

# 枯草芽孢杆菌 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因 (bglS) 在酵母菌中的克隆与表达

黄兴奇\* 宋大新 郑伟军\* 杨帆 陈永青\*\*

(复旦大学微生物学及微生物工程系, 上海 200433)

将大肠杆菌质粒 pFG1 中含枯草芽孢杆菌  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因 (bglS) 的 2.7 kb EcoRI 片段克隆到大肠杆菌/酵母菌穿梭质粒上建成交杂质粒 YCSH, 转化 *S. cerevisiae* 并得到表达。两种不同方向的插入子 (YCSH 1 和 YCSH 5) 在酵母菌中表达出的  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶活性相差 2.3 倍。根据酶作用底物专一性测定和酶反应的最适 pH 分析表明: YCSH 中 bglS 基因产物与出发菌株 *B. subtilis* 1.88 的基本酶学特性完全相同, 但 YCSH 中 bglS 基因在酵母中的表达水平远比大肠杆菌中低。

关键词  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶; 大肠杆菌/酵母菌穿梭质粒; 克隆; 表达

$\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖是大麦胚乳细胞壁的主要成分, 约占大麦总糖的 10—14%。在啤酒发酵中, 高含量的  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖将增大糖化液和发酵液的粘度, 降低它们的过滤速度, 甚至导致啤酒混浊、沉淀而影响质量。尽管酵母菌能产生几种不同类型的  $\beta$ -葡聚糖酶, 但是, 没有一种能够降解  $\beta$ -1, 3-1, 4 混合键葡聚糖<sup>[1]</sup>。英国的 E. Hinceiff<sup>[2]</sup> 首次将  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶基因引入酵母菌, 并得到了表达。我们从 *B. subtilis* 1.88 中分离了含  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶基因 (bglS) 的 7.1kb EcoRI DNA 片段<sup>[3]</sup>, 经亚克隆将该基因定位于 2.7kb EcoRI 片段上<sup>[4]</sup>。本文报道该片段在酵母中克隆与表达的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 菌株

*E. coli* MC 1061: F<sup>-</sup>araD 139,  $\Delta$ (ara, leu) 7696,  $\Delta$ lacY 74, galU, galK, hsr<sup>-</sup>, hsm<sup>+</sup>, strA。 *E. coli* 质粒转化受体菌

*S. cerevisiae* Y-33: his<sup>-</sup>, ade<sup>-</sup>, ura<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>。酵母质粒转化受体菌(以上菌株由复旦大学遗传所提供)。

### (二) 质粒

pFG 1 (pBR 325 + 7.1 kb EcoRI 片段), 含 bglS 基因, 本课题构建。YFD 24 (Ap<sup>r</sup>, ura<sup>+</sup>, 含 2 $\mu$  序列), 为大肠杆菌/酵母菌穿梭质粒, 复旦大学遗传所提供。

### (三) 培养基

*E. coli* 培养基和 LB 培养基等, 同文献[3]。酵母培养基, 包括基本培养基和选择

本文于 1990 年 12 月 4 日收到。

\* 现在地址: 云南省农业科学院遗传工程研究室, 昆明。

\*\* 本文负责人

本研究得到上海市科委的资助, 特致谢忱。

性培养基,参见文献[2]。

酵母菌产  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶活性检测培养基为每升中含蛋白胨 20g, 酵母浸出物 10g, 大麦  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖 1g, 蒸馏水 1000ml, pH 6.0, 琼脂粉 15g。

#### (四) 试剂

DNA 重组技术所用试剂均购自上海华美生物工程公司。大麦  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖购自 Sigma 公司。

#### (五) 质粒 DNA 制备

参照 Birnboim<sup>[5]</sup> 的碱性抽提法。

#### (六) DNA 目的片段制备

pFG 1 质粒 DNA 经 EcoRI 完全酶切后,电泳中在 DEAE 纤维素滤纸上收集含有 bgIS 基因的 2.7kb 片段。

#### (七) 穿梭质粒的构建和酵母菌的转化

参照 Maniatis<sup>[6]</sup> 和 Hisaoito<sup>[7]</sup> 等方法。

#### (八) $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶活性检测

定性测定参见文献[3],酵母菌株产酶检测时,将欲测菌株点种于培养基平板上,30℃ 培养 3—4 天后,用 0.1% 刚果红染色鉴定。定量测定采用 3, 5-二硝基水杨酸法测定酶解大麦  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖所释放的还原糖。反应体系中底物浓度为 2mg/ml。酶活力单位定义为: 在 40℃ 和 pH 7.0 条件下,每分钟催化大麦  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖释放 1nmol 还原糖(以葡萄糖为参比)的酶量,为一个酶活力单位。

