

## 嗜碱芽孢杆菌耐热耐碱内切木聚糖酶基因的密码子优化及在毕赤酵母中的表达\*

# The Codon Optimization of Thermostable and Alkali-resisting Endo-xylanase from *Bacillus halodurans* S7 and Expression in *Pichia pastoris*

严 闯,尹李峰,周玉玲\*\*,张桂敏

YAN Chuang, YIN Lifeng, ZHOU Yuling, ZHANG Guimin

(湖北大学生命科学学院,生物资源绿色转化湖北省协同创新中心,湖北武汉 430062)

(Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Science, Hubei University, Wuhan, Hubei, 430062, China)

**摘要:**【目的】研究极端耐热耐碱的木聚糖酶,使其能够满足造纸行业中碱性高温的苛刻环境。【方法】将一种来源于嗜碱芽孢杆菌 S7 的耐热耐碱内切木聚糖酶基因(*xyn10A*)密码子进行优化,基因合成后克隆至 pH-BM905BDM 载体上,并转化毕赤酵母 GS115 菌株。【结果】木聚糖酶基因(*xyn10A*)优化后与原始序列比对相似性为 76.70%。基因合成后克隆到 pHBM905BDM 载体上,并成功转化毕赤酵母 GS115 菌株。通过交联木聚糖底物平板水解圈法初筛及摇瓶复筛得到一株产酶量较高的菌株,且其在摇瓶发酵第 10 天达到最高酶活力,为 495 U/mL。另外,糖基化分析表明该酶在毕赤酵母中表达时被糖基化修饰。【结论】密码子优化后的极端耐热耐碱木聚糖酶基因在毕赤酵母中成功表达。

**关键词:**嗜碱芽孢杆菌内切木聚糖酶 基因优化 表达 毕赤酵母

中图分类号:Q814 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2017)01-0100-06

**Abstract:**【Objective】Studying the extreme heat and alkali xylanase can satisfy the harsh environment with high temperature and alkaline in papermaking industry. 【Methods】A xylanase gene derived from an alkalophilic *Bacillus* S7 (*xyn10A*) is codon optimized, then cloned into pHBM905BDM vector, and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115. 【Results】The similarity between the optimized xylanase gene (*xyn10A*) and the original sequence is 76.70%. Then the gene is cloned into pHBM905BDM vector and successfully transformed into *P. pastoris* GS115. The transformations are screened on the RBB-xylan plate, then in the shake flask fermentation a high expression strain is obtained. The highest activity is 495 U/mL at the 10th day of the shake fermentation. In addition, glycosylation analysis shows that the enzyme is glycosylated in *P. pastoris*. 【Conclusion】The optimized extreme heat and alkali resistance xylanase gene are successfully expressed in *P. pastoris*.

