

## 枯草杆菌内切葡聚糖酶基因的克隆及表达

肖郁明\* 张义正\*\*

(四川联合大学生物工程系分子生物学实验室 成都 610064)

**摘要** 以质粒 pUC18 为载体,从枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)DB104 基因组中克隆到一个内切葡聚糖酶基因。限制酶切分析表明重组质粒中的插入片段为 3.5kb,其中各含有一个 EcoR I, Hind III 和 Pvu II 位点。该插入片段含有一完整的内切葡聚糖酶基因,其自身启动子能被大肠杆菌转录系统所识别。当加入 lacZ $\alpha$  基因启动子的诱导物 IPTG 后,内切葡聚糖酶表达量提高 2.8 倍。加入 0.5% 葡萄糖能抑制该基因的表达。该基因在大肠杆菌 DH5 $\alpha$ F' 中表达的内切葡聚糖酶分布为:胞外 67.3%,胞间质 3.9%,胞内 28.8%。Southern 杂交证实了该插入片段来自供体菌 *B. subtilis* DB104。

**关键词** 内切葡聚糖酶基因,枯草杆菌,基因克隆,基因表达,大肠杆菌

已有的研究表明,纤维素的完全降解至少需要三类酶系:内切葡聚糖酶(Endoglucanase),纤维二糖水解酶(Cellobihydrolase)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -Glucosidase)。其降解模式是:内切葡聚糖酶首先将纤维素的非结晶区切开,产生大量的非还原端,作为纤维二糖水解酶底物,后者依次从非还原端切下纤维二糖;纤维二糖最后被  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解成葡萄糖<sup>[1]</sup>。实际的降解过程要复杂得多,需要多种酶系的协同作用,各酶系的组成也很复杂。迄今为止人们已从 40 多种细菌和 5 种以上的真菌中克隆到了纤维素酶基因,大多已定序。

枯草杆菌不能降解天然的纤维素,但其产生的内切葡聚糖酶能特异性水解羧甲基纤维素,燕麦葡聚糖和地衣多糖。国外已从 5 种不同的枯草杆菌菌株中克隆到了纤维素酶基因,全为内切葡聚糖酶基因<sup>[1]</sup>。我们从一株枯草杆菌 DB104 菌株中克隆到一个内切葡聚糖酶基因,并且在大肠杆菌中得到了表达。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株和质粒

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) DB104,大肠杆菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  F';质粒 pUC18 均为本研究室保存。

#### 1.2 工具酶及重要试剂

国家自然科学基金资助项目。

\* 现在地址:中国科学院成都生物所非载体室。

\*\* 通讯联系人。

本文于 1995 年 8 月 24 日收到。

各种限制酶, RNaseA、牛小肠碱性磷酸酶(CIP)、T4DNA 连接酶, DNA 聚合酶大片段(Klenow fragment)等, 购自美国 BRL 公司、Promega 公司和华美生物工程公司。其它试剂如溶菌酶, 氨苄青霉素、核酸分子量标准物等均购自华美生物工程公司; 放射性标记 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTP 购自北京亚辉公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 枯草杆菌染色体 DNA 提取:** 取一接种环 *B. subtilis* DB104 菌种, 接种于 75ml LB + 1% 葡萄糖培养基中, 37°C 摇床培养过夜。4 000r/min 离心 10min, 倒去上清液, 1.5ml 10×TE 缓冲液悬浮菌体, 分别转入两个 EP 管, 4 000r/min 离心 10min, 去掉上清液。在每一 EP 管中分别加入约 750 $\mu$ l 裂解缓冲液 (mmol/L: Tris-HCl 25, pH8.0, EDTA 10, pH8.0, 葡萄糖 50, 20mg/ml 溶菌酶), 使总体积为 1ml, 37°C 温浴过夜。用 0.5ml 苯酚抽提一次, 再用苯酚: 氯仿 (1:1) 抽提两次, 加入 1/10 体积 5mol/L NaCl 和等体积异丙醇。用取液器吸头挑出絮状 DNA, 转入另一 EP 管, 用 70% 乙醇洗两次, 待干燥后, 溶于 600 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 或 TE 缓冲液。0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 以确定 DNA 的浓度与质量。

