**反刍动物消化道微生物CAZymes基因资源的挖掘与功能分析Mining and Functional Characterization of CAZymes Derived from Gastrointestinal Microbiota in Ruminants**

王谦\*，王佳堃，孙小宝，曹佳雯

奶业科学研究所，动物科学学院，浙江大学，杭州，浙江

\*通讯作者邮箱: [emirate14@zju.edu.cn](mailto:emirate14@zju.edu.cn)

**摘要：**木质纤维素作为一种可再生的生物质资源具有极大的应用潜力。碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enzymes, CAZymes) 能有效解聚木质纤维素底物成为可利用的寡糖与单糖。研究基于宏转录组技术从反刍动物消化道微生物中筛选获得的碳水化合物活性酶序列，克隆候选基因并在大肠杆菌中进行异源表达，对重组酶进行分离纯化，进一步表征其生化特性。

**关键词：**反刍动物，消化道微生物，宏转录组，CAZyme，功能分析

**材料与试剂**

1. 0.22 μm无菌针孔过滤器 (Sangon Biotech, catalog number: F513134-0001)
2. 高保真DNA聚合酶 (2× Phanta Max Master Mix, Vazyme, catalog number: P515-02)
3. DNA聚合酶 (Taq Master Mix (Dye Plus), Vazyme, catalog number: P112-02)
4. DNA Marker (Fermentas, GeneRulerTM 100 by Plus DNA Ladder)
5. 蛋白Marker (Fermentas, PageRulerTM Prestained Protein Ladder)
6. T4 DNA连接酶 (TransGen Biotech, catalog number: FL101-01)
7. 限制性内切酶 *Eco*RI (TaKaRa, catalog number: 1040BH)；*Hin*dIII (TaKaRa, catalog number: 1060B)
8. 质粒提取试剂盒 (Omega，Plasmid Mini Kit I (200) 200T)
9. PCR产物纯化试剂盒 (Corning, Axygen, catalog number: AP-PCR-50)
10. 割胶回收试剂盒 (Corning, Axygen, catalog number: AP-GX-50)
11. 反转录试剂盒 (Toyobo, ReverTra Ace Kit)
12. 试剂：酵母膏、胰蛋白胨、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG (BBI)
13. Ni-NTA agarose (Sangon Biotech, catalog number: C600033)
14. 40%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 (29:1) 溶液 (Sangon Biotech, catalog number: B546012-0500)
15. EDTA·2H2O (Sangon Biotech, catalog number: A500838-0500)
16. Tris (Sangon Biotech, catalog number: A610195-0500)
17. 冰醋酸 (国药, catalog number: 64-19-7)
18. 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNS) (Sangon Biotech, catalog number: A500420-0100)
19. NaOH (国药, catalog number: 10019718)
20. 酒石酸钾钠 (Sangon Biotech, catalog number: A500881-0500)
21. NaCl (Sangon Biotech, catalog number: A501218-0001)
22. KCl (Sangon Biotech, catalog number: A100395-0500)
23. Na2HPO4 (Sangon Biotech, catalog number: A501727-0500)
24. KH2PO4 (Sangon Biotech, catalog number: A100781-0500)
25. SDS (Sangon Biotech, catalog number: A500228-0001)
26. 甘氨酸 (Sangon Biotech, catalog number: A610235-0005)
27. 过硫酸铵 (Sangon Biotech, catalog number: A500857-0100)
28. 溴酚蓝 (Sangon Biotech, catalog number: A500922-0025)
29. 甘油 (Sangon Biotech, catalog number: A100854-0500)
30. β-巯基乙醇 (Macklin, catalog number: M6230-25ml)
31. 甲醇 (国药, catalog number: 10014118)
32. 考马斯亮蓝 R-250 (Sangon Biotech, catalog number: A100472-0025)
33. LB (Luria-Bertani) (见溶液配方)
34. 0.5 mol/L EDTA (见溶液配方)
35. 50 × TAE母液 (见溶液配方)
36. 100 mg/ml Kan (见溶液配方)
37. IPTG储存液 (见溶液配方)
38. 3,5-二硝基水杨酸溶液 (见溶液配方)
39. PBS缓冲液 (pH 7.4) (见溶液配方)
40. 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) (见溶液配方)
41. 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) (见溶液配方)
42. 10% SDS (w/v) (见溶液配方)
43. 50%甘油 (v/v) (见溶液配方)
44. 5 × SDS-PAGE缓冲液 (见溶液配方)
45. 10%过硫酸铵AP (w/v) (见溶液配方)
46. 1%溴酚蓝 (w/v) (见溶液配方)
47. 5 × SDS上样缓冲液 (见溶液配方)
48. R250染色液 (见溶液配方)
49. SDS-PAGE脱色液 (见溶液配方)
50. NaH2PO4母液 (500 mmol/L) (见溶液配方)
51. NaCl母液 (3 mol/L) (见溶液配方)
52. 1 mol/L咪唑 (见溶液配方)
53. Washing buffer 1 (含20 mmol/L咪唑) (见溶液配方)
54. Washing buffer 2 (含50 mmol/L咪唑) (见溶液配方)
55. Eluent buffer (含50 mmol/L咪唑) (见溶液配方)
56. 转膜缓冲液 (见溶液配方)
57. TBST (见溶液配方)
58. 封闭液 (见溶液配方)

