

土壤微生物 DNA 木聚糖酶基因多样性的研究*

张桂敏 庄永红 刘 婷 马立新[†]

(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

摘 要 采用国产硅胶 GF₂₅₄ (60 型) 代替进口 Glass bead 的改良方法抽提土壤微生物 DNA, 然后设计了一对扩增木聚糖酶基因片段的新简并引物, 对抽提的土壤微生物 DNA 进行 PCR 扩增。扩增片段连接 pMD18T 载体, 转化大肠杆菌, 重组片段通过酶切进行 RFLP 分析后, 测序分析得到 10 个木聚糖酶基因片段。对所得片段翻译的氨基酸序列进行 BLAST 分析表明有 8 个片段与来自放线菌的木聚糖酶具有较高的同源性, 2 个与假单胞菌的木聚糖酶具有较高的同源性。所得 10 个木聚糖酶片段的氨基酸序列同源性比较显示, 第 27 个氨基酸均为天冬酰胺(N), 暗示这些来自土壤微生物 DNA 的基因片段编码耐碱的木聚糖酶。通过构建系统进化树, 发现扩增的木聚糖酶片段之间的相似性均在 70% 以上。

关键词 土壤微生物 DNA; 简并引物; 木聚糖酶; 基因多样性

中图分类号 S154.34 **文献标识码** A

土壤是微生物的大本营, 但土壤中能供实验室纯培养的微生物却不到土壤微生物总数的 1%^[1], 大量的微生物无法在实验室条件培养^[2,3], 这使得传统的分离培养、鉴定菌落研究土壤微生物的方法难以使人们全面了解和深入研究土壤微生物多样性。最近, 随着分子生物学技术的发展, 不通过培养微生物而对土壤微生物进行研究已成为可能, 在抽提土壤微生物 DNA 后, 利用 PCR 技术可以将核糖体 DNA 片段扩增和检测^[4,5]。Landeweert 等对土壤微生物 DNA 的核糖体 DNA 片段进行 PCR 扩增, 测序分析研究土壤中真菌的多样性^[6]; 马万里等利用 PCR 和 T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 法对森林土壤微生物多样性进行了研究^[3]。但是这些方法只能研究土壤微生物的种类, 不能直观地研究土壤微生物的功能。

土壤有机质的主要来源之一就是植物残体被土壤微生物作用转化, 植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素和木质素等物质组成。Patricia Luis 等通过设计 3 对引物与 PCR 扩增途径, 对森林土壤微生物 DNA 中木质素降解酶 - 漆酶的基因多样性进行过研究^[7]。作为半纤维素主要成分的木聚糖在植物细胞壁中的含量仅次于纤维素, 约占细胞干重的 35%。木聚糖在土壤中的降解主要依靠土壤微生物产生的

木聚糖酶, 因此木聚糖酶在土壤碳素循环中同样占有重要的地位。利用分子技术对木聚糖酶基因的研究可以监测土壤微生物这种特异的功能。但是, 目前尚没有研究土壤微生物木聚糖酶基因多样性, 监测土壤微生物功能的报道。

同时, 木聚糖酶在造纸制浆、食品、纺织、饲料、能源工业中具有广阔的应用前景^[8~10]。但是不同应用领域要求具有不同酶学性质的木聚糖酶, 因此开发多样性的木聚糖酶基因资源具有重要的意义。从土壤微生物中直接克隆木聚糖酶基因可以为木聚糖酶基因资源开发拓宽领域。近年来, 直接抽提土壤微生物 DNA 从中克隆基因已成为可能, Cottrell 等通过构建土壤 DNA 的基因组文库, 底物平板筛选从 75 万个转化子中得到 2 个几丁质酶基因^[11]; Henne 等同样用建文库法从 73 万个转化子中筛选到一个具脂水解活性的阳性克隆^[12]; Anwar Sunna 等通过基因组步行 PCR (Genomic walking PCR, GWPCR) 方法从温泉 DNA 样品中克隆到一个木聚糖酶基因^[13]。但是, 这些方法筛选工作量大, 不适于大规模的开发土壤中不可培养微生物基因的资源。

