

文章编号:1009-038X(2005)01-0006-05

核黄素操纵子在 *B. subtilis* 24R7 染色体上 整合对核黄素合成的影响

陈涛, 王靖宇, 班睿, 陈洵, 赵学明*

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要: 构建含有 *B. subtilis* 24 核黄素操纵子的整合型核黄素质粒 pRB40、pRB61 和 pRB63, 研究了核黄素操纵子分别在 *B. subtilis* 24R7 染色体的 *rib*、*amyE* 和 *thrC* 位点整合对核黄素合成的影响。结果表明, 核黄素操纵子通过单交换重组方式整合在上述位点可使核黄素合成量增加 14%~19%, 而通过双交换重组方式整合在 *amyE* 或 *thrC* 位点可使核黄素合成量增加 40%~44%。增强核黄素操纵子在 *B. subtilis* 24R7 染色体上的稳定性可以提高核黄素的合成量。

关键词: 核黄素操纵子; 枯草芽孢杆菌; 基因扩增; 核黄素

中图分类号: Q 812

文献标识码: A

The Effect of Integration of Riboflavin Operon in *B. subtilis* 24R7 Chromosome on Riboflavin Production

CHEN Tao, WANG Jing-yu, BAN Rui, CHEN Xun, ZHAO Xue-ming*

(School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Integrative rib plasmid pRB40, pRB61 and pRB63 containing the riboflavin operon of *B. subtilis* 24 were constructed. The effect of integration of the operon in 24R7 chromosome at *rib*, *amyE* and *thrC* locus was studied. The results indicate that integration of the operon by a single-cross or double-cross event causes an increase of 14%~19% or 40%~44% in riboflavin production, respectively. Enhancing the stability of riboflavin operon integrated in the chromosome results in the improvement of riboflavin production.

Key words: riboflavin operon; *Bacillus subtilis*; gene amplification; riboflavin

核黄素(维生素 B₂)是生物合成黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的前体物,在基础代谢中起重要的作用。核黄素除了作为常用临床药物外,在工业上还用作食品及饲料添加剂^[1]。由于具有可靠的安全性、丰富的遗传信息和极高的核黄素工业化生产潜力,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)

非常适合于构建基因工程菌来发酵生产核黄素。在解除了限制嘌呤和核黄素过量合成的反馈调节之后,进一步提高核黄素合成基因的剂量可以大幅度地提高枯草芽孢杆菌的核黄素合成能力^[2,3]。*B. subtilis* 24 是一株经过多次理化诱变后选育得到的产核黄素菌株,以其为宿主菌构建的 *B. subtilis*

收稿日期:2004-04-28; 修回日期:2004-06-09.

基金项目:国家自然科学基金项目(20036010)和国家 973 计划项目(2003CB716003)资助课题。

作者简介:陈涛(1974-),男,湖北武汉人,代谢工程博士研究生; * 通讯作者

24/pMX45 已经成功地用于核黄素的工业化生产^[4]。作者在构建 3 种整合型核黄素质粒的基础上,比较研究了核黄素操纵子以不同方式分别整合在 *B. subtilis*24 的 *recA* 回复突变株 24R7 的染色体上 *rib*、*amyE* 和 *thrC* 位点的稳定性及对核黄素合成的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 酶和试剂 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、Pyrobest DNA 聚合酶、溶菌酶和 dNTP; 购自

TaKaRa 公司;其它常规药品和试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.1.2 培养基 LB 培养基见文献[5];CMR 培养基见文献[6];补充培养基 B1: 在无菌的基本培养基^[6]中加入氨基酸混合液 0.5%;补充培养基 B2: 在无菌的基本培养基中加入不含苏氨酸的氨基酸混合液 0.5%;淀粉培养基:LB 固体培养基中补加 1 g/dL 水溶性淀粉;摇瓶发酵培养基:蔗糖 12 g/dL, 酵母粉 2.0 g/dL, MgSO₄ 0.05 g/dL, 尿素 0.6 g/dL。

