

# 香菇纤维素酶基 *cel6B* 的克隆及表达

杨 婷 裴雁曦 王景雪

(山西大学 生命科学学院,山西 太原 030006)

**摘要:**以液体 PDA 中培养的香菇菌丝体为材料,提取香菇总 RNA,通过 RT-PCR 方法,克隆得到纤维素酶基因 *cel6B*,并成功构建了原核表达载体 pET28a-*cel6B*;将该载体转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,构建工程菌,用 IPTG 诱导蛋白质的表达。SDS-PAGE 电泳结果表明:在 IPTG 诱导下,*cel6B* 基因编码出 46.4 kDa 的蛋白质 CEL6B。将工程菌在 CMC-Na(羧甲基纤维素钠)为唯一碳源的刚果红液体培养基中培养 7 d 后,培养基红色变浅,初步证明纤维素酶 CEL6B 具有分解纤维素的能力。

**关键词:**香菇;纤维素酶;*cel6B* 基因;刚果红;RT-PCR

中图分类号:S567.3<sup>+</sup>9;Q785 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)03-0042-05

## Cloning of Cellulase Gene *cel6B* from *Lentinula edodes* and Its Expression in *Escherichia coli*

YANG Ting, PEI Yan-xi, WANG Jing-xue

(College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** Total RNA was extracted from *L. edodes* cultured in liquid PDA medium. The predicted gene *cel6B* was cloned via RT-PCR and sequenced. The result of sequence analysis showed the gene belongs to Glycosyl hydrolases family 6. Prokaryotic expression vector pET28a-*cel6B* was constructed. The 46.4 kDa protein CEL6B was expressed based on the result of SDS-PAGE. The bacteria containing pET28a-*cel6B* was cultured in CMC-Na-congo red medium which has CMC-Na as the solo carbon source to test the cellulase activity. The result of primary bioactivity analysis showed that CEL6B has cellulase function.

**Key words:** *Lentinula edodes*; Cellulase; *cel6B* gene; Congo red; RT-PCR

纤维素(Cellulose)是一种不溶性的结晶多糖物质,由D-吡喃型葡萄糖基经 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键连接而成,它在地球上分布很广泛,全球每年通过光合作用产生的纤维素高达 $1.55 \times 10^9$  t<sup>[1]</sup>。纤维素的基本单位是葡萄糖,但由于纤维素具有水不溶性的高度结晶构造,其外围又被木质素包围着,要把它水解成可利用的葡萄糖非常困难<sup>[2]</sup>,自然界对其的利用率很低。目前酸水解和酶水解是用途较多的降解纤维素类生物量的两大途径,前者起步较早,但随着酸废料污染的产生和面临由酸复原成糖的一些技术困难,应用受到限制,而酶水解法以其高效和环境友好的优点,快速地朝着更加高效和低耗的方向发展<sup>[3]</sup>。

纤维素酶(Cellulase)是糖苷水解酶的一类,是指能够降解纤维素生成葡萄糖的酶的总称。狭义的

纤维素酶可分为3类:外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[4]</sup>。将纤维素分解为单糖至少需要以上3种酶共同作用<sup>[5]</sup>,其中外切葡聚糖酶作用于内切葡聚糖酶之后,将纤维素分子进一步水解为纤维二糖或纤维寡糖。纤维素作为大分子多糖,其水解形成的多聚糖类可以与刚果红牢固结合,形成红色复合物<sup>[6]</sup>;当纤维素被分解消耗掉,纤维素和刚果红原先形成的红色复合物也不复存在,红色即褪去。纤维素酶大体上是一个模块化结构,其分子结构主要由3部分组成:催化结构域(Catalytic domain, CD)、纤维素结合域(Cellulose binding domain, CBD或Carbohydrate binding module, CBM)和连接这两部分的连接桥(Linker)。纤维素酶广泛存在于自然界的生物体中,植物、细菌、真菌和动物体内都能

收稿日期:2011-01-25

基金项目:山西省攻关计划(2007031002-14)

