

## 棉花黄萎病真菌 *Verticillium dahliae* 木聚糖酶基因的克隆、表达和酶学性质分析

张桂敏<sup>1</sup>, 饶犇<sup>1</sup>, 叶戈<sup>1</sup>, 马立新<sup>1</sup>, 张先恩<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

(<sup>2</sup>中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

**摘要:** 【目的】从棉花黄萎病真菌 *Verticillium dahliae* 中克隆木聚糖酶基因, 并在毕赤酵母中进行异源表达, 研究酶学性质。【方法】通过多序列比对设计简并引物, 扩增出真菌 *V. dahliae* 木聚糖酶基因片段, 再采用基因组步行 PCR 技术获得全长木聚糖酶基因序列。经 BLAST 比对并结合 GT-AG 原则分析, 该基因含有一个大小为 63 bp 的内含子, 利用 *DpnI* 介导的缺失方法对内含子的全长木聚糖酶基因进行剪接, 获得该基因的全长 cDNA。将克隆到的 cDNA 在毕赤酵母 GS115 进行了表达, 重组酶经纯化后进行酶学性质分析。【结果】BLAST 比对显示, 该 cDNA 推测的氨基酸序列和已知木聚糖酶的最高一致性为 72%。测得该酶最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 值为 6, 在 pH5-9 维持 50% 以上的活性, 对山毛榉材木聚糖具有最好的水解效果。Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对酶有激活作用, 分别提高了 33.7% 和 16.6%, EDTA,  $\beta$ -巯基乙醇和 NaN<sub>3</sub> 对酶的活性基本没有影响, Tween-80 和 DMSO 使酶活性提高了 28.4% 和 12.8%。【结论】本文从引起棉花黄萎病的真菌 *V. dahliae* 中克隆到的木聚糖酶基因是在 GenBank 上登录的第一个来自棉花黄萎病真菌的木聚糖酶基因序列。本文所用的克隆方法可以高效的从植物病原真菌和白腐真菌克隆只含一个内含子的 11 家族的新木聚糖酶基因, 避免了摸索原始菌株酶表达诱导条件, 检测酶的活性等繁琐的操作。酶学性质分析显示该酶在低聚木糖的制备, 面包改良上有潜在的应用价值。

**关键词:** 木聚糖酶; *Verticillium dahliae*; 毕赤酵母; 基因组步行 PCR; 简并引物

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0765-07

木聚糖是植物半纤维素的主要成份, 是除纤维素之外自然界中最为丰富的多糖, 也是自然界中最为丰富的可再生资源之一。木聚糖酶就是可打开木聚糖分子中  $\beta$ -1, 4 木糖苷键的酶, 在造纸制浆、食品、纺织、饲料、能源工业中具有广阔的应用前景。在造纸工业, 利用木聚糖酶作为纸浆漂白助剂不仅可以提高纸张的白度和强度, 而且可以减少氯的用量, 从而降低生产成本, 减轻对环境的污染<sup>[1-2]</sup>; 另外, 采用木聚糖酶脱除废纸中的油墨, 可以提高纸张白度, 克服化学

方法造成的环境污染<sup>[2]</sup>。在饲料行业, 添加到饲料中的木聚糖酶通过水解木聚糖可缓解木聚糖在饲料中的抗营养作用, 促进动物对营养的吸收<sup>[3]</sup>。在食品工业, 应用木聚糖酶加工面包食品, 可以水解面粉中的木聚糖产生木寡糖, 从而改善面包的质地、结构和松软度<sup>[4]</sup>。另外, 木聚糖酶还可应用于酿造行业<sup>[5]</sup>, 甚至有报道木聚糖酶可以用来生产生物燃料, 缓解能源紧张的问题<sup>[6]</sup>。

但是, 木聚糖酶要实现有效应用, 要求木聚糖酶

基金项目: 国家自然科学基金(30600014); 武汉市科技攻关项目(200760423162)

\*通讯作者。Tel: +86-27-87197105; E-mail: zhangxe@most.cn

作者简介: 张桂敏(1976-), 女, 湖北襄樊人, 讲师, 博士, 主要从事微生物与分子酶学方面的工作。E-mail: zhangguimin@hubu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-13; 修回日期: 2008-02-20

