

分类号:

学号: 20172006046

密级: 内部3年

单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 解淀粉芽孢杆菌中基因敲除体系的建立

学位申请人 靳芹

指导教师 张慧莉

申请学位门类级别 理学硕士

学科、专业名称 生物学

研究方向 微生物学

所在学院 生命科学学院

中国·新疆·石河子

2020年8月

**Establishment of gene knockout system in *Bacillus  
amyloliquefaciens***

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Natural Science**

By

**JIN Qin(Biology)**

Dissertation Supervisor:

ZHANG Huili

August,2020

## 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

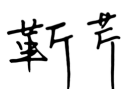
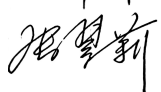
### 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：  时间：2020年8月18日

### 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：  时间：2020年8月18日  
导师签名：  时间：2020年8月18日

## 摘要

**目的:** 解淀粉芽孢杆菌在自然环境中广泛分布,易于分离和培养,对人类无毒无害。其代谢物多样,抗逆性强,生长快,稳定性好,在植物病害的防治中具有多种有益作用,具有广泛的工业和农业应用前景。本研究以实验室保藏的一株能产生 $\gamma$ -聚谷氨酸的解淀粉芽孢杆菌 C10 为研究对象,拟构建解淀粉芽孢杆菌 C10 的无痕基因敲除体系,为后期对菌株进行遗传修饰提供工具,并利用无痕敲除方法敲除该菌的草酸脱羧酶基因,验证草酸脱羧酶基因敲除后对 $\gamma$ -PGA 合成的影响。

**方法:** 本研究选择 *upp* 基因作为反向筛选标记构建解淀粉芽孢杆菌 C10 的无痕基因敲除体系。5-氟尿嘧啶(5-FU)可以被 *upp* 基因编码的尿嘧啶磷酸转移酶转化为有毒物质 5-dUMP,抑制细胞生长。利用这一原理敲除解淀粉芽孢杆菌 C10 内的 *upp* 基因,获得 C10 $\Delta$ *upp* 作为反向筛选标记使用的宿主菌。在这一宿主菌中利用温敏型质粒对 *amyA* 基因片段和 *oxdC* 基因进行无痕敲除,验证这一敲除体系的可靠性。

### 结果:

1. 本试验构建了 *upp* 上下游同源臂,与温敏型质粒 pKSV7 连接,构建的 pKSV7- $\Delta$ *upp* 载体经酶切得到约 7000bp 和 1100bp 两条带,经过测序确认载体构建成功。电转化进入解淀粉芽孢杆菌 C10 后,转化子经过氯霉素、5-FU 及 PCR 的筛选,得到解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp* 菌株。探索得到电转化最优条件为 OD<sub>600</sub>=4.2,重悬感受态细胞使用 MSG 缓冲液,电转化时预设电压 2200V,电击时间 5ms。

通过构建含有 *upp* 基因的 pKSV7 载体,再一次将含有 *upp* 表达盒的反向筛选质粒 pKSU 通过电转化导入解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp* 中。将重新导入 *upp* 基因的突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) 和初始菌株 C10 $\Delta$ *upp* 在 0.35mM 的 5-FU 的平板上涂布,在 5-FU 平板上, C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) 不能进行正常生长,说明 5-FU 的敏感性在 *upp* 基因回补菌株的影响下又被恢复,由此可知,在淀粉芽孢杆菌遗传改造中, *upp* 基因可作为解淀粉芽孢杆菌遗传改造中的反向筛选标记基因。

2. 构建敲除载体 pKSU- $\Delta$ *amyA*, 经过电转化进入突变菌株 C10 $\Delta$ *upp*, 经过氯霉素与 5-FU 敏感性检测后,得到突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA*。对突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* 进行了淀粉酶水解实验。实验结果显示,突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* 由于  $\alpha$ -淀粉酶基因的缺失,不能形成水解圈。实验结果证实了解淀粉芽孢杆菌 C10 中基因敲除体系的成功建立,为后续在解淀粉芽孢杆菌 C10 中的遗传操作奠定了基础。

3. 前期研究表明验证草酸的添加能够刺激解淀粉芽孢杆菌 C10 合成  $\gamma$ -PGA, 为了验证草酸在 PGA 合成中的作用,对草酸脱羧酶基因进行敲除。通过无缝克隆技术构建敲除载体 pKSU- $\Delta$ *oxdC*, 经过电转化进入菌株 C10 $\Delta$ *upp*, 筛选得到突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC*。检测了突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 及初始菌株 C10 $\Delta$ *upp* 的草酸脱羧酶活性,并且对突变菌株和原始菌株进行了  $\gamma$ -PGA 发酵验证。实验结果显示,突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 无草酸脱羧酶活力,对照菌株 C10 $\Delta$ *upp* 草酸脱羧酶活性为 1.3780U,比活力 0.6008U/mg,可以证实草酸脱羧酶基因已经成功敲除。发酵结束后, C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 和 C10 $\Delta$ *upp* OD<sub>600</sub> 值分别为 13.96 和 15.56, C10 $\Delta$ *upp* 较 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 有轻微优势。发酵实验结果显示,初始菌株 C10 $\Delta$ *upp* 的  $\gamma$ -PGA 产量为

22.22g/L，突变菌株产量为 12.33g/L。推测可能的原因是草酸在分解过程中产生还原力（NADH），抑制了菌体的TCA循环，促进碳流进入谷氨酸合成途径。草酸虽然不直接进入聚谷氨酸的合成途径，但通过调节细胞的能量代谢间接促进了聚谷氨酸的合成。

**关键词：**解淀粉芽孢杆菌；*upp*；基因敲除； $\gamma$ -PGA；发酵

## Abstract

**Objective:** *Bacillus amyloliquefaciens* is widely distributed in the natural environment, is easy to isolate and cultivate, and is non-toxic and harmless to human beings. It is rich in metabolites, has a broad-spectrum antibacterial activity, strong resistance, fast growth, good stability, has a variety of beneficial effects in the prevention and control of plant diseases, is very suitable for large-scale production and application of organisms. This study attempts to select a suitable reverse screening marker to make traceless gene manipulation possible, providing a powerful tool for genetic modification of *Bacillus amyloliquefaciens* C10, And verify the effect of oxalate decarboxylase gene knockout on  $\gamma$ -PGA synthesis.

**Methods:** In this study, the *upp* gene was selected as the reverse selection marker to construct a trace-free gene knockout system of *Bacillus amyloliquefaciens* C10. 5-Fluorouracil (5-FU) can be converted into the toxic substance 5-dUMP by the uracil phosphotransferase encoded by the *upp* gene, inhibiting cell growth. Using this principle, the *upp* gene in *Bacillus amyloliquefaciens* C10 was knocked out to obtain C10 $\Delta$ *upp* as a host strain for use as a reverse selection marker. In this host strain, temperature-sensitive plasmids were used to perform a seamless knockout of the *amyA* gene fragment and the *oxdC* gene to verify the reliability of this knockout system.

**Result:**

1. In this experiment, the upstream and downstream homologous arms of *upp* were constructed and connected to the temperature-sensitive plasmid pKSV7. The constructed pKSV7- $\Delta$ *upp* vector was digested to obtain bands of about 7000bp and 1100bp, and the successful construction of the vector was confirmed by sequencing. After electrotransformation into *Bacillus amyloliquefaciens* C10, the transformants were screened by chloramphenicol, 5-FU and PCR to obtain *Bacillus amyloliquefaciens* C10 $\Delta$ *upp* strain. The optimal condition for electrotransformation is OD<sub>600</sub>=4.2, MSG buffer is used to resuspend the competent cells, the preset voltage during electrotransformation is 2200V, and the electric shock time is 5ms.

By constructing the pKSV7 vector containing the *upp* gene, the reverse screening plasmid pKSU containing the *upp* expression cassette was again introduced into *Bacillus amyloliquefaciens* C10 $\Delta$ *upp* by electrotransformation. The mutant strain C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) and the initial strain C10 $\Delta$ *upp* reintroduced into the *upp* gene were spread on a 0.35-mM 5-FU plate. On the 5-FU plate, C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) could not grow normally, indicating that 5-FU The sensitivity was restored under the influence of the *upp* gene back-up strain. It can be seen that in the genetic modification of *Bacillus amyloliquefaciens*, the *upp* gene can be used as a reverse screening marker gene in the genetic modification of *Bacillus amyloliquefaciens*.

2. The knockout vector pKSU- $\Delta$ *amyA* was constructed, and after electrotransformation into the mutant strain C10 $\Delta$ *upp*, after the sensitivity detection of chloramphenicol and 5-FU, the mutant strain C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* was obtained. Amylase hydrolysis experiments were carried out on the mutant strain C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA*. The experimental results show that the mutant strain C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* cannot form a hydrolysis circle due to the deletion of the  $\alpha$ -amylase gene. The experimental results confirmed the successful establishment of the gene knockout system in *Bacillus amyloliquefaciens* C10, which laid the foundation for the subsequent genetic manipulation in *Bacillus amyloliquefaciens* C10.

3. Previous studies have shown that the addition of oxalic acid can stimulate the synthesis of  $\gamma$ -PGA by *Bacillus amyloliquefaciens* C10. To verify the role of oxalic acid in PGA synthesis, the oxalate decarboxylase gene was knocked out. The knockout vector pKSU- $\Delta$ *oxdC* was constructed

by seamless cloning technology, and after electrotransformation into strain C10 $\Delta$ *upp*, the mutant strain C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* was obtained by screening. The oxalate decarboxylase activity of the mutant strain C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* and the initial strain C10 $\Delta$ *upp* was tested, and the mutant strain and the original strain were verified by  $\gamma$ -PGA fermentation. The experimental results show that the mutant strain C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* has no oxalate decarboxylase activity, and the control strain C10 $\Delta$ *upp* oxalate decarboxylase activity is 1.3780U, and the specific activity is 0.6008U/mg, which can confirm that the oxalate decarboxylase gene has been successfully knocked out. After the fermentation, the C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* and C10 $\Delta$ *upp* OD<sub>600</sub> values were 13.96 and 15.56, respectively. C10 $\Delta$ *upp* had a slight advantage over C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC*. The fermentation experiment results showed that the initial strain C10 $\Delta$ *upp* had a  $\gamma$ -PGA yield of 22.22g/L and a mutant strain yield of 12.33g/L. It is speculated that the possible reason is that oxalic acid produces reducing power (NADH) during the decomposition process, inhibits the TCA cycle of the bacteria, and promotes the carbon flow into the glutamate synthesis pathway. Although oxalic acid does not directly enter the synthesis route of polyglutamic acid, it indirectly promotes the synthesis of polyglutamic acid by regulating the energy metabolism of cells.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*; *upp*; gene knockout;  $\gamma$ -PGA; fermentation

# 目录

摘要.....	III
Abstract.....	V
目录.....	VII
第一章 前言.....	1
1.1 解淀粉芽孢杆菌用于生产聚谷氨酸.....	1
1.1.1 解淀粉芽孢杆菌.....	1
1.1.2 聚谷氨酸.....	1
1.2 解淀粉芽孢杆菌的转化方法.....	2
1.2.1 噬菌体转导.....	2
1.2.2 原生质体转化法.....	3
1.2.3 自然转化法.....	3
1.2.4 同源重组.....	3
1.2.5 电转化法.....	3
1.3 芽孢杆菌属中的遗传操作策略.....	4
1.3.1 利用自杀质粒进行基因敲除.....	4
1.3.2 利用条件自杀型质粒进行基因敲除.....	5
1.3.3 基于线性 DNA 片段进行基因敲除.....	5
1.3.4 无痕基因操作方法.....	5
1.4 研究目的及意义.....	8
1.5 主要研究内容.....	8
1.5.1 解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ <i>upp</i> 基因敲除菌的构建.....	8
1.5.2 反向筛选质粒的构建及功能验证.....	9
1.5.3 解淀粉芽孢杆菌 C10 解淀粉酶基因的敲除.....	9
1.5.4 解淀粉芽孢杆菌 C10 草酸脱羧酶基因的敲除及对 $\gamma$ -PGA 合成的影响.....	9
第二章 解淀粉芽孢杆菌 C10 <i>upp</i> 基因敲除菌的构建.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 菌株及质粒.....	10
2.1.2 实验试剂.....	10

2.1.3 引物序列.....	10
2.1.4 培养基及溶液.....	11
2.1.4.1 培养基和缓冲液.....	11
2.1.4.2 抗生素及试剂浓度.....	11
2.1.5 实验设备.....	12
2.2 试验方法.....	12
2.2.1 菌株活化.....	12
2.2.2 确定解淀粉芽孢杆菌对 5-氟尿嘧啶(5-FU)耐受浓度.....	12
2.2.3 解淀粉芽孢杆菌 C10 菌株基因组的提取.....	12
2.2.4 <i>upp</i> 上、下游基因扩增及连接反应.....	12
2.2.4.1 <i>upp</i> 上、下游基因扩增.....	13
2.2.4.2 DNA 片段的回收.....	13
2.2.4.3 制备 <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ 、 <i>E. coli</i> JM110 感受态.....	13
2.2.4.4 T 载体连接 <i>upp</i> 同源臂.....	14
2.2.4.5 菌落 PCR.....	15
2.2.4.6 质粒 DNA 的提取.....	15
2.2.5 <i>upp</i> 片段与温敏型质粒 pKSV7 连接.....	15
2.2.6 利用 <i>Bam</i> H I 甲基转移酶进行甲基化处理.....	16
2.2.7 解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态及电转化条件摸索.....	16
2.2.8 解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态制备.....	17
2.2.9 解淀粉芽孢杆菌 C10 电转化.....	17
2.2.10 筛选 C10 $\Delta upp$ 初始菌株.....	17
2.2.11 生长曲线的确定.....	17
2.3 结果与讨论.....	18
2.3.1 解淀粉芽孢杆菌 C10 对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 耐受浓度的确定.....	18
2.3.2 <i>upp</i> 上下游同源臂基因扩增.....	18
2.3.3 pKSV7- $\Delta upp$ 载体的构建.....	19
2.3.4 pKSV7- $\Delta upp$ 载体电转化解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态细胞.....	20
2.3.4.1 解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态电转化条件建立.....	20

2.3.4.2 解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ <i>upp</i> 菌株的筛选.....	20
2.3.5 <i>upp</i> 基因缺失对菌株生长能力的影响.....	20
2.3.6 讨论.....	21
第三章 构建 pKSV7- <i>upp</i> 反向筛选质粒及功能验证.....	23
3.1 实验材料.....	23
3.1.1 菌株及质粒.....	23
3.1.2 实验试剂.....	23
3.1.3 引物序列.....	23
3.1.4 培养基及溶液.....	23
3.1.5 实验设备.....	23
3.2 试验方法.....	23
3.2.1 菌株活化.....	23
3.2.2 反向筛选质粒 PKSU 的构建.....	23
3.2.3 反向筛选质粒 pKSU 功能验证.....	25
3.3 结果与讨论.....	25
3.3.1 反向筛选质粒 pKSU 载体的构建.....	25
3.3.2 反向筛选质粒 pKSU 功能验证.....	26
3.3.3 讨论.....	26
第四章 $\alpha$ -淀粉酶基因 <i>amyA</i> 的敲除.....	27
4.1 实验材料.....	27
4.1.1 菌株及质粒.....	27
4.1.2 实验试剂.....	27
4.1.3 引物序列.....	27
4.1.4 培养基及溶液.....	27
4.1.4.1 培养基和缓冲液.....	27
4.1.4.2 抗生素及试剂浓度.....	27
4.1.5 实验设备.....	27
4.2 试验方法.....	27
4.2.1 菌株活化.....	27

4.2.2 敲除载体 pKSU- $\Delta amyA$ 构建.....	27
4.2.3 $\alpha$ -淀粉酶基因 $amyA$ 的敲除.....	29
4.2.4 淀粉水解实验.....	29
4.3 结果与讨论.....	29
4.3.1 敲除载体 pKSU- $\Delta amyA$ 的构建.....	29
4.3.2 菌株 C10 $\Delta upp\Delta amyA$ 的筛选.....	30
4.3.3 淀粉水解实验.....	31
4.3.4 讨论.....	31
第五章 草酸脱羧酶基因的敲除及对 $\gamma$ -PGA 合成的影响.....	33
5.1 实验材料.....	33
5.1.1 菌株及质粒.....	33
5.1.2 实验试剂.....	33
5.1.3 引物序列.....	33
5.1.4 培养基及溶液.....	33
5.1.4.1 培养基和缓冲液.....	33
5.1.4.2 抗生素及试剂浓度.....	33
5.1.5 实验设备.....	33
5.2 试验方法.....	34
5.2.1 菌株活化.....	34
5.2.2 敲除菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$ 的构建.....	34
5.2.3 草酸脱羧酶基因敲除菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$ 的发酵培养.....	36
5.2.4 敲除菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$ 草酸脱羧酶活力测定.....	36
5.2.5 $\gamma$ -PGA 的测定.....	37
5.3 结果与讨论.....	37
5.3.1 敲除载体 pKSU- $\Delta oxdC$ 的构建.....	37
5.3.2 菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$ 的筛选.....	38
5.3.3 草酸脱羧酶浓度及活力的测定.....	39
5.3.4 $oxdC$ 基因的敲除对 $\gamma$ -PGA 合成的影响.....	40
5.3.5 讨论.....	41

