

温室黄瓜根结线虫发生地土壤微生物宏基因组文库的构建及其一个杀线虫蛋白酶基因的筛选

赵志祥^{1,2}, 芦小飞², 陈国华², 杨宇红², 茆振川², 刘二明^{1*}, 谢丙炎^{2*}

(¹湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128)

(²中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】本研究旨在通过非培养手段构建和筛选宏基因组文库, 以求找到新型的杀线虫蛋白酶基因。【方法】采用密度梯度离心法提取和纯化温室土壤微生物总 DNA, 经平末端、连接、包装、转染后, 构建宏基因组 Fosmid 文库, 同时, 以脱脂奶为底物, 以根结线虫为靶标, 对文库进行功能初筛。【结果】该文库库容 31008 个克隆, 平均插入片段 36.5 kb, 包含 1.13 Gbp 的微生物基因组信息, 适合大规模的微生物功能基因筛选, 通过功能初筛, 筛选到 1 个含杀线虫蛋白酶基因的 Fosmid 克隆 (pro12)。进一步构建和筛选出亚克隆 (espro124a5), 通过对基因结构进行了初步分析发现: espro124a5 是一种分泌型胞外蛋白酶, 与来自于 *Maricaulis maris* MCS10 (accession no. YP_756822 at NCBI) 的丝氨酸蛋白酶 S15 仅有 45% 的同源性, 是一种新型的丝氨酸蛋白酶, 有其保守的催化三元组: Asp₄₆₉、His₅₄₁ 和 Ser₃₄₈。【结论】密度梯度离心法提取到的 DNA 纯度高、片段长, 完全能满足构建宏基因组 Fosmid 文库的要求; 同时, 构建的宏基因组 Fosmid 文库库容大, 有利于我们从中筛选其他的微生物基因资源。

关键词: 土壤微生物; 宏基因组 Fosmid 文库; 功能筛选; 杀线虫蛋白酶基因

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-08-1072

土壤环境中蕴藏着巨大的微生物基因资源。然而, 环境样品中, 超过 99% 的微生物不能用纯培养的方法获得^[1]。因而, 多数的微生物不能够被描述, 阻碍了对微生物群体结构和生态功能的研究, 以及微生物基因资源的挖掘和利用。

随着分子生物学的发展, PCR 技术的应用, 通过构建基因克隆文库和质粒文库, 一些有用的基因及所编码的代谢产物被筛选出来, 然而, 这些基因是基于已知序列信息的基础上的, 事实上, 大多数的微生物基因序列信息是未知的。因此, 可供挖掘利用的微生物功能基因极其有限, 为了克服这些局限, 一项新的技术, 宏基因组技术, 在 20 世纪 90 年代后期

开始发展起来^[2-4]。宏基因组是对整个环境样品的微生物群体的基因组分析。这一概念最初是由 Handelsman 提出^[5]。

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是植物根系专性内寄生物。在世界范围内, 每年导致 1000 亿美元的损失^[6]。近年来, 随着我国温室蔬菜种植面积的扩大, 蔬菜根结线虫病的发生逐年加重, 严重地产量损失达 30% - 50%, 成为温室蔬菜生产的一大障碍^[7]。

目前, 微生物蛋白酶被认为是线虫致病的毒力因子。研究表明微生物蛋白酶通过降解宿主外层保护屏障, 侵染宿主^[8-9]。然而, 之前的研究都是基于

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2009CB119000); 公益性行业 (农业) 科研专项经费 (3-25, nyhyzx07-050); 国家“十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-82109545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

作者简介: 赵志祥 (1981-), 男, 湖南岳阳人, 博士研究生, 研究方向为微生物资源与利用。E-mail: zhaozhixiang0207@126.com

收稿日期: 2010-01-29; **修回日期:** 2010-03-24

可培养的微生物,对不可纯培养的微生物研究较少。基于此,我们直接从温室线虫发生地黄瓜根围土壤取样,构建宏基因组 Fosmid 文库,通过对文库进行杀线虫蛋白酶基因筛选,筛选到 1 个杀线虫蛋白酶基因,并对基因结构进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:超低温离心机(Sigma, Type:3k15), PCR 仪(BIO-RAD, ALS-1296),凝胶成像仪(BIO-RAD, 76S/06413),普通水平电泳仪(BIO-RAD, PAC3000),显微成像仪(OLYMPUS, SZX12);文库构建用的 Fosmid 试剂盒:

CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit), Fosmid DNA 提取用试剂盒:FosmidMAX™ DNA Purification Kit,均购自美国 EPI 公司(Epicentre, USA);引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.1.2 实验材料:土样于 2008 年 3 月采集自海淀区中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验农场黄瓜种植地。种植黄瓜年限 10 年以上。采样地选择 10 个种植黄瓜的地块。土壤样品采用五点采样法,用土壤采样器采集 5 个黄瓜根围(采集∞ 10 cm)的土壤样品,采集深度为 0-15 cm,混合后用密封袋带回,土样用 10 mesh(2 mm)筛网过筛,去除小颗粒的石头和残存的植物根系,存放于 -20 °C 冰箱中。土壤性质见表 1。

表 1 温室土壤理化性质

Table 1 The soil sample tested in this study

Sample	pH	Organic C (g/kg)	Total N (g/kg)	Available N (mg/kg)	Total P (g/kg)	Available P (mg/kg)	Total K (g/kg)	Available K (mg/kg)
soil	7.2	27.5	2.0	25.7	2.4	82.6	25.2	273.7

1.1.3 引物:细菌、放线菌、古菌和真菌通用引物见表 2。

表 2 PCR 试验所用引物

Table 2 Primers used for PCR experiments

Primer	Target sequences	Primer sequences(5'→3')	References
F27 R1492	16S rDNA of Bacteria	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGCTACCTTGTACACTT	[16]
NS1 FR1	18S rDNA of Fungi	GTAATCATATGCTTGTCTC AICCATTCATCGGTAIT	[17]
21F 958R	16S rDNA of Archea	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA TCCGGCGTTGAMTCCAATT	[18]
S-C-Act-0235-a-S-20 S-C-Act-0878-a-A-19	16S rDNA of Actinobacteria	CGCGGCCTATCAGCTTGTTC CCGTACTCCCCAGGCGGGG	[19]

1.2 土壤 DNA 的提取

参考 Bertrand 等有所改进^[10]。含微生物细胞的沉淀用 10 mL 0.8% NaCl 重悬后,补上 10 mL 的 PVPP,涡旋混匀,10000 × g,4 °C 离心 10 min 后弃上清,重复 3-5 次,至上清呈淡褐色,沉淀用 10 mL 0.8% NaCl 重悬。将 10 mL Nycodenz(Axis-Shield, Oslo, Norway;8 g Nycodenz 溶于 10 mL 灭菌水)加入悬液底部,11000 × g,4 °C 离心 30 min。小心收集在 Nycodenz-土壤混合颗粒和上层水层分界面上的白色细胞层,重悬后在 10000 × g 4 °C 离心 20 min 去除 Nycodenz 溶液。紧接着用蛋白酶 K—溶菌酶—SDS 法提取土壤 DNA,用 100 μL TE 溶解,1% 琼脂糖电泳检测,-20 °C 保存。

1.3 宏基因组 Fosmid 文库构建

1.3.1 DNA 样品提取及纯化:Nycodenz 密度梯度离心法提取的粗 DNA 经低熔点琼脂糖电泳(4 °C, 25 V, 8 h),溶胶酶法回收主带,脉冲场电泳检测

DNA 分子量大小(0.1-40 s,6V/cm,16 h)。

1.3.2 构建文库:按照 Epicenter 公司 CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit 的使用说明对 DNA 片段进行末端补平,然后再进行一次低熔点琼脂糖脉冲电泳(0.1-40 s,6 V/cm, 16 h),切取 25-48 kb 之间的条带,溶胶酶法回收 DNA,连接,包装,转入 EPI300 宿主细胞中,涂到含 12.5 mg/L 氯霉素的 LB 平板上。

1.3.3 克隆的挑取与保存:用无菌牙签将平板上的单菌落挑至 96 孔板,每个菌落一个孔,每孔加入 150 μL 含 12.5 mg/L 氯霉素的 LB 液体培养基,用膜封口,37 °C 温箱中培养过夜。

1.3.4 Fosmid 基因组文库的质量鉴定:插入片段大小检测:随机挑取 13 个克隆,根据 Fosmid 文库构建试剂盒的说明书对其进行诱导培养,使其获得高拷贝质粒,按照 FosmidMAX™ DNA Purification Kit 使用说明提取质粒 DNA,然后用 Not I 酶切,脉冲电

