

chiA 基因在稻根联合固氮菌 E26 和 NG13 中的表达*

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:将带有粘质沙雷氏菌几丁质酶基因(*chiA*)的 1.8kb *Hinf*I 片段分别克隆到表达载体 pKK223-3 和质粒 pMC71A 上,构建成几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA。将这 2 种质粒转化稻根联合固氮菌阴沟肠杆菌 E26(*Enterobacter cloacae* E26)和催婉克氏菌 NG13(*Klebsiella oxytoca* NG13),*chiA* 基因在这 2 菌株中获得高效表达。对表达产物的细胞定位测定表明,几丁质酶不仅存在于细胞周间质和胞内,而且还分泌到培养物上清液中。在对数生长后期,胞外、胞间质和胞内的几丁质酶活性分布分别为 23%~28%、45%~51%和 21%~32%。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表明,表达的几丁质酶蛋白分子量为 58kD。在受体细胞内,质粒 pMChiA 的稳定性要比质粒 pKChiA 高。

关键词: *chiA* 基因, 质粒 pKChiA, 质粒 pMChiA, 阴沟肠杆菌 E26, 催婉克氏菌 NG13

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 06-0686-07

在自然界中,许多细菌、放线菌和真菌能够产生几丁质酶,它们对几丁质的降解及循环利用起着重要的作用^[1]。在研究中人们发现,大多数几丁质酶产生菌对真菌具有拮抗作用,而且多数几丁质酶在离体情况下也能抑制真菌的生长,因而微生物几丁质酶在生物防治中的作用及其应用受到人们的重视^[2-4]。

粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)是重要的几丁质酶产生菌^[5]。Shapira 等^[6]将粘质沙雷氏菌的几丁质酶基因(*chiA*)克隆到质粒 pBR322 上,构建成几丁质酶表达质粒 pLCHIA。由于该质粒表达水平不高,而且需要经过 42℃ 温度诱导才能产生几丁质酶,因而在实际应用上受到一定的限制。我们将 pLCHIA 质粒上的几丁质酶基因切出,并将其重组到表达载体 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。

稻根联合固氮菌阴沟肠杆菌 E26(*Enterobacter cloacae* E26)和催婉克氏菌 NG13(*Klebsiella oxytoca* NG13)的耐氨固氮菌株是我所正在开发应用的基因工程菌株,它们对水稻、甘蔗、蔬菜和水果等作物具有促进生长和提高产量的作用^[7]。我们将构建成的几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA 转化到 E26 和 NG13 菌株中,并获得高效表达。本文报道这一研究结果。

* 广东省自然科学基金资助项目(970688)

作者简介:叶志华(1948-),男,广东梅县人,副研究员,1982 年中山大学微生物学专业研究生毕业,硕士。一直从事微生物分子遗传学、基因工程方面的研究工作,主要研究方向为微生物基因工程育种。

收稿日期:2000-11-23, **修回日期:**2001-02-06

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:本研究用的菌株和质粒见表 1。

表 1 研究用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype/phenotype	Sources/references
<i>Enterobacter cloacae</i> E26	Nif ⁺	[7]
<i>Klebsiella oxytoca</i> NG13	Nif ⁺	[7]
Plasmids		
pLCHIA	Amp ^r ChiA ⁺	[6]
pKK223-3	Amp ^r	Pharmacia
pMC71A	Cm ^r nifA	[7]
pKChiA	Amp ^r ChiA ⁺	This study
pMChiA	Cm ^r nifA ChiA ⁺	This study

1.1.2 主要试剂:本研究中使用的各种限制性内切酶, RNase, T₄ DNA 连接酶, DNA 聚合酶 I Klenow 片段, 溶菌酶等, 分别购自华美生物工程公司、德国柏林格尔曼海姆中国有限公司、美国 Promega、BRL 等公司。几丁质 (C₆H₁₃O₅N)_n = (203.9)_n 购自上海试剂二厂, 其余试剂均为国产。

1.1.3 培养基: a. LB 培养基, 按文献[8]配制。b. 几丁质培养基, 在 LB 培养基中加入胶体几丁质 0.3% ~ 0.5% 配成。胶体几丁质按文献[9]方法制备。在抗性培养基中, 分别加入氨苄青霉素 (Amp) 100 μg/mL 或氯霉素 (Cm) 30 μg/mL

