

文章编号: 1009-038X(2003)02-0026-04

## *Pichia stipitis* 木糖醇脱氢酶基因 XYL2 在 酿酒酵母中的表达

陈叶福, 王正祥, 方慧英, 诸葛健  
(江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 通过 PCR 方法克隆得到树干毕赤氏酵母木糖醇脱氢酶(XDH)基因 XYL2. 将该基因连入酵母表达载体 pYX212 的强启动子磷酸丙糖异构酶(TPI)启动子下, 得到融合表达载体 pYX-XYL2. 通过电转化方法将 pYX-XYL2 转入酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A 中, 酶活测定表明在酿酒酵母中树干毕赤氏酵母木糖醇脱氢酶基因 XYL2 得到活性表达, 酿酒酵母转化子粗酶液中木糖醇脱氢酶比活为每毫克蛋白 0.6 U 左右, 约为供体菌的 2.4 倍. 与基因供体菌不同, 木糖醇脱氢酶基因在酿酒酵母中表达不需木糖诱导, 为组成型表达.

**关键词:** 树干毕赤氏酵母; 木糖醇脱氢酶基因 XYL2; 酿酒酵母; 基因表达  
**中图分类号:** Q 78 **文献标识码:** A

### Expression of *Pichia stipitis* Xylitol Dehydrogenase Gene XYL2 in *Saccharomyces cerevisiae*

CHEN Ye-fu, WANG Zheng-xiang, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian  
(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** *Pichia stipitis* Xylitol dehydrogenase (XDH) Gene XYL2 was amplified by PCR. The XYL2 gene were placed under the triose phosphate isomerase (TPI) promoter of yeast vector pYX212 to produce the fusion expression vector pYX-XYL2. pYX-XYL2 was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A by electroporation. Transformants of *S. cerevisiae* containing XYL2 of *P. stipitis* synthesize an active XDH. Specific XDH activities of two transformants were 0.59 U/mg protein and 0.66 U/mg protein respectively, which were more than 2.4 times of that of *P. stipitis* CBS 5773 stain. Differently from *P. stipitis* CBS 5773, the XYL2 in *S. cerevisiae* transformants expressed constitutively and did not need xylose for induction.

**Key words:** *Pichia stipitis*; xylitol dehydrogenase gene XYL2; *Saccharomyces cerevisiae*; gene expression

木质纤维素类物质是地球上最主要的可再生资源, 将木质纤维素生物转化生成乙醇, 可以缓解

石油日益枯竭的压力, 同时具有绿色环保的社会效益. 木质纤维素由纤维素、半纤维素和木质素 3 种

收稿日期: 2002-10-10; 修回日期: 2002-12-06.

作者简介: 陈叶福(1973-), 男, 吉林通化人, 发酵工程博士研究生.

成分构成。木糖是半纤维素水解液中除葡萄糖外的另一种主要成分,最高可占半纤维素水解糖类的34%<sup>[1]</sup>。因此如何将木糖生物转化生成乙醇是实现木质纤维素生物转化生产乙醇的关键环节。许多细菌、酵母和真菌可以发酵木糖产生乙醇,但是伴有大量副产物生成并且木糖利用缓慢,无法满足商业化乙醇生产的要求<sup>[2]</sup>。一般而言,酵母通过两步反应将木糖转化成木酮糖。在第一步反应中,以NADPH/NADH为辅酶,在木糖还原酶催化下木糖被还原生成木糖醇;木糖醇再以NAD为辅酶,通过木糖醇脱氢酶被氧化生成木酮糖。而在细菌中,木糖经过木糖异构酶一步反应生成木酮糖。无论在酵母中还是在细菌中,木酮糖都会被木酮糖激酶磷酸化生成5-磷酸木酮糖,5-磷酸木酮糖再进入磷酸戊糖途径而被进一步代谢<sup>[3]</sup>。

