

bgIS基因的亚克隆及功能分析

陈永青 宋大新 黄兴奇* 江红 敖万远 郑伟军*

(复旦大学微生物学及微生物工程系, 上海)

带有枯草杆菌 β -1,3-1,4葡聚糖酶基因(bgIS)7.1kb的EcoRI片段,经亚克隆,将1.5kb的EcoRI-PstI酶切片插入pUC19的polylinker上,转化*E.coli* JM101后合成出 β -1,3-1,4葡聚糖酶,它能专一性地降解大麦 β -1,3-1,4葡聚糖和地衣多糖,酶的大部分(>50%)留在胞内,其中25%分泌到胞外。根据酶特性分析,大肠杆菌中合成的 β -1,3-1,4葡聚糖酶完全与出发菌株枯草杆菌相同。

关键词 基因(bgIS); 亚克隆; β -1,3-1,4葡聚糖酶

β -1,3-1,4葡聚糖酶是啤酒酿造中一个重要的工业用酶,能专一性地分解大麦淀粉原胚乳细胞壁的主要成分 β -1,3-1,4葡聚糖,产生可供啤酒酵母利用的还原糖,并在提高麦芽利用,增加麦汁浸出量,加快糖化液和啤酒的过滤速度,避免啤酒混浊等方面均有重要作用。宋大新、陈永青等^[1]从*Bacillus subtilis* 1.88中分离到具有同一作用专一性酶的基因(bgIS),含有bgIS基因的pFG1表达出类似于大麦中的 β -1,3-1,4葡聚糖酶的活性。为了解bgIS基因表达水平和分泌等特性,我们对bgIS基因进行亚克隆并作功能分析。

材料和方法

(一) 菌株

E.coli JM101(Δ (Lac pro), thi, supE, F' tra D36, proA, B, LacI^q, lacZ Δ M 15)由复旦大学遗传所提供。

(二) 试剂和培养基

与宋大新、陈永青前文相同^[1]。

(三) 重组DNA技术与方法

参照T. Maniatis等方法^[2]。DNA片

段制备采用酶切后在电泳槽内将片段迁移到DEAE滤纸上回收。

(四) 酶活力测定和酶特性分析

酶活力测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[3]测定酶解还原糖,酶活力定义为:在40°C, pH7.0条件下,每分钟分解底物产生1 μ mol还原糖(以葡萄糖为参比)的酶量,为1个酶活单位。

(五) β -1,3-1,4葡聚糖酶在大肠杆菌中的定位

参照Cornelis等方法^[4]。

实验结果

(一) bgIS基因的克隆与亚克隆

以*Bacillus subtilis* 1.88为供体, pBR325为载体,采用鸟枪法克隆了 β -1,3-1,4葡聚糖酶基因bgIS,转化大肠杆菌得到表达。宿主所含的杂种质粒pBR325-bgIS(pFG1)插入的含bgIS基因的EcoRI酶切片段为7.1kb。以后又将pFG1中含bgIS的2.7kb EcoRI片段与pUC19实现体外重组,构建了pCSH102与

本文于1990年1月8日收到。

* 云南省农科院遗传工程研究室。

pCSH103杂种质粒，两者中片段插入方向相反，转化大肠杆菌*E. coli* JM101均表达出β-1,3-1,4葡聚糖酶活性。另外从pCSH14(由pBR325与2.7kb bglS基因片段组成)经EcoRI酶切和Pst I的部分酶切所得到的1.5kb的bglS片段与pUC19 组建

成pCSA201转化*E. coli* JM101,β-1,3-1,4葡聚糖酶依然得到表达。用BamHI、HincII、HindIII、BglII、KpnI和SalI酶切试验表明在1.5kb的bglS片段中均无位点，而PstI存在两个位点。bglS基因亚克隆和杂种质粒组建综合在图1。