**1.3.2 质粒 DNA 的提取:** 按文献[2]中的碱变性法进行。

**1.3.3 DNA 的酶切, 连接:** 用 BRL 公司产品, 按产品说明书操作。

**1.3.4 内切葡聚糖酶基因的克隆:** 由于已克隆到的 *B. subtilis* 内切葡聚糖酶基因均不含 PstI 位点, 故用 PstI 将 *B. subtilis* DB104 总 DNA 部分酶切, 用低熔点胶回收 2~10kb 片段, 载体 pUC18 用相同酶切后用 CIP 脱磷酸化, 将两者以 4:1 比例相连, 转化 *E. coli* DH5  $\alpha$  F', 将全部转化子点种到 X-Gal 平板上, 再将全部白色重组子点种到 LB + Amp 平板上。过夜培养, 然后加入 8ml 灭菌上层琼脂 (10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.5mg/ml 溶菌酶, 0.5% Na-CMC), 37°C 培养 16~24h。用 1% 的刚果红溶液染色 20min, 然后用 1mol/L NaCl 溶液冲洗平板, 选择黄色的内切葡聚糖酶基因阳性克隆。

**1.3.5 内切葡聚糖酶活性测定** 参见文献[3]。

**1.3.6 内切葡聚糖酶细胞定位** 参见文献[4]。

**1.3.7 Southern 杂交:** 按文献[2]进行。

## 2 实验结果

### 2.1 内切葡聚糖酶基因的克隆

**2.1.1 内切葡聚糖酶基因阳性克隆的筛选:** 计算 X-Gal 平板上白色菌落和总菌落之比, 发现重组频率高达 83%。随机挑取白色菌落 24 个用于抽取质粒, 以质粒 pUC18 作为对照进行琼脂糖凝胶电泳, 结果表明均有插入片

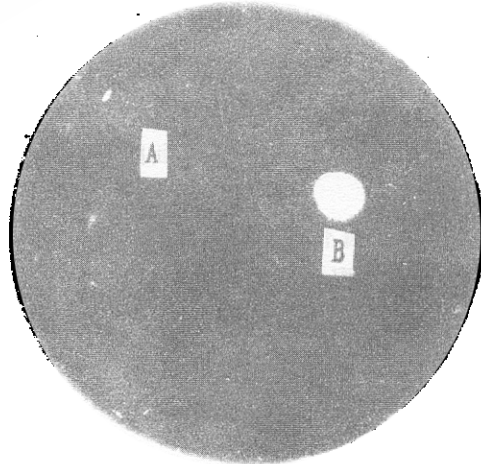


图 1 阳性克隆在 Na-CMC 平板上形成的水解圈

Fig. 1 The endoglucanase-producing clone stained with Congo red on LB plate containing 0.5% Na-CMC.

A: *E. coli* DH5  $\alpha$  F' harboring plasmid pUC18;

B: The endoglucanase-producing clone.

段,平均长度为 3.5kb。最后从 3,000 多个重组子中筛选到了一个黄色的内切葡聚糖酶基因阳性克隆(图 1)。用大规模提取法抽提黄色阳性克隆的质粒,得到了 6.3kb 的重组质粒,命名为 pBSG1。

**2.1.2 内切葡聚糖酶基因片段的限制酶切分析:**用 Bam HI, EcoRI, Hind III, KpnI, PstI, Pvu II, SacI, SphI, SmaI, XbaI 和 XhoI 等 11 种酶对重组质粒进行酶切分析,结果表明插入片段大小为 3.5

