

## 海栖热袍菌极端耐热木聚糖酶B 的提纯

江正强 李里特 林 清 Mohamm ad M ainul A hsan  
(中国农业大学食品学院) (日本食品综合研究所酵素利用研究室)

**摘 要** 克隆并在大肠杆菌中表达的海栖热袍菌的 *xynB* 基因, 其表达产物木聚糖酶B 的C-末端带有6×His 标签, 研究了这种基因重组酶的提纯方法。通过对粗酶提取液的热变性处理, Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和柱层析和离子柱层析, 最终得到了电泳纯的木聚糖酶B, 提纯倍数44.4, 得率11%。SDS-PAGE 法测定木聚糖酶B 的相对分子质量为42 ku, 与理论推算值42 333 u 相吻合。

**关键词** 海栖热袍菌; 耐热木聚糖酶B; 热处理; Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和柱层析; 离子交换柱层析  
中图分类号 Q 556.2

## Purification of an Extrem-thermostable Xylanase B From *Thermotoga maritima*

Jiang Zhengqiang<sup>1</sup> Li L ite<sup>1</sup> Kyoshi Hayashi<sup>2</sup> Mohamm ad M ainul A hsan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Food Science and Engineering, CAU

<sup>2</sup> Enzyme Applications Laboratory of National Food Research Institute in Japan)

**Abstract** The *xynB* gene of *Thermotoga maritima* MSB8 was cloned and expressed in *E. coli*, the C-terminal His-tag was introduced, and purification methods of the recombinant enzyme were studied. The xylanase B was purified to homogeneity by heat treatment, affinity chromatography and ion exchange chromatography. The purified enzyme showed as a single protein band on SDS-PAGE with a molecular weight of 42 ku, this is in good agreement with the molecular mass of enzyme deduced from the DNA sequence, 42 333 u.

**Key words** *Thermotoga maritima*; thermostable xylanase B; heat treatment; Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography; ion exchange chromatography

木聚糖酶(EC 3.2.1.8; 1,4-β-D-endoxylanase)是木聚糖降解酶中最关键的酶, 它的耐高温和热稳定性是工业化应用的理想特性, 它在生物化工、制浆造纸工业、食品工业、饲料工业等都存在很大的应用潜力。但将其作为工业酶制剂的报道在国内尚未见<sup>[1,2]</sup>。

木聚糖酶可以由多种微生物产生, 在我国多集中于对海枣曲霉(*Aspergillus phoenicis*)、黑霉菌(*Aspergillus niger*)、木霉菌(*Trichoderma sp.*)、串珠链孢菌(*Fusarium moniliformae*)、顶青霉(*Penicillium corylophilum*)等真菌和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、碱性假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)等细菌木聚糖酶的研究, 尚未见对嗜热菌耐热木聚糖酶的研究报道<sup>[3,4]</sup>。现已发现的极端嗜热菌都是古菌和细菌。除栖热袍菌属(*Thermotoga*)之外, 已知的能在75℃以

收稿日期: 2000-06-08

联合国大学基金资助项目

江正强, 北京清华东路17号 中国农业大学(东校区)294信箱, 100083

上生长的都是古菌。嗜热性最高的细菌是栖热袍菌属的海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)和 *T. neapolitana* 等<sup>[3,6]</sup>。海栖热袍菌生长在 55~90 的海底火山口附近,最适生长温度 80 左右,是一种严格厌氧,杆状,无孢子的发酵型真细菌。该菌能够利用简单和复杂的碳水化合物如葡萄糖、蔗糖、淀粉、纤维素和木聚糖等<sup>[7]</sup>,在已知序列的细菌中与古细菌具有最高的同源性(24%)<sup>[8]</sup>。微生物产生的木聚糖降解酶系比较复杂,且大多还同时产生纤维素酶,这些酶性质相近,使得分离纯化木聚糖酶比较困难。纯化酶的方法有很多,如热处理、硫酸铵沉淀、亲和层析、离子交换层析、分子筛层析(凝胶过滤)、疏水层析等。一般说来,需应用几种方法的组合,才能得到纯酶<sup>[1-3,5]</sup>。通过 DNA 重组技术,将产生木聚糖酶的基因在合适的宿主菌中表达,可将单一酶比较容易地纯化。同时通过大量表达也可用于获得从自然界难以得到的大量的木聚糖酶。

本文中主要研究基因重组酶的提纯方法。笔者将海栖热袍菌的 *xynB* 基因克隆并在大肠杆菌中表达,通过热处理、亲和层析和离子交换层析对海栖热袍菌耐热木聚糖酶 B 进行了纯化。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 主要仪器