收稿日期:2017-01-15

作者简介:严 闯(1990—),男,研究生,主要从事酶基因的克隆与表达。

\* 国家“863”高科技项目(2012AA022203C)资助。

\*\* 通信作者:周玉玲(1975—),女,副教授,主要从事微生物与酶基因资源的挖掘,E-mail:zyl609@hubu.edu.cn。

**Key words:** thermostable and alkali-resisting xylanase, codon optimization, expression, *Pichia pastoris*

## 0 引言

**【研究意义】**木聚糖是植物细胞壁半纤维素的重要组成部分,它是自然界中含量仅次于纤维素的第二大丰富的多聚糖,几乎占地球可再生碳源的三分之一<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶(Endo- $\beta$ -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8)主要从糖链内部作用于 $\beta$ -1,4-糖苷键,能够专一降解木聚糖为低聚木糖和木寡糖,是木聚糖降解过程中最重要的酶之一<sup>[1]</sup>。自然界能够产生木聚糖酶的微生物有很多,包括丝状真菌、细菌、放线菌等。不同微生物来源的木聚糖酶,其理化性质和分子量不尽相同,分子量从7.7 kDa到150 kDa不等,绝大多数为20~40 kDa,最适pH值在2~11都有分布<sup>[2-4]</sup>。木聚糖酶在造纸、食品、饲料、纺织和能源等工业领域都有着广泛的应用前景<sup>[5]</sup>,特别是在造纸行业。木聚糖酶可以解聚凝结于纤维表面的半纤维素,提高漂白剂在纸浆中的扩散速度,提高漂白效率,减少氯的使用量<sup>[6]</sup>,因此可用于纸浆的预漂白、二次纤维的脱墨等。近几年,国家倡导“绿色工艺”,要求工业上减少能源消耗,降低污水排放;而造纸行业由于大量使用氯漂白、酸碱清洗的缘故,污染比较严重,环保及节能减排压力很大,技术更新需求迫切。在造纸上添加木聚糖酶可减少氯的排放和酸碱的使用,有利于绿色工艺,然而并不是所有的木聚糖酶能够满足造纸行业碱性高温的苛刻环境,只有极端耐热耐碱的木聚糖酶才能满足这样的条件<sup>[6-10]</sup>。**【前人研究进展】**2016年Lu等<sup>[11]</sup>将来源于*Bacillus pumilus* HBP8的耐热木聚糖酶188位点的天冬酰胺突变为丙氨酸后,酶的热稳定性提高,通过基因优化并在毕赤酵母中实现高效表达;在纸张漂白过程中补加15 U/g的木聚糖酶可提高纸张2%的亮度,13%的强度,6.5%的破裂系数。因此,在纸张漂白过程中添加耐热耐碱的木聚糖酶有助于纸张的漂白及性质的改善。**【本研究切入点】**来源于嗜碱芽孢杆菌S7(*Bacillus halodurans* S7)的木聚糖酶最适温度为75℃,最适pH值为9,并且该酶在很广的pH值范围内都有酶活力<sup>[12]</sup>,因此该酶能够满足造纸行业碱性高温的苛刻环境。**【拟解决的关键问题】**根据该酶的基因序列(GenBank: AY687345)进行密码子优化后合成新的基因(GenBank: KX712250),并将其克隆到pH-BM905BDM载体上,然后通过电转法转入毕赤酵母GS115;最后通过交联木聚糖底物平板水解圈法对重组菌进行初筛以及摇瓶诱导后比较酶活力大小进行复筛,筛选得到一株产酶量较高的高产菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 克隆菌株,用于重组质粒的构建;毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115菌株,用于目的蛋白的发酵表达;pH-BM905BDM质粒(来源于本实验室<sup>[8]</sup>)。

#### 1.1.2 试剂

*Not* I、*Cop* I、*Sal* I等限制性内切酶,T4 DNA polymerase、Solution I连接酶,Ex Taq酶均购自TaKaRa公司;Endo H购自BioLabs公司;DNA分子量标准 $\lambda$ /EcoT14与DL 2000、dNTP购自TaKaRa公司;预染蛋白Marker购自Thermo公司;木聚糖、YNB、考马斯亮蓝以及溴化乙锭(EB)购自Sigma公司。引物合成及测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,密码子优化及基因合成由武汉金开瑞生物工程有限公司完成。

#### 1.1.3 培养基

LB培养基,用于大肠杆菌的培养;YPD、MD、BMGY和BMMY培养基,用于毕赤酵母的培养、筛选和诱导表达,具体配方见Invitrogen公司的毕赤酵母操作手册。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 密码子优化

许多数据证明,优化外源基因密码子对提高外源蛋白表达量有显著的作用,可以使表达量提高几倍甚至数十倍<sup>[13-15]</sup>。因此在保证氨基酸序列不变的前体下,尽量使用毕赤酵母偏爱密码子对外源基因序列进行改造。对毕赤酵母密码子的偏好性有不同的算法<sup>[16-17]</sup>,很多研究也给出酵母稀有密码子及偏爱密码子表,可以根据这些算法及偏爱密码子统计表对目的基因密码子序列进行改造<sup>[13-15]</sup>。此外,还可以通过一些密码子优化网站(<http://helixweb.nih.gov/dna-works>)对密码子序列进行改造。

#### 1.2.2 pHBM905BDM-*xyn*质粒的构建

用限制酶*Cop* I和*Not* I双酶切处理pH-BM905BDM质粒,琼脂糖凝胶回收大片段作为载体。以武汉金开瑞生物工程有限公司合成的基因构建的pMD18T-*xyn*质粒为模板,用木聚糖酶基因(大小为1 116 bp)的前引物*xyn*F(5'-GTCAAACGTTGCTGCTGCTCAA-3')和后引物*xyn*R(5'-GGCCATTAATCGATGATTCTCCAA T-3')进行PCR扩增,扩增条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸70 s,25个循

