

# 冰岛硫化叶菌 $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶的同源表达、纯化与性质

朱 涇 赵述森 彭 楠 梁运祥

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 利用 PCR 技术从冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)REY15A 中分别扩增得到带有和不带有信号肽编码序列的  $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶基因(*S. islandicus eng*), 将其克隆至硫化叶菌表达载体 pZC2 中, 构建重组表达载体 pZC2-eng-YS 和 pZC2-eng-WS, 并转化至 *S. islandicus* E233S( $\Delta$ pyrEF $\Delta$ lacS)。重组菌株经 D-阿拉伯糖诱导后, 细胞破碎上清经镍离子金属螯合亲和层析介质(Ni-NTA)柱纯化, 得到重组蛋白。SDS-PAGE 结果表明: 不带有信号肽的葡聚糖酶(ENG-W)分子质量为 41 ku, 带有信号肽的分子质量(ENG-SP)为 43 ku; 酶学性质分析表明前者没有酶活性, 后者酶活力为 103.4 U/L, 最适反应温度为 90  $^{\circ}$ C, 最适 pH 为 4.0。耐热性试验结果表明: 在 90  $^{\circ}$ C 保温 60 min 后酶活力稳定在最高酶活力的 40% 以上。金属离子试验结果表明:  $Mn^{2+}$  对重组酶促进作用最大, 使其酶活力提高了约 50%,  $Ca^{2+}$  对其抑制作用最强, 使其酶活力下降了约 50%。

**关键词** 冰岛硫化叶菌;  $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶; 同源表达; 硫化叶菌表达载体 pZC2; 重组蛋白

**中图分类号** Q 936 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0674-06

纤维素是自然界中分布最广且含量最多的一种结构多糖。纤维素的利用与转化有希望用于解决目前世界能源危机、粮食短缺及环境污染等问题<sup>[1-2]</sup>。内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶是一种能特异性作用于  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键的水解酶, 可与纤维素二糖水解酶及  $\beta$ -葡萄糖苷酶协同作用降解纤维素<sup>[1,3]</sup>, 这类酶作用于纤维素内部的非结晶区, 随机水解  $\beta$ -1,4-糖苷键, 将长链纤维素分子截短, 产生大量带非还原性末端的小分子纤维素。葡聚糖内切酶分子质量介于 23~146 ku, 不同来源的微生物差异较大, 如真菌的葡聚糖内切酶(endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase, EG)包括 2 种异构酶 EG I 和 EG III, 其中 EG I 分子质量为 54 ku, EG III 分子质量约为 49.8 ku, 而纤维粘菌 EG 有 2 种菌的内切酶, 分子质量只有 6.3 ku<sup>[4]</sup>。

冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)属于古菌域中的泉古菌门, 广泛的分布于冰岛、俄罗斯、美国等国家地热温泉的喷口处, 其最适生长温度为 75~80  $^{\circ}$ C, 最适 pH 为 2.0~3.0<sup>[5]</sup>。鉴于硫化叶菌具有在高温和低 pH 的极端环境下生长的特点, 研究者考虑从该类极端微生物中挖掘一些具有潜在工

业价值的嗜热酶。目前, 来源于硫化叶菌的木聚糖酶<sup>[6]</sup>、 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶<sup>[7]</sup>、 $\alpha$ -淀粉酶<sup>[8]</sup>等已经在大肠杆菌中成功表达, 研究表明这些酶均具有耐热的特性, 但在硫化叶菌中的同源表达还尚未见报道。本研究利用冰岛硫化叶菌蛋白表达系统, 在冰岛硫化叶菌中同源表达内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶, 探索该酶在工业化应用中的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1) 菌株与质粒。冰岛硫化叶菌 REY15A(*S. islandicus* REY15A)<sup>[9]</sup>、冰岛硫化叶菌 E233S(*S. islandicus* E233S( $\Delta$ pyrEF $\Delta$ lacS)<sup>[10]</sup>、硫化叶菌表达载体 pZC2<sup>[10]</sup>及大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株为华中农业大学农业微生物学国家重点实验室古菌研究室和发酵工程研究室保存。