总结与展望.....	43
参考文献.....	45

# 第一章 前言

## 1.1 解淀粉芽孢杆菌用于生产聚谷氨酸

### 1.1.1 解淀粉芽孢杆菌

解淀粉芽孢杆菌属于革兰氏阳性杆菌的一种，具有好氧、产芽孢、嗜温的特点<sup>[1]</sup>。解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 是日本学者福本 (Fukumoto) 于 1943 年首次发现的。由于解淀粉芽孢杆菌的外观和性能特征与枯草芽孢杆菌非常相似，其 16S rRNA 对比同源性高达 99%。它最初被列为枯草芽孢杆菌的亚种之一。直到 1967 年，一些学者利用 DNA 杂交技术发现解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌是不同的品种<sup>[2]</sup>。此细菌分布广泛，其优点如下：不会对环境造成污染，且不会对动物与人类有损害；分离培养菌株的成功率较高；具有丰富的代谢产物，如大环内酯类、抗菌蛋白、脂肽类等物质，具有良好的抑菌性，可抑制动植物病原菌的生长；代谢产物应用十分广泛等。解淀粉芽孢杆菌代谢产物的主要用途为食物保鲜、动植物细菌病的防治等，因而应用前景十分广泛<sup>[3]</sup>。

### 1.1.2 聚谷氨酸

$\gamma$ -聚谷氨酸(Poly- $\gamma$ -glutamic acid,  $\gamma$ -PGA)是一种由重复谷氨酸单体构成的聚氨基酸，能够由多种微生物产生，其分子结构如图 1-2 所示<sup>[4]</sup>。 $\gamma$ -PGA 合成前体为谷氨酸。谷氨酸的来源有两种：一种是内源合成，另一种是外源添加。内源合成的谷氨酸是细胞通过糖酵解等途径将碳源转化成乙酰辅酶 A，然后乙酰辅酶 A 通过 TCA 循环合成 2-酮戊二酸，2-酮戊二酸再通过氨同化作用合成谷氨酸<sup>[5]</sup>。外源谷氨酸在转运过程中首先被转化成谷氨酰胺，谷氨酰胺再与 2-酮戊二酸在谷氨酸合成酶的作用下合成两分子的谷氨酸。

根据羧基的附着情况，PGA 可分为两种异构体， $\alpha$ -PGA 和 $\gamma$ -PGA<sup>[6,7]</sup>。谷氨酸单体存在三种，L 型( $\gamma$ -L-PGA)，D 型( $\gamma$ -D-PGA)，和 L 型及 D 型的混合物 ( $\gamma$ -LD-PGA)<sup>[8,9]</sup>，而且由于大量羧基的存在使 PGA 具有很强的吸水性，其水溶液具有很高的粘度。由微生物合成的 $\gamma$ -PGA 分子量一般在 10-10000kD 之间<sup>[10]</sup>。

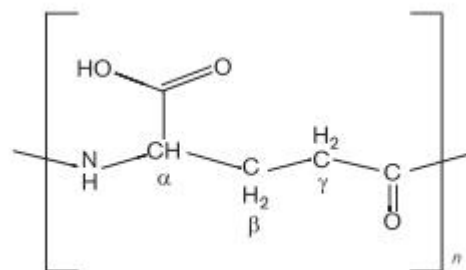


图 1-1  $\gamma$ -PGA 结构。

Figure 1-1 The structure of  $\gamma$ -PGA.

$\gamma$ -PGA 是由 Ivonovics 和 Bruckner 首先在炭疽芽孢杆菌中发现的<sup>[11]</sup>。 $\gamma$ -PGA 的另一个天然来源是纳豆的粘液,其中含有 $\gamma$ -PGA 和纳豆芽孢杆菌产生的果聚糖的混合物<sup>[12,13]</sup>。 $\gamma$ -PGA 主要由革兰氏阳性菌产生,大多数的生产菌都属于芽孢杆菌属,例如解淀粉芽孢杆菌<sup>[14,15,16]</sup>。据报道,有一种革兰氏阴性细菌(核梭杆菌)、一些古菌和真核生物也具有产生 $\gamma$ -PGA 的能力<sup>[17,18,19]</sup>。已报道的合成菌被分为两类:谷氨酸依赖型菌株和谷氨酸非依赖型菌株。谷氨酸依赖型菌株在发酵过程中需要添加外源谷氨酸,提高了 $\gamma$ -PGA 生产成本,而谷氨酸非依赖型菌株在发酵过程中不需要添加外源谷氨酸,可以直接利用无机氮源合成 $\gamma$ -PGA,是 $\gamma$ -PGA 微生物合成的研究重点。

$\gamma$ -PGA 具有极佳的水溶性、生物亲和性和生物降解性,无毒无害,形成的胶体稳定性强,其吸附性也十分优异,可以作为药物增效剂、癌症靶向药载体或基因载体广泛应用于医药行业,其增稠性极佳可作为食品工业中的增稠剂、营养助剂和风味添加剂,祛苦味剂。除此也广泛应用于化妆品研制、污水吸附处理、重金属土壤治理等诸多方面<sup>[20,21]</sup>。在农业方面,亦可作为肥料增效剂、缓释剂和稳定剂,更可保持土壤水分同时吸附土壤中的阳离子来增强耕作土壤肥力,能有效改善土壤团粒结构促进农作物生长,提高农作物的抗逆性<sup>[22,23]</sup>。

$\gamma$ -PGA 生产方法有化学合成法、酶催化法、微生物发酵法等<sup>[24]</sup>。其中,由于微生物发酵的生产条件简单、目标产物含量高,目前已经成为 $\gamma$ -PGA 工业生产的首选方法。按照发酵中微生物培养状态,又可将其分为固态发酵和液态发酵。相比于液态发酵,虽然固体发酵中 $\gamma$ -PGA 的产量高,但是提取十分困难<sup>[25]</sup>,难以实现工业化生产。现阶段,国内外对 $\gamma$ -PGA 发酵的研究仍集中在液体发酵。随着工业中 $\gamma$ -PGA 产量需求不断增加,如何通过液体发酵提高 $\gamma$ -PGA 产量是目前 $\gamma$ -PGA 的产业化进程中最重要任务之一。目前,解决这一问题主要三个方向:筛选新的 $\gamma$ -PGA 合成菌株、优化发酵工艺和遗传改造已有的 $\gamma$ -PGA 合成菌。王增<sup>[26]</sup>等利用基因组重组技术由枯草芽孢杆菌 GXA-28 出发获得了突变株 F3-178,其突变菌株中 $\gamma$ -PGA 相关合成基因的过度表达使得 $\gamma$ -PGA 产量提高了 1.9 倍 $[(34.3 \pm 1.2)\text{g/L}]$ 。

## 1.2 解淀粉芽孢杆菌的转化方法

解淀粉芽孢杆菌目前有五种将外源 DNA 引入菌体的转化方法,例如噬菌体转导<sup>[27]</sup>,原生质体转化法<sup>[28]</sup>,自然转化<sup>[29]</sup>,重组方法<sup>[30]</sup>和电穿孔<sup>[31]</sup>。前两种方法是前人将 DNA 引入解淀粉芽孢杆菌的重要方法<sup>[32]</sup>。

### 1.2.1 噬菌体转导

噬菌体转导是指利用噬菌体将外源小片段染色体或者基因从一个细菌转移到另一个细菌的过程。基于这种现象,人们将噬菌体 DNA 发展改造成为运载基因的载体,如 $\lambda$ 噬菌体载体。利用噬菌体外壳蛋白包裹重组 DNA,形成新的噬菌

体，以感染的方式进入宿主菌，使外源基因进行复制。基因文库的建立过程中，大多使用噬菌体转导技术，提高了外源基因进入宿主菌的效率。因此，在分子克隆技术中，转导特指以噬菌体 DNA 为载体，将外源 DNA 导入细菌细胞的过程 [26,33]。

### 1.2.2 原生质体转化法

在对解淀粉芽孢杆菌进行外源质粒转化过程中，其最大的阻碍是较厚的细胞壁会阻碍质粒的进入。原生质体转化法的原理是用溶菌酶提前处理菌体，溶解其细胞壁后形成原生质体，这样导入外源质粒就会更加方便，成功导入之后将其转移至再生培养基中重新恢复细胞壁。这一方法较为传统，Chang 和 Cohen 在研究中使用了枯草芽孢杆菌原生质体转化法，以此为参考可以在解淀粉芽孢杆菌原生质体转化的过程中调配所需的培养基与缓冲液。同时这一方法也是多种芽孢杆菌进行外源质粒转化的重要方式 [27]。

### 1.2.3 自然转化法

自然转化法的主要依据是菌体具有的能力可形成天然感受态，可以将外源 DNA 重组进入基因组中。*B. subtilis* 的 DNA 转化方法是由 Spizizen 所发明的经典方式 [28]。然而这一方法的应用率较低，这是由于其具有很低的转化效率。虽然有人以此为基础改进了这一转化方法，有利于菌体形成感受态，但是对转化效率的提高并无帮助。

### 1.2.4 同源重组

同源重组这种基因重组技术在所有的生物体中几乎都会发生，是重要的染色体遗传信息交换方式。同源重组的例子主要有：真核生物中姐妹染色单体的基因交换、细菌的转导与重组、细菌与低等真核生物的转化等。这种方式又称一般重组，是受损细胞损伤修复的主要方式。在分子生物学实验中，同源重组技术应用广泛且常用于基因敲除与基因克隆之中 [29]。

### 1.2.5 电转化法

当前电转化法在实验中应用较为广泛，这是由于它具有转化效率高、操作简便、适用菌种范围广泛、周期较短等优点。在长期的研究过程中，针对不同的菌株研究出参数不同的电转化法。Xue 等在地衣芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌的外源质粒转化实验中就是运用的电转化法 [30]。然而在实际操作中，其主要障碍是对转化条件的要求十分苛刻，因此必须探讨研究对电转化法中参数的调节。

通常使用自然转化和重组方法将外源 DNA 引入解淀粉芽孢杆菌，结果是某些枯草芽孢杆菌的转化效率很高 [28,29]。但是，这两种方法的转化效率与某些基因密切相关，例如群体感应组件和能力主调节子 *comK*。这些基因的不同结构导致转化效率的巨大差异 [34,35]。因此，天然转化和重组方法在菌株中具有特异性。与

其他方法相比,电穿孔是一种常见的省时的转化方法,已被广泛用于枯草芽孢杆菌<sup>[36,37]</sup>。尽管枯草芽孢杆菌的电穿孔方法已经研究了很多年,但对于芽孢杆菌仍没有标准和通用的方案。

由于解淀粉芽孢杆菌的巨大工业价值,对于基因操作的各种方法,研究人员也提出了更高的要求。当前非常多的菌株已有全基因组测序结果被发表,因而出现了越来越多的位点可用于基因操作,在这种情况下,为加快菌株转化的效率,必要的是简便高效的基因操作方法。不幸的是,解淀粉芽孢杆菌的遗传操作通常限于转化步骤。与其近亲枯草芽孢杆菌相比,解淀粉芽孢杆菌菌株在转化方法上具有更大的缺点:首先,解淀粉芽孢杆菌不能形成天然的感受态,不可以用诸如枯草芽孢杆菌的 PCR 片段转化;其次,一些解淀粉芽孢杆菌菌株转化效率低,甚至不能完全转化<sup>[38]</sup>。所报道的解淀粉芽孢杆菌菌株的大多数转化都需要电穿孔。通常,将山梨醇或蔗糖添加到培养基中以增加渗透压,或者甘氨酸或丝氨酸可以削弱细胞壁以增加转化效率<sup>[15,39]</sup>。Zakataeva 等发表了通过噬菌体转导来完成解淀粉芽孢杆菌的转化<sup>[40]</sup>。然而对于普通实验室而言,这种操作方法所需的材料获得十分困难,而且具有复杂的操作过程,因而不是十分适用。因此,研究解淀粉芽孢杆菌转化方法具有重要的理论意义和应用价值。

### 1.3 芽孢杆菌属中的遗传操作策略

不管是大规模的染色体遗传工程,还是单基因敲除实验,简便有效的遗传操作是必须的。如何将敲除的 DNA 元件如何转化成受体细菌,有以下几种适用于芽孢杆菌属的基因操作方法。

#### 1.3.1 利用自杀质粒进行基因敲除

在宿主细菌中,无法进行复制的质粒就叫做自杀质粒。在运输 DNA 的过程中,这一质粒应用十分广泛<sup>[41]</sup>。在进行基因敲除时,自杀质粒与同源臂连接到一起,之后转化进入宿主菌株。在宿主菌株中自杀质粒不能进入自主复制过程,因而当发生细胞分裂时,新复制的细胞中就会失去自杀质粒,这样在进行抗生素平板筛选时这些转化体就会被筛选出去。留下来的转化体都具有抗生素抗性,这些转化体的形成是在 RecA 介导下,染色体上相应的同源序列与同源臂之间发生同源重组,之后这些质粒就会整合于细胞染色体中,在之后的细胞分裂中也不会丢失,因而具有抗性。在经过抗生素筛选之后留下来的菌株就是第一次同源重组之后形成的转化体。在此转化体内染色体中存在同源臂两组,其中之一可以发生第二次分子内同源重组,之后将质粒从染色体上分离出来,再对染色体进行检测,其主要表现出两种结果:第一种是染色体恢复了野生型,另一种是用已构建的同源臂替换原始序列。二者可以通过 PCR 进行区分。

在大多数芽孢杆菌菌株的报道中，若被敲除的基因数量较少甚至只有一个，菌株的抗生素抗性标记就可以迅速构建突变菌株。若不将抗性标记用于菌株，则很少会发生第二次同源重组，这样就必须使用反向筛选标记。

### 1.3.2 利用条件自杀型质粒进行基因敲除

这种质粒有两种常见的类型。一种是具有温度敏感性复制起始位点的温度敏感型质粒<sup>[42]</sup>。另一种是无法进行自主复制，但能借助其它质粒完成复制过程的质粒<sup>[43]</sup>。自杀质粒的形成原因有两种：培养温度发生变化或者辅助质粒被消除。近年来，该质粒以低转化效率，被用于部分菌株，参与基因敲除过程。对于温度敏感型质粒来说，要进行基因敲除，首先要有适合质粒复制、培养并富集的温度，并在此条件下获得转化体，为完成基因同源重组提供充足的基数。然后改变培养温度，让质粒无法自主复制，只能通过基因同源重组，将质粒整合到其它辅助质粒上，以获得抗生素抗性，从而存活下来。之后在对应的抗生素平板上完成筛选过程并获得单次交换菌株，后续筛选流程同自杀质粒。

### 1.3.3 基于线性 DNA 片段进行基因敲除

随着功能基因组学的快速发展，基因敲除成为开展基因功能研究的重要内容。目前，基于线性 DNA 片段的基因敲除方法最适合用于大量基因组转化，它不需要耗时的载体构建流程。在枯草芽孢杆菌进行基因敲除的一般过程中首先通过 PCR 制备线性 DNA 片段，该片段的组成结构包括末端的同源臂以及同源臂中间的抗性筛选标记。然后将获得的 DNA 元件转化进待敲除的菌株，末端的两组同源臂经两次重组被融入到染色体中，从而替换需敲除的序列。为去除染色体上标记的抗生素抗性，学者们研究出两种方法：一是于体外建立仅包含同源臂而没有抗性标记的 DNA 元件，该元件必须包含合适的反向筛选标记基因；二是对抗性基因进行两次重组替换，即在 DNA 元件的反向筛选标记的两端，加入重复或具特异性的 DNA 序列，并通过基因同源重组或位点特异性重组除去染色体上的抗性标记。这种基因敲除方法适合于具有天然能力的菌株，例如枯草芽孢杆菌<sup>[44]</sup> (*Bacillus subtilis*)。在大肠杆菌中，RecBCD 复合物的核酸外切酶活性可迅速切割导入细胞的线性片段。但是，可以通过引入噬菌体编码的重组酶来克服这种不稳定性。例如，大肠杆菌中 $\lambda$ 噬菌体的 *red* 和 *gam* 基因能有效避免因温度、湿度或其它原因造成的 DNA 大分子链断裂或化学结构改变，同时，还有利于发生同源重组。研究表明，40-60 bp 的同源臂有助于基因敲除试验的进行<sup>[45]</sup>。

### 1.3.4 无痕基因操作方法

基因敲除过程中，由于抗生素抗性标记的存在，可能会存在一些负面影响，相关研究表明，无痕基因操作方法能有效降低重组菌株对抗性筛选标记的携带率，是目前研究特异基因型生物的有效手段。

基于线性 DNA 片段的基因敲除方法，通过一次同源重组替换目的基因后，使 DNA 元件整合到染色体中以取代靶基因，为去除抗性标记，需要再进行第二次同源重组。一般情况下，发生同源替换的可能性不高，而且离开适当的抗性标记或辅助质粒的帮助，重组菌株很难筛选成功，甚至不可能。在利用自杀质粒进行基因敲除时也出现类似情况，这种质粒不能进行自主复制，必须借助于染色体上的其它辅助质粒才能完成，自杀质粒需要经过两次同源重组替换，才能除去染色体上的抗性标记物以及质粒。在对 *Bacillus subtilis* 的研究中，研究者采用了无痕基因操作技术，并取得很大成效。虽然有所区别，但两种方法都是为了提高筛选重组菌株的可能性。

