

## 瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的分离与鉴定

汪天虹 Merja Penttilä\* 高培基 王春卉 钟 玲

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南山东 250100)

(VTT, 生物技术与食品研究所, FIN-02044 芬兰)\*

**摘 要** 将在木聚糖上生长的瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)RutC-30 的 cDNA 文库全部质粒转化已携带有毕赤氏酵母(*Pichia stipitis*)木糖还原酶基因的重组酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 H475, 在 H475 中构建了瑞氏木霉的 cDNA 表达亚文库。在以木糖为唯一碳源的选择性酵母合成培养基上, 从该亚文库中筛选到瑞氏木霉木糖醇脱氢酶 cDNA 基因, 该基因片段长为 1.3kb。Southern、Northern 印迹杂交分析和蛋白质凝胶电泳结果表明该基因确实来源于瑞氏木霉, 所编码蛋白质分子量约为 40kDa。携带有毕赤氏酵母木糖还原酶和瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的重组酵母能够在以木糖为唯一碳源的培养基上生长, 并能将 90% 以上的木糖转化为木糖醇、乙醇和其它副产品。

**关键词** 瑞氏木霉, 木糖醇脱氢酶基因, 酿酒酵母, 木糖  
学科分类号 Q933

D-木糖是木质纤维素中大量存在的一种五碳糖, 是自然界最丰富的糖类之一, 对它的生物转化具有重要的经济意义<sup>[1,2]</sup>。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)传统地被酿酒工业应用于从六碳糖生产酒精, 并作为宿主菌生产多种外源蛋白<sup>[3,4]</sup>。酿酒酵母具有木酮糖磷酸化酶, 能利用木酮糖, 但缺乏代谢木糖的能力<sup>[5]</sup>, 因其缺乏由木糖经木糖醇进入代谢途径的头两个酶——木糖还原酶(XR)(E. C. 111. 139)和木糖醇脱氢酶(XDH)(E. C. 1. 1. 1. 9)。已有把毕赤氏酵母(*Pichia stipitis*)的木糖还原酶基因引入酿酒酵母细胞的报道<sup>[6,7]</sup>。但该菌株不能在以木糖为唯一碳源的培养基上生长。因其缺乏进一步代谢木糖醇的酶——木糖醇脱氢酶。

瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)是自然界中广泛分布的腐生性丝状真菌, 传统地被应用于生产各种酶制剂, 如纤维素酶、淀粉酶、果胶酶、蛋白酶、脂肪酶等, 其工业规模的生产工艺已比较成熟。在基因工程研究中, 现已被作为宿主菌生产外源蛋白<sup>[8]</sup>。在本研究中, 我们利用了酿酒酵母能表达外源基因的能力, 在以木糖为唯一碳源的选择性合成培养基上, 从瑞氏木霉 RutC-30 cDNA 表达亚文库中成功地筛选到瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因并对该基因进行了鉴定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株、载体和培养基

以酵母-大肠杆菌穿梭质粒 pAJ401<sup>[9]</sup>(5.55kb 带有选择标记 URA3, 2 $\mu$  质粒复制起

点及酿酒酵母 PGK 启动子和终止子)为载体,以大肠杆菌 JS4 为宿主菌,构建了在木聚糖上生长的瑞氏木霉 VTT-D-86271(Rut C-30)的 cDNA 文库。文库构建过程中,cDNA 片段两端设计有 EcoRI 和 XhoI 位点。带有酵母表达质粒 pUA103<sup>[10]</sup>(10.7kb,其上插入有 *P. stipitis* 木糖还原酶基因,选择标记 SC<sup>[11]</sup>-Leu)的重组酵母 H475<sup>[12]</sup>作为筛选木糖醇脱氢酶基因的宿主菌。酿酒酵母 H550<sup>+</sup>(带有两个酵母表达质粒:pUA103 和 pYEP-XYL2,其上分别带有 *P. stipitis* XR 与 XDH 基因)作为正对照菌株,筛选标记 SC-Leu-Ura。H158 是构建 H475 时的原始宿主菌。*E. coli*DH5 $\alpha$  为质粒制备宿主菌。*S. cerevisiae* HX1 菌株为本实验筛选得到的重组酿酒酵母菌株,携带有 *P. stipitis* XR 和 *T. reesei* XDH 基因,选择标记 SC-Leu-Ura,为 6.85kb。