酿酒酵母具有耗糖快、乙醇耐受力高、对水解糖液中有毒物质抗性强等优点,一直是乙醇生产中最常用菌种。酿酒酵母虽不能利用木糖<sup>[4]</sup>,但是却能缓慢利用木酮糖。因此,可以将细菌或酵母中木糖到木酮糖的代谢步骤引入酿酒酵母中来构建利用木糖的酿酒酵母。将来源于不同细菌的木糖异构酶基因导入酿酒酵母中构建木糖利用酵母均未获得成功<sup>[5, 6]</sup>。本实验室已经完成了树干毕赤氏酵母木糖还原酶基因 XYL1 在酿酒酵母中表达的工作。作者将树干毕赤氏酵母的木糖醇脱氢酶基因 XYL2 导入酿酒酵母中并得到活性表达,为进一步构建利用木糖的重组酿酒酵母菌株奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株和载体 大肠杆菌宿主菌株 *Escherichia coli* JM109,酿酒酵母宿主菌株 *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A 由作者所在实验室保藏。树干毕赤氏酵母 *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 (CBS 5773) 由美国农业部微生物基因组学和生物工艺学研究室 (Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit) C. P. Kurtzman 教授惠赠。酵母表达载体 pYX212 为 Novagen 公司产品,带有 TPI 强启动子。

1.1.2 培养基和培养条件 大肠杆菌 *E. coli* JM109 及转化子为 LB 培养基,37℃ 静止或摇瓶振荡培养。酵母菌及转化子为 YEPD 培养基、或 YNB 培养基,30℃ 静止或摇瓶振荡培养。

1.1.3 酶、抗生素及试剂 所用 DNA 聚合酶和限制性内切酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。抗

生素为华美生物工程公司产品。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品,所用试剂为分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 *P. stipitis* NRRL Y-7124 基因组 DNA 的制备 按文献[7]的方法进行。

1.2.2 引物设计及目的基因 PCR 扩增 根据公开的 *P. stipitis* 木糖醇脱氢酶 XYL2 的序列信息设计下列引物

引物 P-XYL2-F1: 5'-CGC GGA TCC TAC TGC TAA CCC TTC CTT G-3'

引物 P-XYL2-R1: 5'-GAA GGG CCC ATA GTC GAA GGC TTT TCC G-3'

其中引物 P-XYL2-F1 的 5'端引入了 *Bam*H I 位点,引物 P-XYL2-R1 的 5'端 *Apa* I 位点。

PCR 扩增条件:100  $\mu$ L 反应体系,94℃ 变性 10 min,加入 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶 2 个单位,混合后加入 30  $\mu$ L 矿物油进行 PCR 反应(94℃, 60 s; 56℃, 60 s; 72℃, 120 s),经过 30 个循环后,于 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 DNA 重组、大肠杆菌转化及阳性转化子筛选 PCR 扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化, *Bam*H I、*Apa* I 酶切电泳分离回收约 1.6 kb 的 PCR 产物与经相同酶切的 pYX212 连接后转化大肠杆菌 JM109,在含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上检出转化子,提取质粒,酶切电泳鉴定。

1.2.4 酿酒酵母转化及重组子的筛选 酵母转化按改进的电穿孔法<sup>[8]</sup>进行,转化后涂布于不含尿嘧啶的 YNB 葡萄糖平板,挑选阳性重组子进一步测定其木糖醇脱氢酶酶活。

1.2.5 酶粗提液的制备 接种划线分离的酵母转化子单菌落于 20 mL YNB(不含尿嘧啶)葡萄糖液体培养基,30℃, 200 r/min 摇床培养至对数中后期,接种 5 mL 于 50 mL 的 YNB(不含尿嘧啶)液体培养基中,30℃, 200 r/min 摇床培养至静止期。离心收集菌体,用 10 mmol/L, pH 7.4 的(含 EDTA 1 mmol/L)磷酸钾缓冲液洗涤一次,离心后用适量 100 mmol/L, pH 7.4 的磷酸钾缓冲液重悬菌体。吸 1 mL 菌悬液到装有 1 mL 玻璃珠(0.1 mm)的破壁专用管中, BEAD-BEATER 4 600 r/min 破壁,破壁 30 s,冰浴冷却 1 min,重复破壁 6 次。破壁后高速离心,上清液即为酶粗提液,用于酶活和蛋白质含量测定。