## 结 果

#### (一) 含 bgIS 基因的 YCSH 质粒的构建

从 pFG 1 质粒分离制备的 2.7kb EcoRI 片段,经同一限制性内切酶剪切的 YFD 24 质粒在体外连接,转化 *E. coli* MC 1061,在含 Ap 的 LB 平板上获得转化子,再将转化子点种在检测培养基上,能产生  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖水解释圈的即为含 bgIS 基因的杂种穿梭质粒(图版 1-A)。构建示意图见图 1。

从 1000 个转化子中,检出 10 个能产生透明水解圈的杂种穿梭质粒,分别命名为 YCSH 1—YCSH 10。YCSH 杂种质粒产生的水解圈不及供体菌大,但大于克隆子 pFG1。我们从中选出各一个即 YCSH 1 和 YCSH 5 进一步鉴定。

#### (二) 杂种穿梭质粒的分析

1. 质粒 YCSH 1 和 YCSH 5 酶切图谱分析: 将 YCSH 1 和 YCSH 5 分别用 EcoRI、BamHI、HindIII 和 PstI 完全酶切,从琼脂糖凝胶电泳图谱(参见图版 1-C)可知: 经 EcoRI 酶切的 YCSH 产生一条相当于 YFD 24 的线状分子区带和一条 2.7kb 带,后者与经 EcoRI 酶切的 pFG 1 所产生的第三条带一致,说明此片段来自 pFG 1。经 BamHI 酶切的 YCSH,仅产生一条 10.7kb 线状分子带,表明 2.7kb 片段上无 BamHI 切点,经 HindIII 酶切的 YCSH 1 和 YCSH 5 各产生两条分子量互不相同的带, YCSH 1 约为 9.4kb 和 1.3kb, YCSH 5 约为 7.4kb 和 3.3kb,这说明 2.7kb 片段上有一个 HindIII 位点,并且该片段在两质粒上插入方向相反。经 PstI 酶切的 YCSH 1 和 YCSH 5 均产

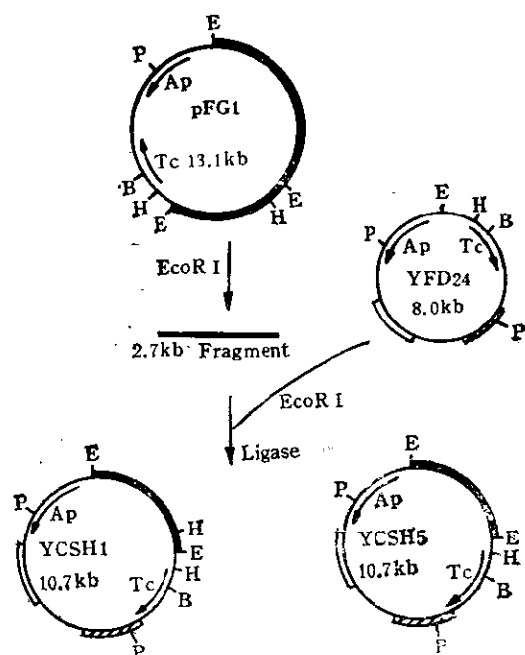


图1 大肠杆菌/酵母菌穿梭杂种质粒 YCSH 的构建

Fig. 1 Construction of an *E. coli*/*S. cerevisiae* shuttle hybrid plasmid YCSH

■ *B. subtilis* chromosomal DNA; ▨ Yeast 2μ  
 ▤ URA<sup>+</sup>3; — Vector DNA sequences  
 Restriction sites for the enzyme: E: EcoRI;  
 B: BamHI; H: HindIII; P: PstI