泳检测插入片段大小。克隆稳定性检测:随机挑取5个克隆,分别接种于1 mL含氯霉素的LB液体培养基中継代培养6 d,分别提取第0代(第1天)和第100代(第6天)细菌培养物中的质粒DNA, *EcoR* I酶切后,电泳检测。文库中包含的微生物物种多样性检测:从文库中随机抽取138个克隆进行单末端测序,然后进行BLAST比对,检测比对结果的重复度。

1.4 蛋白酶基因筛选

1.4.1 超级池和二级池的构建:每个96孔板包含8行,12列。构建二级池时,将保存好的96孔板中8行转接到新的96孔板中的同一行,12列转接到另外一个新96孔板中同一列,并补上150 μ L含12.5 mg/L氯霉素的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C培养过夜。这样就形成了42个8合1板和27个12合1板。即二级池。将8合1板中同一行的克隆保存到一块新的96孔板中的同一个孔(方法同保存8合1或12合1),这样就形成了4块96合1克隆板,即超级池。

1.4.2 文库筛选:将Fosmid克隆接种于LB固体培养基(含1%脱脂奶,12.5 mg/L氯霉素)上,37 $^{\circ}$ C,培养48 h,通过观察菌落周围是否有透明圈来确定该克隆是否含蛋白酶基因。

1.5 亚克隆构建和筛选

提取Fosmid DNA,经*EcoR* I和*Sph* I双酶切后,胶回收1.5—5 kb大小的片段,连接到用相应的酶切后的pUC19载体上,转化(用*E. coli* DH5 α)后,涂板于LB固体培养基(含50 mg/L氨苄青霉素)上,37 $^{\circ}$ C,12 h后,挑取尽量多的亚克隆,37 $^{\circ}$ C,摇菌培养12 h,将亚克隆转接到LB固体培养基(含1%脱脂奶,50 mg/L氨苄青霉素)上,37 $^{\circ}$ C,16 h后,将周围产生透明圈的亚克隆挑出,37 $^{\circ}$ C,摇菌培养12 h,加上终浓度为15%的甘油,-20 $^{\circ}$ C冰箱保菌备用。

1.6 蛋白酶杀线虫室内生物测定

以根结线虫(*Meloidogyne* spp.)为靶标,按照Huang等^[11]的方法稍作修改,进行杀线虫生物测定试验。将保存好的亚克隆菌液从-20 $^{\circ}$ C冰箱中取出,待其融化后,取1 μ L,接种于装有50 mL液体LB培养基的100 mL三角瓶中,28 $^{\circ}$ C,240 r/min,培养4 d后,取出,4 $^{\circ}$ C,8000 \times g离心10 min,收集上清。上清液分成两部分,一部分直接处理线虫,一部分高温热处理(100 $^{\circ}$ C,25 min)后作用于线虫。

生物测定试验在12孔平底细胞培养板中进行,

每孔2 mL处理液,200—300头线虫,在显微成像仪下观察死亡的线虫数。试验5次处理(阳性对照阿维菌素(Abamectin),发酵上清液,热处理发酵上清液,阴性*E. coli*对照和LB培养基对照),每处理至少3次重复。

1.7 序列测定和序列分析

提取克隆espro124a5质粒,送北京诺赛诺赛基因组研究中心测序。序列分析在生物学软件DNAMAN和DNASTAR中进行。亚克隆中包含的基因数和核酸序列运用在线分析页面(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=help&subgroup=gfindb>)进行^[12]。在CBS SignalP 3.0 server界面(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^[13]中分析其信号肽劈开位点,通过BDGP Neural network promoter prediction界面(http://www.fruitXy.org/seq_tools/promoter.html)^[14]预测其是否含有独立的启动子,同时,进入网络数据库(<http://merops.sanger.ac.uk>)^[15],对蛋白酶进行分类和鉴定。

2 结果和分析

2.1 土壤微生物总DNA的提取

结合PVPP预处理和Nycodenz密度梯度离心法提取的微生物基因组DNA纯度高,跟、原位裂解法提土壤DNA相比较,能有效去除土壤腐殖酸,有机质等。并分别以细菌、放线菌、古菌和真菌通用引物(表2)进行PCR扩增,均扩增出各自的rDNA目的条带说明纯度上能够达到构建基因组文库的要求。