环;72℃再延伸 5 min。PCR 扩增后胶回收 PCR 片段,用 T4 DNA 聚合酶与 dTTP 于 12℃ 条件下处理 20 min,得到与限制酶 *Cop* I 和 *Not* I 酶切位点有相同粘性末端的的目的片段,再用 Solution I 连接酶将质粒与目的片段按 1 : 3 的摩尔比在 16℃ 条件下连接 2 h,将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  克隆感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体平板,37℃ 过夜培养。pHBM905BDM-*xyn* 质粒的构建流程具体如图 1 所示。

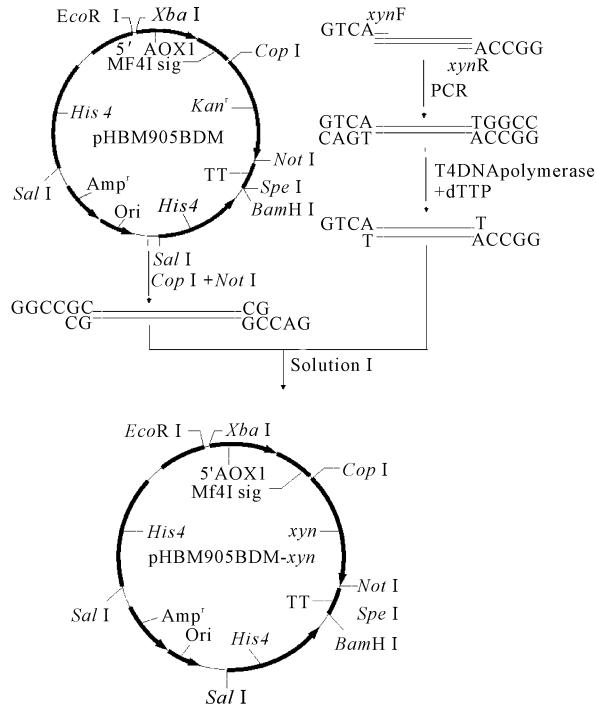


图 1 重组质粒 pHBM905BDM-*xyn* 的构建流程  
Fig. 1 The flow chart of construct recombinant vector pHBM905BDM-*xyn*

1.2.3 重组质粒 pHBM905BDM-*xyn* 的验证  
待平板上长出单菌落后,挑选部分转化子分别作为模板,以引物 *xyn*F 和 *xyn*R 进行菌落 PCR 验证,PCR 扩增条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 70 s,30 个循环;72℃ 再延伸 5 min。将能扩增得到目的条带的转化子摇瓶培养后抽提质粒并测序验证,得到的重组质粒命名为 pHBM905BDM-*xyn*。

1.2.4 目的基因的转化  
用限制酶 *Sal* I 将 pHBM905BDM-*xyn* 质粒进行线性化并回收大片段。取 80  $\mu$ L 毕赤酵母 GS115 感受态细胞与 5~20 ng 线性化 DNA(溶于 10  $\mu$ L TE 缓冲液)混合后,转入预冷的 0.2 cm 电转杯中,冰上放置 5 min,根据参数电击,最后加入 1 mL 1

mol/L PBST 30℃ 静置培养 2 h 后涂布 MD 平板。28℃ 培养 2~3 d 直至长出单菌落,挑选单菌落以引物 *xyn*F 和 *xyn*R 进行菌落 PCR 验证,PCR 扩增条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 70 s,30 个循环;72℃ 再延伸 5 min。

1.2.5 木聚糖酶基因的表达与高产菌株的初筛  
挑选 MD 平板上筛选出的重组子接种在含有桦木木聚糖的 BMMY 底物平板上,每 12 h 加 400  $\mu$ L 甲醇诱导木聚糖酶基因表达。产木聚糖酶的重组菌落会水解底物平板上的交联木聚糖从而产生水解圈,根据产生水解圈的速度和大小可以初步筛选出酶活力较高的重组菌落。