作者简介:杨 婷(1982-),女,河北唐山人,助理研究员,在读硕士,主要从事细胞生物学研究。

通讯作者:王景雪(1961-),女,山西新绛人,教授,博士,硕士生导师,主要从事植物基因工程研究。

产生<sup>[7]</sup>。迄今,在纤维素酶的菌种开发、发酵培养,基因克隆与表达,以及纤维素酶在纺织、能源等方面的应用都取得一定进展<sup>[8]</sup>。

本试验选取香菇外切葡聚糖酶基因 *cel6B*,该基因可编码含 444 个氨基酸的蛋白质 CEL6B,约 46.4 kDa。CEL6B 酶单独作用于纤维素时,分解能力较差,但它有助于推动纤维素酶的协同作用,使其发挥最大活性<sup>[9]</sup>。本试验通过 RT-PCR 方法,从液体培养的香菇菌丝体中克隆出 *cel6B* 基因,构建原核表达载体,并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达 CEL6B 蛋白质。通过羧甲基纤维素钠-刚果红培养基褪色试验初步证明,该纤维素酶 CEL6B 具有分解纤维素的活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

香菇菌种购自山西农业科学院食用菌研究所; *pEASY™-T1 Cloning Vector* 购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 香菇总 RNA 的提取 无菌条件下接种香菇菌丝体至装有 50 mL PDA 液体培养基的三角瓶中,35℃ 转速 80 r/min 培养至第 13 天时,香菇长成直径 1~2 cm 光滑的团状菌丝体,取用此时的香菇作为材料,用 RNAiso Plus 试剂盒提取香菇总 RNA。

1.2.2 *cel6B* 基因的克隆 根据文献报道的 *cel6B* 基因核苷酸序列(AF411251),设计特异性引物:

5' 引物: 5'-GGGGGATCCATGAAGATTACTTC-CACTG-3'; 3' 引物: 5'-AAAAAGCTTCTATAGAG-GAGGGTTGGCC-3'。

以香菇总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,在上述特异引物的作用下,通过 PCR 扩增得到 *cel6B* 基因片段。

采用 TA Cloning 系统将纯化的 PCR 产物连接到 *pEASY™-T1 Cloning* 载体上。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,然后用连接产物转化感受态细胞。转化后,将转化产物涂布在含有氨苄青霉素 (Amp)、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基平板上筛选转化子。提取筛选平板上白色菌落的质粒 DNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测筛选出的重组子。

1.2.3 重组质粒的鉴定及序列测定 随机挑取 5 个单克隆,用 BioFlux 柱式质粒小量抽提试剂盒抽提质粒 DNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。正确的克隆送至北京华大基因中生物科技有限公司测序,并用 MegAlign 软件对测序结果进行了氨基酸水平比对分析。

1.2.4 原核表达载体的构建 分别用 *Bam*H I 和

*Hind* III 双酶切重组质粒和 pET-28a(+) 载体,30℃ 过夜酶切,酶切结束,进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。用 BioFlux 柱式胶回收试剂盒分别回收含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的 *cel6B* 基因片段和 pET-28a(+) 载体片段。用 T4 连接酶连接两片段,构建新的原核表达载体。

### 1.2.5 重组原核表达载体在 BL21 (DE3) 中诱导表达

挑取阳性克隆大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌落于含 50 mg/L 卡那霉素 (Kan) 的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养 16 h 后,以 1:100 比例接种于新鲜的同种培养基中扩大培养,37℃ 振荡培养 2 h。当 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.8 A 时,向培养基中加入异丙基硫代-B-D-半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol/L,30℃ 70 r/min 振荡培养,诱导工程菌的表达。诱导前和诱导后 1、2 h 分别取样 1 mL,分离菌体和上清液,进行蛋白质表达水平 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。

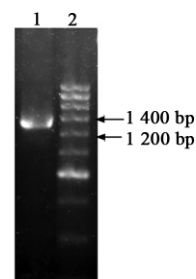
1.2.6 纤维素酶 CEL6B 分解羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 将 1.2.5 中细菌培养物扩大培养 2 h,加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养。以未诱导培养的菌液为对照,未诱导和诱导培养 1、2 h 时各取菌液 1 mL,分别加入含 50 mg/L 卡那霉素 (Kan) 的 CMC-Na-刚果红液体培养基<sup>[10]</sup>。30℃ 180 r/min 培养,观察培养基褪色情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 香菇总 RNA 的提取及 *cel6B* 基因的克隆

