

转化法分离枯草芽孢杆菌 8a5 α -淀粉酶基因

张丽娟* 赵保国

(黑龙江省科学院应用微生物研究所, 哈尔滨)

摘要 用 *EcoRI* 部分降解枯草芽孢杆菌 8a5 染色体 DNA, 琼脂糖凝胶电泳分离纯化各降解片段, 用转化法逐一测定各降解片段的转化活性。实验结果证明, α -淀粉酶基因本身可作为选择性标记用于 α -淀粉酶基因的分离。用 *Hind III* 降解的 λ -DNA 作为分子量对照, 确定能高效转化淀粉酶基因的 DNA 片段大小约 4.3 kb。本实验获得的 α -淀粉酶基因的转化率为 1×10^4 转化子/ μ g DNA。

关键词 转化法; DNA; α -淀粉酶基因

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 8a5 是生产用高产淀粉酶菌株。 α -淀粉酶是由单一肽链组成, 由单基因控制。通过载体将 α -淀粉酶基因导入受体细胞, 由于载体在细胞内的增殖, 使得目的基因得到高效率表达, 用分泌性细胞作受体或采用分泌性载体促进酶从细胞内释放, 由此可构建高产淀粉酶菌株。

目的基因的分离是基因克隆的基础。转化法是进行基因分离的有效方法之一。Yamane 等^[1]用转化法进行了枯草芽孢杆菌 *tyrA*, *trpB*, *aroI*, *hisA*, *leuA* 和 *lys 21* 各基因在琼脂糖凝胶电泳中的区带定位。本实验在原方法的基础上做了部分改进, 对枯草芽孢杆菌 8a5 α -淀粉酶基因 (*amy E*) 进行了凝胶电泳区带定位。

一般认为枯草芽孢杆菌系统中 *amy E* 基因不能作为选择性标记, 而利用 *aroI* 与 *amy E* 基因在染色体上的连锁关系^[2], 以 *aroI* 作为选择性标记。在克隆 *amy E* 基因时首先分离出含有 *amy E* 基因的 *aroI* 片段^[3,4,5], 然后进行 *amy E* 基因克隆。由于 α -淀粉酶是枯草芽孢杆菌产生的胞外酶, 在只有淀粉而缺少其它易于利用的小分子碳源时, 菌细胞才大量分泌淀粉酶并水解淀粉作碳源继续生长。淀粉酶阴性菌株因不能产生淀粉酶而不能利用淀粉, 在只含有淀粉作碳源的培养基中不能生长。根据这一特性, 本实验用 *amy E* 作为选择性标记, 分离了枯草芽孢杆菌 8a5 α -淀粉酶基因。

材料与方法

(一) 菌种

以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 8a5 为供体菌, 该菌系高产淀粉酶菌株, 由黑龙江省应用微生物所保存。受体菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* L-*trp*⁻ *amyE*⁻ *str*^r), 由中国科学院遗传所惠赠。

(二) 培养基及培养条件

1. 供体菌生长在 LB 肉汤中, 37℃ 振荡培养 14 小时收集菌体进行染色体 DNA 提取。

2. 受体菌感受态处理及转化用培养基

BY-液体培养基: 0.5% 牛肉膏, 0.5% 酵母浸膏, 1% 蛋白胨, 0.5% NaCl, 0.5% 葡萄糖。

GM-生长培养基: $1 \times$ spizizen 盐溶液, 0.02% 水解酪蛋白, 0.1% 酵母膏, 50 μ g/ml 色氨酸 (*trp*) 为受体菌必须氨基酸。

TM-转化培养基: $1 \times$ spizizen 盐溶液, 0.01% 水解酪蛋白, 5 μ g/ml 色氨酸。

3. 转化用淀粉琼脂培养基 SA: 0.02% $MgSO_4$, 0.2% $(NH_4)_2SO_4$, 1.4% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.6% KH_2PO_4 , 1% 淀粉, 50 μ g/ml 色氨酸, 2% 琼脂。转化子培养 3—5 天进行鉴定。

(三) 方法

中国科学院遗传所白应林同志对本实验给予了帮助, 特此致谢。

* 本人现在单位中国药品生物制品检定所, 北京。

1. 染色体 DNA 提取按 Dubnau 方法^[6]进行。

2. 电泳分离染色体酶切片段: 50 mg 染色体 DNA 加 EcoRI 50 u, 37℃ 作用 0.5—1 小时, 70℃ 5 分钟终止反应。电泳采用 0.5×14×14cm 平行板电泳, 0.7% 的琼脂糖凝胶。电泳缓冲液为 0.04 M Tris-HAc, 0.002 M EDTA, pH 8.0, 电压 30V, 控制溴酚蓝距点样端 10cm 停止电泳, 按 0.5cm 宽将凝胶分割成 20 个片段, 从点样端起编号 1—20 号, 分离盛入 1.5ml 离心管内。