2002 年，Fabret 等人报告了由枯草芽孢杆菌 PCR 转导的无标记基因操作技术（图 1-1）。作者用 *upp* 作为反向筛选标记，利用 *upp* 基因编码尿嘧啶磷酸转移酶（UPRTase）<sup>[46]</sup>。要完成反向筛选，第一步是在培养基中加入 5-氟尿嘧啶（5-FU），该物质在 UPRTase 的作用下形成 5-F-UMP，再通过生物代谢作用转化为 5-F-dUMP。5-F-dUMP 能起到抑制细胞生长的作用。二是需要利用反向筛选基因，消灭菌株的活性。除需要两组同源臂、DNA 元件、抗性标记以及反向筛选标记外，还需引入两个正向重复（DR）于上下同源臂内。利用同源臂将 DNA 元件融合进菌株中，通过第一次重组，使菌株获得抗生素抗性，并确保染色体上存在 *upp*，增加菌株对 5-氟尿嘧啶（5-FU）的敏感性。为完成基因敲除，还要对获得的两个同源重组菌株进行筛选，让抗性物被标记，*upp* 表达盒和多余的 DR 从染色体上脱落。DR 是最初存在于染色体上的序列，因此所得的突变体不会像位点特异性重组一样在染色体上留下外来序列。这也是第一个报导 *upp* 在芽孢杆菌中的使用的研究。尽管这种线性片段转化方法不适用于其他物种，包括解淀粉芽孢杆菌，但是 *upp* 反向筛选标记已被广泛使用<sup>[47,48]</sup>。2006 年，Zhang 等人在枯草芽孢杆菌中引入了另一种类型的反向筛选标记毒性蛋白<sup>[49]</sup>。研究表明，大肠杆菌的 *mazF* 基因促进 RNA 干扰酶的表达，这种内源 RNA 的过表达激活细胞程序性死亡<sup>[50]</sup>。作者以 *mazF* 基因进行反向标记，引入的线性片段包含两组同源臂、两个正向重复序列以及标记基因三部分。首先通过两组同源臂将整个元件整合到染色体上。然后相邻 DR 序列间发生第二次重组，从而去除抗性标记。将 IPTG 表达 *mazF* 添加至筛选培养基以抑制未经历第二同源重组的菌株。Moeimoto 等继续使用 *mazF* 为反向筛选标记基因，但用到的 DNA 元件结构有所差异。Yu 等的研究与前人不同，他对线性元件中缺乏 IPTG 诱导型启动子的严格性进行了研究<sup>[51]</sup>。这些研究说明，大肠杆菌的载体构建受 *Pxyl*、*mazF* 等基因的影响，而且，*upp* 的使用频次高于 *mazF*。Liu 等研究出一种新型无标记基因敲除方法，该方法中用到的反向筛选标记基因为木糖启动子与抗生素抗性基因的结合体<sup>[52]</sup>，所获得的菌种具有新霉素抗性，上游同源臂的片段是 UP、下游是 DN，上下同源臂之间是 G，同时还有 *araR* 和氯霉素抗性基因。具体操作方法如下：首先使上下同源臂之间发生同源重组，形成 DNA 元件与染色体的结合体，因为 *araR* 的存在，

此时新霉素已经没有抗性。在基因敲除过程中，两个同源臂由于具有同源区域，存在发生基因重组的可能性，一旦发生同源重组，DNA 元件就会脱离染色体，从而实现基因的无痕消除。在这种状况下，要保持新霉素的抗性，可以用新霉素进行筛选。

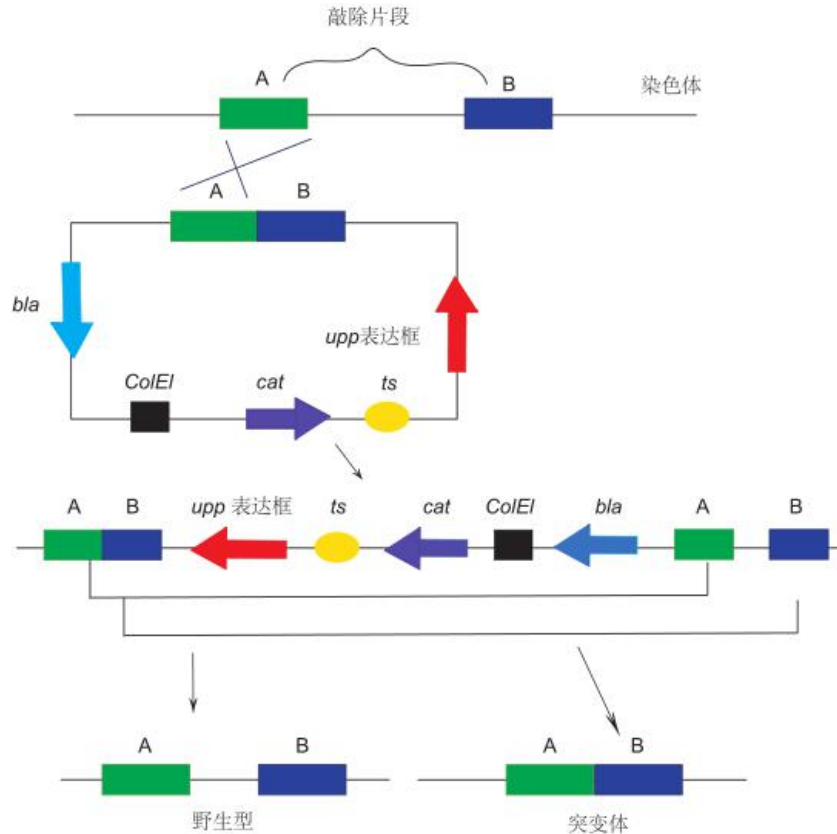


图 1-2 细菌中基于 *upp* 基因的无痕基因敲除方法原理图。

Figure 1-2 Schematic diagram of the method of non-trace gene knockout based on the *upp* gene in bacteria.

Yan 等在 2008 年将 *Cre/lox* 应用于枯草芽孢杆菌<sup>[53]</sup>。*Cre/lox* 最先由 Sternberg 等人提出，并被广泛用于新型基因打靶，属于特异性重组酶的一种，它以较高的重组效率，被广泛用于基因工程<sup>[54]</sup>。重组酶 Cre 可以在不借助其它辅助因子或蛋白质的情况下，使该重组酶系统的两个 *loxP* 位点发生特异性重组<sup>[55]</sup>，随着基因重组的发生，两个正向重复 *loxP* 位点之间的 DNA 序列可能会缺失，而反向重复的双位点间的 DNA 序列可能反向。当应用于基因敲除时，*loxP* 位点保留在最终突变体中。因此，当将突变连续引入同一菌株中时，两条染色体上剩下的 *loxP* 位点之间可能发生意外的重组。所以，作者在开展研究时，引入 *lox* 位点的两个突变位点，*lox71* 和 *lox66*，二者形成一个双突变的 *lox* 位点 *lox72*，这是 Cre 无法识别的，从而避免了由意外重组引起的染色体结构变化。通过 PCR 在体外构建用于敲除的 DNA 元件，包括上游和下游同源臂，抗性标记，*lox71* 以及 *lox66* 位

点。在诱导该片段转变为宿主细菌，并用相应的抗生素进行筛选后，该染色体上融入 *lox71* 以及 *lox66* 两个突变位点。然后，用辅助质粒 pTSC 催化 Cre 重组酶的表达，从而促进同源重组的发生，并完成抗生素敏感菌株的筛选，最后，通过改变温度消除辅助质粒。

Shi 等在对枯草芽孢杆菌的研究中，引入了 I-Sce I 核酸内切酶，并通过在染色体上整入外源 dsDNA，促进双链断裂的表达<sup>[56]</sup>，另外，作者还利用 *upp* 基因提高筛选效率。因为线性片段投入到枯草芽孢杆菌的研究中也是可行的。综上所述，基于线性片段的非标记敲除方法在基因组缩小中得到广泛使用。就目前来看，解淀粉芽孢杆菌还缺乏线性断裂方法的使用。Zakataeva 等<sup>[17]</sup>研究出一种基因无痕敲除方法，该方法主要针对温度敏感型质粒，即可在解淀粉芽孢杆菌菌株中进行无痕操作，而无需反向筛选标记。作者使用了一种源自 pG+ 的温度敏感质粒，该质粒与解淀粉芽孢杆菌菌株中的染色体分离，效率接近 100%。

## 1.4 研究目的及意义

近二十年来，对以枯草芽孢杆菌为代表的  $\gamma$ -PGA 生产菌株进行了大量的研究，已经取得很多阶段性成果，如高产菌株筛选、诱变和优化发酵工艺已经在一定程度上提高了  $\gamma$ -PGA 的发酵产率。然而  $\gamma$ -PGA 相对低的发酵产率和较高的价格仍然是制约其大规模工业化生产和在各个领域展开应用的瓶颈问题。

目前在研究和生产中使用芽孢杆菌的大多都是谷氨酸依赖型菌株，即需要在培养基中添加高浓度谷氨酸作为合成  $\gamma$ -聚谷氨酸的前体，这是推高  $\gamma$ -聚谷氨酸生产成本的重要因素之一。而另外一类菌株即谷氨酸非依赖性菌株，不需要在培养基中添加谷氨酸，菌体自身以糖类为原料以从头合成途径（*de novo pathway*）产生内源谷氨酸前体，实现了谷氨酸的合成过程与谷氨酸的聚合过程的生物集成，可有效降低生产成本，是一种极有前途的方法。但目前的已报道的几种谷氨酸非依赖性菌株  $\gamma$ -PGA 产率都较低，对这类菌株的研究和利用未能广泛展开。因此，如能通过代谢工程手段提高谷氨酸非依赖性菌株的发酵产率，将会最大程度挖掘出此类芽孢杆菌生物合成系统的潜力，开辟一条将生物质原料（糖类）转化为生物聚合物（ $\gamma$ -聚谷氨酸）的最有效途径。因此，本研究拟将 pKSV7 即温度敏感型质粒与 *upp* 反向筛选标记进行结合，在谷氨酸非依赖性菌株解淀粉芽孢杆菌 C10 中构建一个基因无痕替换方法，来完成基因敲除、插入等遗传操作，为解淀粉芽孢杆菌 C10 的代谢工程改造提供工具。

## 1.5 主要研究内容

### 1.5.1 解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta upp$ 基因敲除菌的构建

构建 pKSV7- $\Delta upp$  敲除载体, 优化在解淀粉芽孢杆菌 C10 中的电转化参数, 通过氯霉素、5-FU 及 PCR 筛选出解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta upp$  作为后续实验的初始菌株。

### 1.5.2 反向筛选质粒的构建及功能验证

从枯草芽孢杆菌 168 中克隆 *upp* 表达框, 构建反向筛选质粒 pKSV7-*upp*, 电转化解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta upp$  验证 *upp* 基因的回补是否恢复 C10 $\Delta upp$  对 5-FU 的敏感性。

### 1.5.3 解淀粉芽孢杆菌 C10 解淀粉酶基因的敲除

构建敲除载体 pKSU- $\Delta amyA$ , 筛选出突变菌株 C10 $\Delta upp\Delta amyA$ 。对突变菌株 C10 $\Delta upp\Delta amyA$  进行淀粉酶水解实验验证 *amyA* 基因的敲除, 从而来证实解淀粉芽孢杆菌 C10 中基因敲除体系是否成功建立。

### 1.5.4 解淀粉芽孢杆菌 C10 草酸脱羧酶基因的敲除及对 $\gamma$ -PGA 合成的影响

构建草酸脱羧酶基因敲除载体 pKSU- $\Delta oxdC$ , 电转化进入菌株 C10 $\Delta upp$  后, 筛选突变菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$ 。检测突变菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$  及初始菌株 C10 $\Delta upp$  的草酸脱羧酶的活性, 验证证实草酸脱羧酶基因的成功敲除。最后发酵验证草酸脱羧酶基因敲除后, 草酸的积累是否能够持续促进细胞内大量产生  $\gamma$ -PGA。

## 第二章 解淀粉芽孢杆菌 C10 *upp* 基因敲除菌的构建

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌株及质粒

解淀粉芽孢杆菌 C10 保存于生命科学学院发酵工程实验室，温度敏感型质粒 pKSV7 由南开大学生命科学学院宋存江教授惠赠。质粒图谱如图 2-1。

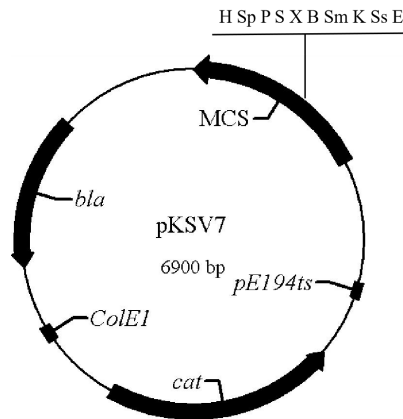


图 2-1 温度敏感型质粒 pKSV7。质粒具有一个芽孢杆菌的温度敏感型复制子 *pE194ts* 和大肠杆菌复制子 *ColE1*，使其能够穿梭在芽孢杆菌和大肠杆菌之间。*cat* 为氯霉素抗性基因，*bla* 为氨苄抗性基因。MCS 为多克隆位点，顺序按照从左到右，有 *Hind* III, *Sph* I, *Pst* I, *Sal* I, *Xba* I, *Bam* HI, *Sma* I, *Kpn* I, *Sst* I, *Eco* RI。

Figure 2-1 Temperature-sensitive plasmid Temperature-sensitive plasmid pKSV7. The plasmid has *E. coli* replicon *ColE1* and a temperature-sensitive replicon of *Bacillus*, which enables it to shuttle between *E. coli* and *Bacillus*. *bla*, an ampicillin resistance gene. *cat*, chloramphenicol resistance gene. The multiple cloning sites (MCS, in order from lift to right) are *Hind* III, *Sph* I, *Pst* I, *Sal* I, *Xba* I, *Bam* HI, *Sma* I, *Kpn* I, *Sst* I, *Eco* RI.

#### 2.1.2 实验试剂

Taq DNA 聚合酶、细菌基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒均购于北京天根生化科技有限公司、溶菌酶购于北京博奥拓达、DNA Marker III、DNA Marker 1kb 购于南京诺唯赞生物科技有限公司，pMD19-T simple、T4 DNA ligase、*Bam* HI 甲基转移酶、FastDigest *Bam* HI、FastDigest *Sal* I、FastDigest *Xba* I、FastDigest *Kpn* I、FastDigest *Eco* RI 均购于宝日医生物技术(北京)有限公司，二甲基亚砷(DMSO)购于上海阿拉丁试剂有限公司，琼脂糖、EDTA、Tris、聚乙二醇 6000 均购于北京索莱宝科技有限公司，其余试剂均为国产分析纯。

#### 2.1.3 引物序列(表 2-1)

表 2-1 本节所用引物及序列

Table 2-1 Primers and sequences used in this section

引物名称	引物序列
UppUP-F	CAGCGAATTCACGTCATCTCGAACGCGAAG
UppUP-R	GACCCGGAACGATCATACTGTGTTTCAGCTCC
UppDN-F	TGAACACAGTATGATCGTTCCGGGTCTCGGTG
UppDN-R	GCGCGGTACCCACAAATACATATCTCCGTTG
UppOUT-F	GAGGACATCGCCCGCGACC
UppOUT-R	GACAAAATCAACAATCCATTCCATG

#### 2.1.4 培养基及溶液

##### 2.1.4.1 培养基和缓冲液

LB培养基: NaCl 10g/L, 胰蛋白胨 10g/L, 酵母提取物 5g/L, 使用 5mol/L NaOH 进行调节 pH 至 7.0, 定容至 1L。固体 LB 培养基加入将 1.5%-2.5%琼脂粉, 高压蒸汽对溶液进行灭菌。

生长培养基: A 组分为葡萄糖 80g/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.04g/L; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.104g/L; CaCl<sub>2</sub> 0.11g/L。B 组分为蛋白胨 10g/L; NH<sub>4</sub>Cl 18g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L; 草酸钠 14.98g/L。A 组分和 B 组分单独灭菌后在超净工作台内混合。

复苏培养基: 酵母提取物 5g/L, 胰蛋白胨 10g/L, NaCl 10g/L, 山梨醇 0.5M, 甘露醇 0.38M, 定容至 1L, 使用高压蒸汽对溶液进行灭菌。

洗涤缓冲液: 山梨醇 0.5M, 甘露醇 0.5M, 纯甘油 10%, 使用高压蒸汽对溶液进行灭菌。

电泳缓冲液(50×TAE): Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 37.2 g/L, Tris242.0 g/L, 冰乙酸 57.1 mL, 室温保存。

##### 2.1.4.2 抗生素及试剂浓度

氨苄(Amp): 1 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 溶解 100 mg 氨苄, 溶解后使用 0.2 μm 纤维滤膜对其进行过滤除菌, 母液于-20℃避光保存。工作浓度为 100μg/mL。

氯霉素(Cm): 1mL 无水乙醇中溶解 34 mg 氯霉素, 在-20℃的避光条件下进行保存。工作浓度为 5μg/mL。

5-FU 母液: 1 mL DMSO 中溶解 75 mg 5-FU, 在-20℃的条件下进行保存。

## 2.1.5 实验设备

表 2-2 仪器名称及生产厂家

Table 2-2 The instrument name and manufacturer

仪器名称	生产厂家
电子分析天平	上海西艾爱电子有限公司
高压蒸汽灭菌锅	江阴滨江医疗设备厂
低温离心机	Eppendorf
加热制冷型金属浴	卡尤迪生物科技
烘干箱	上海精宏实验设备有限公司
电泳仪	北京市六一仪器厂
WFH-201B 紫外透射反射仪	上海精科实业有限公司
电热恒温振荡水槽	上海精宏实验设备有限公司
台式高速大容量离心机	赛默飞世尔科技公司
大容量恒温培养振荡器（摇床）	上海智城分析仪器制造有限公司
恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司
超净工作台	苏州净化设备有限公司
PCR 仪	Eppendorf

## 2.2 试验方法

### 2.2.1 菌株活化

在严格无菌操作的条件下，用接种环挑取-80℃保存的解淀粉芽孢杆菌 C10，在 LB 固体培养基平板上接种划线，放入 32℃条件下过夜倒置培养。*E. coli* DH5α、*E. coli* JM110 在 LB 平板上划线，于 37℃条件下过夜倒置培养。

### 2.2.2 确定解淀粉芽孢杆菌对 5-氟尿嘧啶(5-FU)耐受浓度

首先制备添加 5-FU 的 LB 琼脂平板，终浓度分别为 0.1 mM, 0.15 mM, 0.2 mM, 0.25 mM, 0.3 mM, 0.35 mM, 0.4 mM。为了排除 DMSO 对细菌生长的影响，同时配制对应浓度的 DMSO 平板。活化解淀粉芽孢杆菌 C10 菌株，挑单菌落于 LB 液体培养基中，180rpm，32℃过夜培养，将其稀释  $10^{-7}$  到  $10^{-9}$  倍，吸取 100μl 的稀释物涂布于 5-FU 及 DMSO 平板上。在温度为 32℃的条件下，过夜培养，对每个平板上的菌落数进行观察。计算存活率：5-FU 平板上的菌落数与 DMSO 平板上的菌落数之比。

