; Lane 2: pUC19-*bglA* double digestion with *Xba* I and *Hind*III; (c) 大肠杆菌 DH5α(pP43JM2-*bglA*)菌液 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-4: 选取的大肠杆菌重组子; (d) 大肠杆菌 DH5α(pP43JM2-*bglA*) 质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1-4: 选取重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *EcoR* I 双酶切 *bglA* PCR 产物及 pUC19 质粒,得到 *bglA* 基因片段和质粒片段然后胶回收目标基因片段和 pUC19 载体,利用 T4 DNA 连接酶进行连接,得到亚克隆(具体实验操作步骤详见 2.2.4.1)。通过菌落 PCR 的方法鉴定后,抽提其质粒,进行质粒双酶切鉴定,如图 3.9 (b)所示,分别用限制性内切酶 *Xba* I 和 *EcoR* I, *Xba* I 和 *Hind* III 均能将 pUC19-*bglA* 质粒切出两条带,在 2.7 kb 左右为 pUC19 的条

带，在 1.4 kb 左右为目的片段 *bglA* 的条带，说明在 pUC19 上的亚克隆构建成功。

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 pUC19-*bglA* 质粒，获得有粘性末端的 *bglA* 基因片段，将其和同样进行 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切 pP43JM2 的质粒产物进行连接。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 后，涂布在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上进行培养 12-16 h，待长出单菌落后，通过菌落 PCR 的方法鉴定重组子，如图 3.9 (c)所示，Lane 1-4 都能扩增出目的基因 *bglA* 的条带，在 1.4 kb 左右。挑取 1-4 号菌的单克隆菌落接种在添加了氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中，培养 16 h 后离心得到菌体，抽提其质粒做双酶切(*Xba* I/*Hind* III)鉴定，结果如图 3.9 (d)所示，1-4 号菌的质粒双酶切(*Xba* I/*Hind* III)都能切出两条带，分别是在 1.4 kb 左右为目的基因 *bglA* 的条带，和在 7 kb 左右为载体质粒 pP43JM2 的条带，质粒双酶切验证结果也正确，重组质粒 pP43JM2-*bglA* 的质粒图谱如图 3.9 (a)所示，重组质粒大小为 8160 bp。

然后对细胞裂解液（细菌裂解方法见 2.2.6）用 PNPg 为底物对大肠杆菌重组菌 (pP43JM2-*bglA*)的上清进行酶活检测（具体酶活检测方法见 2.2.11.3），实验结果发现反应液有明显黄色变化，说明重组质粒 pP43JM2-*bglA* 构建成功并能在大肠杆菌中表达。

3.2.3 重组质粒 pP43JM2-*bglA* 在枯草杆菌中的分泌表达

将构建好的 pP43JM2-*bglA* 重组质粒转入到枯草杆菌 WB800 中，获得 WB800-pP43JM2-*bglA* 菌，对转化后的枯草杆菌重组菌进行菌落 PCR 鉴定和质粒双酶切鉴定。

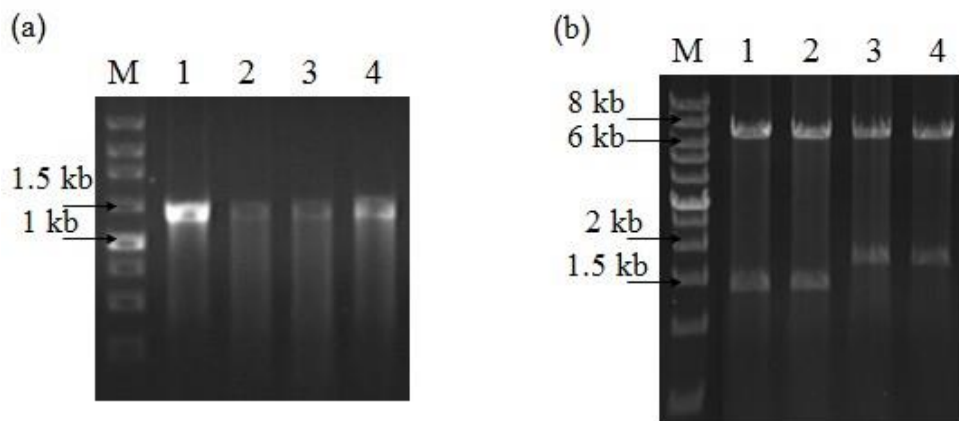


图 3.10 枯草杆菌 WB800 中重组质粒 pP43JM2-*bglA* 的鉴定

Table3.10 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

(a) 枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglA*)菌液 PCR 鉴定电泳图，Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-4: 选取的枯草杆菌重组子；(b) 枯草杆菌重组菌和空载对照菌质粒双酶切鉴定电泳图，Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1-2: WB800(pP43JM2-*bglA*)的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III); Lane 3-4: WB800(pP43JM2)的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglA*)的 PCR 鉴定结果如图 3.10 (a)所示，1-4

号待鉴定的菌都能够扩增出在 1.4 kb 左右大小的目的条带，再选取其中两个菌进行培养并抽提质粒，做质粒双酶切(*Xba* I/*Hind* III)鉴定。结果如图 3.10 (b)所示，Lane 1-2 中都能切出两条带，在 1.4 kb 左右为目的基因 *bglA* 的条带，在 7 kb 左右为 pP43JM2 的条带，Lane 3-4 中为 pP43JM2 质粒双酶切(*Xba* I/*Hind* III)对照，从载体中切下的片段（片段大小为 1.7kb）与电泳中在 1.7 kb 左右处的条带大小符合，在 7 kb 左右处的条带为 pP43JM2 载体，大小符合，从以上验证结果来看，重组质粒(pP43JM2-*bglA*)已成功转入枯草杆菌 WB800 中。

分别从平板中挑取枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglA*)和枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2)的单克隆菌落在添加了卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中培养 20 h 后按 4%的接种量转接到添加了卡那霉素抗性的 50 mL LB 液体培养基中进行发酵试验。发酵 24 小时后将发酵液离心，得到的菌体和发酵液上清，将菌体于研钵中用液氮碾磨法破碎，研钵中的细胞裂解物溶解在 2.5 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0) 中，将裂解液离心得到上清液作为胞内粗酶液；发酵液上清用 50%(W/V)饱和度的硫酸铵沉淀分泌到发酵液中的蛋白，将蛋白沉淀离心收集后溶解在 2.5 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中作为胞外粗酶液。重组菌的 β -葡萄糖苷酶酶活是通过将粗酶液与纤维二糖底物混合后测定生成葡萄糖的量来表征（具体酶活检测方法见 2.2.11.3）。

表 3.2 重组枯草杆菌(pP43JM2-*bglA*)的 β -葡萄糖苷酶酶活测定

Table3.2 The enzymatic activities of β -glucosidase from recombinant *B.subtilis*(pP43JM2-*bglA*)

Strains	Cellobiase (Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2) (Extracellular)	5.2
WB800(pP43JM2- <i>bglA</i>) (Extracellular)	7.1
WB800(pP43JM2) (intracellular)	2.9
WB800(pP43JM2- <i>bglA</i>) (intracellular)	944.4

如表 3.2 中的酶活测定结果所示，用纤维二糖底物测定枯草杆菌重组菌 (pP43JM2-*bglA*)胞外粗酶液中的 β -葡萄糖苷酶酶活，有 7.1 mg/L 的葡萄糖生成，而对照枯草杆菌空载的胞外粗酶液与纤维二糖底物反应也有 5.2 mg/L 的葡萄糖生成。枯草杆菌重组菌的胞外酶活略高于空载，这可能是由于测定酶活存在的系统误差，可以认为在胞外基本上检测不到枯草杆菌重组菌(pP43JM2-*bglA*)的 β -葡萄糖苷酶的酶活，PNPG 底物也检测不到其胞外 β -葡萄糖苷酶活。用液氮研磨法破碎枯草杆菌细胞，提取其胞内粗酶液与纤维二糖底物反应测定其 β -葡萄糖苷酶酶活，枯草杆菌空载 WB800(pP43JM2)胞内粗酶液与纤维二糖为底物时只有 2.9 mg/L 的葡萄糖的生成，而枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglA*)的胞内粗酶液以纤维二糖为底物可生成 944.4 mg/L 的葡萄糖，其 β -葡萄糖苷酶酶活远高于 WB800(pP43JM2)空载对照，在前面的实验（3.1.3 中纤维二糖的消耗实验）中，可知枯草杆菌空载 WB800/600(pMA5)也能少量利用纤维二糖，说明

在枯草杆菌自身含有 β -葡萄糖苷酶的基因,而在对其提取的胞内外粗酶液中却检测不到其 β -葡萄糖苷酶酶活,这可能是由于枯草杆菌自身的 β -葡萄糖苷酶的表达量很低,而且在粗酶液制备过程中还会有部分的酶活损失,并且在其酶活测定方法中是需要 10 min 内检测出提取的粗酶液中的 β -葡萄糖苷酶酶活(具体酶活检测方法见 2.2.11.3),其微量的酶活可能难以检测到;而在对枯草杆菌空载 WB800/600(pMA5)的纤维二糖消耗实验中,在 24 h 内枯草杆菌空载才有少量的纤维二糖消耗,因此用 2.2.11.3 的酶活检测方法检测不到枯草杆菌空载的 β -葡萄糖苷酶酶活只能说明枯草杆菌自身的 β -葡萄糖苷酶表达量太低,用常规的酶活测定方法检测不到。

从酶活测定结果可以看出,在枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglA*)胞内,能检测到很高的 β -葡萄糖苷酶酶活,而在其胞外没有 β -葡萄糖苷酶的分泌。有文献报道多粘芽孢杆菌中由 *bglA* 基因编码的 β -葡萄糖苷酶是一个胞内酶,文献中还提到来源于多粘芽孢杆菌的另一个 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 编码的可能是一个胞外酶,为了实现 β -葡萄糖苷酶在枯草杆菌的胞外分泌表达,尝试将多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因克隆到 pP43JM2 表达载体上,看在枯草杆菌中是否能够实现其胞外表达。

3.3 多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 的克隆及其在枯草杆菌中的分泌型表达

3.3.1 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 的克隆

根据 NCBI 上公布的多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB*(GI:142581)的 CDS 序列(长度为 1347 bp)设计特异性引物,上游引物(P43-*bglB*-F)的 5'端含 *Xba* I 酶切位点,下游引物(P43-*bglB*-R)的 5'端含 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切位点(详见引物序列表 2.3 中的 P3 引物)。以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板,用引物 P43-*bglB*-F 和 P43-*bglB*-R 对 *bglB* 基因进行 PCR 扩增,反应条件为:先 94℃ 预变性 3 min;再 94℃ 变性 30 s, 61℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 循环 30 次后, 72℃ 延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物进行 DNA 电泳鉴定,结果如图 3.11, *bglB* 基因大小在 1.4 kb 左右,说明 *bglB* 基因已被成功扩增,然后将 PCR 产物进行纯化回收。