1.2 方法

1.2.1 DNA 重组操作、感受细胞的培养、质粒转化及琼脂糖凝胶电泳检测: 均按文献[8]方法进行, 稍作改动。

1.2.2 ChiA⁺ 转化子的筛选: 将转化细胞涂布在加有相应抗菌素的几丁质固体培养基上, 在 30℃ 培养 3 ~ 7d 后, 挑选周围有几丁质水解圈的菌落。

1.2.3 胞外几丁质酶的分离: 将 ChiA⁺ 转化子接种在 LB 培养基中 (含 Amp 100 μg/mL 或 Cm 30 μg/mL), 在 30℃ ~ 32℃ 培养到对数生长期, 分别作诱导 (加入 IPTG, 即异丙基硫代-β-D-半乳糖苷, isopropylthio-β-D-galactoside 至 5mmol/L 浓度) 或不诱导处理, 继续培养 4h。在 4℃, 5 000r/min 离心 10min 分别收集菌体细胞和培养物上清。在培养物上清中加入 70% 饱和度的硫酸铵, 放置于 4℃ 沉淀 24h 后离心收集沉淀。将沉淀物溶于适量的 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 在 4℃ 用蒸馏水透析 36h。

1.2.4 胞周间质中几丁质酶的分离: 将上述收集的菌体细胞按文献[10]进行制备。

1.2.5 胞内几丁质酶的提取: 将胞周间质酶制备后的细胞沉淀物按文献[11]的方法进行分离。

1.2.6 几丁质酶的活性测定:按文献[12]方法进行。

1.2.7 几丁质酶蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析:按文献[8]所介绍的方法,对 ChiA^+ 转化子的细胞裂解物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.8 质粒稳定性检测:将 ChiA^+ 转化子接种到 LB 培养基中,在无选择压力的条件下繁殖 90 多世代,然后单菌分离检查质粒的 ChiA^+ 标记。

2 结果

2.1 几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA 的构建

粘质沙雷氏菌可以产生 5 种几丁质酶,其中最主要的编码基因 *chiA* 位于 1.8kb *Hin*Ⅰ片段内^[12]。我们从大肠杆菌 A5745 (pLCHIA) 培养物中,抽出质粒 pLCHIA,用内切酶 *Hin*Ⅰ将质粒完全消化后进行琼脂糖凝胶电泳分离,用高速离心压榨法^[14]从凝胶中回收 1.8kb *Hin*Ⅰ片段。片段的 3'凹端用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段补齐,然后将其插入到表达质粒 pKK223-3 强启动子 *P*_{tac} 下游的 *Sma*I 位点内,构建成几丁质酶表达质粒 pKChiA(图 1-A)。

然后再用内切酶 *Bam*HI 从 pKChiA 中切出 2.1kb *P*_{tac}*ChiA* 片段,并将其重组到质粒 pMC71A 的单一 *Bam*HI 位点内,从而构建成另一种几丁质酶表达质粒 pMChiA。由于 *P*_{tac}-*ChiA* 片段插入方向不同,pMChiA 质粒存在正反 2 种不同形式(图 1-B,C)。构建详情将另文发表。