2.2 Fosmid文库构建及特征分析

2.2.1 纯化后DNA样品脉冲电泳检测:间接法提取纯化后的DNA在23—97 kb之间有明显分布,而Fosmid质粒对插入片段大小的要求一般为40 kb左右,所以所提DNA无需机械打断即符合建库要求。此外,相比于单一物种的基因组DNA,土壤微生物DNA主带并不明显集中于某一长度区域,而是分布在较大的范围内,这可能有两方面的原因:其一,不同物种的基因组DNA大小不一;其二,提取过程中机械损伤造成DNA断裂。

2.2.2 文库插入片段鉴定:用*Not* I进行酶切发现,所有克隆在6.5—9.4 kb之间有一条8.2 kb的载体条带,而插入片段呈大小不同的多个片段,这可能是土壤微生物DNA上的*Not* I酶切位点较多的原因。文库包含31008个克隆,根据所使用的

pCC2FOS 质粒插入片段大小为 40 kb 左右,估计该文库所覆盖的基因组大小超过 1 Gb。

2.2.3 克隆的稳定性检测:第 100 代酶切图谱与第 0 代的无任何明显差异,没有发现插入片段的丢失或重排,说明所构建的 Fosmid 文库是稳定的。

2.2.4 文库末端测序鉴定:138 个随机末端测序结果中,有 6 个分别对上黄单胞菌、新月柄杆菌、汉堡硝化杆菌、*Parvibaculum lavamentivorans*、茄科雷尔氏菌和苜蓿中华根瘤菌,4 个比对上荧光假单胞杆

菌。共 10 个比对上了同源序列,占 7.25%。无同源序列的克隆共 128 个,占到 92.75%。这表明该文库富含大量未知微生物物种。其次,10 个对上同源序列的都是细菌序列,这可能是有两方面的原因,其一,细菌是该环境样品的优势菌群,其物种丰度远远高于古菌、真菌以及其他微生物;其二,间接提取 DNA 的方法得到细菌比例更大一些。此外,由测序结果分析该文库的空载率仅为 1.2%,随机性为 1.000。部分 BLAST 比对结果见表 3。

表 3 部分 Fosmid DNA 测序结果 BLAST 比对结果

Table 3 Partial BLAST result of Fosmid DNA sequencing

Reads name	e value	Identities	Annotation
vsmfaaA08	1e-79	84	gi 154154406 gb CP000774.1 <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1, complete genome
vsmfaaC03	1e-121	86	gi 191798527 gb CP000319.1 <i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14, complete genome
vsmfaaD02	1e-149	90	gi 191729581 gb AE005673.1 <i>Caulobacter crescentus</i> CB15, complete genome
vsmfaaD04	3e-12	82	gi 47118316 dbj BA000040.2 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 DNA, complete genome
vsmfaaD11	7e-24	86	gi 78033986 emb AM039952.1 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria complete genome
vsmfaaG03	5e-88	91	gi 30407127 emb AL646052.1 <i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000 chromosome complete sequence
VsmfaaB10	1e-126	88	gi 77380231 gb CP000094.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1, complete genome

2.3 蛋白酶基因筛选

以脱脂奶为底物,将超级池和二级池中的 Fosmid 克隆转接到 LB 脱脂奶板上,37℃,培养 48 h 后,发现克隆 pro12 周围有明显透明圈(图 1)。经反复验证,克隆 pro12 周围均有透明圈,其他克隆周围无透明圈存在,说明 pro12 中含蛋白酶基因。

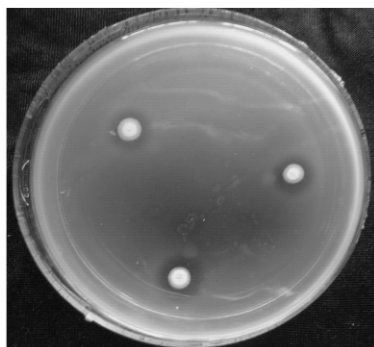


图 1 pro12 在 LB 平板上降解脱脂奶的情况

Fig. 1 Degradation phenotype of proteinase pro12 to the skim milk in LB medium.

