

氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 基因组的大小与结构的研究*

林文楚 尹光琳

(中国科学院上海生命科学研究院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要:收集维生素 C 产生菌氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的纯培养对数期的菌体,采用凝胶包埋法制备完整染色体,用稀有酶切位点的限制性内切酶和脉冲场电泳技术对 SCB329 的基因组进行了分析, *Spe* I (5'-ACTAGT) 酶切有 24 个片段,其大小从 10kb 到 320kb,用 *Xba* I (5'-TCTAGA) 酶切产生 40 个片段,其大小从 4kb 到 200kb,综合两种限制酶酶切片段长度的总和结果,SCB329 基因组大小为 2 700kb,SCB329 基因组由一条 2 500kb 的染色体和一个 245kb 的质粒组成。通过用脱氧核糖核酸酶 I 和 S1 核酸酶处理其基因组后电泳证实 SCB329 的染色体和质粒的拓扑学结构均为环状。

关键词:氧化葡萄糖酸杆菌,基因组大小,脉冲场电泳,线形化

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0530-06

微生物基因组的研究突飞猛进^[1-5],许多重要的微生物的测序工作已完成或接近完成。国内微生物基因组研究开展相对较晚,但着眼于微生物的巨大应用前景,已有若干微生物的测序工作在进行^[6,7],我们在解决了“二步发酵法”中主要的产酸菌—氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 的纯培养后,在采用脉冲场电泳(Pulsed-Field Gel Electrophoresis)技术对其基因组进行了初步研究的基础上^[8],进一步采用稀有酶切位点的限制性内切酶和脉冲场电泳分析了其基因组的大小,同时通过用脱氧核糖核酸酶 I 和 S1 核酸酶处理其基因组后研究其结构,取得了较好的进展。现将最新的研究工作介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料

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

1.1.2 工具酶和试剂: Pulse Marker 0.1 ~ 200kb 为 Sigma 公司产品, Yeast chromosomal DNA Marker 是美国 Promega 公司生产, H. winge DNA size Marker、低熔点琼脂糖、脉冲场电泳用琼脂糖是 Bio-Rad 公司产品, DNase I (RNase free)、Proteinase K 是华美生物工程公司产品, S1 核酸酶是宝灵曼公司产品, 识别 6 ~ 8 个碱基的限制性内切酶是日本 TakaRa 公司产品。

1.1.3 培养基: 见参考文献[8]。

1.2 方法

1.2.1 *Gluconobacter oxydans* SCB329 的纯培养: 参考文献[8]的方法

* 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,湖北省麻城人,中国科学院上海生物工程研究中心 98 级硕士研究生,专业方向为生物化学与分子生物学。联系电话:021-64700892-358, Email: glyin@sreb.ac.cn

收稿日期:2000-10-25, 修回日期:2001-01-18

1.2.2 凝胶包埋法制备 SCB329 完整染色体和胶块酶切:参考文献[8]的方法

1.2.3 预电泳条件:按文献[5]的方法并作修改。新鲜胶块置于上样孔后,采用 $0.5 \times$ TBE, 1.0% 琼脂糖, 6V/cm, 14℃, 角度 120°, 转换时间 24s 到 200s, 电泳 24h 后回收胶块, 用 TE10 洗一次, 胶块放入 TE50(10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA, pH8.0) 中保存于 4℃。

1.2.4 胶块酶切:取新鲜胶块(2mm × 5mm × 10mm)的 1/2 首先 TE10 1mL 洗一次 30min, 接着用酶切 buffer 洗两次, 每次 30min, 重新加上相应的酶切 buffer 并加上 30 ~ 50U 的酶, 置于酶的最适反应温度反应, 酶切完毕弃酶切液, 加 1mL TE10 终止反应 30min。