FPLC 系统 Q-sepharose Fast Flow 16/10 column, Mono Q HR 5/5 均为瑞典 Amersam Pharmacia Biotech 公司生产;高速冷冻离心机 UV/VIS 分光光度计(Mode DU 640)均为美国 Beckman 公司生产;超声破碎机(Branson Sonifier 250D)、PA GEL NPU-12.5 L 电泳槽为日本 ATTO 公司生产。

### 1.2 主要试剂

RBB-木聚糖(Remazol Brilliant Blue R-D-xylan, SIGMA, 德国), Ni-NTA agarose, 10 ku protein ladder 蛋白质标准; SDS-PA GE (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)系列溶液和不同缓冲液由实验室自制。

### 1.3 载体和菌株

以海栖热袍菌(*Thermotoga maritima* MSB8)的基因组 DNA 为模板扩增出 *xynB* 基因片段,在 pET28a(+)表达载体中表达,表达产物 C-末端带有 6×His 标签,由笔者构建。菌株为带有重组质粒的 *E coli* BL 21。

### 1.4 粗酶液的制备

新鲜制备 100 mL 含有重组质粒的 *E coli* BL 21,接种于 1 000 mL 卡那霉素质量浓度为 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Luria-Bertani broth (LB) 培养基,30 的摇床中培养,摇床转速为 150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。测定培养液在 600 nm 下吸光度的变化,当吸光度达 0.5~0.6 时,加入 1 mL 浓度为 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IPTG 诱导,继续培养 16 h。用高速冷冻离心机将培养液在 4 下以 8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的转速离心 10 min,收获细菌沉淀。用 50 mL 磷酸缓冲溶液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.0)悬浮,在冰水浴中用超声破碎机破碎细菌细胞,将破碎液在 4 下以 16 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的转速离心 10 min,所得上清液即为粗酶液。

### 1.5 热变性处理

将粗酶液分别在 60, 70, 80, 90, 100 下加热 10 min,然后在冰水浴中冷却,在 4 下以 16 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的转速离心 10 min,取上清液,分析酶活力和蛋白质浓度的变化,确定最佳热处

理条件。

### 1.6 亲和柱层析

将热处理后的上清液与一定比例的Ni<sup>2+</sup>-NTA树脂充分混合,在4℃下放置30~60 min。将混合物装入柱中,采用FPLC系统提纯酶,用线性梯度法洗脱亲和柱。工作条件:洗涤液为10 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑(imidazole),50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.0的磷酸缓冲液;洗脱液为250 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑,50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.0磷酸缓冲液;流速为1 mL·min<sup>-1</sup>;温度为室温。

### 1.7 离子交换柱层析

透析除去亲和柱层析后酶液中的离子,再过2步离子交换柱层析来提纯表达出的蛋白质。

第1步 离子交换柱选用Q-sepharose Fast Flow 16/10 column,用线性梯度法洗脱离子交换柱,工作条件:洗涤液为25 mmol·L<sup>-1</sup> MOPS缓冲液(pH 6.5);洗脱液为0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl溶液(溶于25 mmol·L<sup>-1</sup> MOPS buffer, pH 6.5);流速为2 mL·min<sup>-1</sup>;温度为室温。

第2步 充分透析后的酶液再过Mono Q HR5/5离子交换柱,工作条件:洗涤液为25 mmol·L<sup>-1</sup> MOPS缓冲液(pH 6.5);洗脱液为0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl溶液;流速为0.5 mL·min<sup>-1</sup>;温度为室温;用3段连续梯度的盐溶液洗脱离子交换柱,洗脱时浓度分别为0~100 mmol·L<sup>-1</sup> (2个柱体积),100~300 mmol·L<sup>-1</sup> (20个柱体积)和300~500 mmol·L<sup>-1</sup> (2个柱体积)洗脱液。

### 1.8 酶纯度的鉴定和分子质量的测定

酶纯度的鉴定和分子质量的测定采用SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)方法进行,分离胶质量分数为10%,浓缩胶质量分数为3%。按Laemmli方法进行蛋白质样品的电泳,使用PAGE NP12.5L电泳槽。样品溶液先与Tris/HCl上样缓冲液混合,沸水浴加热3 min。电泳后的分离胶用考马斯亮蓝R-250染色。蛋白质标准用10 ku protein ladder。

根据样品和标准蛋白的SDS-PAGE图,测定样品和标准蛋白的相对迁移率 $R_f$ 值,用标准蛋白的 $R_f$ 值对分子质量的对数作标准曲线。由纯酶样品的 $R_f$ 值,可求得分子质量。