本研究建立了一种研究土壤微生物 DNA 木聚糖酶基因多样性的方法, 得到 10 个不同的木聚糖酶基因片段, 并对所得的序列进行了系统分析。这种

* 国家高技术 863 计划 (2001AA214161, 2002AA227011) 和湖北省自然科学基金项目 (2005ABA201) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: malixing@hubu.edu.cn

作者简介: 张桂敏 (1976~), 女, 汉族, 湖北襄樊人, 博士研究生, 讲师, 主要从事基因资源开发与酶学研究

收稿日期: 2005-01-20; 收到修改稿日期: 2005-06-06

方法的建立也为直接从土壤微生物 DNA 中分离具有应用价值的木聚糖酶基因、开发土壤微生物基因资源奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

在冬季采自湖北大学教工浴室下水道附近有腐烂树叶的 5 ~ 15 cm 层黄棕壤, pH6.7, 有机质含量 29.1 g kg^{-1} , 全氮 1.9 g kg^{-1} , 置于 4 °C 冰箱待用。

1.2 菌株和质粒

用来进行常规克隆的大肠杆菌 *E. coli* XL-GOLD 为本实验室保存, pMD18T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.3 试剂

限制性内切酶 *Taq*I、*Msp*I、*Sau*3AI, One-step ligation kit, Ex-Taq 酶, PEG8000, DNA 分子量标准 / *Ecot*14 和 / *Hind*III 均购自 TaKaRa 公司, DNA gel extraction kit 购自 V-gene 公司。

1.4 方法

1.4.1 土壤微生物 DNA 的提取程序 参见文献 [14], 其中用到的进口 Glass bead 本研究中用硅胶 GF₂₅₄ (60 型) 代替, 将中国青岛海洋化工集团出品的硅胶 GF₂₅₄ (60 型) 用浓硝酸浸泡过夜, 水洗至中性, 烘干待用。

1.4.2 引物的设计 利用 GenBank 上已发表木聚糖酶的氨基酸序列, 进行同源性分析, YSFWTD 和 NHFDAW 两段氨基酸序列具高度的保守性, 根据这两段氨基酸序列设计了两个简并性核苷酸引物: P1: 5' TACTC (G/C) TTCTGGAC (C/T) GAC 3'; P2: 3' TTG GTGAAGCTGCG (G/C) ACC 5'。

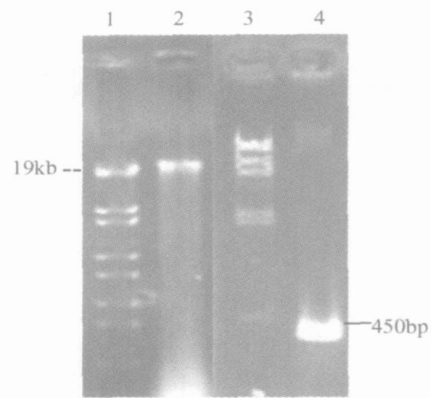
1.4.3 木聚糖酶基因片段的扩增 将土壤微生物 DNA 稀释后作为模板, 以简并引物 P1、P2 进行 PCR, PCR 循环条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 30 个循环; 72 °C 再延伸 7 min。

1.4.4 常规 DNA 克隆操作 参见文献 [15]。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物 DNA 的抽提与木聚糖酶基因片段的扩增效果

通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测所抽提土壤微生物 DNA 和 PCR 扩增的产物, 结果见图 1。



1. / *Ecot*14 分子量标记; 2. 土壤微生物 DNA;

3. / *Hind*III 分子量标记; 4. PCR 产物

1. / *Ecot*14; 2. DNA from soil microorganisms;

3. / *Hind*III; 4. PCR products

图 1 土壤微生物 DNA 与 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of soil microbial DNA and PCR products

