

大肠杆菌D-木糖异构酶基因的分子克隆与表达

张其玖¹ 龚书宝² 张玉瑛¹ 张兰芳¹ 陈瑞娟²

(中国科学院生物物理研究所, 北京)¹

(轻工业部食品发酵研究所, 北京)²

经DNA体外重组, 并以D-木糖异构酶缺陷型菌株互补加以检定, 获得了大肠杆菌D-木糖操纵子克隆, 通过次级克隆, 分离得到了D-木糖异构酶基因克隆。为试图提高酶活力, 将含有D-木糖操纵子和异构酶基因的克隆DNA片段, 分别克隆到若干个高拷贝质粒上, 并且观察了不同宿主对基因表达的影响。实验结果表明, D-木糖操纵子和D-木糖异构酶基因在不同大肠杆菌菌株细胞中均能表达。

关键词 D-木糖异构酶; 分子克隆; 基因表达

D-木糖异构酶(D-木酮糖异构酶, EC5.3.1.5), 即D-葡萄糖异构酶, 它既能催化D-木糖转化为D-木酮糖, 也能催化D-葡萄糖成为果糖。这两种催化反应在生产上均具有重要的经济意义。前者可以把植物秸秆的半纤维素中的D-木糖转化为酒精酵母可以利用的D-木酮糖, 生产燃料酒精, 用于再生能源的开发; 后者可运用于新型甜味剂——果葡糖浆的生产。

近年来, D-木糖异构酶遗传工程的研究受到了一些国家的重视, 有关该酶分子克隆的研究有了一些报道^[1-3]。本课题在于通过体外DNA重组技术获得D-木糖异构酶基因克隆, 并研究其表达。

材料与 方法

(一) 菌株和质粒

E. coli K₁₂ 菌株K₃₇ (xyl⁺) 为D-木糖异构酶基因供体菌; *E. coli* HB101和C600为克隆时的受体菌。在实验中采用的载体质粒有pBR322、pMB9、pAT153和pWR

13^[4]以及pHV33穿梭质粒。

(二) 酶和化学试剂

本项工作中所用的限制性内切酶, 除EcoR I和Pst I为自己制备外, 其余系购自美国Biolabs公司和西德Boehringer公司; T4DNA连接酶为我所生化厂供给; 大肠杆菌碱性磷酸单酯酶(BAP)系Sigma公司出品; λ DNA和Spp I噬菌体DNA系中国科学院微生物所郑文尧同志赠给。

(三) DNA的制备

大肠杆菌菌株K₃₇染色体DNA采用文献[5]方法制备。质粒DNA按碱法^[6]抽提, 并以RNaseA和RNaseT1处理后通过Sephrose 2B柱纯化。

(四) DNA操作

DNA的酶切、连接和转化均参考文献[7]。实验中所用的酶均按照供货部门说明进行。

DNA酶切片段的分离与纯化采用陷

本文于1986年12月5日收到。

本项工作得到中国科学院基金局资助。

湖北省宜昌市生物技术开发中心刘琼、陈兰香二位同志协助部分技术工作, 一并致谢。

并法^[8]。

(五) 酶活性测定

D-木糖异构酶定量测定按吡唑-半胱氨酸方法^[9]进行。为了解该酶对D-葡萄糖转化能力, 常以D-葡萄糖为底物, 测定催化产物果糖量。蛋白质定量以Folin法^[10]测定。

(六) 培养基和培养条件

M9 培养基^[7]作为主要营养成分, 其中以1%的D-木糖取代葡萄糖为唯一碳源, 作为检定D-木糖异构酶基因克隆用。

甘油培养基^[11]用作培养菌体的液体培养基。通常37℃振荡培养过夜, 离心收集菌体, 悬浮菌体于0.03M磷酸盐缓冲液(pH7.2)中, 超声波处理破碎细胞, 10,000rpm离心20min, 收集上清液, 供测定酶活力和蛋白量用。

