

# 几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA 的构建及表达\*

叶志华 梁建庆

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏选育重点实验室 广州 510070)

**摘要:** 从质粒 pLCHIA 中切出含粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 几丁质酶基因 (*chiA*) 的 1.8 kb *Hin*II 片段, 将其插入到表达载体 pKK223-3 强启动子 P<sub>tac</sub> 下游的 *Sma*I 位点内, 构建成几丁质酶表达质粒 pKChiA。再用内切酶 *Bam*HI 从 pKChiA 质粒中切出 2.1 kb P<sub>tac</sub>-*ChiA* 片段, 并将其重组到质粒 pMC71A 的单一 *Bam*HI 位点内, 构建成另一种几丁质酶表达质粒 pMChiA。这两种质粒可在大肠杆菌 HB101 和 JM105 中高效表达, 几丁质酶表达水平比质粒 pLCHIA 高 1~3 倍。

**关键词:** 几丁质酶基因, pKChiA 质粒, pMChiA 质粒

**中图分类号:** Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0035-05

## CONSTRUCTION OF THE PLASMID pKChiA AND pMchiA CARRYING CHITINASE GENE AND THEIR EXPRESSION IN *E. coli*

YE Zhi-Hua LIANG Jian-Qing

(Guangdong Provincial Laboratory of Microbial Culture Collection and Breeding,  
Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

**Abstract:** A 1.8 kb *Hin*II fragment carrying the chitinase gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* was isolated from the plasmid pLCHIA and was inserted into the *Sma*I site downstream of the strong P<sub>tac</sub> promoter in the expression vector pKK223-3, yielding the plasmid pKChiA. The 2.1 kb P<sub>tac</sub>*ChiA* fusion fragment was excised by *Bam*HI from the plasmid pKChiA and was inserted into the single *Bam*HI site present within the plasmid pMC71A, thus generating the plasmid pMChiA. High levels of chitinase were produced by the *E. coli* strains HB101 and JM105 carrying the plasmid pKChiA or the plasmid pMChiA, with the amount of production were higher 1~3 fold than that produced by the strains carrying the plasmid pLCHIA.

**Key words:** Chitinase gene, pKChiA, pMChiA

几丁质 (Chitin) 是一种广泛分布于自然界中的生物多聚物, 是多数真菌细胞壁和脊椎动物外壳的主要结构成份。几丁质酶 (Chitinase) 可将几丁质分解成 N-乙酰氨基葡萄糖, 它在植物的病虫害防治和几丁质的开发利用等方面有着广阔的应用前景<sup>[1,2]</sup>。

粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 是重要的几丁质酶产生菌。1986 年, Fuchs 等<sup>[3]</sup>首先构建了粘质沙雷氏菌的基因文库, 从中分离到编码 57 kD 几丁质酶的 9.5 kb *Eco*RI 片段。同年, Jone 等<sup>[4]</sup>亦克隆到粘质沙雷氏菌的几丁质酶基因 *chiA* 和 *chiB*, 并测出了 *chiA* 基因的全部序列。1989 年, Shapira 等<sup>[5]</sup>以 pBR322 为载体克隆了粘质沙雷氏菌 *chiA* 基因, 构建成几丁质酶表达质粒 pLCHIA。由于该质粒几丁质酶表达水平不

\* 广东省自然科学基金资助项目 (No. 970688)