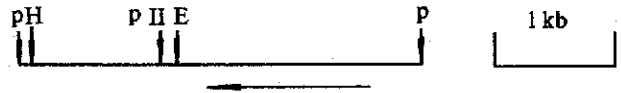


图 2 BSG1 片段的限制酶图谱

Fig.2 The restriction map of BSG1 fragment

kb,其中各有一个 EcoRI, Hind III 和 Pvu II 位点,其余限制酶均无识别位点。根据酶切结果,绘制了该基因片段的限制酶图(图 2)。

**2.1.3 Southern 杂交分析:**为了证实重组子 pBSG1 中的外源插入片段是否来自 *B. subtilis* DB104,将 *B. subtilis* DB104 总 DNA 用 PstI 完全酶切,经电泳和把 DNA 带转移到硝酸纤维素滤膜后,与放射性同位素标记的插入片段探针杂交,结果显示 3.5kb 的外源片段能与 *B. subtilis* DB104 总 DNA 杂交(图 3)。在总 DNA 的 PstI 酶切道上得到一条与该插入片段大小相同的杂交带,表明插入片段确实来自于 *B. subtilis* DB104 基因组,并且在基因组中以单拷贝形式存在。

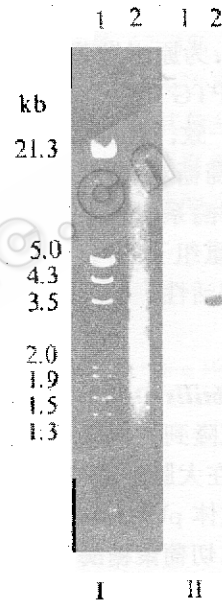


图 3 BSG1 片段与 *B. subtilis* DB104 DNA 的 Southern 杂交结果

Fig.3 Southern hybridization of BSG1 fragment with *B. subtilis* DB104 genomic DNA

I-Agarose gel electrophoresis; II-Southern hybridization. 1- $\lambda$ /E/H;2-*B. subtilis* DB104 total DNA digested by PstI

## 2.2 内切葡聚糖酶基因在 *E. coli* 中的表达

**2.2.1 内切葡聚糖酶基因启动子在 *E. coli* 中的启动作用:**由于质粒载体 pUC18 的多克隆位点区上游有 *lacZ $\alpha$*  基因的启动子。为了证明克隆到的内切葡聚糖酶基因为一完整基因,即是否含有自身的启动子,以及该启动子能否被 *E. coli* 表达系统所识别,将 pBSG1 重组子的内切葡聚糖酶基因片段用 PstI 切下,重新插入 pUC18 的 PstI 位点,筛选到含反向插入片段的重组子,命名为 pBSG2。用 EcoRI 酶切检查其插入方向,它与 pBSG1 的 EcoRI 酶切结果很容易区别开,前者可得一条 1kb 左右的小带,后者则可得 2.3kb DNA 带。酶活性分析结果表明, pBSG2 仍具有内切葡聚糖酶活性,为 55mu/ml。只是反向插入后,该基因的表达不受 *lacZ $\alpha$*  启动子的作用,其表达的内切葡聚糖酶活性略低于正向插入重组子 pBSG1(80mu/ml),说明这段来自 *B. subtilis* DB104 的 DNA 片段含有完整的内切葡聚糖酶基因,并且该基因启动子能够被 *E. coli* 表达系统所识别并发挥启动功能。

**2.2.2 内切葡聚糖酶基因表达产物在 *E. coli* DH5  $\alpha$  F' 中的细胞定位:**以 *E. coli* 为宿主

表达外源基因的严重不足之处在于其表达产物往往不能分泌到胞外。有趣的是我们克隆到的这个内切葡聚糖酶基因表达产物能在发酵液中检测到活性,但这并不说明全部表达产物都被分泌到细胞外,因此我们进行了宿主菌 *E. coli* DH5  $\alpha$  F' 中表达的内切葡聚糖酶的细胞定位,结果如表 1 所列。该基因产物大部分被分泌到了胞外。