具有良好的酶学性质,在不同领域的应用要求木聚糖酶具有不同酶学性质。这就要求要有不同来源具有不同性质的木聚糖酶。木聚糖酶的来源相当广泛,在海洋及陆地细菌、海洋藻类、真菌和反刍动物瘤胃、甲壳动物、陆地植物组织和各种无脊椎动物中都存在。常规构建木聚糖酶基因工程菌的做法是先检测原始出发菌株能产生木聚糖酶,再从中克隆基因,最后异源表达<sup>[7-10]</sup>。本文是基于植物病原真菌能侵染植物组织,必然可以产生降解木质纤维素的酶系,所以不摸索酶表达的诱导条件,不检测酶的活性,直接克隆基因,异源表达后再研究酶的性质。所述的木聚糖酶基因是从一种能引起棉花黄萎病的真菌 *Verticillium dahliae* 中克隆到的,在 GenBank 上尚无来自引起棉花黄萎病真菌的木聚糖酶基因序列。因此,我们将该木聚糖酶基因在毕赤酵母进行了异源表达,研究了重组酶的性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:**大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL10-Gold 为本实验室保存;棉花黄萎病真菌 *Verticillium dahliae* HB183 由华中农业大学植科院植物病理实验室获得;毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**限制性内切酶、T4DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、One-step ligation kit, Ex-Taq 酶、4 种 dNTP、DNA 分子量标准  $\lambda$ /Eco14 和  $\lambda$ /HindIII 购自 TaKaRa 公司;燕麦木聚糖 (Oatspelt xylan)、桦木木聚糖 (Birchwood xylan)、山毛榉材木聚糖 (Beechwood xylan) 购自 Sigma 公司;蔗渣木聚糖和玉米芯木聚糖的制备分别参看文献[11]和[12], YNB 购自上海生工生物工程有限公司;DNA gel extraction kit 购自 V-gene 公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。梯度 PCR 仪购自日本 TaKaRa; BIOCHIMI 凝胶成像系统购自 UVP 公司;小型台式离心机采用德国 Eppendorf 5415D 型。

**1.1.3 培养基:**LB、YEPD、MD、BMGY、BMMY 见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

### 1.2 引物

**1.2.1 简并引物的设计:**根据 GenBank 上已有真菌木聚糖酶的氨基酸序列,寻找到两段同源区域 GKGWNP 和 EGYQSSG,再根据密码子的简并性和

密码子在已知木聚糖酶基因中出现的频率,设计简并引物 fu1: 5'-GG(A/C)AAGGG(A/T)TGGAACCC-3' 和 fu2: 3'-CTCCC(A/G/T)AT(G/A)GT(T/C)TCGTC(G/A)CC-5'。PCR 反应循环条件为: 95℃, 5 min; 95℃, 30 s, 54℃, 30 s, 72℃, 40 s, 30 个循环; 72℃, 7 min。

**1.2.2 基因组步行引物:**根据已获得的木聚糖酶基因的片段和基因组步行 PCR (Clontech 公司产品说明书)引物设计原则,设计 2 对基因特异性引物 VD left1: 3'-TTCACCAAGACGTACCACTGCCGCGGCG-5', VD left2: 3'-TAGACCATCATCACGCGCGGCTCCAAGT-5' 和 VD right1: 5'-AGTACTCGATCAGGGGGT-TGCGGGTCCA-3', VD right2: 5'-CGTGGTCTGAA-GGAGGGTGTAGTGGGTGGA-3'; 用于基因组步行 PCR 获得基因两端的序列。

### 1.3 内含子的剪接

根据两个外显子的序列,设计 Dpn I 介导的定点缺失引物 AI: 5'-AGGGTTGGAACCCCGGCACTG-GCCGCACCATCAACTACGGAGGTTTCGTTTC-3' 和 BI: 5'-GAACGAACCTCCGTAGTTGATGGTGCAGT-GCCGCGGGGTTCCAACCCT-3', 以质粒 pHBM126 为模板,进行 PCR 扩增,扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 68℃ 3 min 40 s, 16 个循环; 4℃ 2 min。回收 PCR 产物用 Dpn I 消化去除模板后,酶解产物转化大肠杆菌 XL10-Gold。

### 1.4 表达载体构建

根据基因的序列设计表达引物 VD<sub>1</sub>: 5'-GTCAT-GGTCTCGTTCAAGTCTCTTCTTC-3' 和 VD<sub>2</sub>: 3'-GC-TCTGCACCAAACGACTACCGG-5', 引物的 5' 端分别加上 Cpo 和 Not 的粘性末端,以质粒 pHBM126-m 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 7 min。胶内回收 PCR 产物用 T4DNA 聚合酶和 dTTP 处理后,和用 Cpo 和 Not 双酶切的毕赤酵母表达载体 pHBM905<sup>[13-15]</sup>连接,转化大肠杆菌 XL10-Gold。