## 1.2 瑞氏木霉 cDNA 亚文库的建立及木糖醇脱氢酶基因的分离

用 QIAGEN 试剂盒大量制备构建在 *E. coli*JS4 菌株中的 *T. reesei* cDNA 文库质粒。采用乙酸锂方法转化酿酒酵母 H475 菌株。在 SC-Leu-Ura,2% 葡萄糖为碳源的酵母合成培养基上筛选转化子,得到 *T. reesei* cDNA 亚文库,将得到的亚文库转化子置 SC-Leu-Ura,2% 木糖为唯一碳源的合成培养基上筛选带有木糖醇脱氢酶基因的阳性克隆。按照 Holfman 等人的方法<sup>[13]</sup>,提取该阳性克隆重组酵母总 DNA,电转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。用标准方法提取大肠杆菌氨苄抗性转化子质粒 DNA<sup>[14]</sup>。用限制酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,根据分子量大小确定所要的质粒。得到后再次转化 H475 菌株,并在 SC-Leu-Ura、以木糖为唯一碳源的合成培养基上培养以确证其利用木糖的能力。最后以 PGK5' 端和 3' 端寡核苷酸片段为引物,用双脱氧方法对得到的几个质粒分别进行初步测序以确定是否为同一个质粒。

## 1.3 Southern 杂交印迹分析

按照 Raeder 和 Broda<sup>[15]</sup>的方法进行。

## 1.4 Northern 杂交印迹分析

按照 Chuirgwin<sup>[16]</sup>等人的方法提取在木聚糖上生长的 *T. reesei* Rut C-30 总 RNA。按照 Maniatis<sup>[14]</sup>等人的方法进行 Northern 杂交印迹分析。

## 1.5 利用木糖的重组酵母的生长及发酵实验

将在添加适当氨基酸的,以 2% 葡萄糖为碳源的,500ml 选择性合成培养基上生长 2d 的培养物,经洗涤后作为接种物,进行分批培养。令起始细胞浓度相同( $OD_{600} = 2.4$ )。分批培养在 50ml 相应的酵母选择性合成培养基中进行(以 1.8% 木糖或 0.2% 葡萄糖 + 1.8% 木糖为碳源),按一定时间间隔收获细胞。

## 1.6 培养物上清液成分分析

按一定的时间间隔取 1ml 培养物,离心分离细胞。上清液储于  $-20^{\circ}\text{C}$ ,用于进行高压液相层析(HPLC),分析葡萄糖、木糖、木糖醇和乙醇含量。HPLC 条件:HC-40 离子交换柱, $80^{\circ}\text{C}$ ,超纯水为移动相。

## 1.7 凝胶电泳

蛋白质和酵母细胞粗抽提物在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行凝胶电泳。凝胶用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250(Sigma) - 20% 甲醇 - 10% 乙酸溶液染色。采用 *P. stipitis* 木糖还原酶专一性抗体和 Promega 碱性磷酸酶方法(ProtoBlot Western Blot AP System)进行