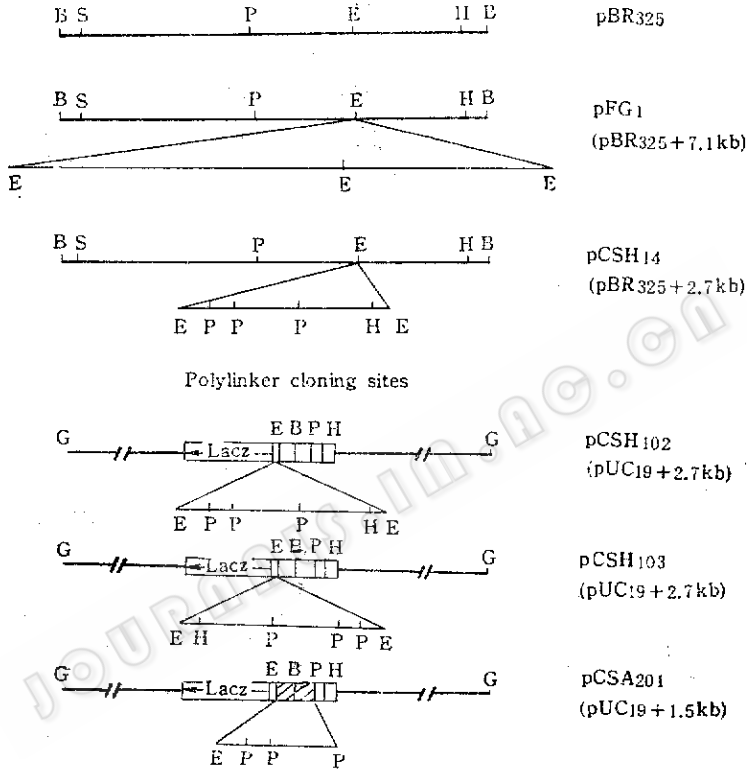


图 1 bglS基因克隆、亚克隆的示意图

Fig.1 Cloning and subcloning of the bglS gene

B: BamHI; S: SalI; P: PstI; E: EcoRI; H: HindIII; G: GsuI;

(二) bglS基因在 *E. coli* 中的表达

带有 bglS 基因的 7.1kb 片段插入 pBR325得到的pFG1转化 *E. coli* MC1061后，合成β-1,3-1,4葡聚糖酶水平较低，37℃，振荡培养 24 h，胞外酶活性仅 1.86×10^{-2} u/ml，而含 bglS 基因的片段缩小到2.7kb，并与pUC19 实现体外重组构建而成的 pCSH102、pCSH103 表达出的酶活均较*E. coli* MC1061(pFG1)高。当含 bglS 基因的片段再次缩短到约1.5kb左右时，*E. coli* JM101 (pCSA201) 的

β-1,3-1,4葡聚糖酶水平与*E. coli* JM101 (pCSH102)、*E. coli* JM101 (pCSH103) 相差不多，结果见表 1。

从表 1 可以看到 pCSH102 与 pCSH103由于 bglS 片段大小相同而插入方向相反，表达水平约差 3 倍，而 pCSA201 的表达水平介于两者之间，结果见图 2。

(三) bglS基因产物在 *E. coli* 中的定位

bglS基因产物β-1,3-1,4Glucanase在

表 1 带有 *bgIS* 基因的不同克隆片段在 *E. coli* 中的表达水平
Table 1 Levels of the enzyme activity in *E. coli* harbouring the *bgIS*

质粒 Plasmid	β -1,3-1,4 葡聚糖酶活性 Enzyme activity of β -1,3-1,4glucanase(u/ml)	宿主 Host	插入片段长度 Size of the inserted fragments(kb)
pBR325	0	MC1061	
pUC19	0	JM101	
pFG 1	1.86×10^{-2}	MC1061	7.1
pFG 1	1.97×10^{-2}	JM101	7.1
pCSH102	0.217	JM101	2.7
pCSH103	0.638	JM101	2.7
pCSA201	0.400	JM101	1.5

