Acidothermus cellulolyticus 11B葡萄糖异构酶基因的克隆、表达及酶活性研究

王晓乐，薛庆海，江　波，沐万孟*
（江南大学食品科学与技术国家重点实验室，江苏无锡 214122）

摘　要：葡萄糖异构酶是生物法转化葡萄糖为果糖制备果葡糖浆的关键酶。本文克隆到一种葡萄糖异构酶基因 xyl，来源于嗜酸耐热型微生物 *Acidothermus cellulolyticus* 11B（ATCC 43068）。以 pET-22b（+）为载体质粒，*E.coli* BL21（DE3）为宿主细胞，构建了基因重组菌，IPTG 可诱导目的重组葡萄糖异构酶过量表达；经亲和层析纯化的重组蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析，在约 43kDa 处出现显著的特征蛋白条带；活性检测结果表明该重组葡萄糖异构酶具有较高的果糖转化活性。

关键词：葡萄糖异构酶，果葡糖浆，克隆，表达，亲和层析

Cloning，expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* 11B glucose isomerase

WANG Xiao-le，XUE Qing-hai，JIANG Bo，MU Wan-meng*
（State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Glucose isomerase is the main enzyme for biotransformation of high-fructose corn syrup. A gene，encoding glucose isomerase from *Acidothermus cellulolyticus* 11B（ATCC 43068）was cloned and over expressed in *Escherichia coli*. The recombinant glucose isomerase was purified to electrophoretic homogeneity by affinity chromatography. The recombinant enzyme molecular weight was about 43kDa with high bioconversion activity.

Key words：glucose isomerase；high-fructose corn syrup；cloning；expression；affinity chromatography
中图分类号：Q789　　**文献标识码：**A　　**文 章 编 号：**1002-0306（2011）03-0192-03

葡萄糖异构酶（Glucose isomerase，GI，EC 5.3.1.5），又称木糖异构酶（xylose isomerase，XI）[1]，可以催化 D-葡萄糖等醛糖至 D-果糖等相应酮糖的异构化反应，在规模化制备果葡糖浆和结晶果糖等食品工业中具有重要的作用[2]。目前，已经有很多种微生物来源的 GI 被发掘和鉴定，其表达基因被序列测定、克隆及异源表达[3-4]。热稳定性及反应 pH 是 GI 工业应用重要的两个参数。一方面，反应温度越高，反应速率就越快，较高温条件下（60℃以上）更有利于果糖的生成，可以降低果糖转化生产成本和提高产物产量[5]；另一方面，工业生产要求 GI 最适反应 pH 为弱酸性，因为在偏酸性条件可以减少非特异性副反应、可以减少褐变反应，提高产品质量[6]。通过筛选嗜酸、耐热性微生物来源的 GI[7]，及利用蛋白质工程技术改造 GI[8] 获得适合工业化应用的突变酶，是目前 GI 研究的热点和趋势。Acidothermus cellulolyticus 11B（解纤维热酸菌）是从酸性温泉中筛选获得的微生物，其基因组序列于 2008 年被完整测序[9]。*Acidothermus cellulolyticus* 11B 同时兼具了耐热与耐酸的特性，属于产 GI 微生物筛选与工业应用的研究趋势。本文以嗜酸耐热菌 *Acidothermus cellulolyticus* 11B 基因组为模板，通过 PCR 扩增获得 GI 的编码基因 xyl，以 pET22b（+）为载体，构建获得重组质粒 pET22b-ac-xyl，并在大肠杆菌中实现成功

收稿日期：2010-04-12　* 通讯联系人
作者简介：王晓乐，本科生，研究方向：食品科学与工程。
基金项目　“十一五”国家 863 资助项目（2006AA10Z334）资助。