1.1.3 菌株与质粒 见表 1。

表 1 菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

菌种	基因型	来源
枯草杆菌		
24	8-AG ^r , roseflavin ^r , Dc ^r , <i>recA4</i>	河北制药厂
24R7	78-AG ^r , roseflavin ^r , Dc ^r , <i>recA</i> ⁺	作者所在实验室保藏
24R7::[pRB40]	同 24R7,并在染色体上整合 pRB40	作者所在实验室保藏
24R7::[pRB61]	同 24R7,并在染色体上整合 pRB61	作者所在实验室保藏
24R7::[pRB63]	同 24R7,并在染色体上整合 pRB63	作者所在实验室保藏
<i>E. coli</i> DH5a	参见文献[6]	作者所在实验室保藏
质粒		
pCP115	Amp ^r , Cm ^r , Tet ^r	BGSC
pDG1664	Amp ^r , Em ^r , Spc ^r	BGSC
pDG364	Amp ^r , Cm ^r ,	BGSC
pHP13	Cm ^r , Em ^r	BGSC
pBE2	Km ^r , Amp ^r	作者所在实验室保藏
pRB40	Amp ^r , Cm ^r	作者所在实验室保藏
pRB61	Amp ^r , Em ^r , Spc ^r	作者所在实验室保藏
pRB63	Amp ^r , Cm ^r	作者所在实验室保藏
pHP13-REC	Cm ^r , Em ^r	作者所在实验室保藏
pBE2-REC	Km ^r , Amp ^r	作者所在实验室保藏

注:BGSC. Bacillus Genetic Stock Center; 8-AG: 8-氮鸟嘌呤; Dc: 德夸菌素。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的酶切、片段回收、连接和转化 DNA 片段用鼎国公司的 A007DNA 片段快速纯化试剂盒回收;DNA 的酶切、连接、转化按文献[5]进行。

1.2.2 PCR 扩增 参照文献[5],用 Thermo Hydaid P2 型扩增仪扩增。

核黄素操纵子引物:上游引物 5'G GGG GGT ACC ACA AAA GAG GGG AGG GAA AC 3'

下游引物 5' G GGG GAA TTC CGG GAT

万方数据

CGG ACT GAC G 3'

扩增条件:92 ℃ 预变性 300 s;92 ℃ 30 s; 58 ℃ 60 s;72 ℃ 300 s;30 个循环;72 ℃ 600 s。

recA 基因引物:上游引物 5' CCC GGG CTG CAG ATG TGT TTA TCG GCA TTT C 3'

下游引物 5'CCC GGG GAA TTC TAG ACG AAT AAA GCC CTA AAA 3'

扩增条件:92 ℃ 预变性 300 s;92 ℃ 30 s; 58 ℃ 60 s;72 ℃ 150 s;30 个循环;72 ℃ 600 s。

1.2.3 大肠杆菌和枯草杆菌感受态细胞的制备、

转化 参考文献[5,7],原生质体融合方法见文献[6].

1.2.4 不同转化子的鉴定方法 采用淀粉水解方法和氨基酸缺陷的验证方法^[6].

1.2.5 整合型质粒在染色体上的扩增方法 见文献[8].

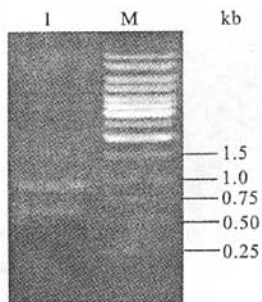
1.2.6 摇瓶发酵方法 500 mL 摇瓶中装入 30 mL 发酵培养基,41 °C 下 250 r/min 发酵 64 h.

1.2.7 测定方法 取 1 体积样品与 0.2 体积 1 mol/L NaOH 混匀,待核黄素结晶完全溶解后在 8 000 r/min 离心 2 min,取上清液,用乙酸-乙酸钠缓冲液适当稀释后在 444 nm 下测定吸光度,按照下列公式计算核黄素的质量浓度:核黄素质量浓度 (mg/L) = (总稀释倍数 × 吸光度) / 0.032 1

2 结果与讨论

2.1 *recA* 回复突变株 24R7 的构建

以 *B. subtilis* DB104 的染色体为模板,通过 PCR 扩增出 1.5 kb 的 DNA 片段, *Cla*I 酶切的鉴定结果见图 1,与理论的酶切图谱(图 2)一致,表明所扩增产物为目的 DNA 片段.



