

## 链霉菌M1033 D-木糖异构酶的分子克隆

朱学良 王玉珍 黄震 刘兢 崔涛  
董婉治 牛立文 徐洵

(中国科学技术大学生物系, 合肥)

链霉菌M1033染色体DNA经BamH I酶解后电泳, Southern转移。根据自测的链霉菌M1033 D-木糖异构酶氨基酸序列设计合成寡聚核苷酸探针X-2、X-3, 以X-2、X-3及*Am-pullariella* sp3876 D-木糖异构酶基因(1.17kb)为探针进行杂交, 确定与上述探针杂交最强处在15kb左右。从胶上分离出9—20kb大小的片段, 克隆到EMBL 3载体中, 经杂交筛选后, 得到0.6%的阳性噬斑, 其插入大小为13kb。将插入DNA的Sal I酶解片段(2.5kb)进一步亚克隆于pUC18, 得到重组质粒pUB1, 经酶解图谱、部分序列分析和互补实验确定pUB1含有完整的M1033 D-木糖异构酶基因

**关键词** 链霉菌M1033; 克隆; D-木糖异构酶基因

D-木糖异构酶(EC 5.3.1.5), 即D-葡萄糖异构酶。很多种微生物都含有D-木糖异构酶(D-Xylose Isomerase, 以下简称D-XI<sup>[1,2]</sup>)。目前已克隆了多种同工酶基因并测定了序列<sup>[3-7]</sup>。由于果糖浆生产成本受此酶影响很大<sup>[8]</sup>, 许多国家均致力该酶的开发与改造工作, 从而使D-XI成为目前研究得最为广泛深入的工业酶之一。

本文利用杂交筛选法克隆了链霉菌M1033的D-XI基因, 为D-葡萄糖异构酶的蛋白质工程奠定了基础。

### 材料和方 法

#### (一) 菌株和载体

*E. coli*菌株HB101和JM109为本系所藏; NM538和NM539<sup>[10]</sup>购自Promega公司; 链霉菌M1033购自山东省食品工业研究设计院、

EMBL 3载体<sup>[11]</sup>购自Promega公

司; pUC18为华美生物工程公司产品; M13mp18和M13mp19为BRL产品。

#### (二) 酶及化学试剂

限制酶分别为华美、Promega、BRL产品; T4DNA连接酶为Biolabs产品;  $\lambda$ -包装蛋白由上海生化所惠赠; Sequencing Kit为USB产品。

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ ( $>3000\text{Ci}/\text{mmol}$ )为NEN和信通公司产品,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ( $>4000\text{Ci}/\text{mmol}$ )为信通公司产品。

噬斑原位转移用ICN公司的Biotrans尼龙膜; Southern转移用NEN公司的Gene Screen Plus膜。

#### (三) 杂交探针

寡聚核苷酸X-2、X-3系分别根据自测的链霉菌M1033木糖异构酶N端的氨基酸顺序和溴化氰裂解得到一个片段的氨基酸顺序设计, 由上海细胞所合成。

X-2:

本文于1990年12月22日收到。  
该项工作得到“863”高技术基金资助。

5' CTCTGGACCGTCGGCTGGCA3'  
 G G G  
 X-3: 5' CCCAGCAGGTCGA-  
 G G  
 AGGCCTCCTT3'  
 C T

*Ampullariella* sp. strain 3876 D-XI 基因由 Patrick J. O'hara 博士惠赠。

#### (四) 基本技术

除非特别指出, 菌体的培养、染色体 DNA 的提取、 $\lambda$ -DNA 的提取、酶切、连接、转化, 体外包装等方法均按文献[12]、[13]进行, 质粒提取按 Kraft 的方法<sup>[14]</sup>。片段分离采用电洗脱法; 寡聚核苷酸探针用 T4 多核苷酸激酶进行 5' 末端标记, D-XI 基因探针标记采用缺口平移法。