### 2.2.3 解淀粉芽孢杆菌 C10 菌株基因组的提取

参考天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤。

## 2.2.4 *upp* 上、下游基因扩增及连接反应

### 2.2.4.1 *upp* 上、下游基因扩增

表 2-3 *upp* 上、下游基因反应体系

Table 2-3 The system of *upp* upstream and downstream gene reaction

Reagent	Volume
C10 DNA	1 $\mu$ l
UP-F、UP-R/DN-F、DN-R (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

上游扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min，变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 63 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 2min，反应 30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

下游扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min，变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 61 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 2min，反应 30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

将获得的上、下游同源臂进行切胶回收，以得到纯化的 UP 和 DN 为模板进行扩增。

表 2-4 *upp* 上、下游基因融合 PCR

Table 2-4 *Upp* upstream and downstream gene fusion PCR

Reagent	Volume
UP、DN	各 2 $\mu$ l
UP-F、DN-R (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min；变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 62 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 2min，30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

### 2.2.4.2 DNA 片段的回收

参考天根细菌DNA回收试剂盒的操作步骤。

### 2.2.4.3 制备 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* JM110 感受态

1. 将 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* JM110 菌种从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出，分别在 LB 固体平板培养基上划线，37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12-16h。

2. 用接种环从平板上分别蘸取一个单菌落接种于 30mL SOB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 180rpm 震荡 12-16h。

3. 按 1% 的接种量将过夜 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* JM110 菌液分别接种于含有

100mLSOB的 1L锥形瓶中, 37°C, 180rpm, 每隔 15-20min测定OD<sub>600</sub>, 至 OD<sub>600</sub>=0.3-0.4。

4. 每 50mL培养液转至无菌、冰预冷的聚丙烯管中, 冷却 10min。
5. 4100rpm, 4°C, 10min, 弃上清, 吸尽液体。
6. 将 30mL预冷的 0.1mol/LCaCl<sub>2</sub>-MgCl<sub>2</sub> 溶液加入到每 50mL初始培养液中, 重悬细胞沉淀。
7. 4100rpm, 4°C, 10min, 弃上清, 吸尽液体。
8. 将 2mL预冷的 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液加入每 50 mL初始培养液重悬。
9. 每 4mL重悬细胞加入 140μl DMSO, 轻旋混匀, 冰浴 15min。
10. 重复步骤 9。
11. 以每 100μl一管的规格迅速分装入无菌、预冷的EP管中, 写好名称和日期, -80°C保存。

#### 2.2.4.4 T 载体连接 *upp* 同源臂

将切胶回收后的 *upp* 同源臂融合片段与 T 载体连接, 反应体系如下。

表 2-5 *upp* 上、下游基因融合 PCR

Table 2-5 *Upp* upstream and downstream gene fusion PCR

Reagent	Volume
pMD19-T (50ng/μl)	1μl
<i>upp</i> 同源臂融合回收片段	4μl
Solution I	5μl
dd H <sub>2</sub> O	补足至 10μl

表 2-6 阳性对照

Table 2-6 Positive control

Reagent	Volume
pMD19-T (50ng/μl)	1μl
Control (50ng/μl)	1μl
Solution I	5μl
dd H <sub>2</sub> O	补足至 10μl

表 2-7 阴性对照

Table 2-7 Negative control

Reagent	Volume
pMD19-T (50ng/μl)	1μl
Solution I	5μl
dd H <sub>2</sub> O	补足至 10μl

1. 16°C, 45min (可适当延长)。
2. 10 $\mu$ l全量加入 100 $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态中, 20min冰浴。
3. 热激 42°C 90s, 勿摇动, 冰浴 2min。
4. 加 900 $\mu$ l SOC培养基, 最低转速 54rpm, 45min。
5. 每 200 $\mu$ l涂于避光晾干的X-Gal、IPTG的Amp LB平板上。
6. 32°C倒置过夜培养 12-16h。
7. 计数白色、蓝色菌落。
8. 对白色菌落进行挑选, 利用PCR检测确认载体中插入片段的长度大小。

#### 2.2.4.5 菌落 PCR

无菌操作下, 向 200 $\mu$ l EP 管中加入 10 $\mu$ l 灭菌蒸馏水, 用灭菌的小枪头蘸取转化平板上 10 个单菌落在无菌蒸馏水中轻轻抖动作为模板。

表 2-8 菌落 PCR

Table 2-8 Colony PCR

Reagent	Volume
模板	10 $\mu$ l
UP-F、DN-R (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

扩增条件为: 预变性 94°C 5min; 变性 94°C 30s, 退火 60°C 30s, 延伸 72°C 2min, 30 个循环后, 72°C延伸 10min。

#### 2.2.4.6 质粒 DNA 的提取

参考天根细菌质粒 DNA 提取试剂盒的操作步骤。

#### 2.2.5 *upp* 片段与温敏型质粒 pKSV7 连接

以温敏型质粒pKSV7 和T-*upp*载体为模板同时进行酶切。

表 2-9 酶切体系

Table 2-9 Digestion system

Reagent	Volume
模板	6 $\mu$ l
10 $\times$ M Buffer	2 $\mu$ l
<i>Kpn</i> I	1 $\mu$ l
<i>EcoR</i> I	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

37°C金属浴温育 3h。酶切后回收纯化pKSV7 线性质粒与 $upp$ 片段，再将 $upp$ 片段与线性温敏质粒pKSV7 连接，16°C金属浴温育过夜。

表 2-10  $upp$  片段与 pKSV7 连接体系Table 2-10  $Upp$  fragment and pKSV7 connection system

Reagent	Volume
pKSV7	2 $\mu$ l
$upp$ 回收片段	4 $\mu$ l
10 $\times$ ligation buffer	2 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

在无菌操作下，将过夜连接的产物pKSV7- $\Delta upp$ 转化进入*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态，提质粒酶切验证。为消除*E. coli* DH5 $\alpha$ 菌株对酶切位点的甲基化影响，利用甲基化酶缺失的*E. coli* JM110 受体细胞进行DNA的制备，由于其Dam和Dcm甲基化酶已敲除，从这些细胞中提取的DNA就能被*Xba* I酶切。将重组质粒pKSV7- $\Delta upp$ 再次转化入*E. coli* JM110 感受态中，再次进行质粒提取备用。

### 2.2.6 利用 *Bam*H I 甲基转移酶进行甲基化处理

表 2-11 甲基化处理体系

Table 2-11 Methylation treatment system

Reagent	Volume
pKSV7- $\Delta upp$	20 $\mu$ l
10 $\times$ <i>Bam</i> H I Buffer	10 $\mu$ l
<i>Bam</i> H I甲基转移酶	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 100 $\mu$ L

37°C处理 1h，80°C，5min。

### 2.2.7 解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态及电转化条件摸索<sup>[57]</sup>

1. 解淀粉芽孢杆菌C10 感受态生长期：OD<sub>600</sub> 为 3.5-4.5。
2. 电场强度：1800-2500 V。
3. 重悬缓冲液：MSG缓冲液（0.5 M山梨醇，0.5 M甘露醇和 10%甘油），MKK缓冲液（0.5 mM MgCl<sub>2</sub>，每升水 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH 7.2），SMKK缓冲液（每升水 272 mM蔗糖，0.5mM MgCl<sub>2</sub>，0.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH7.2），TSM缓冲液（每升水 0.5M海藻糖，0.5 M山梨糖醇和 0.5 M甘露醇）

### 2.2.8 解淀粉芽孢杆菌C10 感受态制备

1. 将实验室保存的解淀粉芽孢杆菌C10 菌株在LB平板上划线，蘸取单菌落于该液体培养基内，32℃ 180rpm过夜培养。

2. 以 10%接种量转接至 30 mL生长培养基的三角瓶中，32 °C振荡培养至  $OD_{600}=3.5-4.5$ ，以 0.1 为梯度进行取样。

3. 6000g 4 °C 20 min离心，除尽上清。

4. 用洗涤缓冲液将菌体重悬。

5. 6000 g 4 °C 10 min离心，除尽上清。

6. 重复步骤 4 和 5 两次。

7. 用重悬缓冲液将洗涤后的菌体进行重悬，每 100 $\mu$ l分装成一管，-80℃保存。

### 2.2.9 解淀粉芽孢杆菌C10 电转化

先处理电转杯：使用 75%酒精对电转杯进行清洗，对其进行 20min以上的紫外灭菌，将其和枪头放在冰上预冷。取 100 $\mu$ l解淀粉芽孢杆菌C10 感受态细胞和 4 $\mu$ l预处理甲基化的pKSV7- $\Delta$ upp质粒加入电转杯，冰上静置 2min。电击后立刻加入复苏培养基 900 $\mu$ l，180rpm 32℃复苏 3h，涂布含Cm的LB平板。

### 2.2.10 筛选 C10 $\Delta$ upp 初始菌株

首先，将获得的转化子在含有氯霉素的LB液体培养基中在 30℃下过夜培养。然后将 10 $\mu$ l过夜菌液转接到含有氯霉素的LB液体培养基中，并在 42℃，180rpm下培养 12 h。将溶液稀释  $10^3$  倍后，在LB平板上（含氯霉素）进行涂布，在温度为 42℃的条件下，对其进行过夜培养。理论上，LB平板上生长的菌落就是单交换菌株。挑取单交换菌落接种到LB液体中（含氯霉素），然后对其进行 42℃ 12h的培养，然后将 10 $\mu$ l细菌溶液吸到不含氯霉素的LB液体培养基中，在 42℃传代培养 24 h，每 12 h转移一次。继代培养后，将培养物稀释  $10^{-3}$  至  $10^{-5}$  倍，并涂布 5-FU的LB固体平板。在 42℃下孵育 12 小时后，菌落开始生长。使用引物 UppOUT-F/UppOUT-R检测这些菌落。

### 2.2.11 生长曲线的确定

将从-80℃下冰箱中取出的待测菌株接种在LB平板上活化。当单个菌落生长时，挑单菌落于LB液体培养基中，32℃，180rpm培养 12h，测其 $OD_{600}$ 。按 10%的接种量将其接种到装有 100 mL液体LB的 500 mL锥形瓶中震荡培养。定期取出 1 mL细菌溶液，测量其 $OD_{600}$ 值，绘制生长曲线，OD值为纵坐标，横坐标为培养时间。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 解淀粉芽孢杆菌 C10 对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 耐受浓度的确定

如图 2-1 所示, 解淀粉芽孢杆菌 C10 对 5-FU 具有敏感性。C10 细胞的存活率, 随着 5-FU 浓度的增加, 逐步降低, 直至存活率为 0。这时 0.35mM 的 5-FU 就可作为后续筛选时的工作浓度。

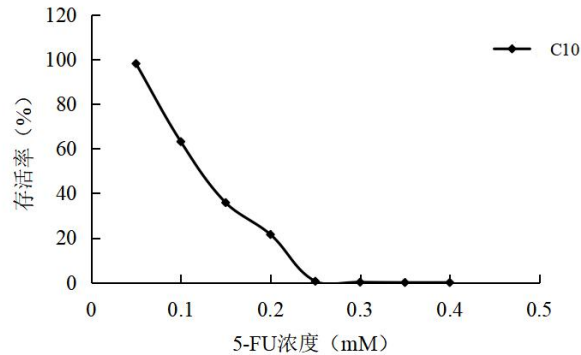


图 2-1 解淀粉芽孢杆菌 C10 耐受 5-FU 实验, 实验结果是三个生物学重复的平均值, 标准偏差小于 10%。

Figure 2-1 5-FU tolerance test of *Bacillus amyloliquefaciens* C10, The experimental result is the average of three biological replicates with a standard deviation of less than 10%.

### 2.3.2 *upp* 上下游同源臂基因扩增

要将 *upp* 用作反向筛选标记, 首先需要构建一个缺失 *upp* 基因的菌株。使用引物对 UppUP-F/UppUP-R 和 UppDN-F/UppDN-R 分别扩增 *upp* 基因上游和下游约 500 bp 的 DNA 片段。在融合 PCR 中, 使用引物对 UppUP-F/ UppDN-R 将上游和下游同源臂融合在一起。结果如图 2-2 所示。条带大小为 1100bp 左右, 即为上下游同源臂融合成功。

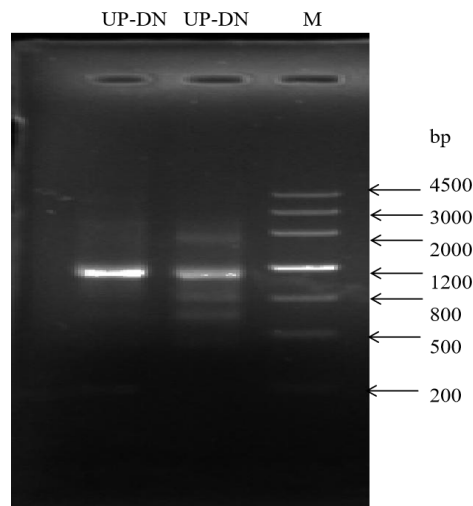


图 2-2 *upp* 基因 UP-DN 上下游同源臂融合电泳图。

Figure 2-2 *Upp* gene UP-DN upstream and downstream homologous arm fusion electrophoresis map.

### 2.3.3 pKSV7- $\Delta upp$ 载体的构建

构建流程图如图 2-3 所示。pMD19-T simple 载体与同源臂进行连接，对其进行酶切、测序验证后，将其与 pKSV7 的 *Kpn* I 和 *Eco*R I 的酶切位点进行连接，最后构成质粒 pKSV7- $\Delta upp$ 。将质粒 pKSV7- $\Delta upp$  转化 *E. coli* JM110，然后对质粒进行提取，用 *Bam*H I 甲基转移酶进行甲基化处理，为下面的电转化做好准备。结果如图 2-4 所示构建的 pKSV7- $\Delta upp$  载体经酶切得到约 7000bp 和 1100bp 的条带，经过测序确认载体构建成功。

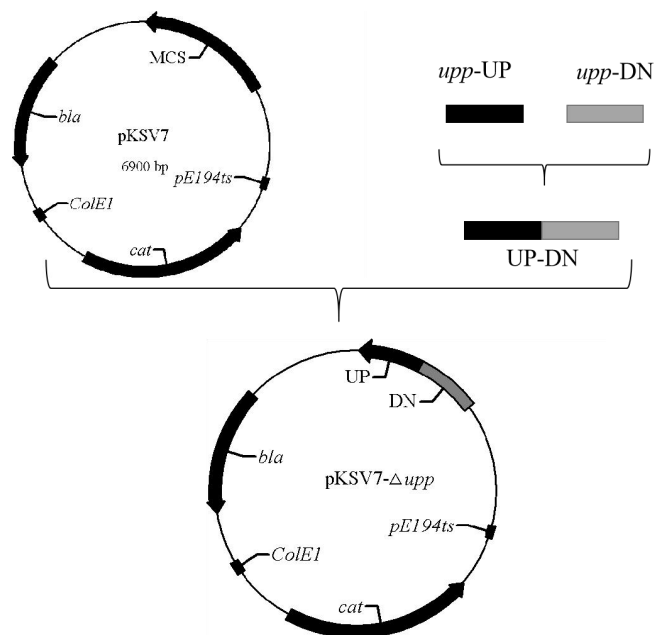
图 2-3 载体 pKSV7- $\Delta upp$  构建流程图。

Figure 2-3 Construction flow chart of vector pKSV7- $\Delta upp$ .

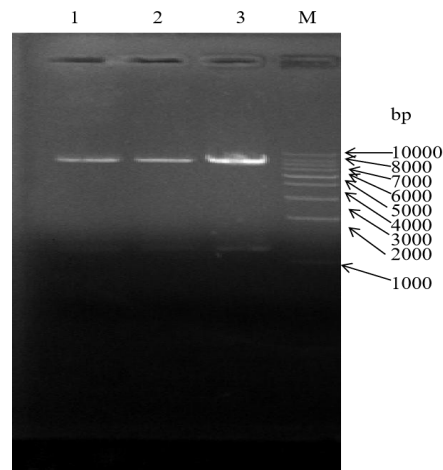


图 2-4 pKSV7- $\Delta upp$  载体酶切图，泳道 1、2、3 均为 pKSV7- $\Delta upp$  质粒。

Figure 2-4 pKSV7- $\Delta upp$  vector digestion map. Lanes 1, 2, and 3 are all pKSV7- $\Delta upp$  plasmids.

### 2.3.4 pKSV7- $\Delta upp$ 载体电转化解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态细胞

#### 2.3.4.1 解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态电转化条件建立

经过对解淀粉芽孢杆菌C10 生长期，电转化的电场强度和重悬缓冲液的摸索，得到电转化最优条件为OD<sub>600</sub>=4.2，重悬感受态细胞使用MSG缓冲液，电转化时预设电压 2200V，电击时间 5ms。

#### 2.3.4.2 解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta upp$ 菌株的筛选

pKSV7- $\Delta upp$ 敲除质粒电转化进入解淀粉芽孢杆菌C10 后经过氯霉素、5-FU 及引物UppOUT-F/UppOUT-R的筛选，得到解淀粉芽孢杆菌C10 $\Delta upp$ 菌株。分析图 2-5 可知，野生型的C10 可以获得片段约 1800bp，因 $upp$ 阅读框的缺少，突变株只获得约 1200bp的片段。对该片段的进一步DNA测序证明，成功敲除了 $upp$  基因。命名为解淀粉芽孢杆菌C10 $\Delta upp$ ，作为随后敲除的初始菌株。

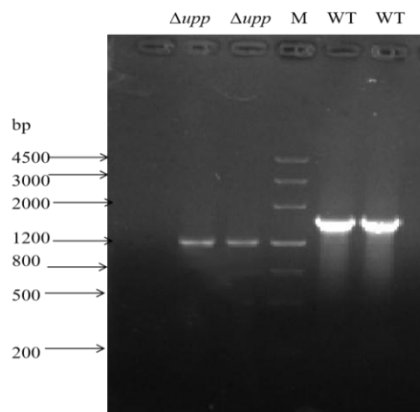


图 2-5  $upp$  基因敲除 PCR 验证的电泳图。泳道 WT 的模板为野生型染色体 DNA，泳道 $\Delta upp$  的模板为突变株染色体 DNA，引物是 UppOUT-R 和 UppOUT-F。由于突变株中缺失  $upp$  基因,泳道 $\Delta upp$  中的 PCR 片段比野生型的要短。

Figure 2-5  $upp$  gene knockout PCR verification electrophoresis. Lane  $\Delta upp$  uses mutant chromosomal DNA as a template, and lane WT uses wild-type chromosomal DNA as a template.