2) 工具酶与试剂。细菌基因组抽提试剂盒, 通用型 DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。DNA 标

收稿日期: 2011-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100096, 31100050)

朱 涇, 硕士研究生, 研究方向: 应用微生物学。E-mail: zhujing\_0711@163.com

通讯作者: 梁运祥, 教授, 研究方向: 微生物产品及发酵工艺学。E-mail: fa-lyx@163.com

准品购自北京全式金生物技术有限公司,蛋白质分子质量标准购于 Fermentas 公司,引物及测序由上海英骏生物技术有限公司完成。镍离子金属螯合亲和层析介质(Ni-NTA)填料购自于 Novagen 公司。

3)培养基。硫化叶菌液体培养基及硫化叶菌双层平板配方参见文献[10-11]。LB 培养基配方参见文献[4]。根据试验需求,LB 液体及固体培养基中氨苄青霉素终质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 1.2 试验方法

1) *S. islandicus eng* 基因的克隆。研究表明冰岛硫化叶菌 *S. islandicus* REY15A 和 *S. solfataricus* P2 的基因组序列具有高达 95% 以上的同源性,同时软件(signalP 3.0)分析结果显示 *S. islandicus eng* 基因中含有 1 段信号肽序列,因此根据 Sso1949 (*S. solfataricus* P2 的葡聚糖酶基因)的基因序列及 *S. islandicus* REY15A 的基因组序列分别设计了带有信号肽和不带信号肽编码序列的引物:引物 1(带有信号肽编码序列): F1: (5'-AGCCGACGCGTATGAATAAATTATATATCATTATAGTT -3'); R1: (5'-ATTTGCGGCCGCGAGGAGAGTTTCAGAGAAAT-3');

引物 2(去除信号肽编码序列):

F2: (5'-AGCCGACGCGTATGGCTATTACCTACACCAT -3');

R2: (5'-ATTTGCGGCCGCGAGGAGAGTTTCAGAGAAATT -3')。

其中,下划线部分分别为引入的 *Mlu* I 和 *Not* I 限制性内切酶酶切位点。设计下游引物时去除 *S. islandicus eng* 基因的终止密码子 TAA 以便载体 pZC2 上 6 $\times$ His-tag 的表达。以 *S. islandicus* REY15A 的基因组为模板进行 PCR 扩增,扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,循环 30 次,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

2) *S. islandicus eng* 基因硫化叶菌表达载体的构建。用琼脂糖凝胶(agarose gel,1.0%)电泳检测 PCR 扩增产物并用清洁回收试剂盒进行回收纯化。纯化的 PCR 产物经 *Mlu* I 和 *Not* I 双酶切后,插入到硫化叶菌表达载体 pZC2 的 *Mlu* I 和 *Not* I 位点,分别构建含有信号肽的表达载体 pZC2-eng-YS 和不含信号肽的表达载体 pZC2-eng-WS,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。对转化子进行酶切验证,并将酶切验证正确的转化子送到上海英骏生物技术有限

公司测序。

3)硫化叶菌转化子的电转化及验证。抽取阳性克隆的质粒,经乙醇沉淀处理后电击转化至受体菌株 *S. islandicus* E233S( $\Delta$ *pyrEF* $\Delta$ *lacS*)。硫化叶菌感受态制备方法及电转化步骤等参见文献[12]。在表达载体 pZC2 多克隆位点的上游设计 1 条引物 SeqF (F3: 5'-AACTGGCGGTACATAGTGGTA-3'),同时以扩增葡聚糖酶编码基因的下游引物 R1, R2 作为另外 1 条引物,菌液 PCR 鉴定转化子。将含有 pZC2-eng-YS 和 pZC2-eng-WS 重组质粒的阳性转化子分别命名为 YS 和 WS。