#### (五) 转移和杂交

噬斑原位转移和杂交、Southern 转移和杂交分别按 ICN 和 NEN 公司的手册进行, 杂交温度为 60°C。

#### (六) 序列测定

采用双脱氧末端终止法, 按 USB 公司 Kit 说明书操作。

#### (七) 表达培养基

即补加酪蛋白水解物的 M<sub>9</sub> 培养基, 以 0.5% 的 D-木糖为唯一碳源, 并含 Amp (氨苄青霉素) 40  $\mu$ g/ml; 37°C 培养 12—18h。

## 结果与讨论

### (一) 链霉菌染色体 DNA 的酶解、Southern 转移和杂交分析

按 Murray 法提取的染色体 DNA (分子量  $\geq 50$ kb) 各 5  $\mu$ g 分别经 BamHI 和 Pst I 酶切, 在中等大小的 0.4% 琼脂糖凝胶上电泳后, 进行 Southern 转移。用 <sup>32</sup>P 标记的 X-2、X-3 及 *Ampullariella* sp. strain

3876 D-XI 基因分别杂交, 两种酶切后 DNA 均有杂交带, 在 DNA/BamHI 约 15kb 处杂交带更强 (图版 I-A)。由此决定从胶上回收 DNA/BamHI 的 9—20 kb 片段。

### (二) 阳性克隆的筛选及其酶谱分析

经过摸索, 确定终浓度为 600  $\mu$ g/ml 的 EMBL3 的载体 (BamHI 和 EcoRI 双酶切) 与 130  $\mu$ g/ml 的 9—20 kb 总 DNA/BamHI 片段连接效果最佳 (图版 I-B)。连接物用  $\lambda$  包装系统包装后得到 10<sup>6</sup> 个重组子。由于 EMBL3 采用双酶切, 中间段 (Stuffer) 与左右臂连接的可能性大大降低, 经分别感染 NM538 和 NM539 (P2 溶源菌, 只允许重组子生长) 比较, 重组子比例在 90% 以上。

杂交筛选 3000 个噬菌斑, 得到 18 个强阳性克隆 (图 1)。可见采用目的基因片段富集后, 筛选效率大大提高 (阳性率为 0.6%)。取其中两个强阳性克隆进一步纯化, 提取其 DNA, 发现插入大小均为

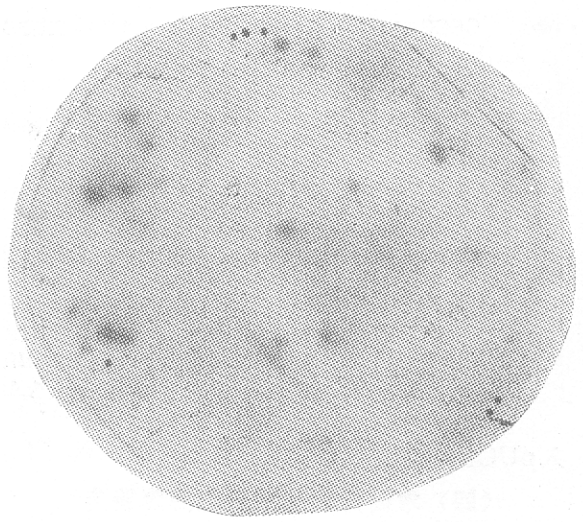


图 1 用 <sup>32</sup>P 标记的 X-2、X-3 混合探针筛选带目的基因的噬菌斑

Fig.1 Screening for *Streptomyces* M1033 D-XI gene with <sup>32</sup>P labeled X-2, X-3 mixed probe. Eighteen positive plaques were obtained

13kb左右, 酶谱分析证明两个克隆的插入是相同的DNA片段。

进一步将阳性克隆 DNA 分别经 Sal I、Sph I、Stu I、BamH I 酶切后的样品进行电泳、Southern转移、与 *Ampullariella* sp. strain 3876 D-XI 基因杂交, 结果显示: 所有样品均有强的杂交带(图版 I -C, D)。