2.4 亚克隆构建、筛选

提取 Fosmid 克隆 pro12 的 DNA,经 *EcoR* I 和 *Sph* I 双酶切后,胶回收 1.5—5 kb 大小的片段(图略),连接到用相应的酶双酶切后的 pUC19 载体上,转化(用 *E. coli* DH5 α)后,涂板于 LB 固体培养基

(含 50 mg/L 氨苄青霉素)上,37℃,12 h 后,挑取尽量多的亚克隆,37℃,摇菌培养 12 h,将亚克隆转接到 LB 固体培养基(含 1% 脱脂奶,50 mg/L 氨苄青霉素)上。经筛选,克隆 espro124a5 能够降解脱脂奶(图 2)。说明克隆中含有目标蛋白酶基因。

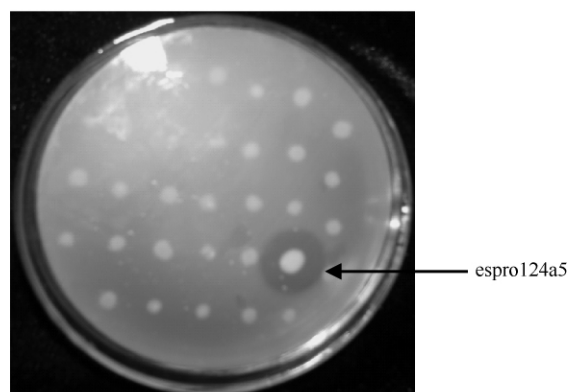


图 2 活性筛选亚克隆

Fig. 2 Subclones based on function-driven screening.

2.5 蛋白酶杀线虫室内生物测定

结果显示(表 4,图 3),亚克隆 espro124a5 对靶标线虫 *Meloidogyne* spp. 具有较大的杀线虫活性。在生物测定中,线虫的致死率 4 h、8 h、12 h 后的观测结果分别为 80%、99% 和 100%。12 h 后,能够看到被破坏的线虫角质。在所有阴性对照:阴性对照

菌 *E. coli*, LB 液体培养基和培养物上清液煮沸 25 min, 12 h 后, 致死率下降到 25% 以下, 并且这些对照中, 死亡线虫的角质完好无损。热处理上清液对线虫无活性, 说明基因编码的蛋白对线虫起了一

定的作用。表 4 中可以看出, espro124a5 杀线虫活性甚至强于阳性对照阿维菌素 (Abamectin), 说明蛋白酶 espro124a5 有较强的杀线虫活性。

表 4 *Meloidogyne* spp. 在 espro124a5 培养物上清液中的致死率

Table 4 Mortality of *Meloidogyne* spp. in culture supernatants from espro124a5

Active substance	4-h mortality of <i>Meloidogyne</i> spp. % (SE)	8-h mortality of <i>Meloidogyne</i> spp. % (SE)	12-h mortality of <i>Meloidogyne</i> spp. % (SE)
espro124a5	81 (2.11) ^{b,B}	98 (0.50) ^{b,B}	100 (0) ^{b,B}
Abamectin	35 (1.19) ^{b,B}	75 (2.80) ^{b,B}	100 (0) ^{b,B}
<i>E. coli</i>	8 (0)	8 (0)	13 (0.70)
boiled espro124a5	15 (0)	20 (0)	24 (0.62)
LB medium	7 (0)	8 (0)	10 (0.10)

Death was determined by nudging nematodes with a stick under a light microscope, the immobilized nematodes were counted as dead. Mortality of nematodes = number of dead nematodes / all tested nematodes × 100%. The mortality with the letter b indicates statistically significant difference against its corresponding *E. coli* control within a column. The mortality with the letter B indicates statistically significant difference against its corresponding LB medium control within a column. SE, standard error of mortality. For all these treatments, an independent samples test showed $P < 0.01$.