收稿日期: 2000-07-13, 修回日期: 2001-02-13

高,而且需要经过 42℃ 温度诱导才能表达,因而在实际应用上受到一定限制。我们将质粒 pLCHIA 上的几丁质酶基因切出,把它重组到表达载体 pKK223-3 和 *nifA* 质粒 pMC71A 上,从而构建成新的几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA,这两种质粒可在大肠杆菌中组成性地高效表达。本文报道研究结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究中用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	基因型或表型	来源或参考
<b>大肠杆菌</b>		
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r<sub>g</sub> m<sub>g</sub><sup>-</sup>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 ml-1</i>	文献 [6], 本所菌种保藏室
JM105	<i>supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]</i>	文献 [6], 本所菌种保藏室
<b>质粒</b>		
pLCHIA	<i>Amp<sup>r</sup> chiA</i>	Dr. A. B. Oppenheim 赠送
pKK223-3	<i>Amp<sup>r</sup></i>	购自 Pharmacia
pMC71A	<i>Cm<sup>r</sup> nifA</i>	本所固氮组
pKChiA	<i>Amp<sup>r</sup> chiA</i>	本研究用
pMChiA	<i>Cm<sup>r</sup> nifA chiA</i>	本研究用

1.1.2 培养基: LB 培养基按文献 [6] 配制。几丁质培养基,在 LB 培养基中加入 0.5% 胶体几丁质即成。胶体几丁质按 Jeuniaux 方法<sup>[7]</sup>制备。在抗性选择时可加入氨苄青霉素 100μg/mL 或氯霉素 30μg/mL。

1.1.3 主要的酶试剂: 本研究中使用的分子克隆工具酶包括各种限制性内切酶, RNase, DNA 聚合酶 I Klenow 片段, T4 DNA 连接酶, 牛小肠碱性磷酸酯酶, 溶菌酶等, 分别购自华美生物工程公司、Roche、Promega 等公司。

1.1.4 几丁质  $(C_6H_{13}O_5N)_n = (203.9)_n$ , 生化试剂, 购自上海试剂二厂, 其余试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化、琼脂糖凝胶电泳分析以及感受态细胞的培养: 均按文献 [6] 进行。

1.2.2 ChiA<sup>+</sup> 转化子的筛选: 将转化的大肠杆菌细胞涂布在含相应抗菌素的几丁质固体培养基上, 在 37℃ 培养 3~7 d, 挑选水解几丁质产生透明圈的菌落。

1.2.3 几丁质酶活性测定: 按文献 [8] 方法进行。

1.2.4 几丁质酶蛋白的 SDS-PAGE 分析: 将 ChiA<sup>+</sup> 转化子接种到加有相应抗菌素的 LB 培养基中, 在 37℃ 振荡培养 16 h, 同时作对照菌株的培养。按文献 [6] 的方法, 制备细胞裂解物进行 SDS-PAGE 检测。

## 2 结果

### 2.1 几丁质酶表达质粒 pKChiA 的构建

粘质沙雷氏菌可产生5种几丁质酶，其中最主要的编码基因 *chiA* 位于 1.8 kb *Hin*fl 片段内<sup>[8]</sup>。我们用碱性裂解法<sup>[6]</sup>从大肠杆菌 A5745 (pLCHIA) 培养物中抽提质粒 pLCHIA DNA，用限制性内切酶 *Hin*fl 完全消化后进行琼脂糖凝胶电泳分离，然后用高速离心压榨法<sup>[9]</sup>回收凝胶中的 1.8 kb 片段。片段的 3' 凹端用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段补齐，然后与 *Sma*I 酶切的表达质粒 pKK223-3 连接。将连接产物分别转化大肠杆菌 JM105 和 HB101 的感受态细胞，然后涂布在含氨卡青霉素 (Amp) 的几丁质平板上，从中选择出 ChiA<sup>+</sup> 转化子。转化结果见表 2。从 ChiA<sup>+</sup> 转化子中抽提出的几丁质酶表达质粒命名为 pKChiA，见图 1 A。JM105 (pKChiA) 水解几丁质酶平板的情况见图 2 B。

