

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (1) :40 - 49; 4 January 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140239

嗜碱芽孢杆菌 N16-5 木寡糖结合蛋白 XynE 的功能表征

张周刚, 宋亚圉, 姜凯, 薛燕芬, 马延和*

中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要:嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) N16-5 是本实验室从内蒙古乌都淖湖沉积物中分离的嗜碱菌, 含有丰富的多糖水解酶, 能够利用广泛的单糖和多糖。实验室前期转录组研究发现其基因组上存在一个 21 kb 大小的木聚糖利用相关基因簇, 其中包括 *xynEFG* 基因簇编码的 ABC 转运蛋白。【目的】生物信息学分析预测 *xynE* 编码转运蛋白的底物结合蛋白, 通过敲除 *xynE* 基因研究它对菌株 N16-5 利用木聚糖的影响。【方法】利用温敏型载体 pNNB194 介导的同源交换重组的方法构建了 *xynE* 基因敲除菌株 N16-5 ($\Delta xynE$), 并通过基因回补对敲除菌株表型进行验证。通过检测菌株在木聚糖培养基中的生长情况及培养基中还原糖含量的变化来分析 *xynE* 基因对菌株利用木聚糖的影响; 通过 HPLC 检测分析不同培养时间点木聚糖培养基的组分, 结合缺失菌株和野生型菌株在以木糖为唯一碳源的培养基中的生长情况来分析 XynE 所属 ABC 转运蛋白的底物特异性。【结果】相比野生型菌株, 缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 在木聚糖培养基的生长曲线对数期明显延迟, 最大生物量略低, 且培养过程中出现了明显的还原糖的累积与消耗过程; 回补菌株恢复了野生型表型, 且最大生物量比野生型略高。HPLC 检测分析显示, 相比野生型菌株, 缺失菌株培养过程底物消耗速度较慢, 且 16 h 后出现明显的木四糖、木三糖和木二糖的累积, 直至 60 h 后仍有较大量木二糖的存在; 在木糖培养基中培养时, 缺失型菌株和野生型菌株的生长趋势较一致。【结论】XynE 蛋白特异性结合木寡糖, 其所属 ABC 转运蛋白在嗜碱芽孢杆菌 N16-5 降解利用木聚糖过程中发挥着重要作用。

关键词:嗜碱芽孢杆菌, 木聚糖利用, 木寡糖转运蛋白

中图分类号: Q816 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 01-40-10

随着人们环保意识的增强和对清洁能源的需求, 以木质纤维素为主要原材料的生物质能作为重要的可再生能源受到研究人员和相关企业及政府的大量关注。微生物是自然界中木质纤维素的主要降解者, 关于微生物降解利用半纤维素的多样化机制, 此前的研究主要关注纤维素水解酶类的挖掘和开发^[1-5], 降解产物如何转运至胞内的过程则少有问

津。嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) N16-5 是本实验自内蒙古乌都淖湖沉积物分离的一株嗜碱菌, 最适生长 pH10.0, 在 1% - 15% NaCl 浓度范围内生长良好, 能利用广泛的单糖和多糖^[6]。前期转录组研究发现嗜碱芽孢杆菌 N16-5 基因组存在一个与木聚糖利用相关的 21 kb 大小的基因簇, 该基因簇编码 16 个功能蛋白, 其中包括一个 *xynEFG* 基因编码的

基金项目: 国家“973 项目”(2011CBA00805); 国家“863 计划”(2012AA022100)

* 通信作者。Tel: +86-10 64807618; Fax: +86-10 64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

作者简介: 张周刚 (1988 -), 男, 湖北人, 硕士研究生, 研究方向为极端微生物资源的认识与利用。E-mail: zzglv1988@hotmail.com

收稿日期: 2014-05-08; 修回日期: 2014-07-10

CUT1 家族 ABC 转运蛋白, *xynE* 编码 ABC 转运蛋白的底物结合蛋白。

ABC (ATP Binding Cassette) 转运蛋白超家族是利用水解 ATP 释放的能量介导多种底物的主动跨膜运输的一大类跨膜转运蛋白,广泛存在于细菌、植物和哺乳动物的各种细胞中,主要功能包括营养物质的吸收和药物的外排等^[7]。介导营养物质吸收的细菌 ABC 转运蛋白除了一般 ABC 转运蛋白所具有的两个跨膜蛋白和核苷酸结合蛋白之外,通常还具有一个位于胞外的底物结合蛋白^[7]。CUT1 家族 ABC 转运蛋白一般负责二糖、寡糖、甘油磷酸和多元醇等底物的转运吸收^[8],该类转运蛋白运输底物时先由胞外的底物结合蛋白特异性识别和结合底物,然后依赖胞内核苷酸结合蛋白水解 ATP 提供的能量将底物转移给跨膜蛋白并转运至胞内。目前有关参与木聚糖利用过程的木寡糖转运蛋白的报道凤毛麟角,来源于嗜热脂肪土芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) T-6 和热紫链霉 (*Streptomyces thermoviolaceus*) OPC-520 的木寡糖 ABC 转运蛋白 XynEFG 和 BxlEFG 的底物结合蛋白 XynE 和 BxlE 在体外进行了表征^[9-10],两者分别与木三糖和木二糖有最大亲和力(解离常数 K_d 分别为 5×10^{-8} mol/L 和 8.75×10^{-9} mol/L),它们与来源于嗜碱芽孢杆菌 N16-5 的 XynE 蛋白一致性 (Identities) 分别为 47% 和 27%。由于遗传操作系统的成熟,这些研究仅报道了转运蛋白的体外底物结合特性,并未通过实验证明其在木聚糖利用过

程中的生理作用。

底物结合蛋白 XynE 决定了转运蛋白 XynEFG 的底物特异性识别和结合,对底物的运输起关键作用。为了检测转运蛋白 XynE 对嗜碱芽孢杆菌 N16-5 木聚糖利用效率的影响,并分析 XynE 蛋白的底物特异性,本研究通过敲除转运蛋白的底物结合蛋白基因 *xynE*,比较野生型菌株和敲除菌株在木聚糖培养基上的生长情况和还原糖的累积情况;通过 HPLC 检测分析木聚糖培养基培养过程的不同时间点样品的组分,并检测野生型菌株和敲除菌株在木糖培养基上的生长情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Bacillus* sp. N16-5 为本实验室分离和保存;敲除载体和回补载体的克隆用菌株 *E. coli* DH5 α 购自北京全式金公司生物技术有限公司。表 1 显示的是本研究所用的质粒。

