



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104726388 B

(45)授权公告日 2017.11.14

(21)申请号 201510062696.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.02.06

C12N 1/21(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 15/74(2006.01)

申请公布号 CN 104726388 A

C12N 9/44(2006.01)

C12R 1/22(2006.01)

(43)申请公布日 2015.06.24

审查员 徐丹

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.10357 2015.01.14

(73)专利权人 河南仰韶生化工程有限公司

地址 472400 河南省三门峡市渑池县黄花
工业区

(72)发明人 焦国宝 邱立友 孙利鹏 王明道

许苗苗 刘仲敏

(74)专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通
合伙) 41104

代理人 时立新

权利要求书1页 说明书10页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种普鲁兰酶产酶菌株及提高其产酶能力
的方法

(57)摘要

本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种高产普鲁兰酶工程菌构建方法及所构建高产普鲁兰酶工程菌株。该方法包括提取DNA、PCR扩增、PCR融合、电击转化、筛选鉴定等步骤。所构建高产普鲁兰酶工程菌株保藏编号为CGMCC NO.10357的变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)为原始出发菌株。本发明通过基因工程技术将枯草芽孢杆菌P43启动子转化进入产普鲁兰酶原始菌株,操作方式易于实现。由于普鲁兰酶得以在本体内得到表达,合成和分泌途径没有发生改变,不会发生质粒丢失现象,因而遗传稳定性高;本发明所构建高产普鲁兰酶工程菌株相较原始出发菌株,普鲁兰酶的酶活和酶表达量具有较好的提高,因而具有较好的推广应用价值。

1. 一种普鲁兰酶产酶菌株,其特征在于,该菌株名称为变栖克雷伯氏菌HN7, *Klebsiella variicola* HN7,已于2015年1月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC NO.10357。

2. 一种提高普鲁兰酶产酶菌株产酶能力的方法,其特征在于,该方法通过在出发菌株变栖克雷伯氏菌中转入枯草芽孢杆菌P43启动子以提高其产酶能力,具体包括以下步骤:

(1) 提取DNA,提取枯草芽孢杆菌DNA备用;

(2) PCR扩增,PCR分别扩增四环素抗性基因*Tet*上游片段、四环素抗性基因*Tet*下游片段、枯草芽孢杆菌P43启动子,具体如下:

PCR扩增四环素抗性基因*Tet*上游片段时,引物序列设计如下:

上游片段的引物Tet-F1:5' -GGGGGATGATTGCGCCCCGAAAGCAAAAATATCTAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG-3' ,

引物Tet-R1:5' -GCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTC-3' ;

PCR 扩增时,以pBR322 质粒为模板,扩增产物记录为第一片段,4℃保存备用;

PCR扩增四环素抗性基因*Tet*下游片段时,引物序列设计如下:

下游片段引物Tet-F2: 5' -CGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAG-3' ,

引物Tet-R2:5' -CCTGCATGCACGTCGACACGAGATGCGCCGCGT-3' ;

PCR 扩增时,以pBR322 质粒为模板,扩增产物记录为第二片段,4℃保存备用;

PCR扩增枯草芽孢杆菌P43启动子时,引物序列设计如下:

上游引物为pF3:5' -ACGCGGCGCATCTCGTGTGACGTGCATGCAGG-3' ,

下游引物为pR3:5' -TCCAAGGTAATAGGGCATGACAGGTATATCTGAGCATCGATATAATGGTACCGCTATCACTT-3' ;

PCR 扩增时,以枯草芽孢杆菌基因组DNA 为模板,扩增产物记录为第三片段,4℃保存备用;

(3) PCR融合,将步骤(2)中分别扩增的序列片段采用融合PCR技术进行融合,具体顺序为:第一轮PCR将第一片段与第二片段进行融合,第二轮PCR时加入第三片段,第三轮PCR以步骤(2)中的Tet-F1与pR3作为引物序列进行整体扩增;

切胶纯化后获得同源重组片段;

(4) 电击转化,将步骤(3)纯化并验证序列正确的同源重组片段采用电击转化方式转化普鲁兰酶产酶出发菌株;

电击转化液转移至新鲜的LB培养基,复苏后均匀的涂在含有四环素的抗性LB平板中培养过夜;

(5) 转化子筛选鉴定,挑选步骤(4)中四环素抗性LB平板中阳性单克隆菌落,提取DNA,PCR鉴定,鉴定正确菌株即可用于普鲁兰酶发酵生产。

3. 利用权利要求2所述提高普鲁兰酶产酶菌株产酶能力的方法所构建的产普鲁兰酶的工程菌株。

一种普鲁兰酶产酶菌株及提高其产酶能力的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种普鲁兰酶产酶菌株、提高其产酶能力的方法及所构建的新的 高产普鲁兰酶工程菌株。

背景技术

[0002] 自然界和农业生产形成的糖质原料绝大多数是以多糖形式存在的,包括淀粉质原料(玉米、小麦、薯类等)、木质纤维素(秸秆、林木等)和壳聚糖(昆虫、虾蟹外壳)等。由于种种原因,目前能够被有效利用的主要是淀粉质原料。我国食品和发酵行业每年耗用玉米、大米、小麦和薯类等淀粉质原料达5000余万吨。

[0003] 淀粉质原料用于食品与发酵生产时往往需要经过酶解生成葡萄糖。淀粉酶解所用的酶有 α -淀粉酶、糖化酶、普鲁兰酶、 β -淀粉酶和异淀粉酶等。其中 α -淀粉酶、糖化酶只能水解淀粉中直链部分的 α -1,4糖苷键,不能水解淀粉中支链淀粉分支点中的 α -1,6-糖苷键。异淀粉酶虽然能水解分支淀粉分支点的 α -1,6糖苷键,但是不能水解由2~3个葡萄糖残基构成的侧枝。普鲁兰酶不仅能够专一性地水解支链淀粉分支点中的 α -1,6糖苷键,并能将最小单位的支链分解,最大限度的利用淀粉原料。因此,在淀粉糖化阶段普鲁兰酶与糖化酶一起使用,可大幅度提高液化后淀粉的水解速度,降低糖化酶用量,缩短糖化时间,提高淀粉原料利用率,节能减排,减污增效,对提高食品和发酵工业生产技术和经济社会效益具有非常重要的意义。