2 号泳道为土壤微生物 DNA, 有拖带, 但主带在 19 kb 以上, 符合进行 PCR 的要求; 4 号泳道为简并引物 P1 和 P2 扩增的 PCR 产物, 大小在 450bp 左右, 与预计的大小一致。

2.2 重组克隆的获得与鉴定结果

将 450bp 左右 PCR 产物通过 DNA gel extraction kit 回收后, 连接到 pMD18T 载体上, 连接示意图见图 2. 连接产物转化大肠杆菌, 得到 200 ~ 300 个转化子, 挑取 24 个抽提质粒, 通过电泳比较大小, 除两个是自连外, 有 22 个为重组质粒, 将此 22 个重组质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切, 回收插入片段, 再用识别 4 个碱基的限制性内切酶 *Taq*I、*Msp*I、*Sau*3AI 对着 22 个片段进行 RFLP 分析, 结果显示有 10 个不同的插入片段, 分别对应于 1, 5, 7, 11, 15, 16, 18, 22, 23, 24 号重组子。

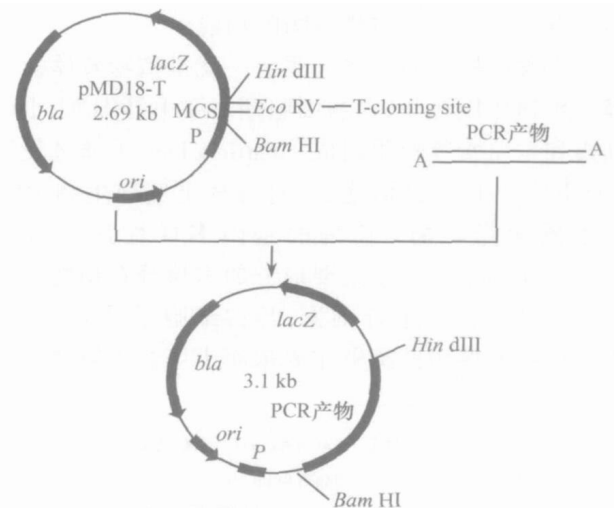


图 2 重组克隆质粒构建过程

Fig. 2 Construction of recombinant clone

XYL22	YSFWTDSPGTVSMALGSGGNYSTQWSNTGMFVAGKGWSTGTRRSVTYSGT	50
XYL11	YSFWTDSQGTVSMELGSGGNYSTQWSNTGMFVAGKGWSTGARRSVTYSGS	50
XYL15	YSFWTDSQGTVSMDMGSGGCYSTQWSNTGMFVAGKGWOTGGRKTVNYSGS	50
XYL16	YSFWTDSQGTVSMDMGSGGCYSTQWSNTGMFVAGKGWOTGGRKTVNYSGS	50
XYL5	YSFWTDSQGTVSMDMGSGGCYSTQWSNTGMFVAGKGWSTGGRKTVNYSGS	50
XYL24	YSFWTDSQGTVSMDMGSGGNYSTQWSNTGMFVAGKGWOTGGRKTVSYSGS	50
XYL23	YSFWTDGQGSVSMDLGSGCTYTRWWSNVGMFVAGKGWRTGGRKTVDYSGT	50
XYL7	YSFWTDGGGSVNMTLGSNGNYSMQWSNVGMFVGGKGWNPGRRTVITYSGS	50
XYL18	YSFWTDGGGSSTTFCLQPNGRITSQWSNVGMWVGGKGWQQGRRSVITYSGT	50
XYL1	YSFWTDGGGSVSMTLNGGCSYSTRWITNCGNFVAGKGWNTGGRRSVRYNGY	50
Consensuysfwt d g g y w n g n v g k g w g r v y g		
XYL22	FNPSGNSYLTLYGWSRNPLVEYYIVDSWGTYRPT..GTFKGTVTTDGGTY	98
XYL11	FNPSGNAYLTLYGWTRNPLIEYYIVDNWGTYRPT..GTFKGTVTTSDGGTY	98
XYL15	FNPSGNAYLTLYGWTTSPLEYYIVDNWGTYRPT..GTFMGTVMSDGGTY	98
XYL16	FNPSGNAYLTLYGWTTNPLIEYYIVDNWGTYRPT..GTHMGTVTTSDGGTY	98
XYL5	FNPSGNAYLTLYGWTTSPLEYYIVDNWGTYRPT..GTFMGTVTTSDGGTY	98
XYL24	FNPSGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVDNWGTYRPT..GTFMGTVTTSDGGTY	98
