

脱胶关键酶基因的克隆及其在黑曲霉中的整合表达*

黄俊丽 王贵学

(重庆大学生物工程学院 重庆 400044)

摘要: 通过 PCR 的方法从苧麻脱胶菌株枯草芽孢杆菌 B10 中扩增出木聚糖酶基因。将该基因克隆在载体 pBluescript II KS⁺ 上, 并在该基因的前面连接 CaMV 35S 启动子, 随后将潮霉素抗性基因 (*Hyg^r*) 片段克隆在上述载体上, 成功构建了表达载体 pKS-35SXYHyg。将该表达载体线性化后转化果胶酶产生菌黑曲霉菌株 An1 的原生质体。对抗潮霉素黑曲霉转化子进行基因组 Southern 杂交分析结果表明, 木聚糖酶基因已整合到受体基因组中。与出发菌株 An1 相比, 黑曲霉转化子 AT1 的木聚糖酶活性提高 2 倍多, 经 AT1 处理后苧麻的残胶率下降 55.18%。

关键词: 脱胶关键酶, 基因克隆, 黑曲霉, 残胶率

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0062-06

Gene Cloning of the Crucial Degumming Enzyme and Its Integration and Expression in *Aspergillus niger**

HUNG Jun-Li WANG Gui-Xue

(College of Biological Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract: The xylanase gene of *Bacillus subtilis* B10 which had an excellent capacity for degumming ramie fibres was cloned by PCR amplification. The xylanase gene was cloned into vector pBluescript II KS⁺ and the CaMV 35S promoter was inserted in front of the gene, and the expression vector pKS-35SXYHyg was constructed successfully after the *Hyg^r* gene was inserted into the multi-cloning sites of pBluescript II KS⁺. The expression vector was linearized and transformed protoplasts of *Aspergillus niger* strain An1. Hygromycin-resistant transformants were generated and the integration of xylanase gene was confirmed by genomic Southern blotting analysis. Compared with An1, the xylanase activity of the transformant AT1 was increased more than trebled, and the residual gum content was decreased by 55.18% after the ramie was treated by culture supernatants from AT1.

Key words: Crucial degumming enzyme, Gene cloning, *Aspergillus niger*, Residual gum content

苧麻纤维是一种天然的纤维素纤维, 但在苧麻的韧皮中, 除了纤维素纤维外, 还有一些胶杂质, 其主要成分为果胶 (20% 左右)、半纤维素 (40% ~ 50%) 及木质素等^[1]。这些胶杂质大多包围在纤维素外表, 使纤维之间相互粘结成坚固的片条状物质。因此, 在纺纱之前必须除去胶杂质, 释放出呈分散状态的单纤维。当前国内外广泛采用的化学脱胶方法存在加工质量不稳定及环境污染严重等弊端, 所以苧麻的微生物脱胶日益受到研究者的关注。国内外在微生物脱胶方面进行了一系列的研究, 但因所筛选到的脱胶菌株脱胶关键酶活力不高或分泌的酶系不全, 苧麻经微生物脱胶处理后, 仍然达不到工业上对纤维残胶率的要求^[2,3]。因此, 本研究就构建具有脱胶关键酶活性

* 重庆市应用基础研究项目 (No. 7975)

通讯作者 Tel: 023-65120497, E-mail: huangjunli@263.net

收稿日期: 2004-09-02, 修回日期: 2004-09-28

的基因工程脱胶菌株进行了探索。本研究中的出发菌株枯草芽孢杆菌菌株 B10 和黑曲霉菌株 An1 是从腐烂苕麻周围土壤中分离的具有一定脱胶能力的菌株, 分别对 B10 产生的木聚糖酶和 An1 产生的果胶酶进行了分离纯化和性质研究 (待发表)。在此基础上, 从枯草芽孢杆菌菌株 B10 中克隆木聚糖酶基因, 利用基因工程技术将木聚糖酶基因转化果胶酶产生菌黑曲霉菌株 An1, 并对转化子的木聚糖酶活性和脱胶能力进行了测定, 为苕麻的纯生物的脱胶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 产木聚糖酶的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株 B10 及产果胶酶的黑曲霉菌株 An1 为本室从腐烂苕麻周围土壤中分离鉴定保存, 大肠杆菌 JM109 为本室保存。

