

# 谷氨酸棒杆菌基因缺失菌株的定点构建

阮 红<sup>1</sup> Bernhard Eikmanns<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生命科学院 杭州 310027)

(<sup>2</sup> Ulm 大学微生物与生物技术学系 德国)

**摘 要** 通过目标基因内部缺失片段的获得以及 DNA 重组交换等技术的有效运用,在氨基酸工业重要生产菌谷氨酸棒杆菌中,成功地定点构建了两个目标研究基因的单基因缺失菌株和双基因缺失菌株,并通过了 PCR 和测序等方法的分析验证。

**关键词** 谷氨酸棒状杆菌,基因缺失,DNA 重组。

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)04-0458-07

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是全球用以氨基酸发酵工业的主要生产菌,早在 1957 年由 Kinoshita 首次描述其为谷氨酸产生菌<sup>[1]</sup>。该菌为革兰氏阳性菌,严格好氧,不运动,不产生孢子,生物素营养缺陷型,G+C 的含量为 53%~55%。*C. glutamicum* 和它的亚种 *C. flavum* 和 *C. lactofermentum* 等不仅能生产谷氨酸,而且也能生产赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸等多种氨基酸。至今,氨基酸制品已被全球广泛地用于食品工业添加剂、动物饲料、化妆品、药品和其它工业制品。据统计,全球每年谷氨酸和赖氨酸生产量分别为 1 000 000t 和 300 000t 左右<sup>[2,3]</sup>。

基因工程是近年来改良微生物代谢途径的十分有效方法,已有一些报道证实可以通过控制氨基酸合成途径中的某些重要基因的表达调控来实现氨基酸的定向合成<sup>[4-6]</sup>。目前对于谷氨酸棒状杆菌一系列功能基因及其调节基因的研究是国内外该领域的重要研究内容。在我们已获取了两个与碳源代谢调控功能相关的目标研究基因 *orfA* 和 *orfB*<sup>[7]</sup> 的基础上,建立了谷氨酸棒杆菌染色体上这两个目标基因的定点缺失技术,这将为今后开展谷氨酸棒杆菌中众多目标基因的定点缺失以及缺失菌株的相关功能研究方面提供广泛的技术支持和大力帮助。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

菌株、质粒及其相关特性见表 1。

### 1.2 基因序列来源

来自于本实验室与碳源代谢功能相关的两个目标研究基因开读框,已被暂命名为 *orfA* 和 *orfB*,它们全序列详见文献 [7]。它们的功能尚有待于进一步研究确证。

\* 本课题由德国政府 DAAD 奖学金和国家教育部联合资助

作者简介 阮 红(1968 年—),女,博士,从事微生物基因调控和生物活性成分研究。

收稿日期 2001-08-16,修回日期 2001-11-01

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Relevant characteristics	Source/Reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>sup E44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1985 <sup>[8]</sup>
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	wild type strain of ATCC 13032	ATCC
13032 intA	Km <sup>R</sup> the strain after the first DNA combination between pK19-dA and the chromosomal DNA of wild type strain	This study
13032 intB	Km <sup>R</sup> the strain after the first DNA combination between pK19-dB and the chromosomal DNA of wild type strain	This study
13032 $\Delta$ A	Km <sup>s</sup> , <i>orfA</i> in-frame deletion mutant	This study
13032 $\Delta$ B	Km <sup>s</sup> , <i>orfB</i> in-frame deletion mutant	This study
13032 $\Delta$ AB	Km <sup>s</sup> , <i>orfA</i> 和 <i>orfB</i> double deletion mutant	This study
Plasmids		
pK19mobsacB	Km <sup>R</sup> Suc <sup>S</sup> ; Mobilizable <i>E. coli</i> vector	Schaefer, 1994 <sup>[9]</sup>
pK19-dA	containing <i>orfA</i> deletion fragment F-dA in pK19mobsacB	This study
pK19-dB	containing <i>orfB</i> deletion fragment F-dB in pK19mobsacB	This study

### 1.3 培养基

用于 *E. coli* 培养的 LB (Luria-Bertani) 培养基和 *C. glutamicum* 培养的 LB 或 2  $\times$  TY 培养基参照文献 [10]。根据实验要求,在培养基中加入 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素。*E. coli* 和 *C. glutamicum* 分别置于 30  $^{\circ}$ C 和 37  $^{\circ}$ C 下培养。