4) *S. islandicus eng* 基因在硫化叶菌中的诱导表达及纯化。将重组菌 YS 和 WS 分别接种于 100 mL SCV<sub>y</sub>(生长培养基)中培养至  $D_{600} = 0.4 \sim 0.5$ ,离心收集菌体,重悬后加入 1 000 mL 终质量分数为 0.2% 的 *D*-阿拉伯糖诱导培养基 ACV<sub>y</sub> 中进行诱导表达,待  $D_{600}$  达到 0.8 以上后,8 000 r/min,20 min 离心收集细胞沉淀及培养液上清。超声波破碎细胞,4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 10 min 收集得到上清。将重组菌胞内上清及培养液上清过 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析柱纯化带有 His 标签的目的蛋白后,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测分析表达情况。

5)重组内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶的酶活性检测。采用羧甲基纤维素钠(CMC)为底物用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定内切葡聚糖酶的活性。取 0.5 mL 适当稀释的粗酶液,0.5% CMC 溶液 2.0 mL (用 pH 4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制),保温 30 min,取出加入 DNS 试剂 2.5 mL,沸水浴煮沸 5 min,用水定容至 25 mL,冷却后在 530 nm 波长下测定吸光度<sup>[13]</sup>。酶反应温度设定为 90  $^{\circ}\text{C}$ 。1 个酶活力单位定义为:在上述反应条件下,每分钟从质量浓度 4 mg/mL 的 CMC 溶液中降解释放 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)<sup>[14]</sup>。

6)重组葡聚糖酶的最适 pH 的测定。分别用 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的缓冲液稀释酶液,以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液作为反应底物,采用本文“1.2.5)”的方法测定酶活力。定义最高酶活力为 100%,计算不同 pH 条件下内切葡聚糖酶的相对酶活力。

7)重组葡聚糖酶的最适温度及耐热性的测定。将酶液分别在 40、50、60、70、80、90、100  $^{\circ}\text{C}$  中水浴保温 30 min,采用本文“1.2.5)”的方法测定酶活力。定义最高酶活力为 100%,计算不同温度条件下内

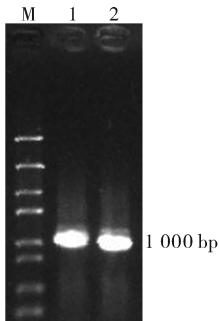
切葡聚糖酶的相对酶活力。将酶液分别置于 90 ℃ 中水浴保温 10、20、30、40、50、60 min, 然后立即冷却, 采用本文“1.2.5)”的方法测定剩余的酶活力。将未处理的酶活力定义为 100%, 计算不同时间处理后的相对酶活力。

8) 金属离子对重组葡聚糖酶的影响。在酶反应体系中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的不同种类金属离子, 同时以不添加任何金属离子的酶反应体系为对照, 采用本文“1.2.5)”的方法测定酶活力, 将对照组的酶活力定义为 100%, 计算相对酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 冰岛硫化叶菌 $\beta$ -1,4-内切葡聚糖酶的克隆

以 *S. islandicus* REY15A 的基因组 DNA 为模板, 并以 F1/R1 和 F2/R2 为引物进行特异性扩增, 分别得到含有信号肽和去除信号肽编码序列的内切葡聚糖酶编码基因 (*S. islandicus eng-y*, *S. islandicus eng-w*), 长度约为 1 000 和 930 bp, 与预期一致 (图 1)。



M. 蛋白质标记 DNA marker, Trans 5K DNA marker; 1. 带有信号肽的葡聚糖酶基因片段 *S. islandicus eng-y*; 2. 去除信号肽的葡聚糖酶基因片段 *S. islandicus eng-w*.