### 1.5 分子生物学操作

真菌总 DNA 的抽提按照文献[16]。常规分子操作,大肠杆菌转化等见文献[17]。重组子快检方法见文献[18]。毕赤酵母的转化、外源基因在毕赤酵母中的诱导表达参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

### 1.6 木聚糖酶的纯化

发酵上清液用 30%~70% 饱和度的硫酸铵梯度沉淀后,4℃, 10750 × g 离心 10 min 去掉上清,蛋白沉

淀用 0.1 倍体积 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 6)溶解。溶解蛋白用同样的缓冲液透析去盐后,过阳离子交换树脂(CMC Biosephar Fast Flow,上海安星生产),填充物用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6)平衡,用含 0~1.0 mol/L NaCl 的同样缓冲液梯度洗脱。

### 1.7 木聚糖酶活力的测定

制备 10 g/L 的木聚糖溶液,取 2.4 mL 加入 0.1 mL 的酶液,反应 10min 后,迅速转入沸水中终止反应。取酶解液 0.5 mL,双蒸水 0.5 mL, DNS 试剂<sup>[19]</sup>0.75 mL 混匀在沸水浴中加热 5 min,立即置于冰水中冷却,补加 10.75 mL 双蒸水混匀,测  $OD_{520}$  值。同样体系以不同浓度的木糖做标准曲线,以每 min 生成 1  $\mu$ mol 还原糖所需酶量作为 1 个酶活力单位(U)。

### 1.8 酶学性质分析

测定酶反应最适温度,按“1.7 节”所述反应体系,以桦木木聚糖为底物,在不同温度下反应 10 min,测定酶活性;测定酶反应最适 pH,用不同 pH 的缓冲液配置桦木木聚糖溶液作为底物,稀释酶液至适当浓度,按 1.7 所述反应体系在最适温度下反应一定时间后,用 DNS 法测还原糖。用到 4 种不同的 0.05 mol/L 的缓冲体系: HAc-NaAc (pH 3.0~5.8), 磷酸缓冲液 (pH 5.8~7.5), Tris-HCl (pH 7.5~8.6) 和甘氨酸-NaOH (pH 8.6~9.6)。实验重复 3 次,实验数据用 Microsoft Excel (Office 2000) 分析。测定金属离子和有机溶剂对酶活性的影响时,按 1.7 所述反应体系,在其中分别加入不同的金属离子至终浓度 5 mmol/L,有机溶剂 0.5% (W/W),用不加的作为 100% 对照,金属离子和有机溶剂对酶活性的影响用和对照相比的百分数表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 木聚糖酶基因片段的获得

抽提棉花黄萎病真菌 HB183 的总 DNA,以简并引物 fu1, fu2 进行 PCR 扩增,扩增出一条与预计大小相符的 450 bp 左右的带,与载体 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌后进行测序,测序结果经软件 Genetool 分析,推测的部分氨基酸序列通过 BLAST 比对,属于糖基水解酶 11 家族,且在不同读框翻译的序列中有两个高度保守的谷氨酸(因为中间有内含子),这说明所得片段确为木聚糖酶基因片段。BLAST 比对还发现推测的部分氨基酸序列和来源于 *Cochliobolus carbonum* 的 Xyl2 前体<sup>[20]</sup>(GenBank 收录号 U58915) 的部分氨基酸序列有 82% 的一致性,这暗示着得到的

核苷酸片段编码一个新的木聚糖酶片段。

### 2.2 棉花黄萎病真菌的菌种鉴定

以棉花黄萎病真菌 HB183 的总 DNA 为模板,以引物 ITS1, ITS4<sup>[16]</sup>进行 PCR 扩增,扩增出一条 500 bp 左右的带,凝胶回收后与载体 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌,重组子经鉴定后进行测序,测序结果通过 BLAST 比对,和 3 个 *Verticillium dahliae* 18S rDNA 基因的部分序列(GenBank 收录号分别为 AJ865691, AF104926, AJ970308)有 100% 的一致性,和 2 个 *Verticillium dahliae* 18S rDNA 基因的部分序列(GenBank 收录号分别为 EF015891 和 AF108478)有 98% 的一致性,和 2 个 *Verticillium albo-atrum* (GenBank 收录号分别为 AF108476, AB353342) 18S rDNA 基因的部分序列分别有 98% 和 93% 的一致性。另外,该菌在 30 生长良好,显微镜检分生孢子为长卵圆形,根据文献[21]中有关 *Verticillium dahliae* 和 *Verticillium albo-atrum* 区别的报道,该菌株不是 *Verticillium albo-atrum*。因此将棉花黄萎病真菌 HB183 鉴定为 *Verticillium dahliae*。