### 1.4 DNA 操作

*C. glutamicum* 总 DNA 抽提参照 Eikmanns 等方法<sup>[11]</sup>。质粒的酶切降解、脱磷酸化和连接反应、低熔点琼脂糖电泳回收 DNA、*E. coli* 感受态细胞制备和电激转化等参照 Sambrook 等方法<sup>[10]</sup>。*C. glutamicum* 的感受态细胞制备和电激转化参照 Van der Rest 等方法<sup>[12]</sup>。DNA 引物制备和样品测序由德国 MWG-Biotech AG 公司测序中心完成。

## 2 实验结果

### 2.1 *orfA* 或 *orfB* 基因内缺失的 DNA 片段的构建和克隆

首先获取 *orfA* 或 *orfB* 内基因缺失的 DNA 片段,采用如图 1 所示方法:根据基因库中开读框 *orfA* 或 *orfB* 及其上下游序列分别设计出各组四种引物 P1、P2、P3 和 P4,其中 P2 和 P3 有 21bp-互补序列(在其引物序列中以下划线标出),P1 和 P4 有 EcoRI 酶切位点。以 *C. glutamicum* 野生菌的染色体 DNA 为模板 DNA,分别以 P1、P2 为引物和以 P3、P4 为引物进行常规 PCR 获得产物 A-12、A-34 以及 B-12、B34,再各自以产物为 DNA 模板,以 P1 和 P4 为引物,采用 Taq/Pwo-聚合酶(Hybrid-AGS 公司 ProofSpinter<sup>TM</sup> 试剂盒)进行 Cross-over PCR 反应可获得在 *orfA* 或 *orfB* 的基因内缺失的 DNA 片段 F-dA 或 F-dB。其中为 *orfA* 缺失设计的四种引物 P1、P2、P3 和 P4 序列分别如下:A-P1(5'-CCG GAA TTC CGG CGC CTC ATG GTC GTT CAG-3');A-P2(5'-CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA ATC GAC TCC TAA TCG ACC CTC TAT TCT AGC-3');A-P3(5'-TGT TTA AGT TTA GTG GGG GCA CTT CTT GAG GAG CAG CAA AGC AAC-3');A-P4(5'-CTA GGT GAT CGA ATT CGA GAC CAA GGA CCC-3')。为 *orfB*

缺失分别设计出的四种引物 P1、P2、P3 和 P4 序列分别如下 :B-P1( 5'-CCG GAA TTC CGG GTA CTT ACC GTC ACG GGT GGA GAA ACT CTG-3' ) ;B-P2( 5'-CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA ATG GTC AAG CAT GCT GGC CAA ATG GTT GTC-3' ) ;B-P3( 5'-TGT TTA AGT TTA GTG GGGAT CCT GGT GAT GAG GGC AGA TTG TTC TAG-3' ) ;B-P4( 5'-CCG GAA TTC CGG CAG CTT CCT GTC CTT TGC CAT CGG CGC-3' ) 。 Cross-over PCR 的反应条件为 94℃2min→25~30 个循环( 94℃ 30s→60℃ 30s→72℃1min→72℃10min→4℃ ) 。

由常规 PCR 获得产物 A-1( 480 bp ) 和 A-34( 471 bp ) , 由 Cross-over PCR 再获得 *orfA* 内缺失的 DNA 片段 F-dA( 930bp ) ; 由常规 PCR 获得 B-1( 471bp ) 和 B-34( 483bp ) , 再由 Cross-over PCR 获得 *orfB* 内缺失的片段 F-dB( 933bp ) , 进一步将 F-dA 和 F-dB 经 *EcoRI* 酶切后分别克隆到基因取代载体 pK19mobsacB 中 , 在 *E. coli* DH5 $\alpha$  中构建了重组质粒 pK19-dA 和 pK19-dB , 电泳结果见图 2 和图 3。

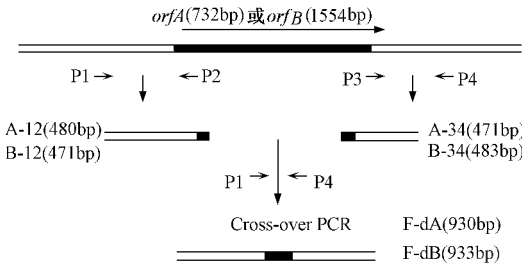


图 1 Cross-over PCR 方法获得 *orfA* 和 *orfB* 基因内缺失的 DNA 片段 F-dA 和 F-dB

Fig. 1 Protocol for harvesting the fragments of deleting the internal region of *orfA* and *orfB* ( F-dA and F-dB ) by Cross-over PCR

