

荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 BAC 文库的构建与分析

朱雅新^{1,2,3}, 王加启³, 马润林⁴, 黄力², 董志扬^{2*}

(¹新疆农业大学农学院 乌鲁木齐 830052)

(²中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

(³中国农业科学院畜牧研究所 反刍动物营养研究室 北京 100094)

(⁴中国科学院遗传与发育生物研究所 北京 100101)

摘 要 采用未培养技术和脉冲场电泳技术直接从瘤胃微生物提取到大小在 2Mb 左右混合微生物 DNA, 经 *Hind* III 不完全酶切获得 50 ~ 100kbDNA 片段, 将其连接在 pCC1BAC 载体上, 转化 *E. coli* EPI300, 得到瘤胃微生物 BAC 文库。经对文库的鉴定分析, 该文库的平均插入片段 54.5kb, 空载体率小于 2%, 库容 837Mb, 共保存 15360 个克隆。通过对该文库进行部分酶活性筛选, 获得具有淀粉酶活性的克隆 16 个, 纤维素酶活性的克隆 26 个, 而且能降解纤维素的克隆中 25 个呈现多酶活性。这些结果表明该文库具有重要研究价值。

关键词: 瘤胃微生物; 细菌人工染色体文库; 筛选

中图分类号: Q78, X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)02-0213-04

瘤胃内微生物是一个由原虫、真细菌、古菌及一些厌氧真菌及噬菌体等构成的复杂体系^[1]。它们对反刍动物的消化、营养与健康起着决定性作用。由于瘤胃微生物群落高度复杂性, 微生物种间共生依赖性非常强, 而且其中 89% 以上的微生物还不能为我们所认识^[2], 传统微生物技术已很难对其生态和资源进行全面分析。而未培养技术可以有效突破这一瓶颈^[3], 使我们可能获得更多的瘤胃微生物基因资源。细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 文库技术又使我们尽可能获得更大、更多的微生物 DNA 片段^[4], 这意味着我们可以通过获得较少的克隆包含更多基因信息, 同时更能够较为完整的研究未培养微生物各种基因的定位、来源、相互关系及协同作用^[5]。从而对未培养微生物的代谢和相互作用有一个更新的认识。因此未培养微生物 BAC 文库构建和分析是研究一些复杂特殊环境微生物最富有潜力的技术手段之一。

在瘤胃宏基因组文库研究中, Ferrer 等于 2005 年构建了第一个平均插入大小为 5.5kb 的 λ 噬菌体表达文库, 从中筛选到的多种木聚糖酶及纤维素酶^[6], 但是对于已经研究了几十年的瘤胃微生物体系, 除了需要对已经做了大量工作的微生物多样性^[7]、微生物酶体系需要进一步深入研究外, 更重要

的工作是通过对于微生物区系关系的研究, 探索瘤胃内蛋白、糖及脂肪代谢的定向调控问题, 同时对于纤维降解酶系、可能的有价值的次生代谢物的研究等等。这几个方面都需要很大的插入片段, 因此, 构建大片段的瘤胃插入文库就显得非常重要。

本文在国内外首次报道了采用未培养技术和 BAC 技术, 构建了荷斯坦奶牛瘤胃微生物 BAC 文库, 并对该文库进行了评价。结果表明这些技术非常适合于瘤胃微生物这样的复杂微生物系统的研究, 可以大量获得瘤胃微生物基因信息, 为进一步研究这一复杂生态系统的分子代谢奠定了良好基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 瘤胃样品来源: 瘤胃内容物采自中国农业科学院畜牧研究所牛场的 3 头带瘻管荷斯坦奶牛。

1.1.2 主要试剂和仪器: CopyControl pCC1BAC (*Hind* III) 试剂盒购自 Epicentre 公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TransforMax EPI300 由中国科学院遗传研究所马润林老师赠送。*Hind* III 限制性内切酶购自 promega 公司; 蛋白酶 K 购自 Merck 公司; 溶菌酶购自 Amersco 公司; 低熔点琼脂糖及脉冲场电泳琼脂糖购自 promega 公司; Mid Range PFG Marker 购