粗蛋白质免疫分析。

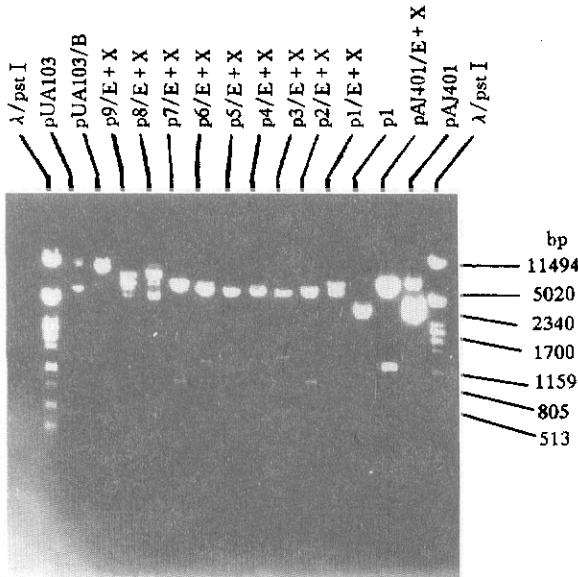


图 1 质粒电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of plasmids in 0.7% agarose gel. E. EcoRI; X. XhoI; B. Bgl II p1 - p9 are plasmids existed in 9 *E. coli* transformants by transformation of total DNA extracted from 9 yeast transformants grown in xylose medium

子所带质粒分子量相同(原因不详)。从每一株重组酵母阳性克隆的 4 株大肠杆菌转化子中随机挑选 1 株,提取质粒 DNA,用 EcoRI 和 XhoI 进行双酶切后再凝胶电泳。这 9 株大肠杆菌转化子质粒按分子量大小区分只有两种类型(与预计相同)。其中 7 株酵母阳性克隆的大肠杆菌转化子质粒为 6.85kb,插入片段为 1.3(0.9+0.4)kb(图 1),显然即为插入有瑞氏木霉木糖醇脱氢酶 cDNA 基因的重组质粒。另 2 株酵母阳性克隆的大肠杆菌转化子质粒为 10.7kb,大小与 pUA103 相同,显然即为该质粒。任意选取 4 个 6.85kb 的质粒重新转化 *S. cerevisiae* H475 菌株,每个质粒的重组酿酒酵母转化子都能够在此培养基上生长。而原宿主菌 H475 不能在此培养基上生长。对这 4 个质粒进行初步测序,结果显示这些质粒携带相同的插入序列。将该质粒命名为 pAJ401-xdhl,其物理图谱如图 2 所示(图中,pgk5':磷酸甘油酸激酶基因 5'端;pgk3':磷酸甘油酸激酶基因 3'端;Amp',氨苄青霉素抗性)。含有 pAJ401-xdhl 的 H475 菌株命名为 *S. cerevisiae* HX1。

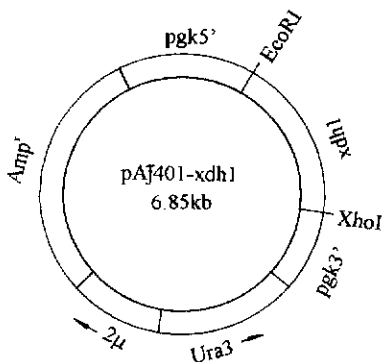


图 2 质粒 pAJ401-xdhl 的物理图谱

Fig. 2 The physical map of plasmid pAJ401-xdhl

## 2 实验结果

### 2.1 瑞氏木霉 cDNA 亚文库的建立及木糖醇脱氢酶基因的分离

按照 1.2 方法所述,将构建在酵母表达质粒 pAJ401 上的 *T. reesei* cDNA 表达文库转化 *S. cerevisiae* H475 菌株,在 H475 中建立了瑞氏木霉 cDNA 表达亚文库。将该亚文库置于 SC-Leu-Ura, 2% 木糖为唯一碳源的选择性培养基上筛选得到 38 株阳性克隆。随机挑选 9 株阳性酵母克隆,提取酵母总 DNA,电转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。在含氨苄(100 $\mu$ g/ml)的 LB 平板上,从每株重组酵母阳性克隆的大肠杆菌转化子中随机挑选 4 株,继续进行 DNA 的分析验证工作。提取大肠杆菌转化子质粒 DNA 进行凝胶电泳。发现来源于同一株重组酵母阳性克隆的大肠杆菌转化子