The primers are UppOUT-F and UppOUT-R. Due to the deletion of the  $upp$  gene in the mutant strain, the PCR fragment in lane  $\Delta upp$  is shorter than the wild type.

### 2.3.5 $upp$ 基因缺失对菌株生长能力的影响

为了 $upp$ 基因敲除后不影响菌株的生长，也不影响后续实验，这样才能将突变菌株C10 $\Delta upp$ 作为随后敲除的初始菌株进行下一步的分子改造。为了鉴定 $upp$  基因敲除后的生长状况，对上述实验获得的 $upp$ 基因敲除菌株C10 $\Delta upp$ 菌株和原始菌株C10 进行了生长曲线测定。结果如图 2-6。在LB培养基中，C10 和C10 $\Delta upp$

在最初的 40 h 里表现出了极其相似的生长情况, 40h 以后 C10 较突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* 有轻微的优势。综上说明, *upp* 基因的缺失对菌株生长速率没有影响。因此可以利用 *upp* 基因作为反向筛选标记基因对解淀粉芽孢杆菌进行遗传学改造。

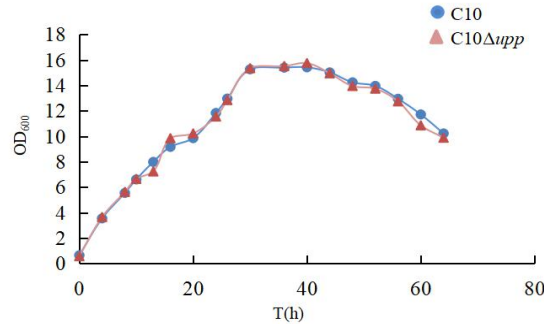


图 2-6 C10 $\Delta$ *upp* 菌株和野生菌株 C10 生长情况比较。

Figure 2-6 Comparison of growth of C10 $\Delta$ *upp* strain and wild strain C10.

### 2.3.6 讨论

本试验构建了 *upp* 上下游同源臂, 与温敏型质粒 pKSV7 连接, 得到敲除载体的 pKSV7- $\Delta$ *upp* 载体经酶切得到约 7000bp 和 1100bp 的条带, 经过测序确认载体构建成功。得到的 pKSV7- $\Delta$ *upp* 质粒需要先转化进入 *E. coli* JM110 感受态, 再次提取的质粒才能被 *Xba* I 限制性内切酶酶切。因为大多数大肠杆菌菌株中含有 Dam 甲基化酶和 Dcm 甲基化酶, 前者可以在 GATC 序列中腺嘌呤 N-6 位上引入甲基, 后者在 CCA/TGC 序列的第一个胞嘧啶 C-5 位置上引入甲基。常用的菌株都会产生 Dam 和 Dcm 甲基化酶, 从而受到甲基化的影响。部分限制性内切酶对甲基化的 DNA 不能切割, 如 *Xba* I。而要解除这种限制修饰作用可以利用甲基化酶缺失的受体细胞进行 DNA 的制备, 如 *E. coli* JM110, 其 *dam*, *dcm* 甲基化酶基因已敲除, 从中提取的质粒就不受甲基化的影响。从 *E. coli* JM110 中提取的 pKSV7- $\Delta$ *upp* 质粒经过 *Bam*H I 甲基转移酶甲基化处理后, 电转化进入解淀粉芽孢杆菌 C10, 转化子经过氯霉素、5-FU 及 PCR 的筛选, 得到解淀粉芽孢杆菌 C10- $\Delta$ *upp* 菌株。经过 *upp* 基因敲除菌株 C10 $\Delta$ *upp* 菌株和原始菌株 C10 进行了生长曲线测定, 发现 *upp* 基因的缺失对菌株生长速率没有影响。因此可以利用 *upp* 基因作为反向筛选标记基因对解淀粉芽孢杆菌进行遗传学改造。

本实验中通过对解淀粉芽孢杆菌 C10 感受态细胞生长期、电转化电场强度、重悬缓冲液的条件摸索, 得到电转化最优条件为 OD<sub>600</sub>=4.2, 重悬感受态细胞使用 MSG 缓冲液, 电转化时预设电压 2200V, 电击时间 5ms。

由于解淀粉芽孢杆菌菌株具有巨大的工业价值, 研究者对其遗传操作方法的需求越来越强。遗憾的是, 解淀粉芽孢杆菌的遗传操作通常受限于转化这一步骤。

与其近亲枯草芽孢杆菌相比，解淀粉芽孢杆菌菌株在转化方法上有较大劣势：一是解淀粉芽孢杆菌无法形成天然感受态；二是解淀粉芽孢杆菌菌株的转化效率很低，甚至无法完成转化。解淀粉芽孢杆菌是革兰氏阳性菌，细胞壁较厚，外源质粒不易通过电击造成的极小孔洞，此外，模式菌株在表达载体构建时的参数未必能够符合野生菌株载体构建的要求，且转化参数也严重制约着转化效果。张智<sup>[58]</sup>等为了将DNA高效导入枯草芽孢杆菌ZK中，优化了七个电穿孔条件。在最佳条件下，电穿孔效率提高到  $1.03 \times 10^7$  个转化子/ $\mu\text{gDNA}$ ，电穿孔效率提高了约 10,000 倍。Duitman等<sup>[59]</sup>在枯草芽孢杆菌体ATCC6633 内诱导表达*comK*基因，与野生型相比,转化效率提高了 100 倍。优化在解淀粉芽孢杆菌C10 中的电转化参数，虽然只得到数个转化子，但是从最开始的没有转化子到能将外源DNA转入解淀粉芽孢杆菌中，目前的转化条件为之后的电转化奠定了基础。

### 第三章 构建 pKSV7-*upp* 反向筛选质粒及功能验证

#### 3.1 实验材料

##### 3.1.1 菌株及质粒

枯草芽孢杆菌 168、解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp*，温度敏感型质粒 pKSV7。

##### 3.1.2 实验试剂

见 2.1.2。

##### 3.1.3 引物序列（表 3-1）

表 3-1 本节所用引物及序列

Table 3-1 Primers and sequences used in this section

引物名称	引物序列
Upp-F	ACAGGTACCGATCCTAAAACCCGCTTG
Upp-R	TGAGGATCCTTATTTTGTTCCAAACATGCGGTC

##### 3.1.4 培养基及溶液

###### 3.1.4.1 培养基和缓冲液

见 2.1.4.1。

###### 3.1.4.2 抗生素及试剂浓度

见 2.1.4.2。

##### 3.1.5 实验设备

见 2.1.5。

#### 3.2 试验方法

##### 3.2.1 菌株活化

将从-80℃取出的枯草芽孢杆菌 168，在 LB 固体培养基平板上接种划线，于 37℃条件下培养。

将从-80℃取出的解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp*，在 LB 固体培养基平板上接种划线，于 32℃条件下培养。

##### 3.2.2 反向筛选质粒 PKSU 的构建

表 3-2 *upp* 表达框的扩增Table 3-2 Amplification of *upp* expression frames

Reagent	Volume
<i>B.subtilis</i> 168 DNA	1 $\mu$ l
Upp-F 和 Upp-R (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min；变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 62 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 1min，30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

将得到纯化 $upp$ 阅读框及上游启动子和下游终止子片段与pMD19-T载体连接，经蓝白斑筛选得到T- $uppE$ ，测序后对pKSV7 及T- $uppE$ 均进行Bam HI和Kpn I 酶切。

表 3-3 酶切体系

Table 3-3 Digestion system

Reagent	Volume
模板	5 $\mu$ l
10 $\times$ M Buffer	2 $\mu$ l
<i>Kpn</i> I	1 $\mu$ l
<i>Bam</i> H I	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

37 $^{\circ}$ C金属浴温育 3h。酶切后回收纯化 pKSV7 线性质粒与  $uppE$  片段，再将  $uppE$  片段与线性温敏质粒 pKSV7 连接，16 $^{\circ}$ C金属浴温育过夜。连接后转化 JM100 提取质粒。

表 3-4 连接体系

Table 3-4 Connection system

Reagent	Volume
pKSV7	2 $\mu$ l
$uppE$ 回收片段	4 $\mu$ l
10 $\times$ ligation buffer	2 $\mu$ l
T <sub>4</sub> DNA Ligase	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

### 3.2.3 反向筛选质粒 pKSU 功能验证

将pKSU转化至解淀粉芽孢杆菌C10 $\Delta$ *upp*以获得突变菌株C10 $\Delta$ *upp* (pKSU)。C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) 在含有氯霉素的LB液体培养基中 32°C下过夜培养。将过夜菌液稀释 10<sup>3</sup> 倍后, 涂布于添加 0.35mM 5-FU的LB平板, 观察C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) 对 5-FU的敏感性。用C10 $\Delta$ *upp*作为对照组。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 反向筛选质粒pKSU载体的构建

由于解淀粉芽孢杆菌C10的*upp*基因与枯草芽孢杆菌 168 的相似性较高, 而枯草芽孢杆菌 168 的上下游调节序列和*upp*阅读框已经得到相关报道<sup>[60]</sup>。于是在枯草芽孢杆菌 168 中, 直接利用引物Upp-F和Upp-R对启动子以及*upp*阅读框进行克隆, 经*Bam* HI和*Kpn* I酶切后连接 pKSV7, 得到反向筛选质粒pKSU(图 3-1)。pKSU酶切验证电泳图如图 3-2 所示。

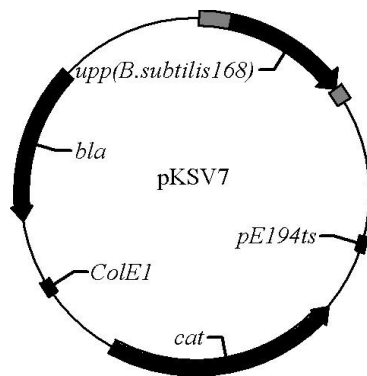


图 3-1 反向筛选质粒 pKSU。

Figure 3-1 Reverse screening of plasmid pKSU.

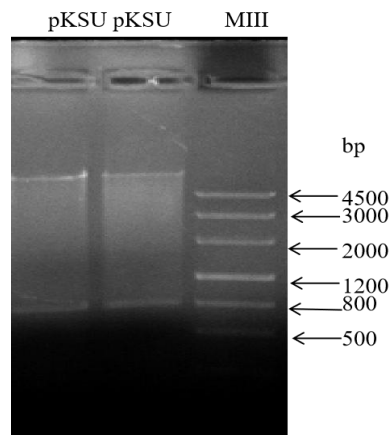


图 3-2 pKSU 酶切验证电泳图。M 代表 DNA marker III。

Figure 3-2 pKSU digestion electrophoresis. M stands for DNA marker III.

### 3.3.2 反向筛选质粒 pKSU 功能验证

结果如图 3-3 所示, pKSU 的回补恢复了突变菌株  $C10\Delta upp$  (pKSU) 对 5-FU 的敏感性, 而 5-FU 对  $C10\Delta upp$  没有影响。实验结果显示, 在解淀粉芽孢杆菌 C10 中, *upp* 基因可以将外源 5-FU 转化为毒性物质, 表明作为一种反向筛选标记的 *upp* 可以在解淀粉芽孢杆菌 C10 中应用。

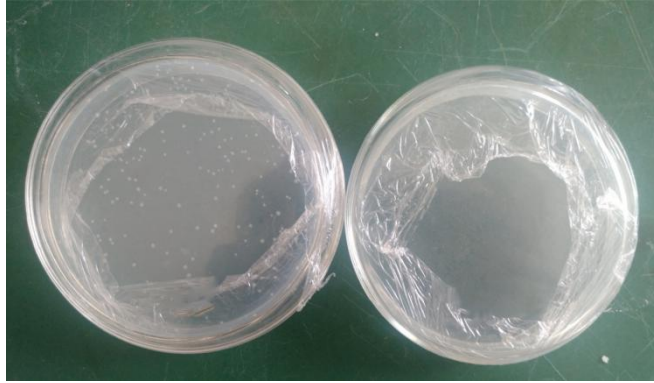


图 3-3 pKSU 对 *upp* 敲除菌株进行回补。左:  $C10\Delta upp$ , 右:  $C10\Delta upp$  (pKSU)。

Figure 3-3 pKSU complements *upp* knockout strains. Left:  $C10\Delta upp$ , right:  $C10\Delta upp$  (pKSU) .

### 3.3.3 讨论

通过构建含有 *upp* 基因的 pKSV7 载体, 再一次将含有 *upp* 表达盒的反向筛选质粒 pKSU 通过电转化导入解淀粉芽孢杆菌  $C10\Delta upp$ 。将重新导入 *upp* 基因的突变菌株  $C10\Delta upp$  (pKSU) 和突变菌株  $C10\Delta upp$  在 0.35mM 的 5-FU 的平板上涂布, 在 5-FU 平板上, pKSU 即  $C10\Delta upp$  不能正常生长, 说明 5-FU 的敏感性在 *upp* 基因回补菌株的情况下又得到恢复, 因此, 在解淀粉芽孢杆菌遗传改造中, *upp* 基因作为反向标记基因可以应用于实际操作。

## 第四章 $\alpha$ -淀粉酶基因 *amyA* 的敲除

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 菌株及质粒

解淀粉芽孢杆菌 C10、解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp*，质粒 pKSU。

#### 4.1.2 实验试剂

见 2.1.2。

#### 4.1.3 引物序列（表 4-1）

表 4-1 本节所用引物及序列

Table 4-1 Primers and sequences used in this section

引物名称	引物序列
AmyUP-F	GCGCTCTAGAGCCTGAAATTA AAAAGCTGGC
AmyUP-R	ACATAAATGGAGACCACAAGTCTGAACGAAAC
AmyDN-F	CGTTCAGACTTGTGGTCTCCATTTATGTTTCAG
AmyDN-R	CGAGTCTAGATTGTTGAAGGCAAATATCTG
AmyOUT-F	TCTCAGCGGAAAAAGAATCATC
AmyOUT-R	GCTTATTTTCGACCAGCTGATTC

#### 4.1.4 培养基及溶液

##### 4.1.4.1 培养基和缓冲液

见 2.1.4.2。

##### 4.1.4.2 抗生素及试剂浓度

见 2.1.4.2。

#### 4.1.5 实验设备

见 2.1.5。

### 4.2 试验方法

#### 4.2.1 菌株活化

见 3.2.1。

#### 4.2.2 敲除载体 pKSU- $\Delta$ *amyA* 构建

表 4-2 *amyA* 基因上、下游同源臂扩增体系Table 4-2 *amyA* gene upstream and downstream homology arm amplification system

Reagent	Volume
C10 DNA	1 $\mu$ l
AmyUP-F、AmyUP-R/ AmyDN-F、 AmyDN-R (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

上游扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min，变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 61 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 1min，反应 30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

下游扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min，变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 63 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 1min，反应 30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。将获得的上、下游同源臂进行切胶回收，以纯化得到的 *amyA*-UP 和 *amyA*-DN 为模板进行扩增。

表 4-3 *amyA* 上、下游基因融合 PCRTable 4-3 *amyA* upstream and downstream gene fusion PCR

Reagent	Volume
模板	各 2 $\mu$ l
AmyUP-F、AmyDN-R (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min；变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 63 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 2min，30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

将纯化得到的 *amyA* 上下游同源臂融合片段与 pMD19-T 载体连接，经蓝白斑筛选得到 T-*amyA*，测序后对 pKSU 及 T-*amyA* 均进行 *Xba* I 单酶切。

表 4-4 酶切体系

Table 4-4 Digestion system

Reagent	Volume
模板	6 $\mu$ l
10 $\times$ M Buffer	2 $\mu$ l
<i>Xba</i> I	1 $\mu$ l
0.1%BSA	2 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

37°C金属浴温育 3h。酶切后回收纯化pKSU线性质粒与*amyA*片段，再将这两个片段连接，16°C金属浴温育过夜。

表 4-5 *amyA* 片段与 pKSU 连接体系

Table 4-5 *amyA* fragment and pKSU connection system

Reagent	Volume
pKSU	2 $\mu$ l
<i>amyA</i> 回收片段	4 $\mu$ l
10 $\times$ ligation buffer	2 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

连接后转化JM100 提取质粒。对长出的单菌落进行PCR及酶切验证，随后经测序后得到敲除载体 pKSU- $\Delta$ *amyA*。将敲除载体经过第二章优化的电转化条件转入解淀粉芽孢杆菌C10 $\Delta$ *upp*中，进行敲除。

#### 4.2.3 $\alpha$ -淀粉酶基因 *amyA* 的敲除

见 2.2.10。

#### 4.2.4 淀粉水解实验

分析淀粉水解实验结果，对 *amyA* 基因的敲除进行确定。将 10 $\mu$ l C10 $\Delta$ *upp* 和 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* 细菌（过夜培养）滴加到装有淀粉培养基（添加 2%可溶性淀粉的 LB）的牛津杯中，并在 37°C 下培养 24 小时。用移液管吸收 1mL 碘液，在培养基表面，将其均匀地滴在上面，并对菌落周围进行观察，是否有水解环。

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 敲除载体 pKSU- $\Delta$ *amyA* 的构建

以解淀粉芽孢杆菌 C10 基因组 DNA 为模板，用引物对 AmyUP-F、AmyUP-R、AmyDN-F、AmyDN-R 对 *amyA* 基因上、下游序列进行扩增。使用 *Xba* I 对同源臂用进行单酶切，并与 *Xba* I 酶切回收的 pKSU 进行连接，最后形成 pKSU- $\Delta$ *amyA* 敲除载体，如图 4-1 所示。对其进行酶切验证，得到 pKSU 载体约 8000bp 和 *amyA* 片段 1100bp 两条条带，说明 pKSU- $\Delta$ *amyA* 载体构建成功。结果如图 4-2 所示。

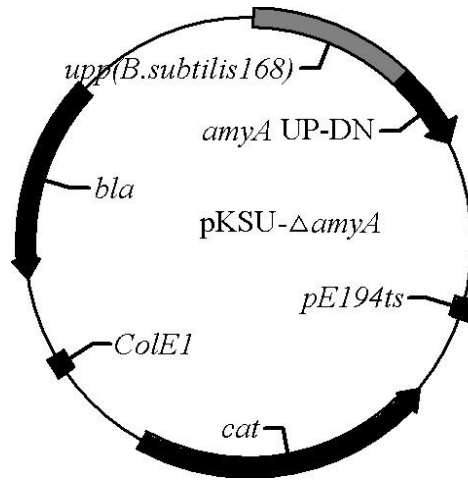


图 4-1 敲除载体 pKSU- $\Delta amyA$  的构建。

Figure 4-1 Knock out carrier pKSU- $\Delta amyA$  build.