### 2.2 几丁质酶表达质粒 pMChiA 的构建

从转化子 JM105 (pKChiA) 中抽提质粒 pKChiA DNA，用限制性内切酶 *Bam*HI 消化后进行琼脂糖凝胶电泳分离，通过高速离心压榨法回收凝胶中 2.1 kb *Ptac*ChiA 片段，然后将该片段与 *Bam*HI 酶切的 pMC71A 质粒连接。将连接产物分别转化大肠杆菌 JM105 和 HB101 的感受态细胞，然后涂布在含氯霉素 (Cm) 的几丁质平板上，从中选择出 ChiA<sup>+</sup> 转化子。转化结果见表 2。从这 ChiA<sup>+</sup> 转化子中抽提出的几丁质酶表达质粒命名为 pMChiA，由于 *Ptac*ChiA 片段的插入方向不同，质粒 pMChiA 存在正反两种形式，见图 1 B，图 1 C。JM105 (pMChiA) 水解几丁质平板的情况见图 2 A。

表 2 转化结果

受体菌株	供体 DNA <sup>*</sup>	转化子数/1 $\mu$ g DNA		
		Amp <sup>r</sup>	Cm <sup>r</sup>	ChiA <sup>+</sup>
JM105	I	3 × 10 <sup>4</sup>	—	6
	II	—	3 × 10 <sup>3</sup>	4
HB101	I	5 × 10 <sup>4</sup>	—	3
	II	—	2 × 10 <sup>5</sup>	6

\* 供体 DNA I: *Sma*I 酶切的 pKK223-3 与两端补齐的 1.8 kb *Hin*fl 片段的连接产物，供体 DNA II: *Bam*HI 酶切的 pMC71A 与 2.1 kb *Ptac*ChiA 片段的连接产物