### 1.9 酶活力的标准测定方法

除非特别指明,本研究测定酶活力的标准方法同文献[9]:以质量分数为1.15%的RBB-木聚糖为底物,在50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 6.14的MES缓冲液中,50℃保温20 min。标准反应混合物(100 μL)组成:质量分数为1.15%的RBB-木聚糖50 μL,200 mmol·L<sup>-1</sup> MES缓冲液25 μL和合理稀释的酶溶液25 μL。反应结束后,加入体积分数为100%的乙醇200 μL终止酶反应,同时沉淀残留底物;将混合物在室温下至少静置15 min,然后以15 000 r·min<sup>-1</sup>的转速离心5 min,取上清液。用Beckman分光光度计测定595 nm下的吸光度值 $A_{595}$ 。对照的操作过程与上述一样,只是以25 μL水代替合理稀释的酶溶液。

酶活力单位(unit)定义:在上述实验条件下,每分钟导致 $\Delta A_{595} = 1$ 所需的酶量定义为1个酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗酶液的热处理

表1示出在不同温度下加热10 min,酶活力和蛋白质含量的变化。可以看出,虽然不同温度下的热处理都能在一定程度上纯化酶,但只能初步纯化粗酶,即使温度高达100℃,提纯倍

数仍不高(1.5 倍)。综合评价结果表明,加热温度为 70 时处理粗酶液效果最为理想,可以去掉 23%的杂蛋白,同时得率高达 91%。

表 1 不同温度下粗酶液的热处理结果

加热温度/	蛋白质/	总酶活力/	相对酶活力/	纯化倍数/	得率/
	mg	U	(U·mg <sup>-1</sup> )	倍	%
0	255	76.0	0.30	1.00	100
60	223	74.0	0.33	1.10	97
70	195	69.0	0.35	1.20	91
80	176	66.0	0.38	1.27	87
90	153	62.0	0.41	1.36	82
100	82	37.0	0.45	1.50	45

注: 加热时间均为 10min。

### 2.2 亲和柱层析

经遗传工程改造的重组蛋白的氨基端或羧基端带有 6 个连续的组氨酸(His) 残基, 筛选出的菌株所携带的表达载体 pET28a(+) 羧基端带有 6×His 标签, 因此表达出的蛋白质在羧基端上带有 6×His 标签。采用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂进行亲和柱层析可将不含有 6×His 标签的蛋白质除去。

亲和柱层析结果见图 1。

可以看出, 不与 Ni<sup>2+</sup>-NTA 结合的蛋白质在洗涤阶段被洗掉, 洗脱阶段只有一个主要的蛋白峰, 而且酶活力峰与蛋白峰的变化趋势相一致, 这表明表达出的在羧基端带有 6×His 标签的蛋白质主要是木聚糖酶 B。SDS-PA GE 测定结果表明, 通过 1 步亲和柱层析可使酶的纯度达 90% 以上(图 2)。

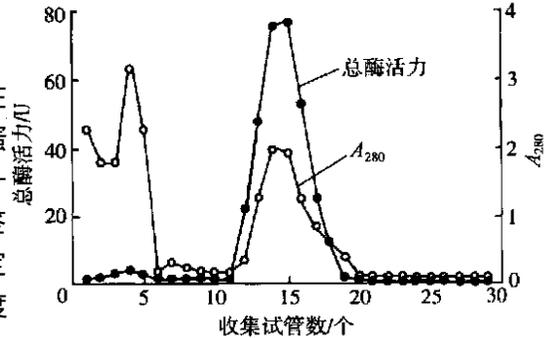
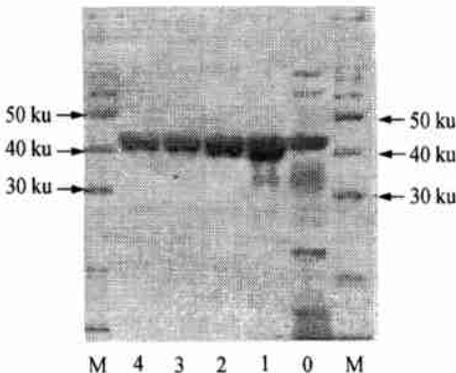


图 1 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和柱层析结果



M 列, 分子质量为 10 ku 的标准梯度蛋白质(梯度范围 20~ 80 ku); 0 列, 热处理后; 1 列, Ni<sup>2+</sup>-NTA 提纯后; 2 列, Q<sup>-</sup>-sepharose 提纯后; 3 和 4 列, Mono-Q 提纯后