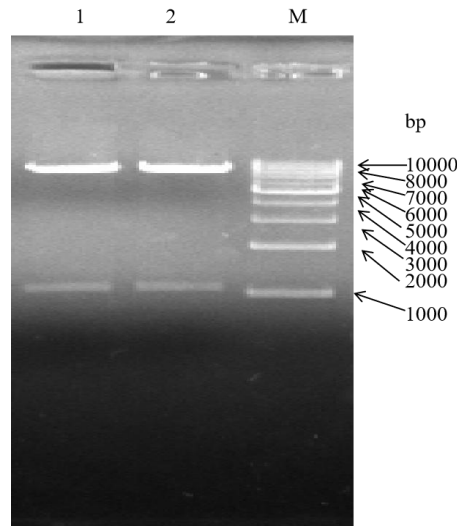


图 4-2 敲除载体 pKSU- $\Delta amyA$  酶切验证图谱。泳道 1,2 均为 pKSU- $\Delta amyA$ , M: DNA 1kb marker。

Figure 4-2 The digestion verification map of the knockout vector pKSU- $\Delta amyA$ . Lanes 1 and 2 are pKSU- $\Delta amyA$ , M: DNA 1kb marker.

#### 4.3.2 菌株 C10 $\Delta upp\Delta amyA$ 的筛选

pKSU- $\Delta amyA$  质粒电转化进入解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta upp$ , 经过氯霉素、5-FU 的筛选后, 用引物 AmyOUT-R 和 AmyOUT-F 的区分初始菌株 C10 $\Delta upp$  和敲除菌株。使用敲除菌株的染色体 DNA 作为模板, 通过 PCR 扩增可获得约 1200bp 的片段, 而初始菌株可获得约 2500bp 的片段, 如图 4-3 所示。将 PCR 阳性菌株在 LB 固体平板上划线。挑出单个菌落, 然后使用引物 AmyOUT-R 和 AmyOUT-F 对其进一步的验证。确认无误后测定此片段的序列。测序结果显示, 已经成功敲

除 *amyA* 基因，*C10ΔuppΔamyA* 即为所敲除菌株。

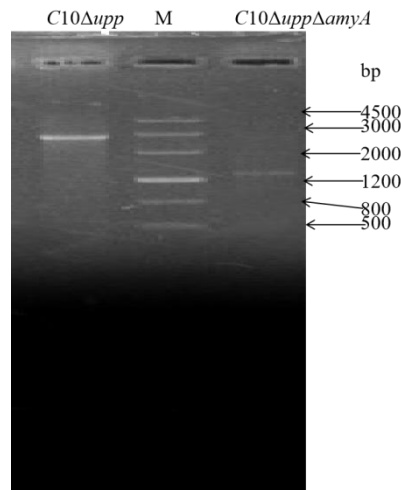


图 4-3 *amyA* 因敲除菌株 PCR 检测电泳图，M: DNA marker III。

Figure 4-3 PCR electrophoresis of *amyA* due to the knockout strain, M: DNA marker III.

#### 4.3.3 淀粉水解实验

为了进一步证实 *amyA* 基因的敲除，将过夜培养的 10 $\mu$ l *C10Δupp* 和 *C10ΔuppΔamyA* 菌液滴加到含有 2% 可溶性淀粉培养基的牛津杯中，并在 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 小时。用移液管吸 1mL 碘液，将其均匀地滴在在培养基表面，对菌落周围进行观察，看是否有水解环。由图 4-4 可知，在没有 $\alpha$ -淀粉酶的情况下，*C10ΔuppΔamyA* 不能形成水解环。在具有淀粉酶的条件下，*C10Δupp* 能够形成明显的水解环。因此，敲除菌株 *C10ΔuppΔamyA* 的成功构建，表明在温度敏感质粒和 *upp* 的基础上，使用无痕基因敲除方法具有可行性。

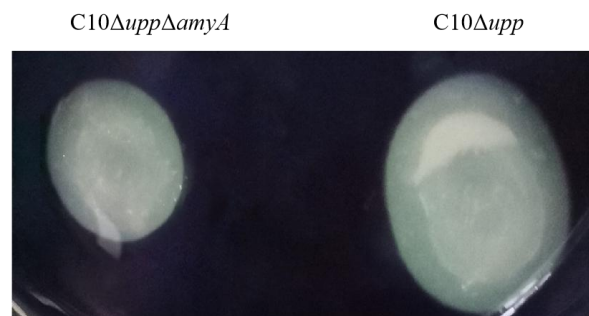


图 4-4 *amyA* 突变株（左）和野生型菌株（右）的淀粉水解实验。

Figure 4-4 Starch hydrolysis experiments of *amyA* mutant (left) and wild-type strains (right).

#### 4.3.4 讨论

在上一章验证了 *upp* 基因的回补能恢复突变菌株 *C10Δupp* 对 5-FU 的敏感性，证实了 *upp* 基因能够作为解淀粉芽孢杆菌的反向筛选标记。本章通过用传统方法构建敲除载体 pKSU- $\Delta amyA$ ，经过电转化进入突变菌株 *C10Δupp*，转化子经

过氯霉素与 5-FU 敏感性检测，引物对 AmyOUT-F/AmyOUT-R 对初始菌株 C10 $\Delta$ *upp* 和突变体进行 PCR 检测后，得到突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA*。后续为了证实敲除 *amy* 基因发挥其作用，对突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* 进行了淀粉酶水解实验。实验结果显示，突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* 由于 $\alpha$ -淀粉酶基因的缺失，不能形成水解圈。实验的成功证了解淀粉芽孢杆菌 C10 中基因敲除体系的成功建立，为后续在解淀粉芽孢杆菌 C10 中的遗传操作奠定了基础。

## 第五章 草酸脱羧酶基因的敲除及对 $\gamma$ -PGA 合成的影响

### 5.1 实验材料

#### 5.1.1 菌株及质粒

解淀粉芽孢杆菌 C10、解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp*，质粒 pKSU。

#### 5.1.2 实验试剂

ClonExpressII One Step Cloning Kit 购于南京诺唯赞生物科技有限公司，Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、购于北京索莱宝科技有限公司，其余试剂均为国产分析纯，剩余见 2.1.2。

#### 5.1.3 引物序列（表 5-1）

表 5-1 本节所用引物及序列

Table5-1 Primers and sequences used in this section

引物名称	引物序列
oxdC UP-F	AAAATAAGGATCCTCTAGAGTCGACATGTCAAAGAAAACAACCTG
oxdC UP-R	TCGCGACTTCGACGAGTAGC
oxdC DN-F	GCTACTCGTCGAAGTCGCGA
oxdC DN-R	TGGGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCAGCATTCTTTTTGACGA
oxdC OUT-F	TTAATGTGAGTTAGCTCACT
oxdC OUT-R	AACTGTTGGGAAGGGCGATC

#### 5.1.4 培养基及溶液

##### 5.1.4.1 培养基和缓冲液

种子培养基：LB 培养基。

发酵培养基：A 组分为葡萄糖 80g/L；FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.04g/L；MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.104g/L；CaCl<sub>2</sub> 0.11g/L。B 组分为蛋白胨 10g/L；NH<sub>4</sub>Cl 18g/L；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g/L；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g/L；草酸钠 14.98g/L。A 组分和 B 组分单独灭菌后在超净工作台内混合。

##### 5.1.4.2 抗生素及试剂浓度

见 2.1.4.2。

#### 5.1.5 实验设备

表 5-2 仪器名称及生产厂家

Table 5-2 The instrument name and manufacturer

仪器名称	生产厂家
超声波细胞粉碎机 JY92IIL	上海乔跃电子有限公司
电转仪 ECM399	美国 BXT 公司
液相色谱仪 1200	安捷伦
酶标仪 SpectraMax	美谷分子仪器有限公司

其余见 2.1.5。

## 5.2 试验方法

### 5.2.1 菌株活化

见 3.2.1。

### 5.2.2 敲除菌株 C10 $\Delta$ upp $\Delta$ oxdC 的构建

在实验操作过程中，使用传统的 PCR 产物克隆方法具有一定的缺陷，不仅耗费精力，而且用时长，其主要有以下两种类型：1.TA 载体连接；2.在 PCR 引物设计的过程中，将载体上的酶切位点引入，然后得到 PCR 产物，其经过双酶切后，最后将克隆到目的载体上。为了克服传统的克隆方法，可以采用无缝克隆技术，这种克隆方法具有简洁、全新、快速的特点，插入位点灵活，插入片段不限，也不受连接酶和内切酶的限制，只需要将任意方法线性化后的载体和与其两端具有 15-25bp 重叠区域的 PCR 片段定向重组，就可以快速实现高效无缝克隆。

以解淀粉芽孢杆菌 C10 基因组 DNA 为模板，以 oxdC UP-F/oxdC UP-R 和 oxdC DN-F/oxdC DN-R 为引物对草酸脱羧酶 *oxdC* 基因上、下游同源臂扩增。

表 5-3 *oxdC* 上、下游基因反应体系Table 5-3 The system of *oxdC* upstream and downstream gene reaction

Reagent	Volume
C10 DNA	1 $\mu$ l
引物 (10 $\mu$ mol/L)	各 1 $\mu$ l
2 $\times$ Taq PCR Mix	10 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 25 $\mu$ l

扩增条件为：预变性 94 $^{\circ}$ C 3min，变性 94 $^{\circ}$ C 30s，退火 63 $^{\circ}$ C 30s，延伸 72 $^{\circ}$ C 1min，反应 30 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

pKSU 质粒进行酶切，37 $^{\circ}$ C 酶切 2.5h，体系如下。

表 5-4 酶切体系

Table 5-4 Digestion system

Reagent	Volume
PKSU	4 $\mu$ l
10 $\times$ H Buffer	2 $\mu$ l
<i>Sal</i> I	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

将纯化得到的 *oxdC* 基因上下游同源臂片段与酶切后回收纯化的 pK<sub>SU</sub> 线性质粒连接，37 $^{\circ}$ C 反应 30min。

表 5-5 连接体系

Table 5-5 Connection system

Reagent	Volume
PKSU	9 $\mu$ l
<i>oxdC</i> -UP	1 $\mu$ l
<i>oxdC</i> -DN	1 $\mu$ l
5 $\times$ CEII buffer	4 $\mu$ l
ExnaseII	2 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

表 5-6 阴性对照-1

Table 5-6 Negative control-1

Reagent	Volume
pK <sub>SU</sub>	9 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

表 5-7 阴性对照-2

Table 5-7 Negative control-2

Reagent	Volume
<i>oxdC</i>	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ l

连接后转化 JM100 提取质粒。对长出的单菌落进行 PCR 及酶切验证，随后经测序后得到敲除载体 pK<sub>SU</sub>- $\Delta$ *oxdC*。将敲除载体经过第二章优化的电转化条件转入解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp* 中，进行敲除。敲除菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 筛选方法见 2.2.10。

### 5.2.3 草酸脱羧酶基因敲除菌株 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$ 的发酵培养

挑取 LB 固体培养基平板上的 C10 $\Delta upp\Delta oxdC$  单菌落接种于 30mL 种子培养基中, 32°C, 200rpm 过夜培养至 OD<sub>600</sub> 值约 4.5。按照 10%的接种量将种子液接种于装有 30mL 发酵培养基的 250mL 锥形瓶中, 32°C, 200rpm 培养 36h。

### 5.2.4 敲除菌株 C10 $\Delta upp \Delta oxdC$ 草酸脱羧酶活力测定

#### 1. 粗酶液的提取

将 5.2.3 中的发酵液 5000g 离心 15 min 收集菌体, 除上清, 将沉淀悬浮于含有 0.5mol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 值 7.6) 中, 缓冲液与培养液体积的比为 1:10, 于冰浴条件下使用超声波破碎仪进行细胞破碎, 破碎条件: 破碎 1 s, 暂停 2 s, 破碎总时间为 8 min, 功率为 50%。随后将细胞破碎液于 4°C、10000g 离心 30 min, 上清液即为粗酶液。对照为 C10 $\Delta upp$  菌株。

#### 2. 蛋白浓度测定

采用考马斯亮蓝法。

- (1) 完全溶解蛋白标准品 BSA, 用 PBS 稀释标准品将 BSA 稀释至终浓度为 0.2mg/mL。
- (2) 5×G250 染色液使用前颠倒 3-5 次混匀, 取 1mL 5×G250 染色液, 加入 4mL 双蒸水, 混匀成 1×G250 染色液, 此 1×G250 染色液可在 4°C 保存一周。
- (3) 将标准品按 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 $\mu$ l 分别加到 96 孔板中, 加 PBS 稀释液补足到 20 $\mu$ l。蛋白样品做同上稀释。
- (4) 各孔加入 200 微升稀释后的 1×G250 染色液, 室温放置 3-5 分钟。
- (5) 用酶标仪测定 A595 的吸光度。根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度。

#### 3. 草酸脱羧酶活力测定

采用终止反应法<sup>[61]</sup>。反应体系中包含 0.2mL 76mmol/L 的草酸钠, 1.2mL 50mmol/L 的柠檬酸缓冲液 (pH 值 4.0), 37°C 水浴 2min 后加入草酸脱羧酶液 0.1mL 开始反应, 10 min 后迅速加入 1.5mL 0.2mol/L 的磷酸氢二钾终止反应。反应液用 0.22 $\mu$ m 微孔过滤膜过滤酶蛋白后, 采用液相色谱法(HPLC)检测反应生成的甲酸。HPLC 条件: 流动相为 0.005mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.5mL/min, 进样量 20 $\mu$ l, 色谱柱为 BENSON 8100-0 BP-800Ca 柱, 柱温 60°C, 紫外检测波长 210 nm。甲酸标准品的浓度梯度为 0, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.012, 0.014, 0.016, 0.018, 0.02, 0.022mmol/L, 根据甲酸浓度与 HPLC 210 nm 处吸收峰面积的线性关系绘制甲酸标准曲线。

酶活单位定义为: 1 分钟催化转化草酸产生 1 $\mu$ mol 甲酸的酶量。酶的比活力即为单位质量(mg) 酶所具有的酶活力单位数, 草酸脱羧酶比活力即为酶活力与蛋白浓度之比。

### 5.2.5 $\gamma$ -PGA 的测定

发酵结束将菌液在 12000rpm 的条件下离心 20min, 去除菌体沉淀, 在上清中加入上清体积 2 倍的无水乙醇, 4°C 冰箱过夜保存, 次日于 3500rpm 离心 10min, 去上清, 将沉淀物于 60°C 烘干至恒重后称重。实验结果取三个生物学重复的平均值。

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 敲除载体 pKSU- $\Delta$ *oxdC* 的构建

以解淀粉芽孢杆菌 C10 基因组 DNA 为模板, 用引物对 *oxdC* UP-F/*oxdC* UP-R 和 *oxdC* DN-F/*oxdC* DN-R 对 *oxdC* 基因上、下游同源臂序列进行扩增, 大小为 500bp (图 5-1)。利用无缝克隆连接试剂盒与 pKSU 进行连接, 最后构建 pKSU- $\Delta$ *oxdC* 即敲除载体, 如图 5-2 所示。对其进行酶切验证, 得到 pKSU 载体约 8000bp 和 *oxdC* 片段 1000bp 两条条带, 说明 pKSU- $\Delta$ *oxdC* 载体构建成功。结果如图 4-3 所示。

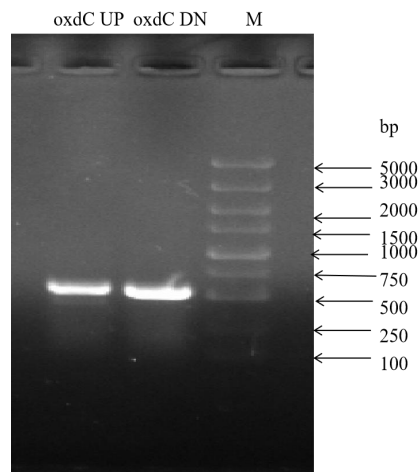


图 5-1 *oxdC* 基因上下游同源臂的扩增。M: DNA Marker III。

Figure 5-1 amplification of the upstream and downstream homologous arms of the *oxdC* gene. M: DNA Marker III.