XYL23	FNPSGNSYLTLYGWTTNPLVEYYVVDNWGTYRPT..GKYKGTVTTSDGGTY	98
XYL7	FNPSGNGYLALYGWTTNPLIEYYVVENFNGMYNPSSGAQRLGSVTTDGGTY	100
XYL18	FNPSGNSYLTLYGWTTNPLIEYYIVDSWGTWRPP..GSGFMGTVTTSDGGTY	99
XYL1	FNPSGNGYGLLYGWTSNPLVEYYIVDNWGSFRPT..GEYRCVWSSDGGTY	98
Consensufnpsgn y lygw pl eyy v g p g v dggt y		
XYL22	DIYTTTRTNAPSIEGTK.TFQYUSVRQSKRVGG..TITTNHFD A W	142
XYL11	DIYCTTRTNAPSIDGTR.TFQYUSVRQCKRTGG..TISAGNHFD A W	142
XYL15	DIYRTRVNVQPSIEGDRSTFYQYUSVRQSKRTGG..TITSGNHFD A W	143
XYL16	DIYRTRVNVQPSIEGDRSTFYQYUSVRQSKRTGG..TITSGNHFD A W	143
XYL5	DIYRTRVNDKPSIEGDHSTFYQYUSVRQSKRTGG..TITSGNHFD A W	143
XYL24	DIYRTRVNDKPSIEGDHSTFYQYUSVRQSKRTGG..TITSGNHFD A W	143
XYL23	DIYCTTRVNVQPSIEGTG.TFNQYUSVRQSKRTGG..TITTCNHFD A W	142
XYL7	DIYRTRVNVQPSIIGTA.TFYQYUSVRQCKRTGG..TITTCNHFD A W	144
XYL18	DIYRTRVNVQPSIEGTR.TFYQYUSVRQCKRVGG..TITTCNHFD A W	143
XYL1	DIYKTRRYNAPSVEGTR.TFDQYUSVRQSKVTSGSGITITTCNHFD A W	144
Consensudiy t r p s g t f q y u s v r q k g t i n h f d a w		

图3 推测木聚糖酶片段氨基酸的同源性分析

Fig.3 Multiple alignment of deduced amino acid of xylanase fragments

2.3 所得片段的序列分析

将上述 10 个重组子送上海博亚公司对插入片段进行测序,测序结果经 BLAST 分析,10 个重组子所含插入片段均为木聚糖酶基因片段,分别命名为 *xy11*, *xy15*, *xy17*, *xy111*, *xy115*, *xy116*, *xy118*, *xy122*, *xy123*, *xy124*, 登陆 GenBank,核苷酸序列接收号见表 1。通过 Gentoool 软件将所得基因片段翻译成相应的氨基酸,BLAST 分析显示 8 个氨基酸片段(XYL1,XYL5,XYL11,XYL15,XYL16,XYL22,XYL23,XYL24)与来自放线菌的木聚糖酶具有较高的同源性,2 个(XYL7,XYL18)与假单胞菌的木聚糖酶具有较高的

同源性,分析结果见表 1。

2.4 木聚糖酶片段的同源性比较

通过 DNAMAN 软件将所得的 10 个木聚糖酶片段的氨基酸序列进行了同源性比较,比较结果见图 3,比较结果显示这些木聚糖酶的第 27 个氨基酸均是天冬酰胺(N),这暗示着所得到的基因片段编码耐碱的木聚糖酶^[20]。为了更形象地表述各基因的相似性关系,进行了多序列匹配排列,构建系统进化树,见图 4。由图 4 可看出通过本研究设计的引物扩增的木聚糖酶片段之间的相似性均在 70%以上。