按照 1.2.1 所述方法,提取香菇总 RNA,提取产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

以香菇总 RNA 反转录成的 cDNA 为模板, *cel6B* 基因两端序列为特异性引物,用 PCR 扩增的方法,从香菇总 RNA 中扩增 *cel6B* 基因。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到一条大小约 1.3 kb 的特异性扩增条带 (图 1)。



1. *cel6B* 基因; 2. 分子量标记。

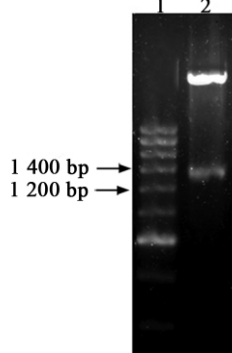
1. *cel6B* gene; 2. Molecular Marker.

图 1 RT-PCR 扩增香菇 *cel6B* 基因

Fig. 1 The result of *cel6B* gene by RT-PCR amplification

回收该 1.3 kb 的条带,并按 1.2.2 所述方法,将该片段构建到 *pEASY™-T1 Cloning* 载体上。将载体转入大肠杆菌并随机挑取 2 个单克隆进行 *Bam*H I + *Hind*

III 双酶切鉴定 酶切结果显示 2 条带, 其中一条为约 1.3 kb 的特异性条带, 一条为载体的酶切条带(图 2)。



1. 分子量标记; 2. *cel6B*-T 载体/ *Bam*HI + *Hind* III 双酶切。  
1. Molecular Marker; 2. *cel6B*-T/*Bam*HI + *Hind* III digestion.

图 2 *cel6B*-T 重组质粒酶切鉴定

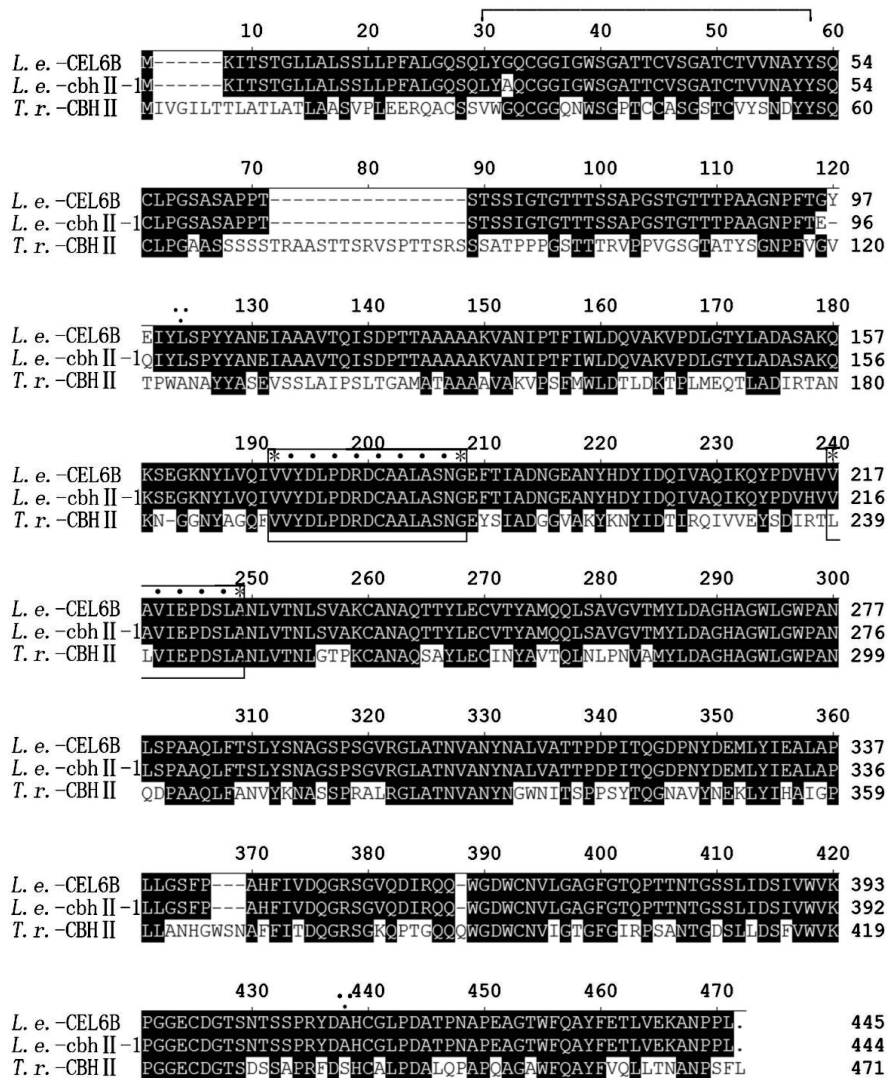
Fig.2 The result of digestion analysis of recombinant plasmid *cel6B*-T