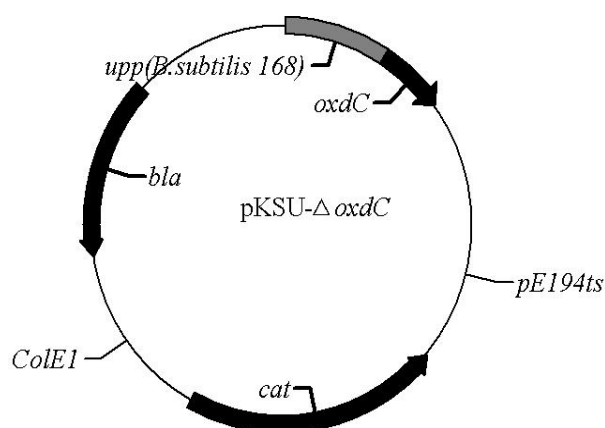


图 5-2 敲除载体 pKSU- $\Delta$ oxdC 的构建。

Figure 5-2 Knock out carrier pKSU- $\Delta$ oxdC build.

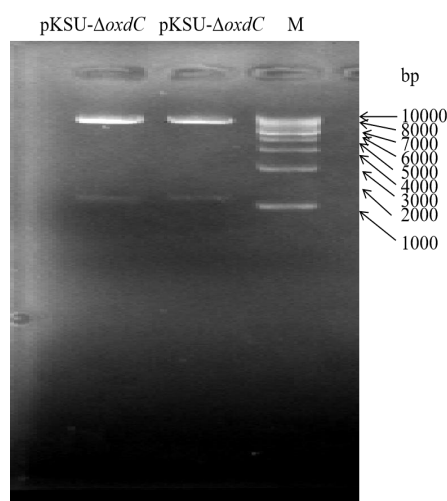


图 5-3 敲除载体 pKSU- $\Delta$ oxdC 酶切验证图谱。泳道 1,2 均为 pKSU- $\Delta$ oxdC, M: DNA 1kb Marker。

Figure 5-3 The digestion verification map of the knockout vector pKSU- $\Delta$ oxdC. Lanes 1 and 2 are pKSU- $\Delta$ oxdC, M: DNA 1kb Marker.

### 5.3.2 菌株 C10 $\Delta$ upp $\Delta$ oxdC 的筛选

pKSU- $\Delta$ oxdC 质粒电转化进入解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ upp, 经过氯霉素、5-FU 的筛选后, 用 oxdC OUT-R 和 oxdC OUT-F 区分初始菌株 C10 $\Delta$ upp 和敲除菌株 C10 $\Delta$ upp $\Delta$ oxdC。使用敲除菌株的染色体 DNA 作为模板, 通过 PCR 扩增可获得约 1100bp 的片段, 而野生型可获得约 2300bp 的片段, 如图 5-4 所示。由此, 可以得出, C10 $\Delta$ upp 基因组中的草酸脱羧酶基因已经成功敲除, 得到敲除菌株 C10 $\Delta$ upp $\Delta$ oxdC。

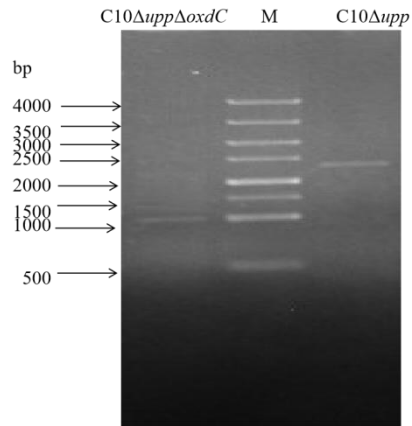


图 5-4 *oxdC* 基因敲除菌株 PCR 检测电泳图, M: DNA marker III。

Figure 5-4 PCR electrophoresis of *oxdC* due to the knockout strain, M: DNA marker III.

### 5.3.3 草酸脱羧酶浓度及活力的测定

为了进一步证实 *oxdC* 基因的敲除。需要对草酸脱羧酶浓度及活力进行测定。测定根据蛋白标准品 BSA 的不同浓度梯度与 595 nm 处吸光度的关系, 绘制标准曲线, 回归方程为  $y=1885x+0.0114$ ,  $R^2=0.9967$  (图 5-5a)。经过及破碎细胞提取粗蛋白酶液后, 进行蛋白质吸光度检测, 根据回归方程求出对照 *C10Δupp* 的蛋白质含量为 2.2934mg/mL, 而 *C10ΔuppΔoxdC* 提取的蛋白质含量为 0.00345mg/mL。

根据甲酸浓度与 HPLC 210nm 处吸收峰面积的线性关系, 绘制标准曲线, 回归方程为  $y=3046.1x+4.1279$ ,  $R^2=0.9904$  (图 5-5b)。HPLC 对草酸脱羧酶催化反应液中甲酸的检测结果见图 5-6, 通过 HPLC 可以有效检测产物甲酸 (16.57min)。根据回归方程求出对照 *C10Δupp* 的草酸脱羧酶酶活力为 1.3780U, 比活力为 0.6008U/mg, 而 *C10ΔuppΔoxdC* 的草酸脱羧酶无酶活力, 可以证实草酸脱羧酶基因已经成功敲除。

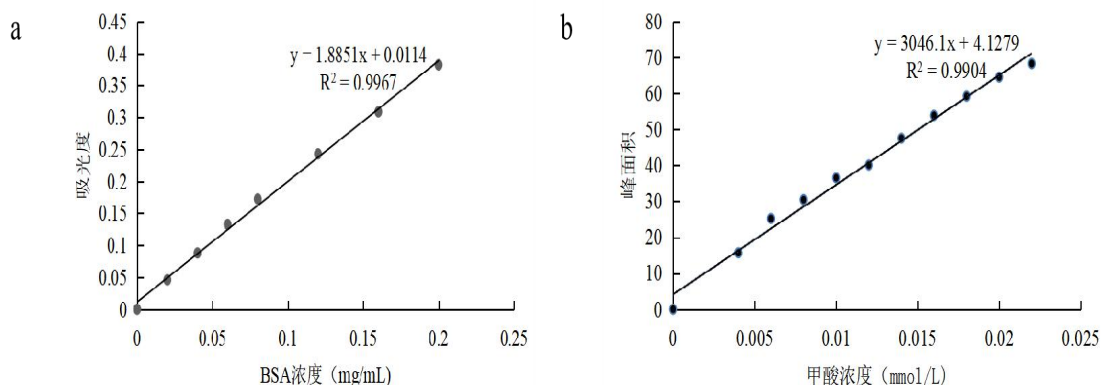


图 5-5 图 a 为 BSA 浓度与 595nm 处吸光度标准曲线, 图 b 为甲酸浓度与 HPLC 210nm 处吸收峰面积标准曲线。

Figure 5-5 Figure a is a standard curve of BSA concentration and absorbance at 595 nm, and Figure b is a standard curve of formic acid concentration and absorption peak area at HPLC 210 nm.

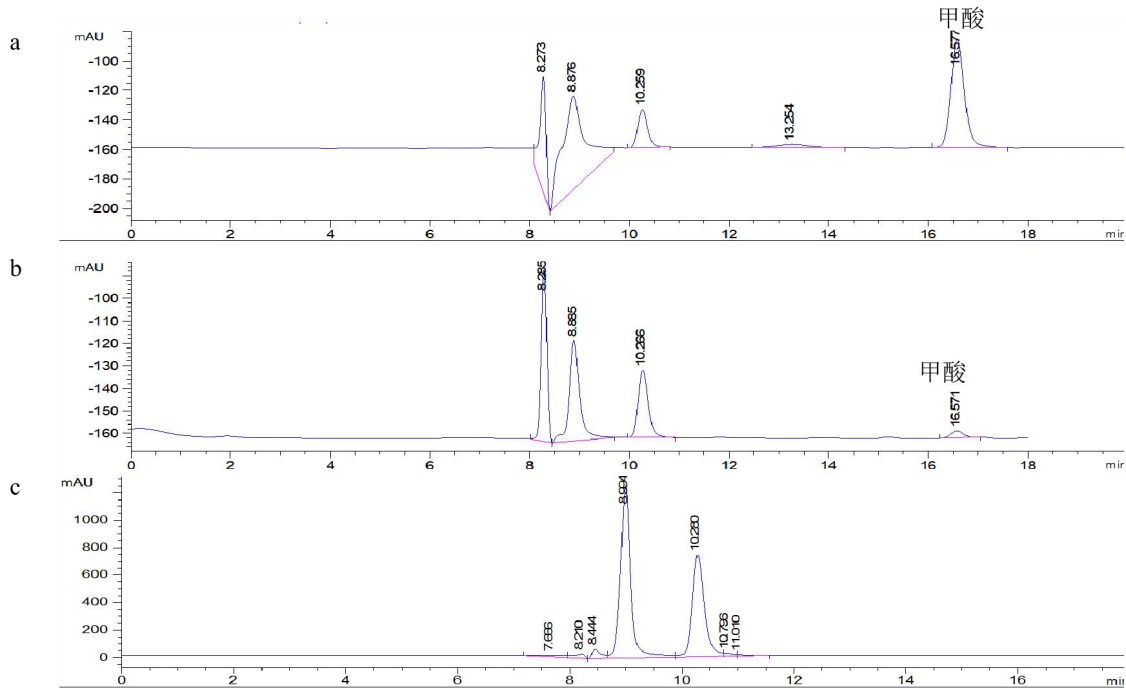


图 5-6 HPLC 对甲酸的检测.图 a 为甲酸标准品，图 b 为  $C10\Delta upp$  样品，图 c 为  $C10\Delta upp\Delta oxdC$ ，未检测到甲酸。

Figure 5-6 HPLC detection of formic acid. Panel a is formic acid standard, panel b is  $C10\Delta upp$  sample, and panel c shows  $C10\Delta upp\Delta oxdC$ , no formic acid was detected.

### 5.3.4 *oxdC* 基因的敲除对 $\gamma$ -PGA 合成的影响

根据本实验室前期的研究，草酸的添加能够刺激解淀粉芽孢杆菌 C10 合成  $\gamma$ -PGA。因此通过敲除草酸脱羧酶基因，阻止草酸被草酸脱羧酶转化为甲酸，验证草酸的积累是否能刺激  $\gamma$ -PGA 的高产。本研究将得到的敲除菌株  $C10\Delta upp\Delta oxdC$  进行发酵，对照为初始菌株  $C10\Delta upp$ 。在发酵培养基中， $C10\Delta upp\Delta oxdC$  和  $C10\Delta upp$  在发酵 36h 后  $OD_{600}$  值分别为 13.96 和 15.56， $C10\Delta upp$  较  $C10\Delta upp\Delta oxdC$  有轻微的优势，说明 *oxdC* 基因的缺失对菌株生长有一定影响，结果如图 5-7b 所示。发酵实验结果（图 5-7a）显示，初始菌株  $C10\Delta upp$  的  $\gamma$ -PGA 产量为 22.22g/L，突变菌株的  $\gamma$ -PGA 产量为 12.33g/L，产量与初始菌株相比有所下降，推测草酸的积累会对菌体生长造成负担。

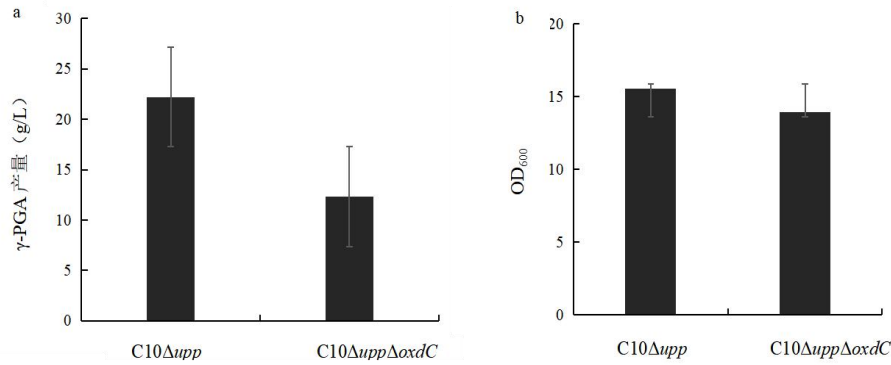


图 5-7 图 a 为 C10Δupp 和 C10ΔuppΔoxdC 的γ-PGA 产量对比。图 b 为 C10Δupp 和 C10ΔuppΔoxdC 的 OD<sub>600</sub> 比较。实验结果是三次生物学重复的平均值。

Figure 5-7 Panel a is a comparison of γ-PGA production of C10Δupp and C10ΔuppΔoxdC. Figure b is an OD<sub>600</sub> comparison of C10Δupp and C10ΔuppΔoxdC. The experimental result is the average of three biological replicates.

### 5.3.5 讨论

本实验室保存的菌株解淀粉芽孢杆菌 C10 是从发酵食品中筛选到谷氨酸非依赖性菌株，前期研究发现在培养基中添加少量草酸能够触发该菌株合成高浓度γ-PGA<sup>[62]</sup>。通过查询 KEGG 代谢途径数据库发现，在枯草芽孢杆菌中，草酸的代谢是由草酸脱羧酶(oxalate decarboxylase, OXDC)转化为甲酸，甲酸被甲酸脱氢酶进一步氧化为二氧化碳。草酸(oxalic acid, OA)普遍存在于自然界动植物和某些微生物中，是一种很强的有机二元羧酸，对于很多微生物来说，高度氧化的草酸对于细胞具有毒性，不能被微生物利用，也不进入糖酵解和 TCA 循环等细胞的主要碳代谢途径。依据现有的代谢途径推断，草酸在解淀粉芽孢杆菌 C10 中被氧化为二氧化碳，并非γ-PGA 合成的底物，因此谷氨酸前体完全从葡萄糖从头合成(de novo pathway)。培养基中的草酸触发了细菌以从头合成途径合成γ-聚谷氨酸的原因尚不清楚。因此，本章的研究对 C10 的草酸脱羧酶基因进行了敲除，以验证草酸在不能被分解的情况下，是否可以持续促进聚谷氨酸的合成。

本试验通过无缝克隆技术构建了草酸脱羧酶基因敲除载体 pKSU-ΔoxdC，经过电转化进入菌株 C10Δupp，转化子经过氯霉素、5-FU 筛选后，用引物 oxdC OUT-R 和 oxdC OUT-F 对初始菌株 C10Δupp 和突变体进行 PCR 检测后，得到突变菌株 C10ΔuppΔoxdC。后续为了进一步证实敲除草酸脱羧酶基因的敲除，检测了突变菌株 C10ΔuppΔoxdC 及初始菌株 C10Δupp 的草酸脱羧酶的活性。实验结果显示，突变菌株 C10ΔuppΔoxdC 由于草酸脱羧酶基因的缺失，无草酸脱羧酶酶活力，而对照菌株 C10Δupp 的草酸脱羧酶酶活性为 1.3780U，比活力为 0.6008U/mg，由此可以证实草酸脱羧酶基因已经成功敲除。

为了验证草酸的积累是否能够持续促进细胞内大量产生 $\gamma$ -PGA, 将敲除菌 *C10 $\Delta$ upp $\Delta$ oxdC* 进行发酵, 发酵结束后检测了敲除菌株与初始菌株的 OD<sub>600</sub> 及  $\gamma$ -PGA 产量。结果显示, 在发酵 36h 后, 敲除菌株和初始菌株 OD<sub>600</sub> 值分别为 13.96 和 15.56, 初始菌株较敲除菌株有轻微优势。通过乙醇沉淀 $\gamma$ -PGA 进行提取, 初始菌株 *C10 $\Delta$ upp* 的 $\gamma$ -PGA 产量为 22.22g/L, 突变菌株 *C10 $\Delta$ upp $\Delta$ oxdC* 的 $\gamma$ -PGA 产量为 12.33g/L, 产量与初始菌株相比有所下降。根据本实验结果草酸不被降解, 反而不利于菌体生长和聚谷氨酸的合成。推测可能的原因是草酸在分解过程中产生还原力 (NADH), 抑制了菌体的 TCA 循环, 促进碳流进入谷氨酸合成途径。草酸虽然不直接进入聚谷氨酸的合成途径, 但通过调节细胞的能量代谢间接促进了聚谷氨酸的合成。

## 总结与展望

### 总结

本研究利用 *upp* 作为反向筛选标记, 首先构建了 *upp* 基因缺失菌株。5-氟尿嘧啶 (5-FU) 可以被 *upp* 基因编码的尿嘧啶磷酸转移酶转化为有毒物质 5-dUMP, 抑制细胞生长, 而 *upp* 基因缺失的菌株对 5-FU 就具有抗性。利用温敏型质粒 pKSV7 获得单交换菌株, *upp* 反向筛选标记用于筛选双交换菌株, 在突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* 的基础上, 成功的构建了含有 *upp* 基因的 pKSU- $\Delta$ *amyA* 基因敲除载体, 并成功敲除了 C10 中的 *amyA* 基因片段。*amyA* 基因的敲除证明了本研究构建的 *upp* 作为反向筛选标记基因可以有效的对目的基因进行敲除。因此, 继续在初始突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* 的基础上对草酸脱羧酶基因进行敲除, 抑制草酸转化为甲酸和二氧化碳, 以验证草酸在不能被分解的情况下, 是否可以持续促进聚谷氨酸的合成。主要结论如下:

1. 本试验构建了 *upp* 上下游同源臂, 与温敏型质粒 pKSV7 连接, 构建的 pKSV7- $\Delta$ *upp* 载体经酶切得到约 7000bp 和 1100bp 的条带, 经过测序确认载体构建成功。电转化进入解淀粉芽孢杆菌 C10 后经过氯霉素、5-FU 及 PCR 的筛选, 得到解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp* 菌株。探索得到电转化最优条件为 OD<sub>600</sub>=4.2, 重悬感受态细胞使用 MSG 缓冲液, 电转化时预设电压 2200V, 电击时间 5ms。