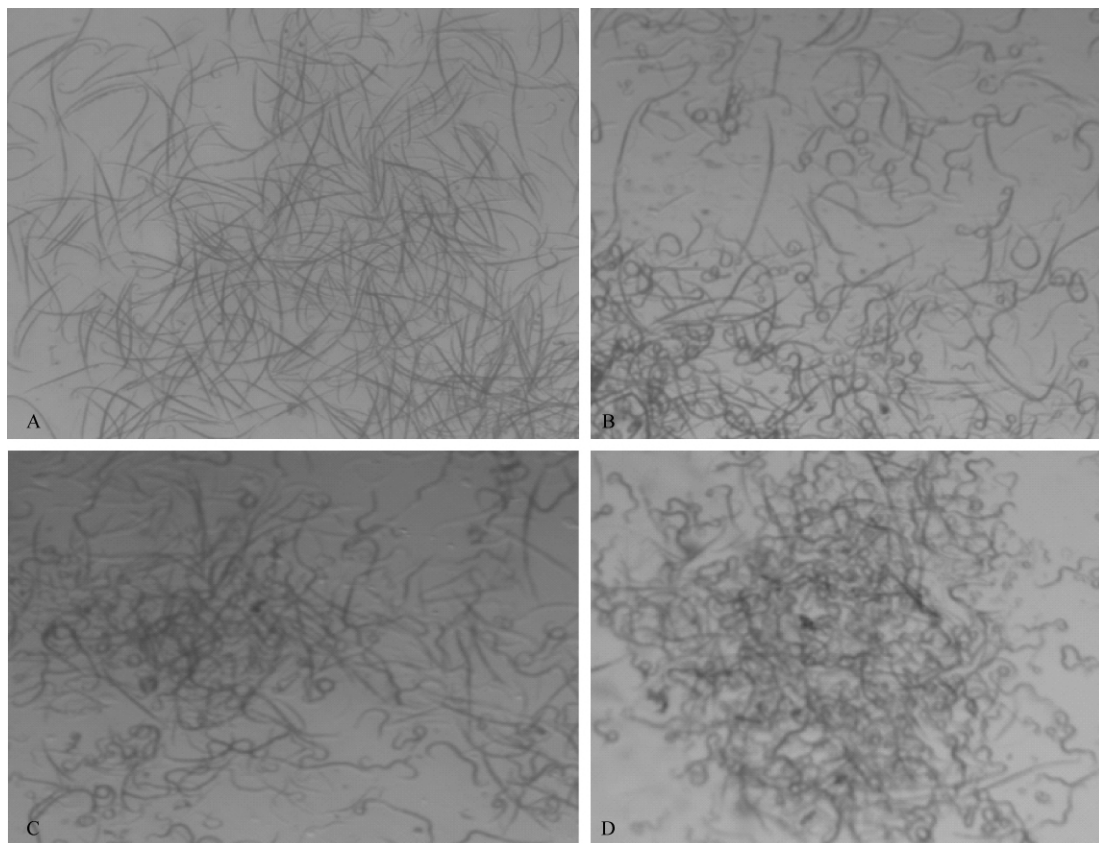


图 3 *Bursaphelenchus xylophilus* 在各处理中的致死情况

Fig. 3 Death note of *Meloidogyne* spp. in each treatment after eight hours. A: espro124a5 (25 ×); B: *E. coli* culture supernatants (25 ×); C: boiled espro124a5 (25 ×); D: LB medium (20 ×).

2.6 序列测定、序列分析

编码该蛋白酶的 ORF 序列全长 1746 个碱基, 编码 581 个氨基酸残基的蛋白质, 蛋白质分子量为 61,353 Da, G + C 含量 63.82%, 等电点 8.75, 包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG (Accession No. GU556930 at NCBI)。在其 5' 非编码区无 S-D 序列 (Shine-Dalgarno, SD), 3' 非编码区无反向串联重复

序列 (Tandem inverted repeat sequences)。在氨基酸序列中, 23 和 24 个氨基酸序列之间是其信号肽劈开位点。

通过 NCBI 上 blastx 比对, 发现 espro124a5 与来自于 *Maricaulis maris* MCS10 (accession no. YP_75682.2 at NCBI) 的丝氨酸蛋白酶 S15 仅有 45% 的同源性, 与另外一种不可纯培养的 *Maricaulis* sp.

(Accession No. ADD69818.1 at NCBI) 丝氨酸蛋白酶 peptidase S15 仅有 93% 的同源性, 是一种新型的丝氨酸蛋白酶, 有其保守的催化三元组: Asp₄₆₉, His₅₄₁ 和 Ser₃₄₈。同时, espro124a5 已在 NCBI 上登录, 并获得核酸序列登录号: GU556930。