结果与讨论

(一) D-木糖操纵子克隆及其鉴定

将大肠杆菌株K₁₂ (xyl⁺) 的染色体DNA以Hind III 酶切后, 与 Hind III 和BAP处理的 pBR322 连接、转化, 以大肠杆菌 HB101 (xyl⁻) 为受体菌, 转化菌涂在以木糖为唯一碳源的 M9 培养基 (10 μg/ml四环素或50 μg/ml氨苄青霉素) 平皿上, 37℃ 培养 36h, 获得了能够利用木糖的克隆菌株。将其质粒 (pX0100) 制备、酶切、电泳鉴定, 结果如图1和图版 I-1所示。pX0100 质粒 DNA 经 Hind III 酶切产生两个 DNA 片段, 其中一个与载体质粒 pBR322 大小一致, 另一个较大的为克隆 DNA 片段, 大小约为 13.2 kb。根据插入片段大小和酶切图谱, 其结果与Rosenfeld等^[3]报告的pLX 1 克隆株的质粒相似。在插入的染色体 DNA 片段中包含了除D-木糖异构酶基因 (xylA)

以外, 尚有D-木酮糖激酶基因 (xylB), 透过酶基因 (xylT), 以及有关的调节基因 (xylR) 等, 构成了D-木糖操纵子。

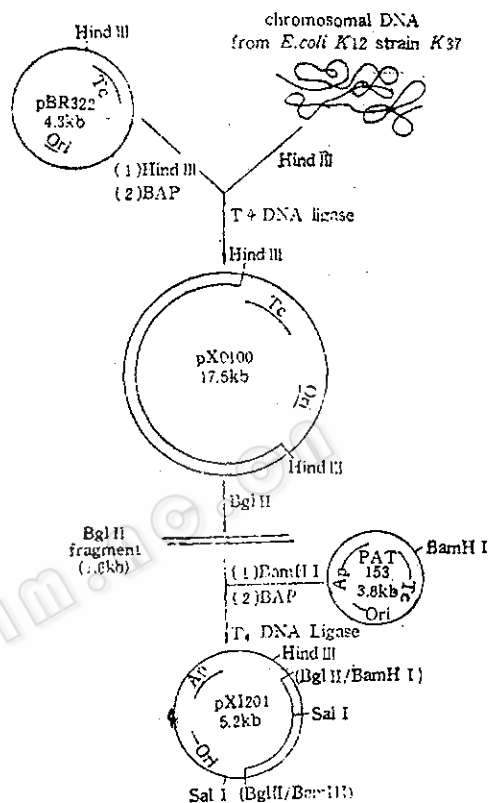


图1 质粒pX0100和pX1201的构建

Fig. 1 Construction of the plasmids pX0100 and pX1201

(二) D-木糖异构酶基因的分离与鉴定

为了获得D-木糖异构酶单个基因的克隆, 将pX0100质粒经 Bgl II 酶切后的 1.6kbDNA片段与Bam HI 和 BAP处理过的 pAT153质粒连接, 经转化得到一些对四环素敏感、抗氨苄青霉素的转化子, 将其克隆质粒 DNA 加以制备, 经酶切和电泳分离, 得到如图版 I-1 所示结果。pX 1201质粒经 Hind III 酶切产生一个 5.2kb片段, 若以Sal I 酶切, 得到 3.9kb 和 1.3kb两个DNA片段, 同时, 该质粒 DNA经Sal I 和Hind III 双酶切, 则产生

3.1kb、1.3kb和0.8kb3个片段。实验结果表明, pX I 201质粒上有一个HindⅢ酶切位点和两个Sal I 酶切位点。由于 pAT153质粒上原有HindⅢ和Sal I 各一个切点, 所以仅有一个Sal I 酶切位点定位在克隆DNA上, 如图1和图版I-2所示。

(三) D-木糖异构酶基因的表达

1. D-木糖操纵子克隆: 将带有D-木糖操纵子的DNA片段插入到不同的载体质粒上, 如pMB9和pWR13, 分别得到重组质粒pX0100和pX0102。同时, 为了观察不同宿主细胞对基因表达的影响, 将这两个质粒通过转化分别将其转入HB101

和C600细胞中, 在甘油培养基中37℃振荡培养过夜, 离心收集菌体, 经超声波破碎细胞、离心、收集上清液, 测定酶活力, 结果见表1。实验结果显示: 在所有的条件下, D-木糖异构酶的产生与D-木糖的诱导是不可缺少的; 在相同的载体质粒情况下, 不同宿主细胞对其基因表达有明显的影响, pX0101和pX0102在HB101菌株中分别为C600产酶水平的3倍多; 无论宿主为HB101还是C600, D-木糖异构酶基因表达能力, 载体质粒pWR13比pMB9均高出1.4倍。这可能与载体质粒的拷贝数有关, pWR13比pMB9的拷贝数高得多。