### 2.3 基因组步行 PCR 法克隆木聚糖酶基因的全长序列

通过获得的木聚糖酶基因片段的序列,设计基因特异性引物 VD left1, VD right1, VD left2, VD right2。先以 *Verticillium dahliae* 的基因组步行文库为模板,用 adaptor 引物 AP1(序列见 Clontech 公司基因组步行 PCR 说明书)分别和基因特异性引物 VD left1, VD right1 进行左向和右向首轮 PCR,PCR 条件为: 94 , 2 min; 94 , 5 s, 72 , 3 min, 7 个循环; 94 , 5 s, 67 , 3 min, 32 个循环; 72 , 7 min, 再将首轮 PCR 产物稀释 50 倍后作为模板,以 adaptor 引物 AP2(序列见 Clontech 公司基因组步行 PCR 说明书)分别和基因特异性引物 VD left2, VD right2 进行次轮 PCR,PCR 条件为: 94 , 2 min; 94 , 5 s, 72 , 3 min, 5 个循环; 94 , 5 s, 67 , 3 min, 20 个循环; 72 , 7 min, 将扩增的带回收后与 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌,重组子经鉴定后进行测序,测序结果显示所扩增的片段包含木聚糖酶基因两端序列,将所得的 3 个片段拼接,得到木聚糖酶基因全长和侧翼序列。通过软件 Genetool 发现 ORF,设计引物 VD<sub>1</sub> 和 VD<sub>2</sub>,以棉花黄萎病真菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到一条 800 bp 左右的带。将该片段与 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌,重组子 pHBM126 测序后,网上进行 BLAST 比对,该片段确为木聚糖酶全长基因。

## 2.4 木聚糖酶基因的序列分析

通过和 11 家族其它木聚糖酶基因的比较, 该序列携带的木聚糖酶结构基因的编码区序列全长为 815 bp, 含有一个内含子, 符合“GT...AG”原则, 其大小为 63 bp, 和其它丝状真菌内含子大小相似, 一般在 36–256 bp 之间<sup>[22]</sup>。该基因起始密码子的上游-300 处有启动子的 CACT, -95 处有 TATA, 起始密码子-3 不为 A, +4 为 G。将该基因序列提交 GenBank, 登录号为 DQ157736。

## 2.5 木聚糖酶基因 cDNA 的获得

按 1.3 所述, 所得 PCR 产物用 *DpnI* 消化去除模板后, 酶解产物转化大肠杆菌, 所得转化子用引物 VD<sub>1</sub> 和 VD<sub>2</sub> 进行菌落 PCR 验证, 获得拼接正确的 cDNA, 对应的质粒命名为 pHBM126-m, cDNA 命名为 *xynG*。

## 2.6 推测氨基酸的序列分析

GeneTool 软件分析该基因含有一个 758 bp 的开放阅读框, 对应氨基酸用 Signal P 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析含有一个 19 个氨基酸的信号肽。通过 PEPTOOL 工具分析, 该木聚糖酶成熟蛋白计算的分子量为 25.5 kDa, 等电点为 8.4; 含有 29.9% 的 $\beta$ -折叠, 12.6% 的 $\alpha$ -螺旋; 具有 11 家族糖基水解酶的两个高度保守的特征序列: 123~135 (NPLIEYYVVESYG), 214~227 (IVATEGYQSSGSSD), 含有一个潜在 N-糖基化位点 NIT。BLAST 比对和来源于 *Cochliobolus carbonum*<sup>[20]</sup> (GenBank 收录号, U58915) 和 *C. sativus*<sup>[23]</sup> (GenBank 收录号, AJ004802) 的木聚糖酶一致性为 72%, 同源性最高; 分别与来源于 *Setosphaeria turcica*<sup>[24]</sup> (GenBank 收录号, AJ548879) 和 *Helminthosporium grisea* (GenBank 收录号, AF155594, 未发表) 的内切-1, 4-木聚糖酶分别有 70% 和 68% 的一致性; 和来源于 *H. insolens*<sup>[25]</sup> (GenBank 收录号, X76047)、*Gibberella zeae* (GenBank 收录号, AY289919, 未发表) 和 *Fusarium oxysporum*<sup>[26]</sup> (GenBank 收录号, AF246831) 的内切-1, 4-木聚糖酶有 67% 的一致性。

