

沼气池宏基因组文库中未培养微生物 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与鉴定

唐咸来^{1,2}, 车志群^{1,3,4}, 李双喜^{1,3,4}, 蒋建林^{1,3,4},
罗奉奉^{1,3,4}, 武波^{1,3,4}

(1. 广西大学 生命科学与技术学院, 南宁 530005; 2. 广西壮族自治区科学技术厅, 南宁 530005; 3. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530005; 4. 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室, 南宁 530005)

摘要: 以间接提取法提取了沼气池样品的微生物宏基因组 DNA, 用柯斯质粒载体 pWEB;TNC 构建了一个含三万个克隆的沼气池宏基因组文库, 对文库中的克隆随机分析表明, 该文库的外源片段平均长度为 40 kb, 文库的总容量为 1.2×10^6 kb. 对其中的一个在七叶苷平板上显色的阳性克隆 pGXN100 进行进一步亚克隆、测序和序列分析。结果表明, pGXN100 上有一个全长为 1 863 bp 的 ORF, 编码 621 个氨基酸组成的蛋白质。将该基因命名为 Unglu100。与产气克雷伯菌属的一个 β -葡萄糖苷酶基因 AN292 在核苷酸和氨基酸水平上分别有 76% 和 85% 的同源性, 利用 SMART 软件进行预测表明, Unglu100 可能是 PTS 中 β -葡萄糖苷酶特异性的转运蛋白组件。

关键词: 沼气池; 宏基因组文库; β -葡萄糖苷酶

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)06-0790-05

Cloning and identification of β -glucosidase gene of uncultured microorganisms from biogas digester

TANG Xian-Lai^{1,2}, CHE Zhi-Qun^{1,3,4}, LI Shuang-Xi^{1,3,4},
JIANG Jian-Lin^{1,3,4}, LUO Feng-Feng^{1,3,4}, WU Bo^{1,3,4}

(1. College of Life Science and Biotechnology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. The Science and Technology Department of Guangxi, Nanning 530005, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, Nanning 530005, China; 4. Key Laboratory of Education Ministry for Microbial and Plant Genetic Engineering, Nanning 530005, China)

Abstract: The metagenomic DNA of uncultured microorganisms from biogas digester was extracted by indirect extraction, end-blunted and ligated with cosmid vector of pWEB;TNC. A metagenomic library containing 30 000 clones was constructed, the stochastic Analysis of the library indicated that: the average size of the foreign DNA fragments was 40 kb and the capacity of the DNA cloned in the library was 1.2×10^6 kb. One of the positive clones pGXN100 that show black hydrolysis circles in Esculin plates was subcloned, sequenced and analysed. The results showed that the putative β -glucanase gene had a 1 863 bp ORF, encoding a protein with 620 amino acids sharing 76% and 85% identity with another β -glucanase gene AN292 for DNA and protein levels respectively. The structure functional domain analysis of Unglu100 using SMART software showed it maybe one of beta-glucoside specific PTS system transport proteins.

Key words: biogas digester; metagenome; β -glucosidase

收稿日期: 2008-06-25 修回日期: 2008-08-17

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 033002-5)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(033002-5)]

作者简介: 唐咸来(1967-),男,广西灌阳县人,博士,主要从事分子生物学研究,(E-mail)xl_tang163@163.com.

纤维素是由 D-葡萄糖以 β -1,4 糖苷键连接而成的直链状大分子,是自然界中分布最广、含量最为丰富的碳水化合物,也是地球上最大量的可再生性天然资源,但纤维素复杂的内部结构却造成绝大部分难以被分解利用。纤维素酶(cellulase)是一类能协同作用将纤维素降解生成葡萄糖的一组酶的总称,主要分为 3 类:内切葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase, EC3. 2. 1. 4)、外切葡聚糖酶(exo-1,4- β -D-glucanase, EC3. 2. 1. 91)、 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC. 3. 2. 1. 21) (Lynd 等,2002)。纤维素的降解是一个复杂过程,其最大特点是协同作用,内切葡聚糖酶首先随机水解纤维素内部的 β -1,4 糖苷键,产生大量带非还原性末端的小分子纤维素,外切葡聚糖酶从这些非还原性末端上依次水解 β -1,4 糖苷键,生成纤维二糖及其它低分子纤维糊精,在 β -葡萄糖苷酶的作用下水解生成葡萄糖分子(Tomme 等,1995)。