说明 *cel6B* 基因片段已经正确连接到 *pEASY*<sup>TM</sup>-T1 Cloning 载体上。将重组质粒命名为 *cel6B*-T 并送北京华大基因中生科技有限公司测序。

## 2.2 测序结果及分析

测序结果显示, 本研究得到的 *cel6B* 基因片段全长是 1 335 bp, 与已发表的 *cel6B* 基因序列 (AF411251) 相比较, 核苷酸序列同源性达到 100%, 说明该基因克隆正确。

将该 *cel6B* 基因用 EditSeq 软件翻译为蛋白质, 并与另外两个纤维素酶, 即 *Lentinula edodes* cbh II-1 (AAK28357) 和 *T. reesei* CBH II (AAA34210.1) 编码的氨基酸序列进行比对(同为葡聚糖水解酶家族 6, pfam013410)(图 3), 结果显示 CEL6B 与香菇 cbh II-1 氨基酸序列的同源性为 98.9%。在 CEL6B 的



— 表示 CBM 结构域; ······ 表示葡聚糖水解酶家族 6 的保守结构域; \* ······ 表示高度保守序列;

缩写: *L. e.* 香菇; *T. r.* 里氏木霉; cbh II-1. 外切纤维素酶。

— denotes the amino acids defines the CBM; ······ over the conserved domain belongs to Glycosyl hydrolases family 6;

\* ······ shows the sequence of highly conserved sequence; Abbreviations: *L. e.* *Lentinula edodes*; *T. r.* *Trichoderma reesei*; cbh II-1. *cellobiohydrolase*.

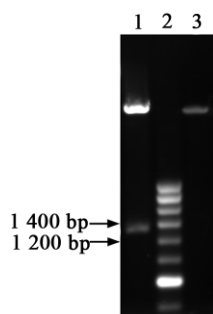
图 3 *cel6B* 基因推导蛋白序列及相关蛋白序列分析

Fig.3 Sequence and alignment of *L. edodes cel6B* predicted polypeptide with other fungal cellulases

氨基端(24~52 残基)是纤维素结合域 CBM,其中有 4 个保守的半胱氨酸,都参与形成二硫键结构,使其结构稳定。香菇 *CEL6B* 中有两段高度保守序列(169~185 残基,217~226 残基),与 *cbh II-1* 相比,序列完全相同,与里氏木霉 *CBH II* 相比,仅在 2 个氨基酸位上有差别(Val 217→Leu, Ala 218→Leu)。根据氨基酸序列分析结果显示,CEL6B 蛋白具有可以与纤维素结合的结构域,和水解酶催化结构域,因此可以推测,该基因所编码的蛋白质具有葡聚糖水解酶家族 6 的纤维素分解功能,在体内该蛋白是以包涵体形式存在的。

### 2.3 原核表达载体 pET28a-*cel6B* 构建

利用限制性内切酶 *BamH I* + *Hind III* 从重组质粒上将 *cel6B* 基因片段切下,按照 1.2.4 所述原核表达载体的构建方法,将 *cel6B* 基因连接到 pET-28a(+) 载体上,构建成新的原核表达载体。用限制性内切酶 *BamH I* + *Hind III* 双酶切,电泳显示两条带,其中一条约 1.3 kb,另一条与 *BamH I* 单酶切处理的 pET-28a(+) 载体大小相同(图 4)。说明该载体构建正确,并命名为 pET28a-*cel6B*。



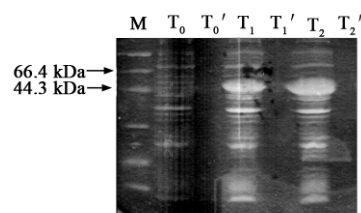
1. pET28a-*cel6B* 载体 / *BamH I* + *Hind III* 双酶切;
2. 分子量标记; 3. pET-28a(+) 载体 / *BamH I* 酶切。
1. pET28a-*cel6B* / *BamH I* + *Hind III* digestion;
2. Molecular marker; 3. pET-28a(+) / *BamH I* digestion.