## 2.7 毕赤酵母表达载体的构建和重组毕赤酵母的筛选

按 1.6 所述将基因 *xynG* 克隆到毕赤酵母表达载体 pHBM905 上, 获得重组质粒 pHBM183。将质粒 pHBM183 用 *Sal* 线性化去掉氨苄青霉素抗性基因后转化毕赤酵母 GS115, 转化子点接于含交联木聚糖的 BMMY 平板上, 在培养皿盖上加甲醇诱导 (每 12 h 补加一次) 24 h 后, 菌落周围有明显的水解圈出现。

## 2.8 重组酶 XYNG 的诱导表达与酶学性质研究

将产生最大水解圈的重组菌株按高密度摇瓶培养方式在 25 °C 条件下诱导产酶, 所得粗酶液测得酶活为 62U/mL, 用 30%~75% 硫酸铵梯度沉淀, 离子交换纯化后 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示(图 1)重组酶分子量大约为 23 kDa, 比预计的 25.5 kDa 偏小, 这可能是由于 SignalP 预计的信号肽大小比实际信号肽小所致。

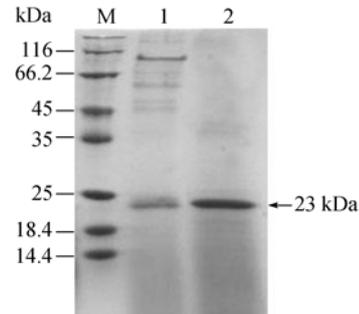


图 1 重组木聚糖酶的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1 Test of recombinant xylanase by SDS-PAGE. M. Protein marker; 1. Crude xylanase of fermentation supernatant; 2. Purified xylanase.

以 1% 的桦木木聚糖为底物, 分别在不同的温度测定酶活力, 测得其最适反应温度为 45 °C, 在 35 ~50 °C 范围内酶活力均较高。

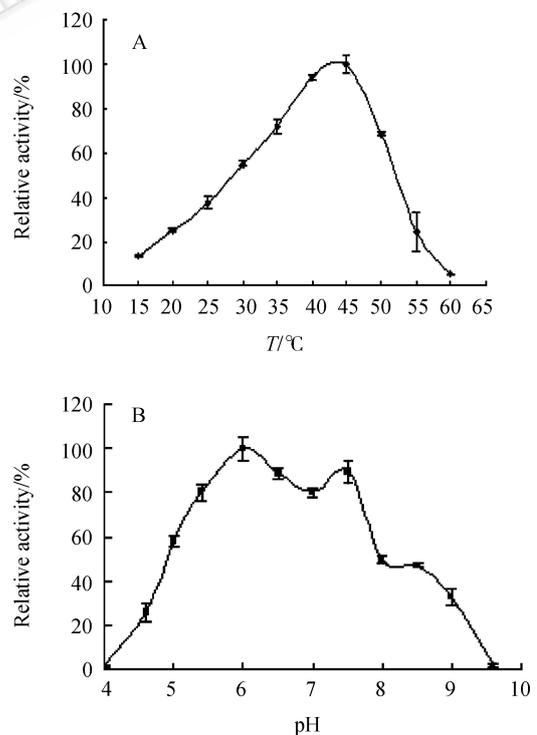


图 2 温度(A)和 pH(B)对重组 XynG 活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature (A) and pH(B) on the xylanase activity of recombinant XynG. Maximum activity is set to 100%. The experiment was performed in triplicates.

之间维持 50% 以上的活性 (图 2-A); 在 45 °C 反应温度下, 测得其最适反应 pH 值为 6, 在 5~8.5 维持 50% 以上的活性, 5.5~7.5 维持 80% 以上的活性 (图 2-B), 在 pH7.5 处出现的峰可能是因为木聚糖在碱性条件下的溶解度更高所致。

在 45 °C, pH 值 6 条件下, 测定该酶的底物特异性, 结果表明 (表 1), 该酶最适作用底物是山毛榉材木聚糖, 对桦木和燕麦木聚糖有同样的特异性。

表 1 木聚糖酶 XYNG 的底物特异性  
Table 1 Substrate specificity of xylanase XYNG

Substrates	Concentration/%	Relative activity /%
Beechwood xylan	1	100.0
Birchwood xylan	1	67.7
Oatspelt xylan	1	67.2
Begasse xylan	1	50.2
Corn fibre xylan	1	0.6
$\beta$ -cyclodextrin	1	5.17
Starch	1	0
Konjac	1	0
Carboxymethyl- cellulose	1	0