3. 染色体片段纯化: 将盛有凝胶块的小管置液氮速冻 30 秒, 取出使其自然恢复室温, 高速台式离心机 12000 r/min 离心弃沉淀物, 上清液用酚、酚-氯仿-异戊醇抽提数次, 加 2 倍体积冰冷 95% 乙醇, -20℃ 沉淀过夜, 再离心 15 分钟收集沉淀物溶解于缓冲液中, 测其浓度为 1μg DNA/ml。

4. 受体菌基因型证明: (a) 接种枯草芽孢杆菌受体菌于含淀粉的 LB 平板中, 培养 24 小时, 分离单菌落点种新鲜淀粉 LB 平板, 24 小时后涂碘液, 无水解圈形成。(b) 点种受体菌于不含色氨酸的 SA 平板, 培养 24—36 小时, 无菌落形成。(c) 将受体菌接种含有淀粉的 LB 斜面, 连续传代培养数星期, 并分别划线于淀粉琼脂平板, (SA), 继续培养 2—5 天, 在 SA 平板上无菌落生长。

5. 感受态细胞转化: 取受体菌接种 BY 培养液中, 37℃ 振荡培养 3—5 小时, 测波长 620 nm 处 OD 值约为 0.4。离心收集菌体, 弃上清, 用 GM 液洗菌体一次, 将该菌细胞重悬浮于等体积 GM 液中, 使 OD 值约 0.4。37℃ 继续振荡培养 3—5 小时, 测 OD 值 (620nm) 为 0.6—0.9。以 1:10 比例将 GM 液培养的菌悬液稀释于 TM 液中, 用 20×150(mm) 试管 37℃ 振荡培养 90 分钟, 按表 1 加入 DNA 液和 TM 液, 称之为转化组。另外设置细菌对照组和 DNA 对照组(表 1)。

上述各实验组同时置 37℃ 振荡培养 30 分钟, 然后用 TM 液 10⁰—10³ 倍稀释, 每一稀释

表 1 感受态细胞转化组别

组 别	菌液 (ml)	DNA (ml)*	TM 液 (ml)
转化组	0.2	0.1	1.7
细菌对照组	0.2	—	1.8
DNA 对照组	—	0.1	1.9

* DNA 浓度为 1 μg/ml。

样品取 0.1ml 涂布于淀粉琼脂平板, 受体菌对照组和 DNA 对照组不稀释按同样方法涂布。37℃ 培养 2—5 天观察结果。

结果与讨论

经 EcoRI 部分降解电泳纯化的染色体片段分别转化枯草芽孢杆菌淀粉酶阴性受体菌。该受体菌为 recA⁺ 系统菌, 在以淀粉为单一碳源的培养基中, 这种菌不能利用淀粉为碳源而不能生长。淀粉酶阳性菌株则生长良好。经过 2—5 天培养, 长出的菌落即为淀粉酶阳性菌, 涂 0.1% 碘液, 在这些菌落周围显示出透明水解圈, 而在细菌对照组和 DNA 对照组中没有淀粉酶阳性菌落形成(图 1)。

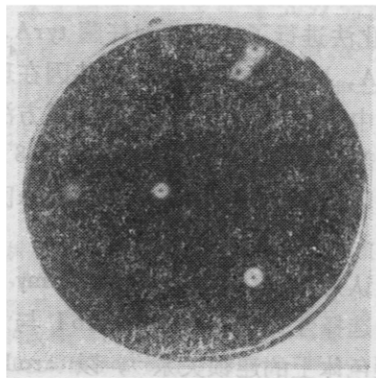


图 1 DNA 片段转化结果

图中显示的透明圈是第 7 号 DNA 片段转化结果, 用稀释度为 10⁻¹ 菌液 0.1ml 涂布以淀粉为单一碳源的琼脂平板, 37℃ 培养 3 天结果

用转化法分离淀粉酶基因是十分有效的, 但需要注意的是, 由于感受态处理所用培养液为完全培养液, 涂布时会带入少量完全培养液, 那么淀粉酶阴性菌可以借此机会生长。本实验结果表明正确控制转化子的培养时间, 即可得到正确结果。将涂布平板培养 3—5 天, 淀粉酶