食品与发酵工业，2006，32（8）：52-55.
[10] Xiao Guan，Huiyuan Yao. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology [J]. Food Chemistry，2008，106：345-351.
[11] Haber A，Runyon R. General statistics（3rd ed）[M]. Henika：Addison-Wesley，Reading，MA，1977.
[12] Kong Q，He G Q，Chen Q H，et al. Optimization of Medium Composition for Cultivating Clostridium butyricum with Response Surface Methodology [J]. Journal of Food Science，2004，69（7）：163-168.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表达，表达产物 GI 被鉴定具有较高的生物活性，对于弱酸稳定与热稳定性的 GI 开发与工业应用具有一定的创新性与指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Acidothermus cellulolyticus 11B（ATCC 43068）购自美国标准菌种收藏所；表达载体 pET-22b（+）中国科学技术大学生命科学学院王玉珍教授惠赠；DNA polymerase、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、*E.coli* DH5α、*E.coli* BL21（DE3）购自上海生工公司；T4 DNA 连接酶、Wide Range DNA Marker（500-10,000）、DNA marker（λ/EcoR I + Hind III）、限制性内切酶 Nde I、Xho I 及 PCR 产物纯化试剂盒、克隆载体 PMD 19-T simple vector 购自宝生物工程（大连）有限公司；Chelating Sepharaose Fast Flow 购自安马西亚公司；其它试剂 均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 *Acidothermus cellulolyticus* 11B xyl 基因的 PCR 扩增 根据 *Acidothermus cellulolyticus* 11B xyl 基因序列设计引物，为方便其定向克隆，于上下游引物 5' 端分别引入 Nde I 和 Xho I 酶切位点。引物序列如下：

引物 1：5'-GGGTTTCATATGTCACTCACCACTGCAT-3'

引物 2：5'-TTTATTACTCGAGGCCGCGTGCGCCGAGGAG-3'

以 *Acidothermus cellulolyticus* 11B 菌液 DNA 为模板，PCR 扩增 xyl 基因。PCR 循环条件为：94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 1min，56℃ 退火 1min，72℃ 延伸 1.5min，进行 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。

1.2.2 PCR 产物的克隆、鉴定 将纯化的 PCR 产物以 T4 DNA 连接酶连接至 PMD19-T simple Vector，连接产物转化至 E.coli DH5α 感受态细胞中，涂布蓝白斑筛选平板，37℃ 培养过夜，白色菌落初步确定为阳性菌落。挑取白色单菌落至 LB 液体培养基（含 50μg/mL 氨苄抗生素）中，37℃ 培养过夜，通过菌液 PCR 扩增、抽提质粒确定重组质粒大小及酶切分析，得到阳性克隆，送上海生工测序。将鉴定为阳性克隆的重组质粒命名为 T-Ac-xyl。

1.2.3 *Acidothermus cellulolyticus* 11B GI 基因重组菌的构建 将 1.2.2 中的阳性重组质粒 T-Ac-xyl 及质粒 pET-22b（+）分别用 Nde I 和 Xho I 双酶切，回收目的片段后，以 T4 DNA 连接酶进行连接，连接产物转化至 *E.coli* BL21（DE3）感受态细胞中。通过筛选与鉴定，获得重组质粒阳性克隆，重组质粒命名为 pET22b-Ac-xyl，重组菌命名为 *E.coli* BL21（pET22b-Ac-xyl）。

1.2.4 *Acidothermus cellulolyticus* 11B GI 基因重组菌的诱导表达 将重组菌 *E.coli* BL21（pET22b-Ac-xyl）接种于 4mL LB 液体培养基（含 50μg/mL 氨苄抗生素）中，37℃ 条件下 200r/min 培养过夜；将其接种至 200mL LB 培养基中，37℃，200r/min 培养至 OD 值为 0.6～0.8[1]，加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，28℃ 条件下 200r/min 诱导培养 6h。

