

环状芽孢杆菌 C-2 几丁酶基因的克隆

郑洪武 王焰玲 张义正*

(四川联合大学生物工程系 成都 610064)

摘 要 环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*) C-2 总 DNA 经 PstI 部分酶切后分离 2~10kb 的片段,插入质粒 pUC19 的 PstI 位点,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)利用几丁质平板从约 8000 个重组子中筛选到一个几丁酶基因阳性克隆(命名为 pCHT1)。用 12 种限制酶对重组质粒进行的酶切分析表明,重组质粒中的插入片段长 3.0kb,其中各有一个 KpnI, SacI 和 SspI 位点。将该克隆片段反向插入 pUC19 的 PstI 位点所得到的重组子同样具有几丁酶基因表达活性,说明此片段含有一个完整的几丁酶基因,其自身的启动子能被大肠杆菌转录系统所识别。Southern 杂交证实了该片段来自于 *B. circulans* C-2 基因组,且以单拷贝形式存在,它不能与来自于其它 7 株几丁酶产生菌的总 DNA 杂交。

关键词 环状芽孢杆菌,几丁酶基因,基因克隆,大肠杆菌

学科分类号 Q78

几丁质是一种广泛分布于自然界中的生物多聚物,它是多数真菌细胞壁和无脊椎动物外壳的主要结构成分。作为几丁质生物降解过程中的关键酶——几丁酶(EC3.2.1.14)在植物抗真菌病及几丁质作为再生能源的利用等方面都具有广泛的应用前景^[1-3]。国外对几丁酶基因的克隆始于 80 年代中期^[4],目前已从多种微生物及植物中克隆到多个几丁酶基因,而国内对几丁酶基因的研究起步较晚,迄今为止还未见有关完整几丁酶基因克隆的报道。

环状芽孢杆菌 C-2 是一株分离自成都动物园土样中的具较高几丁酶和半纤维素酶活性的菌株,该菌株的胞内外蛋白酶活性都很低,并且分泌多种胞外蛋白质^[5]。我们以它为出发菌株,质粒 pUC19 为载体,克隆到了含有几丁酶基因的 DNA 片段,并在大肠杆菌中得到了表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:几丁酶基因供体菌 *Bacillus circulans* C-2 和其它几丁酶产生菌 J1, J2, J3, D1, D2, D3, D4 由本室分离和保存,大肠杆菌 DH5 α 和质粒 pUC19 为本室保存。

1.1.2 培养基:LB, SOB, SOC 按文献 [6] 方法配制;几丁质培养基按文献 [4] 方法配制。

本研究由四川省科委应用基础研究基金资助。

* 通信作者。

收稿日期:1997-01-20,修回日期:1997-06-12。

1.1.3 主要酶制剂：本研究中使用的分子克隆工具酶包括各种限制酶、RNase、DNA 聚合酶 I 大片段、T4 DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIP)、溶菌酶等,分别购自华美生物工程公司、德国柏林格尔曼海姆中国有限公司、美国 Promega、BRL 和 Bio-Labs 等公司。

1.1.4 几丁质 $(C_6H_{13}O_5N)_n = (203.9)_n$ 购自上海试剂二厂 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 购自北京亚辉生物工程公司,其余试剂均为国产。

1.2 方法

1.2.1 *Bacillus circulans* C-2 染色体 DNA 的提取：参考文献 [7]。

1.2.2 质粒 DNA 的提取、酶切、连接、转化和 Southern 杂交均按文献 [6] 进行。

1.2.3 几丁酶基因阳性克隆的筛选：从构建的 *B. circulans* C-2 基因组文库中取菌体稀释至约 10 000 个细胞/ml,取 0.5ml 与 42℃ 保温的 5ml 几丁质培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素)混合后倒入下层为琼脂的平板中,37℃ 培养 36~48h,通过观察水解几丁质产生的无色透明水解圈筛选阳性克隆。