沼气是 21 世纪生物能源的主要形式之一,而纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶在沼气厌氧发酵过程中具有催化纤维素类物质水解生成葡萄糖的重要作用,是纤维素降解的关键限速酶,极大的限制了其降解效率和产气速率(Anish 等,2007),并且也是一类在食品(Belancic 等,2003),农业(Verdoucq 等,2004),医药(Liou 等,2006;Sun 等,2005)上具有广泛用途的优势酶。目前国际上对来自于完全厌氧的环境下的工业沼气池中的 β -葡萄糖苷酶的研究暂时没有。该课题利用土壤宏基因组学技术,首先构建高容量的来自于农村自用沼气池的未培养微生物宏基因组文库,集中开发厌氧体系环境下的 β -葡萄糖苷酶基因资源,同时为进一步利用具有良好的生化性质的酶基因构建优势基因工程菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株和质粒 本工作所用细菌菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基、培养条件和抗生素及其用量 文库构建使用 LB 和 LA 培养基, β -葡萄糖苷酶的筛选采用含有 0.1% 七叶苷和 0.25% 柠檬酸高铁铵的 LA 培养基。液体培养于 37 °C 摇床震荡培养(200 rpm),平板培养于 37 °C 恒温箱倒置培养。氨苄青霉素的使用终浓度为 100 μ g/mL,氯霉素的使用终浓度为 12 μ g/mL。

1.1.3 酶和试剂 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、pGEM-Teasy 载体等购自 Promega 公司,文库构建试剂盒购自 Epicentre 公司,PVPP、Sephadex G200 和七叶苷等购自 sigma 公司。其他均为国产分析纯试剂。

1.1.4 样品 来源于南宁市武鸣县农村自用沼气池。

表 1 供试细菌菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strains or plasmids	有关特性 Relevant attributes	参考文献 或来源 Reference or sources
菌株 Strains		
Escherichia coli DH5 α	SupE44, Δ lacU169 (ϕ lacZ Δ M15)hsd R17 recAendA1 gyrA96 yhilrelA1	参考文献(Boyer 等,1969)
Escherichia coli EPI100	recA1, endA1, F-, mcrA, Δ (mrr2hsdRMS2mcrBC), ϕ 80d, lacZ Δ M15, Δ lacX74, araD139, Δ (ara, leu) 7697 galU, gal K λ -, rpsL, nupG	Epicentre 公司
质粒 Plasmids		
pWEB::TNC	Cosmid 载体, Amp ^r , Chl ^r	Epicentre 公司
pGEM-3Zf (+)	克隆载体, Amp ^r	本实验室保存
pGXN100	pWEB::TNC 上克隆有 35kb 外源 DNA, 表达 β -葡萄糖苷酶活性	本工作
pGXN1001	pWEB :: TNC 上克隆有 pGXN100 8kb 外源 DNA, 表达 β -葡萄糖苷酶活性	本工作
pGXN1002	pWEB :: TNC 上克隆有 pGXN1001 4.8kb 外源 DNA, 表达 β -葡萄糖苷酶活性	本工作

1.2 方法

1.2.1 宏基因组 DNA 的提取、纯化和回收 能否获得高质量环境样品中的 DNA 是宏基因组文库构建的关键之一,其提取方法主要分为 2 种:直接和间接提取法,沼气池宏基因组文库总 DNA 的提取采用间接提取法。先采用物理方法将微生物细胞从样品中分离出来,然后用较温和的方法抽提 DNA,此法可获得较大片段的 DNA(20-200kb)且纯度较高。

