

生孢噬纤维粘菌基因文库的构建和纤维素酶基因的克隆*

张立新 (中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

刘纯强 蒯 军 高培基 (山东大学微生物研究所, 济南 250100)

【摘要】 将生孢噬纤维粘菌(*Sporocytophaga* B29)染色体用 PstI 部分酶切后, 连接到大肠杆菌(*E. coli*)质粒载体 pUC8 上, 然后转化 *E. coli* JM83, 从而建立了 B29 的基因文库, 并筛选一个含有内切葡聚糖纤维素酶(CMCase)的阳性克隆. 从此阳性克隆中提取质粒再转化 JM83, 发现所有的氨苄青霉素抗性(Ap^r)转化子都具有 CMCase 酶活性, 证明在大肠杆菌中克隆到一个 B29 的内切葡聚糖酶基因.

关键词 基因工程生态学 生孢噬纤维粘菌基因文库 CMCase 基因克隆

Construction of *Sporocytophaga* B29 gene library and cloning of CMCase gene. Zhang Lixin (Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015), Liu Chun-qiang, Kuai Jun and Gao Peiji (Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 1994, 5(2): 156—158.

An endoglucanase (CMCase) gene from *Sporocytophaga* B29 was cloned in *Escherichia coli* JM83. The chromosomal DNA of B29 was partially digested with restriction enzyme PstI and ligated into the plasmid pUC8 that had been linearized with the same enzyme. After transformation of JM83, the gene library of B29 was constructed and an endoglucanase-positive clone was detected *in situ*. All transformants with Ap^r had the activity of CMCase, proving that what we cloned was a CMCase gene.

Key words Genetic engineering ecology, *Sporocytophaga* B29 gene library, CMCase gene clone.

1 引言

基因工程生态学研究^[3]作为应用生态学的一个分支, 目前已成为最活跃、进展最快的领域之一. 它利用基因工程手段使生物物种带有新的稳定遗传的生物学性状, 这对丰富生物多样性, 促进经济建设都具有重要意义.

纤维素资源是自然界中分布最广, 数量最多的一类可再生资源, 但在天然条件下, 能直接分解利用纤维素做碳源的微生物却很少. 自 1981 年以来, 纤维素酶基因克隆的研究进展很快, 已陆续从 20 几种细菌和 6 种真菌中克隆到了纤维素酶系基

因, 其中 20 多种纤维素酶基因已进行了序列测定^[1]. 生孢噬纤维粘菌 B29 是山东大学微生物研究所分离得到的一株纤维素分解菌, 可将纤维素底物转化为粘多糖, 具有潜在的应用价值. 生孢噬纤维粘菌 B29 纤维素酶基因的克隆将有助于对纤维素酶作用机制的研究, 有助于纤维素酶基因工程生态学的研究, 并可为构建高效纤维素工程菌提供基础.

2 材料与方法

2.1 菌种和质粒

* 国家自然科学基金资助项目.

1993 年 8 月 12 日收到, 1994 年 1 月 26 日改回.

Sporocytophaga B29 和 *E. coli* JM83 分别作为基因供体菌和受体菌。质粒 pUC8 是从 *E. coli* HB101 中纯化得到,其上有含 PstI 酶切位点的 Lac Z 基因和 Ap^r,为基因载体。

2.2 培养基

2.2.1 LB 培养基(g · L⁻¹) 蛋白胨(Oxoid) 10; NaCl 5;酵母浸出汁(华美)5;pH7.0-7.2。

2.2.2 羧甲基纤维素(CMC)琼脂培养基 LB 培养基+0.4%CMC+1.5-2.0%琼脂。

2.2.3 MacConkey Ap 培养基 MacConkey 合成培养基+50μg · ml⁻¹氨苄青霉素。

2.3 试剂 限制性核酸内切酶 Pst I, Hind III, RNA 酶和蛋白酶 K 等均来自华美公司。

2.4 试验方法

碱性磷酸酯酶处理,连接反应,感受态细胞的制备采用 Maniatis 等人的方法^[3]。B29 染色体 DNA 片段分离收集采用透析袋琼脂糖凝胶电泳洗脱法^[4]。试验中所采用的其它方法^[5,9]略有改进。含有 CMCase 克隆子的检测方法见文献^[6]。

3 结 果

3.1 生孢噬纤维粘菌基因文库的构建

从 B29 中提取染色体 DNA 后,用 Pst I 进行部分酶切。然后,通过透析袋琼脂糖电泳法分离收集 4-17kb 的染色体 DNA 片段。

质粒 pUC8 经 Pst I 完全酶切后,再用碱性磷酸酯酶脱磷。在连接反应中,部分酶切的 B29 片段和 pUC8 按 1:2 的比例混合。以 JM83 为受体,在含有氨苄青霉素 Ap(50μg · ml⁻¹)的 MacConkey 平板上筛选转化子^[2]。由于 Pst I 位于 pUC8 LacZ 基因内部,外源 DNA 片段的插入可导致 Lac Z 基因的失活,因而在 MacConkey 平板上不能形成红色菌落。由于受体菌 JM83 对 Ap 敏感,在 MacConkey+Ap 平板上不能生长,所以在此选择性平板上长出的白色菌落即为含重组质粒的转化子。实验发现在 MacConkey Ap 平板上生长的菌落里,白色菌落占 80%以上,表明经碱性磷

酸酯酶处理后,载体 DNA 的自身环化率低于 20%(表 1)。

表 1 转化结果

Table 1 The results of transformation

No. 序号	处 理 Treatment	在 MacConkey Ap 平板上生长 Grow on MacConkey Ap plate
1	0.1ml JM83	不能生长 Can't grow
2	0.1ml JM83+3μl pUC8	所有菌落都变红 All of the colonies turned red
3	0.1ml JM83 + 0.1ml 连接液 (Ligated mixture)	85% 变白, 15% 变红, 85% were white, 15% were red

