

黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)XA5-5 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达^{*}

邹文 刘纯强 高东 王祖农

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘要 以黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)XA5-5 为供体菌,广泛寄主质粒 pRK404 为载体,在大肠杆菌中克隆了一个 β -葡萄糖苷酶基因,重组质粒 pLZS1 外源片段为 1.1kb,将 pLZS1 接合导入黄单胞菌 XA5-5,得到了克隆子 XA5-5(pLZS1)。以水杨苷为底物,XA5-5(pLZS1)的酶活性大大高于 *E. coli* JM83(pLZS1),并且质粒在 XA5-5 中能相对稳定地存在。初步结果表明,所克隆的基因编码的产物对于水杨苷底物有较强的亲和力,并可以在一定程度上降低 XA5-5 中酶与 pNPG 底物的亲和力,使其酶活减小。

关键词 黄单胞菌 XA5-5, β -葡萄糖苷酶基因,基因克隆

纤维素完全降解需要三类酶,即内切- β -1,4-葡聚糖酶、外切- β -1,4-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶,三类酶协同作用,将纤维素性物质最终分解为葡萄糖等可利用的小分子,这是一个复杂的过程,其真正的酶解机制并不十分清楚。70 年代末开始的纤维素酶基因克隆的研究提供了一种新的途径和方法。目前已在 20 多种细菌和真菌中克隆了纤维素酶系的部分基因^[1]。本文选用我所筛选的纤维素分解菌株——黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)XA5-5 为出发菌株,构建了含有黄单胞菌 β -葡萄糖苷酶基因的重组质粒 pLZS1,通过转化和接合的方式将重组质粒导入大肠杆菌和黄单胞菌 XA5-5 中,并对其酶学性质、质粒稳定性及外源片段同源性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株和质粒

黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)XA5-5、*E. coli* K12 JM83、*E. coli* K12 JM83(pRK404)和 *E. coli* ED8654(pRK2013),由本室提供。

1.2 限制性内切酶及主要试剂

所用化学药品均为分析纯药品,限制性内切酶 PstI、碱性磷酸酯酶 CIP 分别购自百泰公司、华美生物工程公司,T4-DNA 连接酶、蛋白酶 K、RNA 酶均购自 Boehringer Mannheim 公司(西德),Southern 印迹杂交采用美国 BRL 公司(Bethesda Research Laboratories)的核酸检测试剂盒(Nucleic Acid Detection)及西德 Boehringer Mannheim

^{*} 本课题为“七五”攻关项目,国家青年科学基金项目。

本文于 1992 年 8 月 9 日收到。

公司的生物素-16-dUTP。

1.3 培养基及生长条件

所用固体培养基添加 1.6% (W/V) 琼脂粉。

LB 培养基。

麦康凯培养基:取 50g 麦康凯琼脂(MacCONKEY agar)加入于 1000ml 冷蒸馏水中,混合放置 10 分钟,隔石棉铁丝网微火煮沸使之完全溶解,高压灭菌 $0.70\text{kg}/\text{cm}^2$ 15 分钟备用。

七叶苷培养基:LB 固体培养基+0.1% 七叶苷+0.25% 柠檬酸高铁氮。

选择转化子和接合子时,培养基中加入相应的抗菌素(四环素 Tc: $15\mu\text{g}/\text{ml}$,链霉素 Sm: $50\mu\text{g}/\text{ml}$),培养液中细胞生长量的测定一般通过测量培养液在 600nm 处的光吸收值而推算。

1.4 DNA 制备及重组质粒的构建^[2-5]

采用改进的碱法提取质粒 pRK404,纯化后经 Pst I 完全酶切,再加入小牛胸腺碱性磷酸酯酶脱磷酸化。同时,提取黄单胞菌 XA5-5 的染色体 DNA,经 Pst I 部分酶切后,电泳收集 1—16kb 的片段,纯化后与酶切脱磷酸化的质粒 pRK404 连接,连接 DNA 转化到 *E. coli* JM83 中,涂布麦康凯+Tc 选择培养基。重组质粒由于丧失乳糖发酵能力而在麦康凯 Tc 培养基上菌落呈白色。

1.5 β -葡萄糖苷酶阳性克隆的筛选

在含有 Tc 的麦康凯培养基上挑选白色的重组子,经验证后点种在含有 Tc 的七叶苷培养基平板上,37℃ 培养过夜。菌落四周变黑者可以初步确认为 β -葡萄糖苷酶阳性克隆。