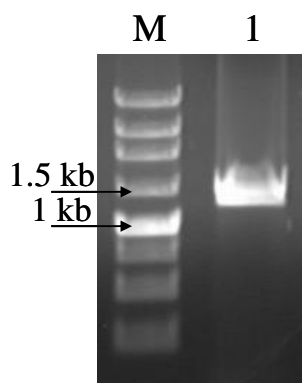


图 3.11 *bglB* 基因的 PCR 扩增

Fig.3.11 *bglB* PCR fragment

Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *bglB* PCR 扩增产物。

3.3.2 pP43JM2-*bglB* 重组表达质粒的构建

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *EcoR* I 双酶切 *bglB* PCR 产物及 pUC19 质粒，得到 *bglB* 基因片段和质粒片段然后胶回收目标基因片段和 pUC19 载体，利用 T4 DNA 连接酶进行连接，得到亚克隆（具体实验操作步骤详见 2.2.4.1），抽提其质粒进行质粒双酶切鉴定，如图 3.12 (b)所示，Lane 1 中为 pUC19-*bglB* 质粒被限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 切出的两条带，在 2.7 kb 左右为 pUC19 的条带，在 1.4 kb 左右为目的片段 *bglB* 的条带，亚克隆构建成功。再用 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 pUC19-*bglB* 质粒，将得到有粘性末端的 *bglB* 基因片段连接到表达载体 pP43JM2 的 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点上，将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 后涂布在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上进行培养，对重组子用菌落 PCR 的方法鉴定，如图 3.12 (c)所示，Lane 1 为扩增出的 *bglB* 目的条带，在 1.4 kb 左右。挑取其单克隆菌落接种在添加了氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中培养，抽提质粒做双酶切鉴定，结果如图 3.12 (d)所示，Lane 1 为质粒被限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 切出的两条带，一个是在 1.4 kb 左右，为目的基因 *bglB* 的条带，另一个是在 7 kb 左右的载体质粒 pP43JM2 的条带，质粒双酶切验证结果正确，重组质粒 pP43JM2-*bglB* 的质粒图谱如图 3.12(a)所示，重组质粒大小为 8158 bp。

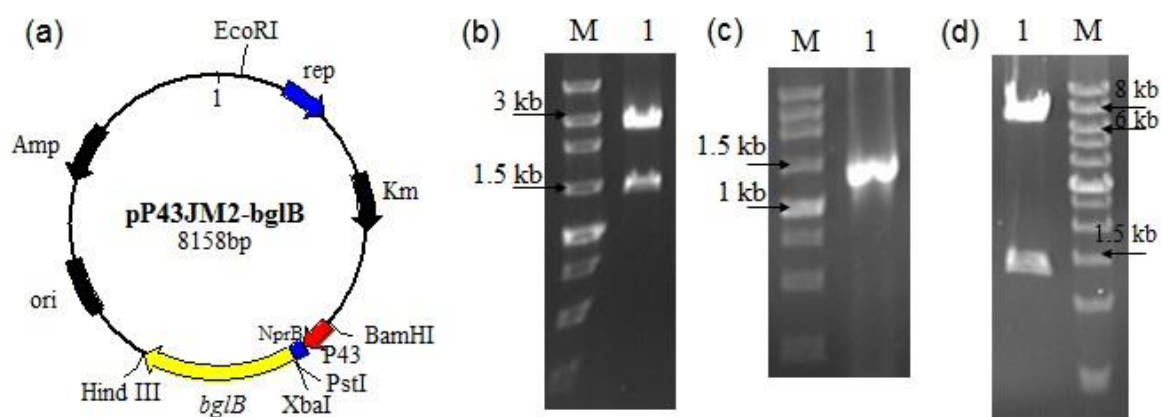


图 3.12 pP43JM2-*bglB* 的构建

Fig.3.12 The construction of pP43JM2-*bglB*

(a) pP43JM2-*bglB* 的质粒图谱; (b) pUC19-*bglB* 质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: pUC19-*bglB* double digestion with *Xba* I and *Hind* III; (c) 大肠杆菌 DH5 α (pP43JM2-*bglB*)菌落 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: 挑取的大肠杆菌重组子; (d) 大肠杆菌 DH5 α (pP43JM2-*bglB*) 质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: 挑取的大肠杆菌重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

再用 PNPG 为底物对大肠杆菌重组菌(pP43JM2-*bglB*)的细胞裂解液上清（细菌裂解

方法见 2.2.6) 进行酶活检测, 能够观察到重组菌(pP43JM2-*bglB*)的细胞裂解上清液与 PNPG 底物混合后有明显的黄色变化 (具体酶活检测方法见 2.2.11.3), 说明重组质粒 pP43JM2-*bglB* 构建成功并能在大肠杆菌中表达。

3.3.3 重组质粒 pP43JM2-*bglB* 在枯草杆菌中的分泌型表达

将构建好的重组质粒 pP43JM2-*bglB* 导入到枯草杆菌 WB800 中, 并对重组的枯草杆菌进行验证。

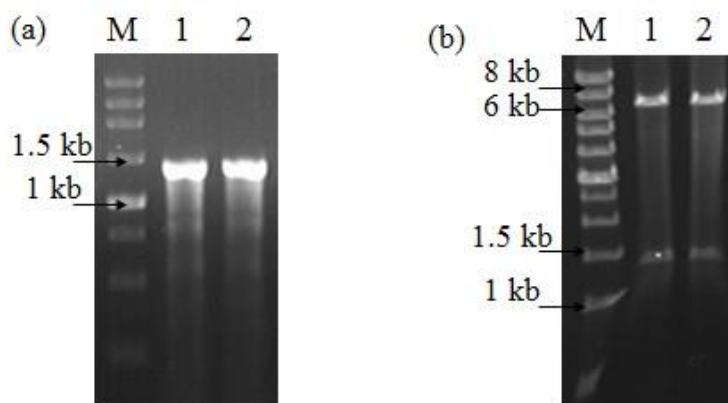


图 3.13 枯草杆菌 WB800 中重组质粒 pP43JM2-*bglB* 的鉴定

Table3.13 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

(a) 枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglB*)菌液 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-2: 选取的枯草杆菌重组子; (b) 枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglB*)质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1-2: 选取的重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

对枯草杆菌重组菌进行 PCR 鉴定, 结果如图 3.13 (a), Lane 1-2 中都扩增出了在 1.4 kb 左右大小的目的条带, 再对其进行质粒双酶切(*Xba* I/*Hind* III)鉴定, 结果如图 3.13 (b)所示, 在 Lane 1-2 中, 重组质粒都能被限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 切出两条带, 一条带是在 1.4 kb 左右的目的基因 *bglB* 的条带, 另一条带是在 7 kb 左右的载体质粒 pP43JM2 的条带, 验证结果表明, 重组质粒(pP43JM2-*bglB*)已成功转入枯草杆菌 WB800 中。

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglB*)和枯草杆菌空载对照菌 WB800(pP43JM2)的培养和对其胞内外粗酶液的制备及酶活测定方法详见 2.2.11.3 和 3.2.3。

表 3.3 重组枯草杆菌(pP43JM2-*bglB*)的 β -葡萄糖苷酶酶活测定

Table3.3 The enzymatic activities of β -glucosidase from recombinant *B.subtilis*(pP43JM2-*bglB*)

Strains	β -glucosidase (Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2) (Extracellular)	5.2
WB800(pP43JM2- <i>bglB</i>) (Extracellular)	49.2
WB800(pP43JM2) (intracellular)	2.9

WB800(pP43JM2-*bglB*) (intracellular)

132.8

如表 3.3 中的 β -葡萄糖苷酶酶活测定结果所示, 用纤维二糖为底物测定枯草杆菌重组菌(pP43JM2-*bglB*)胞外粗酶液的 β -葡萄糖苷酶酶活, 有 49.2 mg/L 的葡萄糖生成, 对照枯草杆菌空载的胞外粗酶液与纤维二糖底物反应只有 5.2 mg/L 的葡萄糖生成, 说明枯草杆菌重组菌(pP43JM2-*bglB*)能够将 β -葡萄糖苷酶分泌到胞外, 同时, 用 PNPG 底物与枯草杆菌重组菌(pP43JM2-*bglB*)胞外粗酶液混合有很明显黄色变化, 而枯草杆菌空载对照胞外粗酶液与 PNPG 底物反应没有颜色变化。用液氮研磨法破碎枯草杆菌重组菌细胞, 得到其胞内粗酶液并与纤维二糖底物反应, 测定其胞内 β -葡萄糖苷酶酶活, WB800(pP43JM2-*bglB*)的胞内粗酶液以纤维二糖为底物可生成 132.8 mg/L 的葡萄糖, 而枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2)的胞内粗酶液以纤维二糖为底物时只有 2.9 mg/L 的葡萄糖的生成, 用 PNPG 底物与枯草杆菌重组菌(pP43JM2-*bglB*)胞外粗酶液混合有很明显黄色变化, 而枯草杆菌空载对照的胞内粗酶液与 PNPG 底物反应没有颜色变化。

从酶活测定结果可以看出, 枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglB*)实现了 β -葡萄糖苷酶的胞外分泌, 由于在重组菌胞内也能检测到 β -葡萄糖苷酶酶活, 说明这种分泌表达效率有限, 还不能实现外源蛋白的完全分泌。要高效地降解纤维素, 需要纤维素酶的多种组分协同作用, 所以如果能在枯草杆菌中实现多种纤维素酶基因的分泌型表达, 将会有利于纤维素底物更好的降解。

3.4 耐热内切葡聚糖酶 *celA* 与 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因在枯草杆菌中的共表达

内切葡聚糖酶作用于纤维素分子的内部, 能随机水解 β -1,4-糖苷键, 将纤维素长链降解成短链和低聚合度的纤维寡糖, 是纤维素酶系的重要组分, 在降解纤维素过程中发挥了重要作用。本实验室前期进行的对纤维素酶基因的筛选研究发现来源于热纤梭菌的耐热内切葡聚糖酶基因 *celA* 在枯草杆菌中有高表达量且能够实现胞外分泌, pP43JM2-*celA* 质粒为实验室构建^[40]。因此, 我们选择了来自热纤梭菌的耐热内切葡聚糖酶基因 *celA* 和来自多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA* 在枯草杆菌中进行共表达。

3.4.1 *celA**bglA* 共表达基因的克隆

根据 NCBI 上公布的多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA*(GI:142579)的 CDS 序列(长度为 1347 bp)和来自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因 *celA*(GI:144753)的 CDS 序列(长度为 1341 bp)设计特异性引物, 引物 P43-o-cAA-A 的 5'端含 *Xba* I 酶切位点, 引物 P43-o-cAA-D 的 5'端含 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切位点, 中间两条引物 P43-o-cAA-B 和 P43-o-cAA-C 不含酶切位点(详见引物序列表 2.3 中的 P4 引物)。以 pP43JM2-*celA* 质粒为模板, 用引物 P43-o-cAA-A 和 P43-o-cAA-B 对 *celA* 基因进行扩增, 以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板, 用引物 P43-o-cAA-C 和 P43-o-cAA-D 对 *bglA* 基因进行 PCR 扩增。反应条件为: 先 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 再 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 循环 30 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物进行 DNA 电泳鉴定, 结果如图 3.14 (a), 在 Lane 1 中, *celA* 基因