得到的 DNA 样品过 Sephadex G200(含有 2% PVPP)层析柱进一步出去腐殖酸(Yong 等,1993),将已经纯化过的 DNA 样品采用电洗脱法回收大小适中的片段,已备后续实验用。

1.2.2 16sDNA 文库的构建和生物信息学分析 以沼气池宏基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCA-3'(E. coli bases

8 to 27)和 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'(E. coli bases 1507 to 1492)(Medlin 等,1988),采用常规的 PCR 反应体系,扩增细菌的 16S rDNA 片段。回收 PCR 产物后,以 pMD18-T Vector 为载体构建 16S rDNA 文库(蒋建林等,2008)。

1.2.3 沼气池宏基因组文库的构建 沼气池宏基因组文库的构建参照 Epicentre 公司 pWEB; TNC Cosmid Cloning Kit 试剂盒产品说明书。回收 30-50kb 的 DNA 片段并未端补平后,与 cosmid 载体连接、包装、侵染宿主菌 Ep I 100,侵染产物涂板后用

于构建文库

1.2.4 文库中 β -葡萄糖苷酶活性克隆的筛选 将文库克隆点板到含 0.1% 七叶苷和 0.25% 的柠檬酸高铁铵的 LA 平板上,培养 12~16 h 后,用氯仿熏蒸 15 min,37 °C 放置 2 h,菌落周围显黑色即为阳性克隆。

1.2.5 系统进化树构建 β -葡萄糖苷酶 Unglu100 的氨基酸序列 GenBank 和 Cazy 上登陆的部分 β -葡萄糖苷酶的氨基酸序列(表 2)用 ClustalX1.8 软件进行完全比对,将比对结果用系统进化分析软件 Mega2.1 分别进行 Neighbor-joining(NJ)分析,绘

表 2 系统进化分析所用的 β -葡萄糖苷酶
Table 2 β -glucosidase used for phylogenetic analysis

登录号 Accession No	来源微生物 Source microorganisms	蛋白质 Protein
YP_001177456	<i>Enterobacter</i> sp. 638	beta-glucoside-specific PTS system components IIABC
AAB51563	<i>Klebsiella oxytoca</i>	cellobiose-specific PTS permease
ABG73228	<i>Klebsiella aerogenes</i>	beta-glucoside transport protein
ZP_00834553	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909	Phosphotransferase system IIC components
AAS55458	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. BglP <i>Carotovorum</i>	BglP
NP_756502	<i>Escherichia coli</i> CFT073	beta-glucoside-specific PTS system components IIABC
ZP_03050186	<i>Escherichia coli</i> E110019	PTS system, beta-glucoside-specific IIABC component
NP_463560	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	hypothetical protein lmo0027
NP_464265	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	hypothetical protein lmo0738

制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 沼气池未培养微生物总 DNA 的提取和纯化

用间接提取法获得的沼气池宏基因组总 DNA,经 Sephadex G200(含有 2% PVPP)层析柱进一步纯化和透析袋电洗脱回收后如图 1 所示。

2.2 沼气池宏基因组文库的构建和筛选

该文库包含约三万个克隆,随机抽取其中 14 个克隆用 BamH I 进行酶切分析,结果显示所有的质粒酶切带型各不相同,说明文库克隆的 DNA 片段随机性比较强。文库中外源片段的最大长度为 61 kb,最小长度为 20 kb,平均长度为 40 kb,文库的总容量为 1.2×10^6 kb。将文库克隆点板到含 0.1% 七叶苷和 0.25% 的柠檬酸高铁铵的 LA 平板上进行 β -葡萄糖苷酶活性筛选。