1.6 接合

在选择性培养液中分别培养供体菌(*E. coli* JM83(pLZS1)、受体菌 XA5-5 及携带有诱动质粒的菌株 ED8654(pRK2013),采用三亲滤膜结合的方法^[6],获得接合子,同时以受体菌+含诱动质粒菌株和供体菌+含诱动质粒菌株作为两组对照。

根据系列稀释平板上的菌落数计算接合率(接合子数/受体菌数 $\times 100\%$),根据接合率的数值可以评价接合系统的可行性。

1.7 重组质粒及外源片段的稳定性测试

将含有重组质粒的菌株纯化后,根据刘纯强的方法^[6],分别检测细胞分裂过程中质粒的稳定性和质粒中插入外源片段的稳定性。同时随机挑选 3—4 个单菌落,提取质粒电泳分析,与原始菌株质粒相比较,进一步验证质粒及外源片段的稳定性。

1.8 Southern 印迹杂交

Southern 吸印转移按 Smith 和 Summers 的方法^[7]进行。杂交、洗膜和 ABAP 染色法均参照 BRL 公司的说明书。

1.9 DNA 分子量的测定

采用 Southern 的改进方法^[8],以 λ DNA/Hind III 片段为 DNA 分子量标准。

1.10 酶液制备

细胞培养好以后,离心收集细胞,用 10 倍稀释的 McIlvaine 缓冲液^[9]洗两次,悬浮在上述缓冲液中,将此菌悬液置于 -196°C 液氮中冷冻 5 分钟,然后立即置于 37℃ 溶化 5 分

钟,再置于冰盐水中超声破碎 2 分钟,使细胞破裂,释放出酶分子。

1.11 β -葡萄糖苷酶活力测定

1.11.1 通过测定对-硝基苯- β -D-葡萄糖苷(pNPG)释放出的对硝基苯(pNP)来测定 β -葡萄糖苷酶的酶活力^[9]。用 E_{pNPG} 来表示。

1.11.2 通过测定还原糖的生成来测定 β -葡萄糖苷酶的活性。采用二硝基水杨酸(DNS)法测还原糖^[10]。酶活力用 E_{ml} 来表示。

1.12 蛋白含量的测定

按文献[11]进行。

2 结果

2.1 黄单胞菌 XA5-5 基因克隆及目的基因筛选

通过重组 DNA 的方法,在麦康凯+Tc 选择培养基上,得到约 800 个白色的转化子。将这些白色转化子点种到含七叶苷的平板上,筛选出了能够表达 β -葡萄糖苷酶活性的若干个克隆子(图 1)。

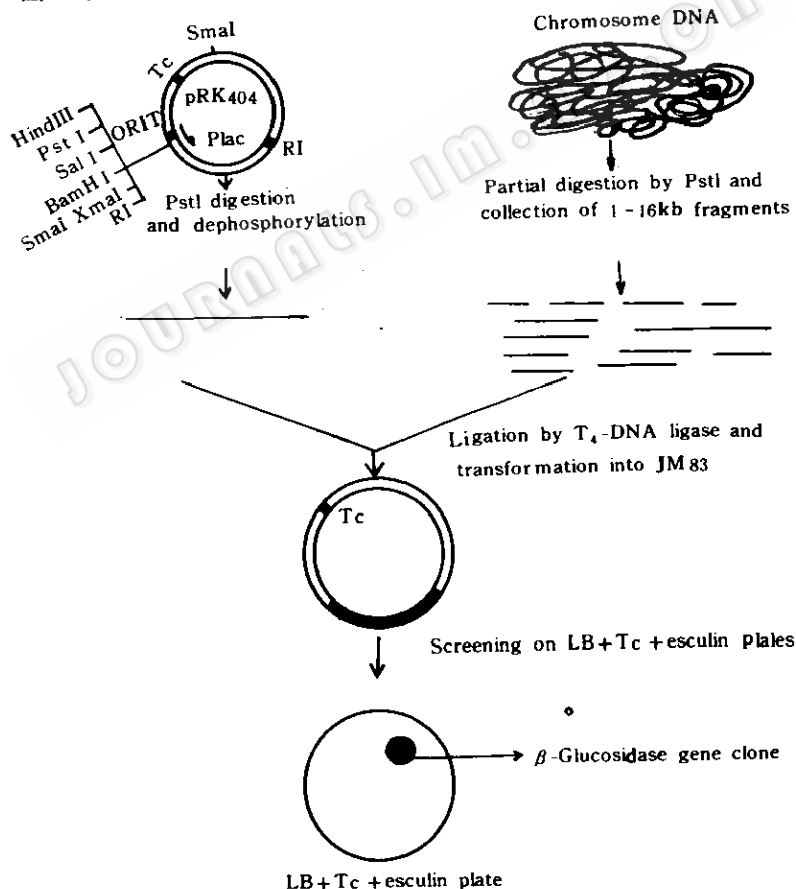


图 1 黄单胞菌 XA5-5 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与筛选

Fig. 1 Cloning and screening of β -glucosidase gene from *Xanthomonas campestris* XA5-5

