研究论文

树干毕赤酵母基因组文库的构建及纤维二糖酶基因的筛选

马经纬[1,2]，张 梁[*1,2]，薛 卫[3]，石贵阳[1,2]

（1. 工业生物技术教育部重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；3. 南京农业大学 信息科学技术学院，江苏 南京 210095）

摘要：首次构建了树干毕赤酵母DNA基因组文库，该文库包含3 000个克隆，插入片段长度为0.5~8.0 kb。树干毕赤酵母染色体基因为15 441 179 bp，该文库覆盖1.08倍树干毕赤酵母染色体基因，筛选出任一基因或序列的概率为97%。提取文库中的质粒醋酸锂法转化酿酒酵母W303-1A，涂布于纤维二糖为唯一碳源的平板，通过纤维二糖酶对底物纤维二糖的底物特异性筛选文库，首次获得树干毕赤酵母来源的一个1.82 kb的纤维二糖酶基因。

关键词：树干毕赤酵母；基因组文库；基因筛选；纤维二糖酶

中图分类号：Q 78　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)05—0536—05

Construction of *Pichia stipitis* Genomic Library and Cellobiase Gene Screening

MA Jing-wei[1]，*ZHANG Liang*[*1]，*XUE Wei*[2]，*SHI Gui-yang*[1]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. College of Information and Technology Science，Nanjing Agricultural University，Nanjing 210095，China）

Abstract：In this study，a genomic library for *Pichia stipitis* was firstly constructed. The library covered 1.08 times of the15 441 179bp genomic DNA of the strain，and contained 3 000 clones with the insertion sizes ranging from 0.5 to 8.0 Kb. It has a propability of 97% for screening a random gene form this library. The library plasmids were extracted and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A by LiAc method. At last，a 1.82 Kb cellobiase gene of P. stipitis was firstly characterized by means of screening the transformants on cellobiose plates.

Key words：*Pichia stipitis*，genomic library，gene screening，cellobiase

随着分子生物学技术的迅猛发展，发现新基因、研究新基因的功能已经成为功能基因组研究的热点。生物工程产业化更需要分离出有应用价值的新基因[1]。构建DNA基因组文库是功能基因组学研究的基本手段，一个物种的基因组DNA包含了它所有的遗传信息基因，可真实反映出基因组的全部

收稿日期：2013-01-08

基金项目：江苏省自然科学基金(BK2011153，BK2012363)；教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-11-0665)。

*通信作者：张 梁(1978—)，男，江苏无锡人，工学博士，副教授，主要从事再生资源和工业微生物研究。E-mail：13861707271@139.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

信息[2]。基因组文库不仅保存物种的遗传信息，而且提供了一个筛选基因的平台，可用于分离鉴定具有特定功能的基因[3-4]。

树干毕赤酵母（*Pichia stipitis*）不仅可以发酵木糖、葡糖糖、甘露糖、半乳糖，还可以发酵纤维二糖和木二糖，对于纤维质原料发酵产燃料乙醇具有重要意义[5-6]。树干毕赤酵母已被证明具有良好的转运和利用纤维二糖的能力，但该菌株产酒精的能力有限，无法在工业规模应用[7]。近年来也有许多学者通过改变发酵条件提高树干毕赤酵母发酵产乙醇的得率，但其生产能力距工业化还有一定的距离，这就凸显出通过基因手段改造得到理想菌株尤为重要。

目前，对于树干毕赤酵母的木糖利用酶系的研究已经取得一定的进展，树干毕赤酵母基因组测序也已经初步完成。但是，树干毕赤酵母基因水平的研究正处于起步阶段，许多关键的功能基因并没有标注，能够检索到的文献甚少。其中，在其转运和利用纤维二糖方面的研究基本空白，仅推测得知该酵母基因组中有 7 个编码 β-葡萄糖苷酶的基因[8-9]。课题组前期根据文献[9]对预测的 7 个基因进行了 PCR 扩增，并连接表达载体后转入酿酒酵母进行表达验证，但均未检测获得纤维二糖酶活性。

鉴于此，构建树干毕赤酵母的 DNA 基因组文库，不仅将树干毕赤酵母的遗传信息以稳定的重组体形式储存起来，还可从中筛选、克隆和验证出新基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 树干毕赤酵母 CBS 5773，大肠杆菌 JM109，酿酒酵母 W303-1A，均保藏于江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心；载体 YEpLac181，由作者所在实验室保藏。

