

维生素 C 混合发酵中产酸菌基因文库的构建

刘 娟 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要: 在对氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 的纯培养方法进行了探索并获得了一定的纯培养的 SCB329 菌体的前提下,用常规方法抽提得到 *Gluconobacter oxydans* SCB329 染色体 DNA。选用质粒 pKS 作为载体,该载体具有氨苄抗性以及 *lacZ* 基因。用限制酶对染色体进行部分消化,将一定范围内的消化片段回收后与载体连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,利用蓝白斑特性选出重组子构建 SCB329 基因组文库。用低熔点琼脂糖将 SCB329 菌体包埋起来,对包埋在凝胶块中的细菌菌体进行细胞裂解、去蛋白等操作,防止染色体因机械剪切作用而断裂,以测出 SCB329 染色体的完整长度。本工作为进行菌株改造以及构建以 L-山梨糖为底物发酵产生维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸的基因工程菌株打下基础。

关键词: 维生素 C, 氧化葡萄糖酸杆菌, 基因文库

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0314-06

收稿日期: 1998-09-12, 修回日期: 1999-04-22

CONSTRUCTION OF GENOMIC LIBRARY OF *GLUCONOBACTER OXYDANS* SCB329 IN THE L-SORBOSE UTILIZING MIXED FERMENTATION

LIU Juan YIN Guanglin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract: Improvements were made on pure culture of *Gluconobacter oxydans* SCB329 and certain quantities of bacteria were obtained. Chromosome DNA of SCB329 was extracted by common method. Plasmid pKS was used as vector, on which there are one Amp^r marker gene and one lacZ gene. The total chromosome DNA was partially digested by restricted endonuclease. Fragments of certain size were recovered from gel to ligate with the vector. Ligation mixture was used to transform DH5 α competent cell, with the result of large quantities of positive transformants. A genomic library can be constructed. Bacterial cells of SCB 329 were buried in low melting-point agarose gel. Lysis and elimination of proteins were performed to the cells buried in the gel. Prevented from breaking under mechanic forces, complete chromosome size can be determined.

Key words: Vitamin C, *Gluconobacter oxydans*, Genomic library

目前,基因组学(Genomics)是现代生物学中的一门新兴学科。人类基因组计划已正式启动,中国的水稻基因组测序正在进行,有不少微生物的基因组序列已被测出,基因组学已成为一个重要的研究领域和研究方法。由于极端微生物在结构及代谢上的某些特性,现在一些研究小组开始对某些极端微生物进行基因组研究。维生素C混合发酵产酸菌 *Gluconobacter oxydans* SCB329 在培养及生理上是一株很有特色的菌株,对其进行基因组研究有较大应用价值。构建基因文库,是整个基因组研究的重要基础。本文介绍了 SCB329 基因组文库的初步构建。

维生素C即L-抗坏血酸,是人体必需的一种维生素,具有广泛的生理作用。维生素C的生产最初采用化学合成“莱氏法”^[1],后来逐步被微生物“两步发酵法”代替^[2]。“两步发酵法”通过两步用3种微生物实现从D-山梨醇到维生素C前体2-酮基-L-古龙酸(2-Keto-L-Gulonic acid,以下简称2-KLG)的转化,其中第二步,即从L-山梨糖到2-KLG的转化由

一株氧化葡萄糖酸杆菌和一株芽孢杆菌属细菌混合培养参与发酵。Makover 和 Perlman 等人通过研究 *Gluconobacter melanogenus* IFO3293 利用L-山梨糖的代谢过程提出了产生2-KLG的“山梨酮途径”(“L-sorbose pathway”)^[3,4],即由L-山梨糖脱氢酶(SDH)催化L-山梨糖生成L-山梨酮和L-山梨酮脱氢酶(SNDH)催化L-山梨酮生成2-KLG。本实验室筛选诱变得到的新的组合菌系—氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* SCB329 和苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* SCB933,并进行了菌株生理特性和发酵条件优化等的研究^[5]。研究发现 SCB329 单独培养时,产生与混合培养时等量的L-山梨酮和少量2-KLG;而 SCB933 单独培养时,既不产生L-山梨酮,也不产生2-KLG。因此推论“山梨酮途径”存在于 SCB329 中。