质粒为 10.7kb,大小与 pUA103 相同,显然即为该质粒。任意选取 4 个 6.85kb 的质粒重新转化 *S. cerevisiae* H475 菌株,每个质粒的重组酿酒酵母转化子都能够在此培养基上生长。而原宿主菌 H475 不能在此培养基上生长。对这 4 个质粒进行初步测序,结果显示这些质粒携带相同的插入序列。将该质粒命名为 pAJ401-xdhl,其物理图谱如图 2 所示(图中,pgk5':磷酸甘油酸激酶基因 5'端;pgk3':磷酸甘油酸激酶基因 3'端;Amp',氨苄青霉素抗性)。含有 pAJ401-xdhl 的 H475 菌株命名为 *S. cerevisiae* HX1。

### 2.2 对瑞氏木霉木糖醇脱氢酶 cDNA 基因的鉴定

对瑞氏木霉 Rut C-30 木糖醇脱氢酶 cDNA 基因

xdhl 进行了 Southern、Northern 印迹分析以及蛋白质的凝胶电泳分析。Southern 印迹杂交分析结果证明 *T. reesei* xdhl 以单一拷贝存在于 8kb EcoRI, 2.2kbSalI 和 3.5kb SphI 片段上(图 3)。

Northern 印迹杂交分析证实 xdhl 基因确实来自于以木聚糖为碳源对数期生长的 Rut C-30 mRNA。瑞氏木霉 Rut C-30 木糖醇脱氢酶 mRNA 长约 1.35kb (图 4)。

提取重组 *S. cerevisiae*HX1 酵母总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western 印迹杂交分析,结果显示 *S. cerevisiae* HX1, 正对照 H550<sup>+</sup> 和 H475 在 38kDa 处都有共同带,此带即木糖还原酶带。而 HX1 在约 40kDa 处(箭头指示处)比 H475 多一条带,推测此蛋白电泳带应为木糖醇脱氢酶带(图 5)。(从图 5 中 B 的第 3 行,可见,H550<sup>+</sup> 的 Western 杂交带出现两条带,估计第 2 条弱带应是具有部分同源性的蛋白质所产生的干扰带。)

初步测序结果表明, *T. reesei* xdhl 与 *P. stipitis* 木糖醇脱氢酶基因的核苷酸序列具高同源性。对全序列的测定正在进行中。

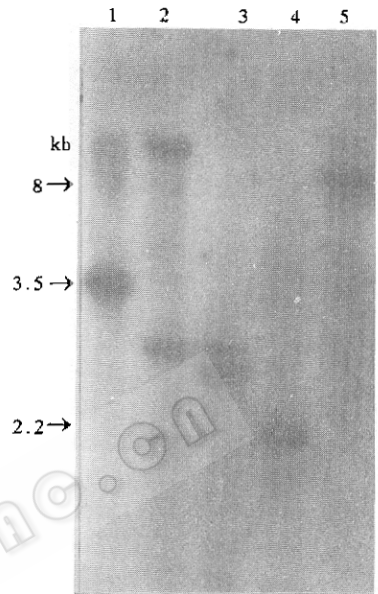


图 3 xdhl 的 Southern 印迹杂交分析  
Fig.3 Southern blot analysis of xdhl.

The digestions are: 1. Sph I ; 2. Pvu II - BstE II ; 3. Acc I ; 4. Sal I ; 5. EcoR I

将 *S. cerevisiae* 重组菌株 HX1、H550<sup>+</sup> 和 H475 以及 H475 的出发菌株 H158 在以木糖为唯一碳源的合成培养基上平板划线培养,30℃,培养 6d 后,HX1 与 H550<sup>+</sup> 生长良好,而 H475 与 H158 均不能在此培养基上生长(图略)。