1.1.2 其他材料 蛋白胨和酵母膏，购自英国 OXOID 公司；蜗牛酶，购自 Fermentas 公司；Sau3A Ⅰ和 BamH Ⅰ限制性内切酶，均购自 NEB 公司；氨苄青霉素，购自上海生工生物工程公司；X-Gal，IPTG，T4DNA 连接酶，购自宝生物工程有限公司；其他试剂和药品，均为国产或进口分析纯。

1.2 树干毕赤酵母染色体 DNA 的提取

接种树干毕赤酵母于 YEPD 液体培养基中，30 ℃，200 r/min 摇床过夜培养。取 2 mL 培养物至 5 mL 的离心管中，6 000r/min 离心 5min 收集菌体；加入 0.5mL 酵母染色体提取试剂 Ⅰ（0.1 mol/L Na_2EDTA+0.9 mol/L 山梨醇，pH 7.5）重悬菌体；加入 30 μL 的 5 mg/mL 蜗牛酶酶解细胞壁，37 ℃处理至大多数细胞形成原生质体；6 000 r/min 离心 5 min，弃上清液；加入 0.5 mL 酵母染色体提取试剂 Ⅱ（20 mmol/L Na_2EDTA+50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4）重悬菌体，并加入 50 μL 质量分数 10% SDS，65 ℃保温 30 min 裂解细胞；加入 200 μL 5 mol/L 醋酸钾溶液，冰浴 1 h；8 000 r/min 离心 8 min；取上清液移至干净离心管中，在冰上加入等体积的异丙醇，放置 15 min；6 000 r/min 离心 5 min；弃上清液，用体积分数 75%的酒精洗涤沉淀两次；待沉淀物干燥后加入适量的 TE 缓冲液（pH 7.4）或无菌水使溶解沉淀，-4 ℃保存[10]。

1.3 载体的制备

碱裂解法大量提取 YEpLac181 质粒，经 BamH Ⅰ酶切成线形，纯化回收后用 CIAP 对 YEpLac181/BamH Ⅰ去磷酸化处理。

1.4 树干毕赤酵母基因组文库的构建及验证

采用微量稀释法用内切酶 Sau3A Ⅰ部分酶切基因组 DNA，同时取处理为线性的质粒 YEpLac181，Sau3A Ⅰ和 BamH Ⅰ为同尾酶，利用 T4DNA 连接酶 16 ℃将二者过夜连接，将连接产物转化大肠杆菌 JM-109 感受态细胞，涂布含 100 μg/mL 的氨苄青霉素、20 μL 100 mg/mL 的 IPTG 和 100 μL 20 mg/mL 的 X-gal 的 LB 平板，37 ℃恒温箱培养，随机挑取白色菌落接种于含 100 μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基，37 ℃摇床过夜培养，提取出质粒 BamH Ⅰ酶切电泳验证。

1.5 基因组文库的保存

将蓝白斑筛选所得白色菌落计数，用无菌牙签将平板上的白色单菌落分别挑至无菌的 96 孔板，每个孔有 100 μL 含 100 μg/mL 的氨苄青霉素 LB 液体培养基，封口膜封死 37 ℃恒温箱过夜培养，加等体积的体积分数 30%的甘油保存于-70 ℃。

1.6 基因组文库的评估

根据所获得的基因组文库的克隆子的数目及平均插入片段的大小，依据公式：库容量=文库中阳性克隆子的数目×插入片段的平均大小/该生物基因组的大小计算出该基因组文库的库容量的大小。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

根据 Clarke-Carbon 公式[11],

$$N=\frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

N 为当要求的克隆概率为 P 时,一个基因组文库中所需的含有重组 DNA 的克隆数;P 为克隆概率,即任一 DNA 片断至少一份拷贝存在于该文库的概率;f 为限制片断的平均长度与基因组 DNA 总长度之比。计算基因组文库中所需的含有重组 DNA 的克隆数。