基金项目: 国家 863 计划 (2004AA214080)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-64807353; E-mail: dongzy@im.ac.cn

作者简介: 朱雅新 (1965 -), 女, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事环境微生物基因组学研究。E-mail: zhuyx@im.ac.cn

其他作者: 毛爱军², 罗淑萍¹

收稿日期: 2005-05-29 接受日期: 2005-07-14 修回日期: 2007-01-10

自 NEB 公司,其余均为国产分析纯级试剂。脉冲场电泳仪 Mapper III(Bio-Rad);电激转化仪 Gene Pulser II(Bio-Rad)。

1.2 瘤胃微生物元基因组大片段 DNA 的提取

1.2.1 样品的采集和处理 通过瘘管直接采集牛瘤胃新鲜样品,经洗涤过滤,离心获得瘤胃微生物细胞悬浮液,使得细胞的浓度为每毫升 $10^7 \sim 10^8$ 个。

1.2.2 瘤胃微生物大片段基因组 DNA 的获得 参照 Rondon 等的方法^[8],将瘤胃微生物细胞悬浮液包埋在 0.8% 低熔点琼脂糖(SeaPlaque LMP agarose (FMC)) 中,制成胶块,用裂解液裂解琼脂包埋块中的微生物细胞,降解其中的蛋白质,使其 DNA 得以释放出来,此时,凝胶块中包含纯化的高分子量的总基因组 DNA。

1.3 BAC 文库的构建

1.3.1 高分子量的总基因组 DNA 酶切 将上述总 DNA 包埋胶块,置于 10 倍体积的 *Hind* III 酶切溶液中,在 37°C 进行酶切消化,然后用脉冲场电泳对酶切 DNA 进行分离,回收含有 50 ~ 200kb 大小 DNA 胶块,用电洗脱法^[9],回收大片断 DNA。

1.3.2 连接、转化及文库保存 将经 *Hind* III 酶切的大片段 DNA 与 CopyControl pCC1BAC 载体按 1:4 的摩尔比,16°C 过夜连接。连接产物经 Millipore 透析膜(0.025 μ m)透析后,参考 Zhang 等^[10]的方法,用 Gene Pulser(Bio-Rad, USA, Gene Pulser II) 进行电激转化(1.6kV, 200 Ω , 25 μ F) 转化后的细胞涂于含有氯霉素、X-Gal、IPTG 的固体 LB 平板上,37°C 培养过夜,计算蓝白斑比例,挑取阳性白斑保存在 384 孔培养平板上,-80°C 贮存。

1.4 BAC 文库的鉴定及评价

从 BAC 文库中随机挑选 77 个克隆分别接种于 5mL 含有 12.5 μ g/ mL 氯霉素的 LB 培养基中,37°C 培养过夜,参考 Sambrook 等^[11]的方法提取质粒 DNA,用 Not I 酶切后,脉冲电泳分析插入片段的大小,统计库容量,脉冲条件为:琼脂糖 1%,缓冲液 0.5 \times TBE,脉冲电压 5V/cm,脉冲时间 5 ~ 15s,脉冲角度 120°,电泳时间 13h,温度 12.5°C。

1.5 BAC 克隆的稳定性鉴定

挑取 3 个 BAC 克隆的单菌落接种到 5mL 含氯霉素 LB 培养基中,37°C 过夜培养,每个克隆的 24h 培养物用 LB 培养基进行 10^6 倍稀释继续培养,如此连续转接培养 4 次,分别提取第 1 天(第 0 代)至第 4 天(约第 100 代)BAC 克隆的质粒 DNA,用 *Hind* III 酶切分析比较指纹图谱的变化,从而确定 BAC 克隆在继代培养中是否稳定^[12]。

1.6 瘤胃微生物 BAC 文库淀粉酶、纤维素酶活力筛选

参照 Theather 等^[13]方法,用含有羧甲基纤维素、淀粉、木聚糖等底物的 LB 平板对文库进行酶活筛选,根据菌落周围的水解圈初步分析产酶性能^[14]。