1.1.2 试剂和引物: 质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒及胶回收试剂盒均购自 Omega 公司;限制性内切酶 *Bam*HI-HF、*Sal*I-HF 和 *Eco*RI-HF 购自 NEB 公司, *rTaq* DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶以及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;木聚糖 (xyln from Beechwood) 购自 Sigma 公司。本研究所用的引物见表 2。

表 1. 基因敲除及回补所用质粒

Table 1. Plasmids used for deletion and retro-complementation

Plasmids	Description or genotype	Reference or source
pMD18-T	Cloning vector, Amp ^R	TaKaRa
pNNB194	Shuttle vector, hybrid between pE194 and pBluescript II SK, <i>Bacillus subtilis</i> Erm ^R , <i>E. coli</i> Amp ^R	[11]
pMK4	5.6 kb; Amp ^R , Cm ^R , ColE1 origin in <i>E. coli</i> ; Cm ^R , pC194 origin in <i>Bacillus</i> sp.	Bacillus Genetic Stock Center

表 2. 缺失菌株和功能回补菌株构建所用引物

Table 2. Primers used for verification of target gene knockout and construction of retro-complement vector

Primers	5' sequences (5'→3')	3' sequences (5'→3')
KnEV	ATGGTATAAAGCGCACGCTTGAAG	CTTCACGAGAAGTGCTAAGCTTC
RetroE	CGGGATCCGTGGCCAACGCTGTTAC	CGGAATTCTTACTCTTCGTGACAGAG
Cat	TTGATTTAGACAATTGGAAGAGAAAA	GGCCTATCTGACAATTCCTGA
<i>xynE</i> _1	AAAACATGCCACTGAATACA	
<i>xynE</i> _2	CCCCTCCGTTTCTAAAAGGTACTTCCCCTTGA	
<i>xynE</i> _3	TTTCAAGGGGAAAAGTACCTTTTAGAAAACGGAGGGG	
<i>xynE</i> _4	TAAGGTCAAAAATACTTTAATGAGC	

1.1.3 培养基: (1) Horikoshi 培养基 (1L): 葡萄糖 5 g, Tryptone 5 g, Yeast extract 0.1 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.31 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g; 以上配成 900 mL 灭菌, 使用前再加入单独灭菌的 10% (W/V) Na_2CO_3 溶液 100 mL; (2) NCM 培养基 (neutral complex medium) (1L): Peptone 5 g, Yeast Extract 2 g, Citric acid 0.34 g, Glucose 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, NaCl 11.7 g; 以上配成 900 mL, 灭菌后加入 100 mL 单独灭菌的 22.8% (W/V) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 溶液。培养基 pH 为 7.6–7.8, 固体培养基加 3% 琼脂; (3) 木聚糖培养基 (1L): 碳源为 0.5% (W/V) 木聚糖 (xylan from beechwood) 的 Horikoshi 培养基; (4) 木糖培养基 (1L): 碳源为 1% (W/V) 木糖的 Horikoshi 培养基。

1.2 基因簇蛋白序列分析

将序列在 NCBI 非冗余蛋白序列数据库 (non-redundant protein sequences database) 中使用 Blastp 工具进行搜索比对, 预测基因的功能; 使用 ClustalW 蛋白相似序列进行多重比对; 将 XynE 蛋白序列在 TCDB 数据库 (<http://www.tcdb.org/>) 进行比对, 确定其分类; 使用 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白的跨膜螺旋结构; 使用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白的信号肽。

1.3 *xynE* 基因的敲除

1.3.1 敲除载体 pNNB194-*xynE* 的构建: 以菌株 N16-5 基因组为模板, 使用 Pyrobest DNA 聚合酶分别以 *xynE*_1/*xynE*_2、*xynE*_3/*xynE*_4 为引物扩增 *xynE* 上下游各 800 bp 片段, PCR 产物胶回收后再以 *xynE*_1/*xynE*_4 为引物进行融合 PCR, 获得 1.6 kb 大小的同源臂融合片段。融合片段使用 rTaq 酶末端加 A 反应后连入 pMD18-T 载体, 再用 *Sall*-HF 和 *Bam*HI-HF 双酶切, 切胶回收的带粘性末端的融合片段与酶切后的 pNNB194 载体使用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后涂布氨苄青霉素抗性的 LB 平板。使用引物 *xynE*_1/*xynE*_4 进行质粒 PCR 验证阳性克隆, 进一步测序验证敲除载体是否构建成功。

1.3.2 基因的无痕敲除: 我们使用温敏型质粒 pNNB194 介导的两次同源重组实现目的基因的无痕敲除。将敲除载体 pNNB194-*xynE* 转化芽孢杆菌 N16-5 原生质体后 (转化方法参见文献 [13]), 使用引物 *xynE*_1/*xynE*_4 菌落 PCR 验证阳性转化子。

将获得的阳性转化子转接到红霉素抗性 NCM 液体培养基, 34 $^{\circ}C$ 摇床培养 24 h, 再经 45 $^{\circ}C$ 过夜培养消除游离载体后涂布红霉素抗性 NCM 固体培养基, 45 $^{\circ}C$ 培养 2 d 后平板长出的菌落中应该包括敲除载体经过同源重组已经整合到染色体上的。通过 PCR 验证为阳性克隆的单菌落转接无抗性的 NCM 液体培养基, 37 $^{\circ}C$ 摇床培养 24 h, 此时部分细胞发生第二次同源交换, 目的基因被敲除。将培养物稀释涂布无抗性的 NCM 固体培养基平板后 37 $^{\circ}C$ 培养得到单菌落, 然后通过无抗性 NCM 平板和红霉素抗性平板的对比培养, 挑取 *xynE* 敲除菌株, 使用引物 KnEV 进行基因组 PCR 验证 *xynE* 基因是否敲除成功, 获得的 *xynE* 基因缺失菌株命名为 *Bacillus* sp. N16-5 (Δ *xynE*)。

