

# 生孢噬纤维粘菌 M229 内切葡聚糖酶基因的克隆与表达\*

刘纯强 高培基 王祖农

(山东大学微生物研究所, 山东济南, 250100)

**摘要** 生孢噬纤维粘菌 (*Sporocytophaga*) M229 可产内切葡聚糖酶 (CMCase), 外切葡聚糖酶 (Avicelase) 和  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (pNPGase)。以质粒 pUC8 为载体, 采用 CMC-刚果红法从 M229 中分离到了一个 CMCase 基因, 导入 *E. coli* JM83 中后, 其表达 CMCase 的活力为  $1.2 \times 10^{-2}$  mU/mgpr, 最适作用 pH 和温度分别为 6—7 和 40—50°C。限制性图谱及亚克隆分析暗示, 该 CMCase 结构基因内部含 PstI 位点。

**关键词** 生孢噬纤维粘菌; 内切葡聚糖酶基因; 克隆与表达

纤维素转化为葡萄糖需三类酶, 即内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶的协同作用。自 1981 年以来, 已陆续从 20 多种细菌和数种真菌中克隆到了纤维素酶系的基因<sup>[1]</sup>。瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 内切葡聚糖酶 EGII 基因在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中表达的研究已完成中试<sup>[2]</sup>。生孢噬纤维粘菌 (*Sporocytophaga*) 被认为是自然界中分解纤维素能力最强的细菌之一<sup>[3]</sup>。本文首次报道生孢噬纤维粘菌 M229 的一个内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的

克隆与表达。

## 材料与 方法

### (一) 菌株和质粒

生孢噬纤维粘菌 (*Sporocytophaga*) M229<sup>[4]</sup>, *E. coli* JM83<sup>[5]</sup>, pUC8<sup>[6]</sup> 和 pRK404<sup>[7]</sup> 均由本所提供。

### (二) 培养基和生长条件

用于 M229 生长的培养基 (EM) 每升含

\* 国家青年自然科学基金资助项目。

MgSO<sub>4</sub> 0.3g、NaCl 0.1g、CaCl<sub>2</sub> 0.1g、NaNO<sub>3</sub> 2.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g、FeCl<sub>3</sub> 0.1g、葡萄糖 4g 和 LB<sup>[5]</sup> 100ml; 以羧甲基纤维素 (CMC) (4g/L) 代替葡萄糖作为 M229 的产纤维素酶培养基。挑取 M229 单菌落至 EM 培养基中, 30℃, 150 r/min 培养 2—3 天。在油镜下观察菌体细胞形态为丰满的棱形, 培养液颜色变黄时, 按 1:10 的比例移接到新的 EM 中再培养 1—2 天, 离心收集菌体, 用于染色体 DNA 提取。JM83 用 LB, 37℃, 150r/min 培养。

### (三) DNA 提取

M229 染色体 DNA 提取参照 Marmur<sup>[9]</sup> 法, 略加改变。收集菌体后, 用生理盐水洗涤两次, 除去菌体胞外粘多糖, 提取 DNA 后用蛋白酶 K (最终浓度为 100 μg/ml) 处理 30 分钟, 再经酚、氯仿抽提和乙醇沉淀。

质粒 DNA 用碱法提取和 NaCl 超离心纯化<sup>[10]</sup>。

### (四) 酶切与连接

经 HindIII 部分酶切的 M229 染色体 DNA 片段和完全酶切的 pUC3 DNA 按 5:1 混合, 总 DNA 终浓度为 50—60 μg/ml, 16℃ 反应 12 小时后, 置 4℃ 再反应 24 小时。有关酶切和连接反应的条件均参照相应厂家提供的方法进行。

### (五) 转化

按 Mornison<sup>[11]</sup> 方法进行。

### (六) 纤维素酶阳性克隆的筛选

基本按 Teather 和 Wood<sup>[12]</sup> 法进行。将含重组质粒的 JM83 菌落点种至含氨苄青霉素 (50 μg/ml) 和 CMC (4g/L) 的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜, 洗去菌落, 然后用刚果红 (1g/L) 染色 30 分钟, 再用 1mol/L 的 NaCl 洗涤两次。产黄色透明圈的为阳性克隆。

### (七) 纤维素酶活测定

培养液经 8000g 离心 10 分钟后, 取上清液用于胞外酶活测定。菌体部分用生理盐水洗涤一次后, 溶于适量的 McIlvaine 缓冲液 (pH 7.2)<sup>[13]</sup> 中, 加入溶菌酶至终浓度为 2mg/ml, 37℃ 保温 1 小时, 置 -20℃ 过夜; 取出放入