2.3 β -葡萄糖苷酶活性克隆 pGXN100 及其蛋白 Unglu100 的鉴定

选择其中表达活性最强的克隆 pGXN100 进行亚克隆,最后将 β -葡萄糖苷酶基因定位在 2.2 kb 的

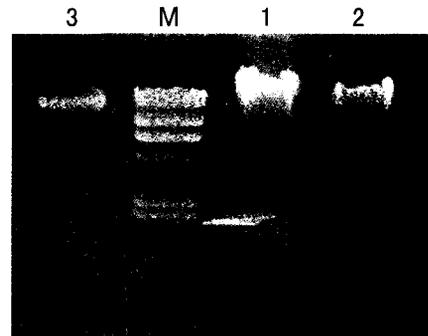


图 1 沼气池样品中未培养微生物总 DNA
Fig. 1 The extracted metagenomic DNA of uncultured microorganisms from biogas digester

M:23kb; 1:粗提的沼气池宏基因组 DNA; 2:经 SephadexG200 纯化的宏基因组 DNA; 3:经电透析回收的宏基因组 DNA
M:23kb; 1. the raw metagenomic DNA from biogas digester; 2. the metagenomic DNA purified by SephadexG200; 3. the metagenomic DNA recovered by electroelution.

DNA 片段上,并送交大连宝生物公司进行测序。结果分析表明,该 DAN 片段上由一个全长为 1 863 bp 的开放阅读框(open reading frame ORF),并将此基因命名为 unglu100。

Vector NTI 软件分析 unglu100 基因 G+C 含

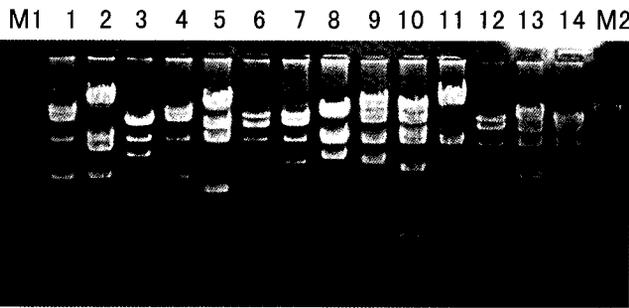


图 2 沼气池宏基因组文库中重组质粒的 BamH I 酶切分析

Fig. 2 Recombinant plasmids from biogas digester metagenomic library digested with BamH I
M1: 1kb Mark; M2: 23kb Mark; 1-14: Recombinant plasmids digested with BamH I.

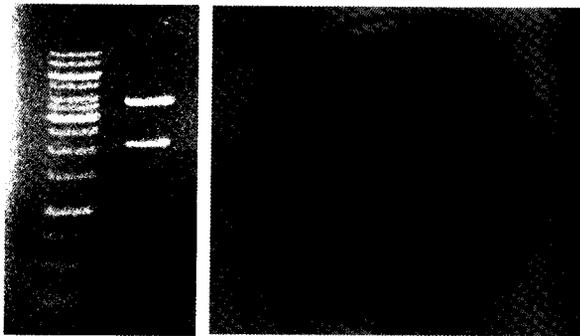


图 3 具有 β -葡萄糖苷酶活性的阳性克隆及其最小亚克隆质粒的酶切带型

Fig. 3 The clones which show β -glucosidase activity and the restriction pattern of the smallest sub-clone plasmid

量为 71%，其编码蛋白由 621 个氨基酸组成，蛋白的分子质量(Mw)和等电点(PI)分别为 65kD 和 5.69。与来源于产气克雷伯菌属的一个 β -葡萄糖苷酶基因 AN292 在 DNA 和氨基酸水平上分别有 76%和 85%的同源性。

Unglu100 蛋白的氨基酸序列，经 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de>)对其功能结

构域进行分析后显示：该蛋白 N 端 7-41、108-393、468-600 个氨基酸区域存在的 PFAM 结构分别和依赖于磷酸烯醇丙酮酸的磷酸转移酶系统(PTS)的糖基转运蛋白 PTS-EIIB、PTS-EIIC、PTS-EIIA-1 具有高度相似性，由此，我们得出结论，Unglu100 蛋白的催化功能域可能和磷酸转移酶系统(PTS)中的糖基转运活性等功能有直接的密切的关系。