图 2 提纯各步木聚糖酶的 SDS-PA GE

### 2.3 提纯各步酶的纯化效果

提纯各步酶纯度的鉴定见图 2, 可以看出, 经第 1 步离子交换层析(Q<sup>-</sup>-sepharose) 之后, 活

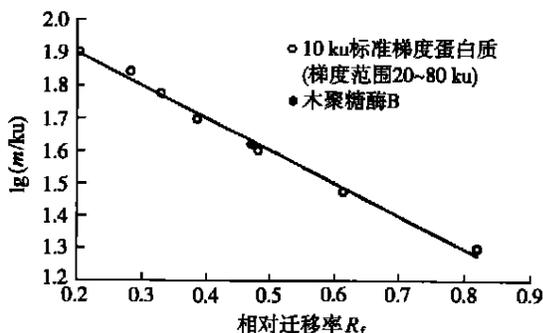
力峰处的洗脱液已基本呈现单一的蛋白带,说明木聚糖酶已达到均一成分。不同纯化过程粗酶液中蛋白质、总酶活力、相对酶活力、纯化倍数和得率的变化见表2。通过对粗酶液的热变性、Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和柱层析和离子交换柱层析,最终得到了电泳纯的木聚糖酶B,提纯倍数44.4,得率11%。

表2 不同纯化步骤木聚糖酶B的纯化结果

纯化步骤	蛋白质/ mg	总酶活力/ U	相对酶活力/ (U·mg <sup>-1</sup> )	纯化倍数/ 倍	得率/ %
粗酶液	255.00	76.0	0.30	1.0	100
热处理	195.00	69.0	0.35	1.2	91
Ni <sup>2+</sup> -NTA	12.30	31.8	2.59	8.6	42
Q <sup>-</sup> -sepharose	2.00	16.5	8.30	27.6	22
Mono <sup>-</sup> Q	0.64	8.50	13.3	44.4	11

## 2.4 酶分子质量的测定

图3示出在相同SDS-PAGE电泳条件下得到的标准蛋白质和纯化酶分子质量与相对迁移率 $R_f$ 之间的关系。将纯化木聚糖酶B的相对迁移率0.47代入标准蛋白质分子质量 $m$ 的对数与相对迁移率 $R_f$ 的回归方程 $\lg m = -1.0018R_f + 2.0998$ ,计算得到木聚糖酶B的相对分子质量为42 ku,与理论推算值42 333 u相吻合。



$m$  为标准梯度蛋白质分子质量  
图3 木聚糖酶B分子质量的SDS-PAGE法测定结果

## 3 结论

热处理能简便地初步纯化在常温菌中表达的耐热木聚糖酶B,70℃加热10 min处理粗酶液可以去掉23%的杂蛋白,收率高达91%。木聚糖酶B的羧基端上带有6×His标签,通过1步Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和柱层析可使酶的纯度达90%以上。离子交换柱层析提纯该酶时选用阴离子交换剂,连续2步离子交换柱层析Q<sup>-</sup>-sepharose和Mono Q,木聚糖酶B已达到均一成分。通过对粗酶提取液的热变性、Ni<sup>2+</sup>-NTA亲和柱层析和离子交换柱层析,最终得到了电泳纯的木聚糖酶B,提纯倍数44.4,得率11%。经SDS-PAGE方法测定,木聚糖酶B的相对分子质量为42 ku,与理论推算的分子质量42 333 u相吻合。

对于日本食品综合研究所酵素利用研究室同人对本研究的帮助和支持,在此表示衷心的感谢。

## 参 考 文 献

- 1 Neeta K, Abhay S, Mara R. Molecular and biotechnological aspects of xylanase. FEM S M icrobio logy Review s, 1999, 23: 411~ 456
- 2 江正强 海栖热袍菌 *xynB* 基因的克隆和表达, 重组木聚糖酶的提纯及其酶学性质: [学位论文] 北京: 中国农业大学, 2001
- 3 Simpson H D, Haufler U R, Daniel R M. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. B iochem J, 1991, 277: 413~ 417
- 4 Nelson K E, Clyton R A, Gill S R, et al Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature, 1999, 399: 323~ 329
- 5 朱 静, 严自正 微生物产生的木聚糖酶的功能和应用. 生物工程学报, 1996, 12(4): 375~ 378
- 6 Veikodvorskaya T V, Volkov I Yu's, Vasilevko V T, et al Purification and some properties of *Thermotoga neapolitana* thermostable xylanase B expressed in *E coli* cells. B iochem istry (M oscow ), 1997, 62: 66 ~ 67
- 7 刘瑞田, 曲音波, 姜英辉, 等 假单胞碱性木聚糖酶的纯化及性质. 微生物学报, 1999, 39(2): 132~ 136
- 8 Robert H, Thomas A, Langworthy H K, et al *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. Arch M icrobiol, 1986, 144: 324~ 333
- 9 Ahsan Mohammad Mainul, Kaneko Satoshi, Wang Qin, et al Capacity of the thermomonospora alba XylA to impart thermostability in familiar F/10 chimeric xylanase. Enzyme and M icrobiology Technology, 2001, 28: 8~ 15