(三) 次级克隆

由图版 I -C, D 可见, 在 Sal I 片段中有一大小约为2.5kb 的单一杂交带。由于大小合适, 将此2.5kb的片段进一步克隆

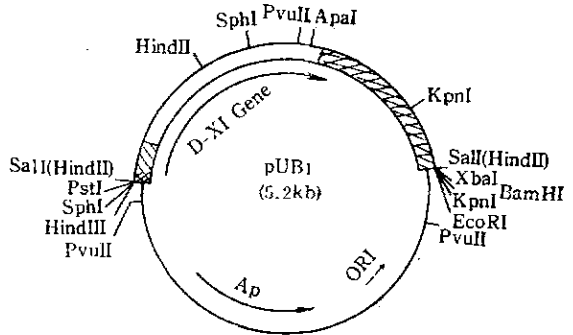


图 2 重组质粒 pUB1 的酶谱

Fig.2 Restriction map of recombinant plasmid pUB 1

Sv.	GACCCGTTTCGGCGACGCCACCCGCCCTGCCCTCGACCCGGTCGAGACCGTGCAGCGCCTG	
S. M1033	GACCCCTTCGGCGACGCCACCCGGCGGCCCTCGACCCGGCCGAGTCCGTCCGCCGCCTC	
Asp.	GACGCGTTCGGTGACGCCACCCGTCCGGTCTCGACCCGATCCAGGCCGTGCACÁAGCTG	123
Sv.	GCCGAGCTGGGGCCCTACGGAGTGACCTTCCACGACGACGACCTGATCCCCTTCGGGTCC	
S. M1033	GCCGAGCTCGGCGCCACGGCGTGACGTTCCACGACGACGACCTCATCCCCTTCGGCGCG	
Asp.	GCCGAGA1 GGCGCGTACGGCGTACGTTCCACGACGACGACCTGGTGCCGTTTCGGCGCC	189
Sv.	TCCGACACCGAGCGCGAGTTCGCACATCAAGCGGTTC	
S. M1033	AGCGACAGCGAGCGCGCCGAGCACATGAAGCGGTTC	
Asp.	GACCCCGGACCCGCGACGGCATCGTCCGCCGGTTC	225

图 3 链霉菌M1033 D-XI部分顺序与*S.violaceoniger*及*Ampullariella* sp. strain 基因的比较

Fig.3 Comparison of partial DNA sequences between M1033 and *S.violaceoniger* and *Ampullariella* sp. strain genes  
Sv.为*S.violaceoniger* Asp.为*Ampullariella* sp. strain 3876

入pUC18, 得到重组质粒pUB1。

(四) 木糖异构酶基因的克隆鉴定

1. 酶谱分析: pUB1克隆用Pst I 为第一酶切, 然后分别以Apa I, Hind II, Kpn I, Sph I 等酶作第二酶切, 得到的酶谱与*S.violaceoniger*的D-XI 基因及其附近区域的酶谱类似<sup>[15]</sup>, 且 Sph I 切点

的存在和位置与杂交结果相符(图 2)。

2. 部分序列分析: 由序列比较可知, *S.violaceoniger*的 *Ampullariella* sp. strain 3876的D-XI基因前800 bp 的同源性为 76%<sup>[5,6]</sup>。我们用 X-2 探针作引物将pUB1 克隆双链变性后用双脱氧末端终止法测序。如以测得的部分顺序与*S.vio-*

*laceoniger* 及 *Ampullariella* sp. strain 3876作比较(图3), 可以看出三者之间有高度同源性, 而且M1033和*S. violaceoniger*的同源性(>85%)比它和*Ampullariella* sp. strain 3876的同源性(70%)为高。从这测出的部分序列可见其(G+C)含量与其它D-XI相似, 高达75%。