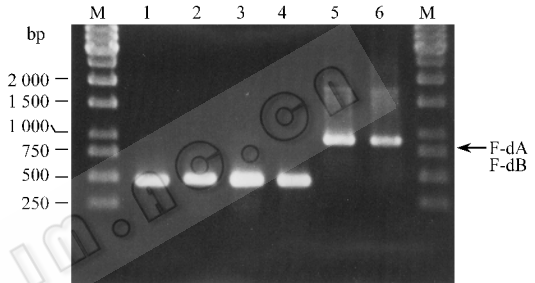


图 2 *orfA* and *orfB* 基因内缺失片段的获得

Fig. 2 Construction of PCR product with deleting internal region of *orfA* and *orfB*

M :DNA marker ; 1 :A-12 ; 2 :A-34 ; 3 :B-12 ; 4 :B-34 ; 5 :F-dA ; 6 :F-dB .

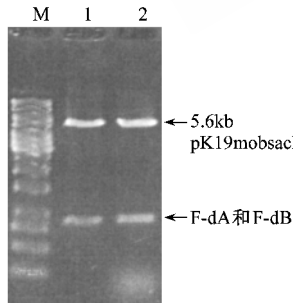


图 3 重组质粒 pK19-dA 和 pK19-dB

Fig. 3 Recombinant plasmids pK19-dA & pK19-dB  
M :1kb-ladder ; 1 :pK19-dA digested with *EcoRI* ; 2 :pK19-dB digested with *EcoRI* .

### 2.2 *C. glutamicum* 中 *orfA* 或 *orfB* 基因缺失菌株的构建

采用基因重组交换技术( 见图 4 )。将已克隆的重组质粒 pK19-dA 和 pK19-dB 通过高效电激转化<sup>[12]</sup> , 分别导入野生型菌株中进行 DNA 重组 , 载体含有 Km<sup>R</sup> 基因 , 在含卡那霉素的培养基进行初次筛选以获得第一次重组 , 即载体 DNA 在野生型染色体上的定点整合 ; 由于载体又含有 *sacB* 基因 , 不能使菌体在含 10% 蔗糖的基质上生长 , 因此以蔗糖为基质进行再次筛选可排除载体 DNA , 载体与染色体 DNA 发生第二次重组 , 并不再具有卡那霉素抗性 ; 其中再重组结果将因重组位点的差异而不同 , 通过 PCR 方法可筛选和鉴定基因缺失突变子 , 其中获得较小 PCR 产物( 大小为 930 或 933bp ) 的菌株为相应的基因缺失突变子。

在获得 *orfA* 和 *orfB* 单基因缺失菌株的基础上 , 任选其一的 *orfA* 或 *orfB* 单基因缺失菌株 , 制备感受态细胞 , 然后将相应的重组质粒 pK19-dB 或 pK19-dA 导入菌株 , 采用图 4 方法重组整合和筛选技术 , 获取在原单基因缺失基础上的双重基因缺失株。以其染色体 DNA 或直接

细胞悬液为检测模板,进行两组引物(A-P1和A-P4)(B-P1和B-P4)下的PCR反应,检验是否都生成各自0.93kb的小片段,如两组都检测到0.93kb PCR小片段的即为双基因缺失菌株。

### 2.3 *orfA* 或 *orfB* 基因缺失菌株的 PCR 分析

以野生型生长菌 *C. glutamicum* 13032 WT 相对照,对获得第一次重组菌(*C. glutamicum* 13032 intA 和 *C. glutamicum* 13032 intB)和单基因缺失菌株(*C. glutamicum* 13032  $\Delta A$  和 *C. glutamicum* 13032  $\Delta B$ )用各自 *orfA* 和 *orfB* 对应的两组引物(A-P1和A-P4)(B-P1和B-P4)进行PCR检测。如图5所示,野生型菌株 *C. glutamicum* 13032 WT 获得PCR产物约在1.5kb或2.3kb大小;*orfA* 和 *orfB* 各自的单基因缺失突变株 *C. glutamicum* 13032  $\Delta A$  和 *C. glutamicum* 13032  $\Delta B$  获得PCR产物约0.93kb大小,对仅第一次重组菌进行PCR检测,发现它们同时存在两种PCR产物(*C. glutamicum* 13032 intA有1.5kb和930bp大小片段,*C. glutamicum* 13032 intB有2.3kb和933bp大小片段)。以上PCR检测结果(图5)与期望的一致,表明缺失突变的方法和获得的缺失菌株是可靠的。