1.4 缺失菌株的遗传回补

1.4.1 回补载体 pMK4-*xynE* 的构建: 以嗜碱芽孢杆菌 N16-5 基因组 DNA 为模板, 使用 Pyrobest DNA 聚合酶以 RetroE 为引物扩增 *xynE* 全长基因及其上游 500 bp 片段, 回收 PCR 产物和 pMK4 质粒分别用 *Bam*HI-HF 和 *Eco*RI-HF 限制性内切酶后按插入片段与载体摩尔比 5:1 使用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}C$ 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布氨苄青霉素抗性的 LB 平板。单菌落转接氨苄抗性 LB 液体培养基后提取质粒, 用引物 RetroE 质粒 PCR 验证阳性克隆, 并测序验证。

1.4.2 回补载体转化缺失菌株原生质体: 按 1.3.2 方法将 *xynE* 基因回补载体 pMK4-*xynE* 转化菌株 N16-5 (Δ *xynE*) 原生质体, 使用 RetroE 菌落 PCR 验证阳性转化子。同时, 将 pMK4 空载体转化野生菌株 N16-5 和缺失型菌株 N16-5 (Δ *xynE*) 原生质体, 作为回补实验的对照菌株。

1.5 表型检测

1.5.1 木聚糖培养基生长情况检测: *Bacillus* sp. N16-5 野生型菌株和 *Bacillus* sp. N16-5 (Δ *xynE*) 菌株经 Horikoshi 培养基活化后, 按 1% 接种量接种于 50 mL 木聚糖培养基; 回补菌株及回补对照菌株活化后, 按 1% 接种量接种于 50 mL 含终浓度 2.5 μ g/mL 氯霉素抗性的木聚糖培养基, 37 $^{\circ}C$ 、210 r/min 摇瓶培养, 每隔 3 h 取样测定菌液 OD_{600} , 绘制菌株生长曲线。

1.5.2 培养基还原糖含量检测: 将木聚糖培养基培养过程中不同时间点取样的 3 份平行样品 10000 \times g

离心 2min, 取上清, 稀释 10 倍后与 DNS 溶液等体积混合, 沸水浴 5min 显色, 冷却至室温后吸取 200 μ L 加入 96 孔板, 酶标仪检测 540 nm 吸光值, 根据木糖标准曲线换算成还原糖当量浓度, 制作成还原糖含量曲线。

1.5.3 木聚糖培养基成分 HPLC 检测: 我们采用 HPLC 分析将木聚糖培养基培养过程中不同时间点还原糖的组成, 样品经 10000 \times g 离心 2min 后取上清上样, 色谱柱选择 TSKgel G2500PWXL, 流动相为双蒸水, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 示差折光检测器 RID。

1.5.4 木糖培养基生长情况检测: 野生型菌株 *Bacillus* sp. N16-5 和基因缺失菌株 *Bacillus* sp. N16-5 (Δ *xynE*) 经 Horikoshi 培养基活化后, 按 1% 接种于 50 mL 木糖培养基, 37 $^{\circ}$ C、210 r/min 摇瓶培养, 每隔 3 h 取样测定菌液 OD_{600} , 绘制菌株生长曲线。

1.6 XynE 蛋白相似序列分析

使用 NCBI 网站 blastp 工具 PSI-BLAST 算法在非冗余蛋白序列 (non-redundant protein sequences database) 数据库上搜索 XynE 蛋白的相似序列, 将搜索得到的相似度最高、属于不同种属细菌的序列用 MEGA5.2 构建 Neighbor-Joining 系统发育树, Bootstrap 值设为 1000。

2 结果

2.1 木聚糖利用基因簇生物信息学分析

嗜碱芽孢杆菌 N16-5 木聚糖利用基因簇如图 1 所示, 根据蛋白序列在 NCBI 非冗余蛋白序列数据库同源比对结果 (表 3) 推测, 基因簇上的基因

xynB1 和 *xynB2* 分别编码 GH39 和 GH43 家族的 β -1,4-木糖苷酶, 不含信号肽, 推测位于细胞内; *xynD* 和 *xynC* 分别编码一组双组份调控系统的组氨酸激酶蛋白 (histidine kinase) 和反应调控蛋白 (response regulator), 其下游紧邻的 *xynEFG* 基因簇编码一套 ABC 转运蛋白的底物结合蛋白 (solute-binding protein) 和两个跨膜通道蛋白 (permease protein), *xynEFG* 基因簇的表达可能受上游双组份系统的调控。另外, 跨膜蛋白 XynF 和 XynG 经 TMHMM 预测均含有 6 个跨膜螺旋结构; 多重序列比对结果显示两者均含有 ABC 转运蛋白跨膜通道蛋白的保守 EAA 基序 (EAAAX₃GX₉IXLP), 这说明 XynE、XynF 和 XynG 蛋白可能组成 ABC 转运蛋白复合体。底物结合蛋白 XynE 含信号肽序列, 在 TCDB 数据库搜索比对得到的相似序列均为 CUT1 家族 (Carbohydrate Uptake Transporter-1 Family, TC 3. A. 1. 1) ABC 转运蛋白的胞外底物结合蛋白, 由此推测 XynE 可能特异性结合木二糖或木寡糖, 其所属 ABC 转运蛋白 XynEFG 属于 CUT1 家族。搜索比对获得的较高相似度的 Xyn 相似蛋白功能均为基因组预测信息, 并未通过实验验证, 因此 XynE 蛋白的生理功能验证对以后该类蛋白的功能注释具有重要作用。

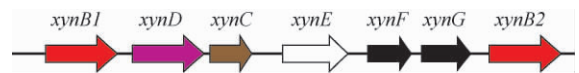


图 1. *Bacillus* sp. N16-5 木聚糖利用基因簇

Figure 1. Genomic organization of xylan utilization gene cluster of *Bacillus* sp. N16-5. The open reading frames in the cluster are labeled according to the annotations found in the sequence databases and the most homologous proteins identified where this gave a clear indication of function