[0004] 现有技术中,我国普鲁兰酶市场被少数大型跨国公司所垄断,酶的价格昂贵,难以满足国内食品与发酵等行业的迫切需要。尽管我国在普鲁兰酶产生菌资源筛选和分子改造及基因工程等方面的研究取得了一定的进展,但无论是从自然界筛选的菌株还是工程菌株,均存在酶活力低、酶学性质差等问题,至今尚未实现工业化生产,因而尚需进一步探索研究。

发明内容

[0005] 本发明主要目的在于提供一种普鲁兰酶产酶菌株,同时提供了一种提高普鲁兰酶产酶菌株产酶能力的方法,该方法通过将枯草芽孢杆菌P43启动子转化进入普鲁兰酶产酶原始菌株,即可实现普鲁兰酶酶活和相关基因表达量的大幅提高。

[0006] 本发明的技术方案如下。

[0007] 一种普鲁兰酶产酶菌株,该菌株名称为变栖克雷伯氏菌HN7,*Klebsiella variicola* HN7,已于2015年1月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏编号为:CGMCC NO.10357。

[0008] 一种提高普鲁兰酶产酶菌株产酶能力的方法,通过在菌株中转入枯草芽孢杆菌P43启动子以提高其产酶能力,具体包括以下步骤:

[0009] (1)提取DNA,将枯草芽孢杆菌进行扩增培养,然后离心收集菌体,按照Ezup柱式细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书提取所培养菌体的DNA;

[0010] (2) PCR扩增, PCR分别扩增四环素抗性基因*Tet*上游片段、四环素抗性基因*Tet*下游片段、枯草芽孢杆菌P43启动子, 具体如下:

[0011] PCR扩增四环素抗性基因*Tet*上游片段时, 引物序列设计如下:

[0012] 上游片段的引物Tet-F1: 5'-GGGGATGATTGCGCCCCGAAAGCAAAAATATCTAATTAAATTC TCATGTTTGACAGCTTATCATCG-3',

[0013] 引物Tet-R1: 5'-GCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAG AAGACAGTC-3';

[0014] PCR扩增时, 以pBR322质粒为模板, 扩增产物记录为第一片段, 4℃保存备用;

[0015] PCR扩增四环素抗性基因*Tet*下游片段时, 引物序列设计如下:

[0016] 下游片段引物Tet-F2: 5'-CGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGAC CGCTTTCGCTGGAG-3',

[0017] 引物Tet-R2: 5'-CCTGCATGCACGTCGACACGAGATGCGCCGCGT-3';

[0018] PCR扩增时, 以pBR322质粒为模板, 扩增产物记录为第二片段, 4℃保存备用;

[0019] PCR扩增枯草芽孢杆菌P43启动子时, 引物序列设计如下:

[0020] 上游引物为pF3: 5'-ACGCGGCGCATCTCGTGTGACGTGCATGCAGG-3',

[0021] 下游引物为pR3: 5'-TCCAAGGTAATAGGGCATGACAGGTATATCTGAGCATCGATATAATGGTACC GCTATCACTT-3';

[0022] PCR扩增时, 以枯草芽孢杆菌基因组DNA为模板, 扩增产物记录为第三片段, 4℃保存备用;

[0023] (3) PCR融合, 将步骤(2)中分别扩增的序列片段采用融合PCR技术进行融合, 具体顺序为: 第一轮PCR将第一片段与第二片段进行融合, 第二轮PCR时加入第三片段, 第三轮PCR以步骤(2)中的Tet-F1与pR3作为引物序列进行整体扩增;

[0024] 切胶纯化后获得同源重组片段;

[0025] (4) 电击转化, 将步骤(3)纯化并验证序列正确的同源重组片段采用电击转化方式转化普鲁兰酶产酶原始菌株, 例如变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7), 电击转化液转移至新鲜的LB培养基, 复苏后均匀的涂在含有四环素的抗性LB平板中培养过夜;

[0026] (5) 转化子筛选鉴定, 挑选步骤(4)中四环素抗性LB平板中阳性单克隆菌落, 提取DNA, PCR鉴定, 鉴定正确菌株即可用于普鲁兰酶发酵生产。

[0027] 采用上述方法所构建的高产普鲁兰酶工程菌, 普鲁兰酶产酶原始菌株为变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7)。

[0028] 现有技术中, 针对普鲁兰酶工程菌筛选工作, 已有较多实践, 例如克雷伯氏菌Z-13 (*Klebsiella variicola*) (王明道等, 一株产普鲁兰酶细菌的分离鉴定及其发酵条件优化, 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2014, 27 (4): 569~573), 其原始产酶能力仅为5.7 U/mL, 尚不能用于生产实践; 而本发明所提供的变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7), 其原始产酶能力已可达7.2 U/mL, 进一步改进提高其产酶能力后即可用于生产实践。

[0029] 现有技术中, 采用基因工程构建高产普鲁兰酶工程菌株时, 一般通过质粒载体方式将普鲁兰酶转化进入新的微生物表达系统, 然后通过诱导表达、纯化等方式获得普鲁兰酶, 这种方法存在外源表达、提取、纯化操作复杂等弊端。而本发明通过基因工程技术将枯草芽孢杆菌P43启动子转化进入产普鲁兰酶原始菌株, 操作方式易于实现。由于普鲁兰酶得

以在本体内得到表达,合成和分泌途径没有发生改变,不会发生质粒丢失现象,因而遗传稳定性高;而且本发明通过以变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)作为原始出发菌株进行了具体验证,表明普鲁兰酶的酶活和酶表达量具有较好的提高,因而具有较好的推广应用价值。

附图说明

[0030] 图1为初步筛选过程中所筛选出的变栖克雷伯氏菌HN7(菌种鉴定后命名为变栖克雷伯氏菌HN7,鉴定前仅标记为代号HN7)的培养图;

[0031] 图2所筛选出的变栖克雷伯氏菌HN7(菌种鉴定后命名为变栖克雷伯氏菌HN7,鉴定前仅标记为代号HN7)的HN 7菌落形态(图A)及革兰氏染色图(图B);