1.2.5 染色体的线形化:方法 1:参照文献[9]的方法并作修改, 取预电泳过的胶块(2mm × 5mm × 10mm)的 1/2 于 1.5mL 的 Eppendorf 管中, 用 1mL 10 mmol/L Tris-Cl(pH8.0) 在 37℃ 洗两次每次 15min, 在 4℃ 用 1mL S1 核酸酶 buffer[50 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Sodium Acetate (pH4.5), 5 mmol/L ZnSO₄] 重悬浮胶块 10min, 弃悬浮液, 加入 200mL 核酸酶 S1 buffer 并加 1U S1 核酸酶, 置于 37℃ 反应 5、10、15、20、25min, 弃酶切液后加入 1mL ES (0.5 mol/L EDTA, 1% SDS, pH7.5) 终止反应 30min。方法 2:参照文献[10]的方法并作修改, 取预电泳过的胶块(2mm × 5mm × 10mm)的 1/2 于 1.5mL 的 Eppendorf 管中, 用 1mL TE10 在 37℃ 洗 10min, 在 4℃ 用无二价阳离子的 DNaseI buffer (40 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L NaCl) 重悬浮胶块 15 min, 弃悬浮液, 重复一次, 加入 200mL 无二价阳离子的 DNaseI buffer 和 2U 的 DNase I 置于 4℃ 10min, 加入 12μL 10 mmol/L 的 MnCl₂, 立即置于 37℃ 反应 2、8 和 12min, 弃酶切液后加入 1mL ES(0.5mol/L EDTA, 1% SDS, pH7.5) 终止反应 30min。

1.2.6 脉冲场电泳:见参考文献[8]。使用 CHEF MAPPER 装置(Bio-Rad 公司)进行电泳。电泳完毕, 凝胶用溴乙锭溶液染色 30 min 后, 用 IS1000 成像系统对凝胶进行摄影。采用四星公司软件根据 Marker 条带模拟标准曲线后, 计算核酸大分子的长度。

2 结果和讨论

2.1 稀有酶切位点的限制性内切酶的选择

参考文献[11]的方法首先根据氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 的 GC 含量高(57.8%)的特点, 选用识别 AT 碱基多的核酸内切酶如 *Cla* I、*Dra* I、*Not* I、*Psh*B I、*Ssp* I、*Xba* I、*Spe* I、*Swa* I 对完整染色体进行酶切, 脉冲电泳后发现 *Cla* I、*Dra* I、*Not* I、*Psh*B I、*Ssp* I 的酶切片段太多, 均小于 50kb, *Xba* I 和 *Spe* I 的酶切片段相对较少, 集中在 100kb 左右。在大多数的细菌基因组中“CTAG”序列是极其稀有的, *Xba* I 的识别序列为“TCTAGA”、*Spe* I 的识别序列为“ACTAGT”, 故 *Xba* I 和 *Spe* I 的酶切片段相对较少, 选用限制性内切酶 *Xba* I、*Spe* I 将有利于以后构建中等密度的物理图谱。

2.2 SCB329 基因组大小的确定

Xba I 和 *Spe* I 的酶切片段集中在 100kb 左右, 所以参考文献[12]的方法采用分段电泳后计算每一种酶酶切片段的长度总和, 得出基因组的长度。现在已确定 *Spe* I 酶切有 24 个片段(图 1, 2, 3), 总长度为 2729kb(表 1), *Xba* I 酶切有 40 个片段(图 1, 2, 3), 总长度为 2675kb(表 1), 综合两种酶酶切片段长度的总和结果, SCB329 基因组大小为 2 700kb。

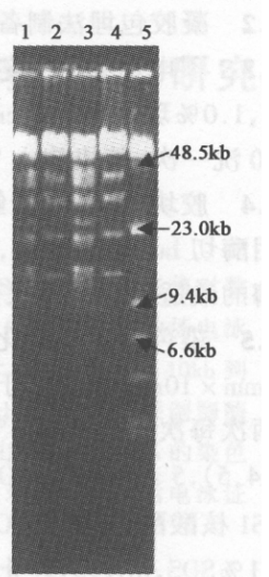
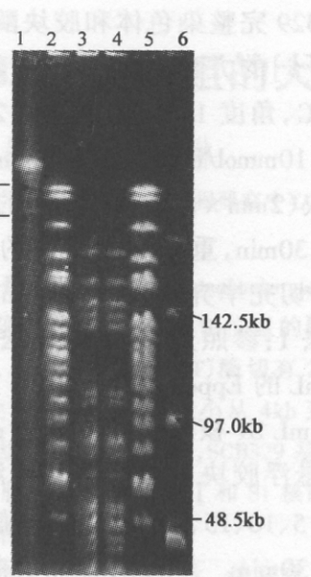
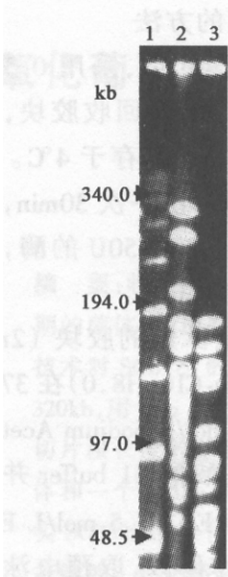


图 1 酶切电泳图 (> 200kb)
Fig.1 The electrophesis of digested DNA
Pulse time: 2.9 ~ 21.7s; Run time: 27h.
1. Marker; 2. Digested DNA with *Spe* I ;
3. Digested DNA with *Xba* I .