用不同的 5 mmol/L 金属离子和 0.5% 的有机溶剂添加到标准反应体系中, 在 45 °C, pH 6 条件下, 测定金属离子和有机溶剂对酶活性的影响。结果显示 (表 2)  $Hg^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  完全抑制了 XYNG 酶的活性; 在有  $Fe^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和 EDTA 存在的情况下, 分别维持 81.1%, 34.9%, 76.8%, 64% 和 82.8% 的相对活性;  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对酶有激活作用, 分别提高了 33.7% 和

表 2 金属离子和化学试剂对 XYNG 活性的影响  
Table 2 The effects of metal ions and chemical agent on XYNG activity

Mental ion or chemical agent	Concentration	Relative activity/%
No addition	0 mmol/L	100.0
$K^+$ (KCl)	5 mmol/L	97.9
$Zn^{2+}$ ( $ZnSO_4$ )	5 mmol/L	34.9
$Fe^{3+}$ ( $FeCl_3$ )	5 mmol/L	81.1
$Mg^{2+}$ ( $MgCl_2$ )	5 mmol/L	133.7
$Mn^{2+}$ ( $MnCl_2$ )	5 mmol/L	64
$Co^{2+}$ ( $CoCl_2$ )	5 mmol/L	76.8
$Hg^{2+}$ ( $HgCl_2$ )	5 mmol/L	10.2
$Cu^{2+}$ ( $CuSO_4$ )	5 mmol/L	2.42
$Ca^{2+}$ ( $CaCl_2$ )	5 mmol/L	116.6
DMSO	0.5%	112.8
EDTA	5 mmol/L	82.8
$NaN_3$	0.5%	100.6
SDS	0.5%	30.5
$\beta$ -mercaptoethanol	0.5%	94.5
Tween-80	0.5%	128.4

16.6%。 $\beta$ -巯基乙醇和  $NaN_3$  对酶的活性基本没有影响, Tween-80 和 DMSO 对酶活性提高了 28.4% 和 12.8%。

### 3 讨论

植物病原真菌和白腐真菌能侵染植物组织, 必然产生可以产生降解木质纤维素的酶系。但是这些酶系在自然环境可表达, 在实验室条件下表达就需要摸索合适的诱导条件。常规克隆真菌木聚糖酶基因需要先在实验室条件下摸索合适的诱导条件, 检测到酶的活性, 最后利用 RT-PCR 克隆到相应的 cDNA<sup>[7, 10]</sup>。但是大多木聚糖酶基因的表达受阻遏和解阻遏的调控, 阻遏物和诱导物对于酶的生成和酶活水平的高低影响较大, 不同的菌种、不同的培养条件, 所产生的酶系差别较大, 甚至有些培养基成分还是木聚糖酶基因表达的阻遏物, 所以利用常规的培养条件, 单一的添加一种底物就不一定能使我们想克隆的基因表达, 这样最后得不到足够丰度的对应 mRNA, 通过 RT-PCR 就扩增不出相应的 cDNA。

本文利用基因组步行 PCR 克隆到内含子的全长木聚糖酶基因后, 以木聚糖为诱导物培养棉花黄萎病真菌, 抽提 RNA, 进行 RT-PCR, 但是却得不到相应的 cDNA, 所以采用了 *Dpn* 介导的缺失用内含子剪接法获得相应的 cDNA。利用这种思路, 基因组步行 PCR 克隆内含子的全长木聚糖酶基因, 再利用 *Dpn* 介导的缺失用内含子剪接法获得相应的 cDNA, 可以高效的从植物病原真菌和白腐真菌克隆只含一个内含子的 11 家族的新木聚糖酶基因, 避免了摸索酶表达的诱导条件, 检测酶的活性等繁琐的操作。*Dpn* 介导缺失的原理是设计引物反向扩增载体, 引物设计时将两个引物的末端引进重叠序列, 这样扩增出来的片段就可以靠末端的重叠连接, *Dpn* 消化的目的是去掉甲基化的模板 DNA, 整个方法的原理见 Stratagene 公司 QuickChange Site-Directed Mutagenesis 试剂盒。本文从引起棉花黄萎病的真菌 *Verticillium dahliae* 中克隆到的木聚糖酶基因就是一个新的木聚糖酶基因, 在 GenBank 上尚无棉花黄萎病真菌的木聚糖酶基因序列的登录。而对其它含多个内含子的木质纤维素降解酶基因的克隆, 则可以将基因组步行 PCR 和我们新近发展的外显子拼接技术<sup>[27]</sup>相结合, 获得相应的 cDNA。