本文选择了其中的一个阳性克隆(图 2 中的 R)作进一步的分析 and 研究。

为检验转化子的可靠性,在 800 个转化子中随机挑选 8 株菌,提取质粒进行电泳分析(图 3)。

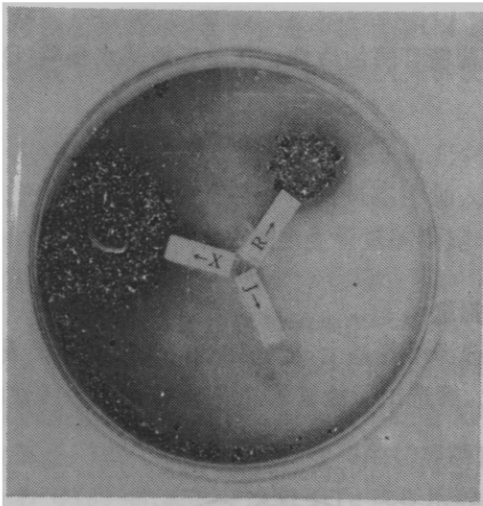


图 2 β -葡萄糖苷酶基因克隆株的选择

X: 黄单胞菌 XA5-5;

J: 大肠杆菌 JM83(pRK404);

R: 带有重组质粒的克隆株 JM83(pLZS1);

所用培养基为 LB+七叶苷+柠檬酸高铁氮选择培养基。

Fig. 2 Selection of β -glucosidase gene clone

X: XA5-5;

J: JM83(pRK404);

R: JM83(pLZS1);

All the strains were grown in LB media with esculin and ferric ammonium citrate added.

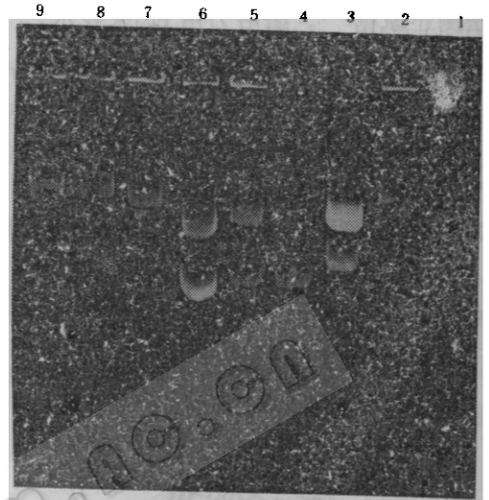


图 3 转化子可靠性检测

1, 5, 7, 9: 随机挑选的转化子; 6: pRK404。

Fig. 3 Reliability detection of transformants

1, 5, 7, 9: random selection of transformants;
6: pRK404.

结果表明, 8 株转化子中均有质粒存在, 而且质粒分子量均比 pRK404 大, 这说明转化子中均有重组质粒存在。

将所选 β -葡萄糖苷酶克隆株纯化后提取质粒, 将此质粒定名为 pLZS1。酶切 pLZS1 结果表明, pLZS1 中的外源片段为 1.1kb(图 4-B)。

2.2 Southern 印迹杂交

采用缺口平移法制备生物素标记探针 DNA(pLZS1), 进行分子杂交(图 4-A, B)。用 Pst I 酶切 pLZS1 质粒(c 带)和 pRK404 质粒(b 带)以及黄单胞菌 XA5-5 染色体 DNA(a 带), 凝胶电泳一段时间后, DNA 带被转移到硝酸纤维素薄膜上, 与用生物素标记的 pLZS1 探针进行杂交, 染色后在硝酸纤维素薄膜, 相应位置 c'、b'、a' 上都有杂交带出现, 染色体 DNA 酶切片段在与 pLZS1 外源片段相同的位置上也出现一条杂交带, 这说明了两者的同源性, 证明了重组质粒 pLZS1 上有表达 β -葡萄糖苷酶活性的片段, 它的确来源于黄单胞菌 XA5-5 的染色体 DNA。