图 1 目的基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *S. islandicus eng-y* and *S. islandicus eng-w* gene

### 2.2 重组表达载体的构建

清洁回收 PCR 扩增产物, 连接到 pZC2 载体上, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。挑取转化子, 抽提质粒并用 *Mlu* I 和 *Not* I 双酶切验证, 得到 1 000 bp 左右和 8 400 bp 左右的预期目的片段 (图 2), 该结果显示目的基因已插入到表达载体 pZC2 上, 进一步测序表明, 该 PCR 片段没有发生突变。

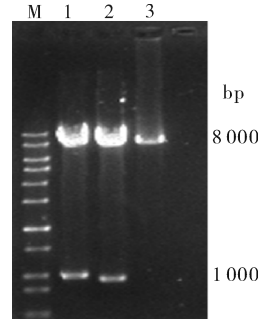
### 2.3 硫化叶菌转化子的鉴定

将重组质粒 pZC2-1949-YS 和 pZC2-1949-WS 分别电击转化至受体菌株 *S. islandicus* E233S, 得

到硫化叶菌转化子 YS 和 WS; 分别以 F3/R1 和 F3/R2 为引物按本文“1.2.3)”的方法对转化子进行菌液 PCR 鉴定, 得到 1 140 和 1 070 bp 的片段, 与预期一致, 说明重组质粒 pZC2-1949-YS 和 pZC2-1949-WS 已经成功转入到硫化叶菌中。

### 2.4 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析及酶活检测

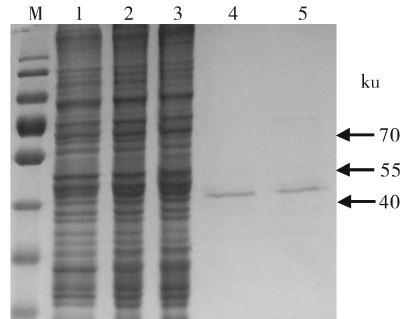
重组菌株 YS 和 WS 经 *D*-阿拉伯糖诱导表达后, 按本文“1.2.4)”的方法对培养液进行处理后, SDS-PAGE 检测  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶表达情况 (图 3)。



M. 蛋白质标记 DNA marker, 1 kb DNA marker; 1. 经 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切的重组质粒 pZC2-eng-YS pZC2-eng-YS digested with *Mlu* I and *Not* I; 2. 经 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切的重组质粒 pZC2-eng-WS pZC2-eng-WS digested with *Mlu* I and *Not* I; 3. 经 *Mlu* I 和 *Not* I 酶切的质粒 pZC2 pZC2 digested with *Mlu* I and *Not* I.

图 2 重组质粒的酶切验证

Fig. 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid



M. 蛋白质分子质量标准 Protein weight marker; 1. 空载 pZC2 重组菌株超声波处理后上清 Supernatant of pZC2 recombinant strain with ultrasonic treatment; 2. WS 重组菌株超声波处理后上清 Supernatant of WS recombinant strain with ultrasonic treatment; 3. YS 重组菌株超声波处理后上清 Supernatant of YS recombinant strain with ultrasonic treatment; 4. WS 重组菌株  $\text{Ni}^{2+}$  柱纯化蛋白 ENG-W Recombinant protein ENG-W of WS recombinant strain with  $\text{Ni}^{2+}$  purification; 5. YS 重组菌株  $\text{Ni}^{2+}$  柱纯化蛋白 ENG-SP Recombinant protein ENG-SP of YS recombinant strain with  $\text{Ni}^{2+}$  purification.

图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of recombinant protein by SDS-PAGE

结果表明:重组酶均在胞内表达并未分泌到胞外, *S. islandicus eng-y* 基因的表达产物 ENG-SP 的分子质量约为 43 ku, *S. islandicus eng-w* 基因的表达产物 ENG-W 的分子质量约为 41 ku,但两者的表达量不是很高。DNS 法酶活测定结果显示,重组酶 ENG-SP 酶活力为 103.4 U/L,而重组酶 ENG-W 检测不到酶活。

### 2.5 重组酶 ENG-SP 的最适 pH

按本文“1.2.6)”的方法将重组酶 ENG-SP 分别在不同 pH 缓冲液中反应,结果如图 4 所示。由图可以看出,ENG-SP 的最适 pH 为 4.0。在 pH 3.0~5.0 的范围内,酶活力均保持最高酶活力的 60%以上,在 pH 7.0~8.0 的范围内,ENG-SP 丧失了大部分活性,说明重组酶 ENG-SP 具有嗜酸的特性。