1.7 从文库中筛选纤维二糖酶相关基因

分别提取构建好的文库大肠杆菌中的重组质粒,用醋酸锂转化法将所提的质粒转入酿酒酵母 W303-1A 中做游离表达,涂布 YNBC 平板 30 ℃培养 4 d 左右。

挑取能够在 YNBC 平板生长的酵母转化株接种于 YEPD 液体培养基 30 ℃摇床过夜培养,pNPG 法测定纤维二糖酶酶活[12]。每分钟每毫升酶液水解产生 1 μmol 对硝基酚(pNP)所需要的酶量定义为一个酶活单位。方法如下:离心分离菌体和发酵液,将所得菌体用超声波破碎仪破碎细胞,离心分离胞内液体和细胞碎片。分别取 0.2 mL 经适当稀释或浓缩的发酵液上清液、细胞碎片和胞内液,加入 1.8 mL 0.2 mol/L Na_2HPO_4+0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.5),30 ℃预热 10 min 后,加入已预热的 5 mmol/L 对硝基酚-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)溶液 2 mL,反应 10 min 后立即加入 2 mL 1 mol/L 的碳酸钠溶液终止反应,室温放置 5 min 后于 400 nm 处测定吸光度。以加热失活的酶液按照同样方法处理作空白。取转化株所对应质粒的插入片段测序,得到纤维二糖酶相关基因序列。

1.8 生物信息学手段分析纤维二糖酶相关基因

将测序得到的碱基序列导入 NCBI 数据库中的 BLAST 程序进行碱基同源性分析;将碱基序列翻译成氨基酸利用 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/)工具进行三维建模。

2 结果与分析

2.1 树干毕赤酵母基因组文库的构建

由于树干毕赤酵母染色体基因组较大,用普通限制性内切酶 HindⅢ和 BamHⅠ等酶切 8 h 均未能获得较为理想的片段组合。经过反复试验,最终选择采用 Sau3AⅠ酶,该酶是识别 4 bp 的限制性内切酶,完全酶切会产生平均 256 bp 的片段。通过微量稀释法设置时间梯度和酶活梯度,对染色体基因组进行酶切处理,确定了树干毕赤酵母染色体基因的最佳酶切条件。

经质量分数 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,树干毕赤酵母染色体经限制性内切酶 Sau3AⅠ稀释 100 倍酶切 6 h 的片段大小在 0.5 kb~8 kb 之间,大多数片段在 5 077 bp 处,如图 1 所示。

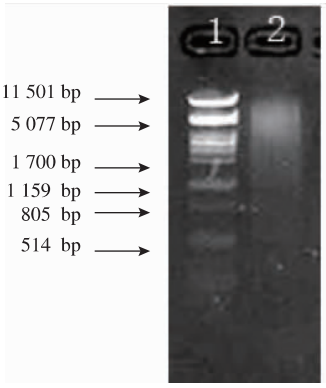


图 1 树干毕赤酵母染色体经 Sau3AⅠ酶切片段 1%的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 *P. stipitis* chromosome digested by Sau3AⅠ was analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel

随机挑取蓝白斑筛选所得白色菌落接种含 100 μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 ℃摇床过夜培养,提取出质粒 BamHⅠ酶切质量分数 1%的琼脂糖凝胶电泳验证,如图 2 所示。

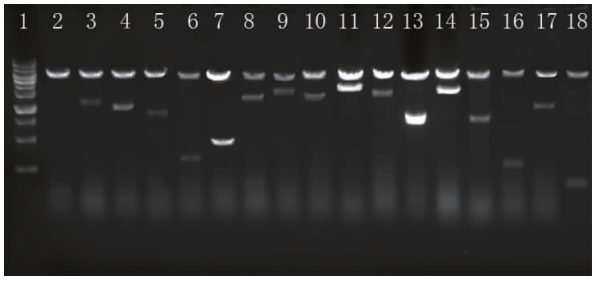


图 2 质粒经 BamHⅠ酶切 1%的琼脂糖凝胶电泳,2 为空载的线性化载体 YEpLac181

Fig. 2 Plasmids digested by BamHⅠ was analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel,2 was YEpLac181 digested by BamHⅠ

共涂布 10 块平板,每块平板大约得 300 多个白斑,55 个蓝斑,共计得到 300 个阳性克隆子。根据公式计算出该基因组文库的库容量为:库容量=3 000×5 000/15 441 179=97%。即该文库中所含插