2 结果

2.1 *Bacillus circulans* C-2 基因组文库的构建

已报道的研究结果表明,来自大多数细菌的几丁酶基因均不存在 PstI 位点,因此用 PstI 将 *B. circulans* C-2 总 DNA 部分酶切,用低熔点琼脂糖凝胶回收 2~10kb 的片段,载体 pUC19 采用相同酶切后经 CIP 脱磷酸基,将两者以 3:1 比例连接,转化 *E. coli* DH5 α ,共得约 10 000 个转化子。随机挑选 200 个转化子点种于 X-Gal 平板上,共得 164 个白色菌落,重组频率为 82%。随机挑选 24 个用于抽提质粒,电泳结果表明,与载体 pUC19 比较,它们均有插入片段,平均长度为 3.5kb。将全部转化子(约 10 000 个)从平板上用无菌水洗下离心,在所得的菌体中加入 20ml 等体积混合的 2 \times LB/甘油即得 *B. circulans* C-2 的 PstI 基因组文库,-20℃ 保存待用。

2.2 几丁酶基因阳性克隆的筛选

根据上述几丁酶基因阳性克隆的筛选方法,几丁质平板在 37℃ 培养 36~48h 后,从约 10 000 个菌落中得到一个产生水解圈的 Ap^r 菌落,挑取划线纯化单菌落后,再将其点种于加有氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的几丁质平板上,经培养后仍可产生无色透明圈(图 1-1)。提取产生水解圈的阳性菌落中的质粒 DNA,重新转化 *E. coli*,挑取具氨苄青霉素抗性的转化子点种于几丁质平板上,它们均可产生水解圈(图 1-2)。将质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析,该质粒明显大于载体 DNA。此重组质粒命名为 pCHT1,其插入片段命名为 CHT1。

2.3 几丁酶基因片段的限制酶切分析

将重组质粒 pCHT1 用 BamHI、EcoRI、EcoRV、HindIII、KpnI、PstI、SacI、SacII、SalI、SmaI、SspI、XbaI 等 12 种限制酶分别酶切,电泳结果表明 CHT1 片段大小为 3.0kb,片段两端的 PstI 位点均已恢复,其中各有一个 KpnI、SacI 和 SspI 位点(图 2-I 中第 3、5、7 道),其余 9 种限制酶均无识别位点。根据酶切片段大小绘制了 CHT1 的限制酶谱,结果见图 2-II。

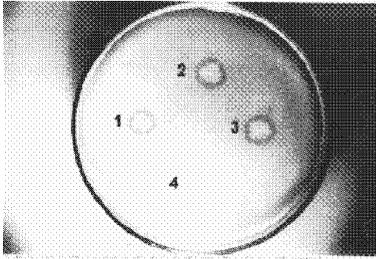


图 1 阳性克隆在几丁质平板上形成的水解圈

Fig.1 Chitin clearance on chitin-containing plate by chitinase-producing clones

1. Chitinase-positive clone selected from chitin overlay plates. 2. Transformant of purified pCHT1. 3. Transformant of pCHT1-R. 4. Transformant of pUC19.

2.4 Southern 杂交分析

为了证实重组子 pCHT1 中的外源插入片段 CHT1 是否来自 *B. circulans* C-2, 并且检查此几丁酶基因与来自其它 7 株几丁酶产生菌的几丁酶基因是否具有一定的同源性, 将 *B. circulans* 总 DNA 分别用 BamHI, EcoRI, HindIII, PstI 完全酶切, 另外 7 株几丁酶产生菌 J1, J2, J3, D1, D2, D3, D4 的总 DNA 分别用 PstI 完全酶切, 经琼脂糖电泳和 Southern 转移后, 与放射性同位素标记的插入片段探针杂交(图 3)。结果显示, CHT1 来自于 *B. circulans* C-2 基因组, 并且在基因组中以单拷贝形式存在, 但是, CHT1 不能与其它几丁酶产生菌的总 DNA 杂交, 说明此几丁酶基因与来自于这些菌的几丁酶基因无明显同源性。