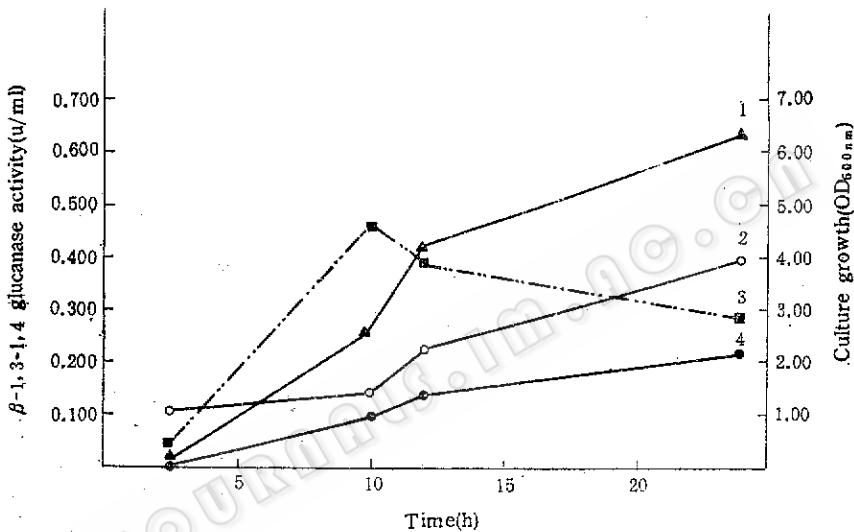


图 2 *E. coli* JM101 胞外 β -1,3-1,4 葡聚糖酶的活性曲线

Fig.2 The β -1,3-1,4 glucanase activity of *E. coli* JM101 (extracellular fraction)
1. JM101 (pCSH103); 2. JM101 (pCSA201); 3. JM101; 4. JM101(pCSH102)
— β -1,3-1,4 葡聚糖酶活性曲线 - - - - 菌体生长曲线

bgIS 基因的供体菌 *B. subtilis* 1.88 中是胞外酶, 但对于 *E. coli* 这一类革兰氏阴性菌来说, 分泌蛋白一般分布于细胞周质空间。为研究 β -1,3-1,4 葡聚糖酶在 *E. coli* 的确切分布, 我们按 Borriss (1981) 法制备了胞外、周质、胞内的酶液, 检测细胞各个部分的 β -1,3-1,4 葡聚糖酶活性。在测定 β -1,3-1,4 葡聚糖酶活性分布时还测定了周质酶 β -lactamase (β -内酰胺酶) 作为对照。结果表明, 在 *E. coli* JM101 中 β -1,3-1,4 葡聚糖酶大多位于胞内, 周质中含量少, 有相当一部分酶

(25%左右) 分泌到胞外。从表 2 可见 β -内酰胺酶大部分位于胞内, 这样就说明 β -葡聚糖酶 25% 分泌到胞外并不是由于细胞破裂的结果 (表 2 数据是各菌种在 37°C, 振荡培养 6 h 的结果)。

(四) *E. coli* JM101 (pCSH103) 与 *B. subtilis* 1.88 所产生的 β -1,3-1,4 葡聚糖酶性质比较

为证实大肠杆菌中表达的 β -1,3-1,4 葡聚糖酶就是 *bgIS* 基因的产物, 我们专门将 *E. coli* JM101 (pCSH103) 与出发菌株 *B. subtilis* 1.88 的纯化酶液进行酶作用

表 2 β -1,3-1,4葡聚糖酶在*E.coli*中的定位
Table 2 Localization of the β -1,3-1,4 glucanase in *E.coli*

质粒 Plasmid	合成的酶 Enzyme synthesized	占总酶量的百分数 (%)		
		胞外 Extracellular	周质空间 Periplasmic	胞内 Cellular
pCSH102	β -glucanase	23	5	72
	β -lactamase	7	34	59
pCSH103	β -glucanase	27	5	68
	β -lactamase	10	60	30

专一性试验和最适pH曲线比较(见表3和图3)。结果表明两者的 β -1,3-1,4 Glucanase是一致的,说明亚克隆菌株所携带的基因来自出发菌株,并且酶的基本特性相同。

表 3 β -1,3-1,4葡聚糖酶作用的专一性
Table 3 Substrate specificity of the β -1,3-1,4 glucanase enzyme

底物 Substrates	键型 Type of linkage	酶活性 β -1,3-1,4 glucanase activity (reducing sugars u/ml)	
		<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>
		1.88	JM101 (pCSH103)
大麦葡聚糖 Barley glucan	β -1,3-1,4	356	355
地衣多糖 Lichenin	β -1,3-1,4	111	149
纤维素 Cellulose	β -1,4	0	0
羧甲基纤维素 CM-cellulose	β -1,4	0	0
可溶性淀粉 Soluble starch	α -1,4-1,6	0	0
蔗糖 Sucrose	β -1,2	0	0
棉籽糖 Raffinose	α -1,6- β -1,2	0	0

从图3可见两者具有相似的pH曲线,最适pH为7.0,且在pH7.4处有一拐点,这种相似也为证明*B.subtilis*与pCSH103的 β -1,3-1,4葡聚糖酶是同一酶提供了证据。