2.3 接合以实现自体克隆

重组质粒 pLZS1 在诱动质粒 pRK2013 的协助下,通过接合的方式重新导入黄单胞菌 XA5-5,接合率一般在 5×10^{-5} 左右。随机挑选接合子,纯化后得到一个新的菌株,命名为 XA5-5(pLZS1),提取质粒进行电泳分析,表明接合子中有重组质粒 pLZS1。

2.4 大肠杆菌和黄单胞菌中重组质粒 pLZS1 稳定性

将 JM83(pLZS1)和 XA5-5(pLZS1)分别在 LB 液体培养基中培养,连续转接四次,每次的培养液经适当稀释后涂布 LB 平板,将长出的单个菌落点种在 LB+Tc 平板和 LB+Tc+七叶苷平板上,同时检测重组质粒的稳定性及插入外源片段的稳定性,结果见表 1。



图 4 分子杂交(A)和琼脂糖凝胶电泳图(B)
a,a': PstI 部分酶切的黄单胞菌 XA5-5 染色体 DNA;
b,b': PstI 完全酶切的 pRK404 质粒;
c,c': PstI 完全酶切的 pLZS1 质粒。
Fig. 4 Southern hybridization with biotin-labelled pLZS1 probe(A) and Agarose gel electrophoresis(B)
Lanes: a, a': Pst I partial digest of XA5-5 chromosome DNA;
b, b': Pst I digest of pRK404 plasmid;
c, c': Pst I digest of pLZS1 plasmid.

表 1 *E. coli* JM83(pLZS1)和 XA5-5(pLZS1)中质粒及外源片段的稳定性

Table 1. Stability of the plasmid and the inserted fragment in

E. coli JM83(pLZS1) and XA5-5(pLZS1) under the non-selective conditions

	I *	II	III	IV	V
<i>E. coli</i> JM83(pLZS1)中质粒的稳定性					
plasmid stability in <i>E. coli</i> JM83(pLZS1)	98.39	98.30	92.80	92.06	91.98
XA5-5(pLZS1)中质粒的稳定性					
Plasmid stability in XA5-5(pLZS1)	100	100	99.30	98.51	98.00
<i>E. coli</i> JM83(pLZS1)中外源片段的稳定性					
inserted fragment stability in <i>E. coli</i> JM83(pLZS1)	4.92	6.90	4.31	9.48	7.54

* 转接次数

质粒稳定性=(含 Tc 的平皿上菌落数/总点种数) $\times 100\%$

外源片段的稳定性=(平皿上变黑的菌落数/平皿上生长的总菌落数) $\times 100\%$

Plasmid stability=(colony number on Tc plates/total dibbling number) $\times 100\%$

Inserted fragment stability=(blackened colony number on plates/total colony number that grow on plates) $\times 100\%$.

从表中可以看出,随着宿主细胞的分裂,质粒稳定性呈下降趋势。相反,插入外源片段的稳定性并不随宿主细胞的分裂增殖而改变,但总的比率很低,这说明插入片段很不稳定,很容易丢失,插入片段的不稳定性严重影响了克隆株的酶活性,但用通常的添加抗生素的方法一般无法预测这种不稳定性。

比较 JM83(pLZS1)和 XA5-5(pLZS1)中重组质粒 pLZS1 稳定性可以看出,pLZS1 在黄单胞菌中比较稳定,随着宿主细胞的分裂增殖,质粒丢失相对比较缓慢。

在 LB+Tc+七叶苷选择平板上,带有外源片段的菌落四周变黑,而插入片段丢失的菌株虽然也能在 Tc 选择平板上生长,但由于不再表达 β -葡萄糖苷酶活性而菌落四周不变黑。随机挑选变黑和不变黑的菌落,提取质粒电泳分析,结果表明,插入片段丢失后,质粒 DNA 的分子量与 pRK404 分子量相同(图略)。

至于 XA5-5(pLZS1)中质粒外源片段的稳定性测试,由于 XA5-5 本身也产生 β -葡萄糖苷酶,因此无法用七叶苷 Tc 平板法检测。

2.5 重组质粒 pLZS1 β -葡萄糖苷酶活性的表达

在黄单胞菌中, β -葡萄糖苷酶是一种胞内酶,基本上不分泌到培养基中,当把它的结构基因克隆到大肠杆菌中时,仍然是一种胞内酶。因此我们采用液氮快速冻融法辅以超声波处理细胞,待细胞裂解后,分别以水杨苷和 pNPG 为底物,检测 JM83(pLZS1)和 XA5-5(pLZS1)中 pLZS1 所表达的 β -葡萄糖苷酶活性,结果见表 2(酶活力单位定义:每分钟每毫克蛋白产生 1 μ g 葡萄糖的酶量为 1 个酶活力单位)。