1.2.5 重组 GI 的纯化 离心收集菌体，以 Binding Buffer（50mmol/L Tris-HCl，500mmol/L NaCl，pH 7.5）重悬菌体，超声波破碎细胞（250W，超声 1s，停顿 2s，全程工作时间 6min）后，离心（15000r/min，20min，4℃）弃细胞碎片，收集上清液进行亲和层析纯化。采用 Ni^{2+}-Chelating Sepharose Fast Flow 亲和介质填充层析柱，对重组蛋白进行纯化。上柱前预先以 3 倍柱体积的 Binding Buffer 平衡亲和柱，样品上柱后以 Wash buffer（50mmol/L Tris-HCl，500mmol/L NaCl，50mmol/L 咪唑，pH7.5）洗脱杂蛋白，再用 Elution buffer（50mmol/L Tris-HCl，500mmol/L NaCl，500mmol/L 咪唑，pH7.5）洗脱重组蛋白，最终用 Sample buffer（50mmol/L Tris-HCl，100mmol/L NaCl，pH 7.5）对洗脱蛋白进行透析（以上操作均在 4℃ 条件下进行）。将纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 重组 GI 生物活性测定 GI 可催化葡萄糖异构化生成果糖，底物葡萄糖与产物果糖含量可通过 HPLC 进行测定。HPLC 条件：Waters 600 高效液相色谱仪，Sugarpak-1 钙型阳离子交换柱，Waters 2410 示差折光检测器；流动相：纯水；柱温：85℃；流速：0.4mL/min；进样量：10μL。

2 结果与讨论

2.1 *Acidothermus cellulolyticus* 11B xyl 基因的 PCR 扩增、克隆及鉴定

以 *Acidothermus cellulolyticus* 11B 菌液 DNA 为模板，扩增出了一条约 1.2kb 的条带（见图 1），与预期的扩增产物大小吻合。

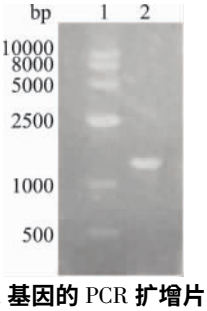

图 1 xyl 基因的 PCR 扩增片段检测

注：其中泳道 1 为 DNA 标样；泳道 2 为 PCR 扩增产物。

使用 T4 DNA 连接酶将纯化后的 *Acidothermus cellulolyticus* 11B xyl 基因连接到 PMD 19-T 载体，转化培养，经菌液 PCR 鉴定、提质粒检测质粒大小（图 1），得到阳性重组质粒 T-Ac-xyl，送上海生工测序，测序结果显示所得基因与 NCBI 中已知基因完全吻合。

2.2 重组表达质粒 pET22b-Ac-xyl 的构建

将重组质粒 T-Ac-xyl 与表达载体 pET-22b（+）分别使用 Nde I 和 Xho I 双酶切，用 T4 DNA 连接酶进行连接，获得重组表达质粒 pET22b-Ac-xyl。重组质粒 pET22b-Ac-xyl 经 Nde I 和 Xho I 双酶切，得到 pET-22b（+）线性片段和插入的目的基因片段，该片段与 PCR 产物大小相同，pET22b-Ac-xyl 酶谱鉴定结果见图 2。

2.3 基因重组菌的诱导表达及重组 GI 的纯化

对重组菌 *E.coli* BL21（pET22b-Ac-xyl）的诱导表达进行了初步研究，为了防止目的蛋白 GI 形成大量包涵体，使用诱导温度 28℃。在此温度下，1mmol/L

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

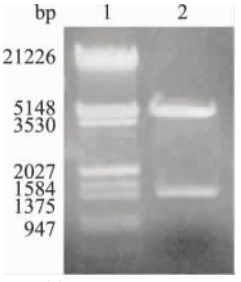

图2 重组表达质粒 pET22b-Ac-xyl 的酶切鉴定

注：其中泳道1为DNA标样；

泳道2为pET22b-Ac-xyl质粒经NdeI和XhoI双切产物。

的IPTG诱导6h可使重组GI的量达到重组菌表达总蛋白的40%以上(图3)。经镍柱亲和层析的重组GI样品进行SDS-PAGE分析(图4)，该重组GI的分子量约为43kDa，与预期分子量相吻合。