通过构建含有 *upp* 基因的 pKSV7 载体, 再一次将含有 *upp* 表达盒的反向筛选质粒 pKSU 通过电转化导入解淀粉芽孢杆菌 C10 $\Delta$ *upp* 中。将重新导入 *upp* 基因的突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) 和初始菌株 C10 $\Delta$ *upp* 在 0.35mM 的 5-FU 的平板上涂布, 在 5-FU 平板上, C10 $\Delta$ *upp* (pKSU) 不能进行正常生长, 说明 5-FU 的敏感性在 *upp* 基因回补菌株的影响下又被恢复, 由此可知, 在淀粉芽孢杆菌遗传改造中, *upp* 基因可作为解淀粉芽孢杆菌遗传改造中的反向筛选标记基因。

2. 构建敲除载体 pKSU- $\Delta$ *amyA*, 经过电转化进入突变菌株 C10 $\Delta$ *upp*, 经过氯霉素与 5-FU 敏感性检测后, 得到突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA*。对突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *amyA* 进行了淀粉酶水解实验。实验结果显示, 突变菌株由于  $\alpha$ -淀粉酶基因的缺失, 不能形成水解圈。实验结果证实了解淀粉芽孢杆菌 C10 中基因敲除体系的成功建立, 为后续在解淀粉芽孢杆菌 C10 中的遗传操作奠定了基础。

3. 前期研究表明验证草酸的添加能够刺激解淀粉芽孢杆菌 C10 合成  $\gamma$ -PGA, 为了验证草酸在 PGA 合成中的作用, 对草酸脱羧酶基因进行敲除。通过无缝克隆技术构建敲除载体 pKSU- $\Delta$ *oxdC*, 经过电转化进入菌株 C10 $\Delta$ *upp*, 转化子经过氯霉素、5-FU 和 PCR 的筛选得到突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC*。检测了突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 及初始菌株 C10 $\Delta$ *upp* 的草酸脱羧酶活性, 并且对突变菌株和原始菌株进行了  $\gamma$ -PGA 发酵验证。实验结果显示, 突变菌株 C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC* 无草酸脱羧酶活力, 对照菌株 C10 $\Delta$ *upp* 草酸脱羧酶活性为 1.3780U, 比活力 0.6008U/mg,

可以证实草酸脱羧酶基因已经成功敲除。

发酵结束后，C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC*和C10 $\Delta$ *upp* OD<sub>600</sub>值分别为 13.96 和 15.56，C10 $\Delta$ *upp*较C10 $\Delta$ *upp* $\Delta$ *oxdC*有轻微优势。发酵实验结果显示，初始菌株C10 $\Delta$ *upp*的 $\gamma$ -PGA产量为 22.22g/L，突变菌株产量为 12.33g/L。推测可能的原因是草酸在分解过程中产生还原力（NADH），抑制了菌体的TCA循环，促进碳流进入谷氨酸合成途径。草酸虽然不直接进入聚谷氨酸的合成途径，但通过调节细胞的能量代谢间接促进了聚谷氨酸的合成。

## 展望

解淀粉芽孢杆菌不仅在自然环境中广泛分布，不仅在土壤，植物根际表面，深海水等外部环境中，而且在植物中也很普遍，易于分离和培养，对人类无毒无害。其代谢物丰富，具有广谱抗菌活性，抗逆性强，生长快，稳定性好，在植物病害的防治中具有多种有益作用，非常适合生物的大规模生产和应用。近年来解淀粉芽孢杆菌的染色体无痕修饰改造的技术方法，在目前看来已经属于一种成熟的技术，在菌种的合成生物学和遗传改造方面取得非常优秀的成绩。在枯草芽孢杆菌168中，有研究者已经成功的制造出精简菌株，这种菌株的染色体缺失超过1M，虽然其给人们带来了一定的好处，但是还是存在一些缺陷（*Ara*等）<sup>[63]</sup>。由于时间所限，本论文研究仍有较多不足之处，为进一步敲除C10中有利于发酵生产的关键基因，探索发酵合成代谢物的调控机理，可从下述几个方面继续进行研究：

- 1.继续优化解淀粉芽孢杆菌感受态细胞及电转化条件，提高电转化效率，建立更加高效、快速的电转体系。

2. 由于时间原因，对于*oxdC*基因的敲除不能高效合成 $\gamma$ -PGA的具体原因没有深入研究，后续可以继续探索，提高发酵产物产量，用于实践生产当中。

## 参考文献

- [1]严婉荣, 赵廷昌, 肖彤斌, 等. 生防细菌在植物病害防治中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32 (4) :533-539.
- [2]杨敏馨. 解淀粉芽孢杆菌在动物生产中的应用研究进展[J]. 饲料广角, 2018(06):49-51.
- [3]杜丽华, 张维瑞, 袁王俊. 解淀粉芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. 科技资讯, 2018, 16(06):128-130.
- [4]Shih I L, Van Y T. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. Bioresour Technol 79, 2001, 207-225.
- [5]Ho G H, Ho T I, Hsieh K H, et al. 2006.  $\gamma$ -polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): structural characteristics, chemical properties and biological functionalities[J]. Journal of the Chinese Chemical Society, 53:1363-1384.
- [6]BAJAJ I, SINGHAL R. Poly (glutamic acid)-an emerging biopolymer of commercial interest[J]. Bioresource technology, 2011, 102(10): 5551-5561.
- [7]ASHIUCHI M, KAMEI T, MISONO H. Poly- $\gamma$ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 23(2-6): 101-106.
- [8]ASHIUCHI M, MISONO H. Biochemistry and molecular genetics of poly- $\gamma$ -glutamate synthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 9-14.
- [9]ASHIUCHI M, NAKAMURA H, YAMAMOTO T, et al. Poly- $\gamma$ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 23(2-6): 249-255.
- [10]SHI F, XU Z, CEN P. Microbial production of natural poly amino acid[J]. Science in China Series B: Chemistry, 2007, 50(3): 291-303.
- [11]Ivanovics G, Bruckner V. Chemical and immunologic studies on the mechanism of anthrax infection and immunity. The chemical structure of capsule substance of anthrax bacilli and its identity with that of the *B. mesentericus*[J]. Z Immunitaetsforsch 90, 1997, 304-318.
- [12]Shih I L, Van Y T. The production of poly-( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications[J]. Bioresour Technol 79, 2001, 207-225.

- [13]Candela T, Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria[J]. Mol Microbiol 60,2006,1091-1098.
- [14]盛洁,孟凡强,吕凤霞等.解淀粉芽孢杆菌 FMBJ37 产 $\gamma$ -聚谷氨酸发酵培养基的优化[J].食品工业科技,2019,40(20):160-166.
- [15]沈大春,敖俊华,陈迪文等.应用解淀粉芽孢杆菌 GBIF-2 液体发酵产 $\gamma$ -聚谷氨酸配方研究[J].甘蔗糖业, 20182018(06):23-26.
- [16]刘培洋,刘芳,蔡亚慧等.产 $\gamma$ -聚谷氨酸解淀粉芽孢杆菌 LDJ11 培养基组分优化研究[J].轻工学报,2018,33(03):30-38+44.
- [17]Candela T, Moya M, Haustant M, et al. Fusobacterium nucleatum, the first Gram-negative bacterium demonstrated to produce polyglutamate[J]. Can J Microbiol 2009,55,627-632.
- [18]Weber, J. Poly(gamma-glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in *Hydra (Hydrozoa, Cnidaria)*[J]. Biol Chem,1990,265, 9664-9669.
- [19]Hezayen F F, Rehm B H, Tindall B J, et al. Transfer of *Natrialba asiatica BIT* to *Natrialba taiwanensis* [J]. Int J Syst Evol Microbiol,2001,51, 1133-1142.
- [20]LUO Z T, GUO Y , LIU J D, et al. Microbial synthesis of poly-gamma-glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives[J]. Biotechnol Biofuels, 2016,9:134.
- [21]OGA TA F, NAGAI N, KAW ASAKI N. Adsorption capability of cationic dyes (methylene blue and crystal violet) onto poly-gamma-glutamic acid[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 2017,65(3):268-275.
- [22]HSUEH Y H, HUANG K Y , KUNENE S C, et al. Poly-gamma-glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017,18(12):2644.
- [23]SAKAMOTO S, KAW ASE Y. Adsorption capacities of poly-gamma-glutamic acid and its sodium salt for cesium removal from radioactive wastewaters[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2016,165:151-158.
- [24]李文婧, 赵祥颖, 田延军, 等.  $\gamma$ -聚谷氨酸产生菌的发酵培养基优化[J].食品与发酵工业, 2010, 36(3): 108-111, 116.
- [25]Pandey A. Solid-state fermentation[J]. Biochem eng j, 2003, 13(2):81-84.

- [26]ZENG W , CHEN G G , WU H, et al. Improvement of *Bacillus subtilis* for poly-gamma-glutamic acid production by genome shuffling[J]. Microbial Biotechnology, 2016,9(6):824-833.
- [27]Young F E, Yasbin R E. Transduction in *Bacillus subtilis* by bacteriophage SPP1[J]. Virol, 1974, 14, 1343-1348.
- [28]Harwood C R, Cutting S M. Molecular Biological Methods for *Bacillus*[J], Wiley: New York, NY, USA, 1990, 581.
- [29]Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Bacteriol, 1961, 81, 741-746.
- [30]Zhang X Z, Zhang Y H P. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*[J]. Microb Biotechnol, 2011, 4, 98-105.
- [31]Xue G P, Johnson J S, Dalrymple B P. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. Microbiol Methods ,1999, 34, 183-191.
- [32]Aune T E, Aachmann F L. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85, 1301-1313.
- [33]马克学,席兴宇.转化、转导、转染和感染概念的辨析[J].生物学教学,2010,35(10):80-81.
- [34]Tran L.S.P, Nagai T, Itoh Y. Divergent structure of the *ComQXPA* quorum-sensing components: Molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*[J]. Mol Microbiol, 2000, 37, 1159-1171.
- [35]Vojcic L, Despotovic D, Martinez R, et al. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 94, 487-493.
- [36]Peng D, Luo Y, Guo S, et al. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*[J]. Appl Microbiol, 2009, 106, 1849-1858.
- [37]Turgeon, N, Laflamme C, Ho J, et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579[J]. Microbiol Methods, 2006, 67, 543-548.
- [38]ZHANG G-Q, BAO P, ZHANG Y, et al. Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall

weakening and cell-membrane fluidity disturbing[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 409(1): 130-137.

[39]GANG-PING XUE JSJ, BRIAN P, DALRYMP L E. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 34: 183-191.

[40]ZAKATAEVA N P, NIKITINA O V, GRONSKIY S V, et al. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1201-1209.

[41]RUVKUN G B, AUSUBEL F M. A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes[J]. *Nature*, 1981, 289(5793): 85-88.

[42]EC C. Disruption of targeted gene in bacterial chromosome by using a temperature-sensitive plasmid[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 184(1): 525-530.

[43]LEENHOUTSK B G, BOLHUI S A, TEN BERG E A, et al. A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes.[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, 253(1-2): 217-224.

[44]FABRET C, EHRLICH S D, NOIROT P. A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular microbiology*, 2002, 46(1): 25-36.

[45]YANGJ J, SUNB B, HUANG H, et al. High-efficiency scarless genetic modification in escherichia coli by using lambda red recombination and I-Sce i cleavage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(13): 3826-3834.

[46]FABRET C, EHRLICH S D, NOIROT P. A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular microbiology*, 2002, 46(1): 25-36.

[47]KELLER K L, BENDER K S, WALL J D. Development of a Markerless Genetic Exchange System for *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and Its Use in Generating a Strain with Increased Transformation Efficiency[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(24): 7682-7691.

[48]KRISTICH C J, MANIAS D A, DUNNY G M. Development of a method for markerless genetic exchange in *Enterococcus faecalis* and its use in construction of a *srtA* mutant[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 5837-5849.

- [49]ZHANG X Z, YAN X, CUI Z L, et al. *MazF*, a novel counter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(9): e71.
- [50]LIN Z, DENG B, JIAOZ, et al. A versatile mini-*mazF*-cassette for marker-free targeted genetic modification in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiol Methods*, 2013, 95(2): 207-214.
- [51]YU H, YAN X, SHEN W, et al. Efficient and precise construction of markerless manipulations in the *Bacillus subtilis* genome[J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2010, 20(1): 45-53.
- [52]LIU S, ENDO K, ARA K, et al. Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the *AraR* repressor and the *ara* promoter[J]. *Microbiology*, 2008, 154: 2562-2570.
- [53]YAN X, YU H J, HONG Q, et al. *Cre/lox* system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5556-5562.
- [54]SUZUKI N, TSUGE Y, INUI M, et al. *Cre/lox* P-mediated deletion system for large genome rearrangements in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(2): 225-233.
- [55]POMERANTSEV A P, SITARAMAN R, GALLOWAY C R, et al. Genome engineering in *Bacillus anthracis* using Cre recombinase[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(1): 682-693.
- [56]SHI T, WANG G, WANG Z, et al. Establishment of a markerless mutation delivery system in *Bacillus subtilis* stimulated by a double-strand break in the chromosome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81370.
- [57]Zhang Z, Ding Z T, Shu D. Development of an Efficient Electroporation Method for Iturin A-Producing *Bacillus subtilis* ZK[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015.4:7343-7345.
- [58] Zhi Zhang, Zhong-Tao Ding , Dan Shu, et al. Development of an Efficient Electroporation Method for Iturin A-Producing *Bacillus subtilis* ZK[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 7334-7351.
- [59]Duitman E H, Wyczawski D, Boven L G, et al. Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73: 3490-3496.

[60]FABRET C, EHRLICH S D, NOIROT P. A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular microbiology*, 2002, 46(1): 25-36.

[61]Draz~enka S, Yong L, Laurie A, et al . Investigating the roles of putative active site residues in the OX-alate decarboxylase from *Bacillus subtilis*[J]. *Arch Bio-chem Biophys*, 2007,464(1): 36-47.

[62]张慧莉. 微生物高效生产 $\gamma$ -聚谷氨酸和 $\beta$ -聚苹果酸的研究[D].浙江大学,2012.

[63]ARA K, OZAKI K, NAKAMURA K, et al. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2007, 46:169-178 .

## 致谢

“逝者如斯夫，不舍昼夜”，研究生之旅途即将结束。三年来，在“明德正行，博学多能”的校风熏陶下，我成长了很多。异乡三年，我想向所有在这座城市里给予我温暖的人致以由衷的感谢，感谢你们陪伴丰富了我的整个青春。饮其流时思其源，成吾学时念吾师。首先，向我的导师张慧莉老师致以我惭愧而又钦佩的感谢！惭愧的是，在整个毕业设计过程中，自己玩乐之心甚重，懈怠之处过多，未能倾尽全力；钦佩的是，在指导学生毕业论文的繁杂任务下，导师一丝不苟，面面俱到。在寒假期间依然严谨求实，每周督促我们完成周任务。对学术的严谨，工作的认真负责，无不使我受益匪浅，受用终生。其次，我要感谢师哥师姐们，在我实验中每次遇到问题，师兄师姐们总是很耐心的帮助我，非常感谢他们的热心帮助，我还要感谢课题组同学们积极的学习态度，让我看到了自己的差距，也在互相交流中收获颇丰；感谢能有如此机会，可以体验科学研究中的惊喜与不易；感谢岁月，于世间欢愉与悲苦，许以宽去。最后深深的感谢呵护我成长的父母。每当我遇到困难的时候，父母总是第一个给我鼓励的人。回顾走过的路，每一个脚印都浸满着他们无私的关爱和谆谆教诲，十多年的在外求学之路，寄托着父母对我的殷切期望。他们在精神和物质上的无私支持，坚定了我追求人生理想的信念。

这段旅程看似荆棘密布，实则蕴藏着无尽的宝藏。我从资料的收集中，掌握了很多专业知识，让我对我所学过的知识有所巩固和提高。在整个过程中，我学到了新知识，增长了见识。在今后的日子里，我仍然要不断地充实自己，争取在所学领域有所作为。脚踏实地，认真严谨，实事求是的学习态度，不怕困难、坚持不懈、吃苦耐劳的精神是我在这段旅程中最大的收益。我想这是一次意志的磨练，是对我实际能力的一次提升，也会对我未来的学习和工作有很大的帮助。

## 作者简介


靳芹，女，汉族，新疆省塔城市额敏县人，1995年生，2017年毕业于新疆农业大学农学院生物技术专业，获理学学士学位，2017-2020年在新疆石河子生命科学学院攻读理学硕士学位，主要研究方向为微生物分子与发酵工程。

### 在学期间主要参与的研究项目

1.参加了国家自然科学基金资助项目《草酸触发枯草芽孢杆菌高效合成 $\gamma$ -聚谷氨酸的代谢机制》（21366028）的部分研究工作。

## 石河子大学硕士研究生学位论文

### 导师评阅表

研究生姓名	靳芹	学制	全日制
专业	生物学	研究方向	微生物分子及发酵工程
<p>学术评语：</p> <p>解淀粉芽孢杆菌是重要的功能菌，也是聚谷氨酸的重要产生菌之一，通过构建该菌基因操作平台，探究了影响该菌产<math>\gamma</math>-聚谷氨酸的途径，选题具有一定的应用价值。该论文简要综述了解淀粉芽孢杆菌合成<math>\gamma</math>-聚谷氨酸以及基因操作研究进展，对国内外相关文献有一定的了解。该论文成功构建了解淀粉芽孢杆菌 C10 的无痕基因敲除体系，并利用该体系敲除了草酸脱羧酶基因，探索了草酸脱羧酶对<math>\gamma</math>-聚谷氨酸合成的影响，对人类了解和利用解淀粉芽孢杆菌合成<math>\gamma</math>-聚谷氨酸有一定的促进作用。上述研究结果为淀粉芽孢杆菌的基因修饰提供了一种新的方法。</p> <p>该论文研究所用方法稳定，图表清晰，研究目标明确，实验设计合理，方法正确，数据翔实，分析准确，书写规范，条理清晰，总体反映了该生已基本掌握了所在专业的基础理论，基本技能。达到了硕士研究生毕业的要求。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">             指导教师签字：         </div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">           2020 年 8 月 18 日         </div>			