3. 互补实验: 将重组质粒pUB1转化到Xyl-的*E. coli*菌株HB101中, 37°C培养12~18h, 可观察到在以木糖为唯一

碳源的M<sub>0</sub>+Amp琼脂板上出现大量小菌落, 并从这类菌落中分离到带有D-XI基因片段的质粒, 而带pUC18的同样菌株却无明显菌落出现。可见, 链霉菌M1033的D-XI能在一定程度上补偿*E. coli*的Xyl缺陷。这与Marcel的观察相同<sup>[15]</sup>。

从以上三个方面的实验, 结合我们已测得的M1033 D-XI单体分子量为4.5万(即其相应的基因1.2kb左右), 可以确定在pUB1中含有完整的D-XI基因。

### 参 考 文 献

- [1] Chen, W.P., *Process Biochem.*, 6(7):30-35, 1980.
- [2] Chen, W.P., *Process Biochem.*, 8(9):36-41, 1980.
- [3] Schellenberg G.D. et al., *J. Biol. Chem.*, 259(11):6826-6832, 1984.
- [4] Wilhelm M. et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:5717, 1985.
- [5] Sarri G.C. et al., *J. of Bacteriol.*, 169(2):612-618, 1987.
- [6] Procount D. et al., *Nucl. Acids Res.*, 16:9337, 1988.
- [7] Amore R. et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:7515, 1989.
- [8] Coker L.E. et al., *Biotechnology: Application and Research*, ed. by Cheremisinoff P.N. et al., pp.165-171, 1985.
- [9] 贺家明等: 食品与发酵工业, 1:1-4, 1981.
- [10] Hendrix R.W. et al., *Lambda I*, Cold Spring Harbour Press, 1983.
- [11] Frischauf, A.M. et al., *J. Mol. Biol.*, 170:827, 1983.
- [12] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1982.
- [13] Murray M.G. et al., *Nucl. Acids Res.*, 8(19):4321-4325, 1980.
- [14] Kraft R. et al., *BioTech.*, 6(6):544-546, 1988.
- [15] Marcel T. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 208:121-126, 1987.
- [16] 崔涛等: 微生物学报, 31(4):329-331, 1991.

## Cloning of D-xylose (D-glucose) Isomerase Gene in *Streptomyces*

Zhu Xueliang Wang Yuzhen Huang Zhen Liu Jing

Cui Tao Huang Wanzhi Niu Liwen Xu Xun

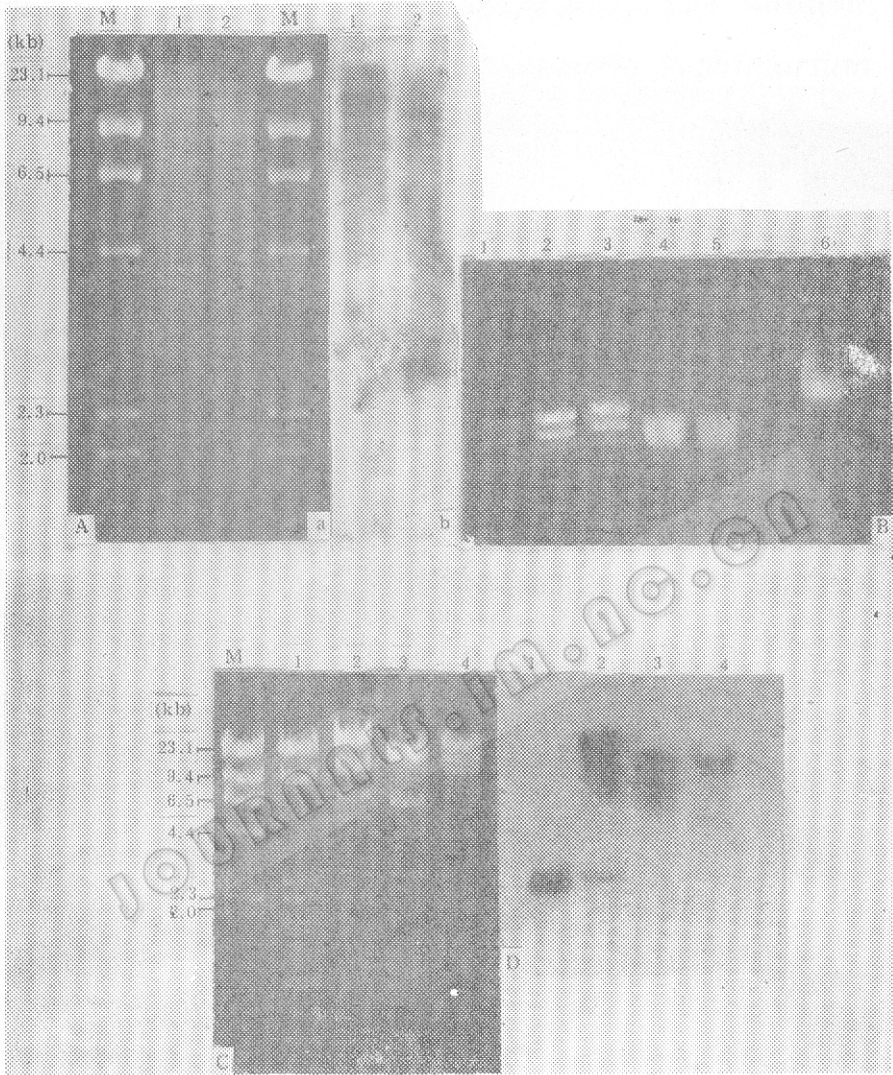
(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei)