1.2.6 高产菌株的复筛  
将初筛得到的重组菌落做好标记,分别接种到 50 mL BMGY 种子培养基中,28℃ 摇瓶培养至  $OD_{600} = 20 \sim 30$  时,将菌体量调一致后分别离心收集菌体并转接至 25 mL BMMY 诱导培养基中,同时添加 400  $\mu$ L 甲醇,于 28℃ 摇瓶诱导发酵。每隔 24 h 在超净工作台中取出 400  $\mu$ L 发酵液并添加 400  $\mu$ L 甲醇,诱导 10 d。将发酵液于 12 000 r/min 条件下离心 1 min,得上清液即为粗酶液。用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[8,13]</sup>测定木聚糖酶酶活力,具体步骤如下:取 100  $\mu$ L 用 glycine-NaOH 缓冲液(pH 值为 9.0)稀释适当倍数的粗酶液和 100  $\mu$ L 溶解在 glycine-NaOH 缓冲液(pH 值为 9.0)中的 1%(W/V)桦木木聚糖溶液于 70℃ 反应 10 min,然后 100℃ 灭活 5 min,冷却后加入 250  $\mu$ L DNS 溶液并在 100℃ 反应 5 min,冷却至室温后加入 500  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 混匀后在 540 nm 处测其吸光度。酶活力单位(U)定义:在该测试条件下每分钟生成 1  $\mu$ mol 的木糖所需要的酶量作为一个酶活力单位(U)。比较不同重组子的酶活力大小,进一步筛选出酶活力较高的重组菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 密码子优化

为提高木聚糖酶 *xyn10A* 在毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 中的表达量,依据毕赤酵母的密码子偏好性对该木聚糖酶基因(GenBank: AY687345)的密码子进行优化(新登录号: KX712250)。原始基因序列中含有的稀有密码子会降低蛋白翻译的效率,甚至终止翻译过程。因此,对 *xyn10A* 基因序列中的 228 个稀有密码子进行优化,提高毕赤酵母的最适密码子使用频率。通过 DNAMEN 软件分析优化后的 *xyn10A* 序列与原始基因序列比对一致性为 76.70% (图 2)。