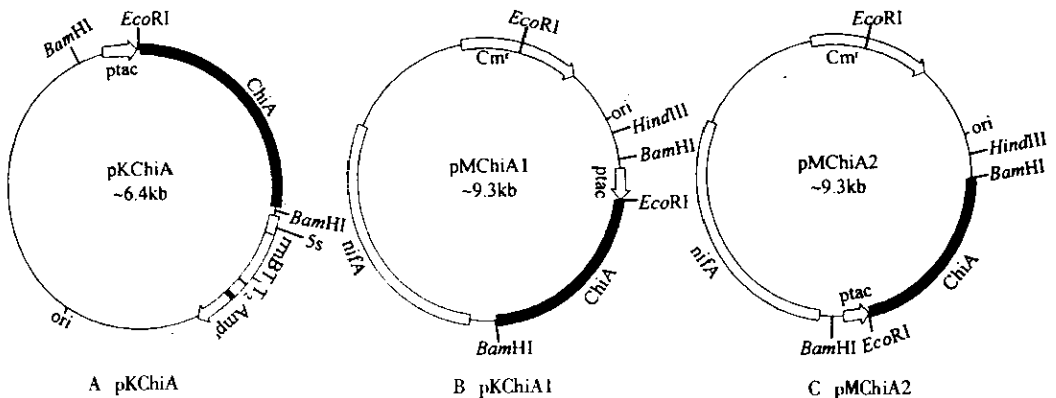


图 1 几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA 图谱

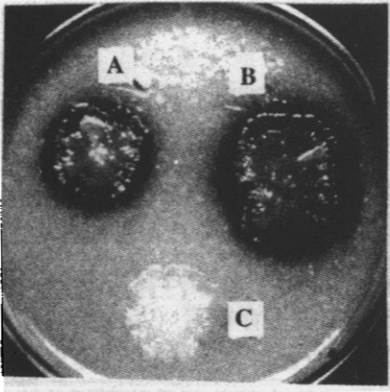


图2 ChiA<sup>+</sup>转化子在几丁质平板上形成的水解圈

A JM105(pKChiA), B JM105(pMChiA), C JM105 对照

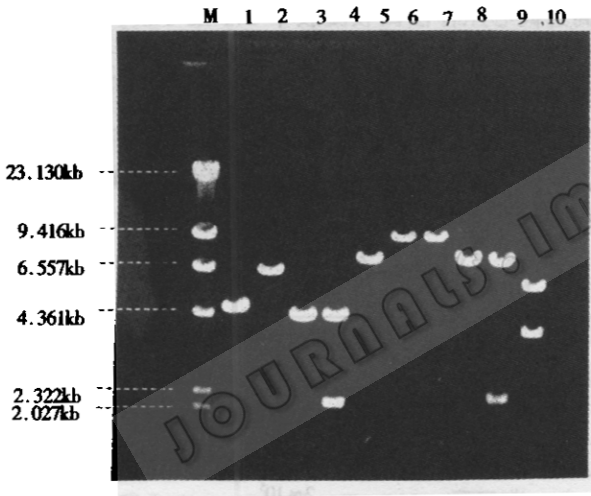


图3 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳检测

M 分子量标准( $\lambda$ /HindIII), 1 载体 pKK223-3 DNA, 用 EcoRI 切, 2 重组质粒 pKChiA DNA, 用 EcoRI 切, 3 载体 pKK223-3 DNA, 用 BamHI 切, 4 重组质粒 pKChiA DNA, 用 BamHI 切, 5 载体 pMC71A DNA, 用 HindIII 切, 6 重组质粒 pMChiA 1 DNA, 用 HindIII 切, 7 重组质粒 pMChiA 2 DNA, 用 HindIII 切, 8 载体 pMC71A DNA, 用 EcoRI 切, 9 重组质粒 pMChiA 1 DNA, 用 EcoRI 切, 10 重组质粒 pMChiA 2 DNA, 用 EcoRI 切

种到 LB 培养基中, 在非选择条件下连续转接培养 82 世代, 然后单菌分离检查其 ChiA<sup>+</sup> 标记, 结果表明丢失率为 23% ~ 30%。

### 3 讨论

近年来, 有关几丁质酶在生物防治中的作用机理及其应用的研究日益受到重视, 并随着分子生物学技术的迅速发展, 使这一研究上升到基因工程水平。构建表达水平高、寄主范围广、稳定性强的几丁质酶表达质粒, 就是其中的一项重要研究内容。

### 2.3 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳检测

用碱性裂解法<sup>[6]</sup>从 ChiA<sup>+</sup> 转化子中抽提出重组质粒, 用限制性内切酶消化后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 3 所示。

从电泳图谱可以看出, pKChiA 质粒大约有 6.4 kb 大小, 除含有载体 pKK223-3 DNA 片段 (4.586 kb) 外, 还插入了 1.8 kb 长的 chiA 片段, 与预期结果相符。

pMChiA 质粒大约有 9.3 kb 大小, 正如图 1 的 B, C 所示, 由于 2.1 kb P<sub>tac</sub>ChiA 片段的插入方向不同, pMChiA 质粒存在正反两种形式, 酶切电泳图谱证实了这一结果。

### 2.4 ChiA<sup>+</sup> 转化子的几丁质酶活性

按文献 [8] 方法分别测定各类型 ChiA<sup>+</sup> 转化子的几丁质酶活性, 并与 *E. coli* A5745 (pLCHIA) 作比较, 结果见表 3。

### 2.5 几丁质酶蛋白的 SDS-PAGE 分析

粘质沙雷氏菌可产生 5 种不同分子量的几丁质酶<sup>[3]</sup>, 其中 chiA 基因编码的几丁质酶为 58 kD<sup>[5]</sup>。从图 4 可见, ChiA<sup>+</sup> 转化子 JM105 (pKChiA)、JM105 (pMChiA<sub>1</sub>) 和 JM105 (pMChiA<sub>2</sub>) 都比对照菌多了一条分子量为 58 kD 的几丁质酶蛋白带, 这与文献 [5] 报道相符。

### 2.6 质粒 pKChiA 和 pMChiA 在受体菌中的稳定性

将带有质粒 pKChiA 或 pMChiA 的 JM105 和 HB101 菌株接

表3 几丁质酶活性测定结果

菌株	几丁质酶活性 (u/ml. 培养物)	
	未诱导	诱导*
HB101 (pKChiA)	92	105
JM105 (pKChiA)	36	126
HB101 (pMChiA 1)	89	93
HB101 (pMChiA 2)	81	95
JM105 (pMChiA 1)	26	102
JM105 (pMChiA 2)	34	97
A5745 (pLCHIA)	0	42