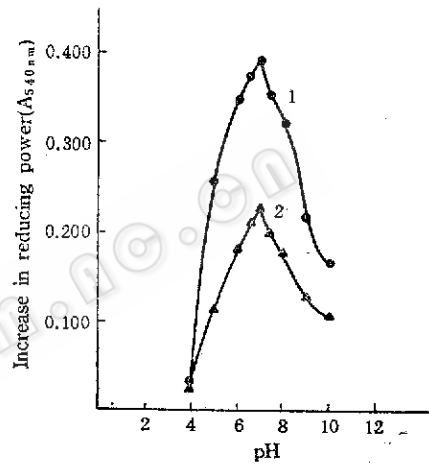


图 3 酶反应最适pH曲线
Fig.3 Optimum pH of the enzyme reaction
1. *B.subtilis* 1.88; 2. JM101(pCSH103)

讨 论

从最初分离到的带有**aglS**的7.1kb *EcoRI*片段,经过几次亚克隆后,具有能分解大麦 β -1,3-1,4葡聚糖酶活性的基因片段已缩小到1.5kb,带有**aglS**的pCSH103在大肠杆菌JM101中表达的 β -1,3-1,4葡聚糖酶与出发菌株*B.subtilis* 1.88合成的酶比较,酶作用专一性试验完全相同,它们均只能降解大麦的 β -1,3-1,4葡聚糖和地衣多糖,对纤维素、羧甲基纤维素、可溶性淀粉、蔗糖、棉籽糖均无作用。其他的酶学特性分析也证实,在大肠杆菌中**aglS**基因表达的产物

就是 β -1,3-1,4葡聚糖酶。

根据Rainer Borriss(1988)^[5]发表的 bglM 为1.0kb, 它的产物为热稳定的 β -1,3-1,4葡聚糖酶。与N.Murphy^[6]从1.6kb EcoRI-PvuI 片段测序分析定出的具有 β -1,3-1,4葡聚糖酶活性的约710bp的基因相比较, 我们1.5kb的bglS 片段可能还不是这个基因的最小长度, 我们将在进一步的序列分析中确定。

根据bglS基因产物在大肠杆菌中定位

结果表明, 合成的酶多数留在胞内, 但仍有25%的酶分泌到胞外。大肠杆菌作为革兰氏阴性菌, 由于存在外膜, 外源蛋白极难分泌出胞外^[7]。根据 Blobel 和 Dobberstein^[8] (1975) 的信号假说, 这种促使蛋白质分泌的信号序列往往可以在许多分泌性蛋白中找到, β -1,3-1,4 葡聚糖酶是否具有类似的结构特性, 以及它的分泌机制等有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 宋大新等; 复旦学报(自然科学版)28(4):386-392, 1989.
 [2] Maniatis, T. et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
 [3] 蔡武城等; 生物化学实验技术教程, 第一版, 复旦大学出版社, p.184, 1983.
 [4] Cornelis, P. et al.; Mol. Gen. Genet., 186:507-511, 1982.
 [5] Borriss, R. et al. J.; Basic Microbial., 28: 1-2, 3-10, 1988.
 [6] Murphy, N. et al.; Nuc. Aci. Res., 12:5355-5366, 1984.
 [7] 陈永青; 生物化学与生物物理进展, 16: 1, 36-41, 1989.
 [8] Blobel, G. and Dobberstein, B.; J. of Cell Biology, 67:835-851, 1975.

Subcloning and Functional Analysis of the bglS Gene

Chen Yongqing Song Daxin Huang Xingqi Jiang Hong
 Ao Wanyuan Zheng Weijun

(Department of Microbiology and Microbial Technology, Fudan University, Shanghai)

This article describes a 7.1kb EcoRI DNA fragment carrying a *Bacillus subtilis* β -1,3-1,4-glucanase gene (bglS). By subcloning, a 1.5kb EcoRI-PstI DNA fragment has been inserted into the polylinker cloning site of the plasmid pUC19 and transferred to *Escherichia coli* JM101. The fragment directs the synthesis in *E. coli* of a β -1,3-1,4-glucanase which specifically degrades barley glucan and lichenin. The largest proportion (50%) of the total enzyme activity is intracellular, 25% of the β -1,3-1,4-glucanase activity is present in the extracellular fractions. By comparison of the substrate specificity and optimal pH, the enzymes purified from *E. coli* and from *Bacillus subtilis* 1.88 are proved to be identical.

Key words

Gene (bglS); subcloning; β -1,3-1,4-glucanase