

## 氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 染色体的测定\*

林文楚 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 对氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*) SCB329 的纯培养进行了研究,测定了其生长曲线,确定其对数期为 4~27h。获得纯培养的对数期菌体后采用凝胶包埋法制备完整染色体,用脉冲场电泳方法对 SCB329 的染色体进行了分析,确定其有一条染色体和一个大质粒。染色体的长度在 2.2Mb 到 3.5Mb 之间。

**关键词**: 氧化葡萄糖酸杆菌, 纯培养, 凝胶包埋法, 脉冲电泳, 染色体

中图分类号: Q343 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2001)01-0049-05

近年来,基因组研究方兴未艾。开展微生物基因组的研究,从根本上揭示微生物的全部基因,将使人类从更高层次掌握微生物的代谢途径或致病机制,从而发展新的工艺和技术为人类服务<sup>[1]</sup>。自 1995 年 Fleischmann 等人完成流感嗜血杆菌全基因组序列以来<sup>[2]</sup>,国内外微生物基因组的研究迅猛发展已成为一大热点,据美国基因组研究所报道,目前已完成了 26 种微生物基因组测序,其中大多数是病原微生物。还有 103 种微生物已被登记,其基因组测序工作将在最近或近两年完成<sup>[3]</sup>。国内外微生物基因组的研究多集中在与疾病相关的微生物,工业微生物的相关研究报道很少。鉴于工业微生物的巨大经济应用价值,有必要选择我国特有的、具有重大应用价值的若干个工业微生物的基因组进行研究,有利于今后基因组功能研究的开展。

生产维生素 C 的“二步发酵法”是尹光琳等人发明的一项先进工艺。其第二步,即 L-山梨糖到 2-KLG 的转化是由两株菌共同参与完成,一株是氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*, 通称“小菌”),另一株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp, 通称“大菌”)的菌株,其中氧化葡萄糖酸杆菌是主要的产酸菌<sup>[4]</sup>。本实验室在原来的氧化葡萄糖酸杆菌基础上通过诱变筛选到一株性状更加优良的突变株 SCB329 并与一株苏芸金芽孢杆菌 SCB933(*Bacillus thuringiensis*)搭配成新的组合菌系,经过多次条件实验及发酵研究已应用于工业生产中<sup>[5~7]</sup>。

葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*)的多种菌株具有工业经济价值。国内外研究多集中在酶学及基因克隆方面,如日本的 Sugisawa 等人对 *Gluconobacter melanogenus* IF03293 的诱变株 UV10 分离 L-山梨糖脱氢酶和 L-山梨酮脱氢酶,蒋宇扬等人从混合菌株 2980 中纯化了 2-酮-L-古龙酸还原酶,但国内外未见有开展氧化葡萄糖酸杆菌基因组方面的报

\* 国家自然科学基金资助项目(39970024) 获得河北维生药业公司科研合作经费资助

作者简介: 林文楚(1972-)男,湖北麻城人,现在中国科学院上海生物工程研究中心微生物代谢与代谢工程组 98 年硕士研究生,师从尹光琳研究员。

收稿日期: 2000-01-27, 修回日期: 2000-05-23

道<sup>[8~10]</sup>。从宏观的角度对氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 的基因组结构进行研究,具有积极的现实意义和潜在应用价值。本实验室自 1995 年以来就对 *Gluconobacter oxydans* SCB329 开始了遗传学方面的研究,并取得了一些进展,如构建了 SCB329 的基因文库<sup>[11~12]</sup>,但遗传学方面的研究难度较大,主要原因是氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 纯培养难以解决。氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 有独特的培养和生理特性,氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 与“大菌”混合培养时生长旺盛,而氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 单独培养则生长相对缓慢,培养过程中易染杂菌。因此本工作一开始便着手 SCB329 的纯培养的研究,对液体培养基成分进行了优化。在此基础上探索 SCB329 的生长规律,确定其对数期,获得凝胶包埋所需菌体。采用凝胶包埋法制备完整染色体,并用脉冲场电泳技术对其遗传物质进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :*Gluconobacter oxydans* SCB329 ,*Bacillu thuringiensis* SCB933 由本实验室保存。

1.1.2 工具酶的化学试剂 :Pulse Marker 0.1~200kb 为 Sigma 公司产品、Yeast chromosomal DNA Marker 是 Promega 公司生产、S. pombe DNA size Marker、低熔点琼脂糖、脉冲场电泳用琼脂糖为 Bio-Rad 公司产品 ,Proteinase K 是华美生物工程公司产品。

1.1.3 培养基 :*Gluconobacter oxydans* SCB329 培养基 I :L-山梨糖 15g ,蛋白胨 10g ,酵母提取物 3g ,尿素 4g ,玉米浆 3g ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>5g ,MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0.2g ,碳酸钙 4g ,pH6.5~6.7 ,用蒸馏水定容至 1L。 *Gluconobacter oxydans* SCB329 固体培养基 II :培养基 I 加上 20g 琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的纯培养 :自 SCB329 与 SCB933 混合保存的试管斜面取一环平板划线分纯两次 ,最后取单菌落于试管斜面保存。SCB329 新鲜试管斜面接三环至茄形瓶斜面上 ,28℃ 培养 36h 后用无菌水洗下 ,以 1% 的接种量接入装有 SCB329 培养基的摇瓶或摇管中 ,28℃ 往复式摇床( 240r/min )培养 72h。

1.2.2 SCB329 生长曲线的测定 :按 1.2.1 的方法培养 ,用 32 只 18mm×180mm 试管每只装 4mL 培养基 I 接种量 1% ,按不同时间分别取出 ,补足体积至 4mL ,取 0.5mol/L 用 0.1mol/L HCl4.5mL 稀释 ,在波长 620nm 用分光光度计比色测生长吸光度。

1.2.3 2-酮基-L-古龙酸定量 :用转化碘量法测定<sup>[5]</sup>。

1.2.4 pH 值测定 :用 PHB-1 便携式 pH 计测定 ,并对国产精密 pH 试纸测定值进行校正。

1.2.5 凝胶包埋法制备 SCB329 完整染色体<sup>[13]</sup> :参考文献 [13] 的方法进行 ,以 1.2.1 节的方法培养至对数中期 ,收集菌体用 SE 溶液( 75mmol/L NaCl 25mmol/L EDTA ,pH7.5 )洗两次 ,每次以 10000r/min 离心 8min ,最后用 SE 溶液悬浮菌体 ,用 2% 低熔点琼脂糖与适量菌液混匀 ,置入制胶模具中 4℃ 放置 10~15min 使其凝固 ,取出胶块放入 50mL 离心管 ,加入含蛋白酶 K 的 ES 溶液( 0.5mol/L EDTA 1%SDS ,pH7.5 )溶液 ,52~56℃ 过夜 ,



于 SCB329 的分子生物学的研究。

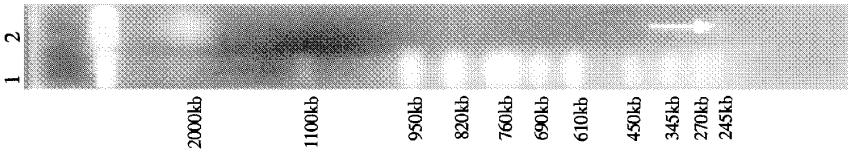


图 3 质粒电泳图

Fig. 3 The electrophoresis of plasmid

Voltage 6V/cm ,1.0% agarose ,0.5×TBE Switch time 24.03s~204s ,Run time 24h  
1. *S. cerevisiae* marker 2. SCB329DNA ,undigested

3 讨论

从氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 产酸曲线来看 ,SCB329 是一株性状优良的菌株 ,用含 1.5% 的山梨糖的培养基培养 72h 时产酸转化率可达 90% 以上。进一步证实了产酸代谢途径存在于 SCB329 中。本工作已经获得完整的染色体和染色体外遗传因子 ,初步判断 SCB329 的遗传物质包括一条染色体和一个染色体外遗传因子 ,染色体外遗传因子可能是一个大质粒。基础研究方面 ,国内外有许多关于“大菌”和“小菌”的关系的报道 ,但存在争论<sup>[14~15]</sup>。对氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 纯培养的研究将有助于解决两菌株之间的关系。从宏观的角度对“小菌”的遗传物质进行分析 ,有助于开展基因工程菌的研究<sup>[16]</sup>以及为基因组的深入研究打下基础。其染色体的长度和结构以及染色体外遗传因子的基本特征有待进一步的研究。