1.2.6 木糖醇脱氢酶酶活测定 用分光光度计在 340 nm 处测定 NAD<sup>+</sup> 依赖的木糖醇脱氢酶活力。

反应体系中包括:100 mmol/L 的 Tris/HCl 缓冲液 (pH 7.4), 0.1 mol/L 木糖醇, 0.4 mmol/L 辅酶 NADH. 加入适量的粗酶液启动反应. 比活(U/mg) 用每毫克总蛋白每分钟内还原 NAD<sup>+</sup> 生成 NADH 的微摩尔数表示.

粗酶液中的蛋白质浓度用 Bradford<sup>[9]</sup> 方法测量, 以牛血清白蛋白作为标准.

## 2 结果与讨论

### 2.1 *P. stipitis* 木糖醇脱氢酶基因的克隆及酵母表达载体的构建

以 *P. stipitis* NRRL Y-7124 基因组 DNA 为模板, 用引物 P-XYL2-F1 和引物 P-XYL2-R1 进行 PCR 反应, PCR 产物电泳表明在 1.6 kb 左右有一明显条带, 特异性较高. 将 PCR 产物用 *Bam*H I、*Apa* I 双酶切、胶回收纯化后与经 *Bam*H I、*Apa* I 双酶切, 胶回收的酵母表达载体 pYX212 大片段连接(见图 1), 转化 *E. coli* JM109, 挑阳性转化子抽提质粒酶切鉴定(见图 2).

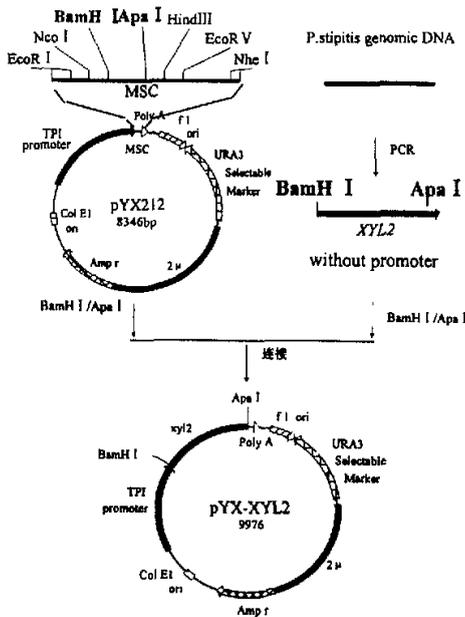


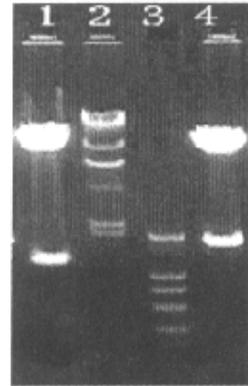
图 1 表达载体 pYX-XYL2 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant expression vector pYX-XYL2

### 2.2 表达载体 pYX-XYL2 的酶切鉴定

将表达载体 pYX-XYL2 用 *Bam*H I、*Apa* I 双酶切, 应释放出 1.6 kb 的没有启动子区域的 XYL2 结构基因片段; 用 *Eco*R I 酶切, 应释放出 1 200 bp

的特征片段. 电泳结果与分析结果相同, 证明质粒构建成功.



1. pYX-XYL2/*Eco*R I; 2.  $\lambda$  DNA/*Hind* III marker; 3. DL2000 Marker; 4. pYX-XYL2/*Bam*H I + *Apa* I.

图 2 重组表达载体 pYX-XYL2 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant expression vector pYX-XYL2

### 2.3 *P. stipitis* 木糖醇脱氢酶基因 XYL2 在酿酒酵母 W303-1A 中的表达及重组子的木糖醇脱氢酶酶活测定

将重组表达载体 pYX-XYL2 用电穿孔转化法转化尿嘧啶营养缺陷型酿酒酵母 W303-1A, 以不含尿嘧啶的 YNB 平板筛选阳性重组子, 重新划线分离后挑选重组子 WXYL2-3 和 WXYL2-7 测定其木糖醇脱氢酶活, 结果见表 1.