质粒: 质粒 pBluescript II KS +、pCambia1301 (大小为 11.837kb, T-DNA 区有 2 个 CaMV 35S Promoter, 1 个 *GUS* 基因, 1 个 *Hyg^r* 基因和 1 个多克隆位点区) 及 pUCAT-PH (5.081kb, 将 *Hyg^r* 基因插入 pUC18 的多克隆位点上构建而成) 均为本室保存。

培养基: 黑曲霉原生质体再生培养基 FG 及黑曲霉产木聚糖酶培养基配方参见文献 [4] 和 [5]。

高保真的 DNA 聚合酶 Pfu 购自上海生工生物工程有限公司, DNA 胶回收试剂盒、T4DNA 连接酶和 DNA 标记试剂盒均购自 Takara 公司。木聚糖和果胶均购自 Sigma 公司。

苕麻 (湘苕一号) 由重庆江津锦丰麻业有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 根据文献 [6] 报道的枯草芽孢杆菌木聚糖酶基因序列设计引物, 以起始密码子 ATG 后面的 30 个碱基序列 (包括 ATG) 作为上游引物, 以终止密码子 TAA 前面的 30 个碱基 (包括 TAA) 反向互补后的序列作为下游引物。引物设计如下:

xynF: 5' > AC CTCGAG ATGTTTAAGTTTAAAAAGAATTTCTTAGTT <3';

xynR: 5' > GA AAGCTT TTACCACACTGTTACGTTAGAACTTCCACT <3'。

上游和下游引物两端分别引入限制性内切酶 *Xho*I 和 *Hind*III 酶切位点, 并加保护碱基。

1.2.2 木聚糖酶基因的克隆: 细菌基因组 DNA 的提取、PCR 扩增参照文献 [7]。PCR 扩增反应体系如下: 引物浓度为 200 nmol/L, dNTP 浓度 100 μ mol/L, 模板浓度为 10 ng/ μ L, Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L, 高保真的 DNA 聚合酶 Pfu 浓度为 1U/25 μ L 反应体系。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环。

1.2.3 表达载体的构建: 质粒的提取、酶切、连接、转化和鉴定均参照文献 [7] 进行。

1.2.4 原生质体的获得: 接种黑曲霉于 150 mL FG 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇培 18 h。离心收集菌丝体, 用 0.7 mol/L NaCl 洗涤, 每克菌丝中加入 1 mL 蜗牛酶溶液 (20 mg/mL, 0.7 mol/L NaCl 配置) 和 1 mL 崩溃酶溶液 (20 mg/mL, 0.7 mol/L NaCl 配置), 28 $^{\circ}$ C 震荡裂解 3 h。用 3 层灭菌的擦镜纸过滤, 离心收集原生质体。用 STC 冲洗并悬浮于其中。

1.2.5 转化和筛选: 将 2 μ g *Sma*I 线性化的质粒与 300 μ L STC (含 $0.5 \sim 1.0 \times 10^8$ 个原生质体) 在 50 mL 离心管中混合, 冰浴 20 min 后逐滴加入 2 mL PEG3350 溶液 [60%

(w/v), 10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 50 mmol/L CaCl_2], 再冰浴 20 min, STC 洗涤离心后悬浮于 3 mL 液体再生培养基中, 室温过夜后与固体再生培养基混匀后铺板, 待其凝固后, 上面铺一层 0.7% 的 Top agar (含 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Hygromycin)。培养 2~3 d 后, 挑取转化子。

1.2.6 木聚糖酶基因的检测: 采用基因组 Southern 杂交分析。用 CTAB/NaCl 法提取黑曲霉基因组 DNA, 方法参照文献 [8]。总 DNA 的酶切、电泳、转膜及随后的探针标记 (随机引物 [α - ^{32}P] dCTP 混合物法) 均参照文献 [7]。