\* HB101 和 JM105 ChiA<sup>+</sup> 菌株用 5 mmol/L IPTG (异丙基硫代-β-D-半乳糖苷, isopropylthio-β-D-galactoside) 诱导, A5745 (pLCHIA) 菌株在 42℃ 诱导 30 min

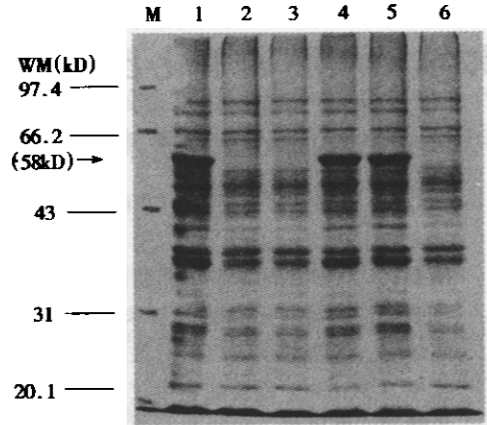


图4 几丁质酶蛋白的 SDS-PAGE 分析

M 分子量标准, 1 JM105(pKChiA) 的细胞裂解物, 2 JM105(pKK223-3) 的细胞裂解物, 3 JM105 的细胞裂解物, 4 JM105(pMChiA<sub>1</sub>) 的细胞裂解物, 5 JM105(pMChiA<sub>2</sub>) 的细胞裂解物, 6 JM105(pMC71A) 的细胞裂解物

P<sub>tac</sub> 是由 trp-lac 两个启动子融合而成的强启动子, 受 lac 阻遏物的调控。由于 P<sub>tac</sub> 启动能力很强, 因此即使在 JM105 这样的 lac I<sup>-</sup> 菌株中, 在未经诱导的情况下, 仍可使几丁质酶有一定的“渗漏”表达<sup>[10]</sup>。

本研究通过 DNA 重组构建成两种新的几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA, 它们的几丁质酶表达水平比原质粒 pLCHIA 提高了 1~3 倍, 而且可在大肠杆菌中组成性地表达。最近, 我们成功地将这两种质粒转化到水稻根际固氮菌阴沟肠杆菌 E26 (*Enterobacter cloacae* E26) 和产酸克雷伯氏菌 NG13 (*Klebsiella oxytoca* NG13) 中, 并得到高水平表达 (另文发表), 这为进一步研究和应用这些几丁质酶基因工程菌株打下了基础。

致谢 衷心感谢 Dr. A. B. Oppenheim 赠送 A5745 (pLCHIA) 菌株, 并感谢张霖琳和朱红惠帮助制图。

### 参考文献

- [1] 陈三凤, 李季伦. 微生物学通报, 1993, 20 (3): 156~160.
- [2] 冯波. 天津师范大学学报 (自然科学版), 1998, 18 (3): 50~56.
- [3] Fuchs R L, Mepherston S A, Drabos D J. Appl Environ Microbiol, 1986, 51 (3): 504~509.
- [4] Jones J D G, Grady K L, Suslow T V, et al. EMBO J, 1986, 5 (3): 467~473.
- [5] Shapira R, Ordentlich A, Chet I, et al. Phytopathology, 1989, 79 (11): 1246~1249.
- [6] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989.
- [7] Jeuniaux C. Methods Enzymol, 1966, 8: 644~650.
- [8] Koby S, Schickler H, Chet I, et al. Gene, 1994, 147: 81~83.
- [9] William W, Michael J W. Analytical Biochemistry, 1995, 229: 350~352.
- [10] Brosius J, Holy A. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 6929.