从以上 MacConkey 平板上挑取 3 000 个白色菌落作为 B29 的基因文库。假定 B29 的染色体 DNA 大小与 *E. coli* 相当(4 200kb),而插入的外源 DNA 片段平均大小为(4+17)÷2=10.5(kb)。根据 Clark 和 Carbon 法^[6]可算得从此基因文库中得到任何特定 B29 基因的机率(P)大于 95%。为了进一步验证此基因文库的可靠性,再随机挑选 10 个转化子,进行质粒快速提取和凝胶电泳分析,发现这些质粒大小各不相同,而且都在 7.0kb 以上,说明它们都带有不同大小的 DNA 片段。由此可见,此基因文库符合要求。整个基因文库的构建和纤维素酶克隆过程如图 1 所示。

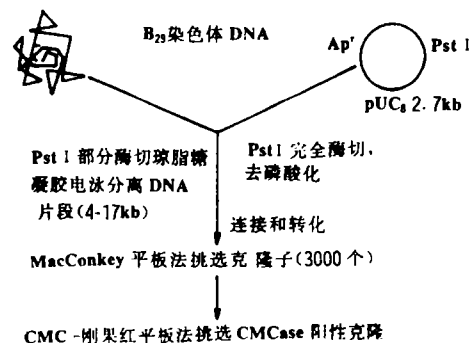


图 1 B29 的 CMCase 基因克隆过程

Fig. 1 Outline map of CMCase cloning of B29.

3.2 含 CMCase 基因克隆的筛选

将以上基因文库的 3000 个菌落分别点种在都含有 Ap(50μg · ml⁻¹)的 CMC 平

板上和 LB 平板上. 37℃ 培养 48 小时后, 用刚果红法检测到两个能形成黄色透明圈的阳性克隆. 质粒提取和 Pst I 酶切分析表明它们为同一重组质粒, 命名为 pED6. pED6 经 Pst I 切割后产生两条带, 一条为 2.7kb 的 pUC8 质粒带, 另一条为 5.0kb 的外源 DNA 片段. 将质粒 pED6 重新转化 JM83, 发现所有的 Ap^r 转化子对 CMC-刚果红染色均呈阳性, 验证 pED6 确实带有 CMCase 基因(图 2).

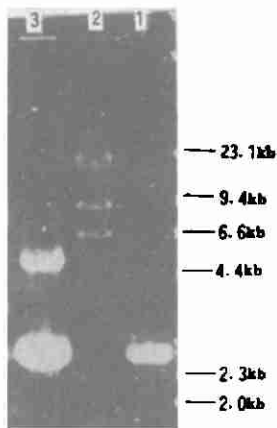


图 2 pED6 被 Pst I 酶切的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of pED6 digested with Pst I.

1. Pst I 酶切的 pUC8 pUC8 digested with Pst I, 2. Hind III 酶切的 λDNA 片段 DNA marker digested with Hind III, 3. Pst I 酶切的 pED6 pED6 digested with Pst I.

4 讨 论

4.1 CMCase 基因克隆的生态学意义

生孢噬纤维粘菌虽然分解纤维素底物的能力很强, 但其生长周期(1周)缓慢. CMCase 基因在 *E. coli* 中克隆和表达的成功, 预示着基因工程菌能快速产生纤维素酶. 尽管克隆子的纤维素酶分解活力只是生孢噬纤维粘菌的 10%, 但可采用更换强启动子等方法增强其表达量. 由于分解纤维素这一特性并不是大肠杆菌通过长期遗

传进化和自然选择过程而获得的. 因而, 这一工程菌真正投入应用之前, 还应对其生态学行为做深入研究.

4.2 基因载体的选择

构建基因文库时一般都采用 λ 噬菌体或 Cosmid 质粒做载体, 在本实验起初也尝试过, 但效果不理想. 分析其原因可能是受体菌在外源质粒大小超过 20kb 时, 转化和表达效率都受到了影响. 因此选用 pUC8 做转化载体, 并把外源插入 DNA 片段大小定在 4—17kb 范围内, 可得到克隆子.

4.3 纤维素酶的多基因性

我们曾用 Hind III 部分酶切 B29 染色体片段, 并克隆到一个含 CMCase 基因的 DNA 片段, 经亚克隆分析还发现, 该基因内部还含有一个 Pst I 酶切位点, 而且用 Pst I 酶切后即可破坏 CMCase 基因的表达活性. 从 Pst I 酶切 pED6 的结果看, CMCase 基因的 DNA 片段内部不再含有 Pst I 酶切位点, 这是一个新克隆到的 CMCase 基因, 并可推论出, 在生孢噬纤维粘菌体内, CMCase 基因不止一个.

致谢 承蒙王书锦研究员指导, 特此致谢.

参考文献

- [1] 刘纯强等. 1991. 纤维素酶基因克隆的新进展. 生物工程进展, 11(3): 8—15.
- [2] 汪天虹等. 1991. 黄单胞菌 β-葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. 遗传, 13(3): 16—20.
- [3] 闻大中. 1992. 基因工程生物的生态影响及其评价. 应用生态学报, 3(4): 371—377.
- [4] 彭秀玲等. 1986. 基因工程实验技术. 湖南科学技术出版社, 长沙.
- [5] Beguin, P. et al. 1987. Cloning of cellulase genes. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 6(2): 129—162.
- [6] Clarke, L. and Carbon, J. 1976. A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, 9: 91—99.
- [7] Maniatis, T. et al. 1982. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, NY, USA.