图 2 酶切电泳图 (48.5 ~ 145kb)
Fig. 2 The electrophesis of digested DNA
Pulse time: 3.51 ~ 12.48s; Run time: 27h; 1. *S. cerevisiae* marker; 2, 5. Digested DNA with *Spe* I ; 3, 4. Digested DNA with *Xba* I ; 6. Pulse marker.

图 3 酶切电泳图 (1 ~ 50kb)
Fig.3 The electrophesis of digested DNA
Pulse time: 0.05 ~ 0.92s; Run time: 14h.
1,3. Digested DNA with *Xba* I ; 2, 4. Digested DNA with *Spe* I ; 5. Marker.

表 1 氧化葡萄糖酸杆菌 SCB329 基因组的限制性酶切片段和大小

Table 1 Restriction fragments and sizes of the genome of *Gluconobacter oxydans* SCB329

Fragment size after digestion with							
<i>Spe</i> I				<i>Xba</i> I			
Band	Size/kb	band	Size/kb	Band	Size/kb	Band	Size/kb
A	304	P	64*	A	208	P	48
B	257	Q	49	B	193	Q	44*
C	201	R	30	C	174	R	39*
D	180	S	24	D	165	S	36
E	161	T	20	E	160*	T	33*
F	154	U	10	F	151	U	28
G	141*			G	109	V	25
H	126			H	101	W	19**
I	116			I	86	X	15
J	107*			J	80**	Y	12*
K	103			K	75	Z	10
L	100			L	68*	a	8
M	95			M	62	b	6*
N	92			N	53*	c	4
O	80			O	50		
Total			2729				2675

* Indicates doublets; ** Indicates triplet

2.3 SCB329 基因组结构的证实

2.3.1 DNase I 处理预电泳过的胶块:未酶切的核酸大分子上样电泳后没有弥散型的条带,可以肯定 SCB329 染色体是完整的,但是电泳图谱上几乎见不到任何条带或是微弱条带,根据文献报道,长达几个 Mb 的环状 DNA 大分子无法跑出上样孔^[5,9],因此推测 SCB329 染色体拓扑学结构是环状的, DNase I 在 Mg^{2+} 存在时,能在双链 DNA 上随机地产生切口,而在 Mn^{2+} 存在下能将双链 DNA 同时切断,使 DNA 片段化^[9]。为证实 SCB329 染色体的结构,新鲜胶块预跑以除去降解的片段和已线形化的染色体后,在 Mn^{2+} 存在下用 DNase I 处理预跑过的胶块,采用可以跑几个 Mb 的脉冲电泳条件电泳(如图 4)。结果显示未用 DNase I 处理的样品没有任何条带,而用 DNase I 处理 2、8、12min 的预跑过的胶块则在 2 个 Mb 左右处有明亮的条带,随着作用时间的加长,弥散型带明显变亮,同时染色体条带也逐渐变暗。证实 SCB329 染色体的结构是环状的。

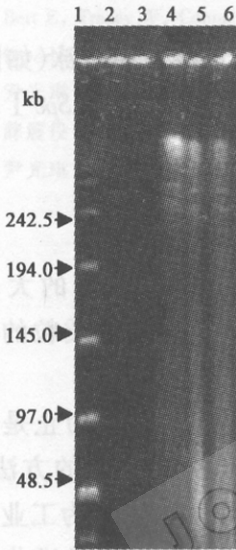


图 4 线形 DNA 电泳图

Fig. 4 The electrophoresis of linear chromosome

Pulse time: 6.7s ~ 17.5s, 1% agarase, 120°, 6v/cm, 24h.

1. Pulse marker; 2, 3. SCB329 DNA, undigested; 4, 5, 6. SCB329 DNA, digested with DNase I for 2, 8, 12min, respectively.

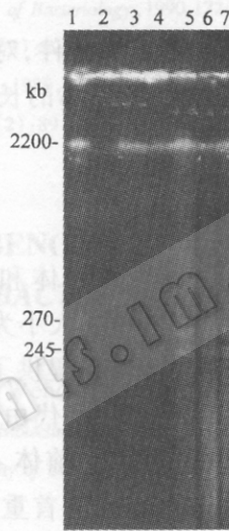


图 5 线形 DNA 电泳图

Fig. 5 The electrophoresis of linear chromosome

Pulse time: 12s ~ 45s, 1% agarase, 120°, 6v/cm, 24h.