2 结果和分析

2.1 瘤胃混合微生物 BAC 文库的构建

根据瘤胃本身的特性,对瘤胃内容物采用分级分离法,最大限度的获得瘤胃微生物,采用上述 DNA 提取分离方法,我们能够制备的大分子瘤胃微生物混合 DNA, DNA 片段大小在 2.2Mb 以上占较大比例,而所获得的大片段 DNA 纯度较高,能够被限制酶酶切,通过控制酶量,对这些大片段 DNA 进行不完全酶切,可以获得不同长度 DNA 段。收集 50 ~ 100kb 大小的酶切 DNA 片段胶块,电洗脱回收胶块中的 DNA,可得到 0.1 ~ 0.4 μ g DNA/mL 瘤胃液。用 100ng DNA 与酶切处理好的 BAC 载体进行连接,最终获得含 15360 个阳性克隆的瘤胃微生物元基因组 BAC 文库,白斑率达到 90%,经统计平均每微克经酶切大片段 DNA 可以得到 2.5×10^5 个 BAC 克隆。

2.2 瘤胃混合微生物 BAC 文库的鉴定与评价

从库中随机挑取的 77 个 BAC 克隆进行酶切分析(图 1),发现该 BAC 文库外源 DNA 插入片段大小主要集中在 40 ~ 70kb 之间,平均值为 54.5 kb,小于 10kb 的插入片段占 6%,空载 2%。已挑取克隆的总库容为 837.12Mb。

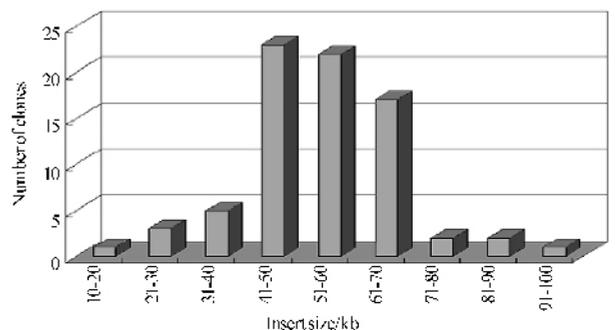


图 1 瘤胃元基因组 BAC 文库插入片段大小的分布

Fig. 1 Representation of insert size range in the rumen metagenomic BAC library. (Clones within a range of 10kb are grouped together)

随机挑取插入片段较大的 3 个 BAC 克隆进行 4 次连续转接培养,从初始培养物和终培养物中提取 BAC DNA 并用 *Hind* III 酶切指纹图谱分析,没有发现两者的酶切指纹图谱有明显变化,这充分证明了 BAC 克隆能稳定繁殖。

2.3 瘤胃微生物 BAC 文库的部分酶活性筛选分析 从 BAC 文库挑选 15360 个克隆,通过淀粉和羧

甲基纤维素钠平板筛选, 分别获得具有纤维素酶活性的阳性克隆 26 个。具有淀粉酶活性的阳性克隆 16 个。对呈现 CMC-Na 酶活性阳性的克隆再次筛选的纤维二糖酶、地衣淀粉酶及木聚糖酶活性的结果见表 1, 其中 25 个克隆至少有两种以上的酶活性。表明 BAC 库不仅有利于单酶基因的活性筛选, 而且易于找出具有多个相关活性的酶的克隆。

表 1 CMC-Na 酶阳性克隆进行多酶活性的分析

Table 1 Analysis of multi-activity of enzyme positive BAC clones of CMCcellulase

Clones	Cmcellulase	Lichenase	Cellobioase	Xylanase
1	+++	+++	++	
2	++	+	+	
3	+	++	+	
5	+		+	
6	+++	+++		
7	+++	+++		
8	+++	+++		
9	++	+		
10	++	+	+	+
11	+	+		
12	+	+		
16	+	+		+++
17	++	++++		
18	+++	+		
19	+			
20	++	++		
21	+++		++	
24	++	++		
25	++	++		
27	+	+	+	
30	+++	+		
31	+		+	
32	+++	++++	+	
33	+	+++	+	
34	+		+	
35	++		+	

“+” means the approximate ratio of the clearing halo to the colony.

