

野油菜黄单胞菌 S-152 遗传转移系统的 建立及外源性内切葡聚糖酶 基因在其体内的表达

蔡 勉 刘纯强 高培基

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘要 通过细胞接合的方式将广宿主质粒 pRK404、pKT230 和 RP4 分别转入野油菜黄单胞菌 S-152 中, 其转移频率均在 10^{-4} 数量级上, 从而建立起了 S-152 的转移系统。用同法将由载体质粒 pRK404 和白纹黄单胞菌 XA1-1 的 CMC 酶基因构成的重组质粒 pND82 转入到 S-152 中并得到了表达, 使 S-152 (pND82) 的胞内 CMC 酶酶活比出发菌株 S-152 提高了 1 倍。

关键词 野油菜黄单胞菌, 细胞接合, 遗传转移系统, 内切葡聚糖酶, 基因表达

Development of Genetic Transfer System and Expression of an Extraneous Endoglucanase Gene in *Xanthomonas* S-152

Cai Mian Liu Chunqiang Gao Peiji

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The wide-host-range plasmid vectors pRK404 and pKT230 were transferred into a recipient strain S-152 respectively by conjugation with the aid of the helper plasmid pRK2013 at frequencies of 10^{-4} , and a genetic transfer system for S-152 was developed. A recombinant plasmid pND82, constructed by combining the plasmid vector pRK404 with a chromosomal DNA fragment coding for CMCase from XA1-1, was introduced into S-152 by this transfer system. As a result, the intracellular CMCase activity of S-152 (pND82) increases 1 time in comparison with S-152.

Key words *Xanthomonas campestris*, Conjugation, Genetic transfer system, Expression of gene, Endoglucanase

纤维素的生物转化与利用对解决当前世界能源危机、粮食短缺和环境污染等问题具有重要意义。目前, 国内外均在尝试应用基因工程技术来改造、构建高效纤维素降解菌, 并已取得较大进展⁽¹⁾。野油菜黄单胞菌 S-152 具有较强的纤维素酶活性, 不论在基础理论研究还是在实际应用方面, 该菌都具有很好的应用前景⁽²⁾。我们选用了几种基因工程中常用的载体质粒, 建立起 S-152 的转移体系, 为应用基因工程手段改造、构建降解纤维素工程菌提供了有利条件。同时, 还成功地将已克隆到的白纹黄单胞菌 XA1-1 内切葡聚糖酶基因转移到 S-152 中并得到表达。

1 材料与 方法

1.1 菌种和质粒

野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) S-152, 由本所提供。

所用质粒为: pRK404 含抗四环素 (Tc^r) 基因; pKT 含抗链霉素 (Str^r)、抗卡那霉素 (Km^r) 基因; RP4 含抗氨基青霉素 (AP^r)、抗卡那霉素 (Km^r)、抗四环素 (Tc^r) 基因; pRK2013 含抗卡那霉素 (Km^r) 基因。

pND82 是由载体质粒 pRK404 和白纹黄单胞菌 (*Xanthomonas albiline*) XA1-1 的内切葡聚糖酶 (CMC) 基因构成的重组质粒⁽⁴⁾, 仍具有抗四环素基因活性。

1.2 培养基

EM 培养基 $MgSO_4$ 0.03%, $NaCl$ 0.01%, $CaCl_2$ 0.01%, $NaNO_3$ 0.25, K_2HPO_4 0.1%, $FeCl_3$ 0.01%, 葡萄糖 0.4%, pH 自然; LB 培养基⁽⁹⁾; CMC 酶检测培养基: LB: 0.3% 羧甲基纤维素 (CMC)。

1.3 细胞接合

基本上按 Puhler 法进行⁽⁹⁾。

将供体菌、质粒推动菌分别于含相应抗菌素的 LB 液体培养基 37℃ 振荡培养至对数期; 将受体菌 S-152 于 LB 液体培养基 30℃ 振荡培养至稳定期。取上述 3 种菌悬液各 0.1ml, 混合于醋酸纤维素微孔滤膜 (直径 25mm, 孔径 0.3 μ m) 上, 室温下干燥 2-3 小时; 将此滤膜平移至 LB 固体平板上, 30℃ 培养过夜。用生理盐水将菌苔洗下, 离心、洗涤 2 次, 最后悬浮于 2ml 生理盐水中。取此悬液 0.2ml 涂布于含相应抗菌素的 EM 平板上, 30℃ 培养 3 天以上, 以筛选相应的接合子; 同时取此悬液系列稀释, 涂布于含相应抗菌素的 LB 平板上, 37℃ 培养 2 天, 以求出原悬液中供体菌浓度。