1.2.7 木聚糖酶活性测定: 测定方法参见文献 [9]。木聚糖酶活力定义: 发酵液经过滤得清液, 即为酶液。取 0.1 mL 适当稀释的酶液, 加入到 0.1 mL 的 1% 木聚糖溶液 (0.2 mol/L, pH7.0 磷酸缓冲液配制), 50℃ 反应 15 min, DNS 法测定还原糖 (以木糖为标准)。在上述条件下, 每分钟产生的还原糖相当于 1 μmol 木糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)。

1.2.8 苕麻残胶率的测定: 参见国家标准 GB5889-86^[10]。将黑曲霉以 2% 的接种量接种于发酵培养基中, 于 30℃、200 r/min 的转速振荡培养 72 h, 过滤得粗酶液。将 3.0 g 经高压处理过的苕麻浸入粗酶液中, 于 35℃ 振荡培养箱中反应 8 h, 取出后清洗, 烘干, 测残胶率。经筛选的发酵培养基配方如下: NaNO_3 2.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 麸皮半纤维素 20.0 g, 硫酸铵 2.0 g, 尿素 0.5 g, 麸皮 10.0g, 葡萄糖 10.0g, 桔皮粉 10.0g, 水 1,000 mL。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶基因的克隆与测序

以枯草芽孢杆菌 B10 的基因组 DNA 为模板扩增到木聚糖酶基因, 命名为 XYn (图 1)。测序结果表明, XYn 大小为 642bp, 与已发表的枯草芽孢杆菌的木聚糖酶基因相比, 阅读框内序列只有两个碱基的差别, 其它完全一致。其中一个碱基的差异造成在 179 位的氨基酸是 Tyr 而不是文献报道的 Leu, 而另一个碱基的差异并没有使氨基酸发生改变。造成这些差别的原因可能是菌株之间的差异, 同时也说明木聚糖酶基因在同一种菌内有很强的保守性。

2.2 表达载体的构建

表达载体构建策略如下: 将扩增产物经 *Xho*I 和 *Hind*III 双酶切后, 与载体 pBluescriptII KS+ 相连, 重组质粒命名为 pKS-XY; 通过限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Xho*I, 将来自 pCambia1301 上的 CaMV 35S 启动子片段与 pKS-XY 相连, 形成重组质粒 pKS-35SXY; 然后利用 *Xba*I 酶切位点将来自质粒 pUCATPH 的潮霉素抗性基因 (简称 *Hyg*^r) 与 pKS-35SXY 相连, 形成重组表达载体 pKS-35SXYHyg (图 2), 酶切鉴定见图 3。从图 3 可以看出, pKS-XY 经 *Xho*I 和 *Hind*III 双酶切后, 产生一条与扩增产物大小相同的带, 说明扩增的木聚糖酶基因正确克隆在载体 pBluescript II KS+ 上; pKS-35SXY 经 *Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切的结果表明,

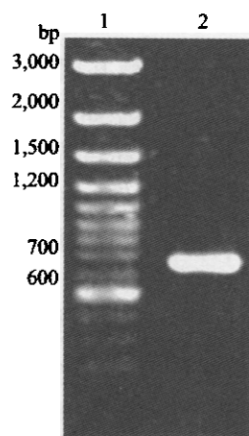


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
1 Marker (MBI), 2 PCR 产物

CaMV 35S 启动子片段克隆在 pKS-XY 上, 且插入在木聚糖酶基因的前方; pKS-35SXYHyg 经 *Xba*I 酶切结果表明, *Hyg*^r 基因与 pKS-35SXY 正确相连。最后通过限制性内切酶 *Sma*I 将 pKS-35SXYHyg 切成线形, 用于转化黑曲霉原生质体。