进一步将呈现 CMC-Na 酶活性阳性的克隆经 *Hind*III 完全酶切, 得到的指纹图谱显示, 插入片段是不重复的(图 2)。

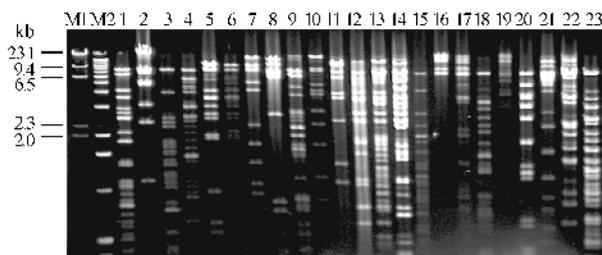


图 2 纤维素酶阳性 BAC 克隆的指纹图谱脉冲场电泳分析

Fig. 2 PFGE of digested product of clones with a positive CmcCellulase activity. M1. λ -*Hind*III (NEB); M2. 1kb plus ladder (Invitrogen); 1~23. Clones with CmcCellulase activity digested with *Hind*III.

3 讨论

用未培养微生物 BAC 文库来研究一些复杂特殊环境微生物是很有潜力的, 但是未培养微生物 BAC 库构建从技术上讲确实存在许多难点, 首先是大片段 DNA 的获得要求我们不能采用普通的 DNA 提取手段, 否则 DNA 极易断裂, 采用凝胶包埋技术^[10], 从细胞破裂到 DNA 分离、纯化都需在凝胶中进行, 这就要求操作时要尽可能防止污染发生; 其次大片段 DNA 纯度决定酶切消化的质量, 进而影响后续的分分子操作。在本实验中, 我们通过分级分离瘤胃内容物、二次电泳大片段 DNA 纯化技术, 成功地获得了片段大(大于 2Mb)、纯度高、易于酶切的高分子量 DNA。

BAC 质粒连接与转化效率又是 BAC 文库构建的一个技术难点^[10], 因此许多关于 BAC 文库构建的报道多采用处理好的商业化载体和感受态细胞, 费用非常昂贵。而本研究中我们采用改进了张洪斌的方法^[15], 获得较好的感受态细胞, 使得每 ng 质粒连接产物可以得到 6000 个以上的有效克隆。而且蓝斑比例低于 10%。说明连接与转化技术已经能达到建立大型文库的要求。

通过对我们构建的 BAC 文库评价分析, 证明该文库具有较大的 DNA 插入片段, 高于已报道的从各种土壤环境中构建的未培养微生物 BAC 文库的 DNA 插入片段, 通过对这些阳性克隆的酶切分析和部分序列分析, 表明这些克隆都包含完全不同的 DNA 序列, 这些 DNA 序列与 Genbank 已知序列同源性均小于 40%, 通过对该文库进行部分酶活性筛选及亚克隆测序, 获得两个具有全新序列的新酶基因及多个尚未鉴定的具酶活性克隆。尤为重要的是, 许多与纤维素酶活性相关的克隆呈现多种相关酶活性的特征, 这说明了在瘤胃内纤维素等多糖难以降解的物质是通过多个基因协同作用的结果, 这些基因可能以基因簇的形式起作用, 与理论上认为瘤胃中与纤维素降解有关的酶以多酶复合体形式存在吻合^[16]。同时也进一步表明利用 BAC 文库研究成簇排列的相关基因是极为有利的。

不难看出, 已有的成果充分体现了该库的巨大研究价值。在此基础上, 我们将进一步提高该文库的库容量, 使之尽可能包含更多瘤胃微生物基因信息, 同时对这些基因的功能、相互作用关系等进行进一步研究, 有关结果我们将作进一步报道。