**仪器设备**

1. 离心机 (Eppendorf, model: Centrifuge MiniSpin)
2. PCR仪 (Eppendorf, model: Mastercycler Pros)
3. 电子分析天平 (梅特勒-托利多, model: EL204)
4. 微波炉 (格兰仕, model: D80D23NTP-7T)
5. 空气恒温摇床 (宁波科技园区新江南仪器有限公司, model: KYC-100B)
6. 生化培养箱 (宁波东南仪器有限公司, model: LRH-50)
7. 洁净工作台 (苏州市金净净化设备科技有限公司, model: JJ-CJ-ETD)
8. 水平脱色摇床 (苏州威尔实验用品有限公司, model: ZD-9560)
9. 凝胶成像系统 (Molecular imager, model: GeL.Dcode XR+)
10. 立式压力蒸汽灭菌器 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂, model: YXQ-75SII)
11. 超声波破碎仪 (浙江宁波/新芝, model: JY98-IIIDN)

**软件和数据库**

* + - 1. dbCAN HMMdb v9 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>)
      2. Carbohydrate-Active enZYmes Database (<http://www.cazy.org>)
      3. Pfam Database (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0>)
      4. Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
      5. Oligo 6.0

**实验步骤**

1. CAZymes功能注释

将前期通过测序组装得到的unigenes基因，通过在线软件dbCAN HMMdb v9 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>) 进行分析注释，该分析网站是基于CAZy数据库 (version：20200730) ，根据CAZy数据库，CAZy中一个家族通常包含多种酶，从功能注释的结果中筛选出属于至少包含一种纤维素酶家族 (Glycoside Hydrolases，GHs—GH1、GH3、GH5等；GlycosylTransferases，GTs：GT1，GT2，GT3等；Polysaccharide Lyases，PLs—PL1，PL2，PL3等；Carbohydrate Esterases，CEs—CE1，CE2，CE3等；Auxiliary Activities，AAs—AA1，AA2，AA7等) 的unigenes。将所有预测ORFs的氨基酸序列与Pfam数据库 (version 4.0) (<http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab0>) 在线比对，分析结构域，进一步预测其蛋白功能，筛选出能够比对到纤维素酶家族功能域的序列作为后续研究对象 (王谦, 2020) (He *et al*. 2019)。