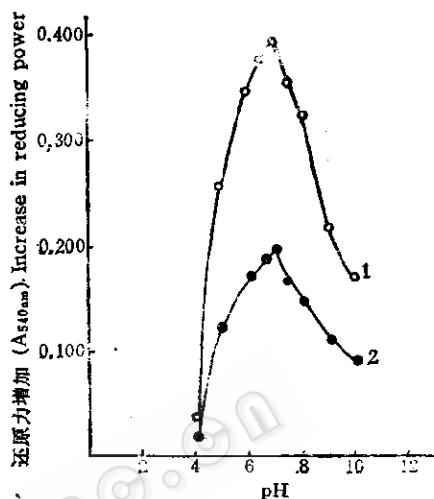


图2 β-1, 3-1, 4 葡聚糖酶反应的最适 pH 曲线

Fig. 2 The optimum pH curve of β-1, 3-1, 4-glucanase reaction

1. *B. subtilis*;  
 2. *E. coli* MC1061 (YCSH5)

生五条带,其中相同的三条约为 4.3kb、0.8kb 和 0.3kb,不同的二条 YCSH 1 为 3.5kb 和 1.3kb, YCSH 5 为 3.2kb 和 1.5kb,这也表明 2.7kb 亚克隆在两质粒上插入方向不同,并且 PstI 在该片段上的酶切位点数,与文献 [4] 中报道的,即从亚克隆质粒 pCSH 11 和 pCSH 14 中得到结果一致,均为 5 个 PstI 切点。

2. YCSH 的 *bglS* 基因在 *E. coli* 中的表达: 从酶活性定性检测表明: YCSH 1 和 YCSH 5 质粒产酶能力有差异 (图版 I-B)。将含有杂种质粒的 *E. coli* 分别接种于含 Ap (100 μg/ml) 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养 24 小时 (出发菌株 *B. subtilis* 1.88 作对照), 定量测定 β-1, 3-1, 4 葡聚糖酶活力, 结果见表 1。

表1 枯草芽孢杆菌 β-1, 3-1, 4 葡聚糖酶基因在 *E. coli* 中表达Table 1 Expression of *B. subtilis* *bglS* gene in *E. coli*

菌种 Strain	<i>B. subtilis</i> 1.88	<i>E. coli</i> MC1061 (pFG1)	<i>E. coli</i> MC1061 (YFD24)	<i>E. coli</i> MC1061 (YCSH5)	<i>E. coli</i> MC1061 (YCSH1)
酶活力 Enzyme activity (u/ml)	1510	18.6	0	38.9	80.6

由表知 *bglS* 基因在 *E. coli* 中的表达水平, 仅为出发菌株的 1.2—5.3%, 但该基因

在穿梭质粒 YCSH 上的表达比在 pFG 1 中提高了 2-4 倍。而 *E. coli* MC1061/YCSH1 产酶量是 MC 1061/YCSH 5 的 2.07 倍。上述结果说明, 基因来源、载体质粒性质、克隆片段大小和插入方向均影响表达水平。

3. *E. coli* MC 1061/YCSH 与出发菌株所产  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶性质比较: 为证实 YCSH 中表达的酶来自出发菌株 bglS 的产物, 我们在相同条件下测定了 *E. coli* MC 1061/YCSH 1 和 *B. subtilis* 1.88 酶制剂的酶底物反应专一性和最适 pH 曲线(表 2 和图 2)从结果看出, 两者具有完全相同的酶作用底物的专一性, 即只能专一性地分解以  $\beta$ -1, 3-1, 4 糖苷键交替相连的大麦  $\beta$ -葡聚糖和地衣多糖, 而不作用于其它键型的糖类。pH 试验也证实, 两其具有十分相似的 pH 曲线图型, 即最适 pH 均在 7.0, 而在 pH 7.4 处有一拐点。上述实验表明它们具有相同的酶学特性, 这为证明克隆菌株 *E. coli* MC 1061/YCSH 所带的基因来自出发菌株, 两者产生的是同一种酶提供了佐证。

表 2 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌转化子  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶专一性比较

Table 2 The specificity of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase in *B. subtilis* and *E. coli* transformants