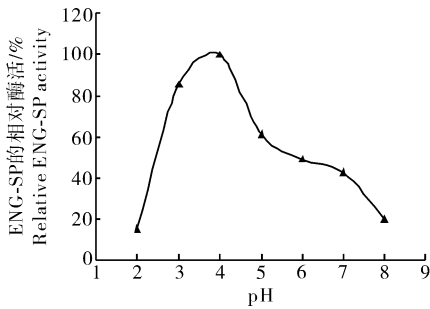


图 4 重组酶 ENG-SP 的最适 pH

Fig. 4 The optimal pH for recombinant ENG-SP

### 2.6 重组酶 ENG-SP 的最适温度及耐热性

按本文“1.2.7)”的方法将重组酶 ENG-SP 在不同温度中保温 30 min,检测酶的活力。试验结果显示该酶最适反应温度为 90 °C,在 70~100 °C 范围内酶活力均在最高酶活力的 60%以上(图 5),这说明该酶在高温下依然能保持相对较高的酶活力。耐热性试验结果表明 ENG-SP 对高温的耐受能力一般,在 90 °C 保温时,前 20 min 酶活力下降较快,20~60 min 酶活力稳定在最高酶活力的 40%以上(图 6)。

### 2.7 金属离子对重组酶 ENG-SP 的影响

按本文“1.2.8)”的方法检测不同金属离子对 ENG-SP 酶活力的影响,结果如图 7 所示,  $Mn^{2+}$ 、 $K^+$  和  $Co^{2+}$  对 ENG-SP 有较大促进作用,其中  $Mn^{2+}$  促使重组酶 ENG-SP 酶活力提高了约 50%,而  $Ca^{2+}$  对 ENG-SP 有较大抑制作用,使其相对酶活只有 50%。

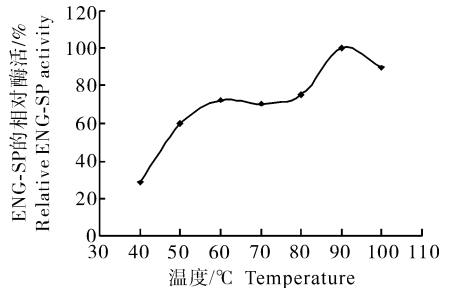


图 5 重组酶 ENG-SP 的最适反应温度

Fig. 5 The optimal temperature for recombinant enzyme ENG-SP

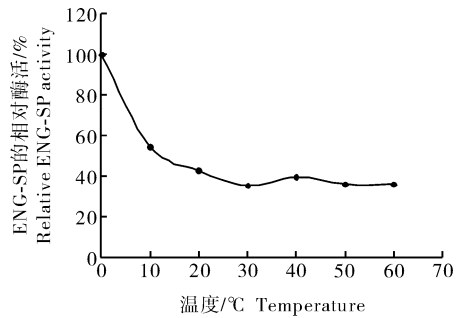


图 6 重组酶 ENG-SP 的耐热性试验

Fig. 6 The temperature stability of recombinant enzyme ENG-SP

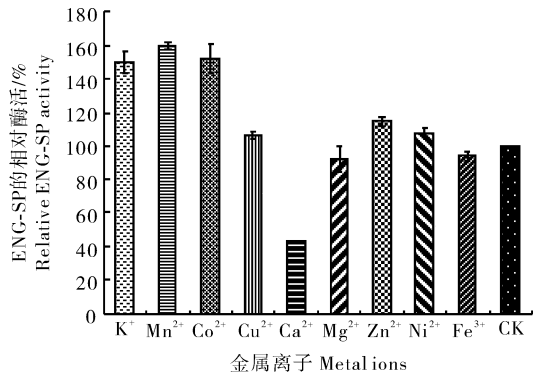


图 7 金属离子对重组酶 ENG-SP 的影响

Fig. 7 Effect of different metal ions on recombinant enzyme ENG-SP activity

## 3 讨论

据报道,硫化叶菌体内蛋白翻译后修饰作用对该蛋白耐热、耐酸和耐有机溶剂等特性密切相关<sup>[15]</sup>。目前,来源于嗜热古菌硫化叶菌的内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶已经在 大肠杆菌表达体系中成功表达,但用硫化叶菌表达体系对该酶实现同源表达的例子