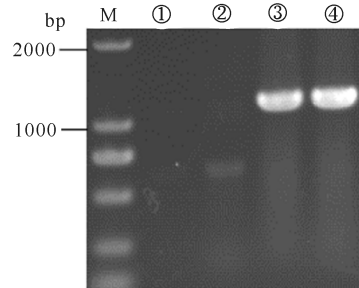
Original	1	AATGTAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCAACAAAATCTGGAGTCTTTGGAGAAATCAAAA
Optimized	1	AACGTTGCTGCTGCTCAAGGTGTCCACCAAGCTCTGTTGTTTTGGTGAGAACCAAGA
Original	61	AGAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTTCTGAGCGATATCAAGAGCAG
Optimized	61	AGAAACGACCAGCCATTGCTTGGCAAGTTGCTTCTTTGTCGAGAGATACCAAGAGCAG
Original	121	TTTGATATTGGAGCTGCGGTGAGCCCTATCAATAGAAAGAAACAAGCCAAATTTTA
Optimized	121	TTCGACATTGGTCTGCTGTTGAGCCATACCAATTGGAGGTTAGACAGGCTCAGATTTTG
Original	181	AAGCATCATATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAACCTGTATCACTCCAGCCA
Optimized	181	AAGCACCACTACAATTCTTGGTGTGAGAACGCTTGAAGCCAGTTTCTTGAACCT
Original	241	AGAGAAGTGAAGTGAAGTGGGAAGGCGCTGACAAAATTTGGAGATTGCCCCAAACAT
Optimized	241	AGAGAAGTGAATGGAAGTGGGAAGGCTGACAAAGATCGTTGAGTTGGAGTGAAGAAGCAG
Original	301	AACATGGAGCTTCGCTCCACACACTCGTTGGCAGTACCAAGTCCAGAAATGGTTTTTC
Optimized	301	AACATGGAATTGAGATTCCACACTTTGGTTGGCACTCCCAAGTCCACAGTGGTTCTTC
Original	361	ATCGATGAAAATGGCAATCGGATGGTTGATGAAACCGATCCAGAAAACGTAAGCGAAT
Optimized	361	ATTGACGAGAAAGGTAACGAAATGGTTGACGAGACTGACCCAGAAAAGAGAAGGCTAAC
Original	421	AAACAATTTGTTTGGAGCGAATGGAAAACCATATAAAAAGGTTTGAACGTTATAAAA
Optimized	421	AAGCAGTTGTTGTTGAGAGAAATGGAAAACCACTCAAGACTGTTGTTGAAGATACAAG
Original	481	GATGATGTGACTTCATGGGATGTTGGTAATGAAGTATTGATGATGGCGGGCCCTCCGT
Optimized	481	GACGACGTTACTTCTGGGACGTTGTTAACGAGGTTATTGATGACGGTGGTTTGAGA
Original	541	GAATCAGAAATGGTATCAAAATACAGGCACTGACTACATTAAAGTAGCTTTGAACTGCA
Optimized	541	GAATCCGAGTGGTATCAGATCACTGGTACTGACTACATCAAGGTTGCTTCGAGACTGCT
Original	601	AGAAAATATGGTGGTGAAGAGGCAAGCTGTACATTAAATGATTACAACCCAAAGTACCT
Optimized	601	AGAAAGTACGGTGGTGAAGAGGCTAAGTTGTACATCAACGACTACAACACTGAGGTTCCA
Original	661	TCTAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGGTGAAGACTTATTAGAGCAAGGAGTACCAATT
Optimized	661	TCCAAGAGAGATGACTTGTACAATTGGTTAAGGACTTGTGGAGCAGGGTGTCCAATT
Original	721	GACGGGTAGGACATGAGCTTCATATCCAATCGGCTGGCCTTCCATTGAAGATACAAGA
Optimized	721	GATGGTGTGGTACCAATCCACATTGAGTGGTTGGCCATCCATCGAGGACACTAGA
Original	781	GCTTCTTTTAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACACCAAGTAACTGAAGTACAGATG
Optimized	781	GCTTCTTTGAGAAGTTCACTTCTTGGGTTTGACACCAAGTAACTGAGTTGGATATG
Original	841	AGTCTTTATGGTGGCCACCGACAGGGGCTTACCTCTTATGACGACATTCCAGAAGAG
Optimized	841	TCCTGTACGGTTGGCCACCACTGGTGTACACTTCTTACGACGACATCCAGAAGAG
Original	901	CITTTTCAAGCTCAAGCAGACCGTTTATGATGAGCTATTGAGTTATGAAGAATAAAGC
Optimized	901	TTGTTCCAAGCTCAAGCTGACAGATACGACAGTTGTTGAGTTGATGAGGAATTGTCC
Original	961	GCTACTACTAGTAGTGAACCTTCTGGGGAATGCTGATAACCATACATGGCTTGATGAC
Optimized	961	GCTACTACTCTCCCTTACATCTCTGGGGAATGCTGATAACCACACTTGGTTGGATGAC
Original	1021	CGCGTAGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGGTCGATGCCAATTGTTTTGATCACAAC
Optimized	1021	AGAGCTAGAGAGTACAACAAGGAGTTGGTGTGAGCGCTCCATTGTTTTGACCAACAAC
Original	1081	TATCGAGTGAAGCCTCTTACTGGAGAATTATTGAT
Optimized	1081	TACAGAGTTAAGCAGCTATTGGAGAATCATCGAT

图2 *xyn10A* 序列与原始基因序列比对

Fig. 2 *xyn10A* alignment with original gene sequence

## 2.2 重组质粒 pHBM905BDM-*xyn* 的 PCR 验证

分别以 pHBM905BDM 质粒和构建好的 pHBM905BDM-*xyn* 质粒为模板,使用引物对木聚糖酶基因(大小为 1116 bp)进行 PCR 扩增(图 3),从图中可以看出以 pHBM905BDM-*xyn* 质粒为模板的 PCR 在 1100 bp 左右处出现一条亮带,证明重组质粒 pHBM905BDM-*xyn* 构建成功。



M: DNA Marker DL 2000; ①、②: 以 pHBM905BDM 质粒为模板; ③、④: 以 pHBM905BDM-*xyn* 质粒为模板

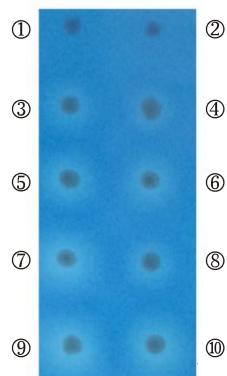
M: DNA Marker DL 2000; ①、②: pHBM905BDM plasmid as template; ③、④: pHBM905BDM-*xyn* plasmid as template