2.5 *B. circulans* C-2 几丁酶基因启动子在 *E. coli* 中的作用

由于质粒载体 pUC19 的多克隆位点区上游有

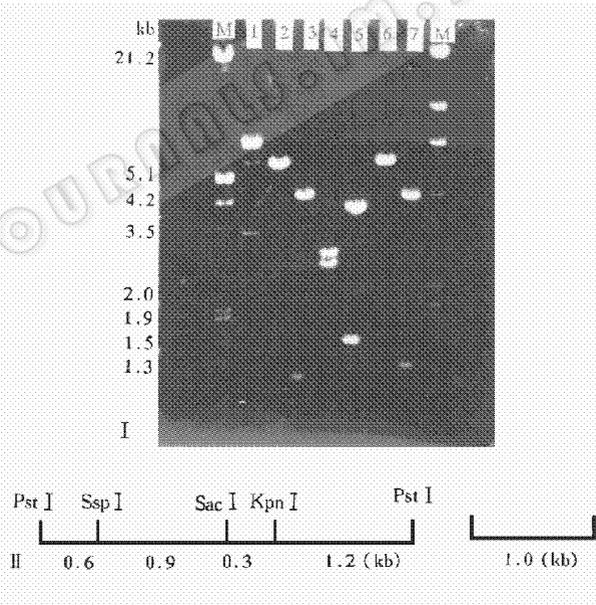
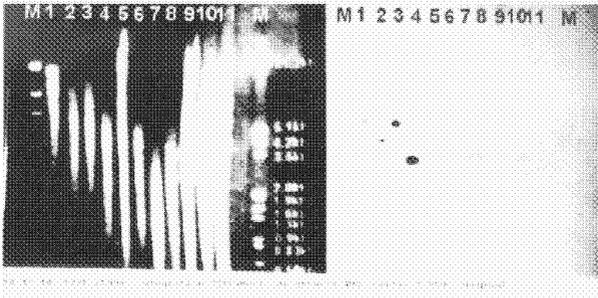


图 2 pCHT1 的限制酶切分析(I)和 CHT1 片段的限制酶谱(II)

Fig.2 Restriction analysis of pCHT1(I) and Restriction map of CHT1(II)

Lanes in I :1. EcoRV ;2. Hind III ;3. KpnI ;4. PstI ;5. SacI ;6. SmaI ;7. SspI ;M. Molecular weight marker (left √EcoRI - HindIII ,right √HindIII) .

LacZα 基因启动子, 因此, 为了证实克隆到的几丁酶基因是一个完整的基因, 即它含有自身的基因启动子且能被 *E. coli* 表达系统所识别, 将 pCHT1 的几丁酶基因片段用 PstI 切



I II
图 3 CHT1 的 Southern 杂交分析

Fig. 3 Southern hybridization analysis of CHT1

I. Agarose gel stained by ethidium bromide; II. Southern hybridization

Lanes in I and II :1~4. Total DNA of *B. circulans* digested by BamHI, EcoRI, HindIII and PstI, respectively.

5~11. Total DNAs of J1, J2, J3, D1, D2, D3, D4 digested by PstI, respectively.

M. Molecular weight marker (left λ /EcoRI-HindIII, right λ /HindIII)

下,插入 pUC19 的 PstI 位点,转化 *E. coli* DH5 α ,将转化子点种于 X-Gal 平板,选白色菌落提取质粒。利用 KpnI 酶切筛选含反向插入片段的重组子 pCHT1-R。将含反向插入片段的重组子点种于加氨苄青霉素(100 μ g/ml)的几丁质平板上,发现它也能产生透明的水解圈(图 1-3),说明 CHT1 含有完整的几丁酶基因,该基因启动子能够被 *E. coli* 表达系统所识别并发挥转录启动功能。经摇瓶培养的 *E. coli* DH5 α 转化菌株培养上清液中几丁酶活力最高可达 20.1u/ml,这也说明该几丁酶基因的启动子在 *E. coli* 中有较高的启动效率(结果另文发表)。