表 3. 基因簇基因同源比对结果

Table 3. Blast search results of proteins encoded by the gene cluster against NCBI's non-redundant protein database

Genes	Predicted functions	Best blast hits	Identities	Positives
<i>xynB1</i>	xylan beta-1,4-xylosidase, GH39	GI:15613631	64	79
<i>xynB2</i>	xylan beta-1,4-xylosidase, GH43	GI:15616245	76	87
<i>xynD</i>	two-component sensor histidine kinase	GI:15616240	58	73
<i>xynC</i>	two-component response regulator	GI:15616241	59	75
<i>xynE</i>	ABC transporter sugar binding protein	GI:15616242	79	90
<i>xynF</i>	ABC transporter permease	GI:15616243	87	95
<i>xynG</i>	ABC transporter permease	GI:15616244	85	92

2.2 *xynE* 基因缺失菌株和功能回补的构建

为了验证 *xynE* 的功能, 我们构建了 *xynE* 基因缺失菌株和功能回补菌株。我们根据目的基因同源

臂外侧的序列设计引物 KnEV 进行菌落 PCR 验证 *xynE* 基因的敲除, *xynE* 基因敲除成功菌株 PCR 条带大小应在 1.9 kb 左右, 未敲除菌株 PCR 条带则在

3.2 kb 左右;使用 Cat 引物菌落 PCR 扩增 pMK4 载体上特有的氯霉素抗性基因,转化了回补载体 pMK4-*xynE* 或空载体 pMK4 的菌株均应扩增出 600 bp 条带;使用 RetroE 引物扩增 *xynE* 基因全长及其上游 500 bp 片段,野生型菌株和成功转化回补载体 pMK4-*xynE* 的回补菌株应扩增出 1.8 kb 条带。结果如图 2 所示,相应 PCR 产物条带与理论值相符,表明 *xynE* 基因缺失菌株、回补菌株以及回补对照菌株均构建成功,分别命名为 N16-5 ($\Delta xynE$)、N16-5 ($\Delta xynE$ pMK4-*xynE*) 及 N16-5 (pMK4) 和 N16-5 ($\Delta xynE$ pMK4)。

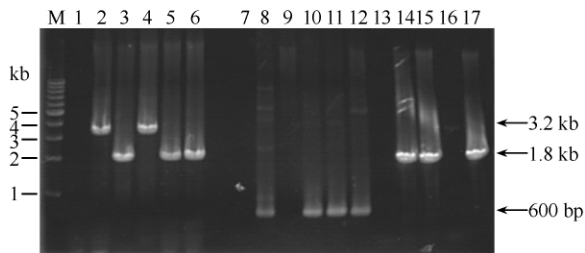


图 2. 基因缺失菌株和功能回补菌株菌落 PCR 鉴定

Figure 2. Verification of *xynE* gene deficient strain and complementation strain by colony PCR. M: 1 kb DNA marker; Primer for lanes 1-6 was KnEV, and Cat for lanes 7-12, RetroE for 13-17. Colony templates for lanes as follows: lanes 2 and 14: wild-type N16-5, lane 3: N16-5 ($\Delta xynE$); lanes 4, 10 and 15: N16-5 (pMK4); lanes 5, 11 and 16: N16-5 ($\Delta xynE$ pMK4); lanes 6, 12 and 17: N16-5 ($\Delta xynE$ pMK4 - *xynE*). Lanes 1, 7 and 13: negative PCR control with H₂O as template. Lane 8: positive control with plasmid pMK4 as template. Lane 14: positive control with wild-type N16-5 colony as template.

2.3 缺失菌株及回补菌株的表型检测

2.3.1 木聚糖培养基生长情况检测及还原糖含量测定: XynE 蛋白经预测可能特性性结合木二糖或木寡糖, *xynE* 基因的缺失可能使 N16-5 菌株在木聚糖培养基培养时不能有效吸收利用木聚糖降解产物木二糖或木寡糖,使菌体生长受到影响。为了验证 *xynE* 基因的生理功能,我们检测了 *xynE* 基因缺失菌株和回补菌株在木聚糖培养基中的生长情况,并测定了培养基中还原糖含量的变化情况。如图 3 所示,相比于野生型 N16-5 菌株,缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 生长曲线的对数期明显延迟,最大生物量比野生型略低,且培养过程中出现明显的还原糖的累积和消耗的过程。回补菌株恢复了野生型表型,培养过程中未出现明显的还原糖的累积和消耗过

程,且最终生物量比野生型略大,说明 *xynE* 基因缺失表型确是由 *xynE* 基因功能的缺失引起,而非转录极性效应所致。这证实了我们的推测, *xynE* 基因的缺失降低了菌株 N16-5 吸收利用木聚糖降解产物的效率,使培养基中还原糖累积,影响了菌体的生长。

2.3.2 木聚糖培养基成分 HPLC 分析: 为了分析 XynE 可能结合的底物,我们使用 HPLC 检测了野生型菌株和缺失型菌株培养过程中典型时间点木聚糖培养基样品的组成成分。根据图 3-A、C,我们选择在接种后 8 h、16 h、22 h、32 h、40 h、60 h 和 70 h 分别取样。从未接种的培养基 HPLC 检测图谱得知,木聚糖培养基底物主要由出峰时间分别在 6.286 min 和 9.365 min 的底物所组成,根据木寡糖标品出峰时间(木六糖:11.622 min;木五糖:11.904 min;木四糖:12.294 min;木三糖:12.750 min;木二糖:13.390 min;木糖:14.326 min)推测前者可能为难溶木聚糖,后者为相对易溶的聚合度在 10 以上的低聚木糖,两者峰面积占所有峰总面积的百分比分别为 14.6% 和 72.7%,剩下的为培养基中其他物质。从各时间点样品的液相图谱来看(见图 4,数据未完全发表),随着底物(绿色框内峰所代表)中木聚糖底物的部分降解,聚合度在 10 以上的低聚木糖一定程度上有所累积;缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 培养过程中底物消耗速度较野生型慢,且培养 16 h 后底物降解产物中有较明显的木二糖、木三糖和木四糖的累积,直至 60 h 后仍有较大量的木二糖存在。由此推测 XynE 蛋白的结合底物可能包括木四糖、木三糖和木二糖等,其所属的 ABC 转运蛋白可能是木寡糖转运蛋白。