图 3 pHBM905BDM-*xyn* 重组质粒的 PCR 验证

Fig. 3 The PCR verification of pHBM905BDM-*xyn* recombinant plasmid

## 2.3 木聚糖酶基因的表达与高产菌株的初筛

将测序验证后的 pHBM905BDM-*xyn* 重组质粒用限制酶 *Sal* I 线性化后电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞,涂在 MD 平板上筛选重组子,挑取转化子进行菌落 PCR 验证后,挑取 MD 平板上的单菌落转接到含桦木木聚糖底物的平板 BMMY 上并加甲醇诱导,根据产生水解圈的快慢和大小初步筛选酶活力较高的重组菌,从图 4 中可以看出 ③~⑩都产生水解圈,可以进行下一步实验。



①GS115; ②GS115/ pHBM905BDM; ③~⑩重组酵母

①GS115; ②GS115/ pHBM905BDM; ③~⑩ The recombinant strains

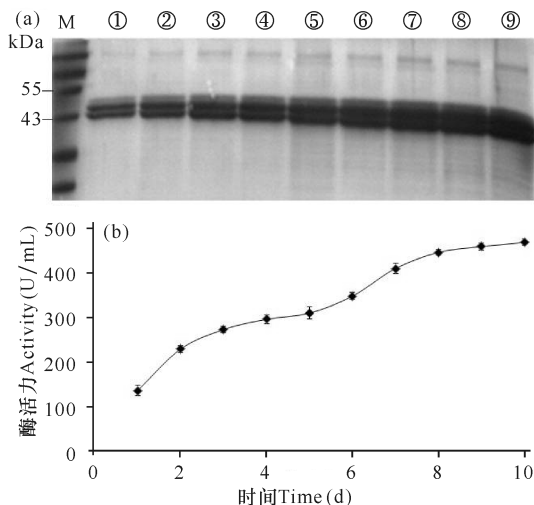
图 4 重组子的初步筛选

Fig. 4 Preliminary screening of the recombinants

## 2.4 高产菌株的复筛

通过初筛,挑选 6 株产生水解圈较快、较大的重组菌。将这 6 株菌进行摇瓶诱导复筛得一株酶活力相对较高的菌株。甲醇诱导 10 d,每隔 24 h 取其发酵上清液测活并用 SDS-PAGE 检测表达量,结果如图 5。由图 5b 可知,随着诱导时间的延长,木聚糖酶的表达量和酶活力在逐步提高,诱导 8 d 以后酶的表达量和酶活力在逐步提高,诱导 8 d 以后酶的表达量和酶活力在逐步提高。

达量和酶活力基本趋于稳定,在第 10 天最高活力达到 495 U/mL。



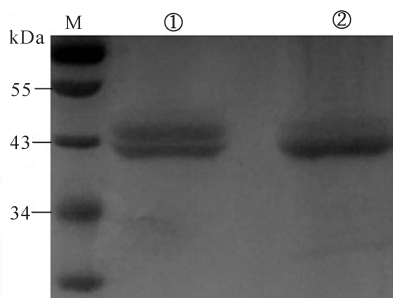
(a) SDS-PAGE 检测木聚糖酶的表达,其中 M 为 Marker, ①~⑨泳道分别为 2 号菌加甲醇诱导 10 d,每 24 h 的表达量; (b) 重组木聚糖酶的产酶曲线

(a) SDS-PAGE analysis of high-yield strain 2, M: Marker; Lane ①~⑨, the samples at 24-interval for 10 d; (b) Enzyme production of recombinant xylanase

图 5 2 号菌不同诱导时间木聚糖酶的表达量和产酶曲线

Fig. 5 Expression of xylanase and its enzyme production curve at different induction time

该木聚糖基因长度为 1 116 bp,预测蛋白质分子量约为 43 kDa,由图 5a 可以看出表达的蛋白大小基本正确。然而图中有两条带,推测较大分子量的蛋白可能是木聚糖酶在酵母中表达糖基化修饰造成的。因此,用去糖基化酶 Endo H 处理,验证是否发生糖基化修饰<sup>[18]</sup>,结果如图 6 所示。SDS-PAGE 表明,经去糖基化酶 Endo H 处理后发酵液中的木聚糖酶条带由两条变为一条,且分子量变小,证明该酶在毕赤酵母中表达时的确发生糖基化修饰。