Genomic DNA from *Streptomyces* M1033 was digested with BamH I, then electrophoresed, Southern transferred and hybridized. The probes were *Ampullariella* sp. strain 3876 D-xylose isomerase (D-XI) gene and oligonucleotides corresponding to the amino acid sequences of *Streptom-*

*Streptomyces* M1033 D-XI. A strong hybridizing band of about 15 kb was found. The 9—20 kb DNA fragments were recovered from the gel, cloned into EMBL 3 vector and screened with the same probes. The 13 kb insert DNA from a positive plaque was digested with *Sa*I. A 2.5 kb DNA segment of the digestion was then subcloned into pUC18 (Assigned pUB1). Restriction mapping, partial sequence analysis of pUB1 displayed high homology with the *S. violaceoniger*. On the other hand, pBU1 was found to exhibit complementation with *xyl-E. coli* strain HB 101 on M<sub>9</sub> medium in which D-xylose was the sole carbon source. Therefore, it is concluded that there is *Streptomyces* M1033 D-XI gene in the pUB1 clone.

#### Key words

*Streptomyces* M1033; clone; gene for D-xylose isomerase



A. 链霉菌染色体DNA的Southern杂交

Southern hybridization result of the chromosome DNA

a. 琼脂糖凝胶电泳 Agarose gel electrophoresis

M. Marker,  $\lambda$ -DNA/Hind III; 1. Chromosome DNA cleaved with BamHI; 2. Chromosome DNA cleaved with Pst I.

b. 放射自显影 Autoradiography, probe: *Ampullariella* sp. strain 3876 D-XI gene

B. DNA的连接 Ligation of DNA

1-3. EMBL 3 cleaved with EcoR I and Bam H I, on each of them there are three segments. The top one is left arm 19.8kb. The bottom one is right arm 8.8kb; 4,5. Isolated 9-20 kb DNA/BamH I fragments, 6. after ligation

C, D. 阳性克隆DNA的分析 Analysis of DNA from a positive plaque

C. 琼脂糖凝胶电泳 Agarose gel electrophoresis

M. Marker,  $\lambda$ -DNA/Hind III 1. DNA/Sal I; 2. DNA/Sph I; 3. DNA/Stu I; 4. DNA/BamH I;

D. 放射自显影 Autoradiography, probe: *Ampullariella* sp. strain 3876 D-XI gene