1. 克隆目的基因
   1. 引物的设计：以步骤1中筛选出的基因为模板，通过Oligo 6.0进行引物设计，加上相应的酶切位点，并送至Sangon Biotech进行合成。
   2. cDNA合成：以消化道微生物总RNA为模板，逆转录合成cDNA，反应体系与条件如下：

|  |  |
| --- | --- |
| Random Primer (25 pmol/μl) | 1 μl |
| 总RNA | ~1 μg |
| 加RNase Free Water至 | 12 μl |

65 °C孵育5 min使RNA热变性，立即置于冰上。

|  |  |
| --- | --- |
| 第一步变性后的RNA溶液 | 12 μl |
| 5× RT Buffer | 4 μl |
| dNTP Mixture (各10 mM) | 2 μl |
| RNase Inhibitor (10 U/μl) | 1 μl |
| ReverTra Ace | 1 μl |
| 加RNase Free Water至 | 20 μl |

将反应液于30°C孵育10 min；42 °C孵育20 min；99 °C孵育5 min；4 °C孵育5 min，然后瞬时离心得到cDNA。

* 1. 目的基因PCR扩增：以合成的cDNA为模板，利用自行设计的特异性引物PCR扩增目的基因，扩增体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 2× Phanta Max Master Mix | 25 μl |
| Forward primer (10 mM) | 2 μl |
| Reverse primer (10 mM) | 2 μl |
| cDNA模板 | 2 μl |
| 加ddH2O至 | 50 μl |

涡旋振荡混匀，稍离心后放入PCR仪中。扩增条件如下：

|  |  |
| --- | --- |
| Step | 程序 |
| 1：95 °C | 预变性3 min |
| 2：95 °C | 变性30 s |
| 3：65 °C | 退火15 s |
| 4：72 °C | 延伸30 s |
| Steps 2~4循环29次 | |
| 5：72 °C | 继续延伸5 min |
| 6：16 °C | 保存 |

* 1. 琼脂糖凝胶电泳检测：用1.0%琼脂糖凝胶 (1 g琼脂糖，溶于100 ml 1 × TAE，再加入3 μl GoldViewer I染料) 对目的基因进行检测。取3 μl PCR产物加0.5 μl 6 × DNA上样缓冲液，混匀取3 μl上样；120 V，电流400 mA，30 min；观察图像。
  2. 目的条带回收纯化：参照Marker条带分子量，根据目的基因实际大小，在紫外发光仪上切取目的条带胶块，参照胶回收试剂盒说明书回收纯化目的基因片段。

1. 原核表达载体的构建
   1. 目的基因和载体双酶切：以pET-30a(+)载体为例，酶切体系及条件如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 目的基因片段/pET-30a(+) | 1 μg |
| 10 × buffer | 5 μl |
| 酶1/酶2 | 各1 μl |
| 加ddH2O至 | 50 μl |

混匀离心，37 °C，3 h。通过产物纯化试剂盒纯化基因片段，并通过割胶回收试剂盒回收载体片段 (具体方法参照试剂盒说明书)。

* 1. 双酶切目的基因和载体连接：连接反应体系如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 目的片段 | 8 μl |
| 载体 | 2 μl |
| 5 × ligation buffer | 3 μl |
| T4 DNA连接酶(200 U/μl) | 1 μl |
| 加ddH2O至 | 15 μl |