图 4 pET28a-*cel6B* 重组原核表达载体酶切鉴定结果  
Fig. 4 The results of digestion analysis of recombinant prokaryotic expression vector pET28a-*cel6B*

### 2.4 CEL6B 蛋白质的诱导表达

将重组原核表达载体转入大肠杆菌 BL21

(DE3) 感受态细胞中,在含有卡那霉素(Kan)的 LB 培养基平板上筛选转化子。随机挑取单克隆,提取质粒 DNA 并鉴定。挑取阳性克隆菌落于含 Kan 的 LB 液体培养基中,振荡培养 16 h,取 500  $\mu$ L 接种至 50 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中扩大培养,2 h 后取样 1 mL(即  $T_0$ )作为对照;添加诱导剂 IPTG 后 1、2 h 分别取样 1 mL。离心分离菌体( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ )和上清液( $T_0'$ ,  $T_1'$ ,  $T_2'$ ),各取 15  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳(图 5)。从电泳结果可以看出,在大约 46 kDa<sup>[11]</sup>处有一条特异的蛋白质条带清晰可见,随诱导时间的增加,该蛋白量增加。说明该特异表达的蛋白质就是由 *cel6B* 基因编码的 46.4 kDa 的 CEL6B 蛋白质。从图 5 中我们还可以看到,在该蛋白诱导表达前后,上清液中都没有蛋白质。说明,该蛋白是以包涵体的形式在细菌中进行表达,这与预测的结果相一致。

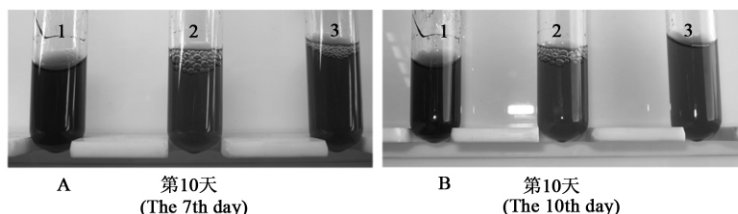


- M. 蛋白质分子量标记(低);  $T_0$ ,  $T_0'$ . 未诱导培养基;  
 $T_1$ ,  $T_1'$ ,  $T_2$ ,  $T_2'$ . 诱导培养基。  
M. Protein Maker( Low);  $T_0$ ,  $T_0'$ . Non-induced culture ;  
 $T_1$ ,  $T_1'$ ,  $T_2$ ,  $T_2'$ . induced culture.

图 5 细菌培养物总蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳结果  
Fig. 5 The result of SDS-PAGE electrophoresis of total proteins of cultures

### 2.5 纤维素酶 CEL6B 分解 CMC-Na

于诱导前和诱导后 1、2 h 分别取菌液 1 mL,加入到 CMC-Na-刚果红液体培养基中振荡培养,第 7 天可见添加了菌液的诱导培养基出现褪色(图 6-A),第 10 天可见红色继续褪去,与对照差别明显(图 6-B),初步证明,纤维素酶 CEL6B 具有分解 CMC-Na 的活性。



1. 对照; 2. 添加了被诱导 1 h 的菌液; 3. 添加了被诱导 2 h 的菌液。  
1. Control; 2, 3. Bacterial medium induced after 1 h and 2 h was plated respectively.