3 讨论

在宏基因组途径中, 最重要的一步是环境样品基因组 DNA 的提取。到目前为止, 没有一个简单统一的方案适合提取所有的环境样品 DNA。主要问题是 DNA 的数量, 纯度, 完整性和 DNA 的代表性。DNA 的提取方法有两种: 要么, 通过碱裂解法、从环境样品中提取; 要么, 间接法, 先从环境样品中分离和浓缩微生物细胞, 然后再进行碱裂解提取环境样品 DNA。对许多环境样品来说, 间接法是十分可取的。如对海洋水来说, 直接从其中分离 DNA 是不实际的, 因为微生物密度较低, 因此, 在浓缩细胞之前, 通常进行一些过滤的操作^[20]。对土壤样品来说, 许多土壤的污染是非常严重的, 例如, 多酚类物质的污染能够影响 DNA 的纯化, 也能影响宏基因组过程中随后的步骤^[21]。Lindahl 和 Bakken^[22] 报道用密度梯度分离液 (Nycodenz) 将微生物细胞分离出来, 可以获得基本上全部加入灭菌土中的测试细菌。据 Acridine Orange Direct Counts (AODC) 方法估测, 这种方法提取到的细菌细胞比单用洗涤/离心法得到的细胞提高了 1%—50%, 并且提取过程对细胞并不造成损伤^[22]。

因此, 为兼顾土壤 DNA 的纯度和片段大小, 本研究采取结合 PVPP 的 Nycodenz 密度梯度离心法提取温室土壤微生物基因组 DNA。先将分散的土壤悬液低速离心, 去除大的土壤颗粒, 然后高速离心收集上清中的细胞后, 用 PVPP 洗涤 1—3 次, 去除腐殖酸等杂质, 最后, 将细胞重悬液经 Nycodenz 密度梯度离心去除其余的土壤碎片及杂质, 最终得到了足量的纯净微生物细胞。实验结果表明, 通过该法提取到的 DNA 纯度高、片段长, 完全能满足构建宏基因组 Fosmid 文库的要求。

采用宏基因组克隆最先筛选到的生物活性物质是具有抗菌活性的五种新的小分子物质 Terragine A、B、C、D、E^[23]。后来, 人们陆续通过构建和筛选宏基因组文库, 筛选到新的生物素合成操纵子、脂(酯)酶、琼脂糖酶、甘油脱水酶、蛋白酶和抗菌化合物及合成酶基因簇等^[2, 24-27]。本研究通过构建和功能驱动筛选宏基因组 Fosmid 文库, 进一步构建和

筛选亚克隆, 成功筛选到一个含蛋白酶基因亚克隆 (espro124a5)。杀线虫室内生物测定试验表明: 克隆发酵液在无需诱导剂, 无需克隆载体上的启动子, 就能起到杀线虫的作用。说明该蛋白酶基因有独立的启动子, 同时, 也说明该蛋白酶是一种分泌型胞外蛋白酶。在 NCBI 上通过 blastx 比对发现, espro124a5 与来自于 *Maricaulis maris* MCS10 (accession no. YP_756822 at NCBI) 的丝氨酸蛋白酶 S15 仅有 45% 的同源性, 是一种新型的丝氨酸蛋白酶, 有其保守的催化三元组: Asp₄₆₉, His₅₄₁ 和 Ser₃₄₈。但是, 本研究仅对蛋白酶 espro124a5 的杀线虫室内生物测定做了初步研究, 其酶的活性, 最适温度和 pH 值, 异源表达和蛋白纯化以及 espro124a5 的杀线虫机制还有待于进一步研究。

本研究构建的宏基因组 Fosmid 文库库容大, 包含了 3 万多个 Fosmid 克隆, 覆盖了大于 1 Gb 的微生物基因组信息, 有利于我们从中筛选蛋白酶、淀粉酶、酯酶、氧化还原酶和磷降解酶等微生物基因资源; 同时由于插入片段较大 (> 35 Kb), 有利于我们从中筛选到大的基因簇和生物素合成操纵子, 如巨酮合成酶基因簇 (PKS 基因簇) 等。

参考文献

- [1] Kamagata Y, Tamaki H. Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microbes and Environments*, 2005, 20: 85-91.
- [2] Brady SF, Clardy J. N-acyl derivatives of arginine and tryptophan isolated from environmental DNA expressed in *Escherichia coli*. *Organic Letter*, 2005, 7 (17): 3613-3616.
- [3] Rodriguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *Federation of European Microbiological societies Microbiology Letter*, 2004, 231: 153-158.
- [4] Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(5): 492-498.
- [5] Handelsman J, Rondon MR, Brady, SF. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry Bioogy*, 1998, 5: 245-R249.
- [6] Bird DM, Koltai H. Plant parasitic nematodes: habitats, hormones, and horizontally acquired genes. *Plant Growth Regulation*, 2000, 19: 183-194.