混匀离心，24 °C保温2 h。

* 1. 热激转化

1. 将上述的连接产物与100 μl大肠杆菌BL21感受态细胞混合，轻弹管壁，使样品混匀，冰浴30 min；
2. 42 °C下热激60 s，立即冰浴5 min；
3. 加入500 μl 37 °C预热的液体LB，37 °C下150 rpm培养复苏1 h；
4. 6,000 rpm 离心2 min，弃上清，剩余100 μl LB悬菌，将所有转化后的细菌液涂于含有50 μg/ml Kan LB平板上，在37 °C下培养12~16 h后，观察平板上的细菌密度。挑取单菌落进行培养，在37 °C，200 rpm，12~16 h后提取质粒，PCR产物电泳后，若存在预期大小的DNA片段，并将该质粒送至Sangon Biotech进行测序验证，将测序拼接后结果通过Clustal Omega在线软件进行序列比对(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)，测序验证成功的质粒为阳性质粒，该菌株为阳性菌株。
5. 阳性菌株的诱导表达及蛋白纯化
   1. 种子液制备：取阳性菌液在操作台中，接种于5 ml含50 μg/ml Kan的LB中，37 °C，200 rpm培养12~16 h。
   2. 目的蛋白诱导表达：取2 ml种子液接种至200 ml LB培养基，37 °C培养至OD600 = 0.5~1.0 (约3~5 h)。加入200 μl 1 mol/L的IPTG，16 °C 100 rpm诱导16~20 h。诱导表达后，6,000 *× g*，4 °C，离心8 min收集菌体，用事先预冷的1× PBS (pH 7.4)重新悬浮菌体。超声波破碎 (开3 s，关5 s，工作时间15 min)，4 °C，10,000 *× g*，离心15 min，取上清；4 °C，10,000 *× g*，15 min，重复离心一次，所得上清即为粗酶液。
   3. 蛋白纯化
      1. 取50 ml粗酶液，加入Ni-NTA树脂填料1 ml，并加入咪唑使终浓度为20 mmol/L，于冰上60 rpm缓慢孵育，使镍离子与目的蛋白的6×His标签充分结合。
      2. 孵育1~2 h后，于空层析柱纯化，并收集滤液 (Flow-through，记为FT)，可将穿透液重复上柱2~3次。
      3. 加10~20倍柱床体积的Washing buffer 1重复清洗填料并收集，记为W1。
      4. 加1 ml washing buffer 2，收集清洗液，记为W2。
      5. Washing buffer 2洗涤后，每次用1个柱床体积的Elution buffer约1 ml洗脱目的蛋白，重复洗脱4次，收集洗脱液，记为E1、E2、E3、E4 (加入Elution buffer时沿着管壁加，防止将填料冲起)。
      6. 加入20%乙醇冲洗填料，回收填料，4 °C保存。
6. SDS-PAGE蛋白电泳
   1. 样品制备：超声破碎后，离心管于10,000 *× g*，4 °C，离心15 min取80 μl粗酶液、沉淀、FT、W1、W2、E1、E2、E3、E4，加5 × 蛋白上样缓冲液，混匀后煮沸5 min，冷却至室温，10,000 *× g*，室温离心10 min，备用。
   2. 制胶：SDS-PAGE配方如下：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 组成 | 12%分离胶 (ml) | 4%浓缩胶 (ml) |
| ddH2O | 8.6 | 4.38 |
| 40% Acr-Bis | 6.0 | 0.75 |
| 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) | 5.0 |  |
| 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) |  | 0.75 |
| 10% SDS | 0.2 | 0.06 |
| 10% AP | 0.2 | 0.06 |
| TEMED | 0.008 | 0.006 |
| 总计 | 20 | 6 |