M: 预染蛋白 Marker; ①未用 Endo H 糖基化酶处理的粗酶液; ②用 Endo H 糖基化酶处理后的酶液

M: marker; ①The crude enzyme solution was not treated with Endo H; ②Xylanase treated with Endo H

图 6 木聚糖酶糖基化验证

Fig. 6 Glycosylation analysis of xylanase

### 3 讨论

毕赤酵母表达系统由于遗传背景清晰、安全性好,具有较强的醇氧化酶基因 (Alcohol Oxidase, AOX1) 启动子,并能严格调控外源蛋白的表达,获得外源蛋白的表达量高,因此得到广泛应用,并已成功表达数百种外源蛋白<sup>[19-21]</sup>。由于巴斯德毕赤酵母存在特殊的密码子使用偏好,在所有 61 个密码子中有 25 个是毕赤酵母所偏爱的<sup>[22-24]</sup>,如果外源基因密码子偏爱性不同于宿主毕赤酵母,将导致外源蛋白表达量低或表达出没有生物学功能的外源蛋白<sup>[25]</sup>。研究表明,密码子优化是提高外源蛋白在毕赤酵母中表达量的有效策略之一<sup>[11,26]</sup>。本研究成功地将一种来源于嗜碱芽孢杆菌 S7 的内切木聚糖酶基因 (*xyn10A*) 经密码子优化后克隆到 pHBM905BDM 载体上并转化毕赤酵母 GS115 菌株,实现该酶的分泌表达,并通过底物平板水解圈法和摇瓶发酵比较酶活力大小筛选出产酶量较高的菌株。

基因剂量效应是影响蛋白表达量的重要因素。重组质粒在毕赤酵母染色体上整合一般为单拷贝,但是在甲醇诱导的  $P_{AOX1}$  强启动子下,即使单拷贝也能获得外源蛋白高水平表达。一般情况下外源基因整合的拷贝数越高,蛋白的表达量就越高。为进一步提高该酶的表达量,可以用“生物砖”法构建多拷贝质粒<sup>[27]</sup>,进一步筛选出产酶量更高的菌株。

虽然该酶在毕赤酵母表达系统中成功表达,但该酶的活性不高,摇瓶发酵只有 495 U/mL,而现在很多木聚糖酶的活力可以很高,如 Lu 等<sup>[11]</sup>在毕赤酵母中表达的木聚糖酶的活力可达到 6 043 U/mL。由于该酶耐热耐碱,可以进一步采用体外定向进化技术改造该酶基因,例如根据该酶已经解析过的结构对其进行一些理性改造,合理构建突变体库筛选出热稳定性更好,酶活力更高的重组木聚糖酶,进一步满足工业化大规模生产的要求。

### 4 结论

本研究将来源于嗜碱芽孢杆菌 S7 的耐热耐碱内切木聚糖酶基因 (*xyn10A*) 经密码子优化合成后克隆到 pHBM905BDM 载体上,成功转化毕赤酵母 GS115 菌株后,通过交联木聚糖底物平板水解圈法筛选得到一株产酶量较高的菌株,可用于后续造纸工业纸浆的漂白预处理。