构建 SCB329 基因组文库,为L-山梨酮脱氢酶(SNDH)和L-山梨糖脱氢酶(SDH)基因的克隆与表达等研究打下基础,也为构建以L-山梨糖为底物以高转化率发酵产生2-KLG的

基因工程菌打下基础。关于 SCB329 在遗传学方面的研究,国内外报道很少^[6],因此,本工作只能借助一些相关菌种的资料进行^[7,8]。目前,只收集到少数 L-山梨酮脱氢酶基因,而且进行同源比较后发现相互间同源性很小。另外,SCB329 的某些独特的生理特性和代谢途径给某些实验诸如菌株纯培养等带来困难,增加了这一探索性工作的难度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒:菌株 *Gluconobacter oxydans* SCB329、*E. coli* DH5 α 均由本实验室保存;质粒 pKS 由中科院国家基因研究中心惠赠。

1.1.2 工具酶及化学试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、核酸 Marker、Wizard 试剂盒等均为美国 Promega 公司产品;碱性磷酸酯酶为日本 Takara 公司产品;Zymolyase 为日本 Seikagaku 公司产品;RNase A、溶菌酶、抗生素为华美生物工程公司产品。

1.1.3 培养基:LB 培养基:蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,NaCl 10g,pH7.0,定容至 1L。

氨苄青霉素 (Amp):使用浓度为 100 μ g/mL。

Gluconobacter oxydans SCB329 培养基: L-山梨糖 15g,葡萄糖 2g,蛋白胨 10g,碳酸钙 4g,酵母提取物 3g,尿素 4g,pH6.8~7.0,定容至 1L。

SOB 培养基 (1000mL): 蛋白胨 20g,酵母提取物 5g,NaCl 0.5g, 250mmol/L KCl 10mL,2mol/L MgCl₂ 5mL(单独灭菌,临用前加入),pH7.0。

SOC 培养基:除含 20mmol/L 葡萄糖外,其余成分均与 SOB 培养基成分相同。

1.2 方法

1.2.1 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的纯培养和染色体的提取:将 SCB329 从新鲜试管斜面接至茄瓶斜面上,28 $^{\circ}$ C 培养 48h 后每一支茄瓶斜面接至一瓶装有 50mL 液体培养基的 500mL 三角瓶中,28 $^{\circ}$ C 摇瓶培养 48h。在摇瓶培养结束后,一方面用相差显微镜观察活菌,看其生长状态和检

查是否污染杂菌;另一方面取少量培养液测定该菌纯培养时的产酸量。离心收集菌体,用 10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA 缓冲液洗涤菌体,离心收集菌体,用同样缓冲液重新悬浮菌体。加入溶菌酶,37 $^{\circ}$ C 温育 1h。加入 RNase A 使终浓度为 100 μ g/ μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。加入蛋白酶 K 使终浓度为 100 μ g/ μ L, 50 $^{\circ}$ C 温育 3h。用等体积酚/氯仿/异戊醇抽提,取上清,再用氯仿/异戊醇抽提,取上清。加入 3mol/L NaAc 至终浓度为 0.3mol/L,加入两倍体积无水乙醇,0 $^{\circ}$ C 沉淀 10min。用洁净玻棒挑出成团纤维状物质转移到 Eppendorf 管中,用 70% 乙醇洗涤。将 DNA 沉淀干燥,待痕量乙醇挥发至尽,用 TE 溶解 DNA,待 DNA 完全溶解后,置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

将 DNA 溶液走脉冲场凝胶电泳,电泳条件为:电场强度 6V/cm,时间 8h,角度 120 $^{\circ}$,角度变换时间 0.6s,温度 14 $^{\circ}$ C。