[0032] 图3为PCR扩增四环素抗性基因*Tet*的上、下游片段和枯草芽孢杆菌P43启动子片段产物电泳图谱,其中1为四环素抗性基因*Tet*的上游片段;2为四环素抗性基因*Tet*的下游片段;3为枯草芽孢杆菌P43启动子片段;

[0033] 图4为PCR融合后同源重组片段,其中1为同源重组片段;

[0034] 图5为同源重组片段转化克雷伯氏菌后重新PCR扩增出的同源重组片段的PCR电泳检测结果;

[0035] 图6为同源重组片段转化克雷伯氏菌后重新PCR扩增出同源重组片段部分序列及变栖克雷伯氏菌上游基因组序列的PCR检测结果;

[0036] 图7为同源重组片段转化克雷伯氏菌后重新PCR扩增出同源重组片段部分序列及变栖克雷伯氏菌下游基因组序列的PCR检测结果。

具体实施方式

[0037] 在介绍具体实施例前,首先对实施例中所用到的部分原料和试剂简要介绍说明如下,未说明内容以现有技术中常用原料和试剂为准。

[0038] 菌株与质粒载体

[0039] 本发明所构建的普鲁兰酶工程菌以变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)为基础,该菌从淀粉生产厂附近土壤中筛选获得,目前已于2015年1月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(北京),保藏编号为:CGMCC NO.10357。

[0040] 枯草芽孢杆菌1.4255,来自于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

[0041] pBR322质粒,购自于宝生物工程(大连)有限公司。

[0042] 微生物培养所用培养基

[0043] 变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)保藏采用斜面保藏方式,斜面保藏培养基(w/v)配方如下:糯米粉 1.0%,蛋白胨 0.5%,酵母膏 0.5%,KH₂PO₄ 0.05%,MgSO₄·7H₂O 0.01%,KH₂PO₄ 0.05%,琼脂 2.0%,pH 6.0。

[0044] 变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)及改造后菌株扩增采用种子培养基进行扩增,种子培养基(w/v)配方如下:蛋白胨1.0%,牛肉膏0.3%,NaCl 0.5%,pH 6.0。

[0045] 所构建的新的普鲁兰酶工程菌及对照菌株(即原始出发菌株)产酶采用产酶培养基,产酶培养基(w/v)配方如下:糯米粉 0.5%,蛋白胨 0.5%,KH₂PO₄ 0.05%,MgSO₄·7H₂O 0.01%,pH自然。

[0046] 筛选菌株时采用LB培养基, LB培养基(w/v)配方如下:胰蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5 %, NaCl 1 % (固体培养基含1.5%琼脂粉)。

[0047] 部分试剂与酶

[0048] 四环素、3,5-二硝基水杨酸(DNS)、DNA凝胶回收试剂盒、Ezup柱式细菌基因组DNA提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;

[0049] 普鲁兰多糖为东京化成工业株式会社产品。

[0050] 电泳中所用M为 1kb plus DNA Maker。

[0051] 实施例1

[0052] 本发明中所构建的普鲁兰酶工程菌以变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 为原始出发菌株, 该菌从淀粉生产厂附近土壤中筛选获得, 目前已于2015年1月14日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(北京), 保藏编号为: CGMCC NO.10357。

[0053] 下面对该菌的筛选过程简要介绍如下。

[0054] 筛选方法

[0055] 采用从土壤样品中筛选微生物方法进行筛选, 土壤样品取自国内多个省市不同的淀粉厂及生产淀粉池附件。

[0056] 筛选过程中所用培养基

[0057] 菌种富集筛选培养基(质量%): 糯米粉1.0, 蛋白胨0.5, 酵母膏0.5, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, KH_2PO_4 0.05, 琼脂2.0, pH 6.0;

[0058] 分离培养基(质量%): 糯米粉2.5, 蛋白胨0.5, 酵母膏0.5, KH_2PO_4 0.05, 琼脂2.0, pH 6.0;

[0059] 鉴别培养基(质量%): 普鲁兰糖(Pullulan, 东京化成工业株式会社)0.3, 蛋白胨0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, KH_2PO_4 0.05, 琼脂2.0, pH 7.0;

[0060] 斜面培养基(质量%): 糯米粉1.0, 蛋白胨0.5, 酵母膏0.5, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, KH_2PO_4 0.05, 琼脂2.0, pH 6.0;

[0061] 种子培养基(质量%): 蛋白胨1.0, 牛肉膏0.3, NaCl 0.5, pH 6.0;

[0062] 产酶培养基(质量%): 玉米淀粉 1.0%, 蛋白胨 1.5%, KH_2PO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 装液量为70mL/250mL;

[0063] LB培养基(质量%): 蛋白胨1.0, 牛肉膏0.5, NaCl 1.0, pH 7.0。

[0064] 筛选鉴定过程

[0065] 菌株筛选以筛选获得产普鲁兰酶菌株为目的, 包括初筛、复筛、鉴定等步骤, 具体如下:

[0066] (1) 普鲁兰酶产生菌的初筛

[0067] 取所采集土样10 g 用100 mL 无菌生理盐水浸泡1 h, 之后振荡30 min。待静止后吸1.0 mL于菌种富集筛选培养基中。35℃振荡培养18~20 h。

[0068] 取培养液稀释后涂布于分离培养基平板上, 35℃温箱中培养48 h, 用体积分数0.1% 稀碘液(0.1%碘-碘酸钾溶液, 配制方法为: 称取0.5g I_2 和5.0g KI_2 于研钵中研磨后, 500ml容量瓶定容)显色。

[0069] 将有蓝色圈的菌落挑至斜面培养基上, 35℃ 培养48 h。

[0070] 然后转接到鉴别培养基平板上,35℃温箱中培养48 h。培养结束后将10 mL 无水乙醇倒入平板中,室温放置2~ 5h。此时培养基中的普鲁兰糖在乙醇作用下会发生沉淀,形成透明圈。将有透明圈的菌落斜面培养基保存,供复筛选用。

[0071] 初步筛选结果如图1所示,图中所示透明圈为变栖克雷伯氏菌HN7(菌种鉴定后命名为变栖克雷伯氏菌HN7,鉴定前仅标记为代号HN7)所形成的透明圈。结果表明,经过透明圈筛选试验共得到有透明圈的菌株38株。