1. *S. cerevisiae* marker; 2. SCB329 DNA, undigested; 3, 4, 5, 6, 7. SCB329 DNA, digested with nuclease S1 for 5, 10, 15, 20, 25min, respectively.

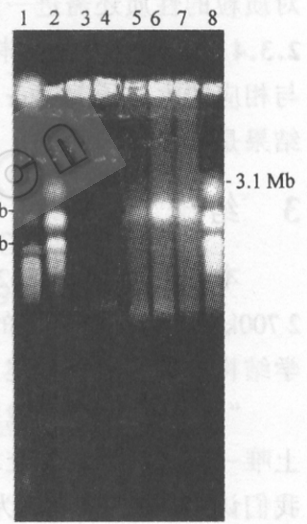


图 6 完整染色体电泳图

Fig. 6 The electrophoresis of intact chromosome

Block 1: 2v/cm, 0.8% agarase, 106°, Pulse time 20min ~ 27min, 72h; block 2, 6v/cm, 0.8% agarase, 120°, pulse time: 1.3 ~ 2.5min, 7h. 1. *S. cerevisiae* marker; 2, 8. *H. wingei* marker; 3, 4. SCB329 DNA, undigested; 5, 6, 7. SCB329 DNA, digested with S1 nuclease for 5min, 15min, 25min, respectively.

2.3.2 S1 核酸酶处理预电泳过的胶块:S1 核酸酶可以内切单链 DNA 和 RNA 使其降解为具有 5-磷酸末端的产物。在高浓度情况下,该酶对双链 DNA 有降解作用,在合适的酶浓度下作用一定的时间,可使环状双链断链为线形^[10]。为确证 SCB329 的结构,新鲜胶块预电泳以除去降解的片段和已线形化的染色体后,用 S1 核酸酶处理预跑过的胶块,采用可

以跑几个 Mb 的脉冲电泳条件电泳(如图 5),除处理 5、10min 有微弱条带,处理 15、20 和 25min 的样品则有明亮的条带,随着时间的加长,弥散型带明显变亮,同时染色体条带也逐渐变暗。其结果与用 DNase I 处理的样品完全一样,进一步证实了 SCB329 的拓扑学结构是环状的。

2.3.3 质粒结构的初步分析:经证实 SCB329 有一个大质粒,200 ~ 300kb 范围靠近 270kb 并且条带的电泳位置不随脉冲电泳条件变化而变化。由于有切口的环状大分子不能跑出上样孔,而超螺旋和线形大分子可以电泳分离,线形大分子的电泳是依赖于脉冲时间而超螺旋大分子则与脉冲时间相关^[10,13]。由此推测此质粒的结构是环状的,采用 DNase I、S1 核酸酶对样品进行处理后电泳(如图 4,5)。除了染色体条带外,在 200 ~ 300kb 范围出现两条带,其中接近 Marker 270kb 的条带与未处理样品跑电泳位置相同,是质粒的超螺旋形式,另一条带位置与 245kb 处于同一位置,为处理后线形化的质粒,长度为 245kb 左右。对质粒的性质还需进一步研究。

2.3.4 线形化的染色体电泳:选定优化的电泳条件,对线形化的染色体样品电泳(如图 6)与相应的大分子 Marker 比较可知,SCB329 染色体的长度为 2500kb,与 *Xba* I、*Spe* I 酶切结果是一致的。

3 结论

本研究确认 SCB329 的基因组由一条染色体和一个大质粒组成,其总的大小为 2 700kb 左右,其染色体的大小是 2 500kb,质粒的大小为 245kb 左右,染色体和质粒的拓扑学结构为环状。为构建 SCB329 的基因文库规模提供了理论依据。