接合率按下列公式计算:

$$Tf = \text{每 ml 中接合子数} / \text{每 ml 中供体菌数}$$

1.4 质粒的提取及电泳

质粒提取、琼脂糖凝胶电泳等均按 Birnboim 法⁽³⁾进行。

1.5 转化

按 Morrison 法⁽⁸⁾转化受体菌, 在含相应抗菌素的 LB 平板上筛选转化子。

1.6 CMC 酶的平板检测

按 Teather 法⁽¹⁰⁾进行, 具有 CMC 酶活性菌, 其菌落周围可形成黄色透明圈。

1.7 CMC 酶酶液的制备

将待测菌株于 200ml 含 0.3% CMC 和相互抗菌素的液体 LB 培养基中 30℃ 振荡培养至稳定期, 离心, 上清液为胞外酶酶液; 菌体用生理盐水洗涤 3 次后, 分别称其菌泥湿重, 然后分别悬浮于约 20ml 无菌水中, 使各待测菌菌体浓度基本一致, 便于相互间比较。将上述各菌悬液置于液氮 (-196℃) 处理 5' 以上, 室温下融化, 10, 000rpm 离心 5', 上清液即为胞内酶酶液。

1.8 CMC 酶酶活测定

CMC 酶酶活按 Liu, C-Q 法⁽⁵⁾进行测定, 将混有 1ml 含 10g/L CMC 的 McIlvaine 缓

冲液、0.5ml 酶液、0.5ml 蒸馏水的混合液于 37℃ 保温 30', 加入 3ml DNS 试剂终止反应, 立刻置 100℃ 沸水中煮沸 10', 稀释 1 倍后于 575nm 处测定光吸收值。酶液的蛋白含量按 Lowry 法进行测定⁽⁶⁾。

胞内 CMC 酶以每毫克酶蛋白每分钟水解 CMC 产生的葡萄糖微克分子数表示酶活力; 胞外 CMC 酶以每毫克湿菌体每分钟水解 CMC 产生的葡萄糖微克分子数表示酶活力。

1.9 质粒的稳定性

在不相应抗菌素的非选择性 LB 液体培养基中连续转换、培养 3 次, 使其繁殖约 50 代, 然后在 LB 平板上划线得单菌落若干, 将这些单菌落点种在含相应抗菌素的 LB 平板上, 30℃ 培养 4 天以检测其抗性。

2 实验结果

2.1 野油菜黄单胞菌 S-152 遗传转移系统的建立

选用了广宿主载体质粒 pRK404 (Tc^r), pKT230 (Str^r, Km^r), RP4 (Ap^r, Km^r, Tc^r) 等, 在推动质粒 pRK2013 (Km^r) 的参予下, 通过细胞接合的方式转移进入 S-152, 结果表明 (见表 1), 它们均可被转移到 S-152, 转移频率均在 10⁻⁴ 数量级上, 符合基因操作的要求。质粒 RP4 虽然能以较高的频率转入 S-152 中, 但其分子量较大 (60kb), 不宜进行基因操作。质粒 pRK404 和 pKT230 将是 S-152 较理想的克隆载体。

表 1 载体质粒和重组质粒转入受体 S-152 的接合转移频率

| 供体菌 | 受体菌 | 质粒推动菌 | 筛选接合子用培养基 | 转移频率 |
|--|-------|----------------------------------|-------------|------------------------|
| JM83 (pRK404Tc ^r) | S-152 | ED8654 (pRK2013Km ^r) | EM+Tc | 1.7 × 10 ⁻⁴ |
| SP1659 (pKT230 Str ^r , Km ^r) | S-152 | ED8654 (pRK2013Km ^r) | EM+Str+Km | 1.6 × 10 ⁻⁴ |
| <i>E.coli</i> (RP4 Ap ^r , Km ^r , Tc ^r) | S-152 | — | EM+Ap+Km+Tc | 3.0 × 10 ⁻⁴ |
| HB101 (pND82 Tc ^r) | S-152 | ED8654 (pRK2013Km ^r) | EM+Tc | 8.0 × 10 ⁻⁶ |