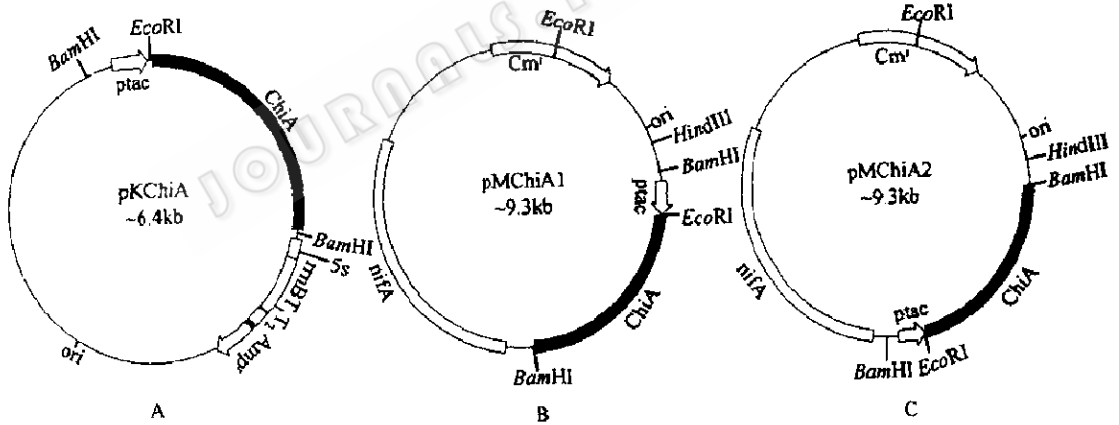


图 1 几丁质酶表达质粒 pKChiA 和 pMChiA 图谱

Fig. 1 Maps of the plasmids pKChiA and pMChiA

2.2 ChiA^+ 转化子的筛选

在 50mmol/L CaCl_2 溶液中,用构建成的质粒 pKChiA 和 pMChiA 分别转化阴沟肠杆菌 E26 和催婉克氏菌 NG13 的感受态细胞,然后涂布在含有相应抗菌素的几丁质培养基上培养,从中选择出有水解圈的 ChiA^+ 转化子。转化结果见表 2。用质粒 pMChiA 转化 E26 未能获得转化子,可能是 E26 不适宜质粒 pMChiA 表达所致。 ChiA^+ 转化子水解几丁质平板的情况见图 2。

表 2 转化结果

Table 2 Results of transformation

Hosts	Donor DNA	Numbers of transformant/ μg DNA	
		Amp ^r ChiA ⁺	Cm ^r ChiA ⁺
<i>Enterobacter cloacae</i> E26	pKChiA	3×10^5	-
	pMChiA ₁	-	0
	pMChiA ₂	-	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> NG13	pKChiA	5×10^5	-
	pMChiA ₁	-	4×10^5
	pMChiA ₂	-	3×10^5

2.3 ChiA⁺转化子中的质粒检测

用碱性裂解法^[8]从 ChiA⁺转化子中抽提出质粒 DNA,经内切酶切后进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3 所示。

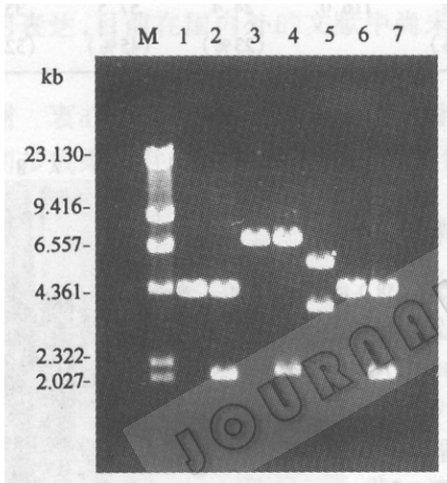
图 3 ChiA⁺转化子中的质粒检测

Fig. 3 Analysis of the plasmids of pKChiA and pMChiA in ChiA⁺ transformants

M: λ DNA/*Hind* III; 1. pKK223-3 DNA, digested by *Bam*HI; 2. pKChiA DNA isolated from transformant NG13(pKChiA), digested by *Bam*HI; 3. pMC71A DNA, digested by *Eco*RI; 4. pMChiA₁ DNA isolated from transformant NG13 (pMChiA₁), digested by *Eco*RI; 5. pMChiA₂ DNA isolated from transformant NG13 (pMChiA₂), digested by *Eco*RI; 6. pKK223-3 DNA, digested by *Bam*HI; 7. pKChiA DNA isolated from transformant E26 (pKChiA), digested by *Bam*HI.

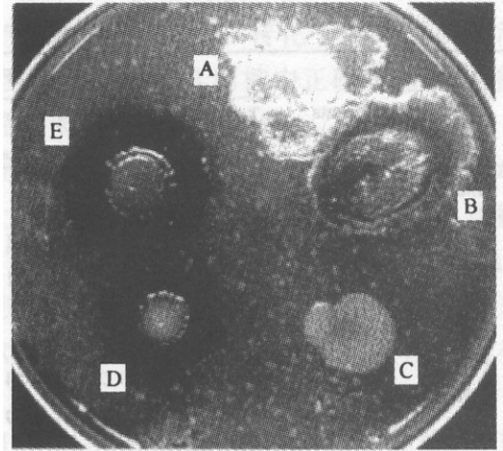


图 2 ChiA⁺转化子在几丁质平板上形成的水解圈

Fig. 2 Chitin clearance on chitin-containing plate by chitinase-producing clones
A. E26; B. E26(pKChiA); C. NG13;
D. NG13(pMChiA); E. NG13(pKChiA).