致谢 本研究工作承杨胜利教授和赵国屏教授关心并提出宝贵意见 ,实验进行过程中先后得到中国科学院植物生理研究所马伟同志和国家基因中心赵文会、周 波等同志在脉冲场电泳技术方面的帮助 ,特此致谢。

参 考 文 献

[ 1 ] 闻玉梅. 中华微生物和免疫学杂志 ,1999 ,19( 4 ) 353~355.  
[ 2 ] Robert D , Mark D , Owen W. et al . Science ,1995 ,269( 5223 ) 496~512.  
[ 3 ] TIGR Microbial Database. <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbhtml> ,2000. 1  
[ 4 ] 尹光琳 ,陶增鑫 ,严自正 ,等. 微生物学报 ,1980 ,20( 3 ) 246~251.  
[ 5 ] 任双喜 ,何建明 ,尹光琳 ,等. 工业微生物 ,1997 ,27( 1 ) :1~7.  
[ 6 ] 宋 祺 ,何建明 ,尹光琳 ,等. 工业微生物 ,1997 ,27( 2 ) 5~9.  
[ 7 ] 任双喜 ,何建明 ,尹光琳 ,等. 工业微生物 ,1997 ,27( 3 ) 6~10.  
[ 8 ] Hoshino T , Sugisawa T , Fujiwara A. Agri Biol Chem ,1991 ,55( 2 ) 363~370.  
[ 9 ] Hoshino T , Sugisawa T , Fujiwara A. Agri Biol Chem ,1991 ,55( 3 ) 665~670.  
[ 10 ] 蒋宇扬 ,郭振勇 ,张成刚. 生物工程学报 ,1997 ,13( 4 ) 400~405.  
[ 11 ] 郭新友 ,尹光琳. 微生物学通报 ,1998 ,25( 3 ) :139~143.  
[ 12 ] 刘 娟 ,尹光琳. 微生物学通报 ,1999 ,26( 5 ) 314~319.  
[ 13 ] Ute R , Dietmar G , Wilfried B et al . The EMBO Journal ,1989 ,8( 13 ) 4081~4089.  
[ 14 ] 冯 树 ,孙传宝 ,张忠泽 ,等. 微生物学杂志 ,1998 ,18( 1 ) 1~4.  
[ 15 ] 中国科学院植物生理研究所马伟同志和国家基因中心赵文会、周 波等同志在脉冲场电泳技术方面的帮助 ,特此致谢。

[15] 马成新 杨凤政 焦 鹏 等. 微生物学杂志, 1996, 16: 39~41.

[16] 尹光琳. 工业微生物, 1991, 21(1): 29~37.

## DETERMINATION OF CHROMOSOME OF *GLUCONOBACTER OXYDANS* SCB329\*

Lin Wenchu Yin Guanglin

(Shanghai Research Centre of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** After the pure culture of *Gluconobacter oxydans* SCB329 was researched, its growth curve was measured and its logarithmic phase was determined as between 4-27h. After the microorganisms were harvested in its logarithmic phase, The intact chromosome was prepared by agarose-embedded method. Then the genome of SCB329 was analyzed by Pulsed-field Gel Electrophoresis. The result indicated that there are one chromosome and one great plasmid. The length of intact chromosome of SCB329 has been estimated to be approximately between 2.2Mb and 3.5Mb.

**Key words:** *Gluconobacter oxydans*, Pure Culture, Agarose-embedded method, Pulsed-field gel electrophoresis, Chromosome

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39970024)

## 《微生物学报》承接广告业务

《微生物学报》创刊于 1953 年, 双月刊, 双月 4 日出版, 由中国微生物学会和中科院微生物研究所主办。他是我国微生物学领域唯一的综合性学报级刊物。主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学和生物工程等方面的研究论文、研究简报和短篇综述等。

本刊历史悠久, 发行量大, 内容涵盖面广, 深受国内外科研工作者、高等院校师生和企事业科研管理人员的欢迎。他是我国自然科学核心期刊, 被国内外一些重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

凡与微生物学及其各分支学科有关的试剂、药品、仪器、设备, 以及与微生物有关的信息等均欢迎在本刊刊登广告。本刊服务热情, 信守协议, 保证质量, 价格合理, 竭诚为广大用户服务。

联系电话 (010) 62630422 邮编: 100080

通讯地址: 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部