表 1 木聚糖酶基因片段序列接收号与对应氨基酸最高同源性比较

Table 1 GenBank accession numbers of partial xylanase gene and comparison of deduced amino acid by BLAST

基因片段 Gene fragments	GenBank 接收号 Accession numbers	最高氨基酸同源性比较 Comparison of deduced amino acid by BLAST			
		微生物种类 Microbial species	GenBank 接收号 Accession numbers	同源性 Homology	参考文献 References
xy11	AY857187	<i>Streptomyces coelicolor</i>	T37005	93 %	[16]
xy15	AY857188	<i>Cellulomonas fimi</i>	CAA54145	88 %	[17]
xy17	AY857189	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	BAB79287	81 %	Unpublished
xy111	AY857190	<i>Thermobifida fusca</i>	AAA21480	84 %	[18]
xy115	AY857191	<i>Cellulomonas fimi</i>	CAA54145	86 %	[17]
xy116	AY857192	<i>Cellulomonas fimi</i>	CAA54145	86 %	[19]
xy118	AY857193	<i>Pseudomonas</i> sp. ND137	BAB79287	77 %	Unpublished
xy122	AY857194	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	BAD02383	77 %	[19]
xy123	AY857195	<i>Streptomyces viridosporus</i>	AAF09501	86 %	Unpublished
xy124	AY857196	<i>Cellulomonas fimi</i>	CAA54145	89 %	[17]

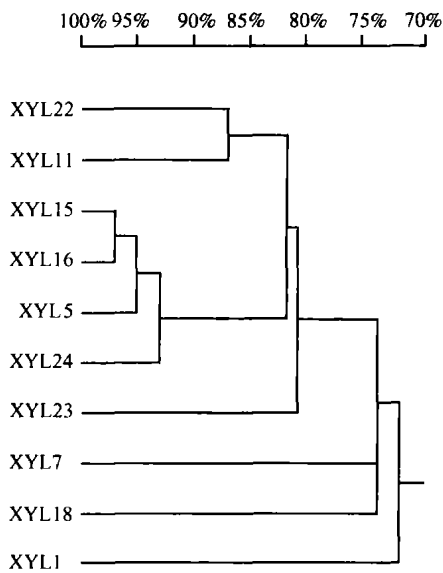


图 4 推测木聚糖酶片段氨基酸的系统关系

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on the deduced amino acid sequences

3 小结

本研究在抽提土壤微生物 DNA 上,将国产硅胶

处理后代替文献[14]中用到的进口 Glass bead,使得该方法变得更简单,成本大幅降低,使一般的分子生物学实验室可以进行。

本研究中,新设计了一对简并引物,利用新的简并引物对抽提的土壤微生物 DNA 进行 PCR 扩增,得到的片段经 RFLP 分析、测序后均是木聚糖酶基因片段,表明该方法效率高,可以大规模开发基因资源,适于对土壤中木聚糖酶基因多样性进行分析。新设计的一对简并引物,尚未见同类的报道。

尽管扩增的是木聚糖酶基因片段,但在对 10 个木聚糖酶片段进行 BLAST 分析时,却发现这些氨基酸对应完整的糖基水解酶 11 家族(木聚糖酶),见图 5,这意味着这些片段可能已经具有木聚糖酶活性,但是否真的有活性,还需进一步研究。即便无活性,也可采用基因组步行 PCR (Genomic walking PCR, GWPCR) 方法^[13],根据中间已知序列设计引物,向基因两端 PCR 扩增,获得两端的序列,再设计引物,扩增全长基因,从而大量开发木聚糖酶基因资源。这对大规模开发土壤微生物 DNA 中木聚糖酶基因资源尤为重要。