3 讨论

目前微生物几丁酶基因阳性克隆的常用筛选方法仍是点种法,即将转化子直接点种于几丁质平板上,通过观察水解圈的产生来筛选阳性克隆,而本研究采用先建立基因组文库,然后取部分文库样品与几丁质培养基混合后倒入下层为琼脂的平板中,再通过观察水解圈的产生筛选阳性克隆。这种方法与常用的点种法相比省去了大量的点种工作,一次性筛选量大,而且灵敏度也有所提高。同时,建立的基因组文库还可用于筛选其它基因。

迄今为止,从 *B. circulans* 中克隆到的几丁酶基因只有两个:Chi A1 和 Chi D,均是 Watanabe 等从一株 *B. circulans* WL-12 中克隆得到的^[8,9]。通过比较限制酶切图谱发现,CHT1 同 Chi A1 和 Chi D 有很大差别,Chi A1 和 Chi D 功能区内的 PstI 和 BamHI 位点均未在 CHT1 的功能区内发现,而 CHT1 中的 KpnI 和 SspI 位点则未在 ChiA1 和 ChiD 中发现,因此可以初步判定 CHT1 是一个来自于 *B. circulans* 的新几丁酶基因。其功能缺失分析和序列测定工作正在进行之中。另外,Watanabe 等^[8,9]通过比较 ChiA1,ChiD 和其它微生物的几丁酶基因的核苷酸序列后发现,几丁酶基因间的同源性较低,因此他们认为这可能是由于几丁酶基因在起源和进化上差异较大所致。本研究用 CHT1 作为探针同其它 7 种几丁酶产生菌总 DNA 杂交的结果均呈阴性的结果也符合这一说法。

参 考 文 献

- 1 Brogli K E. Dev Plant Pathol ,1993 **2** :411
- 2 Flach J ,Pilet P E ,Jolles P. Experientia ,1992 **48** :701
- 3 Logeman J ,Jach G. Dev Plant Pathol ,1993 **2** :446
- 4 Fuchs R L ,McPherson S A ,Drahos D J. Appl Environ Microbiol ,1986 , **51** :504
- 5 孙 迅,任 昶,刘德明等. 四川大学学报(自然科学版),1995 **32** :207
- 6 Sambrook J ,Fritsh E F ,Maniatis T. In :Molecular cloning :a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory ,1989 , New York
- 7 Yang R C A ,Mackenzier C R ,Bilous D ,Seligy V L. Appl Environ Microbiol ,1988 **54** :1023
- 8 Watanabe T ,Suzuki K ,Oyanagi W *et al.* Biol Chem ,1990 **15** :15659
- 9 Watanabe T ,Oyangi W ,Suzuki K *et al.* J Bacteriol ,1992 **174** :408

Molecular Cloning of a Chitinase Gene from *Bacillus circulans* C-2

Zheng Hongwu Wang Yanling Zhang Yizheng

(Department of Biotechnology ,Sichuan University ,Chengdu 610064)

Abstract The 2 ~ 10kb DNA fragments isolated from the PstI partially digested total DNA of *Bacillus circulans* C-2 was inserted into the PstI site of vector pUC19 ,and then the recombinant DNA was used to transform *Escherichia coli* . One chitinase gene-containing clone (named pCHT1) was selected from about 8000 recombinants on chitin overlay plates. Analysis of pCHT1 cut with 12 restriction enzymes showed that the inserted fragment in this clone was about 3.0kb in size and had one site for each of the three restriction enzymes :KpnI ,SacI and SspI. Cells harboring the recombinant plasmid (pCHT1-R) in which the insert had an inverted orientation also displayed chitinase activity indicating that the cloned fragment from *B. circulans* C-2 contained an intact chitinase gene , and its own promoter could be recognized by *E. coli* transcriptional system. Southern hybridization analysis proved that the inserted fragment of pCHT1 was really from the genome of *B. circulans* C-2 and there was only one copy existed in the genome. The fragment could not hybridize with the total DNAs from other seven chitinase-producing bacteria.

Key words *Bacillus circulans* chitinase gene gene cloning *Escherichia coli*