2.4 系统进化分析

系统进化(图 5)显示 Unglu100 与肠杆菌属处于同一组中，和克雷伯氏菌属三者亲源关系最近；Unglu100 与耶尔森菌属、果胶杆菌属在进化树上相对较远；与埃希杆菌属、李斯特菌属在进化树上相对较远。该结果与 Blastx 分析的 Unglu100 基因编码产物与肠杆菌属的 β -葡萄糖苷酶特异性的 PTS 系统组件 IIABC 的同源性最高的结果相符。据此可以推断 Unglu100 蛋白可能是 PTS 中 β -葡萄糖苷酶特异性的转运蛋白组件。

3 讨论

在能源危机日益严重的情况下，沼气做为 21 世纪生物能源的主要形式正得到广泛的推广和利用(中国生物产业发展战略研究课题组,2004)。其内容物主要为动物粪便、农作物秸秆等纤维素物质，但由于纤维素内部结构的复杂性使其较难于降解，需要内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶等多种纤维素酶的协同作用才能完成(Lange & Ahring,2001)。而 β -葡萄糖苷酶在沼气厌氧发酵过程中具有催化纤维素类物质水解生成葡萄糖的重要作用，是纤维素降解的关键限速酶，极大的限制了其降解效率和产气速率。因此，开发耐热性稳定和高活性的 β -葡萄糖苷酶对于大中型沼气工程的工业化生产具有重大的理论和实际生产意义。

当前在 β -葡萄糖苷酶基因的克隆和鉴定方面，国内外的主要方法是从纤维素被活跃降解的环境中

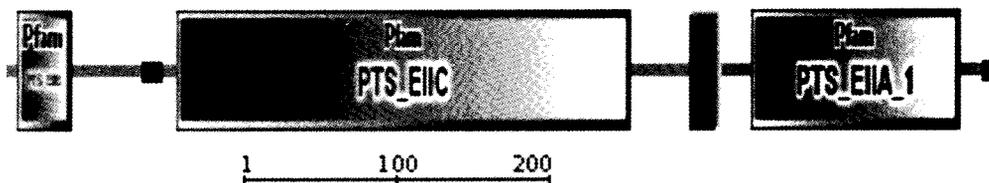


图 4 Unglu100 蛋白的功能结构域分析

Fig. 4 The structure functional domain analysis of Unglu100 protein

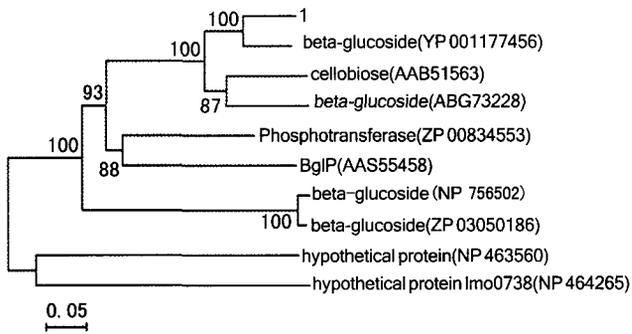


图5 Unglu100蛋白的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of Unglu100 protein