[0072] (2)将步骤(1)中初筛出的菌株进行复筛

[0073] 将步骤(1)中纯化好的初筛菌株接入装有50 mL 种子培养基的小锥形瓶中,34℃、220 r/min培养16h。

[0074] 然后按8%的体积比例转接到装有50mL 灭菌后的发酵培养基(产酶培养基)的250mL三角瓶中,30℃、200r/ min 培养48 h,测定发酵液中普鲁兰酶活力。

[0075] 结果表明,步骤(1)中初步筛选出的38株菌株,变栖克雷伯氏菌HN7菌株(菌种鉴定后命名为变栖克雷伯氏菌HN7,鉴定前仅标记为代号HN7)的普鲁兰酶产酶活力最高,达到7.2 U/mL。

[0076] 普鲁兰酶活力测定按以下步骤进行

[0077] 首先收集发酵培养结束后发酵液,8000r/min、4℃离心20 min后取上清液,获得粗酶液。

[0078] 其次普鲁兰酶活力的测定采用DNS法,即3, 5-二硝基水杨酸法:取两支试管,每支试管中分别加入粗酶液1mL和1m去离子水,将其中一支试管中液体沸水浴加热10min灭活作为对照。分别在两只试管中加入1mL 0.5%(质量分数)的普鲁兰多糖溶液45℃保温30 min,然后加入1.5mL DNS(3,5-二硝基水杨酸)试剂(DNS试剂配制方法:3.15 g DNS溶于131 mL 2 M NaOH热溶液中,加入250 mL 36.4%的酒石酸钾钠热溶液中,再加入2.5 mL苯酚和2.5 g Na₂SO₃,溶解后定容到500 mL,贮于棕色瓶中7天后使用),沸水浴10min显色,最后迅速冷却。

[0079] 540nm波长下进行比色(灭活酶液对照)来测定还原糖含量。酶活定义:在上述条件下,每分钟产生相当于1 μ mol葡萄糖所需的酶量定义为1个酶活单位。

[0080] (3)菌种鉴定

[0081] 前述根据普鲁兰酶活力所筛选出的菌株,对其菌种类别进一步的鉴定包括形态鉴定、基因组鉴定等数个方面,从而最终确定其所属分类学上地位,简要介绍如下。

[0082] 首先将筛选所确定菌株(即HN7菌株)进行扩增培养,具体为:用接种环从保存的斜面培养基上挑取筛出的菌株少量,接种于100mL的LB液体培养基中。34℃、220 r/min培养16h备用。

[0083] 菌株形态鉴定及生理生化特性

[0084] 将所筛选菌株培养结束后进行革兰氏染色,在OLYMPUS BX51型光学电子显微镜下观察菌落形态,并参照《伯杰氏手册第九版》对所筛选菌株进行芽孢染色、淀粉水解实验、V-P实验、氧化酶实验等生理生化特性实验,结果如下表和图2所示。

[0085]

测试项目	特征	普鲁兰酶活性	阳性
菌落形态	圆形, 乳白色	水解可溶性淀粉	阳性
菌体形态	棒杆状	生长 pH	4.5-9.5
鞭毛	无	生长温度	25°C-55°C
运动性	无	水解明胶	阴性
革兰氏染色	阴性	过氧化氢酶	阳性
芽孢	无	V-P 实验	阴性

[0086] 从上表及图2可以看出, HN 7菌株在以普鲁兰为唯一碳源的鉴别培养基上生长迅速, 菌落圆形, 乳白色, 通过乙醇着色, 能形成清晰的透明圈。通过镜检, 该菌株为棒杆状, 革兰氏染色为阴性。

[0087] 基因组DNA的提取及16S rDNA序列测定

[0088] 将所筛选菌株的发酵液抽提过滤回收菌丝体, 根据SDS-CTAB法采用DNA提取试剂盒提取DNA, 然后用细菌通用引物F27/ R1522对待测菌株核糖体DNA上的ITS区域进行PCR扩增, 具体过程如下:

[0089] 设计制备引物序列如下:

[0090] F27: 5' -AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3' ,

[0091] R1522: 5' -AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3' 。

[0092] PCR扩增待测菌株核糖体DNA上的16S区域, 具体程序: 94°C 预变性5min, 94°C 变性60s, 54°C 退火40s, 72°C 延伸80s, 共30个循环, 72°C 延伸10min, 4°C 保存。回收PCR产物。

[0093] 扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测: 取样2uL, 采用d12000 (2-Log DNA Ladder) 作为Marker。

[0094] 将扩增产物经电泳纯化后, 将含有目标条带的凝胶回收送上海生物工程公司进行测序, 获得菌株16S rDNA基因序列

[0095] ITS序列分析: 据所测菌株的16s rDNA基因序列, 用NCBI-BLAST软件将测序结果在GenBank数据库中进行同源性检索, 确定菌种的种类。

[0096] 所测16S rDNA基因序列如下:

[0097]

```
CAGCTACCATGCACGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT
GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGG
GGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCCA
CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCG
GTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG
AGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
```


GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACG
ATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTCCAGAGATGCATTGCTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTG
CCAGCGGTTAGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACG。

[0098] 综上,根据菌株的形态学观察、生理生化指标及16s rDNA同源比对结果,最终鉴定所筛选菌株的分类学名称为:变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)。

[0099] 实施例2

[0100] 本实施例所构建的高产普鲁兰酶工程菌,以变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)为原始出发菌株,采用如下操作步骤进行构建:

[0101] (1)提取DNA,将枯草芽孢杆菌进行扩增培养,培养基为LB培养基,30℃,220 rpm培养15 h,8000 r/min离心20 min收集菌体,然后按照Ezup柱式细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书提取所培养菌体的DNA。

[0102] (2)PCR扩增,PCR分别扩增四环素抗性基因*Tet*上游片段、四环素抗性基因*Tet*下游片段、枯草芽孢杆菌P43启动子,具体如下:

[0103] PCR扩增四环素抗性基因*Tet*上游片段时,引物序列设计如下:

[0104] 上游片段的引物Tet-F1:5'-GGGGATGATTGCGCCCCGGAAAGCAAAAATATCTAATTAATTC
TCATGTTTGACAGCTTATCATCG-3',

[0105] 引物Tet-R1:5'-GCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAG
AAGACAGTC-3';