大小在 1.4 kb 左右, 说明 *celA* 基因已被成功扩增出来了; 在 Lane 2 中, *bglA* 基因的大小在 1.4 kb 左右, 说明 *bglA* 基因已被成功扩增出来了; 然后将 *celA* 和 *bglA* 的 PCR 产物进行纯化回收。

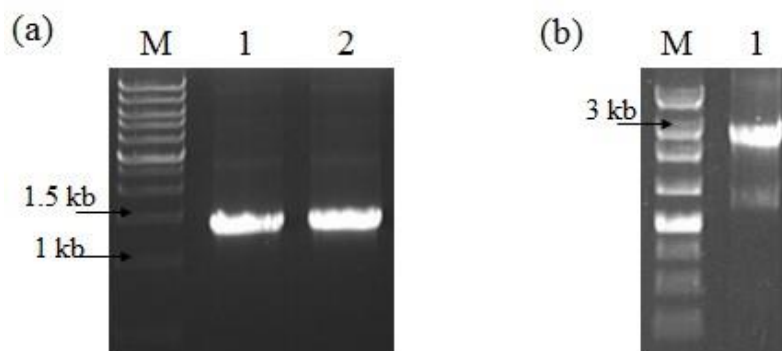


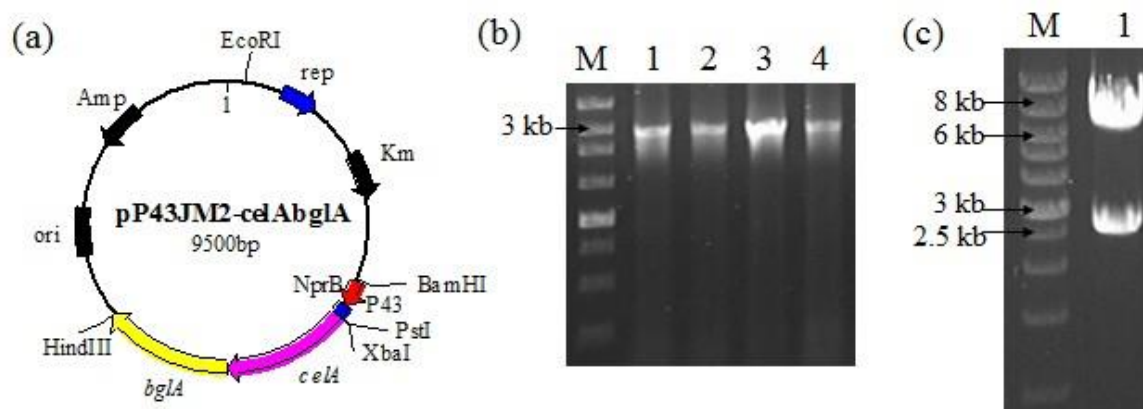
图 3.14 *celAbglA* 基因的 PCR 扩增

Fig.3.14 *celAbglA* PCR fragment

(a) *celA* 和 *bglA* PCR 电泳鉴定图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: *celA* PCR fragment; Lane 2: *bglA* PCR fragment; (b) *celAbglA* overlap PCR 电泳鉴定图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *celAbglA* PCR fragment.

再以纯化后 *celA* 和 *bglA* 的 PCR 产物为模板, 用引物 P43-o-cAA-A 和 P43-o-cAA-D 对 *celAbglA* 基因进行扩增。反应条件为: 先 94°C 预变性 3 min; 再 94°C 变性 40 s, 62°C 退火 1 min, 72°C 延伸 6 min, 循环 36 次后, 72°C 延伸 10 min。其中, 在开始 PCR 反应时反应体系中只有 *celA* 和 *bglA* 的 PCR 产物作为模板, 不加入引物, 待 PCR 反应进行了 4~7 个循环后再将引物 A 和 D 加入反应体系中。反应结束后, 取 2 μ L 扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3.14 (b)所示, Lane 1 为 *celAbglA* 基因的 overlap PCR 扩增产物, 在 2.8 kb 左右出有一条很亮的条带(目的条带大小为 2.7 kb), 可见通过 overlap PCR 的方法成功地将 *celAbglA* 串联基因扩增出来, 将得到的 *celAbglA* 的 overlap PCR 产物进行纯化回收。

3.4.2 pP43JM2-*celAbglA* 重组表达载体的构建

图 3.15 p43JM2-*celAbgIA* 的构建Fig.3.15 The construction of pP43JM2-*celAbgIA*

(a) pP43JM2-*celAbgIA* 的质粒图谱; (b) 大肠杆菌 DH5 α (pP43JM2-*celAbgIA*)菌落 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-4: 挑取的大肠杆菌重组子; (c) 大肠杆菌 DH5 α (pP43JM2-*celAbgIA*)质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: 挑取重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 *celAbgIA* PCR 产物后, 将得到 *celAbgIA* 的串联基因片段连接到表达载体 pP43JM2 的 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点上, 连接产物直接转化大肠杆菌 DH5 α 后涂布在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上。通过菌落 PCR 的方法对平板的菌体进行鉴定, 结果如图 3.15 (b)所示, Lane 1-4 都能扩增出目的条带, 在 2.8 kb 左右, 菌落 PCR 鉴定正确, 说明这 4 个重组子均为阳性克隆。挑取 1 号菌的单克隆菌落在添加了氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中培养, 并抽提其质粒做双酶切鉴定, 结果如图 3.15 (c)所示, 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 对 1 号菌的质粒进行双酶切, 切出了两条带, 分别是在 2.7 kb 左右为目的基因 *celAbgIA* 的条带, 和在 6.8 kb 左右为载体质粒 pP43JM2 的条带, 质粒双酶切验证结果也正确, 说明重组质粒 pP43JM2-*celAbgIA* 构建成功。重组质粒 pP43JM2-*celAbgIA* 的质粒图谱如图 3.15 (a)所示, 先表达 *celA* 基因再表达 *bglA* 基因, 重组质粒大小为 9500 bp。

再用 PNPG 为底物对大肠杆菌重组菌(pP43JM2-*celAbgIA*)的细胞裂解液上清进行酶活检测(细菌裂解方法见 2.2.6), 能够观察到重组菌(pP43JM2-*celAbgIA*)的细胞裂解上清液与 PNPG 底物混合后有明显的黄色变化(具体酶活检测方法见 2.2.11.3), 说明重组质粒 pP43JM2-*celAbgIA* 构建成功并能在大肠杆菌中表达。

3.4.3 重组质粒 pP43JM2-*celAbgIA* 在枯草杆菌中的分泌型共表达

将构建好的重组质粒 pP43JM2-*celAbgIA* 导入到枯草杆菌 WB800 中, 并对重组菌进行 PCR 验证。

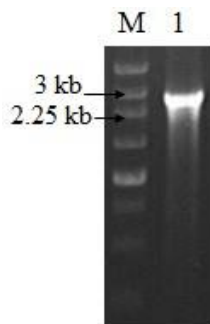


图 3.16 枯草杆菌 WB800 重组菌 pP43JM2-*celAbgIA* 的 PCR 鉴定

Table3.16 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *celAbgIA* PCR fragment.

对枯草杆菌重组菌的 PCR 鉴定结果如图 3.16 所示, Lane 1 中有一条在 2.7 kb 左右大小的条带, 为对重组菌进行菌落 PCR 鉴定的 PCR 扩增产物, *celAbgIA* 串联基因大小为 2.7 kb 左右, 说明重组质粒(pP43JM2-*celAbgIA*)已转入枯草杆菌 WB800 中。

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*celAbgIA*)和枯草杆菌空载 WB800(pP43JM2)的菌体的培养和对其胞内外粗酶液的制备及酶活测定方法详见 2.2.11.3 和 3.2.3。

表 3.4 重组枯草杆菌(pP43JM2-*celAbgIA*)的酶活测定

Table3.4 The enzymatic activities of β -glucosidase and endoglucanase recombinant *B.subtilis*

Strains	β -glucosidase	Endoglucanase
	(Glucose equivalent mg/L)	(Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2)(Extracellular)	5.2	6.6
WB800(pP43JM2- <i>celAbgIA</i>)(Extracellular)	8.6	336.2
WB800(pP43JM2)(intracellular)	2.9	2.4
WB800(pP43JM2- <i>celAbgIA</i>) (intracellular)	323.5	215.8

从表 3.4 中可以看出, 重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbgIA*)胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 323.5 mg/L 的葡萄糖, 与 PASC 底物混合时释放还原糖的量为 215.8 mg/L; 而空载对照的胞内粗酶液与纤维二糖底物混合只有 2.9 mg/L 的葡萄糖的生成, 与 PASC 底物混合也只有 2.4 mg/L 的还原糖生成, 说明枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2)在胞内没有或者说只有微量的 β -葡萄糖苷酶酶活和内切葡聚糖酶酶活。在重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbgIA*)胞内, 内切葡聚糖酶 *celA* 基因和 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因都有表达。在胞外粗酶液的测定中, 分别以纤维二糖和 PASC 为底物, 能够检测到重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbgIA*)胞外内切葡聚糖酶的分泌, 其催化 PASC 底物有 336.2 mg/L 的还原糖生成, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 不能被分泌到胞外; 以纤维二糖和 PASC 为底物, 基本上检测不到枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2) 胞外

分泌的 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶酶活。从酶活检测结果可知，在重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglA*)中，实现了内切葡聚糖酶 *celA* 基因和 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因的共表达，其中内切葡聚糖酶 *celA* 能够被分泌到胞外。

考虑到共表达基因先后表达的顺序不同，相应酶的表达量和作用效果也会有差别^[38]，*celAbglA* 串联基因实现了在枯草杆菌 WB800 中的共表达，由于 *bglA* 基因在 *celA* 基因之后表达，其 β -葡萄糖苷酶的表达量受到一定的影响，表达量不高，所以尝试将共表达基因 *celAbglA* 的前后顺序调换，即先表达 *bglA* 基因后再表达 *celA* 基因，进行 *bglAcelA* 基因的克隆和表达。