- [7] 刘玮琦, 茂振川, 杨宇红, 谢丙炎. 保护地根结线虫发生地土壤微生物群落多样性的研究. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)*, 2008, 24 (4): 318-324.
- [8] Åhman J, Johansson T, Olsson M, Punt PJ, Hondel CAMJJ, Tunlid AS. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3408-3415.
- [9] Huang XW, Zhao NH, Zhang KQ. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology*, 2004, 155: 811-816.
- [10] Bertrand H, Poly F, Van VT, Lombard N, Nalin R, Vogel TM, Simonet P. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62(1): 1-11.
- [11] Huang XW, Tian BY, Niu QH, Yang JK, Zhang LM, Zhang KQ. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystal can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Research in Microbiology*, 2005, 156: 719-727.
- [12] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428 (6978): 37-43.
- [13] Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340: 783-795.
- [14] Reese MG. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry*, 2000, 26: 51-56.
- [15] Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: 270-272.
- [16] Weissburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 697-703.
- [17] Vainio EJ, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 2000, 104: 927-936.
- [18] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [19] Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers specific for Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003a, 5: 828-841.
- [20] Fuhrman JA, Comeau DE, Hagstrom A, Chan AM. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54: 1426-1429.
- [21] Tebbe CC, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant-DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 2657-2665.
- [22] Bakken LR, Lindahl V. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *Federation of European Microbiological societies Microbiological Ecology*, 1995, 16 (2): 135-142.
- [23] Wang GYS, Graziani E, Waters B. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Organic Letters*, 2000, 2: 2401-2404.
- [24] Henne A, Daniel R, Schmitz RA, Gottschalk G. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol.* 1999, 65: 3901-3907.
- [25] HENNE A, RUTH A. SCHMITZ, MECHTHILD BO MEKE. Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 3113-3116.
- [26] Entcheva P, Liebl W, Johann A, Hartsch T, Streit WR. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 89-99.
- [27] Waschkowitz T, Rockstroh S, Daniel R. Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 2506-2516.

Construction of microbial metagenomic library and screening of a nematocidal protease gene in greenhouse cucumber soil infested with Root-knot nematodes

Zhixiang Zhao^{1,2}, Xiaofei Lu², Guohua Chen², Yuhong Yang², Zhenchuan Mao², Erming Liu^{1*}, Bingyan Xie^{2*}

(¹ College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(² Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: [**Objective**] In order to search novel nematocidal protease genes, a metagenomic fosmid library was constructed and screened by uncultured method. [**Methods**] Density gradient centrifugation was used to extract and purify total greenhouse soil microbial DNA. After end-repair, ligation, packing and transformation, metagenomic fosmid library was constructed. At the same time, in order to screen the library, function-driven screening was used as a potential strategy, skim milk was served as substrate and root-knot nematodes as targets. [**Results**] The library contained 31,008 clones with the average insert fragment of 36.5 kb, including 1.13Gbp microbial genetic information, so it was suitable for large-scale microbial functional gene screening. By the function-driven screening, fosmid clone pro12 which contained the nematocidal protease gene was screened. Then, subclones were constructed and screened. A subclone named espro124a5 was screened. After analysis of gene structure, espro124a5 is a secreted extracellular protease and a database search for homologies revealed it possessed 45% identities with peptidase S15 from *Maricaulis maris* MCS10 (accession no. YP_756822 at NCBI). It is a novel serine protease. Besides these, it has the serine protease-conserved catalytic triad residues, Asp₄₆₉, His₅₄₁ and the catalytic nucleophile Ser₃₄₈. [**Conclusion**] DNA obtained from the method of Nycodenz density gradient centrifugation had high purity, long fragment, and can meet the requirements of constructing metagenomic fosmid library. At the same time, the metagenomic fosmid library contains a lot of microbial genetic information, which is suitable for the screening of the other microbial genetic resources.

Keywords: soil microbes; metagenomic Fosmid library; function-driven screening; nematocidal protease gene

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Major Fundamental Research Program of China (2009CB119000), the Public Service Sectors (Agriculture) Special Funding for Research(3-25, nyhyzx07-050) and the Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program During the Eleventh Five-year Plan Period(2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-82109545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

Received: 29 January 2010/ Revised: 24 March 2010