37℃ 水浴, 15 分钟后, 放入冰浴中保存。由此得到的酶液用于胞内酶活测定。

内切葡聚糖酶 (CMCase) 和外切葡聚糖酶 (Avicelase) 活力测定分别以 CMC 和微晶纤维素 (Avicel) 为底物, 采用 DNS 法测其还原糖生成量<sup>[14]</sup>。β-葡萄糖苷酶 (pNPGase) 以对硝基苯酚-β-D-葡萄糖苷 (pNPG) 为底物, 测其葡萄糖生成量<sup>[15]</sup>。单位定义为每分钟催化底物生成 1 μmol 葡萄糖的酶量。

### (八) 蛋白质含量测定

采用改进的 Lowry 法<sup>[16]</sup> 测定可溶性蛋白和培养液总蛋白含量。

## 结 果

### (一) 生孢噬纤维粘菌 M229 的纤维素酶系

在含 CMC 的培养基中培养 2 天后, 测定

表 1 生孢噬纤维粘菌 M229 的纤维素酶系及其 CMCase 基因在大肠杆菌 JM83 中的表达

酶 类	酶活 (mU/mg 蛋白)	
	胞 内	胞 外
M229 CMCase	$5.9 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
M229 Avicelase	ND	$1.1 \times 10^{-3}$
M229 pNPGase	$2.3 \times 10^{-2}$	ND
JM83 (pED2) CMCase	$1.2 \times 10^{-2}$	ND
JM83 (pUC8) CMCase	ND	ND
JM83 CMCase	ND	ND

注: ND: 未检测到。

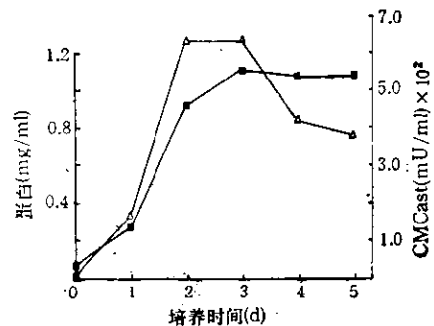


图 1 M229 菌体生长与 CMCase 的关系

■: 培养液总蛋白; △: 培养液总 CMCase

M229 所产各类纤维素酶的水平(表 1)。该菌纤维素酶系较完全,胞内可测得 pNPGase; 胞内、外均有 CMCase, 但以胞外为主; 所产生的 Avicelase 是一种胞外酶。以 CMCase 为指示酶, 测定了菌体生长与产纤维素酶关系(图 1), M229 产 CMCase 与菌体生长同步进行, 2—3 天时达到高峰。

**(二) 内切葡聚糖酶基因的克隆**

pUC8 DNA 片段与 M229 DNA 片段连接后, 转化 JM83, 共得到 2132 个含重组质粒的菌落, 在 CMC-刚果红平板上筛到了三个呈阳性反应的克隆。单菌落划线纯化三次后, 提取质粒, 再转化 JM83, 所有转化子均可在 CMC-刚果红平板上形成黄色透明圈, 表明这些质粒携带有 CMCase 基因。质粒提取与限制

性酶切分析表明, 这三个重组质粒含一相同的外源 DNA 片段, 因此, 只挑选其中一个质粒(定名为 pED2) 做进一步分析。

**(三) 限制性图谱与亚克隆**

通过 HindIII、EcoRI、BamHI 和 PstI 酶切和琼脂糖(1%)凝胶电泳分析, 建立了 pED2 的限制性图谱(图 2)。pED2 携带的外源片段大小与 pUC8 相同, 为 2.7kb, 无 BamI 切点。为进一步缩短外源 DNA 片段, 将 pED2 用 PstI 完全切割, 再自我环合, 得到 pED2-1; pED2 经 HindIII/PstI 完全酶切后, 插入用相同双酶切过的 pRK404, 得到 pED2-2(图 2)。含这两个质粒的 JM83 (pED2-1) 和 JM83 (pED2-2) 在 CMC-刚果红平板上均不能形成透明圈, 表明这两段经亚克隆后的 DNA 片段