阳性菌(转化子)可以形成较大菌落(直径约2—3 mm);而淀粉酶阴性菌在消耗掉微量的营养物质后即停止生长,长时间培养后菌落并不增大,只保持原来的微小菌落(直径小于1 mm)。所以用控制培养时间的方法很容易将淀粉酶阳性与阴性菌落区分开来。用这种方法可以省去用碘液检查,不仅使实验程序简便还可减少碘液对细菌生理特性的干扰。

用转化子数为纵座标,以凝胶电泳各区带距离(cm)为横座标作图,获得淀粉酶基因的转化曲线(图2)。转化率为 1×10^4 转化子/ μg DNA。

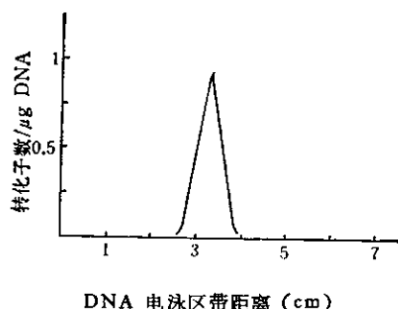


图2 转化法分离 amyE 基因曲线
EcoRI 降解枯草杆菌 8a5 染色体 DNA, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 转化法测定结果

枯草芽孢杆菌 8a5 染色体 DNA 经 EcoRI 部分降解, 琼脂糖凝胶电泳, 控制溴酚蓝泳动距点样端 10cm, 根据转化实验结果确定含有 α -淀粉酶基因的 DNA 片段位于电泳区带 2.5—4.0cm 区域内, 淀粉酶阳性转化子高峰出现在 3.0—3.5cm 处。以 Hind III 降解的 λ -DNA 作分子量对照, 得出能高效转化淀粉基因的 DNA 片段大小近似 4.3 kb (图3)。

本实验对受体菌基因型进行了验证, 并连续传代观察其有无回复突变, 实验显示该受体菌基因型是稳定的, 是转化的理想受体菌, 从而表明选出的淀粉酶阳性菌株是 DNA 转化的结果。

分子克隆 α -淀粉酶基因对于提高目的基因的拷贝数从而提高淀粉酶的产量以及构建普遍用于芽孢杆菌的分泌性载体都具有重要意义。另外对于分析分布于微生物和动植物中的 α -

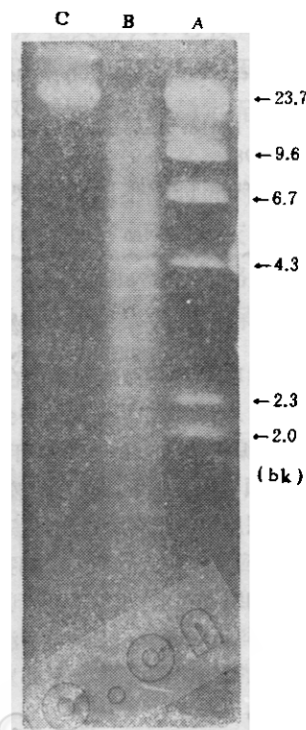


图3 0.7% 琼脂糖凝胶电泳图谱

A: Hind III 降解的 λ -DNA 分子量对照
B: EcoRI 降解枯草杆菌 8a5 染色体 DNA,
C: 未降解枯草杆菌 8a5 染色体 DNA 对照

淀粉酶基因的进化关系也是十分有用的^[7,8]。有目的克隆外源基因, 首先要进行目的基因的分离, 在无基因探针的情况下, 这一工作是很困难的。在进行淀粉酶基因克隆时, 许多研究者以 aroI 作为选择性标记, 利用 aroI 与 amyE 基因在染色体图谱上的连锁关系, 分离 aroI-amyE 片段, 如构建专一性的转导噬菌体^[3], 然后从中分离 amyE 基因, 再与载体经体外连接, 克隆相应的受体菌。

本实验用 amyE 作为选择性标记, 成功地分离了枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因。用控制培养时间的方法将淀粉酶阳性与阴性菌落容易地区别开来, 省去用碘液检查淀粉酶阳性菌落步骤, 可避免碘液对细菌生理特性的干扰。

转化法是进行基因分离的有效方法之一, 特别是在无基因探针条件下, 此方法显示简便可行、目的性强的特点。

参 考 文 献

- [1] Yamane, K. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28: 417—428.
- [2] Cold Spring Harbor Laboratory: *Genetic Maps*, 2: 133—149, 1982.
- [3] Nomura, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2637—2638, 1979.
- [4] Yasutoshi et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 47: 159—161, 1983.
- [5] Yang, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11: 237—249, 1983.
- [6] Dubnau, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, 56: 209—221, 1971.
- [7] Contente, S. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 167: 251—258, 1979.
- [8] Richard, P. et al.: *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 122: 175—183, 1984.