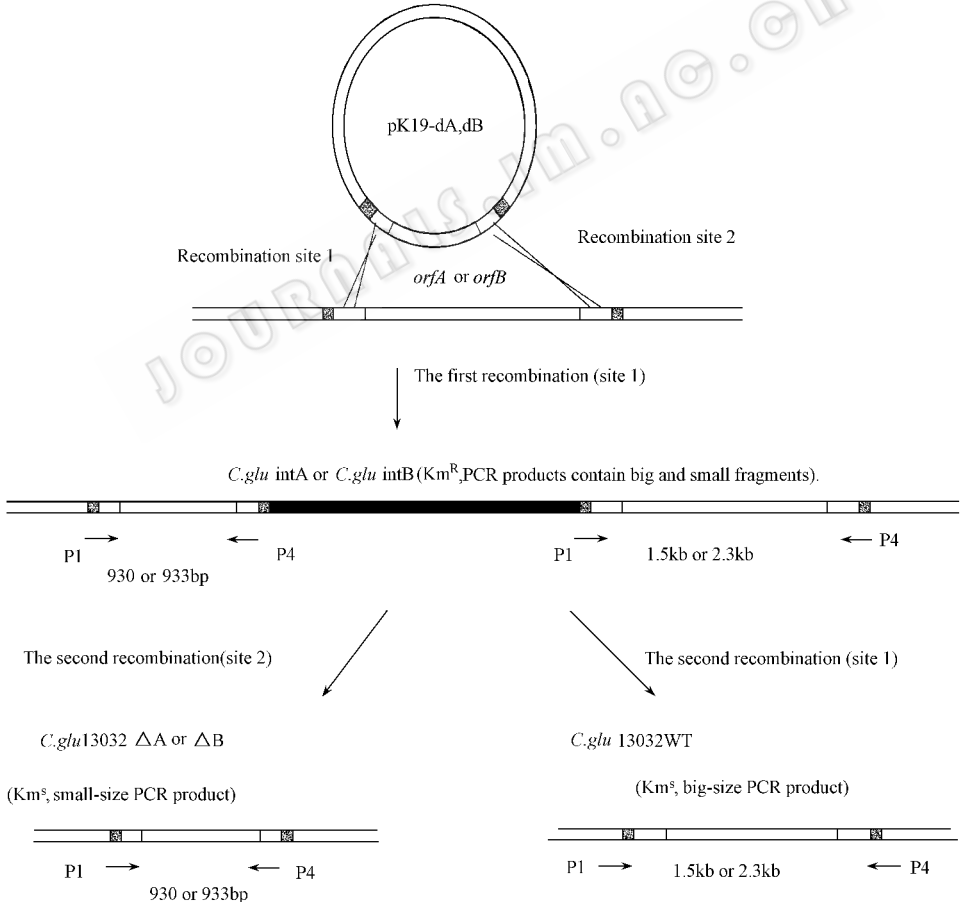


图4 通过基因重组方法获得 *orfA* 或 *orfB* 基因缺失突变子

Fig.4 Protocol for construction of defined deletion mutants within *orfA* or *orfB* by DNA recombination

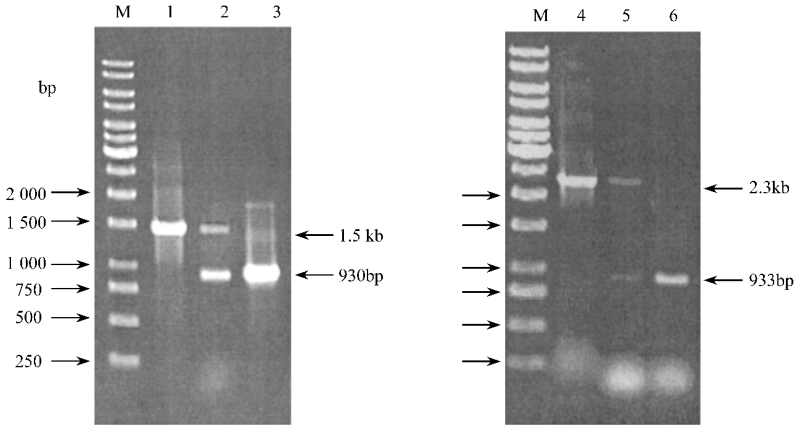


图 5 *orfA* 和 *orfB* 基因缺失株的 PCR 分析鉴定

Fig.5 Characterization of defined deletion mutant within *orfA* and *orfB* by PCR analysis

M :DNA-marker ; 1 :*C. glutamicum* 13032 WT 2 :13032 intA 3 :13032 ΔA 5 :13032 intB 6 :13032 ΔB.