图 6 纤维素酶 CEL6B 分解 CMC-Na

Fig. 6 The result of fermentation of *E. coli* including pET28a-*cel6B* plasmid with CMC-Na medium

### 3 讨论

本试验的结果表明:从香菇中分离克隆到的 *cel6B* 基因可以通过原核表达载体表达该基因编码的纤维素酶。经过 IPTG 诱导表达,在诱导后 1 h 时,该蛋白就得到了特异的表达,说明该基因在大肠杆菌中可以较容易地表达,有利于后期工作的开展。*cel6B* 基因通过原核表达载体表达蛋白质,经过 CMC-Na-刚果红液体培养基褪色试验,初步证明表达产物有一定的纤维素分解活性,为今后的工作奠定了良好的工作基础。

从文献报道中可知,香菇 *cbh II-1* 酶是外切葡聚糖酶。通过序列比对分析得知,CEL6B 与 *cbhII-1* 的 CBM 和 CD 序列都完全相同,它们都是葡聚糖水解酶家族 6 的成员,因此可以推测香菇 *cel6B* 基因也是外切葡聚糖酶基因,这在其他一些文献中得到证明。里氏木霉是工业生产纤维素酶的主要真菌菌种,由它产生的纤维素酶以酶谱全、活力高的特点而著称,纤维素酶 CBH II 是其中被研究和应用较高的酸性酶之一,最适反应温度为 50℃,最适 pH 值为 5~6。CEL6B 与 CBH II 在关键序列上的高度相似性也预示着它们的功能相似性,但还需要做进一步的研究加以证实。

目前较常用的、工业生产的纤维素酶主要由真菌产生,如木霉属 (*Trichoderma*)、青霉属 (*Penicillium*) 等,生产形式主要是直接发酵生产,但普遍存在产酶成本高、产酶时间较长的问题<sup>[12]</sup>,并且目前大部分纤维素酶基因的表达水平较低。当蛋白需求量比较大、供给时间又不长的情况下,利用转基因植物作为宿主来表达纤维素酶基因是不错的选择<sup>[13]</sup>。本研究从大型真菌中克隆纤维素酶基因 *cel6B*,通过氨基酸序列比对,预测了它可能的一些特性,由此推论该基因一方面可以转回到香菇中,改进香菇种植,提高香菇产量;另一方面,可以转到植物中,利用转基因植物作为生物反应器生产纤维素酶,以期大大降低纤维素酶的生产成本,改善纤维素类粗饲料的营养价值,提高纤维素类生物废料的再利用率。

#### 参考文献:

[1] 刘永生,冯家勋,段承杰,等. 能降解天然纤维素的地

衣芽孢杆菌 GXN151 的分离鉴定及其一个纤维素酶基因(*cel5A*)的克隆和测序分析[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(2): 132-138.

- [2] 武秀琴. 纤维素酶及其应用[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(2): 89-92.
- [3] Rajeev K S, Reeta R S, Gincy M M, et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production [J]. Renewable Energy, 2009(34): 421-424.
- [4] 白洪志,杨谦,张鲁进. 纤维素降解菌简青霉 H-11 的筛选及酶学特性的研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 160-162.
- [5] Zhou Jin, Wang Y H, Chu Ju, et al. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 819-825.
- [6] 刘起丽,张建新,徐瑞富,等. 纤维素刚果红培养基筛选产纤维素酶菌株的影响因素研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 279-281.
- [7] 吕慧卿,李日强,董良利,等. 一株秸秆分解菌的分离及酶活力测定[J]. 山西农业科学, 2004, 32(2): 53-56.
- [8] Chen Y, Stipanovic Arthur J, William T Winter, et al. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses [J]. Cellulose, 2007, 14(4): 283-293.
- [9] Thu V, David B, Wilson. The absence of and identifiable single catalytic base residue in *thermobifida fusca* exocellulase Cel6B [J]. The FEBS Journal, 2009, 276: 4261-4269.
- [10] 张超,李艳宾,张磊,等. 纤维素-刚果红培养基鉴定产纤维素酶真菌的机理研究[J]. 纤维素科学与技术, 2007, 15(2): 39-44.
- [11] Charles C Lee, Dominic WS Wong, George H Robertson. Cloning and characterization of two cellulase genes from *Lentinula edodes* [J]. Microbiology, 2001, 205: 355-360.
- [12] 沈业寿,王光存,陈斌. 超薄层琼脂板扩散法快速检测纤维素酶[J]. 中国食用菌, 1994, 13(5): 33-35.
- [13] 顾方媛,陈朝银,石家骥,等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 83-87.