参 考 文 献

- [1] Bryant MP , Burkey LA. Cultural methods and some characteristics of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J Dairy Sci* ,1953 **36** :205 – 217.
- [2] Edwards JE , McEwan NR , Travis AJ , *et al.* 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 2004 **3** :263 – 281.
- [3] Handelsman J ,Rondon MR , Brady DF ,*et al.* Molecular Biological access to the chemistry of unknown soil microbes : a new for natural products. *Chemical and Biology* ,1998 ,**5** :245 – 249.
- [4] Qiu F , Fu JM , Xie WW , *et al.* A rapid and efficient method for isolating plant high molecular weight (HMW) DNA with high purity. *Chinese Science Bulletin* , 1999 ,**44** :378 – 380.
- [5] Wild J ,Szybalki W. Copy-control pBAC/oriV vectors for genomic cloning. *Methods Mol Biol* ,2004 **267** :145 – 154.
- [6] Ferrer M , Golyshina OV , Chernikova TN ,*et al.* Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology* ,2005 ,**12** :1996 – 2010.
- [7] Galbraith EA , Antonopoulos DA , White BA. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying identifying genetic diversity in an environmental metagenome : the rumen as a model. *Environ Microbiol* ,2004 ,**6** :928 – 937.
- [8] Rondon MR , Raffel SJ , Goodman RM , *et al.* Toward functional genomics in bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc Natl Acad Sci* , 1999 ,**96** :6451 – 6455.
- [9] Strong SJ , Ohta Y , Litman GW , *et al.* Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field gel- separated partial digests of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* , 1997 **25** :3959 – 3961.
- [10] Zhang HB , Choi SD , Woo SS , *et al.* Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Molecular Breed* ,1996 **2** :11 – 24.
- [11] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T , *et al.* Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York ; Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [12] Shizuya H , Mehr HK. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med* , 2001 , **50** :26 – 30.
- [13] Teather RM , Wood PJ. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *Applied and environment microbiology* , 1982 ,**43** :777 – 780.
- [14] Fujita M , Torigoe K , Nakada T , *et al.* Cloning and nucleotide sequence of the gene (amyP) for maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri* MO-19. *J Bacteriol* , 1989 , 171(3) :1333 – 1339.
- [15] Zhang HB , Dong J. A Manual : Construction and manipulation of large-insert bacterial clone libraries. Texas A&M University , college situation , Texas , USA , 2000.
- [16] Schwarz WH. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* ,2001 , **56** :634 – 649.

Construction and analysis of rumen bacterial artificial chromosome library from a dairy cow rumen microflora

ZHU Ya-xin , Wang Jia-qi , MA Run-lin , Huang Li , DONG Zhi-yang*

(¹ Agriculture University of Xinjiang , Urmqi 830052 , China)

(² State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(³ Ruminant Nutrition Laboratory , Institute of Animal Sciences Chinese Academy of Agriculture Sciences , Beijing 100094 , China)

(⁴ Institute of Genetics and Developmental Biology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

Abstract :The high molecular weight DNA was extracted and purified directly from rumen samples in the study by using culture-independent and pulsed field gel electrophoresis approaches. After digestion with *Hind* III , DNA fragments ranging from 50-100kb was collected and ligated to pCC1BAC vector. The ligation mixture was transformed into *E. coli* EPI300 and a rumen metagenomic BAC library with about 15360 clones was constructed. The average insert size is about 54.5kb , mostly ranging from 50-70kb , and the capacity of this BAC library is about 837Mb. Several BAC clones with activity of amylase ,Cmcellulase had been screened from the BAC library. The clones with Cmcelluase activity were screened further for linchenase , xylanase , cellobioase activity and the result is that 25 of them have at least one kind of other enzyme activity.

Keywords : rumen ; bacterial artificial chromosome library ; screening

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China(2004AA21480)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-10-64807331 ; E-mail :dongzy@im.ac.cn

Other authors : MAO Ai-jun² , LUO Shu-ping¹

Received : 27 May 2006/ Accepted : 14 July 2006/ Revised : 10 January 2007