2.4 ChiA⁺转化子的几丁质酶活性测定及其定位

从表 3 可见,粘质沙雷氏菌的 *chiA* 基因在 E26 和 NG13 菌株中得到高效表达,其产物不仅存在于胞周间质和胞内,而且能分泌到胞外。在对数生长后期,几丁质酶活性在胞外、胞周间质和胞内的分布分别为 23% ~ 28%、45% ~ 51% 和 21% ~ 32%。IPIG 诱导对酶的生成没有明显的促进作用,说明 *chiA* 基因在强启动子 Ptac 的驱动下,可在 E26 和 NG13 细胞内组成性地表达。

2.5 几丁质酶蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

粘质沙雷氏菌可产生 5 种分子量分别为 21、36、48、52 和 58kD 的几丁质酶,其中 *chiA* 基因编码的几丁质酶为 58kD。从图 4 可见,ChiA⁺菌株 E26 (pKChiA)、NG13 (pKChiA) 和 NG13 (pMChiA) 都比对照菌株多了一条分子量为 58kD 的几丁质酶蛋白

表3 ChiA⁺转化子的几丁质酶活性测定及其定位Table 3 The cell location of chitinase in the ChiA⁺ transformants

ChiA ⁺ transformants	Induced with IPIG				Non-induced			
	Total* activity	Super- natant	Peripl- asm	Cytop- lasm	Total* activity	Super- natant	Peripl- asm	Cytop- lasm
<i>Enterobacter cloacae</i>								
E26(pKChiA)	120.2	33.6 (28%)	61.3 (51%)	25.3 (21%)	115.1	29.8(26%)	57.6 (50%)	27.7 (24%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>								
NG13(pKChiA)	112.2	29.2 (26%)	54.9 (49%)	28.1 (25%)	114.3	30.8 (27%)	57.2 (50%)	26.3 (23%)
NG13(pMChiA ₁)	115.1	31.1 (27%)	55.2 (48%)	28.8 (25%)	113.3	28.4 (25%)	55.5 (49%)	29.5 (26%)
NG13(pMChiA ₂)	108.1	26.9 (25%)	54.1 (50%)	27.1 (25%)	116.0	24.4 (23%)	57.5 (45%)	33.9 (32%)

* Activity = u/mL

带,这与文献[6]报道相符。

2.6 ChiA⁺转化子中的质粒稳定性

从表4可以看出质粒 pMChiA 的稳定性比质粒 pKChiA 的高。繁殖 92 世代后质粒 pKChiA 的丢失率达到 80%~90%,而质粒 pMChiA 的丢失率仅为 20%~30%。

表4 ChiA⁺转化子中的质粒稳定性检测Table 4 Analysis of the stability of the plasmids in the ChiA⁺ transformants

ChiA ⁺ transformants	Generations	Numbers of the ChiA ⁺ colony/ Numbers of the colony tested
E26(pKChiA)	48	40/69
	92	8/66
NG13(pKChiA)	48	42/67
	92	6/69
NG13(pMChiA ₁)	48	103/129
	92	89/121
NG13(pMChiA ₂)	48	115/130
	92	102/128

3 讨论

粘质沙雷氏菌 *chiA* 基因的可译框架由 1686bp

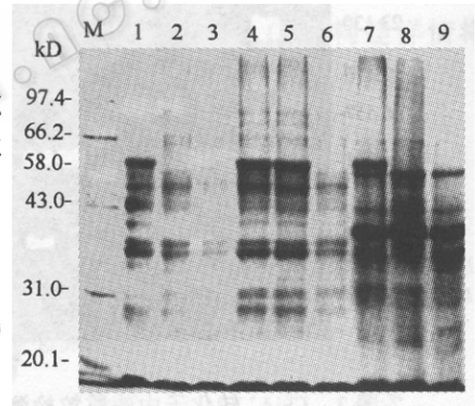


图4 几丁质酶蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the chitinase

M: molecular weight markers;

1. Cell lysates of NG13(pKChiA);
2. Cell lysates of NG13(pKK223-3);
3. Cell lysates of NG13;
4. Cell lysates of NG13(pMChiA₁);
5. Cell lysates of NG13(pMChiA₂);
6. Cell lysates of NG13(pMC71A);
7. Cell lysates of E26(pKChiA);
8. Cell lysates of E26(pK223-3);
8. Cell lysates of E26.

组成,可以编码 61kD 分子量的蛋白质,其中 N-末端的 3kD 多肽为信号肽^[15]。我们克隆的 1.8kb *Hin*Ⅱ 片段包含了 *chiA* 基因的整个可译框架顺序。从 *ChiA*⁺ 转化子的几丁质酶活性测定结果来看,粘质沙雷氏菌 *chiA* 基因不仅能在 E26 和 NG13 菌株中正确表达,而且能够通过信号肽的作用将表达的几丁质酶分泌到细胞周间质中和细胞外。