1. *Cla*I 酶切 PCR 产物; M. 1 kb DNA ladder

图 1 图 1 PCR 产物的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of product by digest

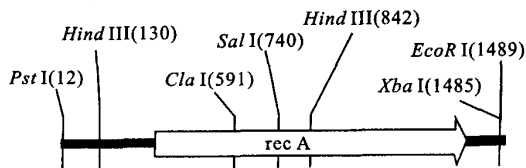
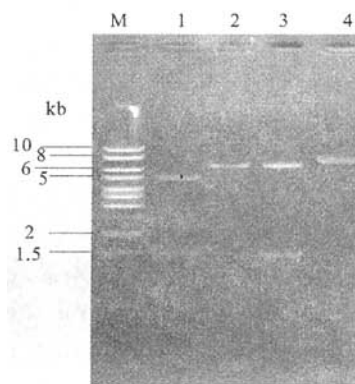


图 2 图 2 扩增产物的酶切图谱

Fig. 2 Restriction map of PCR product containing *recA*

用 *Pst*I 和 *Eco*R I 分别双酶消化 PCR 产物和两种 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭质粒 pBE2 与 pHP13,然后将质粒 PCR 产物连接,通过原生质体转化法将连接产物直接转化 *B. subtilis* 24,从含 50 ng/mL 丝裂霉素 C 的 CMR 再生选择培养基上得

到目的转化子,提取质粒后酶切鉴定结果见图 3. 将所构建的两种重组质粒分别命名为 pBE2-REC 和 pHP13-REC. 随后将 24/pBE2-REC 和 24/pHP13-REC 分别在含有 50 ng/mL 丝裂霉素 C 的 LB 液体培养基中传代培养约 20 代后,挑取因消除了质粒而分别对 Km 和 Cm 敏感但仍然具有丝裂霉素 C 抗性的菌株. 对于 24/pHP13-REC,在所挑取的 240 株菌株中,95% 同时具有 Cm 抗性和丝裂霉素 C 抗性,剩余 5% 的菌株则对 Cm 和丝裂霉素 C 均敏感,没有获得抗丝裂霉素 C 而对 Cm 敏感的菌株. 而对于 *B. subtilis* 24/pBE2-REC,所挑取的 60 株菌株中,70% 具有丝裂霉素 C 抗性而对 Km 敏感,从这 42 株菌中随机挑选 4 株进行质粒的提取验证,结果均不含有质粒,表明这些菌株在丢失了质粒的同时通过同源重组恢复了 *recA* 基因的功能. 将其中一株 *recA*⁺ 菌株 24R7 作为后续实验中的宿主菌.



M. 1 kb DNA ladder; 1. *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切 pHP13-REC; 2. *Eco*RI 酶切 pHP13-REC; 3. *Eco*RI 和 *Pst*I 酶切 pBE2-REC; 4. *Eco*RI 酶切 pBE2-REC

图 3 图 3 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid by digest

2.2 整合型核黄素质粒的构建和筛选

以 *B. subtilis* 24 的染色体为模板,通过 PCR 扩增出 4.6 kb 的 DNA 片段,包括核黄素操纵子的启动子、结构基因和终止子. 通过引物在上下游分别引入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点,分别用这两种内切酶酶切 PCR 产物及整合型质粒 pCP115、pDG1664 和 pDG364(见图 4),将 PCR 产物分别与 3 种载体连接,然后将连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,从选择性培养基上生长出黄色和白色两种转化子,提取质粒进行酶切验证,结果见图 5. 所有黄色转化子中均含有所构建的重组核黄素质粒,而白色转化子中都没有目的重组质粒. 将这些整合型核黄素质粒分别命名为 pRB40, pRB61 和 pRB63.