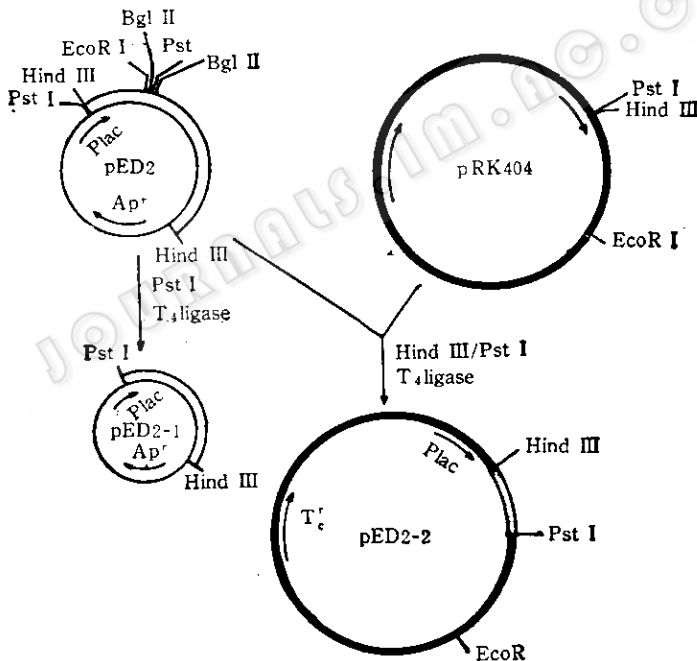


图 2 pED2 的限制性酶切图谱及亚克隆

□: M229 DNA 片段 —: pUC8 DNA 片段 —■: pRK404 DNA 片段

不含完整的内切葡聚糖酶基因。

**(四) M229 内切葡聚糖酶基因在 JM83 中的表达与酶学特性**

如表 1 所示, 在 JM83 和 JM83 (pUC8) 中均测不到 CMCase 活性; M229 内切葡聚糖酶基因在 JM83 (pED2) 表达的水平较低, 约

为其基因供体菌 M229 胞内 CMCase 活力的 1/5。

在 JM83 (pED2) 中, CMCase 的最适作用温度范围为 40—50℃, 最适 pH 范围为 6—7。

## 讨 论

生孢噬纤维粘菌 M229 可利用造纸厂废纤维素发酵生产粘多糖,具工业化应用价值<sup>[9]</sup>。除内切葡聚糖酶外, M229 还能合成外切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶,因此是一株比较理想的纤维素酶基因供体菌。1975年, Osmudsvag 等<sup>[17]</sup> 从一株生孢噬纤维粘菌中分离、纯化得到了两个 CMCase 组分,表明该菌可产多组分的 CMCase。王浩等(私人通信)曾从 M229 中分离得到一个 CMCase 组分,其分子量为 27,000,最适作用 pH 和温度分别为 pH5.5 和 50℃。我们首次从生孢噬纤维粘菌中克隆到 CMCase 基因,并在 *E. coli* 中得到表达。克隆的 M229 CMCase 基因在 *E. coli* JM83 中的表达水平仅为 M229 的 1/5,原因可能包括: 1. M229 CMCase 基因的启动子在 JM83 中不能被完全识别; 2. M229 中含多种 CMCase 基因,而在 JM83 (pED2) 中克隆的只是其中的一个。pED2 编码的 CMCase 与王浩等从 M229 分离到的 CMCase 组分,两者的最适 pH 和最适温度相近,但是否为同一 CMCase 组分还有待于进一步验证。pED2 携带的外源片段仅为 2.7kb, 在 PstI 处进行缺失亚克隆时未能得到具活性的 CMCase 基因,表明在克隆的 CMCase 结构基因区域内可能含有 PstI 位点。下一步工作是利用合适的载体将克隆的 CMCase 基因

导入其它可望用于工业化生产的菌株(如运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis*<sup>[18]</sup>), 为纤维素的利用和直接转化为更有价值的产品(如酒精)开辟新途径。

## 参 考 文 献

1. 刘纯强等: 生物工程进展, 11(3): 8—15, 1991.
2. Zurbruggen BD et al.: *J. Biotechnol.*, 17: 133—146, 1991.
3. Berg B et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 35: 215—219, 1972.
4. 江伯英等: 山东大学学报(自然), 22(1): 143—148, 1987.
5. Yanisch-Perron C et al.: *Gene*, 33: 103—119, 1985.
6. Vicira J et al.: *Gene*, 19: 259—268, 1982.
7. Ditta M et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 7347—7351, 1980.
8. Miller JH: Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory, 1982.
9. Marmur J: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
10. Maniatis T et al.: Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory, 1982.
11. Mornison DA: *J. Bacteriol.*, 132: 349—351, 1977.
12. Teather RM et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 777—780, 1982.
13. McIlvaine T: *J. Biol. Chem.*, 49: 183—186, 1921.
14. Chang WTH et al.: *Can. J. Microbiol.*, 23: 1285—1292, 1977.
15. 汪天虹等: 遗传, 13(3): 14—18, 1991.
16. Herbert D et al.: Chemical Analysis of Microbial Cells, Academic Press, 513: 209—344, 1971.
17. Osmudsvag K et al.: *Eur. J. Biochem.*, 57: 405—409, 1975.
18. Rogers PL et al.: *Adv. Biochem. Eng.*, 23: 37—84, 1982.

(1992-1-16 收稿)