2.3.3 木糖培养基生长情况检测: 为检测 *xynE* 基因是否和木糖的转运相关,我们检测了野生型菌株 N16-5 和缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 在木糖培养基上的生长情况。结果如图 5 所示,野生型菌株和缺失型菌株在木糖培养基中的生长情况基本一致,这说明 *xynE* 基因的缺失对菌株利用木糖没有明显影响。菌株 N16-5 可能主要利用其他蛋白来转运木糖,实验室前期转录组研究中发现一个与木糖利用有关的 MFS 转运蛋白,该蛋白基因独立于木聚糖利用基因簇。

2.4 XynE 蛋白相似序列分析

NCBI 数据库搜索获得的 XynE 蛋白相似序列均为基因组测序信息,注释功能为 ABC 转运蛋白的

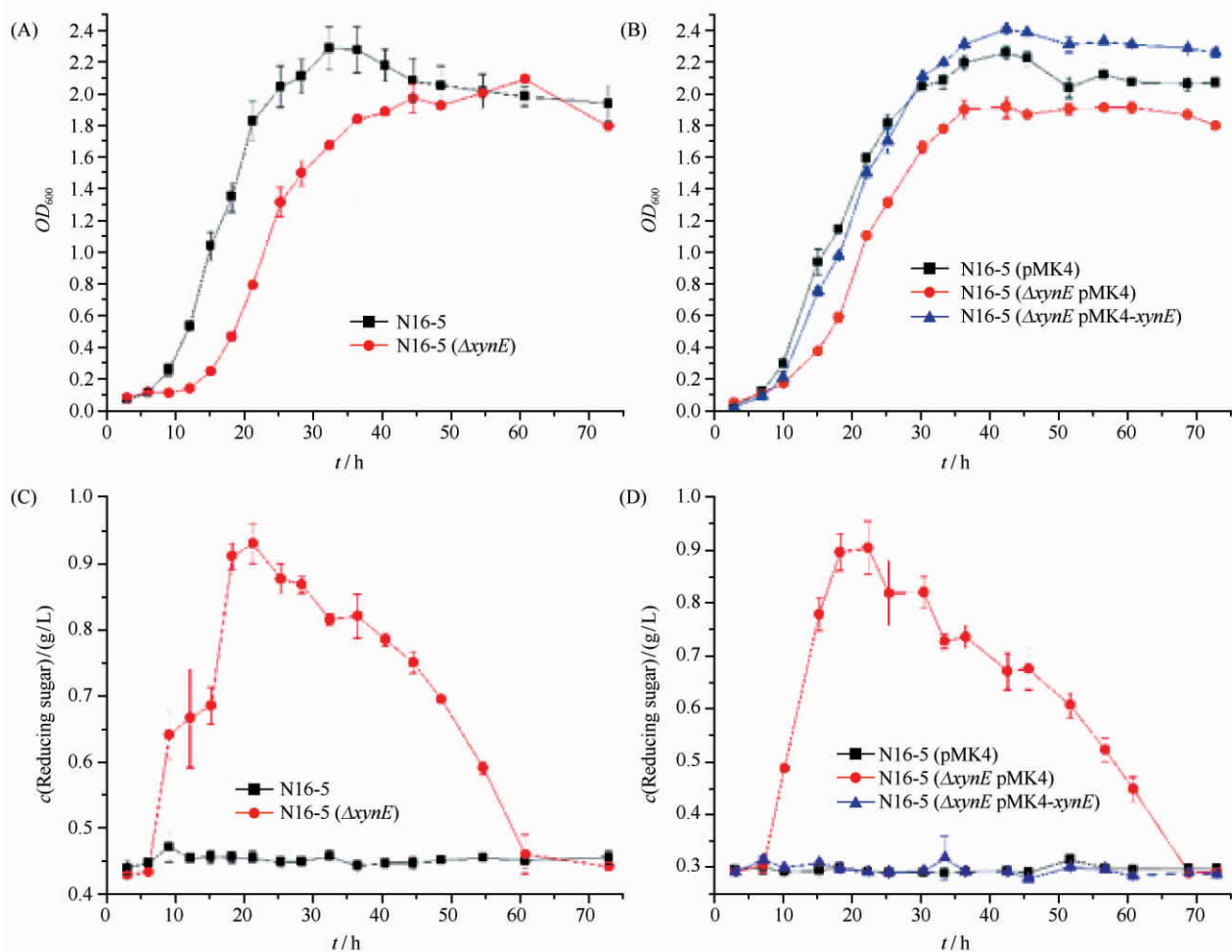


图 3. 基因缺失菌株及功能回补菌株在木聚糖培养基中生长情况检测及培养基还原糖含量变化

Figure 3. Growth profiles of *xynE* gene deficient strain (A) and the complementation strain (B) as well as the variation of reducing sugar concentration in the medium during culture on xylan from beechwood (C and D).

底物结合蛋白, 其中相似度最高 (Identities 79%, Positives 90%) 序列来源于 *Bacillus halodurans* C-125 菌株。我们选择相似度高、来源于不同属种细菌的序列, 利用 MEGA5.2 构建 Neighbor-Joining 系统发育树, Bootstrap 值设为 1000。如图 6 所示, XynE 相似蛋白主要来源于 *Oceanobacillus* 属、*Halobacillus* 属、*Gracilibacillus* 属和 *Bacillus* 属的嗜盐菌, *Geobacillus* 属和 *Thermoanaerobacterium* 属的嗜热菌、*Paenibacillus* 属的兼性厌氧菌以及 *Clostridium* 属的厌氧菌, 且来源于同一属、具有相似生理特性菌株的蛋白序列聚类成簇, 这说明 *xynE* 基因在进化过程中与菌株协同进化。