表 2 β -葡萄糖苷酶活性的表达
Table 2 Expression of β glucosidase activity

菌株 Strain	JM83	JM83(pRK404)	XA5-5	JM83(pLZS1)	XA5-5(pLZS1)
底物 Substrate					
Salicine	0.022	0.025	0.537	0.098	0.908
pNPG	0	0	1.507	0.017	1.398

从表 2 中可以看出, JM83(pLZS1)对这两种底物都有酶活性,但总的酶活都很低。而对于 XA5-5(pLZS1)来说,当以水杨苷为底物时,其酶活大大高于 JM83(pLZS1)和黄单胞菌自身,但当以 pNPG 为底物时, XA5-5(pLZS1)的酶活相对于 XA5-5 并没有提高。

3 讨论

据研究表明^[12], β -葡萄糖苷酶具有广泛的底物特异性,实际上是多种酶的总称,它包括能催化烷基 β -D-葡萄糖苷和芳基- β -D-葡萄糖苷以及只含有碳水化合物残基的糖苷(如纤维二糖)水解的一系列酶,酶解机制较为复杂。本文所克隆的 pLZS1 重组质粒上的 β -葡萄糖苷酶基因可能只是其中的一个基因。重组质粒在大肠杆菌中的表达水平较低,为了克

服菌株之间的遗传调节的差异性,采用接合的方法将重组质粒 pLZS1 导入黄单胞菌 XA5-5,得到自体克隆子 XA5-5(pLZS1)。据文献^[13]报道,来自不同菌体的 β -葡萄糖苷酶对于不同的底物,其酶活有很大的不同。从表 2 中可以看出, JM83 及 JM83(pRK404)具有很微弱的 E_{sal} 但检测不出 E_{pNPG} , 而黄单胞菌则共存 E_{pNPG} 及 E_{sal} 两种酶活性,其中 E_{pNPG} 大大高于 E_{sal} 。JM83(pLZS1)及 XA5-5(pLZS1)的 E_{sal} 较之 JM83 及 XA5-5 分别高出很多,但 E_{pNPG} 的活性却相差不大(XA5-5(pLZS1)还略有下降)。这个结果表明,重组质粒 pLZS1 所克隆的这一段 β -葡萄糖苷酶基因编码的酶对于水杨苷底物有较强的亲和力,并且可以在一定程度上抑制 XA5-5 中酶与 pNPG 底物的亲和力,使其酶活降低。当然,也不排除不同的受体菌代谢机制对于不同底物酶活性的影响,因此,最终的结论还需进一步的实验验证。

参 考 文 献

- [1] 刘纯强,等. 生物工程进展, 1991, 11(3): 8—15.
- [2] Rodriguez R L *et al.* Recombinant DNA techniques. An Introduction, Addison-Wesley Publishing Company, 1983. 45—46.
- [3] 刘伟民,等. 遗传, 1987, 9(1): 13—14.
- [4] Maniatis T *et al.* Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 164—165.
- [5] Morrison D A. *J Bacteriol*, 1977, 132: 349—351.
- [6] Liu C Q. Cloning and Expression of genes involved in cellulosic bioconversion, Ph. D. thesis. University of New South Wales. 1988. 57—58.
- [7] Smith G E *et al.* *Anal Biochem*, 1980, 109: 123.
- [8] Southern E M. *Anal Biochem*, 1979, 100: 319—323.
- [9] Liu C Q. Ph. D. thesis, University of New South Wales, 1988. 49.
- [10] Miller G L. *Anal Chem*, 1959, 31: 426—428.
- [11] Lowry D H *et al.* *J Biol Chem*, 1951, 193: 265—275.
- [12] Alexander J K. *Methods in Enzymology*, 1972, 28: 944—948.
- [13] Khan A W *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1985, 7: 465—467.

CLONING AND EXPRESSION OF β -GLUCOSIDASE GENE IN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* XA5-5

Zou Wen Liu Chunqiang Gao Dong Wang Zunong

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract A β -glucosidase gene from *Xanthomonas campestris* XA5-5 was cloned in *Escherichia coli* with the broad-host-range plasmid pRK404. The β -glucosidase encoding