在以木糖为唯一碳源,带有相应选择压力的合成培养基摇瓶中,30℃,125r/min 培养 *S. cerevisiae* HX1、H550<sup>+</sup> 和 H475。经 100h 培养后,HX1、H550<sup>+</sup> 和 H475 对木糖的转化、利用率分别为 91.8%,72.2% 和 3.72% (3 次实验的平均值),分别能把 55.95%,38.5% 和 1.65% 的木糖转化为木糖醇。HX1 与其宿主菌 H475 相比,对木糖的转化率提高 20 倍以上,积累的木糖醇更高达 30 倍(HX1,H550<sup>+</sup> 和 H475 分别为 9.5 g/L,6.7 g/L 和 0.31 g/L)。H475 不能利用木糖产乙醇,而 HX1 和 H550<sup>+</sup> 分别可产 0.9 g/L 和 1.1 g/L 乙醇。在 1.8% 木糖 + 0.2% 葡萄糖为辅助底物的培养基上,各菌株木糖醇与乙醇积累量略高于

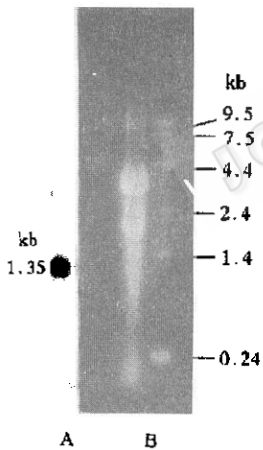


图 4 xdhl 的 Northern 印迹杂交分析

Fig.4 Northern blot analysis of xdhl

A. Northern; B. Electrophoresis with 1% agrose gel

在木糖培养基上的积累量(数据未列出)。

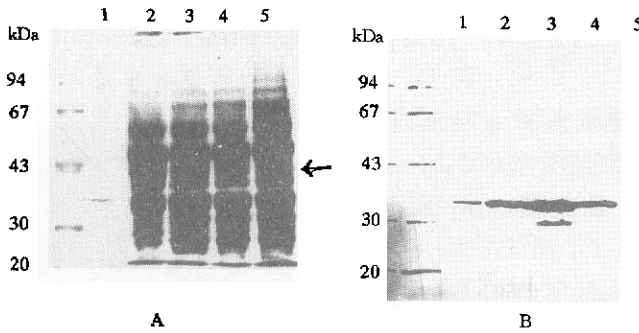


图 5 SDS-PAGE 凝胶电泳(A)和 Western 印迹杂交分析(B)

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis(A) and Western blot analysis(B)

Lanes:1. Xylose reductase from *P. stipitis*;2. HX1;3. H550<sup>+</sup>;4. H475;5. H158. WESTERN blot was carried out probing with antibody of xylose reductase from *P. stipiti*. The arrow shows the location at which there is more one band in HX1 than in H475.

### 3 讨 论

在酵母启动子的控制下,某些丝状真菌酶的 cDNA 基因能够在酵母细胞中表达。利用了丝状真菌基因表达的这一特点,可以根据灵敏而可信的酶活力直接对丝状真菌的 cDNA 基因进行平板[包括固体平板和 96 穴平板(Microtiter plate)]活力分析和筛选<sup>[17]</sup>,当然,此方法的前提必须是该酶基因能够在酵母细胞中表达,并且有灵敏的检测方法。这种克隆丝状真菌酶基因的方法已被成功地用于分离瑞氏木霉的葡聚糖酶基因<sup>[18]</sup>、 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶基因<sup>[19]</sup>等。本实验中我们从 *T. reesei* 的 cDNA 文库中分离木糖醇脱氢酶基因,正是利用了丝状真菌基因表达的这一特点,从瑞氏木霉 Rut C-30 cDNA 表达文库中成功地筛选到瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的。与此同时,也构建了能利用木糖的重组酿酒酵母。

带有 *T. reesei* *xdhl* 和 *P. stipitis* *xr* 基因的重组酵母 HX1 能够有效地转化木糖为木糖醇及其它副产品,转化率达 90% 以上,但乙醇产量不高(经 100h 发酵后为 1g/L 左右)。该菌株的构建对天然酒精发酵中含木糖高达百分之十几的残存物的生物转化,显然具有一定的应用潜力。此外,瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的克隆,对进一步研究瑞氏木霉木糖代谢酶的基因表达与调控以及进一步的菌株改造(如通过基因定位整合置换,使瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因失活而构建积累木糖醇的瑞氏木霉生产菌株)奠定了基础。