1.2.2 用凝胶包埋法制备 SCB329 完整染色体 DNA:SCB329 从新鲜试管斜面至茄瓶斜面至液体培养的一系列扩大培养同 1.2.1 中所述。离心收集菌体,用 50mmol/L EDTA 重悬细胞,洗涤细胞,离心收集细胞。用 SCE(1mol/L sorbitol, 10mmol/L EDTA, 0.1mol/L 柠檬酸钠, pH5.8) 溶液悬浮细胞,并且每 1mL SCE 加入 34 μ L 2mol/L DTT 和 1mg zymolyase,于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。加入与 SCE 溶液等体积的由 125mmol/L EDTA 溶液配成的 2% 低熔点琼脂糖溶液,于 50 $^{\circ}$ C 混合。将熔化的混合物立即滴于模中,冷却使形成凝胶包埋块。将凝胶块转移至蛋白酶 K 溶液 (0.5mg/mL ES, ES: 0.5mol/L EDTA, pH9.5, 1% SDS) 中,50 $^{\circ}$ C 温育 24h 后用新的蛋白酶 K 溶液替换原溶液,继续温育 24h。室温下,用水洗涤凝胶块,然后将凝胶块转移至 TEP(0.1mmol/L PMSF, 10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA) 溶液中,室温下放置 1h。用 10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA 洗涤凝胶块数次。将凝胶块置于 10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA 中,保存于 4 $^{\circ}$ C。

将 DNA 溶液走脉冲场凝胶电泳,电泳条件

为:电场强度 6V/cm, 时间 8h, 角度 120°, 角度变换时间 0.6s, 温度 14℃。

1.2.3 载体的制备:将质粒 DNA 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 挑单菌落转化细胞, 用含 100 μ g/mL 氨苄的 LB 培养基进行扩大培养。抽提 pKS 质粒, 并进行纯化。用 SmaI 对质粒进行单酶切, 酶切完全后用碱性磷酸酯酶对载体进行去磷酸化, 并在反应结束后加入 EDTA 使终浓度为 5mmol/L, 于 65℃ 温育 1h 以灭活去磷酸化酶。用酚/氯仿/异戊醇以及氯仿/异戊醇各抽提一次, 取上清, 加入两倍体积无水乙醇和 3mol/L NaAc (pH5.2) 至终浓度为 0.3mol/L, 0℃ 沉淀 30min, 12000r/min 离心 15min, 弃上清。用 70% 乙醇洗涤 DNA, 并使乙醇挥发干尽。用 50 μ L TE 反复吹洗管壁, 溶解 DNA。

1.2.4 染色体 DNA 的酶切与纯化:根据载体选用 SmaI 对染色体进行部分消化, 将消化产物走 0.7% Agarose 凝胶电泳, 收集 4~10kb 的 DNA 片段, 并进行胶回收与纯化。

1.2.5 用 CaCl_2 方法制备感受态细胞和转化:用 0.1mol/L CaCl_2 制备感受态细胞。将载体与染色体片段按 3:1 的比例连接, 连接液中 PEG8000 浓度为 15%, 并进行转化。方法参考文献 [9]。

在 100 μ g/mL 氨苄 LB 平板上加入 20mg/mL X-gal 40 μ L, 2mol/L IPTG 10 μ L, 用玻棒涂布均匀。

设立: (1) 感受态细胞阴性对照, (2) 标准质粒阳性对照, (3) 去磷酸化质粒载体自连接产物对照。

1.2.6 电转化:制备用于电转化的细胞, 细胞浓度为 2×10^{10} 个 / mL。将连接液用乙醇沉淀的方法脱盐后进行电转化。方法参考文献 [10]。电压为 12.5KV/cm, 电容为 25 μ F, 平行电阻为 200 Ω ^[11, 12]。

1.2.7 2-KLG 的测定:方法参考文献 [5]。

2 结果与讨论

2.1 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的纯培养和染色体 DNA 的抽提

实验证实, *Gluconobacter oxydans* SCB329

在利用 L-山梨糖发酵生产维生素 C 前体 2-KLG 的过程中是主要产酸菌。这是一株革三氏阴性菌。然而, 这株菌的细胞个体极小, 在与 *Bacillus thuringiensis* SCB933 混合培养时生长旺盛, 产酸量高, 而单独培养时生长极其微弱, 容易聚集成团, 产酸量低, 而且极易受到污染, 很难进行大规模纯培养。获得大量该菌纯种菌体是进行一系列实验如抽提染色体等的前提。因此, 本工作从一开始便进行了对 SCB329 纯培养的探索。针对该菌在固体斜面上生长较旺盛, 在液体中生长微弱, 采取首先在茄瓶上扩大培养, 然后以较大接种量接液体培养基的方法。摇瓶培养控制在 40~48h 之间, 时间过短菌体量较少, 时间过长会造成 pH 值急剧下降, 因为 SCB329 在纯培养时会少量产酸。此外, 为避免液体培养基中杂质对收集菌体的影响, 液体培养基在灭菌前需过滤以保持透明度。摇瓶培养结束后的检测是为保证收集的纯菌体的质量。从相差显微镜观察活菌的结果来看, 在相同接种量和相同培养时间的情况下, SCB329 单独培养时的菌体密度比混合培养时的菌体密度明显要低。测得 SCB329 摇瓶纯培养的平均产酸量为 1.5~2.5mg / mL, 而同样条件混合培养时产酸量在

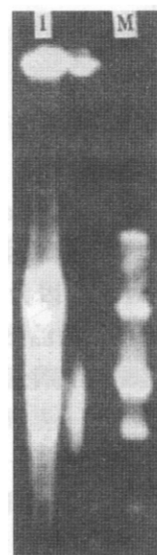


图1 用常规方法抽提到的染色体脉冲场凝胶电泳

1. SCB329染色体DNA, M. 从上至下为Pulse Marker (kb): 194.0, 145.5, 97.0, 48.5, 23.1, 9.4, 6.6

12 mg/mL 以上。这一方面说明该菌在液体培养时有一定活力,另一方面也证明该菌纯培养时的产酸量比混合培养时的产酸量要低得多。通过大规模茄瓶斜面培养以及对其液体培养基的改进,SCB329 的纯培养收集到了一定量的菌体。

从脉冲场凝胶电泳的结果来看,常规法抽出的染色体 DNA 大小约为 98kb,见(图 1)。

2.2 凝胶包埋法制备完整 DNA

将凝胶块走脉冲场凝胶电泳时,发现条带线性不明显,有拖尾,将条带比较集中的部分与 marker 进行比较,大小在 200kb 以上(实验中所用 marker 最大条带为 200kb)。可能用消解酶 zymolyase 温育 1h 时间过长,细胞破壁之后不久 DNA 被自身酶降解,造成电泳条带有拖尾。根据脉冲场电泳结果,基本上可以肯定染色体大小在 200kb 以上。该方法虽曾适用于酵母菌,但针对不同的细胞某些实验条件可能有所不同。因此,需要继续摸索某些针对该菌的实验条件。

2.3 载体的制备

pKS 是一个大小为 3kb 的质粒。主要有一个氨苄抗性位点,一个 *lacZ* 片段可提供蓝白斑选择,*lacZ* 片段上有该质粒上唯一的单酶切位点: *SmaI*。

2.4 染色体的消化

设立了一系列预实验摸索部分消化条件,使消化后片段主要集中在 4~10kb 之间。由于将用于平端连接,胶回收后进行了浓缩。

2.5 电转化

电转化的效率不高于用 CaCl_2 方法转化的效率,效果并不理想。分析原因,可能是连接液经乙醇脱盐后浓度过低。因为是平端连接,连接液中 DNA 的浓度本来已经比较低,经乙醇沉淀等步骤的损失,使脱盐后的连接液浓度过低,使电转化效率并不高。

2.6 用感受态细胞转化

用由 CaCl_2 制备的感受态细胞转化后,通过蓝白斑筛选重组子。设立的 (1) 阴性对照在氨苄平板上无菌落长出; (2) 标准质粒载体长出大量蓝斑; (3) 去磷酸化载体对照长出个别白斑及蓝斑。载体与染色体片段的连接产物转化 DH5 α 的

平板平均一个平板上有 50 个白色菌落。随机挑选白斑抽质粒进行验证,结果表明绝大部分由白斑抽出的质粒较原 pKS 载体有明显增大。将重组质粒进行酶切验证,结果表明重组质粒能被 *SmaI* 切成载体片段与插入片段,见(图 2)。

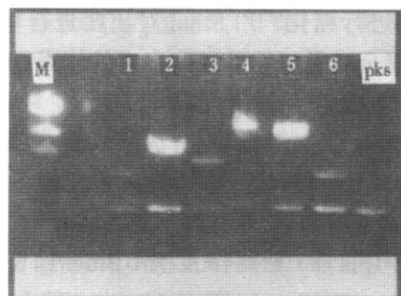


图2 重组质粒酶切鉴定
M. λ /Hind III marker, 1~6. 重组质粒 *SmaI* 酶切结果, pKS. 载体对照。

根据 Maniatis 等 (1982) 介绍的公式^[9]: $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f/g)$, 要使构建的基因文库能以 99.99% 的概率 (P) 覆盖整个基因组 DNA, 理论上需要的重组子数 N 应达到一定数量。目前 SCB329 基因组可确定在 200kb 以上, 确切大小待定。资料表明, 革兰氏阴性菌的基因组大小在 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ bp 之间^[14]; 若按 SCB329 基因组为 4×10^6 bp, 插入片段平均为 5kb 计算, 则需重组子 3681 个。

氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 是“两步发酵法”生产维生素 C 中关键的一株菌, L-山梨酮脱氢酶与 L-山梨糖脱氢酶是该菌产酸过程中关键的两个酶, 从基因工程角度对 SCB329 进行的研究, 为今后进行菌株改造及构建基因工程菌打下坚实的理论基础。关于 SCB329 在遗传学方面的工作在本实验室只是刚刚起步, 而可供参考的资料较少, 整个工作在不断探索中进行。本文提出了该项探索性新工作及其意义。

致谢 国家基因中心赵文会同志在脉冲电场凝胶电泳方面提供了帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Reichstein T, Grüssner A. *Helv Chim Acta*, 1934, 17: 311~328.
- [2] 尹光琳, 陶增鑫, 严自正等. 微生物学报, 1980, 20(3):

246~251.

- [3] Kitamura I, Perlman D. *Biotech Bioeng*, 1975, **17**:349.
- [4] Makover S, Ramsey G B, Witt C G *et al.* Abstract of the annual meeting of the American society for microbiology. *Microbial physiology*, 1974, Chicago, 64.
- [5] 尹光琳, 何建明, 任双喜等. *工业微生物*, 1997, **27**(1): 1~7.
- [6] 郭新友, 尹光琳. *微生物学通报*, 1998, **25**(3): 139~143.
- [7] Yoshimasa S, Yoshinori I, Kyoichi S *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**:454~460.
- [8] Masako S, Noribumi T, Akira A *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**:413~420.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *分子克隆实验指南*. 北京: 科学出版社, 1996, 49~59, 457.
- [10] 陈乃用. *微生物学通报*, 1991, **18**: 97~103.
- [11] Shuang-En C, Ann-Lii C, Chih-Chiang C. *Nucleic acids research*, 1995, **23**:164.
- [12] William J, Jeff F, Charles W. *Nucleic acids research*, 1988, **16**:6127~6145.
- [13] 彭秀玲, 谢毅, 王洪海等. *基因工程实验技术*, 湖南: 湖南科学技术出版社, 1997, 54~61.
- [14] 孙乃恩等编著. *分子遗传学*. 南京: 南京大学出版社, 1995, 34.