“两步发酵法”是我国特有的生产工艺,70 年代由尹光琳等人发明,迄今为止是世界上唯一的微生物发酵技术工业化生产维生素 C 前体 - 2 - 酮基 - L - 古龙酸的方法^[14]。我们认为将 SCB329 作为基因组的研究对象,是有首重要的意义的。一方面作为工业微生物氧化葡萄糖酸杆菌的模式菌株,可以为其它葡萄糖酸杆菌的生理代谢和分类进化的研究提供帮助。作为一种只有与伴生菌混合培养才生长旺盛的独特微生物,开展基因组的研究可以从遗传的角度探讨混合培养中的菌群关系;另一方面,通过研究其基因组来寻找生产维生素的相关基因从而探索它的生理、代谢机理,为改进维生素 C 生产工艺服务。作为基因组研究的前期工作,了解 SCB329 基因组的大小、结构,为深入开展 SCB329 基因组的研究打下基础。此外以 *Xba* I、*Spe* I 酶为基础可以构建具有中等密度的 SCB329 物理图谱,一方面为基因组测序作准备,另一方面可以进行基因定位,进而构建其遗传图谱。在物理图谱的基础上可以对突变株的突变位点进行定位,促进诱变工作的进行。

对实验过程中发现的大质粒进行纯化、分析,将对 SCB329 的分子生物学操作有很大的帮助作用。大于 100kb 的质粒大多与致病性及抗生素、次生代谢产物的产生相关,推测“L-山梨酮途径”的相关基因可能位于这个大质粒上。本实验室已分离到 L-山梨糖脱氢酶,正在根据氨基酸序列来克隆 L-山梨糖脱氢酶基因^[15],将它与 SCB329 的基因组进行杂交后,可以研究产生 2-酮基-L-古龙酸的代谢途径与质粒的关系,为构建“山梨醇基因工程菌”^[16]改进维生素生产工艺可能会提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Ricky W, Antonius S, Budi T. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **175**:59 ~ 68.
- [2] Elena R, Veronique R, Didier R. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **176**:73 ~ 78.
- [3] Lorenza P, Pina S, Pietro A. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **175**:231 ~ 238.
- [4] Clifford P, Christopher L, James M. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, **170**:349 ~ 353.
- [5] Annick A, Sylvie M, Estelle J, et al. *Journal of Bacteriology*, 1993, **175**(24):7869 ~ 7874.
- [6] 陆德如. 微生物学报, 1997, **37**(4):323 ~ 325.
- [7] 林 旭. 国外医学微生物分册, 1999, **22**:1 ~ 3
- [8] 林文楚, 尹光琳. 微生物学报, 2001, **41**(1):49 ~ 53.
- [9] Alexander M, Carsten R, Piet B. *Nucleic Acids Research*, 1988, **16**(11):4841 ~ 4850.
- [10] Bret M, Gordon P, Anthony J. *Analytical Biochemistry*, 1995, **226**:235 ~ 240.
- [11] Michael M, Robert J, Yogesh P, et al. *Nucleic Acids Research*, 1987, **15**(11):5985 ~ 6005.
- [12] Bert E, Tracey W, Connie J, et al. *Journal of Bacteriology*, 1990 **172**(3):1262 ~ 1266.
- [13] Beverley M. *Nucleic Acids Research*, 1988, **16**(3):925 ~ 939.
- [14] 尹光琳, 陶增鑫, 严自正, 等. 微生物学报, 1980, **20**(3):246 ~ 251.
- [15] 薛震役, 尹光琳. 微生物学通报, 2000, **27**(2):89 ~ 92.
- [16] 尹光琳. 工业微生物, 1991, **21**(1):29 ~ 37.

STUDLES ON THE GENOME SIZE AND STRUCTURE OF *GLUCONOBACTER OXYDANS* SCB329

Lin Wenchu Yin Guanglin

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Science, Shanghai 200233, China)

Abstract: In the "Two-step fermentation" of Vitamin C synthesis, *Gluconobacter oxydans* SCB329 is responsible for the production of 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG), which is an important precursor of vitamin C synthesis. The intact chromosome was prepared from logarithmic phase cells by agarase-embedded method and was analyzed by restriction endonucleases and contour-clamped homogeneous electric field pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Spe* I (5-ACTAGT) produced 24 fragments, ranging in size from 10 to 320 kilobases (kb). *Xba* I (5-TCTAGA) yielded 40 fragments (4 to 200kb). A total genome size of approximately 2 700kb was determined by summing the fragment length. Analysis of the entire genome of SCB329 by PFGE revealed that the genome of SCB329 consist of a chromosome which is 2 500 Kb in length and a large plasmid which is 245kb. After linearization of the DNA by DNase I and S1 nuclease, in contrast with the band which can not be viewed, the band of chromosome and plasmid were appeared, this suggest that structure of the chromosome and the plasmid were circular.

Key words: *Gluconobacter oxydans*, Genome size, Pulsed-field gel electrophoresis, Linearization