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

入片段的总长度为树干毕赤酵母基因组的 0.97 倍。

根据 Clarke-Carbon 公式，已知 P=97%，即从该文库筛选到树干毕赤酵母任一 DNA 序列的精确概率为 97%。计算得到 N 为 1.08，即该文库已经覆盖了树干毕赤酵母的所有基因。

2.2 纤维二糖酶相关基因的筛选

根据 1.7 步骤，筛选获得唯一一株能够在 YNBC 平板生长的酿酒酵母转化株，接种 YEPD 液体培养基 30 ℃过夜培养后，离心分离发酵液上清液和菌体，将菌体超声波破碎离心分离胞内液和细胞碎片，pNPG 法分别测定发酵液上清液、胞内液和细胞碎片的纤维二糖酶酶活，结果见表 1。在细胞碎片中测到纤维二糖酶酶活，说明该基因编码的蛋白质可在细胞间质处起作用。

表 1 发酵液上清、细胞碎片和胞内液酶活比较

Table 1 Cellobiase activity of supernatant of the medium, the cell wall and cell extracts

菌株	纤维二糖酶酶活/(U/mL)		
	发酵液上清液	细胞碎片	胞内液
W303-1A	0	0	0
W303-1A/YEpLac181-X	2.30	9.07	0.43

提取转化株所对应的质粒，BamH Ⅰ酶切后琼脂糖凝胶电泳，如图 3 所示。将插入片段胶回收纯化后测序，得到一段 1 821bp 的碱基序列。

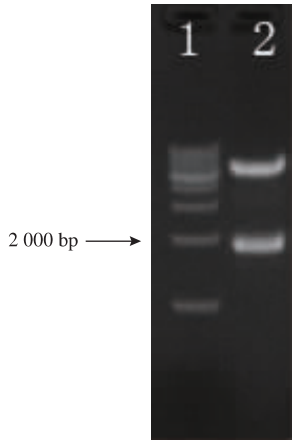


图 3 转化株对应质粒 BamH Ⅰ酶切后 1%琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Plasmid of transformation digested by BamH Ⅰ was analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel

2.3 纤维二糖酶相关基因的分析

将测序得到的碱基序列导入 BLAST 程序没有检索到同源序列；利用 SWISS-MODEL 工具三维建模失败。

3 结 语

基因组文库的构建载体的浓度和纯度的高低都直接关系到文库构建的成败，空载的多少直接影响到文库的质量。为了避免空载现象，采取大提质粒以增加载体的浓度，酶切成线性化后跑琼脂糖凝胶电泳验证，将完全酶切呈线性的载体进行胶回收防止污染，纯化后用 CIAP 进行脱磷处理以防止载体自连现象，再次琼脂糖凝胶电泳回收纯化备用。

高质量的染色体基因是另一个构建完整文库的影响因素，树干毕赤酵母染色体的各种提取方法原理相通，仅破裂细胞方法不同，大体分为物理法和酶法。物理法有液氮研磨法和玻璃珠震荡破碎法，这种方法由于震动剧烈会使细胞核破裂从而染色体断裂；而酶法采用蜗牛酶破壁形成原生质体，再碱裂解细胞，相对温和，大大减少了染色体的断裂。染色体 DNA 的处理可以用物理机械剪切，也可以用限制性酶消化。机械切割法可获得较均一的随机片段，但片段不能直接用于克隆，需要经过末端修饰，连上接头后再用限制性内切酶消化产生黏性末端；直接用限制酶消化的方法则可以直接产生黏性末端，大大减少了工作量。

酵母菌中能够降解纤维二糖的菌株很少，树干毕赤酵母是其中比较重要的一种，虽然有研究根据同源性预测了其纤维二糖酶基因信息[8]，但通过实验无法验证其具有活性(数据另发)。本课题研究中通过构建树干毕赤酵母基因组文库，以纤维二糖酶对底物纤维二糖的底物特异性筛选文库所含基因，获得一段 *P. stipitis* 来源的纤维二糖酶基因。该基因通过反复表达验证，具有明显的纤维二糖水解活性。但其碱基序列通过 BLAST 检索结果均为预测序列或未知序列，未找到同源序列，三维建模也没有成功，表明该基因是一个新基因，这为树干毕赤酵母纤维二糖代谢机理的研究提供了一个新的切入口，具有一定的学术意义。课题组接下来将进一步对所获得的基因进行功能和调控机理等分析，并构建高效利用纤维二糖的重组工业酒精酵母菌株。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Quiniou S M,Waldbieser G C,Duke M V,et al. A first generation BAC based physical map of the channel catfish genome[J]. **BMC Genomics**,2007,8:40.