3.4.4 *bglAcelA* 共表达基因的克隆

根据 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA*(GI:142579)的序列和内切葡聚糖酶基因 *celA*(GI:144753)的 CDS 序列设计特异性引物，引物 P43-o-AcA-A 的 5'端含 *Xba* I 酶切位点，引物 P43-o-AcA-D 的 5'端含 *Hind* III 酶切位点，中间两条引物 P43-o-AcA-B 和 P43-o-AcA-C 不含酶切位点（详见引物序列表 2.3 中的 P6 引物）。以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板，用引物 P43-o-AcA-A 和 P43-o-AcA-B 对 *bglA* 基因进行 PCR 扩增，以 pP43JM2-*celA* 质粒为模板，用引物 P43-o-CAA-C 和 P43-o-CAA-D 对 *celA* 基因进行扩增。反应条件为：先 94℃ 预变性 3 min；再 94℃ 变性 40 s，61℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 3 min，循环 30 次后，72℃ 延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物进行 DNA 电泳鉴定，结果如图 3.17 (a)，*celA* 基因大小为 1341 bp，在 Lane 1 中有一条在 1.4 kb 左右的亮带，说明 *celA* 基因已被成功扩增出来了；*bglA* 基因的大小为 1347 bp，与图 3.17 (a)中 Lane 2 的在 1.4 kb 左右处条带相符，说明 *bglA* 基因已被成功扩增出来了；将 *celA* 和 *bglA* 的 PCR 产物进行纯化回收。

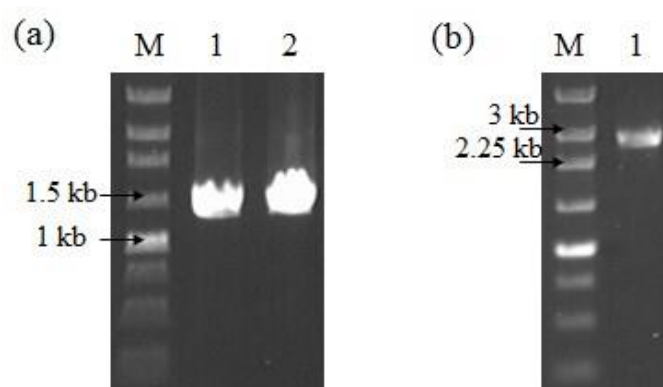


图 3.17 *bglAcelA* 基因的 PCR 扩增

Fig.3.17 *bglAcelA* PCR fragment

(a) *celA* 和 *bglA* PCR 电泳鉴定图，Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *celA* PCR fragment; Lane 2: *bglA* PCR fragment; (b) *bglAcelA* overlap PCR 电泳鉴定图，Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *bglAcelA* PCR fragment.

将纯化回收的 *celA* 和 *bglA* 的 PCR 产物为模板,用引物 P43-o-AcA-A 和 P43-o-AcA-D 对 *bglAcelA* 基因进行扩增。反应条件为:先 94℃ 预变性 3 min;再 94℃ 变性 50 s, 62℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 6 min, 循环 36 次后, 72℃ 延伸 10 min。其中, 在开始 PCR 反应时, 反应体系中不加入引物, 待 PCR 反应进行了 4~7 个循环后再将引物 A 和 D 加入反应体系中。反应结束后, 取 2 μ L 扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3.17 (b) 所示, Lane 1 为 *bglAcelA* 基因的 overlap PCR 扩增产物, 在 2.7 kb 左右处有一条很亮的条带(目的条带大小为 2.7 kb), 可见通过 overlap PCR 的方法成功地将 *bglAcelA* 串联基因扩增出来了, 将得到的 *bglAcelA* 的 overlap PCR 产物进行纯化回收。

3.4.5 pP43JM2-*bglAcelA* 重组表达载体的构建

利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 *bglAcelA* PCR 产物后, 将得到 *bglAcelA* 的串联基因片段连接到表达载体 pP43JM2 的 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点上, 得到重组表达质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α 。通过菌落 PCR 的方法筛选阳性转化子, 结果如图 3.18 (b) 所示, Lane 1 中扩增出目的条带, 在 2.7 kb 左右, 菌落 PCR 鉴定正确, 说明该转化子为阳性克隆。对其质粒进行酶切分析, 由于 *celA* 序列里在 1249 bp 处中含 *Pst* I 酶切位点, 在 pP43JM2 载体的 NprB 信号肽后上也有一个 *Pst* I 酶切位点, 如图 3.18 (a), 用 *Pst* I 对重组质粒进行单酶切, 应该能切出 2.6 kb 和 6.9 kb 大小的两条带, 在图 3.8(c)中 Lane 1 中是重组质粒用 *Pst* I 单酶切后的产物, 可以看到其在 2.6 kb 和 6.9 kb 处各有一条带, 验证正确; Lane 2 中为用 *Xba* I 和 *Hind* III 对重组质粒进行双酶切后的酶切产物, 切出了两条带, 分别是在 2.7 kb 左右的目的基因 *bglAcelA* 的条带, 和在 6.8 kb 左右为载体质粒 pP43JM2 的条带, 质粒双酶切验证结果也正确, 说明重组质粒 pP43JM2-*bglAcelA* 构建成功。重组质粒 pP43JM2-*bglAcelA* 的质粒图谱如图 3.18 (a)所示, 先表达 *bglA* 基因再表达 *celA* 基因, 重组质粒大小为 9500 bp。

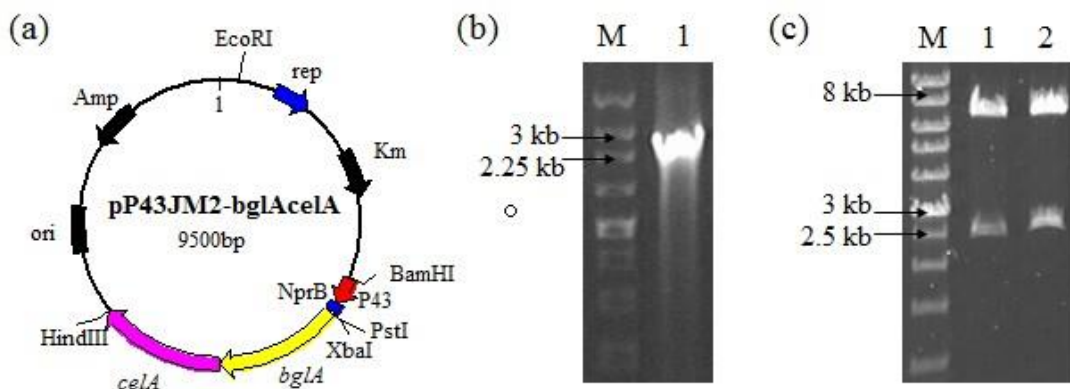


图 3.18 pP43JM2-*bglAcelA* 的构建

Fig.3.18 The construction of pP43JM2-*bglAcelA*

(a) pP43JM2-*bglAcelA* 的质粒图谱; (b) 大肠杆菌 DH5 α (pP43JM2-*bglAcelA*)菌落 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: 挑取的大肠杆菌重组子; (c) 大肠杆菌 DH5 α (pP43JM2-*bglAcelA*)质粒酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: 重组子的质粒单酶切鉴

定(*Pst* I); Lane 2: 重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

再用 PNPG 为底物对大肠杆菌重组菌(pP43JM2-*bglAcelA*)的细胞裂解液上清(细菌裂解方法见 2.2.6)进行酶活检测,能够观察到重组菌(pP43JM2-*bglAcelA*)的细胞裂解上清液与 PNPG 底物混合后有明显的黄色变化(具体酶活检测方法见 2.2.11.3),说明重组质粒 pP43JM2-*bglAcelA* 构建成功并能在大肠杆菌中表达。

3.4.6 重组质粒 pP43JM2-*bglAcelA* 在枯草杆菌中的分泌型共表达

将构建好的重组质粒 pP43JM2-*bglAcelA* 导入到枯草杆菌 WB800 中,并对重组菌进行 PCR 验证。

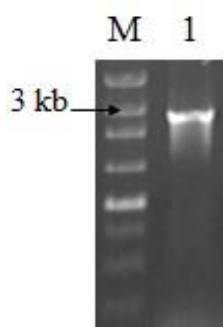


图 3.19 枯草杆菌 WB800 重组菌 pP43JM2-*bglAcelA* 的 PCR 鉴定

Table3.19 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *bglAcelA* PCR fragment.

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)的 PCR 鉴定结果如图 3.19, Lane 1 中在 2.7 kb 左右大小有的一条亮带, *bglAcelA* 串联基因大小为 2.7 kb, 可看出在对重组菌的菌落 PCR 鉴定中,重组菌扩增出目的基因的条带,说明重组质粒 pP43JM2-*bglAcelA* 已成功转入枯草杆菌 WB800 中。

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)和枯草杆菌空载 WB800(pP43JM2)的菌体的培养和对其胞内外粗酶液的制备及酶活测定方法详见 2.2.11.3 和 3.2.3。

表 3.5 重组枯草杆菌(pP43JM2-*bglAcelA*)的酶活测定

Table3.5 The enzymatic activities of β -glucosidase and endoglucanase recombinant *B.subtilis*

Strains	β -glucosidase	Endoglucanase
	(Glucose equivalent mg/L)	(Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2)(Extracellular)	5.2	6.6
WB800(pP43JM2- <i>bglAcelA</i>)(Extracellular)	7.6	87.2
WB800(pP43JM2)(intracellular)	2.9	2.4
WB800(pP43JM2- <i>bglAcelA</i>) (intracellular)	857.1	66.8

从表 3.5 中可以看出, 重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 857.1 mg/L 的葡萄糖, 与 PASC 底物混合时释放还原糖的量为 66.8 mg/L; 而分别以纤维二糖和 PASC 为底物基本上检测不到枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2)胞内的 β -葡萄糖苷酶酶活和内切葡聚糖酶酶活; 在胞外粗酶液的测定中, 分别以纤维二糖和 PASC 为底物, 能够检测到重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)胞外内切葡聚糖酶的分泌, 其催化 PASC 底物有 87.2mg/L 的还原糖生成, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 不能被分泌到胞外; 以纤维二糖和 PASC 为底物, 基本上检测不到枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2) 胞外分泌的 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶酶活。从酶活检测结果可知, 在重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)中, 内切葡聚糖酶 *celA* 基因和 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因都有表达, 其中内切葡聚糖酶 *celA* 能够被分泌到枯草杆菌胞外。

3.5 耐热内切葡聚糖酶 *celA* 与 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因在枯草杆菌中的分泌型共表达

纤维素酶是一种多酶复合体的总称, 对纤维素的降解过程一般被认为是由内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶这三个酶共同作用的结果。已经知道来自多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB* 能够在枯草杆菌 WB800 中进行胞外表达, 内切葡聚糖酶 *celA* 基因也能够在枯草杆菌 WB800 中胞外表达, 而在枯草杆菌中能否实现 *celA* 和 *bglB* 基因的分泌型共表达还需验证。

3.5.1 *celA**bglB* 共表达基因的克隆

根据 NCBI 上公布的多粘芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB*(GI:142581)的 CDS 序列 (长度为 1347 bp)和来自热纤梭菌的内切葡聚糖酶基因 *celA*(GI:144753)的 CDS 序列(长度为 1341 bp)设计特异性引物, 引物 P43-o-*cAB-A* 的 5'端含 *Xba*I 酶切位点, 引物 P43-o-*cAB-D* 的 5'端含 *Hind*III 和 *Eco*RI 酶切位点, 中间两条引物 P43-o-*cAB-B* 和 P43-o-*cAB-C* 不含酶切位点 (详见引物序列表 2.3 中的 P5 引物)。以 pP43JM2-*celA* 质粒为模板, 用引物 P43-o-*cAB-A* 和 P43-o-*cAB-B* 对 *celA* 基因进行扩增, 以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板, 用引物 P43-o-*cAB-C* 和 P43-o-*cAB-D* 对 *bglB* 基因进行 PCR 扩增。反应条件为: 先 94℃预变性 3 min; 再 94℃变性 40 s, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 3 min, 循环 30 次后, 72℃延伸 10 min。

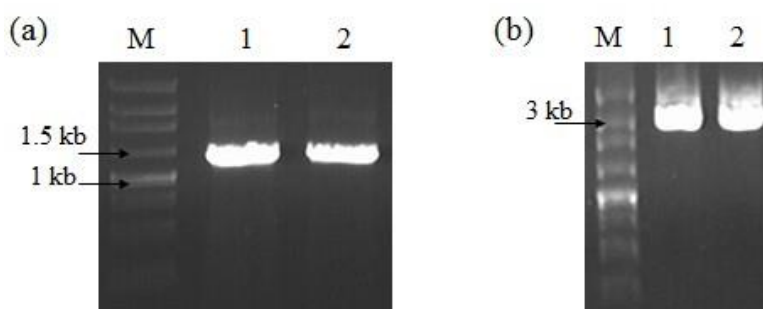


图 3.20 *celAbglB* 基因的 PCR 扩增

Fig.3.20 *celAbglB* PCR fragment

(a) *celA* 和 *bglB* PCR 电泳鉴定图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: *celA* PCR fragment; Lane 2: *bglB* PCR fragment; (b) *celAbglB* overlap PCR 电泳鉴定图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-2: *celAbglB* PCR fragment.

将 PCR 扩增产物进行 DNA 电泳鉴定, 结果如图 3.20 (a), *celA* 基因大小为 1341 bp, 在如图 3.20 (a)中 Lane 1 有一条在 1.4 kb 左右的亮带, 说明 *celA* 基因已被成功扩增出来了; *bglB* 基因的大小为 1347 bp, 与图 3.20 (a)中 Lane 2 的在 1.4 kb 左右处条带相符, 说明 *bglB* 基因已被成功扩增出来了; 将 *celA* 和 *bglB* 的 PCR 产物进行纯化回收。

将纯化回收的 *celA* 和 *bglB* 的 PCR 产物为模板, 用引物 P43-o-*cAB*-A 和 P43-o-*cAB*-D 对 *celAbglB* 基因进行扩增。反应条件为: 先 94℃ 预变性 3 min; 再 94℃ 变性 50 s, 62℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 6 min, 循环 36 次后, 72℃ 延伸 10 min。其中, 在开始 PCR 反应时, 反应体系中不加入引物, 待 PCR 反应进行了 4~7 个循环后再将引物 A 和 D 加入反应体系中。反应结束后, 取 2 μL 扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3.20 (b) 所示, Lane 1-2 中均为 *celAbglB* 基因的 overlap PCR 扩增产物, 在 3 kb 左右处都有一条很亮的条带 (目的条带大小为 2.7 kb), 可见通过 overlap PCR 的方法成功地将 *celAbglB* 串联基因扩增出来了, 将 *celAbglB* 的 overlap PCR 产物进行纯化回收。

3.5.2 pP43JM2-*celAbglB* 重组表达载体的构建

利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 *celAbglB* PCR 产物后, 将得到 *celAbglB* 的串联基因片段连接到表达载体 pP43JM2 的 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点上, 连接产物直接转化大肠杆菌 DH5α 后涂布在含氨苄青霉素抗性平板上。

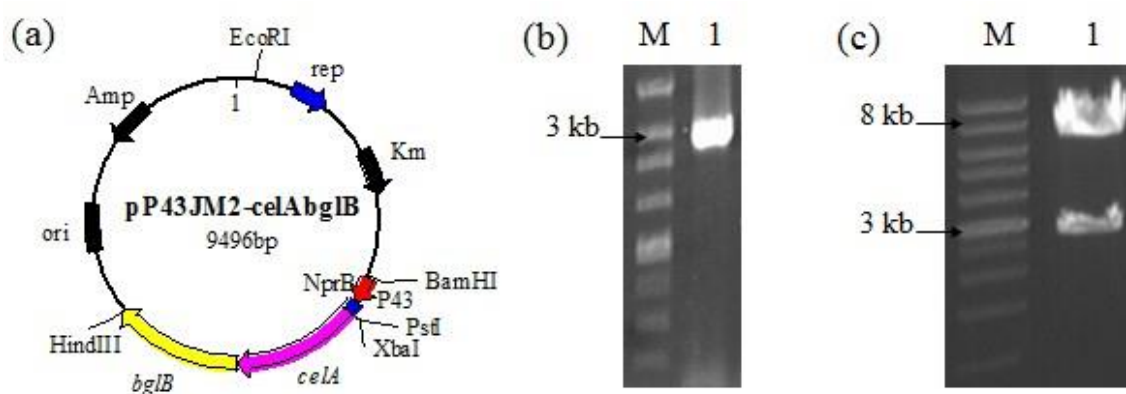


图 3.21 pP43JM2-*celAbglB* 的构建

Fig.3.21 The construction of pP43JM2-*celAbglB*

(a) pP43JM2-*celAbglB* 的质粒图谱; (b) 大肠杆菌 DH5α (pP43JM2-*celAbglB*)菌落 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: 挑取的大肠杆菌重组子; (c) 大肠杆菌 DH5α(pP43JM2-*celAbglB*) 质粒双酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: 挑取的重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

通过菌落 PCR 的方法对平板的菌体进行鉴定, 结果如图 3.21 (b)所示, Lane 1 中扩增出了目的条带, 在 2.7 kb 左右, 菌落 PCR 鉴定正确, 说明该重组子为阳性克隆。挑取其单克隆菌落在含氨苄青霉素液体培养基中培养, 并抽提质粒做双酶切鉴定, 结果如图 3.21 (c)所示, *Xba* I 和 *Hind* III 对质粒进行双酶切, 切出了两条带, 分别是在 2.7 kb 左右的目的基因 *celAbglB* 的条带, 和在 6.8 kb 左右为载体质粒 pP43JM2 的条带, 质粒双酶切验证结果也正确, 说明重组质粒 pP43JM2-*celAbglB* 构建成功。重组质粒 pP43JM2-*celAbglB* 的质粒图谱如图 3.21 (a)所示, 先表达 *celA* 基因再表达 *bglB* 基因, 重组质粒大小为 9496 bp。

再用 PNPG 为底物对大肠杆菌重组菌(pP43JM2-*celAbglB*)的细胞裂解液上清(细菌裂解方法见 2.2.6)进行酶活检测, 能够观察到重组菌(pP43JM2-*celAbglB*)的细胞裂解上清液与 PNPG 底物混合后有明显的黄色变化(具体酶活检测方法见 2.2.11.3), 说明重组质粒 pP43JM2-*celAbglB* 构建成功并能在大肠杆菌中表达。

3.5.3 重组质粒 pP43JM2-*celAbglB* 在枯草杆菌中的分泌型共表达

将构建好的重组质粒 pP43JM2-*celAbglB* 导入到枯草杆菌 WB800 中, 并对重组枯草杆菌进行 PCR 验证。

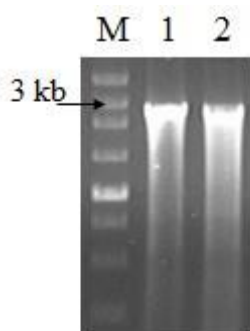


图 3.22 枯草杆菌 WB800 重组菌 pP43JM2-*celAbglB* 的 PCR 鉴定

Table3.22 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-2: *celAbglB* PCR fragment.

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*celAbglB*)的 PCR 鉴定结果如图 3.22 所示, Lane 1-2 中都有在 2.7 kb 左右大小的一条带, *celAbglB* 串联基因大小为 2.7 kb, 可看出在对重组菌的菌落 PCR 鉴定中, Lane 1-2 中都扩增出了目的基因的条带, 说明重组质粒 pP43JM2-*celAbglB* 已成功转入枯草杆菌 WB800 中。

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*celAbglB*)和枯草杆菌空载 WB800(pP43JM2)的菌体的培养和对其胞内外粗酶液的制备及酶活测定方法详见 2.2.11.3 和 3.2.3。

表 3.6 重组枯草杆菌(pP43JM2-*celAbglB*)的酶活测定

Table3.6 The enzymatic activities of β -glucosidase and endoglucanase recombinant *B.subtilis*.

Strains	β -glucosidase	Endoglucanase
	(Glucose equivalent mg/L)	(Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2)(Extracellular)	5.2	6.6
WB800(pP43JM2- <i>celAbglB</i>)(Extracellular)	26.8	338.7
WB800(pP43JM2)(intracellular)	2.9	2.4
WB800(pP43JM2- <i>celAbglB</i>) (intracellular)	44.4	114.5

从表 3.6 中可以看出，分别以纤维二糖和 PASC 为底物基本上检测不到枯草杆菌空载对照 WB800(pP43JM2)胞内外的 β -葡萄糖苷酶酶活和内切葡聚糖酶酶活；在对重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglB*)胞内外粗酶液的测定中，将其胞内粗酶液与纤维二糖底物混合，能生成 44.4 mg/L 的葡萄糖，与 PASC 底物混合生成还原糖的量为 114.5 mg/L；重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglB*)能将内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶分泌到胞外，其催化 PASC 底物有 338.7 mg/L 的还原糖生成，催化纤维二糖底物有 26.8 mg/L 的葡萄糖生成。从酶活检测结果可知，在重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglB*)中，实现了内切葡聚糖酶 *celA* 基因和 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因在枯草杆菌 WB800 的分泌型共表达。

celAbglB 串联基因实现了在枯草杆菌 WB800 中的分泌型共表达，但由于 *bglB* 基因在 *celA* 基因之后表达，其 β -葡萄糖苷酶的表达量不高，因此尝试将共表达基因 *celAbglB* 的前后顺序调换，即先表达 *bglB* 基因后再表达 *celA* 基因，进行 *bglBcelA* 基因的克隆和表达。

3.5.4 *bglBcelA* 共表达基因的克隆

根据 β -葡萄糖苷酶基因 *bglB*(GI:142581)的 CDS 序列（长度为 1347 bp）和内切葡聚糖酶基因 *celA*(GI:144753)的 CDS 序列（长度为 1341 bp）设计特异性引物，引物 P43-o-BcA-A 的 5'端含 *Xba*I 酶切位点，引物 P43-o-BcA-D 的 5'端含 *Hind*III 和 *Eco*RI 酶切位点，中间两条引物 P43-o-BcA-B 和 P43-o-BcA-C 不含酶切位点（详见引物序列表 2.3 中的 P7 引物）。

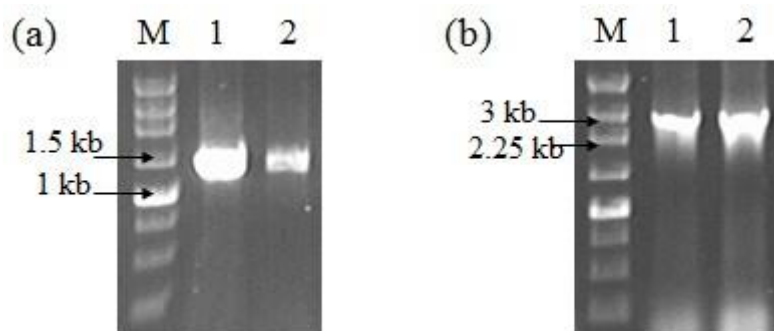


图 3.23 *bglBcelA* 基因的 PCR 扩增

Fig.3.23 *bglBcelA* PCR fragment

(a) *celA* 和 *bglB* PCR 电泳鉴定图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: *celA* PCR fragment; Lane 2: *bglB* PCR fragment; (b) *bglBcelA* overlap PCR 电泳鉴定图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-2: *bglBcelA* PCR fragment.

以多粘芽孢杆菌 1.794 基因组 DNA 为模板,用引物 P43-o-BcA-A 和 P43-o-BcA-B 对 *bglB* 基因进行 PCR 扩增,以 pP43JM2-*celA* 质粒为模板,用引物 P43-o-BcA-C 和 P43-o-BcA-D 对 *celA* 基因进行扩增,反应条件同上,其 PCR 扩增产物鉴定结果如图 3.23 (a),在 Lane 1 中, *celA* 基因大小在 1.4 kb 左右,说明 *celA* 基因已被成功扩增出来了;在 Lane 2 中, *bglB* 基因的大小在 1.4 kb 左右,说明 *bglB* 基因已被成功扩增出来了。

然后将 *celA* 和 *bglB* 的 PCR 产物进行纯化回收,以 *celA* 和 *bglB* 的 PCR 纯化产物作为 overlap PCR 的模板,用引物 P43-o-BcA-A 和 P43-o-BcA-D 对 *bglBcelA* 基因进行扩增。反应条件为:先 94℃ 预变性 3 min;再 94℃ 变性 40 s,62℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 6 min,循环 36 次后,72℃ 延伸 10 min。其中,在开始 PCR 反应时反应体系中不加入引物,待 PCR 反应进行了 4~7 个循环后再将引物 A 和 D 加入反应体系中。反应结束后,取 2 μL 扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3.23 (b)所示, Lane 1 为 *bglBcelA* 基因的 overlap PCR 扩增产物,在 2.8 kb 左右出有一条很亮的条带(目的条带大小为 2.7 kb),可见通过 overlap PCR 的方法成功地将 *bglBcelA* 串联基因扩增出来了,将得到的 *bglBcelA* 的 overlap PCR 产物进行纯化回收。

3.5.5 pP43JM2-*bglBcelA* 重组表达载体的构建

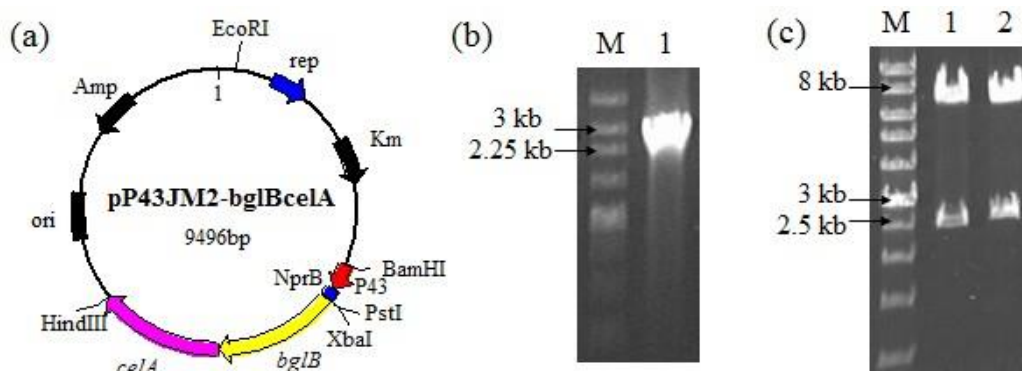


图 3.24 pP43JM2-*bglBcelA* 的构建

Fig.3.24 The construction of pP43JM2-*bglBcelA*

(a) pP43JM2-*bglBcelA* 的质粒图谱; (b) 大肠杆菌 DH5α(pP43JM2-*bglBcelA*)菌落 PCR 鉴定电泳图, Lane M: Marker(250 bp); Lane 1: 挑取的大肠杆菌重组子; (c) 大肠杆菌 DH5α(pP43JM2-*bglBcelA*)质粒酶切鉴定电泳图, Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: 重组子的质粒单酶切鉴定(*Pst* I); Lane 2: 重组子的质粒双酶切鉴定(*Xba* I/*Hind* III)。

利用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切 *bglBcelA* PCR 产物后,将得到 *bglBcelA*

的串联基因片段连接到表达载体 pP43JM2 的 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点上, 得到重组表达质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α 。通过菌落 PCR 的方法筛选阳性转化子, 结果如图 3.24 (b) 所示, Lane 1 中扩增出了目的条带, 在 2.7 kb 左右, 菌落 PCR 鉴定正确, 说明该转化子为阳性克隆。对其质粒进行酶切分析, 由于 *celA* 序列里在 1249 bp 处中含 *Pst*I 酶切位点, 在表达载体的 *NprB* 信号肽后上也有一个 *Pst*I 酶切位点, 如图 3.24 (a), 用 *Pst*I 对重组质粒进行单酶切, 应该能切出 2.6 kb 和 6.9 kb 大小的两条带, 在图 3.24 (c) 中 Lane 1 中是重组质粒用 *Pst*I 单酶切后的产物, 可以看到其在 2.6 kb 和 6.9 kb 处各有一条带, 验证正确; Lane 2 中为用 *Xba* I 和 *Hind* III 对重组质粒进行双酶切后的酶切产物, 切出了两条带, 分别是在 2.7 kb 左右的目的基因 *bglBcelA* 的条带, 和在 6.8 kb 左右为载体质粒 pP43JM2 的条带, 质粒双酶切验证结果也正确, 说明重组质粒 pP43JM2-*bglBcelA* 构建成功。重组质粒 pP43JM2-*bglBcelA* 的质粒图谱如图 3.24 (a) 所示, 先表达 *bglB* 基因再表达 *celA* 基因, 重组质粒大小为 9496 bp。

再用 PNPG 为底物对大肠杆菌重组菌(pP43JM2- *bglBcelA*)的细胞裂解液上清(细菌裂解方法见 2.2.6)进行酶活检测, 能够观察到重组菌(pP43JM2- *bglBcelA*)的细胞裂解上清液与 PNPG 底物混合后有明显的黄色变化(具体酶活检测方法见 2.2.11.3), 说明重组质粒 pP43JM2- *bglBcelA* 构建成功并能在大肠杆菌中表达。

3.5.6 重组质粒 pP43JM2-*bglBcelA* 在枯草杆菌中的分泌型共表达

将构建好的重组质粒 pP43JM2-*bglBcelA* 导入到枯草杆菌 WB800 中, 并对重组的枯草杆菌进行 PCR 验证。

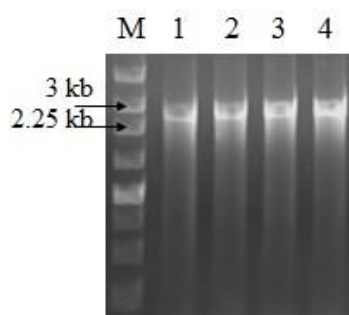


图 3.25 枯草杆菌 WB800 重组菌 pP43JM2-*bglBcelA* 的 PCR 鉴定

Table3.25 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

Lane M: Marker(250 bp); Lane 1-4: *bglBcelA* PCR fragment.

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglBcelA*)的 PCR 鉴定结果如图 3.25 所示, Lane 1-4 中都有在 2.7 kb 左右大小的一条带, *bglBcelA* 串联基因大小为 2.7 kb, 可看出在对重组菌的菌落 PCR 鉴定中, Lane 1-4 中都扩增出了目的基因的条带, 说明重组质粒 pP43JM2-*bglBcelA* 已成功转入枯草杆菌 WB800 中。

对枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglBcelA*)和枯草杆菌空载 WB800(pP43JM2)的

菌体的培养和对其胞内外粗酶液的制备及酶活测定方法详见 2.2.11.3 和 3.2.3。

表 3.7 重组枯草杆菌(pP43JM2-*bglBcelA*)的酶活测定

Table3.7 The enzymatic activities of β -glucosidase and endoglucanase recombinant *B.subtilis*

Strains	β -glucosidase	Endoglucanase
	(Glucose equivalent mg/L)	(Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2)(Extracellular)	5.2	6.6
WB800(pP43JM2- <i>bglBcelA</i>)(Extracellular)	36.9	97.0
WB800(pP43JM2)(intracellular)	2.9	2.4
WB800(pP43JM2- <i>bglBcelA</i>) (intracellular)	136.1	43.8

从表 3.6 中可以看出, 在对重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglBcelA*)胞内外粗酶液的测定中, 将其胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 136.1 mg/L 的葡萄糖, 与 PASC 底物混合生成还原糖的量为 43.8 mg/L; 重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglBcelA*)能将内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶分泌到胞外, 其催化 PASC 底物有 97 mg/L 的还原糖生成, 催化纤维二糖底物有 36.9 mg/L 的葡萄糖生成。从酶活检测结果可知, 在重组菌枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*bglBcelA*)中, 实现了 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因和内切葡聚糖酶 *celA* 基因的分泌型共表达。

3.6 内切葡聚糖酶与 β -葡萄糖苷酶基因在枯草杆菌中的共表达及酶活比较

分别提取枯草杆菌共表达重组菌中的质粒, pP43JM2-*celA**bglA*, pP43JM2-*bglA**celA*, pP43JM2-*celA**bglB*, pP43JM2-*bglB**celA*, 以空载 pP43JM2 为对照, 用 *Xba* I 和 *Hind* III 对其进行双酶切, 通过琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行分析, 如图 3.26 所示, 在琼脂糖凝胶电泳中都有相应的两条带, 一条条带与 pP43JM2 载体片段大小适合, 另一条条带与其各自相应的目的片段大小一致, 证实上述共表达的重组质粒都构建成功并成功转入 WB800 中进行表达。

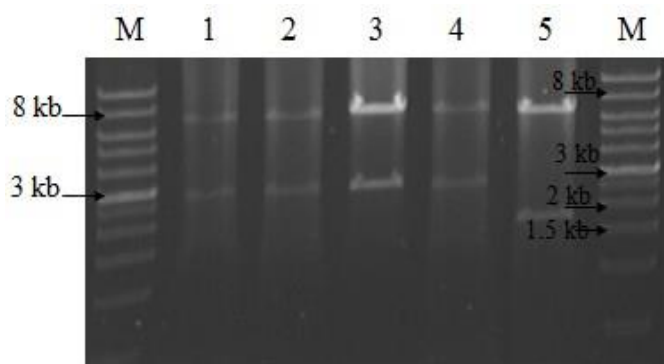


图 3.26 枯草杆菌 WB800 重组菌的双酶切鉴定

Table3.26 The verification of recombinant *B.subtilis* WB800

Lane M: Marker(wide range 500~12000 bp); Lane 1: pP43JM2-*celAbglA* from *B.subtilis* WB800 double digestion with *Xba* I and *Hind* III; Lane 2: pP43JM2-*bglAcelA* from *B.subtilis* WB800 double digestion with *Xba* I and *Hind* III; Lane 3: pP43JM2-*celAbglB* from *B.subtilis* WB800 double digestion with *Xba* I and *Hind* III; Lane 4: pP43JM2-*bglBcelA* from *B.subtilis* WB800 double digestion with *Xba* I and *Hind* III; Lane 5: pP43JM2 from *B.subtilis* WB800 double digestion with *Xba* I and *Hind* III.

对已经构建好的枯草杆菌重组菌进行酶活比较, 枯草杆菌重组菌在添加了卡那霉素抗性(100 μg/mL)的 LB 液体培养基中培养 20 h 后按 4% 的接种量转接到添加了卡那霉素抗性(100 μg/mL)的 50 mL LB 液体培养基中进行发酵试验, 发酵 24 小时后将发酵液离心, 得到的菌体和发酵液上清: 将菌体于研钵中用液氮碾磨法破碎, 研钵中的细胞裂解物溶解在 2.5 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0) 中, 将裂解液离心得到上清液作为胞内粗酶液; 发酵液上清用 50%(W/V)饱和度的硫酸铵沉淀分泌到发酵液中的蛋白, 将蛋白沉淀离心收集后溶解在 2.5 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0) 中作为胞外粗酶液; 其 β-葡萄糖苷酶酶活是通过将粗酶液与纤维二糖底物混合后测定生成葡萄糖的量来表征, 其内切葡聚糖酶酶活是通过将粗酶液与 PASC 底物混合后测定生成的还原糖的量来表征 (具体酶活测定方法见 2.2.11.3)。

表 3.8 枯草杆菌重组菌的胞内酶活测定

Table3.8 The enzymatic activities of intracellular cellulase from recombinant *B.subtilis*.

Strains	β-glucosidase (Glucose equivalent mg/L)	Endoglucanase (Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2)	2.9	2.4
WB800(pP43JM2- <i>celA</i>)	4.4	235.7
WB800(pP43JM2- <i>bglA</i>)	944.4	2.7
WB800(pP43JM2- <i>bglB</i>)	132.8	1.5
WB800(pP43JM2- <i>celAbglA</i>)	323.5	215.8
WB800(pP43JM2- <i>bglAcelA</i>)	857.1	66.8
WB800(pP43JM2- <i>celAbglB</i>)	44.4	114.5
WB800(pP43JM2- <i>bglBcelA</i>)	136.1	43.8

表 3.9 枯草杆菌重组菌的胞外酶活测定

Table3.9 The enzymatic activities of extracellular cellulase from recombinant *B.subtilis*

Strains	β-glucosidase (Glucose equivalent mg/L)	Endoglucanase (Glucose equivalent mg/L)
WB800(pP43JM2)	5.2	6.6

WB800(pP43JM2- <i>celA</i>)	6.0	398.7
WB800(pP43JM2- <i>bglA</i>)	7.1	6.8
WB800(pP43JM2- <i>bglB</i>)	49.2	9.2
WB800(pP43JM2- <i>celAbglA</i>)	8.6	336.2
WB800(pP43JM2- <i>bglAcelA</i>)	7.6	87.2
WB800(pP43JM2- <i>celAbglB</i>)	26.8	338.7
WB800(pP43JM2- <i>bglBcelA</i>)	36.9	97.0

枯草杆菌重组菌的胞内外酶活如表 3.8 和 3.9 所示, 可以看出内切葡聚糖酶 *celA* 不能水解纤维二糖, 即没有 β -葡萄糖苷酶酶活; 枯草杆菌重组菌 WB800(pP43JM2-*bglA*)、WB800(pP43JM2-*bglB*)也无法对磷酸处理的微晶纤维素底物进行利用; 从枯草杆菌空载 WB800(pP43JM2)中提取的胞内粗酶液和从其发酵液上清浓缩的胞外粗酶液都对纤维二糖底物和 PASC 底物不起作用。 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 不能被分泌到枯草杆菌胞外, 只在胞内有表达, WB800(pP43JM2-*bglA*)的胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 944.4 mg/L 的葡萄糖; WB800(pP43JM2-*bglB*)的胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 132.8 mg/L 的葡萄糖; 虽然编码 β -葡萄糖苷酶的 *bglA*、*bglB* 基因都来自多粘芽孢杆菌, 但不同类型的 β -葡萄糖苷酶对不同底物的水解效率差异很大^[50], β -葡萄糖苷酶的 *bglA* 适合水解纤维二糖底物, 所以用纤维二糖为底物来表征 β -葡萄糖苷酶酶活时, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 酶活较高。虽然 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 对于纤维二糖底物酶活较低, 但对人工合成的底物如 PNPG 有较高的酶活, β -葡萄糖苷酶 *bglB* 能够被分泌到枯草杆菌胞外, 在胞外的分泌性能上优于 β -葡萄糖苷酶 *bglA*, 而纤维二糖底物能够穿膜到枯草杆菌细胞内, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 也能够对其利用, 具体哪一种 β -葡萄糖苷酶更适用于实际纤维素底物的水解还需要进一步的实验验证。由于内切葡聚糖酶不能利用纤维二糖, β -葡萄糖苷酶也不对聚合度较高的纤维素底物进行利用, 所以单独表达一种纤维素酶基因有一定的局限性, 实现多纤维素酶基因在枯草杆菌中的分泌型共表达更具实用性, 具有广阔的应用前景。

β -葡萄糖苷酶 *bglB* 和来自热纤梭菌的耐热内切葡聚糖酶 *celA* 都能够被分泌到枯草杆菌胞外, WB800(pP43JM2-*bglB*)的胞外粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 49.2 mg/L 的葡萄糖; WB800(pP43JM2-*celA*)的胞外粗酶液与 PASC 底物混合, 生成还原糖的量为 398.7 mg/L; 其胞内也有较高的酶活, WB800(pP43JM2-*celA*)的胞内粗酶液与 PASC 底物混合有 235.7 mg/L 的还原糖生成; 在共表达重组枯草杆菌中, 其胞内粗酶液与 PASC 底物混合后生成还原糖的量分别是: WB800(pP43JM2-*celAbglA*), 215.8 mg/L; WB800(pP43JM2-*bglAcelA*), 66.8 mg/L; WB800(pP43JM2-*celAbglB*), 114.5 mg/L; WB800(pP43JM2-*bglBcelA*), 43.8mg/L。说明枯草杆菌中性蛋白酶信号肽 NprB 的分泌效率有限, 还无法将表达的外源蛋白都分泌到枯草杆菌胞外, 但是在枯草杆菌中实现外源蛋白的分泌已经具有很大的优势, 尤其是对可分泌纤维素酶的重组菌构建有重要意义, 因为纤维素底物一般无法穿膜到细胞内, 只能通过细胞分泌到胞外的纤维素酶对其进行

降解。

在枯草杆菌中共表达 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶基因时存在基因表达的先后问题, 先表达内切葡聚糖酶 *celA* 基因时, 其内切葡聚糖酶酶活比后表达 *celA* 基因时要高一些, 如 WB800(pP43JM2-*celA**bglA*)的胞内外粗酶液与 PASC 底物混合后生产还原糖的量分别为: 215.8 mg/L 和 336.2mg/L, WB800(pP43JM2-*celA**bglA*)的胞内外粗酶液与 PASC 底物混合后生产还原糖的量分别为: 114.5 mg/L 和 338.7 mg/L, 比后表达内切葡聚糖酶 *celA* 基因时的内切葡聚糖酶酶活要高, 如 WB800(pP43JM2-*bglA**celA*)的胞内外粗酶液与 PASC 底物混合后生产还原糖的量分别为: 66.8 mg/L 和 87.2 mg/L, WB800(pP43JM2-*bglB**celA*)的胞内外粗酶液与 PASC 底物混合后生产还原糖的量分别为: 43.8 mg/L 和 97.0 mg/L, 其内切葡聚糖酶酶活都偏低。

枯草杆菌在共表达纤维素酶基因时会存在一些代谢压力和负担, 在对其酶活表征时也有体现, 如单独表达 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 时, WB800(pP43JM2-*bglA*)胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 能生成 944.4 mg/L 的葡萄糖, 其利用纤维二糖底物的能力要比共表达时要高, 如 WB800(pP43JM2-*bglA**celA*)胞内粗酶液与纤维二糖底物混合, 生成 857.1 mg/L 的葡萄糖较 944.4 mg/L 要低, 这可能是因为在 WB800(pP43JM2-*bglA**celA*)中要在同一宿主内表达两个基因, 对菌体造成了一定的代谢负担。在枯草杆菌中共表达 *celA* 和 *bglB* 基因时其表达量也相对于单独表达 *celA* 或 *bglB* 基因时要弱一些。

第四章 结论与展望

(1) 将来源于多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 和 *bglB* 基因在枯草杆菌表达系统 WB800/pP43JM2 里进行了表达, *bglA* 基因还在枯草杆菌 WB800(WB600)/pMA5 中进行了表达, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 不能被分泌到胞外, 其在胞内对纤维二糖底物有很高的 β -葡萄糖苷酶酶活, 由于纤维二糖能够穿膜到细胞内, β -葡萄糖苷酶 *bglA* 能够对其利用, 携带了 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因的重组枯草杆菌能够在纤维二糖为唯一碳源的培养基中生长, *bglB* 基因能够在枯草杆菌中实现胞外的分泌型表达。