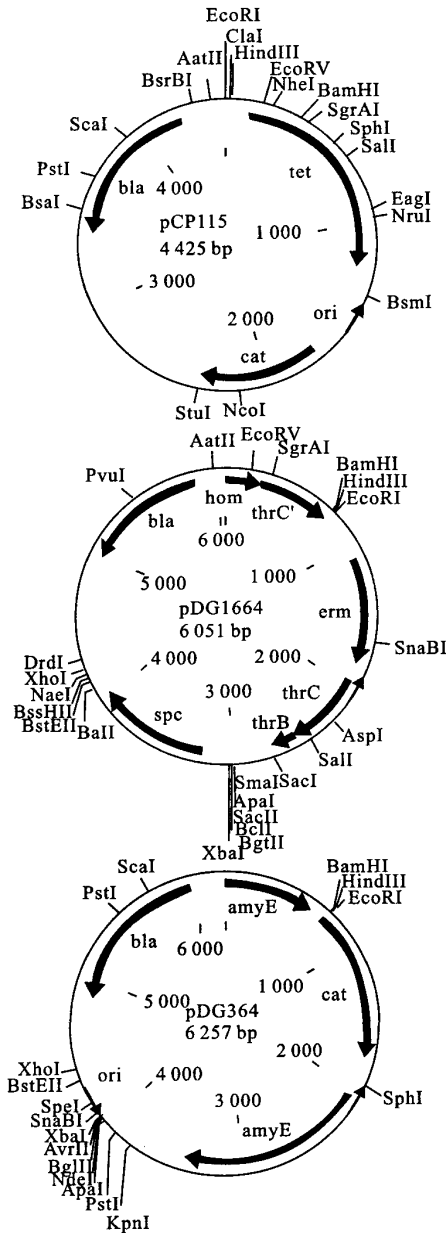
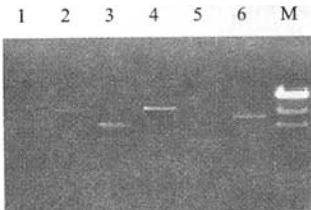


图 4 pCP115、pDG1664 和 pDG364

Fig. 4 pCP115, pDG364, and pDG1664



1. *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切 pRB63; 2. *Bam*HI 酶切 pRB63; 3. *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切 pRB61; 4. *Bam*HI 酶切 pRB61; 5. *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切 pRB40; 6. *Bam*HI 酶切 pRB40; M. λ /HindIII

图 5 整合型核黄素质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of integration riboflavin plasmid by digestion

万方数据

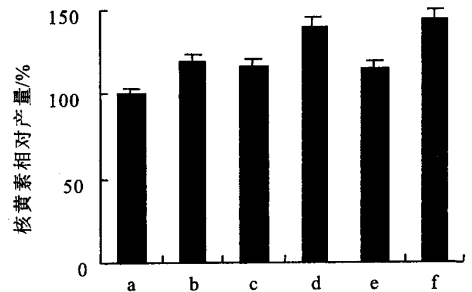
2.3 核黄素操纵子在 *B. subtilis* 染色体上整合方式和扩增后对核黄素合成的影响

通过原生质体法分别将 pRB40、pRB61 和 pRB63 转化入 24R7 中,共得到 5 种转化子,它们的特点和相对核黄素产量见表 2 和图 6。结果表明,核黄素操纵子通过单交换重组方式整合在 *rib*、*amyE* 或 *thrC* 位点,使核黄素的产量提高约 14%~19%,而通过双交换重组方式整合在染色体上的 *amyE* 或 *thrC* 位点可使核黄素产量提高 40%~44%。检测 4 种工程菌在传代培养过程中质粒稳定性,结果表明,通过双交换重组整合的核黄素操纵子在染色体上更为稳定,而单交换重组的核黄素操纵子在菌株的传代培养过程中容易从染色体上丢失(见图 7),这可能是造成上述产量差异的主要原因。拷贝数为 2 的游离型核黄素质粒 pMX45 在整个发酵过程中的保持率可高达 98% 以上,其分离稳定性非常高^[4]。将 pMX45 转化入 24R7 后的核黄素产量提高了约 150%(每个核黄素操纵子约 75%),这也说明了核黄素操纵子在 *B. subtilis* 24R7 中稳定性的增强有利于核黄素合成能力的提高。

表 2 核黄素操纵子整合在染色体 *rib*、*thrC* 或 *amyE* 位点的 5 种转化子

Tab. 2 Five types of transformants with riboflavin operon integrated at *rib*、*thrC* or *amyE* locus in chromosome