[2] Jung S,Main D,Staton M,et al. Synteny conservation between the Prunus genome and both the present and an cestral *Arabidopsis* genomes[J]. **BMC Genomics**,2006(7):81.

[3] Zhebentyayeva T N,Swire-Clark G,Georgi L L ,et al. A frame work physical map for peach ,a model Rosaceae species[J]. **Tree Genetics and Genomes**,2008(4):745-756.

[4] Chan A K N,Wang Y Y,Ng K,et al. Cloning and characterization of a novel cellobiase gene,cba3,encoding the first knownβ-glucosidase of glycoside hydrolase family 1 of *Cellulomonas biazotea*[J]. **Gene**,2012,493(1):52-61.

[5] Parekh S,Wayman M. Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipiti*[J]. **Biotechnolgy Letters**,1986(8):597-600.

[6] Parekh S R,Parekh R S,Wayman M. Fermentation of xylose and cellobiose by *Pichia stipitis* and *Brettanomyces clausenii*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**,1988,18:325-338.

[7] Passoth V,Cohn M,Schafer B,et al. Analysis of the hypoxia-induced ADH2 promoter of the respiratory yeast *Pichia stipitis* reveals a new mechanism for sensing of oxygen limitation in yeast[J]. **Yeast**,2003,20(1):39-51.

[8] Jeffries T W,Grigoriev I V,Grimwood J,et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*[J]. **Nature Biotechnol**,2007,25(3):319-26.

[9] Jeffries T W,Jennifer R,Vleet H V. *Pichia stipitis* Genomics,transcriptomics,and gene clusters[J]. **FEMS Yeast Research**,2009(9):793-807.

[10] Sambrook J,Russel D. Molecular Cloning:a Laboratory Manual,third ed [M]. **New York:Cold Spring Harbor,Cold Spring Harbor Laboratory Press**,2001:485-486.

[11] 萨姆布鲁克·J,拉塞尔·D·W. 分子克隆实验指南[M]//第2版. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社,1992:399.

[12] Guo Z P,Zhang L,Ding Z Y,et al. Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,2011,49:105-112.

科　技　信　息

英国公布零售食品中丙烯酰胺与呋喃含量水平的中期报告

4月18日,食品标准局公布了一系列零售食品中丙烯酰胺与呋喃含量水平的中期报告。

本次调查涉及300个样本,采自2011年11月与2012年12月,对294个样本进行了丙烯酰胺含量测定,以及113个样本进行了呋喃含量的测定。检测发现,样本中两种物质的含量不会增加消费者的健康风险,机构没有改变其对消费者的建议。丙烯酰胺和呋喃的调查结果将被送到欧洲食品安全署,进行趋势分析、风险评估等。

[信息来源]Foods Standards Agency. Fifth acrylamide and furan survey published [EB/OL]. (2013-4-18). http://www.food.gov.uk/news-updates/news/2013/apr/furan2013

美国FDA拟将硒列入婴儿配方奶粉必需营养成分列表

4月15日,美国食品药品管理局(FDA)提议将硒列入婴儿配方奶粉必需营养成分列表,并修订婴儿配方奶粉中硒的限量标准。该项条例名为:"婴儿配方奶粉:婴儿配方奶粉中硒的限量及有关标签要求。"据了解,FDA提议婴儿配方奶粉中硒的最小限量为2.0ug/100kcal,最大限量为7.0/100kcal,并在婴儿配方奶粉标签中标明硒的含量。FDA将该项提议从即日起向公众征求意见75天。

[信息来源]食品伙伴网. 美国FDA拟将硒列入婴儿配方奶粉必需营养成分列表 [EB/OL]. (2013-4-17). http://www.foodmate.net/news/yujing/2013/04/229451.html.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net