底 物 Substrate	键 型 Bond type	还原糖含量 Reducing sugar (mg/ml, 24h)	
		<i>B. subtilis</i> 1.88	<i>E. coli</i> MC1061 (YCSH5)
大麦 $\beta$ -葡聚糖 $\beta$ -Glucan (barley)	$\beta$ -1, 3-1, 4	6.207	1.89
地衣多糖 Lichenan	$\beta$ -1, 3-1, 4	3.778	1.48
羧甲基纤维素 CM-Cellulose	$\beta$ -1, 4	0	0
纤维素 Cellulose	$\beta$ -1, 4	0	0
可溶性淀粉 Soluble starch	$\alpha$ -1, 4-1, 6	0	0
蔗糖 Sucrose	$\beta$ -1, 2	0	0
棉籽糖 Raffinose	$\alpha$ -1, 6-B-1, 4	0	0

### (三) 杂种穿梭质粒 YCSH 在酵母菌中的克隆与表达

1. 带枯草芽孢杆菌 bglS 基因的酵母菌种的构建与鉴定: 为将枯草芽孢杆菌  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶基因引入酵母菌, 我们构建了穿梭质粒 YCSH。该质粒带有 *ura*<sup>+</sup> 基因, 可通过 *ura*<sup>-</sup> 的受体酵母菌 Y33 筛选酵母转化子。从 *E. coli* MC 1061/YCSH 中分离 YCSH 1 和 YCSH 5 质粒, 采用 LiAc 完整细胞转化法, 从 *ura*<sup>-</sup> 选择性培养基上选出转化子。转化率约为  $10^2$ — $10^3$  个转化子/ $\mu$ g 质粒 DNA。通过点种在含有  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖的酶活性检测培养基上获得的有透明圈的转化子, 经改良的快速质粒抽提法, 从酵母菌转化子中直接抽提出杂种质粒 YCSH, 用 *Eco*RI 酶切后电泳, 可得到一条 YFD 24 线状带和一条 2.7kb 带。从酵母菌转化子直接抽提的 YCSH 重转化 *E. coli* MC 1061, 得到的重转化子均能抗氨基青霉素和四环素, 点种于含大麦  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖的平板

上,均能产生透明水解圈,证实酵母菌 Y33 确实携带含 *bglS* 基因的 YCSH 穿梭质粒。

2. 枯草芽孢杆菌  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶基因在酵母菌中的表达: 定性检测表明, 质粒 YCSH 1 和 YCSH 5 上的 *bglS* 基因在酵母菌中的表达水平是有差异的。将 Y33/YFD 24, Y33/YCSH 1 和 Y33/YCSH 5 分别接种于 *ura*<sup>-</sup> 选择性培养液中, 30℃ 振荡培养到对数生长期, 离心收集菌体, 冰浴中研磨破碎菌体, 离心得上清液测定酶活性。结果表明, Y33/YCSH 5 和 Y33/YCSH 1 的酶活性分别是 0.96 和 2.20u/ml, 表达水平与 Hinchliffe 报道的相当, 而 Y33/YCSH 1 的表达活力比 Y33/YCSH 5 约高 2.3 倍, 但在同一载体上, 枯草芽孢杆菌 *bglS* 基因在酵母菌中的表达水平远比在大肠杆菌中低。

## 讨 论

1. 关于克隆片段插入方向对 *bglS* 基因表达的影响, 文献报道并不一致。Cantwell, B. A. 等的实验指出, 枯草芽孢杆菌  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶的表达不受质粒 pJG 82 上 4kb *EcoRI* 片段插入方向的影响。但 Hinchliffe 的实验显示, 3.5 kb *EcoRI* 片段在质粒 pEHB 上插入方向不同, 产酶能力相差 1.6 倍, 我们的结果与后者相似。从实验结果看出, 克隆片段的插入方向并不决定 *bglS* 基因能否表达, 而仅影响该基因表达水平的高低。这说明克隆的 2.7kb 片段上, *bglS* 基因可能带有自己的转录启动子, 可以不依赖于载体启动子而独立表达, 但插入片段的大小、位点、载体和宿主细胞的特性均与表达有关。