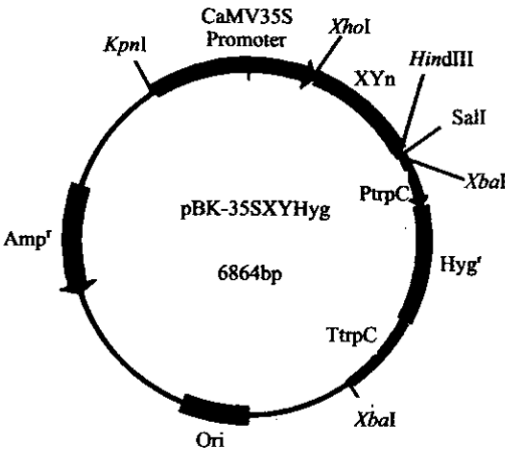


图 2 表达载体 pKS-35SXYHyg 的遗传组成

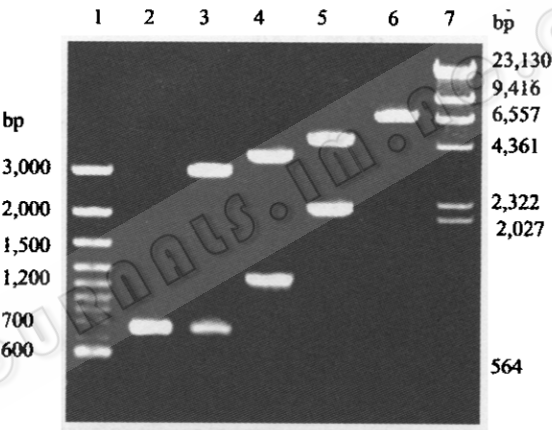


图 3 表达载体 pKS-35SXYHyg 的酶切鉴定

1 M (MBI), 2 PCR 产物, 3 pKS-XY/*Xho*I + *Hind*III, 4 pKS-35SXY/*Kpn*I + *Xho*I, 5 pKS-35SXYHyg/*Xba*I, 6 pKS-35SXYHyg/*Sma*I, 7 M (Takara)

2.3 转化子的鉴定

从随机挑取的 9 个转化子中选择 AT1 ~ AT6 做基因组 Southern 杂交分析。采用 *Sma*I 酶切基因组 DNA, 以克隆的木聚糖酶基因为探针, 结果如图 4。从图上可以看出, 除 AT4 中有 2 个拷贝基因插入以外, 其它 5 个转化子都是单拷贝基因插入。

2.4 转化子的木聚糖酶活力和脱胶效果测定

测定 9 个转化子 (AT1 ~ AT9) 的木聚糖酶活力, 并与原出发菌株 An1 的木聚糖酶活力进行比较 (表 1)。结果表明, 转化子之间酶活力差异不显著, 而与原出发菌株 An1 的酶活力相比, 差异极显著 ($P < 0.001$)。对转化子与原出发菌株的脱胶能力进行研究和比较, 可以看出, 9 个转化子的脱胶效果都明显优于原出发菌株, 其中以 AT1 的脱胶效果最佳, 苎麻经 AT1 处理后, 残胶率为 8.08%, 比 An1 脱胶后的残胶率降低 55.18%。