* 1. 电泳：90 V，20 min，待条带迁移至分离胶与浓缩胶分界处，再转换电压至120 V，电泳1.5 h左右。待溴酚蓝迁移至凝胶的底部大约1 cm时，电泳停止。
  2. 染色与脱色：将凝胶剥落到塑料盒中，倒入R250染料，使胶完全浸没于染料中。水平震荡摇床染色30 min左右，回收染料，并用ddH2O洗去表面的染料，加脱色液脱色 (脱色液没过凝胶表面)，直至出现清晰条带。并通过标准蛋白质Marker计算蛋白分子量。
  3. Western-blot
     1. 以上述SDS-PAGE相同方式进行电泳，小心剥下凝胶置于转膜缓冲液中，并浸湿NC膜，以 (-) 极-三层滤纸-胶-NC膜-三层滤纸 (+) 极的方式，于转膜缓冲液中，60 V进行湿转，转膜时间为60 min (具体的转膜时间要根据目的蛋白的大小而定，目的蛋白的分子量越大，需要的转膜时间越长，目的蛋白的分子量越小，需要的转膜时间越短。在转膜过程中，特别是高电流快速转膜时，通常会有非常严重的发热现象，最好把转膜槽放置在冰浴中进行转膜)。
     2. 封闭：转膜完毕后，立即把蛋白膜放置到预先准备好的TBST中，漂洗1-2 min，以洗去膜上的转膜液。吸尽洗涤液，加入Western封闭液，在摇床上缓慢摇动，室温封闭60~120 min (对于一些背景较高的抗体，可以4 °C封闭过夜，从转膜完毕后所有的步骤，一定要注意膜的保湿，避免膜的干燥，否则极易产生较高的背景)。
     3. 一抗孵育：参考一抗说明书，按照适当比例稀释一抗。吸尽封闭液，立即加入稀释好的一抗，室温或4 °C在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时。如果一抗孵育一小时效果不佳，可以4 °C缓慢摇动孵育过夜或根据抗体说明书选择适当的稀释倍数，回收一抗。加入TBST，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤5~10 min。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液洗涤5-10分钟。共洗涤3次 (如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数)。
     4. 二抗孵育：吸尽洗涤液，立即加入稀释好的二抗，室温或4 °C在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时，回收二抗。加入TBST，在侧摆摇床上缓慢摇动洗涤5~10 min。吸尽洗涤液后，再加入洗涤液洗涤5~10 min。共洗涤3次 (如果结果背景较高可以适当延长洗涤时间并增加洗涤次数)。
     5. 蛋白检测：参考相关说明书，使用ECL试剂来检测蛋白。

1. 蛋白活性测定

*注：具体不同的蛋白其活性测定方法不同，这里以纤维素酶为例。*

吸取60 μl 1%羧甲基纤维素钠底物加入1.5 ml离心管中，37 °C预热5 min后，加入15 μl稀释到合适浓度的酶液，混匀后37 °C反应10 min，立即加入75 μl DNS混匀，100 °C煮沸15 min。冷却至室温后测定OD540值。(Miller, 1959)

**溶液配方**

1. LB (Luria-Bertani)

酵母膏 (Yeast extract) 5 g

胰蛋白胨 (tryptone) 10 g

NaCl 10 g

加ddH2O定容1,000 ml，分装，121 °C，20 min，4 °C放置

LB固体加入2.0%的琼脂

1. 0.5 mol/L EDTA

取1.861 g EDTA·2H2O加入8.0 ml ddH2O，用NaOH调pH值到8.0，定容至10 ml

1. 50× TAE母液

Tris 242 g，冰醋酸57.1 ml，0.05 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 ml，加ddH2O至1,000 ml，1×为使用液

1. 100 mg/ml Kan

配制终浓度为100 mg/ml，0.22 μm无菌针孔滤膜过滤除菌，-20 °C备用

1. IPTG储存液

将IPTG溶于灭菌ddH2O，配制成1 mol/L，0.22 μm无菌针孔滤膜过滤，-20 °C存放备用

1. 3,5-二硝基水杨酸溶液

50.0 g 3,5-二硝基水杨酸，加入400 ml ddH2O中，缓慢加入80 g NaOH，加入150 g酒石酸钾钠，45 °C溶解，冷却后定容至5,000 ml，室温避光保存

1. PBS缓冲液 (pH 7.4)

8.0 g NaCl

0.2 g KCl

1.42 g Na2HPO4

0.27 g KH2PO4

加800 ml ddH2O溶解，调pH至7.4，定容至1,000 ml，灭菌后室温保存

1. 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)

称取24.2 g Tris，加50 ml ddH2O，盐酸调pH至pH 8.8，加ddH2O至100 ml，4 °C保存

1. 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)

称取12.1 g Tris，加50 ml ddH2O，盐酸调pH至pH 6.8，加ddH2O至100 ml，4 °C保存

1. 10% SDS (w/v)