TCATCGGCACCACCGTCTCGAATTACTGGTCCAGGCTGGCGGAGGCCGCAAGAACGATG  
 CCACCAAGCACATGAGTGGTTCGCGCACGCGATGGACGCCTCGTGCACCTTTGCGCCAG  
 AGGGCGACATTTGATGGTGGATCCGCCCGGCGATTTTGTCACTGTCACGGTGACTG  
 AGGCCAAGCCTTTCTTCCTCATCGCAGACTCCGGTGTGCAGACCCACCGCCGCACCA  
 AAGCTGGTGACAACCTCTGCAGTTGGTCAAGTTCCAACCACAGCACCAGATCGGTGTGG  
 GCTTGGGACTGCCACAAATCGGCGCACCAAAGGTGGCTCCTGCCACAGAATCTGCCT  
 GCTGCTCTATTAACATAAAAATTGCAGGCTAGAATAGAGGGTCGATTAGGAGTCGATT  
GTTTAAGTTTAGTGGATGGGACACTTCTTGAGCAGCAGCAAAGCAACCCAGAAGATA  
ATCCTTTGCTTGTGACGATCGTCGCGCCCGCATCGCCCGCCGCGCGAGCGTGAAC  
AGGATGCACAAGGGGAGCAGGCTTAAGTTCTAGTTC AAGCGTTGATCACGATACAA  
 GTGGTCAACCGCTTTTCCGTGCCCGCCTGGGATGCGATTTAAAGGCTCGTTTTTCTC  
 GAATGTGTGTTTGTATCGCCTTGGGGTGTTTAGGCGCTTAGAAGCCATTCTGTGAGG  
 TCGCTTTTTTTCAGGTT

GAGGGACACCACCATCACCTGGTCTGCACCAATTGCGGTCGCACAGTCGAAATCGAT  
 GGCGGTCCAGTAGAGACATGGGCACAGGAAATGCCACTAAAACGGCTTTGCTCTC  
 AGTAGTCACGGAGGCTGAAATCTTTGGACTTTGCGCCTGATTGTAAGGAAAAAGTTA  
 CCGTAGTTCAAGGACATATGAAGCTGTGCAACATGTGAGTGTCTGACAGCTTTTCTA  
 TTTGAAAAATAGCCTTGTATTCGAAAATTTGATCGGGTATGGTGGTTGGTATTAGC  
 ACAGGGAACTAAACGGGAAAGGGGGAAGACACCATGAGCATCACACACAGTCCAA  
GCACTCACACAGCACTCAACGCCATCGACAACCATTTGGCCAGCATGCTTGACCAT  
TGTTTTAAGTTTAGTGGATGGGGATCCTGGTGTAGGGGCACATTGTTCTAGCCCTTG  
 TTATTGCTGAGTTGTTGTCATGTTGTTGTGCTGTTGTCAGTCGCCCCAGTGTGTCT  
 GATAACCGGACACACCCATGCCTTGATCAACATACCGACAAGCCAGCACACCCCGAA  
 CTGGCCAGCCAGGCCGGGCCGCTGCAACCTGACGT

图 6 *orfA* (前) 和 *orfB* (后) 基因缺失菌株的 DNA 序列定点测定结果

Fig.6 The sequencing results from the *orfA* and *orfB* in-frame mutants *C. glutamicum* 13032 ΔA and *C. glutamicum* 13032 ΔB.

The defined deletion region of *orfA* (the show front) and *orfB* (the show behind) are boxed. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

此外,对单基因缺失菌株基础上发展的双基因缺失菌株,采用两组引物的 PCR 反应来检测和筛选,均获得了 0.93kb 两组 PCR 产物。

## 2.4 测序分析结果

对 *orfA* 和 *orfB* 的基因缺失菌株 *C. glutamicum* 13032  $\Delta A$  和 *C. glutamicum* 13032  $\Delta B$  进行染色体 DNA 上的定点序列测定,对照基因库序列<sup>[7]</sup>和基因缺失菌株设计方案,定点 DNA 缺失区域的序列准确率为 99.8% ~ 100%,序列测定结果显示(图 6)基因 *orfA* 和 *orfB* 内已经获得了预期的定点缺失。