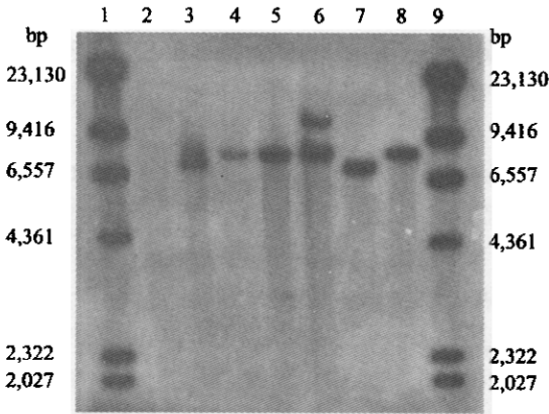


图 4 转化子的基因组 Southern 杂交

1, 9M (Takara), 2 AnI, 3~8 转化子 AT1~AT6

表 1 黑曲霉转化子与 AnI 的木聚糖酶活力、脱胶效果的比较

菌株	木聚糖酶活力 (U/mL)	苧麻残胶率 (%)
AT1	160.31 ± 1.77b	8.08 ± 0.33
AT2	158.72 ± 3.84b	8.34 ± 0.72
AT3	149.45 ± 6.79b	8.54 ± 0.16
AT4	152.71 ± 4.08b	8.14 ± 0.25
AT5	156.74 ± 7.54b	8.18 ± 0.24
AT6	143.85 ± 6.89b	8.28 ± 0.34
AT7	160.07 ± 2.43b	8.71 ± 0.96
AT8	150.65 ± 5.98b	8.85 ± 0.87
AT9	146.95 ± 9.87b	8.35 ± 0.67
AnI	48.88 ± 7.76a	18.03 ± 0.43

3 讨论

在微生物脱胶方面，国内外就筛选生物脱胶菌株进行了一系列的研究。为了解决天然脱胶菌株不能实现完全脱胶的问题，本研究在构建工程脱胶菌株方面进行了尝试。通过原生质体渗透法将脱胶关键酶木聚糖酶基因转化果胶酶产生菌黑曲霉，得到工程脱胶菌株。虽然经工程菌株脱胶后苧麻的残胶率仍然达不到工业上对苧麻纤维残胶率的要求（残胶率≤2.0%），但与原出发菌株相比，工程脱胶菌株的木聚糖酶活力和脱胶能力都有很大提高。通过构建工程菌株来提高脱胶能力的方法为苧麻的生物脱胶提供了一种新的思路。与 B10（木聚糖酶活力为 486U/mL）相比，工程脱胶菌株 AT1 的木聚糖酶活力（160.31U/mL）较低，导致其脱胶能力受到限制，推测可能是因为木聚糖酶基因的表达受到限制。在本研究中，在木聚糖酶基因的前面直接连接 CaMV35S 启动子，即基因的前面没有 5' 非翻译区，这可能是影响木聚糖酶基因表达的一个重要因素，将有待于在后续的研究中加以改进和证实。

构建表达载体 pKS-35SXYHyg 时，木聚糖酶基因的后面没有终止信号。因选用使载

体线性化的 *Sma*I 酶切位点紧位于木聚糖酶基因后面,在该位点切开后,不会造成后面基因的通读,所以不会影响木聚糖酶的活性。

Chin 和 Janet 曾报道,在 *Streptomyces lividans* 中,木聚糖酶基因的拷贝数对酶活力没有显著影响^[11],本研究也得到了类似的结果。在 6 个转化子中,木聚糖酶基因在 AT4 的基因组中有两个拷贝的插入,在其它 5 个转化子中均是单拷贝插入,但 6 个转化子之间木聚糖酶活力和脱胶能力差异不显著(表 1 和图 4),即插入基因的拷贝数对转化子的木聚糖酶活性和脱胶能力没有显著影响。

参 考 文 献

- [1] 韦雪英. 广西热带农业, 2001, **1**: 15 ~ 16.
- [2] 彭源德, 冯湘沅, 刘正初, 等. 中国麻作, 1995, **17** (2): 32 ~ 35.
- [3] Bruhlmann F, Leupin M, Erismann K H, *et al.* J Biotechnology, 2000, **76** (1): 43 ~ 50.
- [4] 朱宝成, 王俊刚, 成亚丽, 等. 微生物学通报, 1994, **21** (1): 15 ~ 18.
- [5] 陈红歌, 朱 静, 梁改芹, 等. 微生物学报, 1999, **39** (4): 350 ~ 354.
- [6] Paice M G, Bourbonnais R, Desrochers M. Arch. Microbiol, 1986, **144**: 201 ~ 206
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Graham G C, Mayers P, Henry R J. Biotechnique, 1994, **16** (1): 48 ~ 50.
- [9] Miller, G L. Analytical Chemistry, 1959, **31**: 426 ~ 428.
- [10] 国家标准局. GB5889-86, 1986, 40 ~ 43.
- [11] Chin C, Janet W. Appl Environ Microbiol, 1998, **64** (11): 4217 ~ 4225.