称取10 g SDS，加ddH2O至100 ml

1. 50%甘油 (v/v)

50 ml甘油，加ddH2O 50 ml

1. 5× SDS-PAGE缓冲液

15.1 g Tris

94 g甘氨酸

5 g SDS

加ddH2O定容至1,000 ml，在室温下长期保存，稀释到1×作为工作液使用

1. 10%过硫酸铵AP (w/v)

称取0.1 g过硫酸铵，加1 ml ddH2O，新鲜配制

1. 1%溴酚蓝 (w/v)

称取100 mg溴酚蓝溶于10 ml ddH2O中，过滤

1. 5× SDS上样缓冲液

0.6 ml 1 mol/L的Tris-HCl (pH 6.8)

5 ml 50%甘油

2 ml 10% SDS

0.5 ml β-巯基乙醇

1 ml 1%溴酚蓝

0.9 ml ddH2O

4 °C放置

1. R250染色液

ddH2O 400 ml与冰乙酸100 ml，甲醇500 ml，0.25 g考马斯亮蓝，过滤

1. SDS-PAGE脱色液

冰乙酸100 ml，甲醇100 ml，用ddH2O定容至1,000 ml

1. NaH2PO4母液 (500 mmol/L)

称取78 g NaH2P04·2H2O溶于800 ml ddH2O，定容至1,000 ml

1. NaCl母液 (3 mol/L)

称取174 g NaCl溶于800 ml ddH2O，定容至1,000 ml

1. 1 mol/L咪唑

称取68 g咪唑溶于800 ml ddH2O，定容至1,000 ml

1. Washing buffer 1 (含20 mmol/L咪唑)

NaH2PO4母液4 ml

NaCl母液4 ml

1 mol/L咪唑800 μl

NaOH调pH至8.0，用ddH2O定容至40 ml

1. Washing buffer 2 (含50 mmol/L咪唑)

NaH2PO4母液4 ml

NaCl母液4 ml

1 mol/L咪唑2 ml

NaOH调pH至8.0，用ddH2O定容至40 ml

1. Eluent buffer (含50 mmol/L咪唑)

NaH2PO4母液4 ml

NaCl母液4 ml

1 mol/L咪唑2 ml

NaOH调pH至8.0，用ddH2O定容至40 ml

1. 转膜缓冲液

称取甘氨酸2.9 g

Tris 5.8 g

SDS 0.37 g

溶于500 ml ddH2O，加入200 ml甲醇，定容至1,000 ml室温储存

1. TBST

称取8.8 g NaCl，溶于800 ml ddH2O，加入20 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和0.5 ml Tween-20，定容至1,000 ml，4 °C储存

1. 封闭液

称取2.5 g脱脂奶粉溶于50 ml TBST，现配现用

**致谢**

国家重点研发计划重点专项子课题“农副产品利用与饲料资源开发技术集成与应用”(2018YFD0501903)。

**参考文献**

王谦. (2012). [木聚糖酶基因的体外定向进化及其高拷贝重组酵母的构建](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD1214&filename=1013186905.nh&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1FhcEFLUmVZRzV6N3VhVVNIS0xhMWFWaktQWXBQaz0=$9A4hF_YAuvQ5obgVAqNKPCYcEjKensW4IQMovwHtwkF4VYPoHbKxJw!!&v=MTE0NTFyRkNuZ1dyM0tWRjI2SGJLd0dOak1xcEViUElSOGVYMUx1eFlTN0RoMVQzcVRyV00xRnJDVVI3cWZiK2Q=). 杭州, 浙江大学博士论文.

He, B., Jin, S., Cao, J. W., Mi, L. and Wang, J. K. (2019). [Metatranscriptomics of the Hu sheep rumen microbiome reveals novel cellulases](https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1498-4). *Biotechnol Biofuels* 12: 153.

Miller, G. L. (1959). [Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.](https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030) *Anal Biochem* 31(3): 426-428.