[0106] PCR扩增时,以pBR322质粒为模板,扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,66℃退火30 s,72℃延伸40s,共31个循环,72℃延伸10min,扩增产物记录为第一片段,4℃保存备用;

[0107] PCR扩增四环素抗性基因*Tet*下游片段时,引物序列设计如下:

[0108] 下游片段引物Tet-F2:5'-CGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATTTTCGGCGAGGAC
CGCTTTCGCTGGAG-3',

[0109] 引物Tet-R2:5'-CCTGCATGCACGTCGACACGAGATGCGCCGCGT-3';

[0110] PCR扩增时,以pBR322质粒为模板,扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,70℃退火30s,72℃延伸40s,共31个循环,72℃延伸10 min,扩增产物4记录为第二片段,4℃保存备用。

[0111] PCR扩增枯草芽孢杆菌P43启动子时,引物序列设计如下:

[0112] 上游引物为pF3:5'-ACGCGGCGCATCTCGTGTGACGTGCATGCAGG-3',

[0113] 下游引物为pR3:5'-TCCAAGGTAATAGGGCATGACAGGTATATCTGAGCATCGATATAATGGTACC
GCTATCACTT-3';

[0114] PCR扩增时,以枯草芽孢杆菌基因组DNA为模板,扩增条件:94℃预变性5 min,94℃变性30s,70℃退火30s,72℃延伸40s,共31个循环,72℃延伸10 min,扩增产物记录为第三片段,4℃保存备用。

[0115] PCR所扩增出四环素抗性基因*Tet*的上游片段、四环素抗性基因*Tet*的下游片段、枯草芽孢杆菌P43启动子产物跑胶后电泳图谱如图3所示,其中1、2、3分别代表第一片段、第二片段、第三片段的PCR扩增结果。

[0116] (3)PCR融合,将步骤(2)中分别扩增的序列片段采用融合PCR技术进行融合,具体顺序为:第一轮PCR将第一片段与第二片段进行融合,第二轮PCR时加入第三片段,第三轮PCR以步骤(2)中的Tet-F1与pR3作为引物序列进行整体扩增;

[0117] 第一轮PCR扩增条件:94℃预变性5 min,94℃变性30s,71℃退火30s,72℃延伸80s,共18个循环,72℃延伸10min;

[0118] 第二轮PCR扩增条件:94℃预变性5 min,94℃变性30s,69℃退火30s,72℃延伸100s,共18个循环,72℃延伸10min;

[0119] 第三轮PCR扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,66℃退火30s,72℃延伸100s,共33个循环,72℃延伸10min;

[0120] 将第三轮PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,检测结果如图4所示,其中1表示第一片段、第二片段、第三片段DNA片段融合后的PCR结果。

[0121] 切胶纯化后获得同源重组片段,送华大基因有限公司进行测序验证。测序结果表明,融合片段DNA序列与预期序列一致,且连接顺序正确。

[0122] (4)电击转化,将步骤(3)纯化并验证序列正确的同源重组片段采用电击转化方式(Bio-Rad电转化仪,型号Gene Pulser II,美国Bio-Rad公司)转化变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7),具体过程如下:

[0123] 2μL的同源重组片段(100ng,即步骤(3)纯化并验证序列正确的同源重组片段)与50μL的变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)感受态细胞充分混合,然后转移至2mm的电击转化杯中,电击参数:2KV,25μF和电阻400 Ω;

[0124] 电击转化液转移至新鲜的LB培养基,37℃、200r/min摇床复苏60min,然后均匀的涂在含有22μg/mL四环素的抗性LB平板中培养过夜。

[0125] (5)转化子筛选鉴定,挑选步骤(4)中四环素抗性LB平板中阳性单克隆菌落,进行菌落PCR鉴定,鉴定正确菌株即为本实施例所构建的高产普鲁兰酶工程菌。

[0126] PCR鉴定过程具体如下:

[0127] 以步骤(2)中的Tet-F1与pR3为引物序列,PCR扩增全长同源重组片段,PCR扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,66℃退火30s,72℃延伸100s,共30个循环,72℃延伸10min;

[0128] 以如下引物序列PCR扩增同源重组片段部分序列及其上游变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)序列(产物长550bp),引物序列为:

[0129] ZF1:5'-CTCAGGACTCACAGGGAATACCA-3',

[0130] ZR1:5'-GCATAACCAAGCCTATGCCTACA-3';

[0131] PCR扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸40s,共30个循环,72℃延伸10min;

[0132] 以如下引物序列PCR扩增同源重组片段部分序列及其下游变栖克雷伯氏菌HN7(*Klebsiella variicola* HN7)基因序列(产物长1410bp),引物序列为:

[0133] YF2:5'-CCTACTACTGGGCTGCTTCCTA-3',

[0134] YR2:5' -CACATCCTGCGGGTCGGGCGTA-3'

[0135] PCR扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,57℃退火30s,72℃延伸80s,共30个循环,72℃延伸10min;

[0136] PCR产物分别用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

[0137] 针对上述PCR所扩增的全长同源重组片段,其电泳图谱如图5所示;PCR所扩增同源重组片段部分序列及其上游变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 基因组序列(产物长550bp)电泳图谱如图6所示;PCR所扩增同源重组片段部分序列及其下游变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 基因组序列(产物长1410bp)如图7所示。

[0138] 从图5、图6、图7电泳图谱可以分析看出,同源重组片段正确的重组进入变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 中。其中图5中转化子为同源重组片段全长PCR扩增结果;图6中转化子为同源重组片段部分序列及其上游变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 基因组部分序列PCR扩增结果;图7中转化子为同源重组片段部分序列及其下游变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 基因组部分序列PCR扩增结果。

[0139] 实验检验

[0140] 为检验步骤(5)中鉴定正确的所构建的普鲁兰酶工程菌的产酶性能,发明人进一步进行了发酵产酶实验,然后分别进行了酶活力和酶表达量分析鉴定,简要介绍如下。

[0141] 普鲁兰酶活力分析

[0142] 挑取步骤(5)中鉴定正确的所构建的普鲁兰酶工程菌,产酶培养基培养。普鲁兰酶活力测定参照实施例1中普鲁兰酶活力测定方法进行。

[0143] 同时以变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 原始出发菌株作为对照。

[0144] 测定结果表明,本发明所构建的新的普鲁兰酶工程菌,酶活力最高为9.44 U/ml,而原始出发菌株(WT)变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7) 的最高酶活力是7.20 U/ml,因而本发明所构建的普鲁兰酶工程菌的酶活相较于原始菌株的酶活力提高了31.11%,具有较好的技术效果。

[0145] 普鲁兰酶基因表达量分析鉴定

[0146] 普鲁兰酶基因表达量采用半定量PCR分析方法进行,简要介绍如下。

[0147] 总RNA的提取采用Trizol试剂,提取的总RNA用gDNA Eraser于42℃反应2min去除基因组DNA后,用作半定量PCR反应模板;

[0148] cDNA的合成采用PrimeScript RT Enzyme,37℃反应15min,之后在85℃反应5s。

[0149] 半定量PCR扩增普鲁兰酶基因用引物设计如下:

[0150] 上游引物pu1(A)-F:5' -GAAGCAGAACGACAGCAAGG-3' ,

[0151] 下游引物pu1(A)-R:5' -GTGGTCCATACCGCCAGTGA-3' ;

[0152] PCR扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,共36个循环,72℃延伸10min。

[0153] 扩增housekeeping gene 16S rRNA基因用引物设计如下:

[0154] 上游引物16S_F:5' -AGAAGAAGCACCGGCTAACTC-3' ,

[0155] 下游引物16S_R:5' -AGAAGAAGCACCGGCTAACTC-3' 。

[0156] PCR扩增条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,共32个

循环,72℃延伸10min。

[0157] 对本发明所构建的普鲁兰酶工程菌和原始出发菌株(WT)变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7)分别进行PCR扩增,扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳,EB显色,用凝胶成像系统(G-BOX凝胶成像系统,英国Syngene公司)照相并用Gel Base/Gel Blot Support软件分析各电泳条带的灰度值。

[0158] 结果表明,本发明所构建的普鲁兰酶工程菌普鲁兰酶基因表达量是原始出发菌株(WT)变栖克雷伯氏菌HN7 (*Klebsiella variicola* HN7)的1.45倍,表明普鲁兰酶基因表达量得到了明显提高。

[0001]	SEQUENCE LISTING							
[0002]	<110>	河南仰韶生化工程有限公司						
[0003]	<120>	一种普鲁兰酶产酶菌株及提高其产酶能力的方法						
[0004]	<130>	none						
[0005]	<140>	2015100626965						
[0006]	<141>	2015-02-06						
[0007]	<160>	1						
[0008]	<170>	PatentIn version 3.5						
[0009]	<210>	1						
[0010]	<211>	1165						
[0011]	<212>	DNA						
[0012]	<213>	Klebsiella variicola 16S rDNA						
[0013]	<400>	1						
[0014]		cagctaccat	gcacgtcgag	cggtagcaca	gagagcttgc	tctcgggtga	cgagcggcgg	60
[0015]		acgggtgagt	aatgtctggg	aaactgcctg	atggaggggg	ataactactg	gaaacggtag	120
[0016]		ctaataccgc	ataacgtcgc	aagaccaaag	tgggggacct	tcgggcctca	tgccatcaga	180
[0017]		tgtgccaga	tgggattage	tggtaggtgg	ggtaacggct	cacctaggcg	acgatcccta	240
[0018]		gctggtctga	gaggatgacc	agccacactg	gaactgagac	acggtcacga	ctctacggg	300
[0019]		aggcagcagt	ggggaatatt	gcacaatggg	cgcaagcctg	atgcagccat	gccgcgtgtg	360
[0020]		tgaagaaggc	cttcgggttg	taaagcactt	tcagcgggga	ggaaggcggg	gaggttaata	420
[0021]		acctcatcga	ttgacgttac	ccgcagaaga	agcaccggct	aactccgtgc	cagcagccgc	480
[0022]		ggtaatacgg	agggtgcaag	cgttaatcgg	aattactggg	cgtaaagegc	acgcaggcgg	540
[0023]		tctgtcaagt	cggatgtgaa	atccccgggc	tcaacctggg	aactgcattc	gaaactggca	600
[0024]		ggctagagtc	ttgtagaggg	gggtagaatt	ccagggttag	cggtgaaatg	cgtagagatc	660
[0025]		tggaggaata	ccgggtggcga	aggcggcccc	ctggacaaag	actgacgctc	aggtgcgaaa	720
[0026]		gcgtggggag	caaacaggat	tagataccct	gtagtccac	gctgtaaacg	atgtcgattt	780
[0027]		ggaggttgtg	cccttgagge	gtggcttccg	gagctaacgc	gttaaatega	ccgcctgggg	840
[0028]		agtacggccg	caaggttaaa	actcaaatga	attgacgggg	gcccgcacaa	gcggtggagc	900
[0029]		atgtggttta	atc gatgca	acgcgaagaa	ccttacctgg	tcttgacatc	cacagaactt	960
[0030]		tccagagatg	cattgctgcc	ttcggaact	gtgagacagg	tgctgcatgg	ctgtcgtcag	1020
[0031]		ctcgtgttgt	gaaatgttgg	gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccttat	cctttgtgcc	1080
[0032]		agcggttage	cggaactca	aaggagactg	ccagtgataa	actggaggaa	ggtggggatg	1140
[0033]		acgtcaagtc	atcatggccc	ttacg				1165

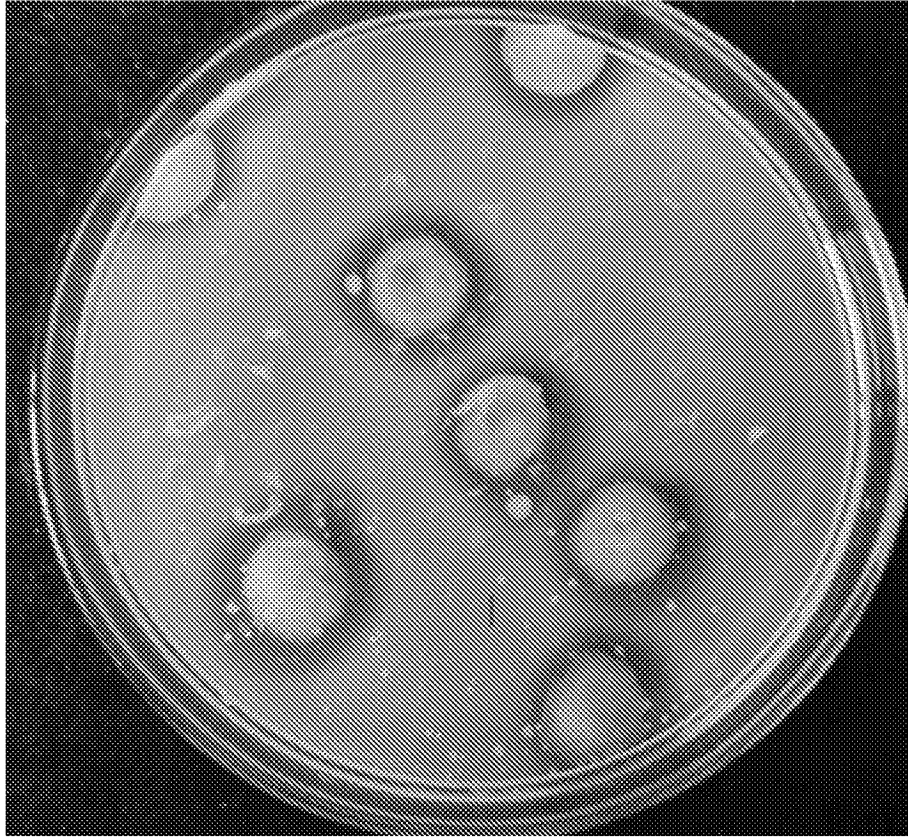


图1

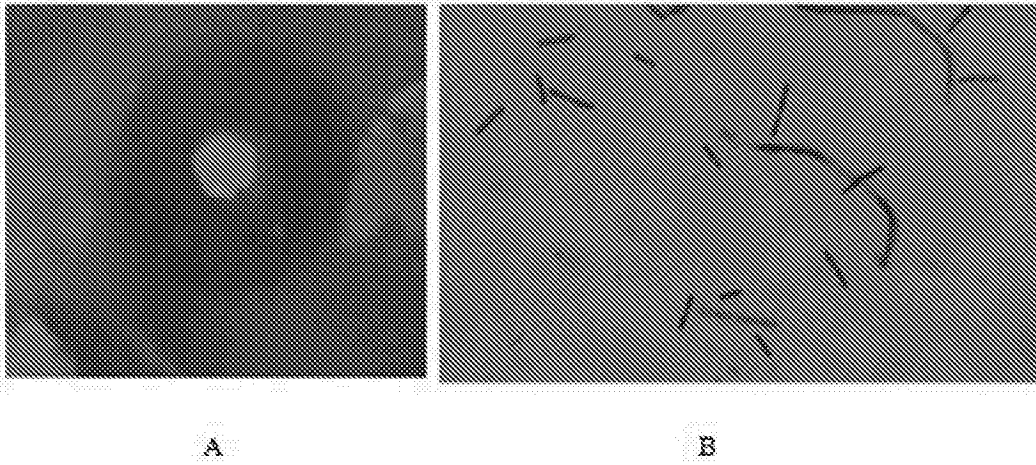


图2

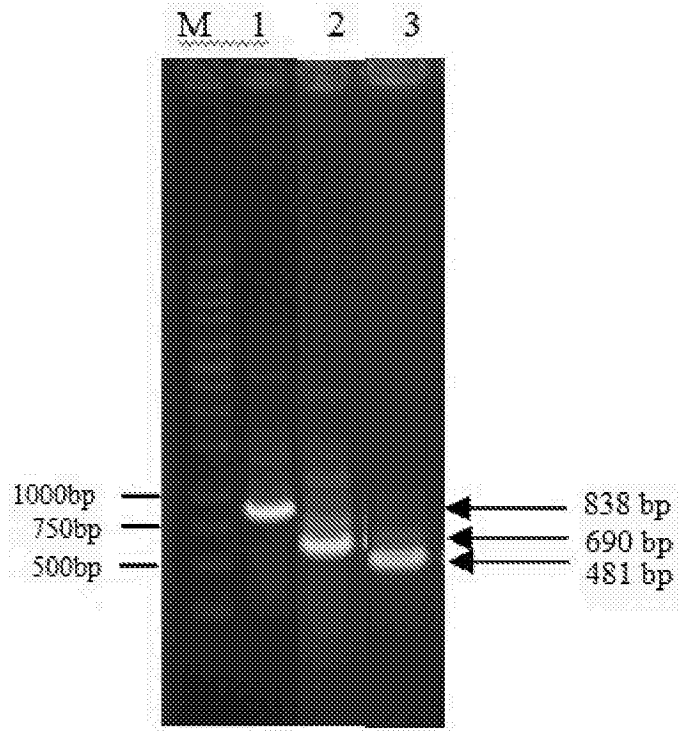


图3

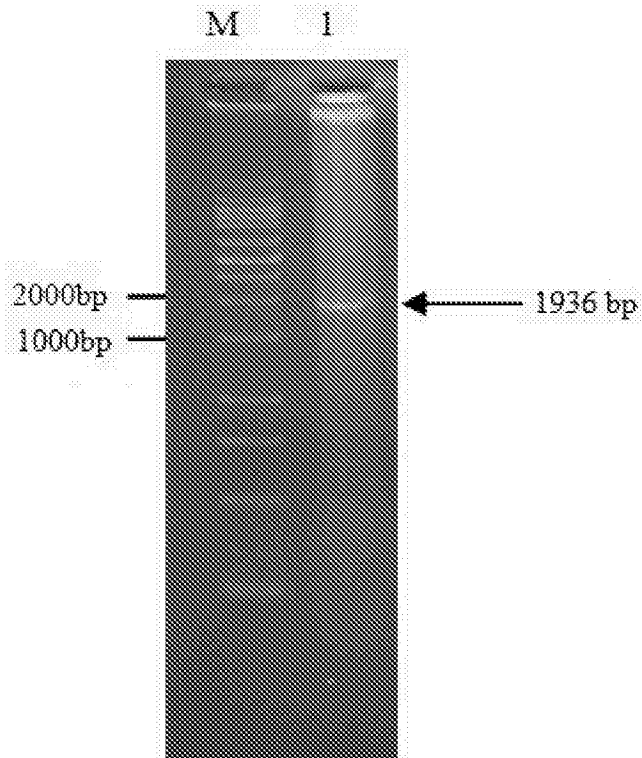


图4

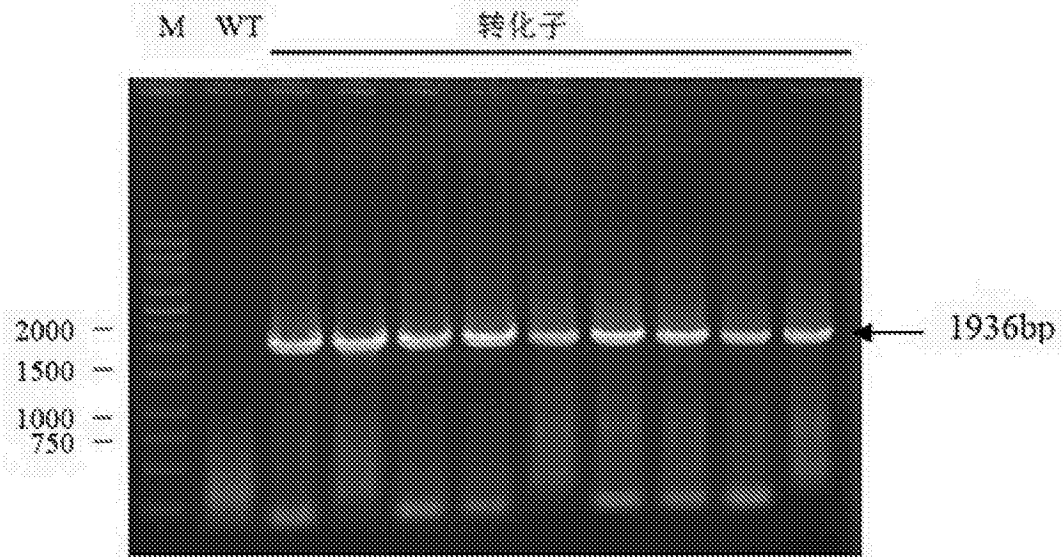


图5

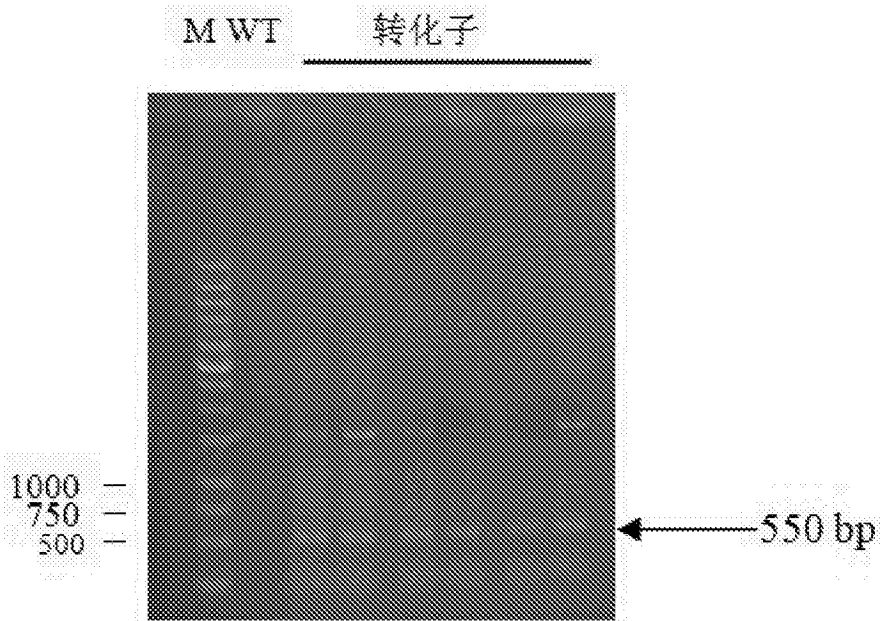


图6

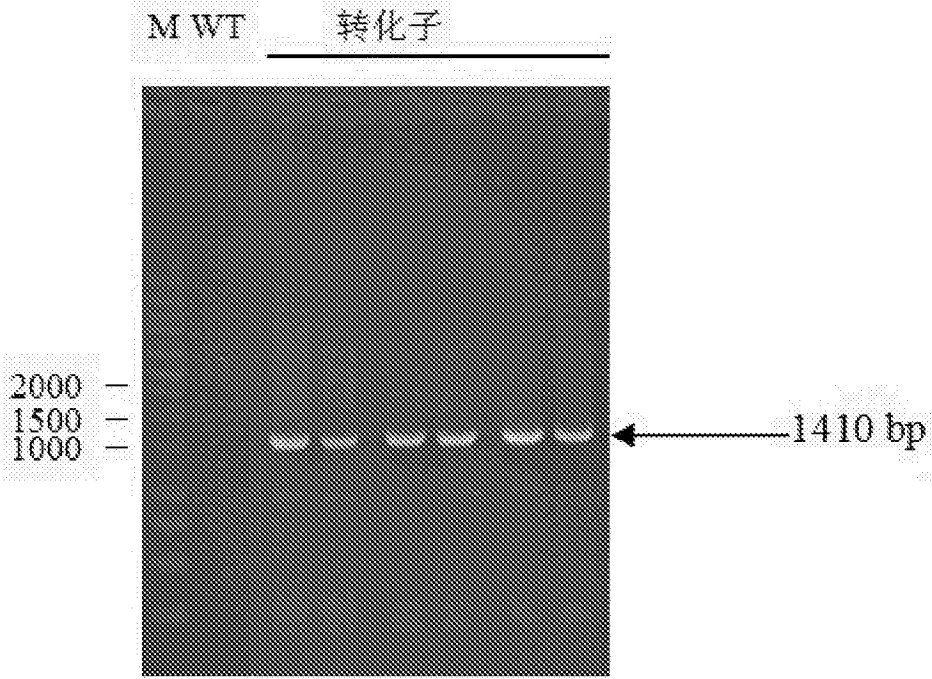


图7