表 1 内切葡聚糖酶(EG)的细胞定位

Table 1 The distribution of endoglucanase in *E. coli* DH5 $\alpha$ F'

位置	胞外	胞间周质	胞内
EG 酶活/ $\mu\text{m}\cdot\text{ml}^{-1}$	80.00	4.64	34.23
百分比/%	67.3	3.9	28.8

2.8 倍左右,为原出发菌株 *B. subtilis* DB104 的 2 倍,而 pBSG2 中的内切葡聚糖酶基因表达则不受 IPTG 诱导。这些结果也表明 pBSG1 中的内切葡聚糖酶基因的转录方向与 lacZ $\alpha$  基因一致,而 pBSG2 中的内切葡聚糖酶基因转录方向则与 lacZ $\alpha$  基因相反。

2.2.4 葡萄糖对内切葡聚糖酶基因表达的抑制:由于葡萄糖是纤维素降解的终产物,对纤维素降解酶系的基因表达有着强烈的抑制作用,故当在培养基中加入 0.5% 的葡萄糖时,pBSG2 重组子的内切葡聚糖酶基因表达受到了抑制,在发酵液中基本上检测不到内切葡聚糖酶活性。

### 3 讨论

#### 3.1 *B. subtilis* DB104 内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达与调控

由于克隆到的内切葡聚糖酶基因带有自身的启动子并能被大肠杆菌表达系统所识别,所以它在大肠杆菌中的表达不受其在质粒载体中的插入方向的限制。但当其转录方向与质粒载体 pUC18 的 lacZ $\alpha$  基因的转录方向一致时(即 pBSG1 重组子),lacZ $\alpha$  基因的启动子与内切葡聚糖酶基因的启动子串联在一起,从而提高了转录效率,使表达的内切葡聚糖酶较其反向插入形成的重组子 pBSG2 提高了 48%。同时由于 lacZ $\alpha$  的启动子受 IPTG 诱导,所以当加入 IPTG 后,这种启动子线状排列的重组子因 lacZ $\alpha$  启动子被诱导,导致整个基因转录水平提高,酶活水平提高了 2.8 倍,这样的表达水平是原供体菌 *B. subtilis* DB104 的内切葡聚糖酶基因表达水平的 2 倍。Hwan 也曾将 *B. subtilis* BSE616 菌株的 1.5kb 内切葡聚糖酶基因片段次克隆到 pUC19 质粒上,该片段缺失了基因自身的启动子和 SD 序列,但却利用 pUC19 上的 lacZ $\alpha$  启动子,在 *E. coli* 中获得了高效表达<sup>[5]</sup>。

虽然我们未测定克隆片段的核苷酸序列,无法直接判断片段中内切葡聚糖酶基因的转录方向,但根据上述的两种实验结果就可确定其转录方向。如果基因的转录方向与 lacZ $\alpha$  基因方向相同,则因为外源基因启动子靠近载体中 lacZ $\alpha$  基因启动子,形成串联的基因启动子,转录效率可提高;串联在一起的基因启动子由于其中的 lacZ $\alpha$  基因启动子会受 IPTG 的诱导,转录效率可进一步提高。如果外源基因插入方向与 lacZ $\alpha$  基因相反,则基因的表达活性则完全取决于外源基因自身启动子的强弱,有可能会低于正向插入形成的重组子,且不受 IPTG 诱导。因此,利用 pUC 系列载体克隆外源基因,还可根据不同插入方向片段的表达水平和是否受 IPTG 的诱导来判断基因转录方向。当然,最后的方向确定还需进一步实验。

2.2.3 IPTG 对内切葡聚糖酶基因表达的诱导:由于质粒载体上 pUC18 的 lacZ $\alpha$  基因启动子受 IPTG 的诱导,故 pBSG1 中的内切葡聚糖酶基因(转录方向与 lacZ $\alpha$  基因一致)也可能受其诱导。当加入 0.02mmol 的 IPTG 后,酶活测定发现:pBSG1 重组子表达的外源基因产物——内切葡聚糖酶的活性提高了