2. 基因表达是一个十分复杂的多层次调控过程, 外源基因的引入更增加了表达的复杂性。它涉及到不同来源的种属差异, 涉及到外源基因与宿主细胞复制、转录、翻译、后加工等多层次调控系统的协调问题。我们克隆的枯草芽孢杆菌 *bglS* 基因在大肠杆菌和酵母菌中表达水平的降低也说明了这一点。Cantwell<sup>[9]</sup> 等曾通过变换基因的启动子, 使酵母菌中  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶的水平提高了 1000 倍左右, 这是提高外源基因表达的一条重要途径。

3. 要使携带 *bglS* 基因的新型酵母菌种达到工业应用的水平, 还必须解决产物的分泌问题, Hinchliffe 在 1984 年报道, 低水平的酶活性只出现在细胞提取液中, 而不存于发酵液。在我们的实验中, 不仅细胞提取液中, 而且在酵母菌落周围也出现透明的酶水解圈, 说明该基因在酵母菌中表达水平虽低, 但仍有部分的  $\beta$ -1, 3-1, 4 葡聚糖酶分泌到细胞外。

## 参 考 文 献

- [1] Ahmed, T.H. et al.: *Biochem. J.*, 109: 347-360, 1968.
- [2] Hinchliffe, E.: *Current Genetics*, 8: 471-475, 1984.
- [3] 宋大新等: 复旦学报(自然科学版), 28: 394-400, 1989.
- [4] 黄兴奇等: 西南农业科学报, 3: 173-175, 1990.
- [5] Birnboim, H.C.: *Methods in Enzymol.*, 100: 243-255, 1983.
- [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, p.104, 259, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
- [7] Hisamoto, et al.: *J. Bacteriology*, 153: 163-168, 1983.
- [8] Hinchliffe, E. et al.: *Journal of General Microbiology*, 130: 1285, 1984.
- [9] Cantwell, B. A. et al.: *Gene*, 23: 216, 1983.
- [10] Cantwell, B. A. et al.: *Current Genetics*, 11: 65-70, 1986.

## CLONING AND EXPRESSION OF A *BACILLUS SUBTILIS* $\beta$ -1,3-1,4-GLUCANASE GENE(bglS) IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Huang Xingqi\* Song Daxin Zheng Weijun\* Yang Fan Chen Yongqing\*\*

(Department of Microbiology and Microbial Technology, Fudan University, Shanghai 200433)

A 2.7kb EcoRI DNA fragment carrying a *Bacillus subtilis* endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene (bglS) from the *E. coli* plasmid pFG1. was cloned into an *E. coli*/*S. cerevisiae* shuttle vector to construct a hybrid plasmid YCSH. The hybrid plasmid was used to transform the *Saccharomyces cerevisiae* and expressed the  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase activity. The difference of the  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase activities between two recombinants (YCSH1 and YCSH5) with two different insert orientations was up to 2.3 fold. Analysis of substrate specificity and optimal pH of the enzyme showed that the  $\beta$ -glucanase enzyme coded by YCSH(bglS) was identical with that found in *Bacillus subtilis*, but the expression level of the bglS gene in *S. cerevisiae* (YCSH) was much lower than that in *E. coli* (YCSH).

### Key words

$\beta$ -1,3-1,4-glucanase; *E. coli*/*S. cerevisiae* shuttle vector; Cloning; Expression

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

#### A. 含杂种穿梭质粒 YCSH 转化子的筛选

The selection of transformants containing hybrid shuttle plasmid YCSH

#### B. *E. coli* MC1061 (YCSH1) 和 *E. coli* MC1061 (YCSH5) 中 $\beta$ -1,3-1,4 葡聚糖活性的检出

The detection of  $\beta$ -glucanase activity of *E. coli* MC 1061 (YCSH 1) and *E. coli* MC1061 (YCSH5)

#### C. 重组质粒 YCSH1 和 YCSH5 酶切分析结果

Result of restriction enzyme analysis of recombinant plasmid YCSH1 and YCSH5

1. pFG1 + EcoRI; 2. YFD24 + EcoRI; 3. YCSH1 + EcoRI; 4. YCSH1 + PstI; 5.  $\lambda$ DNA + HindIII; 6. YCSH1 + HindIII; 7. YCSH1 + BamHI; 8. YCSH5 + HindIII; 9. YCSH 1 + HindIII; 10. YCSH5 + PstI; 11. YCSH1 + PstI

\* Genetic Engineering Institution of Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming

\*\* Corresponding author