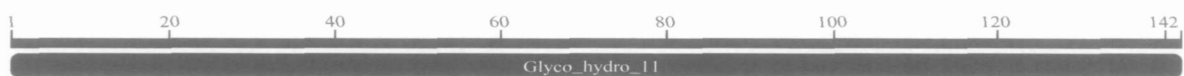


图 5 推测木聚糖酶氨基酸序列的 BLAST 分析

Fig. 5 BLAST analysis of the deduced amino acid sequences of xylanase

参考文献

- [1] Amann R, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995(59): 143 ~ 169
- [2] 蔡燕飞, 廖宗文. 土壤微生物生态学研究方法进展. *土壤与环境*, 2002, 11(2): 167 ~ 171. Cai Y F, Liao Z W. Advancement of methods in soil microbial ecology(In Chinese). *Soil and Environmental Sciences*, 2002, 11(2): 167 ~ 171
- [3] 马万里, Josquin T, Mark A. 土壤微生物多样性研究的新方法. *土壤学报*, 2004, 41(1): 103 ~ 107. Ma W L, Josquin T, Mark A. A new method for research on soil microbial diversity(In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(1): 103 ~ 107
- [4] Tiedje J M, Asuming B S, N üslein K, *et al.* Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 1999, 13: 1 109 ~ 1 122
- [5] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, 345: 63 ~ 65
- [6] Landeweert R, Leeflang P, Kuyper T W, *et al.* Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 327 ~ 333
- [7] Patricia L, Grit W, Harald K, *et al.* Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36: 1 025 ~ 1 036
- [8] Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol Reviews*, 2005, 29(1): 3 ~ 23
- [9] Damaso M C, Almeida M S, Kürtenbach E, *et al.* Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(10): 6 064 ~ 6 072
- [10] Nuyens F, van Zyl WH, Iserentant D, *et al.* Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo-beta-xylanase (xynA) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56(3/4): 431 ~ 434
- [11] Cottrell M, Moore J, Kirchman D. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 2 553 ~ 2 557
- [12] Henne A, Schnita R, Bomeke M, *et al.* Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 3 113 ~ 3 116
- [13] Anwar S, Peter L B. A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-xylanase isolated directly from an environment DNA sample. *Extremophiles*, 2003, 7: 63 ~ 70
- [14] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, *et al.* Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1998, 1: 40 ~ 47
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: CSH Press, 1989
- [16] Bentley S D, Chater K F, Cerdeno-Tarraga A M, *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141 ~ 147
- [17] Millward-Sadler S J, Poole D M, Henrissat B, *et al.* Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. *Mol. Microbiol.*, 1994, 11(2): 375 ~ 382
- [18] Irwin D, Jung E D, Wilson D B. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60(3): 763 ~ 770
- [19] Tsujibo H, Ohtsuki T, Iio T, *et al.* Cloning and sequence analysis of genes encoding xylanases and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(2): 661 ~ 664
- [20] Liu X M, Qu Y B, You F, *et al.* Studies on the key amino acid residues responsible for the alkali-tolerance of the xylanase by site-directed or random mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 18: 307 ~ 313

DIVERSITY OF XYLANASE GENE FROM SOIL MICROBIAL DNA

Zhang Guimin Zhuang Yonghong Liu Ting Ma Lixin[†]
(College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract An improved method was used to extract soil microbial DNA by indigenous silica gel instead of imported glass beads. A new degenerate PCR-primer pair P1/ P2 was designed to amplify directly xylanase gene fragments from soil microbial DNA. PCR products were ligated with pMD18T vector. Transformants were got by transforming ligation product into *E. coli*. Ten different recombinants that were confirmed by RFLP were sequenced. The sequence analysis shows that all of the ten fragments encode partial xylanase. The BLAST of deduced amino acid of fragments show that eight out of the ten were high in sequence homology with xylanase from Actinomycetes, two with *Pseudomonas*. Asn27 was found in all partial xylanase based on the alignment of deduced amino acid sequences, which means that all xylanase fragments were alkali-tolerant. Phylogenetic tree shows that all xylanase fragments were positive and over 70 % of similarity.

Key words Soil microbial DNA; Degenerate PCR primers; Xylanase; Gene diversity