### 3.2 内切葡聚糖酶在大肠杆菌中的分泌

从目前已经克隆到的 *B. subtilis* 基因结构来看,大多数存在着典型的革兰氏阳性菌的信号肽序列,并且能被大肠杆菌识别。但是这些信号肽在大肠杆菌中的效率却不相同,即被识别后的正确切除,以及成熟蛋白最终被分泌到胞外的程度存在着差异,对于纤维素酶基因也是这样。来自 *B. subtilis* DLG 菌株的内切葡聚糖酶基因在 *E. coli* 细胞中的表达产物分布是:胞外少于 1%,胞间周质为 37%,胞内则为 63%<sup>[6]</sup>;而 IFO 菌株则分别为 24%,45.2%,30.8%<sup>[7]</sup>;PAP115 菌株为 70%,20%,10%<sup>[8]</sup>。这些内切葡聚糖酶基因表达的分泌信号肽都能被 *E. coli* 识别,因为这些基因表达产物至少能被分泌到胞间周质中。但是信号肽的切除以及表达产物穿过质膜和胞壁到胞外却存在着很大的差别,导致分泌效率从 1%到 70%不等。进一步的 DNA 序列分析发现这三种酶的信号肽序列非常相似,主要的差异在于对胞外分泌并不必需的羟基端编码区,其原因尚不清楚。本研究克隆到的内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达产物分布为:胞外 67.3%,胞间周质 3.9%,胞内 28.8%。可见其表达的信号肽也能被大肠杆菌识别,大部分表达产物经过正确的信号肽切除,最终被分泌到胞外。由于没有进行定序工作,不能比较其信号肽序列与上述 3 种酶的异同,但是可以发现这些来自不同 *B. subtilis* 菌株的内切葡聚糖酶基因在 *E. coli* 中表达的信号肽都能被大肠杆菌系统识别,并将表达的内切葡聚糖酶有效地分泌到胞外。

### 参 考 文 献

- [1] Beguin P. Ann Rev Microbiol, 1990. 40:219~248.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory manual (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- [3] Robson L M, Chambliss G H. Appl Environ Microbiol. 1984. 47:1038~1046.
- [4] Cornelis P, Digneffe C, Willemot K. Mol Gen Genet 1982. 186:507~511.
- [5] Hwan P S, Kim H K, Pack m y. Agric Biol Chem 1991. 55(2):441~448.
- [6] Robson L M, Chambliss G H. J Bacteriol. 1986. 165(2):612~619.
- [7] Koide Y, Ramur A Na, Uozumi T *et al.*: Agric Biol Chem. 1986. 50(1):233~237.
- [8] Mackay R M, Willick A L G, Zuker M. *et al.*: Nucl. Acids Res. 1986. 14:9159~9170.

## Molecular Cloning and Expression of An Endoglucanase Gene from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*

Xiao Fangming Zhang Yizheng

(Lab of Molecular Biology, Biotechnology Department, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

**Abstract** An endoglucanase gene was cloned from *Bacillus subtilis* DB104 using the *Escherichia coli* plasmid vector pUC18. The inserted fragment was 3.5kb with three unique EcoR I, Hind III, Pvu II restriction sites. The cloned fragment contained an intact endoglucanase gene and its own promoter could be recognized by *E. coli* transcriptional system. When IPTG was added the endoglucanase activity of recombinant BSG1 was increased 2.8 times as compared to uninduced one. When 0.5% of glucose was added, the expression of cloned gene was completely repressed. The distribution of the enzyme activity was extracelullar 67.3%, periplasmic 3.9% and cytoplasmic 28.8%. Southern hybridization showed that the inserted fragment of pBSG1 was from the genomic DNA of *B. subtilis* DB104.

**Key words**  $\beta$ -1,4-endoglucanase gene, *Bucillus subtilis*, gene cloning, gene expression, *Escherichia coli*