获得大量的新基因必需要进行异源表达, 利用本研究室发展的高通量、定向克隆毕赤酵母表达载

体<sup>[13-15]</sup>可将多个基因进行并行表达,构建不含任何抗生素抗性基因,具生物安全性的基因工程菌,研究重组酶的性质。本文所克隆的木聚糖酶基因在毕赤酵母得到了表达,对重组酶性质的研究显示,该酶有广泛的温度和 pH 作用范围,对山毛榉材木聚糖的降解特异性最好。 $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ 没有显著影响酶的活性,而  $\text{Mg}^{2+}$ 和  $\text{Ca}^{2+}$ 对酶有激活作用,虽然  $\text{Cu}^{2+}$ 和  $\text{Zn}^{2+}$ 抑制酶的活性,但是 EDTA 对该酶的影响不大,可以在酶使用时加入 EDTA,从而降低  $\text{Cu}^{2+}$ 和  $\text{Zn}^{2+}$ 的影响。因此该酶在低聚木糖的制备,面包改良上有潜在的应用价值。

### 参 考 文 献

- [1] Neeta K, Abhay S, Mala R. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999(23): 411-456.
- [2] 刘伟丰, 毛爱军, 祝令香, 等. 耐碱性木聚糖酶基因在短小芽孢杆菌中高效分泌表达的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44(4): 487-490.
- [3] Mo nica CTD, Marcius SA, Eleonora K, *et al.* Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 2003 (10): 6064-6072.
- [4] 胡沂淮, 邵蔚蓝. 木聚糖酶. 生命的化学(*Chemistry of Life*), 2002, 22(3): 281-285.
- [5] Nuyens F, Willem H van Zyl, Iserentant D, *et al.* Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* xylanase (xynA) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001(56): 431-434.
- [6] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005(29): 3-23.
- [7] Takuya K, Shinji F, Kimio I, *et al.* An *Aspergillus awamori* acetyltransferase : purification of the enzyme, and cloning and sequencing of the gene. *Biochem J*, 1997, 326, 485-490 (Printed in Great Britain).
- [8] Jose APG, Leo H D, Jaap V. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(6): 2179-2182.
- [9] Renato C, Claudio N, Ines C, *et al.* Secretion of endoxylanase A from *Penicillium purpurogenum* by *Saccharomyces cerevisiae* transformed with genomic fungal DNA. *FEMS microbiology letters*, 2002(212): 237-241.
- [10] 丁少军, Buswell JA. 利用真菌纤维素结合域(CBD)保守性序列进行草菇木聚糖酶 cDNA 的克隆. *中国生物化学与分子生物学报(Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)*, 2004, 20(3): 387-392.
- [11] 黄运红, 龙中儿, 李素珍, 等. 木聚糖酶高产微生物的筛选和鉴定. *江西师范大学学报(自然科学版)(Journal of Jiangxi Normal University-Natural Sciences Edition)*, 2002, 26: 245-248.
- [12] 邵佩兰, 徐明, 李海峰, 等. 碱法提取玉米芯木聚糖的研究. *宁夏农学院学报(Journal of Ningxia Agricultural college)*, 2000, 21: 47-49.
- [13] 谭秀华, 武玉永, 马立新, 等. 耐碱性甘露聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(4): 543-546
- [14] Zhang GM, Hu Y, Zhuang YH, *et al.* Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a xylanase gene from *Bacillus pumilus* HBP8. *Biocatalysis and biotransformation*, 2006, 24: 371-379.
- [15] 孙明主编. 基因工程. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [16] 张桂敏, 唐文杰, 班静, 等. 基因组步行 PCR 克隆基因用真菌染色体 DNA 抽提方法. *湖北大学学报(自然科学版)(Journal of Hubei University-Natural Science)*, 2006, 1: 69-71.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: CSH Press, 1989.
- [18] 张桂敏, 刘振, 李春华, 等. 一种简便快速筛选重组子方法. *湖北大学学报(自然科学版)(Journal of Hubei University-Natural Science)*, 2005, 27: 280-281.
- [19] Miller GL, Blum R, Glennon WE, *et al.* Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal Biochem*, 1960, 2: 127-132
- [20] Apel-Birkhold PC, Walton JD. Cloning, disruption, and expression of two endo-beta-1,4-xylanase genes, XYL2 and XYL3, from *Cochliobolus carbonum*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62, 4129-4135
- [21] 刘学堂, 宋晓轩, 郭金城. 棉花黄萎病菌的研究及最新进展. *棉花学报(Cotton Science)*, 1998, 10(1): 6-13
- [22] 李育阳. 基因表达技术. 北京: 科学出版社, 2001.
- [23] Emami K, Hack E. Characterisation of a xylanase gene from *Cochliobolus sativus* and its expression. *Mycol Res*, 2001, 105: 352-359
- [24] Degefu Y, Paulin L, Lubeck PS. Cloning, sequencing and expression of a xylanase gene from the maize pathogen *Helminthosporium turcicum*. *Pass Eur J Plant Pathol*, 2001, 107: 457-465
- [25] Dalboege H, Hansen HPH. A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. *Mol Gen Genet*, 1994, 243: 253-260
- [26] Gomez-Gomez E, Isabel M, Roncero G, *et al.* Molecular characterization of a novel endo-beta-1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet*, 2001, 40: 268-275
- [27] 张桂敏, 王亚平, 蔡立涛, 等. 外显子拼接法合成真菌灵芝漆酶基因 cDNA. *武汉大学学报(理学版)(Journal of Wuhan University-Natural Science Edition)*, 2007, 53(6): 701-705.

## Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Verticillium dahliae*

Guimin Zhang<sup>1</sup>, Ben Rao<sup>1</sup>, Jian Ye<sup>1</sup>, Lixin Ma<sup>1</sup>, Xian'en Zhang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

<sup>2</sup>Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** [Objective] Fungus *Verticillium dahliae* caused greensickness of cotton and xylanase is necessary in this pathogenesis. Cloning xylanase gene from *V. dahliae* and heterologous expression might obtain new xylanase. [Methods] By comparing the amino acid sequences of over 10 xylanases in 11 families from fungi through BLAST, we found 2 highly conserved regions, with a fragment of about 150 amino acids coding sequence in between. Degenerate primers complementary to the ends of these two conserved regions were designed to amplify the in-between sequence from *V. dahliae*. The whole xylanase gene containing intron was achieved by Genome-walking PCR method. A 63 bp intron was found through BLAST, the whole cDNA *xynG* was cloned by *Dpn*<sup>-</sup>-mediated PCR to delete intron. The cDNA was inserted into pHBM905 and expressed in *Pichia pastoris* GS115, xylanase-secreting transformants were selected on plate containing RBB-xylan. The transformant with the largest halos was selected for study the character of xylanase. [Results] The deduced amino acid sequence showed 72% identity with endo- $\beta$ -1, 4-xylanase from *Cochliobolus carbonum* and *C. sativus* in the GenBank, which means *xynG* is a new xylanase gene. The optimal pH of the purified recombinant enzyme was pH6. It remains over 50% relative activity at pH5-9. The optimal temperature was 45°C. The most favorable substrate for the xylanase (XYNG) is Beechwood xylan. Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> improve the enzyme activity by 33.7% and 16.6%, respectively. EDTA,  $\beta$ -Mercaptoethanol and NaN<sub>3</sub> don't affect the enzyme activity. Tween-80 and DMSO activated enzyme activity by 28.4% and 12.8%. Hg<sup>+</sup>, in concentration of 5 mmol/L, also inhibited the enzyme activity. [Conclusion] The xylanase gene *xynG* was firstly cloned from the fungi that caused greensickness of cotton. The xylanase genes containing one intron can be efficiently cloned from plant pathogens and white-rot fungi using strategy in this research. It is unnecessary to explore enzyme expression condition and measure enzyme activity of the original strain. Enzyme character analysis showed that the XynG have potential application in the production of xylo-oligosaccharide and the improvement of bread quality.

**Keywords:** xylanase; *Verticillium dahliae*; *Pichia pastois*; genome-walking PCR; degenerate primer

Supported by the National Natural Science foundation of China (30600014) and Wuhan City Science & Technology Plan (200760423162)

\*Corresponding author. Tel: +86-27-87197105; Fax: +86-27-88666349; E-mail: zhangxe@most.cn

Received: 13 December 2007/ Revised: 20 February 2008

### 答 作 者 问

问: 我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表, 如果想调整作者并且修改作者及单位署名顺序是否可以? 是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答: 可以变更, 但需要作者再提供以下材料。(1) 如变单位署名顺序, 需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信, 证明内容: 原署名顺序—现署名顺序—盖章。(2) 如变更作者署名顺序, 需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容: 原作者姓名及顺序—修改之后的作者姓名及顺序。(3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 e-mail 发来), 新的变更即可生效。