表1 D-木糖操纵子基因克隆株的表达
Table 1 Expression of the clones of D-xylose operon

重组质粒 Recombinant plasmid	载体质粒 Vector plasmid	宿 主 Host	*D-木糖异构酶活性 Activity of D-xylose isomerase	
			加D-木糖 + D-xylose	不加D-木糖 - D-xylose
pX0101	pMB9	HB101	6.20	1.91
pX0102	pWR13	HB101	14.99	2.65
Blank1	0	HB101	0	—
pX0101	pMB9	C600	1.86	0.32
pX0102	pWR13	C600	4.47	0.78
Blank2	0	C600	0.95	—

* 在测试条件下, 每分钟每毫克蛋白所生成产物的毫微克分子数, 即为酶单位数
Units are expressed as n moles product formed per min per mg protein

2. 异构酶基因克隆: 将含有D-木糖异构酶基因的1.6kb BglⅡ 染色体DNA片段, 分别插入到pAT153和pHV33质粒上, 同时观察不同宿主细胞对其基因表达的影响, 结果如表2, 这里显示了与操纵子的表达结果相似: D-木糖异构酶的产生也必须有D-木糖的诱导; 其基因在宿主HB101细胞中比C600有较高的表达水平, 尤其是pX0102在HB101细胞中产酶量为C600的4.6倍; 载体质粒对基因表达影响同样是显著的, 当宿主为HB101和C600时,

pHV33产酶水平与pAT153比起来分别高1.6倍和4.1倍, 尽管pHV33比pAT153的拷贝数低得多。pHV33是由pBR322和pC194 (带有氯霉素抗性基因) 构建而成^[12], 是否由于氯霉素基因或者是由于pC194质粒上某个DNA区域或对D-木糖基因表达产生了有利的影响。因此它启示我们, 在研究基因表达时, 不仅要注意调控区DNA片段和质粒拷贝数的作用, 同时要对类似氯霉素基因片段对基因表达的影响也应适当地加以考虑。

表2 D-木糖异构酶克隆株的表达
Table 2 Expression of clones of the D-xylose isomerase gene

重组质粒 Recombinant plasmid	载体质粒 Vector plasmid	宿 主 Host	D-木糖异构酶活性 Activity of D-xylose isomerase	
			加D-木糖 + D-xylose	不加D-木糖 - D-xylose
pX I 201	pAT153	HB101	11.70	0.17
pX I 202	pHV33	HB101	19.20	1.88
Blank ₁	0	HB101	0	—
pX I 201	pAT153	C600	2.55	0.35
pX I 202	pHV33	C600	10.47	1.31
Blank ₂	0	C600	0.95	—

参 考 文 献

- [1] Mleszka, R. et al.: *J. Biochem.*, 80:144—151, 1982.
- [2] Briggs, K. et al.: *The EMBO Journal*, 3:611—616, 1984.
- [3] Rosenfeld, S. A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 194:410—415, 1985.
- [4] 郭礼和等, 生物工程学报, 1:14—33, 1985.
- [5] 敖世洲等, 遗传学报, 10:85—90, 1983.
- [6] Bimboim, H. C. et al.: *Nucleic Acids Research*, 7:1513—1522, 1979.
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1982.
- [8] 张其玖等, 微生物学报 (待发表).
- [9] Ashwell, G. et al.: *Methods Enzymol.*, 3:73—105, 1957.
- [10] Lowry, O. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193:265—275, 1951.
- [11] Fraser, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 205:291—295, 1953.
- [12] Primorse, S. B. et al.: *Plasmid*, 6:193—201, 1981.

CLONING AND EXPRESSION OF D-XYLOSE ISOMERASE GENE IN *E. COLI*

Zhang Qijiu¹ Gong Shubao² Zhang Yuying¹

Zhang Lanfang¹, Cheng Ruijuan²

(Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing)¹

(Institute of Food and Fermentation, Ministry of Light Industry, People's Republic of China, Beijing)²

E. coli D-xylose operon was obtained by virtue of DNA recombination in vitro and selection by using complementation D-xylose isomerase deficient *E. coli* strain. D-xylose isomerase gene was isolated through subcloning. Then, the cloned DNA containing D-xylose operon and isomerase gene were further cloned into various high copy-number plasmids respectively, in order to increase activity of the enzyme in the host cells, (continued on plate I)