转化子	整合位点	整合方式	抗生素抗性
24R7::[pRB40]	<i>rib</i>	单交换重组	Cm; 5
24R7::[pRB61] _单	<i>thrC</i> 或 <i>rib</i>	单交换重组	Em; 5 Spc; 100
24R7::[pRB61] _双	<i>thrC</i>	双交换重组	Em; 5
24R7::[pRB63] _单	<i>amyE</i> 或 <i>rib</i>	单交换重组	Cm; 5
24R7::[pRB63] _双	<i>amyE</i>	双交换重组	Cm; 5



a. R7; b. R7::[pRB40]; c. R7::[pRB61]_单; d. R7::[pRB61]_双; e. R7::[pRB63]_单; f. R7::[pRB63]_双

图 6 5 类转化子的相对核黄素产量

Fig. 6 The relative riboflavin yield of transformants

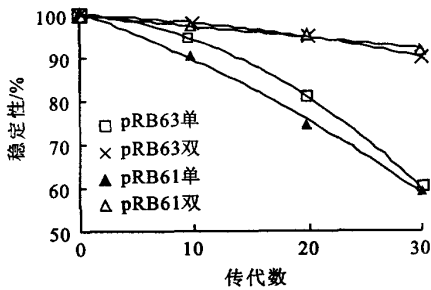


图7 整合型质粒的稳定性

Fig. 7 Stability of integration plasmid

图8表明了将R7::[pRB63]₄中的pRB63进行扩增后对提高核黄素合成的影响,得到的抗Cm 10~60 μg/mL的菌株的核黄素产量最高可增加约60%。对抗Cm 30 μg/mL的菌株作了质粒稳定性的检测,在传代培养30代后,具有10, 20 μg/mL氯霉素抗性的菌株分别占72%和40%,仍具有30 μg/mL氯霉素抗性的菌株仅有7%。这一结果表明,24R7染色体上所扩增的串联重复结构的稳定性很差,同双交换整合方式和转化pMX45相比,通过这种方式增加核黄素操纵子的剂量对增强核黄素合成的效果并不理想。

对于工程菌24/pMX45的改造,将核黄素操纵子中的启动子*ribP1*和*ribP2*替换为强启动子以增强转录的基础上,以较稳定的双交换整合的方式增

加少量的核黄素操纵子剂量,可以更好地提高工程菌的核黄素合成能力。

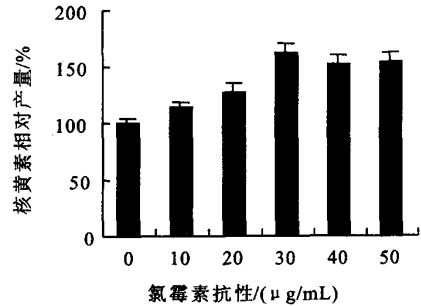


图8 24R7 Cm 抗性菌株的相对核黄素产量

Fig. 8 The relative riboflavin yield of 24R7 Cmr strains

3 结论

1) 通过单交换重组方式在*B. subtilis* 24R7染色体的*rib*、*amyE*和*thrC*位点整合一个核黄素操纵子可使核黄素合成增加14%~19%,而通过双交换重组方式整合在*amyE*或*thrC*位点可使核黄素合成增加40%~44%。

2) 通过将整合型核黄素质粒pRB63在*B. subtilis* 24R7染色体上进行大量扩增后,最多可使核黄素的合成增加约60%,但扩增后的串联重复结构的稳定性较差。以较稳定的双交换整合的方式增加核黄素操纵子剂量可提高工程菌的核黄素合成能力。

参考文献:

- [1] Stahmann K P, Revuelta J L, Seulberger H. Three biotechnical processes chemical riboflavin production[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53: 509-516.
- [2] Perkins J, Sloma A, Hermann T, et al. Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 22: 8-18.
- [3] Hümbelin M, Griesser V, Keller T, et al. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 22: 1-7.
- [4] 刘晓敏. *Bacillus subtilis* 24/pMX45 核黄素发酵工艺和基因操作研究[D]. 天津: 天津大学, 2001.
- [5] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1989.
- [7] Colin R Harwood, Simon M Cutting. *Molecular Biological Methods for Bacillus* [M]. London: Wiley-Interscience Publication, 1990.
- [8] Young M. Gene amplification in *Bacillus subtilis* [J]. *J Gen Microbiol*, 1984, 130: 1613-1621.
- [9] Koizumi S, Yonetani Y, Maruyama A, et al. Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(6): 674-679.

(责任编辑:李春丽)