### 参考文献:

[1] PRADE R A. Xylanases: From biology to biotechnology

- [J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1996,13(1):101-132.
- [2] YAMAURA I, MATSUMOTO T, FUNATSU M, et al. Purification and some properties of endo-1,3- $\beta$ -D-xylanase from *Pseudomonas* sp. PT-5[J]. *Agric Biol Chem*, 1990,54(4):921-926.
- [3] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005,29(1):3-23.
- [4] 邵婷婷,王春明,李衡香,等. *Bacillus subtilis* JH-1 木聚糖酶的纯化及酶学性质 [J]. *生物加工过程*, 2016,14(5):51-55.
- SHAO T T, WANG C M, LI H X, et al. Purification and characterization of xylanase from *Bacillus subtilis* JH-1 [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2016,14(5):51-55.
- [5] 阮同琦,赵祥颖,刘建军. 木聚糖酶及其应用研究进展 [J]. *山东食品发酵*, 2008(1):42-45.
- RUAN T Q, ZHAO X Y, LIU J J. Research progress of xylanase and its application [J]. *Shandong Food Ferment*, 2008(1):42-45.
- [6] ZHAO J, LI X Z, QU Y B. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw [J]. *Biore-source Technology*, 2006,97(13):1470-1476.
- [7] COSSON T, VENDRELL A M P, TERESA B G, et al. Enzymatic assays for xylanase and  $\beta$ -glucanase feed enzymes [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1999,77(3/4):345-353.
- [8] ZHANG G M, HUANG J, HUANG G R, et al. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007,74(2):339-346.
- [9] 聂国兴,王俊丽,明红. 木聚糖酶的应用现状与研发热点 [J]. *工业微生物*, 2008,38(1):53-59.
- NIE G X, WANG J L, MING H. Application status of xylanase and its hottopics of researches and developments [J]. *Industrial Microbiology*, 2008,38(1):53-59.
- [10] 徐晓丽. 麦草浆预处理用木聚糖酶的制备与应用 [D]. 南京:南京农业大学, 2005.
- XU X L. Pretreatment of wheat straw pulp with xylanase preparation and application [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.
- [11] LU Y H, FANG C, WANG Q H, et al. High-level expression of improved thermo-stable alkaline xylanase variant in *Pichia pastoris* through codon optimization, multiple gene insertion and high-density fermentation [J]. *Scientific Reports*, 2016,6:37869.
- [12] MAMO G, HATTI-KAUL R, MATTIASSON B. A thermostable alkaline active endo- $\beta$ -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7; Purification and characterization [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006,39(7):1492-1498.
- [13] YANG J K, LIU L Y. Codon optimization through a two-step gene synthesis leads to a high-level expression of *Aspergillus niger lip2* gene in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010,63(3/4):164-169.
- [14] WU A B, CHEN H D, TANG Z Z, et al. Synthesis of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene using yeast preferred codons and its expression in *Pichia pastoris* [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2008,175(1/2/3):403-405.
- [15] 陈惠,赵海霞,王红宁,等. 植酸酶基因中稀有密码子的改造提高其在毕赤酵母中的表达量 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005,21(2):171-175.
- CHEN H, ZHAO H X, WANG H N, et al. Increasing expression level of phytase gene (*phyA*) in *Pichia pastoris* by changing rare codons [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005,21(2):171-175.
- [16] LLOYD A T, SHARP P M. Synonymous codon usage in *Kluyveromyces lactis* [J]. *Yeast*, 1993,9(11):1219-1228.
- [17] SHARP P M, COWE E. Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1991,7(7):657-678.
- [18] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959,31(3):426-428.
- [19] CREGG J M, VEDVICK T S, RASCHKE W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. *Nature Biotechnology*, 1993,11(8):905-910.
- [20] PENG Y C, ACHESON N H. Production of active polyomavirus large T antigen in yeast *Pichia pastoris* [J]. *Virus Research*, 1997,49(1):41-47.
- [21] CREGG J M, CEREGHINO J L, SHI J Y, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. *Molecular Biotechnology*, 2000,16(1):23-25.
- [22] 赵翔,霍克克,李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析 [J]. *生物工程学报*, 2000,16(3):308-311.
- ZHAO X, HUO K K, LI Y Y. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000,16(3):308-311.
- [23] GRANTHAM R, GAUTIER C, GOUY M, et al. Codon catalog usage and the genome hypothesis [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980,8(1):r49-r62.
- [24] SHARP P M, TUOHY T M F, MOSURSKI K R. Codon usage in yeast; Cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986,14(13):5125-5143.
- [25] SCORER C A, BUCKHOLZ R G, CLARE J J, et al. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *Gene*, 1993,136(1/2):111-119.
- [26] CHANG S W, SHIEH C J, LEE G C, et al. Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa* LIP1 gene and optimum production of recombinant LIP1 expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 2005,67(2):215-224.
- [27] CREGG J M, TSCHOPP J F, STILLMAN C, et al. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* [J]. *Nature Biotechnology*, 1987,5(5):479-485.

(责任编辑:米慧芝)