分离纯化产酶活性微生物,对所得的菌株鉴定并对其产酶条件及酶学特性等进行研究后,在进一步用分子生物学的方法对其进行克隆、鉴定和表达。而在自然界中超过99%的未培养微生物组成了地球上生物多样性的主体(Amann等,1995),所以长期以来微生物的纯培养方法严重地限制了我们对微生物的视野,使得微生物的多样性资源难以得到全面的开发和利用。自从1998年Handelsman等人提出宏基因组(Metagenome)的概念以来,宏基因组技术在开发未培养微生物以及功能基因、活性物质等方面应用非常广泛(Schmeissor等,2007;Howard等,2006;Lorenz & Eck,2005;Daniel,2005;Steele & Streit,2005),目前已经成功构建了土壤(eg:红树林土壤)(蒋云霞等,2007)、海洋(eg:海底污泥)(任海霞等,2006)、人唾液和牛的瘤胃(赵广存等,2005)等环境样品的宏基因组文库,但现在未见有构建沼气池宏基因组文库并获得纤维素酶基因的报到。本研究从沼气池中提取宏基因组DNA并以此构建文库,并以从中筛选到的一个活性较强的 β -葡萄糖苷酶克隆为研究对象,对其进行了克隆和表达,待 β -葡萄糖苷酶在沼气发酵过程中的基因功能得阐明后,我们就可以利用这些具有良好生理生化性质的酶基因来构建优势高效的基因工程菌,通过开发功能基因资源来缓和21世纪能源危机的现象。

参考文献:

- 中国生物产业发展战略研究课题组. 2004. 抓住机遇积极推进我国生物产业的发展. 宏观经济研究,12:3-7
- 任海霞,王三英. 2006. WP2 深海细菌宏基因组文库的构建和克隆子测序比对分析[J]. 厦门大学学报·自然科学版,45(21):184-189
- 赵广存,段承杰,庞浩. 2005. 牛瘤胃未培养细菌中一个 β -葡萄糖

- 糖苷酶基因 umbgl3A 的克隆及鉴定[J]. 西南农业学报,18(4):472-476
- 蒋云霞,郑天凌. 2007. 天然红树林土壤微生物大片段宏基因组文库的构建[J]. 环境科学,28(11):2609-2614
- 蒋建林,周权能,车志群, et al. 2008. PCR-RFLP 技术分析沼气池厌氧活性污泥细菌的多样性[J]. 广西农业科学
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiol Rev,59(1):143-169
- Anish R, Rahman MS, Rao M. 2007. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims[J]. Biotechnol Bioeng,96(1):48-56
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli* [J]. J Molecular Biology,41:459-472
- Daniel R. 2005. The metagenomics of soil[J]. Nat Rev Microbiol,3(6):470-478
- Howard EC, Henrikson JR, Buchan A, et al. 2006. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean[J]. Science,314(5799):649-652
- Lange M, Ahring BK. 2001. A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic *Archaea*[J]. Fems Microbiol Rev,25(5):553-571
- Liou B, Kazimierczuk A, Zhang M, et al. 2006. Analyses of variant acid beta-glucosidase: effects of Gaucher disease mutations[J]. J Biol Chem,281(7):4242-4253
- Lorenz P, Eck J. 2005. Metagenomics and industrial applications [J]. Nat Rev Microbiol,3(6):510-516
- Lynd LR, Weimer PJ, Van ZWH, et al. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiol Mol Biol Rev,66(3):506-577
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, et al. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16 S2 like ribosomal RNA 2 coding regions[J]. Gene,71(2):491-500
- Schmeissor C, Steele H, Streit WR. 2007. Metagenomics: biotechnology with non-culturable microbes[J]. Appl Microbiol Biotechnol,75(5):955-962
- Steele HL, Streit WR. 2005. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology[J]. Fems Microbiol Lett,247(2):105-111
- Sun Y, Quinn B, Witte DP, et al. 2005. Gaucher disease mouse models: point mutations at the acid beta-glucosidase locus combined with low-level prosaposin expression lead to disease variants[J]. J Lipid Res,46(10):2102-2113
- Tomme P, Warren RA, Gilkes NR. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi[J]. Adv Microbiol Physiol,37:1-81
- Verdougq L, Moriniere J, Bevan DR, et al. 2004. Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases: novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase with strict specificity, in complex with its natural substrate[J]. J Biol Chem,279(30):31796-31803
- Yong C, Burghoff RL, Keim LG, et al. 1993. Polyvinylpyrrolidone gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction amplifiable DNA from soils [J]. Appl Environ Microbiology,59:1972-1974