还没有报道。

本试验首次应用实验室构建的硫化叶菌超表达载体 pZC2, 该载体是基于硫化叶菌质粒 pRN2 构建的 1 个 *Sulfolobus-E. coli* 的穿梭质粒<sup>[10]</sup>。该质粒由 3 部分组成, 来自于 pRN2 的 ORF 框, 氨苄抗性基因和用于筛选的 *pryEF*。同时该质粒含有 *araS* 启动子, 并带有 His-tag 标签。利用载体 pZC2 对来源于冰岛硫化叶菌的内切  $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶基因 *S. islandicus eng* 进行了同源表达, 分离纯化及酶学性质研究。

研究发现, 去除信号肽后的内切  $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶 ENG-W 检测不到酶活, 而含有信号肽的内切  $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶 ENG-SP 具有酶活力为 103.4 U/L; 其最适 pH 为 4.0, 最适反应温度为 90 °C, 具有嗜酸嗜热的特性; 比 Huang 等<sup>[7]</sup>所报道的在大肠杆菌中表达的 ENG-1949 酶活力提高了 70 多倍, 最适反应温度升高了 10 °C。本试验中目的蛋白酶活力的提高以及最适反应温度的提高可能是由于来源于硫化叶菌的  $\beta$ -1, 4-内切葡聚糖酶在其自身和大肠杆菌 2 种不同的宿主中的翻译后修饰机制不同造成的<sup>[15]</sup>。

来源于黑曲霉、芽孢杆菌<sup>[16]</sup>、苜蓿根瘤菌<sup>[17]</sup>、里氏木霉<sup>[18]</sup>、海栖热袍菌<sup>[1]</sup>等的内切葡聚糖酶已经在大肠杆菌或毕赤酵母中成功表达, 其中来源于黑曲霉的内切葡聚糖酶酶活力可达到 1 928 U/mL。而本研究 SDS-PAGE 及酶活力测定结果显示, *S. islandicus eng* 基因在硫化叶菌中的蛋白表达量及酶活力相对较低。

进一步的研究计划采用液态发酵得到大量同源表达的目的蛋白, 通过质谱等方法研究其翻译后修饰位点及修饰方式, 希望在此基础上将极端嗜酸热古菌的翻译后修饰体系改造到目前成熟的表达系统中, 如毕赤酵母和大肠杆菌表达系统, 从而提高这些表达系统生产耐热耐酸蛋白的能力。

## 参 考 文 献

[1] 李相前, 邵蔚蓝. 极耐热内切葡聚糖酶 *Cel12B* 的高效表达[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 1-3.  
 [2] SHAO W L. Isolation and characterization of hemicellulolytic enzymes from anaerobic thermophiles[D]. Athens: University of Georgia, 1993; 2-23.  
 [3] MERJ A E, PENTTIL A M, ANDRE L, et al. Expression of