## 3 讨论

利用基因缺失技术进行目标基因功能的定向研究,是国内外基因功能研究的重要手段和可靠依据<sup>[13-15]</sup>。采用开读框内定点缺失技术和染色体上 DNA 整合重组技术,我们在谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 中成功建立了两个目标基因 *orfA* 和 *orfB* 的染色体定点缺失方法,该方法具有技术应用的普遍性,可以指导开展该菌株内众多功能基因的定向缺失研究,特别对于目前有关该菌株代谢中调控基因的研究方面,更是值得借鉴。在筛选到的转座子插入突变菌株中,获得了与葡萄糖和乙酸盐等碳源代谢相关的目标研究基因 *orfA* 和 *orfB*<sup>[7]</sup>。通过本研究建立了这两个目标基因的单基因缺失株和双基因缺失株,这些为我们进一步分析研究缺失菌株在碳源代谢中的功能变化提供了必要的准备。

目前主要围绕 *orfA* 和 *orfB* 基因缺失菌株与野生型菌株的生理功能方面,进行一些生长特征的比较和一些代谢酶的酶学特性分析研究。至今尚没有发现它们在葡萄糖和乙酸等不同碳源上生长特性的明显差异,葡萄糖和乙酸代谢途径中一系列相关酶的酶学特征还在进一步的调查中,此外,这两个基因的过量表达菌株正在构建中,该两个目标基因是否对于谷氨酸棒杆菌碳源代谢及其调控作用有积极的意义,尚有待进一步验证,深入系统的研究在进行中。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M J. *Gen Appl Microbiol*, 1957, **3**: 193 ~ 205.
- [ 2 ] Sahn H, Eggeling L. *Naturwissenschaften*, 1999, **86**: 33 ~ 38.
- [ 3 ] Wendisch V F, DE Graaf A A, Sahn H, et al. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 3088 ~ 3096.
- [ 4 ] Ikeda M, Katsuma R. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 781 ~ 785.
- [ 5 ] Eggeling L. *Amino Acids*, 1994, **6**: 261 ~ 272.
- [ 6 ] Gubler M, Park S M, Jetten M, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **40**: 857 ~ 863.
- [ 7 ] 阮 红, Eikmanns. *微生物学报*, 2002, **42**(3): 326 ~ 330.
- [ 8 ] Hanahan D. *Techniques for transformation of E. coli*. Oxford, Washington DC: IRL-Press, 1986. 109 ~ 135.
- [ 9 ] Schäfer A, Tauch A, Jaeger W, et al. *Gene*, 1994, **145**: 69 ~ 73.
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis J. *Molecular cloning*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 11 ] Eikmanns B J, Thum-Schmitz N, Eggeling L, et al. *Microbiology*, 1994, **140**: 1817 ~ 1828.
- [ 12 ] Van der Rest M E, Lange C, Molenaar D. *Appl Microbiol Biotech*, 1999, **52**: 541 ~ 545.
- [ 13 ] Kakuda H, Hosono K, Shiroishi K, et al. *J Biochem*, 1994, **116**: 916 ~ 922.
- [ 14 ] Hueck C J, Hillen W. *Mol Microbiol*, 1995, **15**: 395 ~ 401.
- [ 15 ] Kumari S, Tischer R, Eisenbach M, et al. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 2868 ~ 2878.

## Site-directed Construction of In-frame Deletion Mutants of *Corynebacterium glutamicum*

Ruan Hong<sup>1</sup> Bernhard Eikmanns<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science ,Zhejiang University ,Hangzhou 310027 ,China )

(<sup>2</sup> Department of Microbiology & Biotechnology ,Ulm University ,Germany )

**Abstract :** This study is focused on *Corynebacterium glutamicum* ,an important producer in amino-acids industry ,by the protocol with construction of the in-frame deletion fragments of targeting genes ,application of DNA recombination technique and so on. We achieved successfully the defined deletion mutants in frame of the single gene or double genes. The in-frame deletion mutants are subsequently analyzed and confirmed by polymerase chain reaction and sequencing.

**Key words :** *Corynebacterium glutamicum* , Gene deletion , DNA recombination

### 《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、高等院校师生和企业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。2001 年《微生物学报》入选“中国科技期刊方阵”。

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

E - mail :gesg@sun.im.ac.cn actamicro@sun.im.ac.cn

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