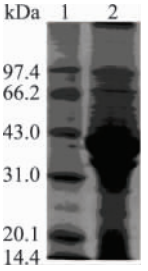

图3 重组GI的在 *E.coli* BL21(DE3)中的表达

注：其中泳道1为蛋白质标样；

泳道2为重组菌经诱导表达后的全细胞蛋白。

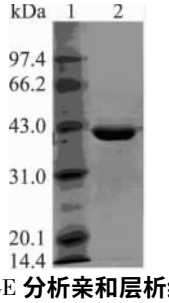

图4 SDS-PAGE分析亲和层析纯化的重组GI

注：其中泳道1为蛋白质标样；

泳道2为镍柱亲和层析纯化后的重组GI。

2.4 重组GI的活性研究

利用重组GI细胞进行果糖转化实验(如图5)，反应条件为80℃，pH 6.5，在500μg/mL的葡萄糖反应体系中，80℃条件下反应4h果糖含量达到344.9μg/mL，转化率为69.98%。而相同条件下，以非重组菌 *E.coli* BL21(DE3)细胞作为果糖生物转化合成实验的对照，其最高果糖含量为99μg/mL，充分说明GI基因在 *E.coli* 中得到了正确的表达，并具有较高生物活性。

3 结论

葡萄糖异构酶是工业上大规模生产高果糖浆的关键酶之一，提高其反应的温度可以提高果糖的转化率，具有很高的工业价值。利用基因克隆技术，将耐热葡萄糖异构酶基因克隆至表达载体，通过提高表达水平可以得到有可观潜在用途的热稳定性葡萄糖异构酶。

本文以耐热菌 *Acidothermus cellulolyticus* 11B 葡萄糖异构酶基因为模板，通过PCR及基因克隆技术，将目的基因构建到pET-22b(+)为载体中，获得重组质粒pET22b-Ac-xyl，并将该质粒转化至大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)中获得基因重组菌。IPTG可诱导该基因重组菌过量表达重组GI，表达量达到细胞总蛋白的40%以上。经亲和层析纯化的重组蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳分析，约在43kDa处出现特征蛋白条带，进一步证明了 *Acidothermus cellulolyticus* 11B xyl 基因在 *E.coli* BL21 中得到了正确的表达。对该重组GI的活性进行了初步研究，在80℃下反应4h果糖转化率为69.98%，表明在大肠杆菌 *E.coli* BL21 中成功地表达了具有生物活性的重组GI，且该GI具备提高工业生产果糖产率的潜能。

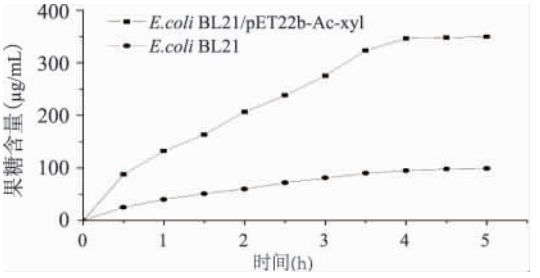

图5 重组GI细胞催化葡萄糖生产果糖的进程曲线

参考文献

[1] Jensen VJ，Rugh S.Industrial scale application of immobilized glucose isomerase [J].Methods Enzymol，1987，136：356-370.

[2] Antrim RL，Colilla W，Schnyder BJ. Glucose isomerase production of high fructose syrups [J]. Appl Biochem Bioeng，1979，2：97-155.

[3] Drocourt D，Bejar S，Calmels T，et al.Nucleotide sequence of the xylose isomerase gene from *Streptomyces violaceoniger* [J]. Nucleic Acids Res，1988，16：9337.

[4] Park BC，Koh S，Chang C，et al.Cloning and expression of the gene for xylose isomerase from Thermus flavus AT62 in *Escherichia coli* [J].Appl Biochem Biotechnol，1997，62：15-27.

[5] Bandish RK，Hess JM，Epting KL，et al. Glucose-fructose conversion at high temperatures with xylose(glucose) isomerases from Streptomyces murinus and two Thermotoga species [J]. Biotechnol Bioeng，2002，80：185-194.

[6] Bhosale SH，Rao MB，Deshpande VV.Molecular and industrial aspects of glucose isomerase [J]. Mcirobiol Rev，1996，60：280-300.

[7] Brown SH，Sjoholm C，Kelly RM. Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritime* [J].Biotechnol Bioeng，1993，41：878-886.

[8] Cha J，Batt CA. Lowering the pH optimum of D-xylose isomerase：the effect of mutations of the negatively charged residues [J].Mol Cells，1998，8：374-382.

[9] Barabote RD，Xie G，Leu DH，et al.Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations [J]. Genome Res，2009，19：1033-1043.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net