表 1 重组子中木糖醇脱氢酶酶活

Tab. 1 Xylitol dehydrogenase activity of *P. stipitis* and *S. cerevisiae* transformants

酵母菌种	每毫克蛋白质中 XDH 活性/U
W303-1A	0.01
<i>P. stipitis</i> CBS 5773	0.25
WXYL2-3	0.59
WXYL2-7	0.66

从酶活测定结果可以看出, 宿主菌株 *S. cerevisiae* W303-1A 中基本没有木糖醇脱氢酶酶活. 重组子 WXYL2-3 和 WXYL2-7 的木糖醇脱氢酶为每毫克蛋白质中比酶活分别为 0.59 U 和 0.66 U, 分别为基因供体菌 *P. stipitis* CBS 5773 的 2.4 和 2.6 倍. 另外, 试验结果表明, 木糖醇脱氢酶基因在 *P. stipitis* CBS 5773 中的表达需要木糖诱导, 而在 *S. cerevisiae* W303-1A 中却为组成型表达, 在葡萄糖培养基中即可测得 *S. cerevisiae* W303-1A 重组子的木糖醇脱氢酶酶活.

### 3 结 论

作者通过 PCR 克隆得到木糖醇脱氢酶基因, 将克隆得到的没有 5' 上游启动序列的木糖醇脱氢酶结构基因与酵母强启动子丙糖磷酸异构酶(TPI)启动子融合, 构建得到表达载体 pYX-XYL2. 用 pYX-

XYL2 转化酵母 *S. cerevisiae* W303-1A, 转化子酶活测定结果表明 *P. stipitis* 木糖醇脱氢酶基因在酿酒酵母中得到活性表达. 酿酒酵母转化子的木糖醇脱氢酶比活是基因供体菌 *P. stipitis* CBS 5773 的 2.4 倍多, 表明结构基因与 TPI 启动子的融合提高了该酶的表达水平.

### 参考文献:

- [1] Schneider H. Conversion of pentose to ethanol by yeasts and fungi[J]. *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1989, 9: 1-40.
- [2] Slininger P J, Borhast R J, Okos M R, *et al.* Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations[J]. *Biotechnol Lett*, 1985, 7:431-436.
- [3] Jeffries T W. Utilization of xylose by bacteria, yeast and fungi[J]. *Adv Biochem Eng*, 1983, 27:1-32.
- [4] Barnett J A. The Utilization of sugars by yeasts[J]. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 1976, 32:126-128.
- [5] Sarthy A V, Mcconaughey B L, Lobo Z, *et al.* Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53:1996-2000.
- [6] Amore R, Wilhelm M, Hollenberg C P. The fermentation of xylose - an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes xylose* isomerase genes in yeasts[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 30: 351-357.
- [7] A. 亚当斯. 酵母遗传学方法实验指南[M]. 刘子铎译. 北京: 科学出版社, 2000. 84-85.
- [8] Becker D M, Guarente L. High-efficiency transformation of yeasts by electroporation[M]. *Methods Enzymol*, 1991, 194:182-187.
- [9] F. 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998. 332.

(责任编辑: 李春丽)

### 征 稿 征 订 启 事

江南大学是教育部直属的“211工程”重点建设大学。《江南大学学报(自然科学版)》为自然科学与工程融合的学术刊物(季刊), 旨在反映自然科学与工程技术领域中最新研究成果及其应用, 刊载机械工程、通信与控制工程、信息工程、化学与材料工程、纺织工程、工业设计、土木工程、数理科学以及医疗卫生等学科的科技论文。

刊物为全国公开发行, 邮发代号: 28-189。热忱欢迎本校及全国各地高等院校相关专业的师生及有关科研院所和企业的研究人员、工程技术人员不吝赐稿, 积极订阅(订购处: 全国各地邮局)。

《江南大学学报(自然科学版)》编辑部