two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1987, 3(3): 175-185.  
 [4] 常巧玲. 热纤梭菌  $\beta$ -1, 4-内切葡聚糖酶基因 *celD* 在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达[D]. 杭州: 浙江大学动物科学学院, 2006.  
 [5] MAURELLI L, GIOVANE A, ESPOSITO A, et al. Evidence that the xylanase activity from *Sulfolobus solfataricus* O<sub>a</sub> is encoded by the endoglucanase precursor gene (*ssol354*) and characterization of the associated cellulase activity[J]. Extremophiles, 2008, 12: 689-700.  
 [6] MORANA A, PARIS O, MAURELLI L, et al. Gene cloning and expression in *Escherichia coli* of a bi-functional  $\beta$ -D-xylosidase/ $\alpha$ -L-ara-binoidase from *Sulfolobus solfataricus* involved in xylan degradation[J]. Extremophiles, 2007, 11: 123-132.  
 [7] HUANG Y W, KRAUSS G, COTTAS S, et al. A highly acid-stable and thermostable endo- $\beta$ -glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* [J]. Biochem, 2005, 385: 581-588.  
 [8] 刘莉, 陈炜, 金城. 芝田硫化叶菌新型  $\alpha$ -淀粉酶基因在大肠杆菌的克隆和表达[J]. 微生物学报, 2000, 40(3): 323-326.  
 [9] GUO L, BRUQQER K, LIU C, et al. Genome analyses of icelandic strains of *Sulfolobus islandicus*, model organisms for genetic and virus-host interaction studies[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(7): 1672-1680.  
 [10] PENG N, XIA Q, CHEN Z J, et al. An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(4): 928-939.  
 [11] ZHANG C Y, GUO L, DENG L, et al. Revealing the essentiality of multiple archaeal *pcna* genes using a mutant propagation assay based on an improved knockout method[J]. Microbiology, 2010, 156: 3386-3397.  
 [12] 刘薇, 余群新, 梁运祥. 冰岛硫化叶菌反螺旋酶基因的遗传学分析[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1): 39-42.  
 [13] 刘德海, 杨玉华, 安明理, 等. 纤维素酶活力的测定方法[J]. 中国饲料, 2002(17): 27-28.  
 [14] 谯仕彦, 陆文清, 刘兴海, 等. NY/T 912-2004, 饲料添加剂纤维素酶活力的测定分光光度法[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2005.  
 [15] BOTTING C H, TALBOT P, PAYTUBI S, et al. Extensive lysine methylation in hyperthermophilic crenarchaea: potential implications for protein stability and recombinant enzymes [J/OL]. Archaea, 2010[2011-01-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2929605/>.  
 [16] 李春华, 廖贵芹, 马立新, 等.  $\beta$ -1, 4-内切葡聚糖酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 湖北大学学报, 2005, 27(3): 276-279.  
 [17] 许善峰. 苜蓿根瘤菌内切  $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶 EndS21 在 *Escherichia coli* 和 *Pichia pastoris* 中表达及定点突变的研究[D].

扬州:扬州大学生物科技学院,2006.

母中的表达及酶学性质研究[J]. 菌物学报,2004,23(3):388-

[18] 乔宇,毛爱军,何永志. 里氏木霉内切  $\beta$ -葡聚糖酶 II 基因在毕醇

396.

## Homogeneous expression, purification and characterization of endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Sulfolobus islandicus* REY15A

ZHU Jing ZHAO Shu-miao PENG Nan LIANG Yun-xiang

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene (with or without signal peptide coding sequence) was amplified from *Sulfolobus islandicus* REY15A genomic DNA with PCR and inserted into the *Sulfolobus* expression vector pZC2, constructing the recombinant plasmid pZC2-eng-YS and pZC2-eng-WS, respectively. Then the recombinant plasmids were electro-transformed into the host strain *S. islandicus* E233S ( $\Delta pyrEF\Delta lacS$ ). After induced by D-arabinose and purified with the  $Ni^{2+}$ -nitrilotriacetate column, two obvious protein bands with molecular weight about 43 ku and 41 ku appeared on the SDS-PAGE. The following analysis showed the recombinant protein (ENG-W) without signal peptide does not have endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity. However, the activity of recombinant protein (ENG-SP) with signal peptide was 103.4 U/L. The optimal temperature and pH for the recombinant protein (ENG-SP) was 90 °C and 4.0, respectively. Further research indicated that after incubating at 90 °C for one hour, ENG-SP still had 40% of the highest activity.  $Mn^{2+}$  could increase the activity of ENG-SP by 50%, while  $Ca^{2+}$  could inhibit the activity of ENG-SP by 50%.

**Key words** *Sulfolobus islandicus*; endo- $\beta$ -1,4-glucanase; homogeneous expression; *Sulfolobus* expression vector pZC2; recombinant protein

(责任编辑:陆文昌)