强启动子 *P*_{tac} 是由 *trp-lac* 两个启动子融合而成,受 *lac* 阻遏物的调控。*P*_{tac} 的启动能力很强,即使在 *lac* 阻遏物高水平表达的 *lacI*ⁿ 大肠杆菌菌株中(例如 JM105),其启动能力也不能完全被阻遏,仍可使下游基因有“渗漏”水平表达^[16]。在 E26 和 NG13 的 *ChiA*⁺ 转化子中,几丁质酶表达水平不受 IPTG 诱导的影响,这说明 *P*_{tac} 启动子在受体细胞内未受到 *lac* 阻遏物的有效阻遏。这种组成性表达对几丁质酶工程菌株的实际应用可能有利。

我们成功地将几丁质酶表达质粒 pK*ChiA* 和 pM*ChiA* 转化到 E26 和 NG13 菌中,并获得高效表达,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。

有关粘质沙雷氏菌 *chiA* 基因在稻根联合固氮菌阴沟肠杆菌 E26 和催婉克氏菌 NG13 中的表达,目前在国内外的文献中尚未见有报道。

致谢 衷心感谢 Dr. A. B. Oppenheim 赠送 pLCHIA 质粒,使我们的研究项目得以开展并取得初步成果。并感谢张霭琳和朱红惠帮助制图。

参 考 文 献

- [1] Goody G W. *Biodegradation*, 1990, 1: 117 ~ 190.
- [2] 陈三凤,李季伦. 微生物学通报, 1993, 20(2): 184 ~ 190.
- [3] 邱立友. 河南农业大学学报, 1995, 29(2): 184 ~ 190.
- [4] 冯 波. 天津师大学报(自然科学版), 1998, 18(3): 50 ~ 56.
- [5] Monreal J, Reese E, Con J. *Microbiol*, 1969, 15: 689 ~ 696.
- [6] Shapira R, Ordemitch A, Chet I, et al. *Phytopathology*, 1989, 79: 1246 ~ 1249.
- [7] 丘元盛,程锐彦,莫小珍,等. 水稻根际耐氮固氮菌株的田间试验. 见:尤崇杓主编. 水稻根际联合固氮. 北京:农业出版社, 1990. 397 ~ 402.
- [8] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular cloning; a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [9] 陈三凤,李季伦. 植物病理学报, 1992, 22(4): 223 ~ 227.
- [10] Koshland D, Botstein D. *Cell*, 1980, 20: 749 ~ 760.
- [11] Guchte M Van de, Kok J, Venema G. *Mol Gen Genet*, 1991, 227: 65 ~ 71.
- [12] Koby S, Schickler H, Chet I, et al. *Gene*, 1994, 147: 81 ~ 83.
- [13] Trudel J, Asselin A. *Anal Biochem*, 1989, 178: 362 ~ 366.
- [14] William W, Michael J W. *Anal Biochem*, 1995, 229: 350 ~ 352.
- [15] Jones J D G, Grady K L, Suslow T V, et al. *EMBO J*, 1986, 5: 467 ~ 473.
- [16] Brosius J, Holy A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 6929.

EXPRESSION OF THE *CHIA* GENE FROM *SERRATIA MARCESCENS* IN BOTH STRAIN E26 AND STRAIN NG13, NITROGEN-FIXING BACTERIA ASSOCIATED WITH RICE ROOT*

Ye Zhihua Liang Jianqing

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

Abstract: A 1.8kb *Hin*II fragment carrying the chitinase gene (*chiA*) from *Serratia marcescens* was cloned into the expression vector pKK223-3 and the plasmid pMC71A, yielded the plasmid pKChiA and the plasmid pMChiA respectively. Both plasmid pKChiA and plasmid pMChiA were used to transform to the *Enterobacter cloacae* strain E26 and the *Klebsiella oxytoca* strain NG13, two nitrogen-fixing bacteria associated with rice root. The *chiA* gene could be highly expressed in the ChiA⁺ transformants of the strain E26 or the strain NG13. Cell location determination of the expressed chitinase showed that the enzyme existed not only in cell periplasm and cytoplasm, but also in extracellular broth. When the cultures were in the after logarithmic growth phase, the distribution of the enzyme activity in extracellular broth, periplasm and cytoplasm were 23% ~ 28%, 45% ~ 51% and 21% ~ 32%, respectively. The molecular weight of chitinase expressed in the ChiA⁺ transformants was 58kD by SDS-PAGE analysis. The stability of the plasmid pMChiA in the transformants was better than that of the plasmid pKChiA.

Key words: *chiA* gene, Plasmid pKChiA, Plasmid pMChiA, *Enterobacter cloacae* E26, *Klebsiella oxytoca* NG13

* Project Granted by Guangdong Province Natural Science Fund (970688)