(2) 来源于热纤梭菌的耐热内切葡聚糖酶 *celA* 基因与来源于多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 基因在枯草杆菌表达系统 WB800/pP43JM2 中进行共表达, 构建了 *celAbglA* 和 *bglAcelA* 在枯草杆菌中的两种不同的串联表达方式, 都实现了内切葡聚糖酶 *celA* 和 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 在枯草杆菌中的共表达, 重组枯草杆菌 WB800(pP43JM2-*celAbglA*)和 WB800(pP43JM2-*bglAcelA*)都能够将内切葡聚糖酶 *celA* 有效地分泌到培养基中, 且对磷酸处理的微晶纤维素(PASC)有较高的活性, 在枯草杆菌胞内表达的 β -葡萄糖苷酶 *bglA* 对纤维二糖的水解能力较强。

(3) 耐热内切葡聚糖酶 *celA* 基因与来源于多粘芽孢杆菌的 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 基因在枯草杆菌表达系统 WB800/pP43JM2 中进行共表达, 构建了 *celAbglB* 和 *bglBcelA* 在枯草杆菌中的两种不同的串联表达方式, 都实现了内切葡聚糖酶 *celA* 和 β -葡萄糖苷酶 *bglB* 在枯草杆菌中的分泌型共表达, 内切葡聚糖酶 *celA* 能够被有效地分泌到培养基中, 且对磷酸处理的微晶纤维素(PASC)有较高的活性, β -葡萄糖苷酶 *bglB* 也能够被有效地分泌到胞外, 它对对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG) 水解能力较强而对纤维二糖的水解能力较弱。

(4) 纤维素酶是一个多酶复合体系的, 其对纤维素的完全降解需要内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶这三种酶的共同参与, 协调起作用才能完成。在枯草杆菌中共表达内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶正是基于这种考虑, 但要实现枯草杆菌重组菌完全降解纤维素的能力还需要更多地筛选出性能优良的纤维素酶组分以及实现它们在枯草杆菌中的分泌型共表达。

(5) 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒 pP43JM2 中包含了来自枯草杆菌自身的强的重叠启动子 P43 和枯草杆菌自身的中性蛋白酶信号肽 NprB, 不需要诱导就能够持续地表达外源蛋白并将其分泌到胞外, 但由于不同外源蛋白质性质的差异, 枯草杆菌表达系统 WB800/pP43JM2 对外源蛋白的表达和分泌也存在差异, 如果在分子基因水平上对枯草杆菌表达系统进行进一步的改进和完善, 提高外源蛋白的表达量和分泌效率, 使枯草杆菌重组菌的发酵液能够直接地水解底物, 就省去了需要花费大量成本的分离纯化环节,

这在纤维素酶基因的克隆和表达中尤为重要，因为纤维素底物结构的复杂性及其无法穿膜到细胞内，只能被分泌到培养基中或被分泌到细胞表面的纤维素酶降解，所以实现纤维素酶基因在枯草杆菌中的分泌型共表达有重要的意义和广阔的应用前景。

(6) 由于枯草杆菌具有生长快，营养需求简单，能够对纤维素水解液中己糖和戊糖进行利用，有高效的外源蛋白分泌能力，无致病性是工业安全菌等优点，被认为是生物炼制工业中非常具有潜力的菌种，如果在可降解纤维素的枯草杆菌重组菌中重构或者强化有关乳酸、燃料乙醇等生物基化学品的代谢路径，构建枯草杆菌整合生物工艺(CBP)菌种，将对实现更经济和环境友好的生物能源及生物炼制行业的更快发展具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] 中国科学院生物质资源战略研究组. 中国至 2050 年生物质资源科技发展路线图. 北京: 科学出版社, 2009
- [2] 史济春,曹湘洪. 生物燃料与可持续发展[J]. 中国石化出版社, 2007
- [3] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, *et al.* The path forward for biofuels and biomaterials[J]. *Science*. 2006, 311: 484-489
- [4] 宋安东, 裴广庆, 王风芹等. 中国燃料乙醇生产用原料的多元化探索[J]. 农业工程学报. 2008, 24: 302-307
- [5] Saha B C. Hemicellulose bioconversion[J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2003, 30: 279-291
- [6] 吕学斌. 木质纤维素转化为生物乙醇过程中关键问题的研究[D]. 天津大学, 2008
- [7] Fogarty W M, Kelly C T. *Microbial enzymes and biotechnology*[J]. Applied Science Publishers London, 1983
- [8] 李亚冰. 兼性厌氧纤维素酶产生菌的筛选及在沼气发酵中的应用[M]. 河北工业大学, 2009
- [9] 颜淑芳. 纤维素酶产生菌的选育鉴定及产酶性能研究[M]. 南昌大学, 2010
- [10] 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
- [11] Sharrock K R. Cellulase assay methods: a review[J]. *Biochemical and Biophysical methods*. 1988, 17: 81
- [12] Nidetzky B, Hayn M, Macarron R, *et al.* Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses[J]. *Biotechnology letters*. 1993, 15: 71-76
- [13] Zhang Y H P, Lynd L R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems[J]. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 88: 797-824
- [14] Wood T M, Garcia C V. Enzymology of cellulose degradation[J]. *Biodegradation*. 1990, 1: 147-161
- [15] Percival Zhang Y H, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies[J]. *Biotechnology advances*. 2006, 24: 452-481
- [16] Wood T M, Bhat K M. Methods for measuring cellulase activities[J]. *Methods Enzymol*. 1988, 160: 87-117
- [17] Percival Zhang Y H, Lynd L R. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by

- fungal cellulase[J]. *Biotechnology Bioeng.* 2006, 94: 888-898.
- [18] Hong J, Ye X, Percival Zhang Y H. Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications[J]. *Langmuir.* 2007, 23(25): 12535-12540
- [19] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure Appl. Chem.* 1987, 59: 257-268
- [20] Coward K G, Aiello M C, Kim S, Granda C, Holtzapple M. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity[J]. *Biotechnology Bioeng.* 2003, 82: 745-749
- [21] Johnson E A, Sakajoh M, Halliwell G, Madia A, Demain A L. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 43: 1125-1132.
- [22] Percival Zhang Y H, Lynd L R. Quantification of cell and cellulase mass concentrations during anaerobic cellulose fermentation: development of an ELISA-based method with application to *Clostridium thermocellum* batch cultures[J]. *Anal. Chem.* 2003, 75: 219-227.
- [23] Percival Zhang Y H, Lynd L R. Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*[J]. *Bacteriol.* 2005, 187: 99-106.
- [24] Zeigler D R. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition.* 2000, 1: *Bacillus subtilis* 168
- [25] 湯懋鼓, 童克忠, 陈慎等. 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 转化的研究 I. 受体菌株的筛选[J]. *微生物学报.* 1964, 10: 189-194
- [26] 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
- [27] Simonen M, Palva I. Protein secretion in *Bacillus species*[J]. *Microbiological reviews.* 1993, 57: 109-137
- [28] 张欢. 少根根霉脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达研究[M]. 北京化工大学, 2009
- [29] 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
- [30] Khasanov F K, Zvingila D J, Zainullin A A, *et al.* Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology[J]. *Molecular and General Genetics MGG.* 1992, 234: 494-497
- [31] Conrad B, Bashkirov V I, Hofemeister J. Imprecise excision of plasmid pE194 from the chromosomes of *Bacillus subtilis* pE194 insertion strains[J]. *Bacteriology.* 1992, 174: 6997-7002
- [32] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed J D H, *et al.* Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome[J]. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2004, 68: 207-233

- [33] Petit M A, Joliff G, Mesas J M, *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
- [34] Yao Q, Sun T, Chen G, *et al.* Heterologous expression and site-directed mutagenesis of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*[J]. Biotechnology letters. 2007, 29: 1243-1247
- [35] Aminov R I, Golovchenko N P, Ohmiya K. Expression of a *celE* gene from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus*[J]. Fermentation and bioengineering. 1995, 79: 530-537
- [36] Zhang X Z, Zhang Z, Zhu Z, *et al.* The noncellulosomal family 48 cellobiohydrolase from *Clostridium phytofermentans* ISDg: heterologous expression, characterization, and processivity[J]. Applied microbiology and biotechnology. 2010, 86: 525-533
- [37] Cho H Y, Yukawa H, Inui M, *et al.* Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800[J]. Applied and environmental microbiology. 2004, 70: 5704-5707
- [38] Arai T, Matsuoka S, Cho H Y, *et al.* Synthesis of *Clostridium cellulovorans* minicellulosomes by intercellular complementation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007, 104: 1456
- [39] Romero S, Merino E, Bolívar F, *et al.* Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism[J]. Applied and environmental microbiology. 2007, 73: 5190-5198
- [40] Liu J M, Xin X J, Bao J, *et al.* Cloning of thermostable cellulase genes of *Clostridium thermocellum* and their secretive expression in *Bacillus subtilis*[J]. Applied biochemistry and biotechnology. 2012, 166: 652-662
- [41] Zhang X Z, Sathitsuksanoh N, Zhu Z, *et al.* One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic engineering. 2011,
- [42] Dartois V, Coppee J, Colson C, *et al.* Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*[J]. Applied and environmental microbiology. 1994, 60: 1670-1673
- [43] Zhang X Z, Cui Z L, Hong Q, *et al.* High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800[J]. Applied and environmental microbiology. 2005, 71: 4101-4103
- [44] Luria S E, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance[J]. Genetics. 1943, 28: 491
- [45] Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Anagnostopoulos and spizizen, 1960, 81: 741-746.
- [46] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.

New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[47] 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: 1072

[48] 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

[49] Choi I S, Wi S G, Jung S R, *et al.* Characterization and application of recombinant β -glucosidase (BglH) from *Bacillus licheniformis* KCTC 1918[J]. Wood Science. 2009, 55: 329-334

[50] González-Candelas L, Aristoy M, Polaina J, *et al.* Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing beta-glucosidase activity in *Escherichia coli*[J]. Applied and environmental microbiology. 1989, 55: 3173-3177

致谢

本论文系在导师辛秀娟副教授和鲍杰教授的悉心指导下完成的。两位导师对学术科研认真求索的精神时刻激励着我。辛老师为人和蔼，亦师亦友，在我遇到困难时，辛老师给予了我莫大的鼓励和指引，让我能够面对挫折和学会了坚持。鲍老师学识渊博，治学态度严谨和工作认真负责的态度，让我深深地受益。从研究选题，方案的确定，实验结果分析讨论到论文的撰写和修改，都饱含了两位导师的汗水和智慧，在此，谨向两位导师表达我内心最真诚的感谢。

同时，十分感谢高秋强老师在论文修改过程中对我提供的帮助和建议，感谢胡凤仙老师、张建老师在实验和生活中对我的帮助。

感谢董宏伟师兄、楚德强师兄、刘建明师兄在实验中对我的指导和帮助，感谢王玉梅、国立浩、方镇宏、何燕青、顾翰琦、张瑶、王霞等同学在实验中给予我的帮助。

感谢我的父母，哥哥姐姐一直以来对我的关心和付出。

最后感谢所有关心我的老师、同学和朋友，谢谢你们。