### 参 考 文 献

- 1 Skoog K, B Hahn-Hagerdal. *Enzyme Microb Technol.* 1988. 10:66~80
- 2 Schneider, H. *CRC Critical Reviews in Biotechnology.* 1989. 9:1~40
- 3 Barnett JA. In: Tipson R S, Horton D(eds), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* New York: Academic Press, 1976, pp125~235

- 4 Jill E Ogden. In: Peberdy J F (eds). Applied Molecular Genetics of Fungi, Cambridge: Cambridge University Press, 1991, pp. 66~84
- 5 Hahn-hagerdal B, Nhallom J, Jeppson H *et al.* In: Saddler J N(ed.), CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1993, pp. 231~290
- 6 Shinya Takuma *et al.* Appl Biochemistry and Biotechnology. 1991, **28/29**:327~340
- 7 Hallborn J *et al.* Bio/Technology 1991, **9**:1090~1095
- 8 Sirkka Keränen, Merja Penttilä, Current Opinion in Biotechnology, 1995, **6**:534~537
- 9 Salheimo A *et al.* Mol Microbiol, 1994, **13**:219~228
- 10 Johan Hallborn *et al.* Bio/Technology, 1991, **19**:1090~1095
- 11 Sherman F, Fink G, Hicks J B. In: Yeast genetics, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbou Laboratory. Cold Spring Harbou, N Y. 1983
- 12 Daniel Gietz *et al.* Nucleic Acids Reseach, 1992, **20**(6):1425
- 13 Hoffman C S, Winston F. Gene, 1987, **57**:267~272
- 14 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis, T. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor. N Y. 1989
- 15 Raeder U, Broda P. Lett Appl Microbiol, 1985, **1**:17~20
- 16 Chirgwin J M *et al.* Biochemistry, 1979, **18**:5294~5299
- 17 Jacobs M, Stahl U. Gene Regulation in Mycelial Fungi. In: Kück (ed), The Mycota II, Genetic and Biotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1995, p309
- 18 Anu Saloheimo *et al.* Molecular Microbiology, 1994, **13**(2):219~228
- 19 Emilio Margolles-Clark, PhD Thesis. VTT Biotechnology and Food Research. Finland. 1996

## Isolation and Identification of Xylitol Dehydrogenase Gene from *Trichoderma reesei*

Wang Tianhong<sup>1</sup> Merja Penttilä<sup>2</sup>

Gao Peiji<sup>1</sup> Wang Chunhui<sup>1</sup> Zhong Ling<sup>1</sup>

(National Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)<sup>1</sup>

(VTT Biotechnology and Food Research, P. O. Box 1500, FIN-02044, Finland)<sup>2</sup>

**Abstract** A cDNA sub-library from the fungus *Trichoderma reesei* grown on xylan was constructed in *S. cerevisiae* recombinant strain H475 harboring xylose reductase (XR) gene from *Pichia stipitis*. The sub-library was screened for xylitol dehydrogenase (XDH) gene on SC selective medium in which xylose was used as a sole carbon source. The XDH gene, *xdhl*, was isolated from this sub-pool and the length of *xdhl* is about 1.3kb. Southern, Northern and Western blot were carried out. The results indicated that *xdhl* has high affinity with *T. reesei* and the molecular weight of the xylitol dehydrogenase produced by *S. cerevisiae* recombinant strain HX1 is about 40 kDa. The strain HX1 harboring both *xr* from *P. stipitis* and *xdhl* from *T. reesei* was able to grown on xylose medium and converted more than 90% of the xylose into xylitol, ethanol and another by-products.

**Key words** *Trichoderma reesei*, xylitol dehydrogenase gene, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose