

枯草芽孢杆菌 α -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆及表达*

高 健²⁾ 铁翠娟¹⁾ 王忠彦²⁾ 何秀萍¹⁾ 胡永松²⁾ 张博润¹⁾ **

(中国科学院微生物研究所¹⁾ 北京 100080) (四川联合大学生物工程系²⁾ 成都 610064)

摘 要 利用鸟枪法构建了供体菌的基因组文库,通过 VP 反应显色法进行筛选,从约 7000 个转化子中选出携带 ALDC 基因的重组质粒(pBG4~pBG5)。绘制了 pBG4 插入片段的限制酶图谱。Southern 杂交证明该外源片段来源于供体菌。酶活性测定结果表明 ALDC 基因在大肠杆菌中获得了表达,为构建带有 ALDC 的啤酒酵母工程菌奠定了基础。

关键词 枯草芽孢杆菌, α -乙酰乳酸脱羧酶基因, 克隆及表达

分类号 Q93-933

啤酒发酵风味成熟的重要限速步骤是降低双乙酰含量。双乙酰是啤酒酵母的代谢产物,由 α -乙酰乳酸经非酶氧化脱羧产生,由于啤酒酵母本身不能产生 α -乙酰乳酸脱羧酶简称 ALDC(EC4.1.1.5),只能由双乙酰还原酶将 α -乙酰乳酸还原成乙偶姻,再由乙偶姻还原酶还原为 2,3-丁二醇,这一系列物理、生化反应是延长啤酒发酵风味成熟期的重要因素,ALDC 能将乙酰乳酸直接脱羧转化成乙偶姻,对于改善啤酒风味,缩短熟化期具有重要作用。降低双乙酰的途径有两种:一是在啤酒酿造中直接使用 ALDC 酶制剂;二是利用基因工程技术将外源的 ALDC 基因引入啤酒酵母,构建带有 ALDC 基因的工程菌用于啤酒酿造^[1~3]。本研究的主要目的是获得 ALDC 基因,为下一步构建带有 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌奠定基础。本文报道枯草芽孢杆菌 ALDC 基因克隆及表达的研究结果。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

含有 ALDC 基因的枯草芽孢杆菌 BD-5^[3] 由河北大学阎振荣教授惠赠。质粒 pUC18 和受体菌大肠杆菌 JM107 为本实验室保存。

1.2 酶及试剂

限制性内切酶、修饰酶及核酸分子量标准分别为 Promega, Sigma 及 B.M 公司产品,其它

试剂购自天象人公司及华美公司。

1.3 培养基及培养条件

TB 培养基^[5]用于供体菌培养,供提取总 DNA; SOB 和 SOC 培养基^[5]用于大肠杆菌的转化; LB 培养基^[5]用于受体菌培养; VP 培养基^[6]用于阳性克隆的筛选;固体培养基加 1.5% 的琼脂。Amp 加入量为终浓度 80 μ g / ml,供体菌在 30 $^{\circ}$ C 培养,受体菌在 37 $^{\circ}$ C 培养。

1.4 克隆技术

参照文献 [5] 进行。

1.5 V.P 试验

将单菌落接种于 VP 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡 24h,取 200 μ l 菌液于微孔板中,依次加入显色剂 (40% NaOH 100 μ l, 5% α -萘酚乙醇溶液 + 1% 肌酸 100 μ l),振荡混匀,室温静置 40min 后观察,显红色的为 ALDC 阳性克隆。

1.6 α -乙酰乳酸脱羧酶活测定

按文献 [6~7] 所述方法进行。

2 结果与讨论

2.1 枯草芽孢杆菌 BD-5 基因组文库的构建

EcoRI 部分酶切 BD-5 的总 DNA, 低熔点琼

* 本研究为国家自然科学基金资助课题

** 通讯联系作者

1997-12-27 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

脂糖电泳回收 2~10kb 的片段。用相同酶切载体 pUC18 后经 CIP 脱磷酸化,然后将两者以 4:1 比例连接,转化受体菌 JM107,得到约 10,000 个转化子。随机挑选 200 个转化子点种于 X-gal 平板上,得 131 个白色菌落,重组频率为 65.5%。随机挑选 30 个提取质粒,电泳表明均有插入片段,平均长度为 3kb。将转化子用无菌水洗下,离心后将菌体中加入 10ml LB 及 10ml 50% 甘油即得供体菌的基因组文库,于 -20℃ 保存。

2.2 ALDC 阳性克隆的筛选

将 X-gal 平板上的白色菌落挑至 VP + Amp 培养基中,37℃ 振荡培养 24h 后,取 200μl 菌液进行试验,经反复筛选,从约 7,000 个重组菌落中筛选出 3 株阳性菌。该方法简便快速,结果准确。

2.3 阳性克隆的鉴定

2.3.1 酶切分析:提取重组质粒用 EcoRI 酶切,电泳分析表明插入片段为 2.3kb 左右,经 Hind

III、PstI、SacI、SalI、BamHI、SphI 和 EcoRI 酶切分析,酶切图谱完全相同(图 1),表明插入片段为

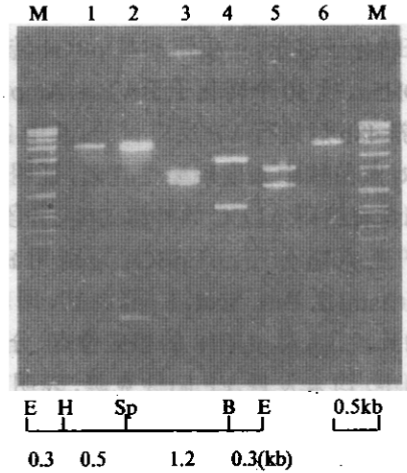


图1 pBG4插入片段的限制酶切分析和限制酶图谱

M: *sppI*/EcoRI; 1: *SacI*; 2: *BamHI*; 3: *EcoRI*; 4: *SphI*; 5: *HindIII*; 6: *SalI*.

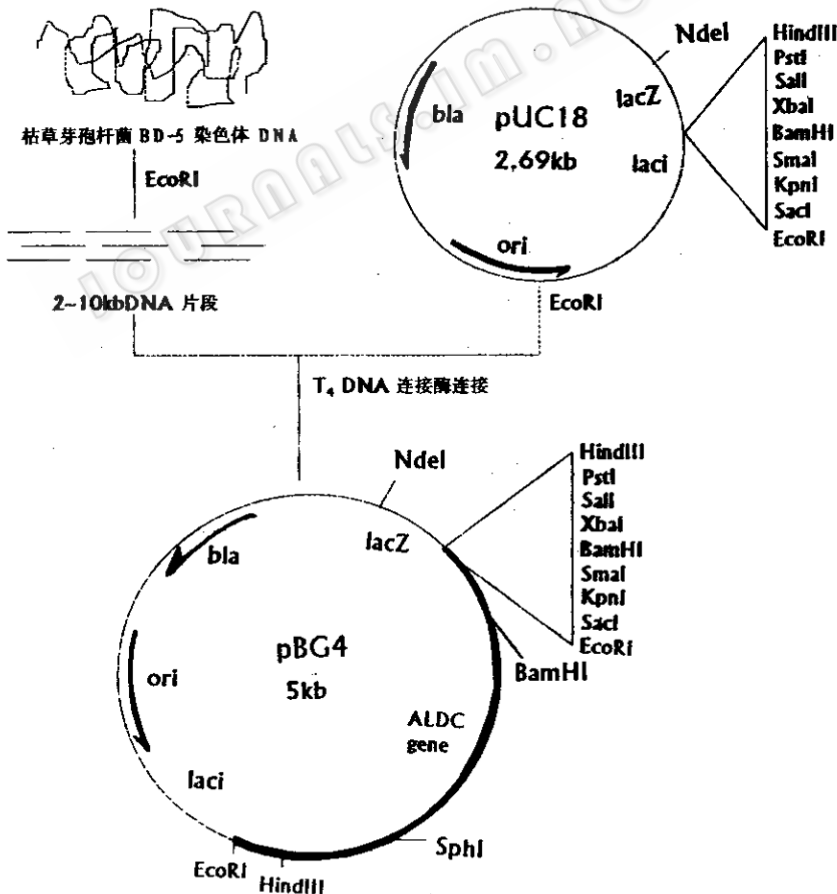


图2 重组质粒pBG4的构建

同一外源 DNA, 根据酶切结果绘制了该外源片段的限制酶切图谱。选 pBG4 (图 2) 作进一步分析。

2.3.2 转化子鉴定: 用重组质粒 pBG4 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑 30 个转化子于 VP + Amp 培养基中, 培养 48h 后进行 VP 反应试验, 其中 29 个为阳性, 对照菌株中未发现阳性克隆, 证明该重组质粒确实含有编码 ALDC 的外源 DNA 片段。

2.3.3 亚克隆分析: 将 pBG4 分别用 HindIII、EcoRI、BamHI、PstI、SacI、KpnI 酶切, 回收不同大小的片段, 插入 pUC18 的相应位点, 分别转入 JM107 中, 均未发现 VP 阳性克隆, 表明以上酶切位点均位于该基因表达的功能区内。Renna 等人^[4]的研究结果表明, 枯草芽孢杆菌的 ALDC 基因 (alsD) 和乙酰乳酸合成酶基因 (alsS) 位于同一操纵子内, 而且 alsD 位于 alsS 的下游, 二者的长度分别为 0.8kb 和 1.2kb, 本研究验证了这一结果。

2.3.4 Southern 杂交分析: 为证明该重组子 pBG4 的外源片段是否来自供体菌, 以地高辛标记的 pBG4 的外源片段为探针, 对经 EcoRI 酶切后的 BD-5 总 DNA 进行杂交, 结果如图 3 所示, 供体菌总 DNA 出现了唯一一条杂交带, 初步断定 2.3kb 左右的外源片段来自 BD-5 的基因组。

2.4 ALDC 基因在 *E. coli* 中的表达

对供体菌, 受体菌及转化子 JM107 (pBG4) 的 ALDC 酶活性进行测定, 测定结果验证了受体菌中不含有 ALDC 活性, 重组质粒 pBG4 确实含有外源的 ALDC 完整基因, 并且在大肠杆菌中获得了表达。虽然枯草芽孢杆菌的 ALDC 基因能在大肠杆菌中表达, 但表达量较低, 其主要原因是采用的载体 pUC18 是克隆载体, 不是高表达诱导型载体。本研究的主要目的是获得

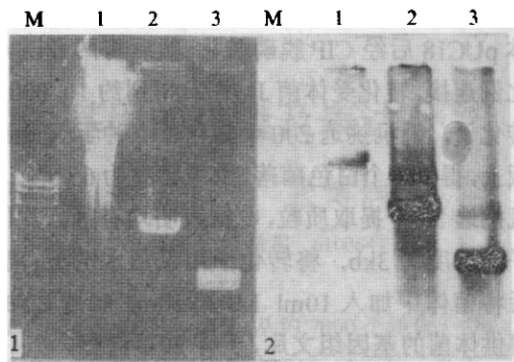


图3 pBG4插入片段的Southern杂交图谱
(1: 电泳图谱; 2: 杂交图谱)

M: *sppI*/EcoRI; 1: BD-5总DNA/BamHI;

2: pBG4; 3: pBG4/EcoRI

ALDC 基因, 为构建带有 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌提供目的基因和奠定基础。在大肠杆菌中表达的 ALDC 不能分泌到胞外, 这和 Renna 等人^[4]报道的结果相同。结合 Southern 杂交分析结果, 可以确定该 ALDC 基因来源于供体菌 *Bacillus subtilis* BD-5 菌株。

参 考 文 献

- [1] 张博润, 刁爱坡, 何秀萍. 微生物学通报, 1997, 24(4): 241~243.
- [2] 陈 炜, 何秉旺, 张建华等. 微生物学报, 1997, 37(4): 270~243.
- [3] 阙振荣, 张元亮. 河北大学学报(自然科学版), 1997, 17(1): 46~49.
- [4] Renna M C, Najimudin N, Winik L R et al. J Bacteriol, 1993, 175(12): 3863~3875.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [6] Loken J P, Stormer L C. Eur J Biochem, 1970, 14: 133~137.
- [7] Olsen F. Pat Appl, EPO128714, 1988.

CLONING AND EXPRESSION OF α -ACETOLACTATE DECARBOXYLASE GENE OF *BACILLUS SUBTILIS*

Gao Jian²⁾ Tie Cuijuan¹⁾ Wang Zhongyan²⁾ He Xiuping¹⁾ Hu Yongsong²⁾ Zhang Borun¹⁾

(Institute of Microbiology, Academia Sinica¹⁾, Beijing 100080)

(Sichuan University²⁾, Chengdu 610064)

Abstract *Bacillus subtilis* BD-5 genomic library has been constructed using plasmid pUC18 in *Escherichia coli*. The hybrid plasmids (pBG3~5) which contained the gene encoding α -acetolactate decarboxylase (ALDC) have been isolated from this library by Voges-Proskauer tests. Southern hybridization showed that the inserted fragment of pBG4 was from the BD-5. The restriction map of the insert fragment of pBG4 has been drawn. The ALDC activity was expressed in the *Escherichia coli*. This work laid a foundation to construct the genetically-modified brewing yeasts with ALDC gene.

Key words *Bacillus subtilis*, α -Acetolactate decarboxylase gene, Cloning and Expression