3 讨论

随着高通量测序技术的发展, 微生物基因组测序信息也日益增多。基于基因差异化转录表达的转录组数据, 结合序列同源性及基因组上下文分析 (genome context analysis) 的方法已经成为基因功能注释和代谢途径重建的常用手段^[13-17]。本实验室前期转录组研究发现嗜碱芽孢杆菌 N16-5 基因组存在一个与木聚糖利用相关的基因簇, 其中含有一套 *xynEFG* 基因编码的 ABC 转运蛋白。根据生物信息学分析推测, *xynEFG* 编码 CUT1 家族 ABC 转运蛋白。CUT1 家族 ABC 转运蛋白一般负责转运二糖、寡糖、甘油磷酸和多元醇等底物^[7], 本研究通过实验证实了 XynEFG 蛋白主要参与木聚糖降解产物木

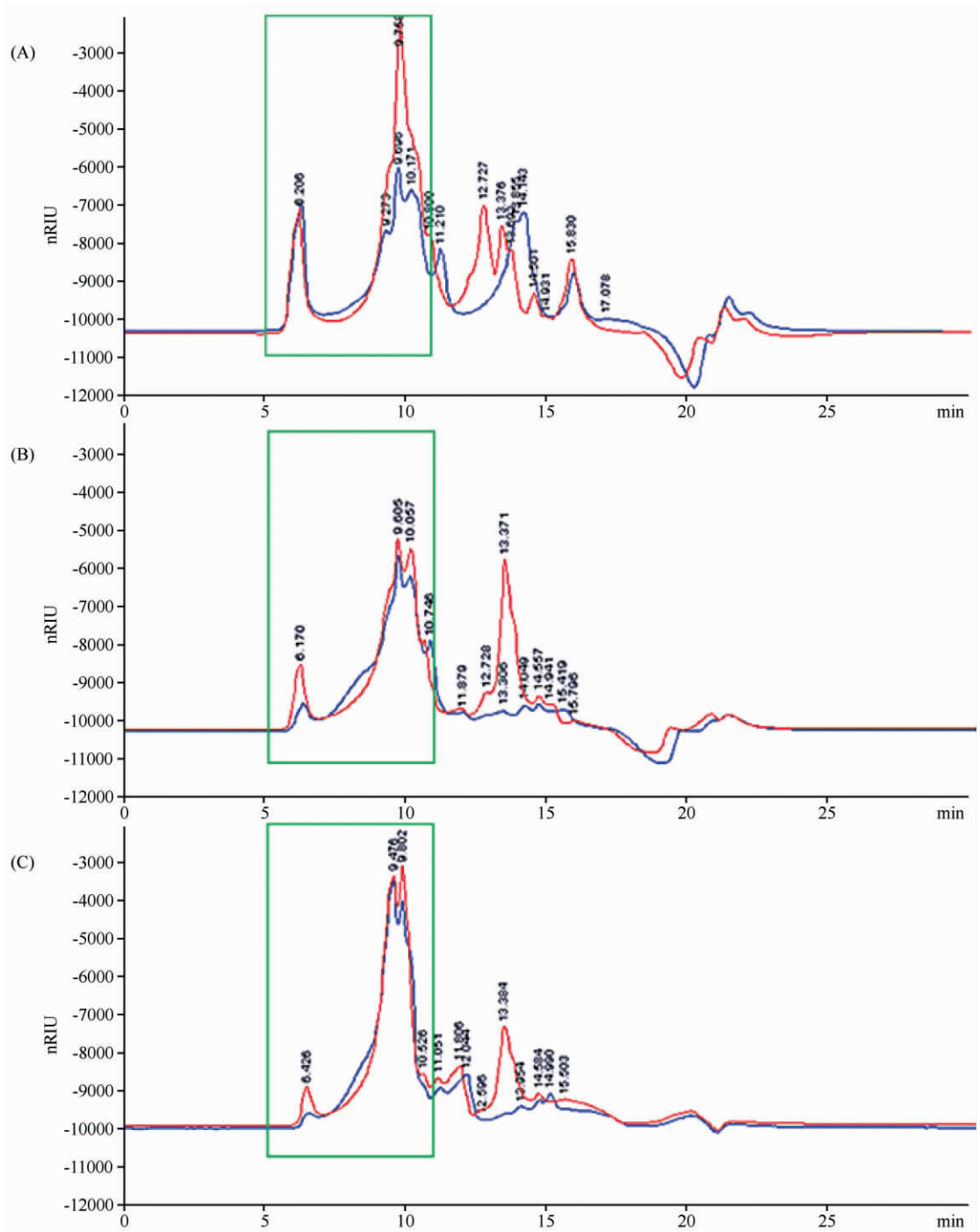


图 4. 木聚糖培养基培养过程中典型时间点样品组成成分 HPLC 检测

Figure 4. HPLC analysis of the components of xylan medium samples taken at typical times during culture. Blue lines present samples for wild type strain N16-5; Red lines present samples for deficient strain N16-5 ($\Delta xynE$). A: samples taken at 22 h; B: samples taken at 40 h; C: samples taken at 60 h.

二糖或木寡糖的转运。

相比野生型菌株 N16-5, 缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 在以木聚糖为唯一碳源的培养基中生长时对数期明显延迟, 且最终生物量比野生型略低, 培养

过程中出现了明显的还原糖的累积与消耗的过程; *xynE* 基因的回补菌株恢复了野生型表型, 培养过程中未出现明显的还原糖的累积与消耗过程, 且最终生物量比野生型菌株略高, 这可能是 *xynE* 基因通过

回补载体转化缺失型菌株之后提高了 *xynE* 基因的拷贝数, 增强了回补菌株底物转运能力的原因。这

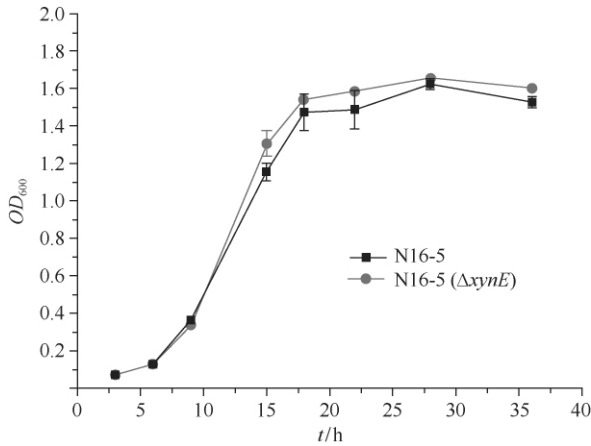


图 5. 野生型菌株 *Bacillus* sp. N16-5 和缺失型菌株 *Bacillus* sp. N16-5 ($\Delta xynE$) 木糖培养基生长曲线

Figure 5. Growth curve of strains *Bacillus* sp. N16-5 and *Bacillus* sp. N16-5 ($\Delta xynE$) on xylose.