2.2 在 S-152 中引入外源性内切葡聚糖酶 (CMC 酶) 基因

我们已从白纹黄单胞菌 XA1-1 中克隆到了一个 CMC 酶基因, 并克隆至 pRK404 上, 得到 pND82。质粒 pRK404 可通过接合进入 S-152, 同法将 pND82 转入该菌, 得到接合子 S-152 (pND82)。但转移频率明显下降 (见表 1)。

分别提取接合子 S-152 (pRK404), S-152 (pND82)、供体菌 JM83 (pRK404), HB101 (pND82)、受体菌 S-152 及含推动质粒菌 ED8654 (pRK2013) 的质粒, 电泳, 发现从黄单胞菌接合子中分离得到的质粒电泳效果较差, 难以与供体菌质粒带进行比较。为了证明接合子的质粒的确来自原供体菌, 提取接合子 S-152 (pRK404) 和 S-152 (pND82) 的质粒, 分别转化 HB101, 得到相应的转化子 HB101 (pRK404) 和 HB101 (pND82), 再提取转化子的质粒, 电泳, 发现转化子质粒的分子量与原供体菌的质粒一致 (见图 1); 别将转化子 HB101 (pRK404) 和 HB101 (pND82) 分别接种于 CMC 平板上检测, 发现后者形成了黄色透明圈, 而前者没有形成透明圈, 这充分说明转化子及接合子质粒均是来自原供体菌。

2.3 外源性 CMC 酶基因在 S-152 中的表达

为检测外源性 CMC 酶基因在 S-152 体中的表达水平,测定了 S-152、S-152 (pRK404) 和 S-152 (pND82) 的 CMC 酶活,结果见表 2。由此表可以看出:3 株菌胞外 CMC 酶酶活基本一致;S-152 和 S-152 (pRK404) 的胞内 CMC 酶酶活也基本相同,而 S-152 (pND82) 的胞内 CMC 酶酶活明显高于其它二株菌,约为它们的 2 倍。以上结果表明,具有载体质粒并不影响 S-152 的 CMC 酶活,S-152 (pND82) 胞内 CMC 酶酶活的提高可能是由于 XA1-1 的 CMC 酶基因在 S-152 中表达所致,但其胞外 CMC 酶酶活并没有提高。

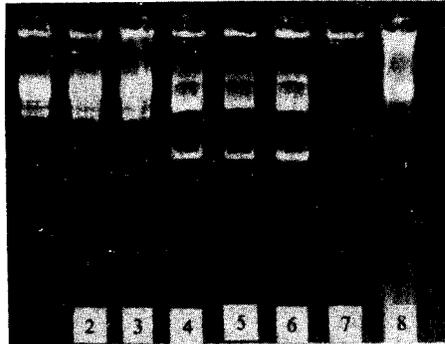


图 1 各供体菌及转化子的质粒电泳图谱

1 和 3. 转化子 HB101 (pRK404) 的质粒; 2. 原供体菌 JM83 (pRK404) 的质粒; 4 和 6: 转化子 HB101 (pND82) 的质粒; 5. 原供体菌 HB101 (pND82) 的质粒; 7. 转化受体菌 HB101 的质粒; 8. 含推动质粒菌 ED8654 (pRK2013) 的质粒。

表 2 出发菌株及各重组菌株的 CMC 酶酶活水平

| 菌 株 | 胞内 CMC 酶活 | 胞外 CMC 酶活 |
|----------------|-----------|-----------|
| S-152 | 0.889 | 0.126 |
| S-152 (pRK404) | 0.991 | 0.120 |
| S-152 (pND82) | 1.939 | 0.122 |

注: 胞内 CMC 酶酶活单位为 $\mu\text{mol Glu} / \text{mg pro} \cdot \text{min}$; 胞外 CMC 酶酶活单位为 $\mu\text{mol Glu} / \text{mg 菌体} \cdot \text{min}$ 。