说明, *xynE* 基因缺失表型确是由于 *xynE* 基因功能缺失引起, 而不是基因片段敲除导致的转录极性效应所致, XynE 所属的 ABC 转运蛋白在菌株 N16-5 吸收利用木聚糖降解产物过程中起着重要的作用。

HPLC 检测分析木聚糖培养基培养过程中各时间点样品组成的结果显示, 相比野生型菌株, 缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 在培养 16 h 后出现明显的木四糖、木三糖和木二糖等寡糖的积累, 直至 60 h 后仍有较大量的木二糖存在。这说明, XynE 蛋白可能与木四糖、木三糖和木二糖等木寡糖结合, 其所属 ABC 转运蛋白可能特异性转运木聚糖部分降解产生的木寡糖。为分析 XynEFG 转运蛋白是否参与单糖木糖的转运, 我们检测了野生型菌株和缺失型菌株 N16-5 ($\Delta xynE$) 在以木糖为唯一碳源的培养基中的生长情况, 结果显示缺失型菌株生长趋势与野生型基本一致, 并未出现对数期的延迟现象。由此推测, XynEFG 转运蛋白主要特异性转运木二糖与木

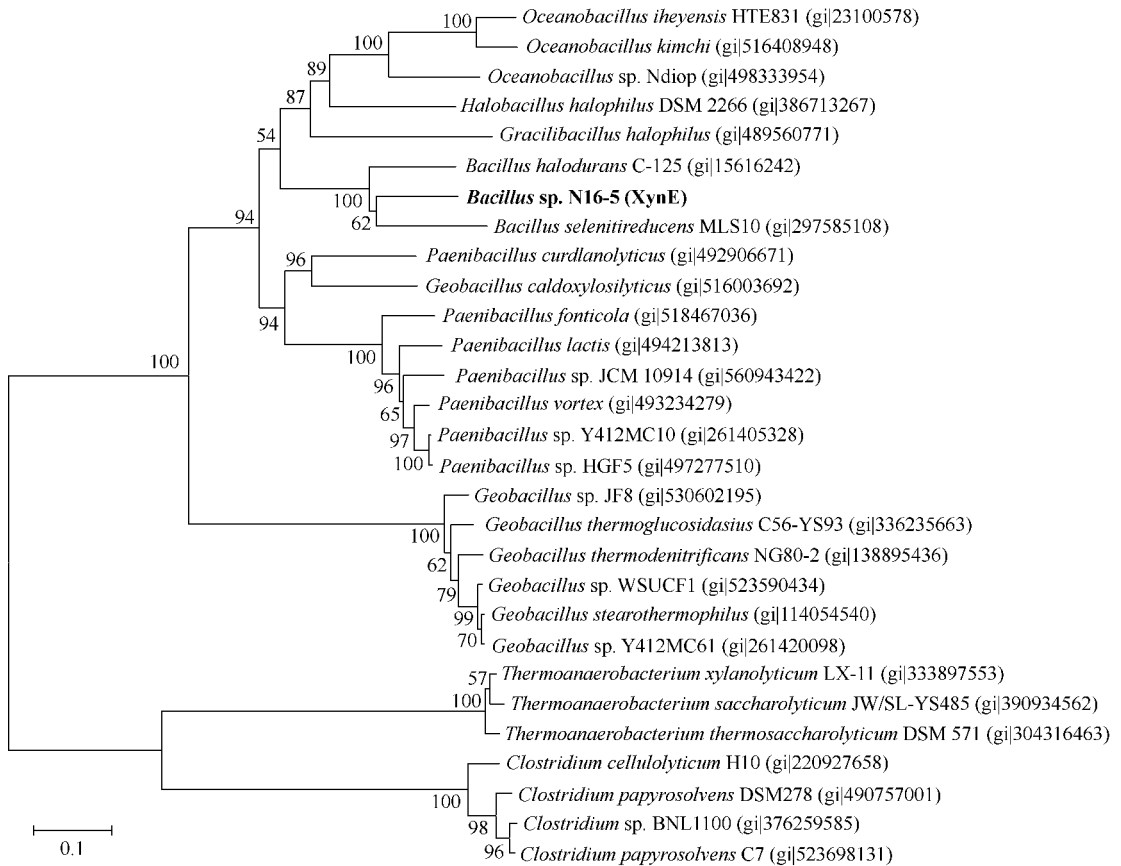


图 6. 不同种属细菌来源的 XynE 蛋白相似序列 Neighbor-Joining 进化树

Figure 6. Consensus NJ phylogenetic tree based on the amino sequences similar to XynE derived from various genus or species. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The numbers at each branch points is the percentages supported by bootstrap. Bar, 10% divergence.