2.4 重组菌株的稳定性

将在不含相应抗菌素 Tc 的非选择压力条件下,培养 S-152 (pRK404) 和 S-152 (pND82) 约 50 代后得到的单菌落,依次接种在 LB+Tc 平板上,30℃ 培养 4 天,以检测其重组菌株的稳定性。结果 (表 3) 表明,质粒 pRK404 和 pND82 在 S-152 中的稳定性均较差,特别是 pND82。因此,若要使 pRK404 和 pND82 在 S-152 中稳定地遗传下去,必须在含有相应抗菌素 Tc 的选择压力条件下进行培养。

表 3 各重组菌株的稳定性

| 菌 株 | 点种菌落数 | 在 LB+Tc 平板上生长的菌落数 | 质粒稳定率 |
|----------------|-------|-------------------|-------|
| S-152 (pRK404) | 161 | 141 | 87.6% |
| S-152 (pND82) | 153 | 16 | 10.5% |

3 讨 论

建立起菌株的转移系统是运用基因工程技术改造、构建工程菌的先决条件。我们通过细胞接合的方式将 pRK404 等几种常用的广宿主载体质粒成功地转移到受体菌 S-152 中去, 其转移频率在 10^{-4} 数量级上, 符合基因操作的要求。我们选择 pRK404 为载体质粒, 在克隆到一个白纹黄单胞菌 XA1-1 和 CMC 酶基因, 得到重组质粒 pND82 后, 用细胞接合的方式将此重组质粒转移到 S-152 中去, 且外源性 CMC 酶基因在 S-152 中得到了一定程度的表达, 从而使 S-152 (pND82) 的 CMC 酶酶活比出发菌株 S-152 提高了 1 倍, 这表明白纹黄单胞菌 XA1-1 CMC 基因的启动子可被 S-152 的 RNA 聚合酶识别, 但 S-152 (pND82) CMC 酶酶活的增加似乎只限于胞内酶, 对胞外 CMC 酶则没有明显影响, 这可能是由于 pND82 不携带 XA1-1 的与 CMC 酶分泌有关的完整基因, 或 XA1-1 的这种分泌基因与 S-152 的有一定的差异, 不为后者所识别。再者, 载体质粒 pRK404 在结合上外源片段后, 其转移频率和稳定性均有显著的下降, 在非选择条件下连续培养 50 代左右, 重组菌株的稳定性仅为 10.5%, 重组菌株的 CMC 酶酶活也必然会随着重组质粒的丢失而相应下降。这种不稳定性可能是由于外源片段的插入干扰了载体质粒 pRK404 的复制和分配所致。

参 考 文 献

- (1) 刘纯强等, 1991. 生物工程进展, 11 (3): 8-15.
- (2) 汪天虹等, 1991. 遗传, 13 (3): 16-20.
- (3) Birnboim H C, *et al*, 1979. Nucleic Acids Res., 7 (6): 1513-1523.
- (4) Liu C-Q, 1988. In: Cloning and expression of genes involved in cellulosic bioconversion, Ph.D. thesis, University of New South Wales. pp. 118.
- (5) Liu C-Q, 1988. In: Cloning and expression of genes involved in cellulosic bioconversion, Ph.D. thesis, University of New South Wales. pp. 49-50.
- (6) Lowry D H, *et al*, 1951. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- (7) Maniatis T, *et al*, 1982. In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual. By Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 68.
- (8) Morrison D A, 1977. J. Bacteriol., 132: 349-351.
- (9) Pühler A, *et al*, 1984. In: Advanced Molecular Genetics. By Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 9-12.
- (10) Teather R M, *et al*, 1982. Appl. Environ. Microbiol., 43: 777-780.

本文于 1991 年 12 月 10 日收到。

第一届全国人类遗传学术讨论会简介

〔本刊讯〕中国遗传学会人类遗传委员会于 1993 年 10 月 26-28 日在南京师范大学召开了第一届全国人类遗传学术讨论会。来自全国二十个省市自治区的 60 名代表出席了会议。

大会组织的 12 个专题报告, 内容丰富, 介绍了国内国际的进展。有 27 篇论文在分组会上进行了交流。提交会议的论文基本上反映了国内近年来人类遗传学研究的现状。青年学者的积极参与, 活跃了会议气氛。这次会议上他们的论文都具有较高的学术水平, 有几位还作了大会报告。会议期间, 人类遗传专业委员会还召开了会议, 杜若甫、杜传书、张思仲、孙开来、张贵寅、吕学洗、高翼之、郭亦寿、黄尚志等同志出席了会议。