三糖和木四糖等寡糖。菌株 N16-5 可能利用基因组上其他的转运蛋白来转运吸收木糖。

综合以上论述,我们推断 XynE 蛋白主要特异性结合木寡糖或木二糖,*xynE* 基因的缺失造成菌株 N16-5 不能有效吸收利用木聚糖降解产物木寡糖或木二糖,使菌株生长变慢。嗜碱芽孢杆菌 N16-5 利用木聚糖的方式可能是通过分泌有限的木聚糖酶部分降解木聚糖后,降解产物木寡糖或木二糖被 XynE 所属 ABC 转运蛋白转运吸收至胞内,再在胞内水解酶的作用下被完全水解成单糖,参与戊糖代谢。基于 XynE 相似蛋白的氨基酸序列构建的系统发育树表明,来源于同一属、具有类似生理特性(耐盐、耐热、兼性厌氧或厌氧)的菌株的蛋白序列聚类成簇。这说明,*xynE* 基因在进化过程中与菌株协同进化,类似某些细菌通过基因水平转移或是复制获得转运蛋白 [18-19],环境中不同属的细菌之间可能通过基因的水平转移获得了该基因的功能。虽然已报道的与木寡糖转运相关的转运蛋白较少,但该类蛋白广泛存在,这为我们认识微生物利用木聚糖的方式提供了新的线索。

参考文献

- [1] de Vries RP, Visser J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65 (4): 497-522.
- [2] Juhasz T, Szengyel Z, Reczey K, Siika-Aho M, Viikari L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (11): 3519-3525.
- [3] Jiang Z-Q, Deng W, Li L-T, Ding C-H, Kusakabe I, Tan S-S. A novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*. *Biotechnology Letters*, 2004, 26 (5): 431-436.
- [4] van Dyk JS, Sakka M, Sakka K, Pletschke BI. The cellulolytic and hemi-cellulolytic system of *Bacillus licheniformis* SVD1 and the evidence for production of a large multi-enzyme complex. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45 (5): 372-378.
- [5] Zhang Y-HP, Lynd LR. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (20): 7321-7325.
- [6] 马延和. 嗜碱芽孢杆菌 N16-5 碱性甘露聚糖酶的研究. 江南大学博士学位论文, 2005.
- [7] Davidson AL, Chen J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 241-268.
- [8] Schneider E. ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Research in Microbiology*, 2001, 152 (3): 303-310.
- [9] Shulami S, Zaide G, Zolotnitsky G, Langut Y, Feld G, Sonenshein AL, Shoham Y. A two-component system regulates the expression of an ABC transporter for xylo-oligosaccharides in *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (3): 874-884.
- [10] Tsujibo H, Kosaka M, Ikenishi S, Sato T, Miyamoto K, Inamori Y. Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (4): 1029-1037.
- [11] Connelly MB, Young GM, Sloma A. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (13): 4159-4167.
- [12] Gao C, Xue Y, Ma Y. Protoplast transformation of recalcitrant alkaliphilic *Bacillus* sp. with methylated plasmid DNA and a developed hard agar regeneration medium. *PLoS One*, 2011, 6 (11): e28148.
- [13] Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothhaft H, Saier MH, Titgemeyer F. In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (5): 1362-1373.
- [14] Connors SB, Montero CI, Comfort DA, Shockley KR, Johnson MR, Chhabra SR, Kelly RM. An expression-driven approach to the prediction of carbohydrate transport and utilization regulons in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (21): 7267-7282.
- [15] Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu C-Y, Roseman S, Schoolnik GK. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (8): 2524-2529.
- [16] Servinsky MD, Kiel JT, Dupuy NF, Sund CJ. Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology*, 2010, 156 (11): 3478-3491.
- [17] VanFossen AL, Verhaart MR, Kengen SM, Kelly RM.

Carbohydrate utilization patterns for the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* reveal broad growth substrate preferences. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (24) : 7718-7724.

[18] Ren Q, Paulsen IT. Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in

prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Computational Biology*, 2005, 1 (3) : e27.

[19] Ren Q, Paulsen IT. Large-scale comparative genomic analyses of cytoplasmic membrane transport systems in prokaryotes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, 12 (3-4) : 165-179.

Characterization of solute-binding protein XynE of the xylooligosaccharide transporter from *Bacillus* sp. N16-5

Zhougang Zhang, Yajian Song, Kai Jiang, Yanfen Xue, Yanhe Ma*

State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The alkaliphilic cellulolytic bacterium *Bacillus* sp. N16-5 was isolated from Lake Wudunao in Inner Mongolia. It has a broad substrate spectrum and exhibits a capacity to utilize complex carbohydrates such as galactomannan, xylan and pectin. Previous transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Bacillus* sp. N16-5 has identified a putative gene cluster related to xylan utilization. It contains a putative xylo-oligosaccharide ATP-binding cassette (ABC) transporter encoded by *xynEFG* gene cluster. **[Objective]** *xynE* gene is predicted to encode an extracellular solute-binding protein of the ABC transporter. Here, the physiological roles of *xynE* on the xylan utilization was investigated by gene deletion. **[Methods]** We obtained the *xynE* deficient strain N16-5 ($\Delta xynE$) through homologous recombination using a temperature sensitive shuttle vector pNNB194. The effects of *xynE* on xylan utilization by N16-5 were detected by comparing the growth profiles on xylan of the wild type and mutant strains as well as the variation of reducing sugars concentration in the medium during cultivation. We further verified the phenotype by constructing the complementary strain. Moreover, the substrate specificity of XynE was illustrated by the HPLC analysis results of the xylan medium components, which was supplemented with the growth profiles of the wild type strain and N16-5 ($\Delta xynE$) strain on xylose. **[Results]** Compared with the wild type strain, strain N16-5 ($\Delta xynE$) had a delayed exponential phase, obtained a lower maximum optical intensity OD_{600} value, and presented the accumulation and depletion of reducing sugars during cultivation. The complementary strain retrieved the phenotype of wild type strain, and grown slightly better than it. HPLC analysis showed that N16-5 ($\Delta xynE$) strain degraded the xylan substrates more slowly than wild type, xylo-oligosaccharides like xylotetraose, xylotriose and xylobiose began to accumulate after 16 h cultivation. Moreover it still maintained a large number of the degradation product xylobiose in the medium after 60 h. When cultured in xylose medium, strain N16-5 ($\Delta xynE$) performed similar growth profile with the wild type strain. **[Conclusion]** XynE played an important role in rapidly and effectively utilizing xylan in *Bacillus* sp. N16-5 and specifically related with xylo-oligosaccharide uptake.

Keywords: alkaliphilic bacterium, xylan utilization, xylooligosaccharide transporter

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CBA00805) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA022100)

* Corresponding author. Tel: +86-40 64807618; Fax: +86-40 64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

Received: 8 May 2014/Revised: 10 July 2014