

产氢细菌 *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 基因文库构建及分析

赵鑫, 邢德峰, 王静怡, 张璐, 任南琪

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090, dxing@hit.edu.cn)

摘要: 以高效产氢细菌哈尔滨产乙醇杆菌的模式菌株 YUAN-3 作为出发菌株, 提取细菌总 DNA, 经过 *Sau* 3A I 的不完全酶切, 将 2.5~5.0 kb 的片段连接入用 *Bam*H I 酶切的 pUC 19 质粒, 转化入 *E. Coli* DH5 α 中, 构建菌株 YUAN-3 的基因组文库, 得到克隆数接近 9×10^3 个, 以最相近的梭菌属已报道的基因组平均大小 4.6 Mb 计算, 概括了其 99% 以上的基因组, 达到了建库的理论值. 随机挑取 200 个白色菌落进行测序, 经分析得到的结果大多数与已经过全序列分析的产氢细菌的假想蛋白相近, 其中有 49 个与其他菌株功能蛋白相似性超过 70% 的片段, 包括叶酰聚谷氨酸合成酶、DNA 拓扑异构酶、乙酰转移酶等, 同时获得了 7 个功能蛋白或基因的完整开放阅读框.

关键词: 生物制氢; 基因文库; 产氢细菌; 哈尔滨产乙醇杆菌

中图分类号: TH133; TP183

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)10-1586-05

Construction and analysis of gene library from H₂-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3

ZHAO Xin, XING De-feng, WANG Jing-yi, ZHANG Lu, REN Nan-qi

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology,
Harbin 150090, China, dxing@hit.edu.cn)

Abstract: The genomic DNA of H₂-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 was isolated and partially digested by *Sau* 3A I. The fragments of 2.5-5.0 kb were selected and inserted into *Bam*H I digested plasmid pUC 19. The genomic clone library of strain YUAN-3 was constructed with 9×10^3 recombinants, indicating the coverage of clone library tends to be the theoretical value based on a 4.6 Mb average chromosome size of *Clostridium*, closest to *Ethanoligenens harbinense*. 200 colonies were picked stochastically for sequencing and aligned with the database. The results imply that most of the sequences are similar with the hypothetical protein of hydrogen-producing bacterium whose complete genomes are sequenced, among which 49 sequences have the similarity over 70%, including folylpolyglutamate synthetase, DNA topoisomerase, acetyltransferase and so on, and 7 open reading frames (ORFs) of functional proteins or genes can be obtained.

Key words: biohydrogen; gene library; H₂-producing bacterium; *Ethanoligenens harbinense*

收稿日期: 2009-01-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30870037); 城市水资源与水环境国家重点实验室 (哈尔滨工业大学) 开放课题 (HCK201018).

作者简介: 赵鑫 (1982—), 男, 博士研究生;

邢德峰 (1977—), 男, 副教授, 博士生导师;

任南琪 (1959—), 男, 博士生导师, 中国工程院院士.

生物制氢技术具有清洁能源生产和环境友好等特点引起广泛关注^[1-2]. 近年来, 国内外关于生物制氢的研究主要集中在反应器开发、运行工艺优化调控、产氢群落及其高效菌种和产氢代谢机制等方面. 其中在产氢细菌分离和培养方面已有大量的研究成果报道^[3-10]. 如任南琪^[11]等人早

在上个世纪 90 年代就已经率先开展活性污泥法生物制氢研究,完成了生物制氢示范工程,发现了一个不同于传统丁酸型发酵的全新产氢发酵类型——乙醇型发酵^[12]. 2005 年邢德峰等分离并获得了乙醇型发酵的主要产氢功能细菌,并确立新的种属——哈尔滨产乙醇杆菌 (*Ethanoligenens harbinense*)^[13-14].

菌株 YUAN-3^[14] 是本实验室从生物制氢反应器中分离得到的一株高效产氢菌株. 经过 16S rRNA (GenBank 注册号 AY295777) 比对与最相近的柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*) 相似性仅为 92%, 为一个全新的菌属, 命名为产乙醇杆菌属, YUAN-3 为模式菌株, 它是已报导中唯一一株具有自凝集能力的产氢细菌, 代谢末端产物为乙醇、乙酸、H₂、CO₂, 已报道最大比产氢率可达 1.9 mol/mol - glucose^[15].

哈尔滨产乙醇杆菌产氢过程进行乙醇型代谢, 在发酵末端产物、pH 值和产氢能力等诸多方面都不同于传统的丁酸型发酵体系, 因而其产氢过程中很多机理亟需探讨. 在前期研究中, 林海龙^[16] 等克隆得到了该菌属另一菌株 B49 的乙醇脱氢酶、乳酸脱氢酶等关键代谢酶, 但是仍没能够更确切地诠释这一新的代谢类型. 因此, 构建哈尔滨产乙醇杆菌属模式菌株 YUAN-3 的基因组文库, 寻找更多的关键酶和功能基因, 可以更好地了解乙醇型产氢发酵代谢和生理生化特征.

1 试 验

1.1 材料

菌株和质粒: *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 由本实验室保存; 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 和质粒 pUC 19 购自大连 TaKaRa 生物公司.

酶和主要试剂: *Sau* 3A I、*Bam*H I 限制性内切酶、T4 连接酶、碱性磷酸酶 (CIAP)、DNA Marker、Taq 酶等购自大连宝生物公司; Tris、Amp 抗生素、IPTG、X-gal 购自 Sigma 公司; 氯仿、饱和酚等购自上海生工公司. DNA 抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司.

培养基: 产氢液体培养基为 LM-1 培养基^[17]; 大肠杆菌使用 LB 培养基培养^[18].

1.2 方法

1) 基因组 DNA 的提取

在有 10 mL LM-1 培养基的厌氧管中, 按照 1:100 的比例接入菌株 YUAN-3, 37 °C 下 140 r/min 培养 52 h, 待菌体形成大的絮凝颗粒产生较多氢气时, 用离心管收集菌体, 12 000 r/min 离心 1 min 去上清, 用 PBS 重悬洗两次, 取沉淀按照上海华舜公司的

DNA 抽提试剂盒说明抽提总 DNA.

2) 基因组酶切制备 DNA 片段

基因组 DNA 40 μ L, *Sau* 3A I 1 μ L, 10 \times H Buffer 5 μ L, 用 ddH₂O 补足 50 μ L 体系, 酶切 30 min. 用 0.9% 的琼脂糖电泳, 切胶取 1 000 ~ 7 500 bp 的片段, 按照胶回收试剂盒说明书进行胶回收, 用 0.9% 的琼脂糖电泳检测回收效果.

3) 载体 pUC 19 的酶切和去磷酸化

按照 pUC 19 质粒 10 μ L, *Bam*H I 酶 2 μ L, 10 \times H Buffer 3 μ L, ddH₂O 15 μ L 配成 30 μ L 体系, 37 °C 酶切 2 h, 用 0.9% 的琼脂糖检测酶切结果, 用未经酶切的质粒做对照. 使用 CIAP 2 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 酶切的 pUC 19 质粒 26 μ L, ddH₂O 17 μ L 配成 50 μ L 体系. 37 °C 反应 30 min, 0.9% 的琼脂糖电泳胶回收.

4) 载体与回收片段的连接

将回收的片段 10 μ L, 酶切 pUC 19 载体 1 μ L, T4 连接酶 2 μ L (15 U/ μ L), 10 \times T4 DNA Ligase Buffer 2 μ L, 50% PEG 1 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L, 16 °C 连接过夜.

5) 连接产物的转化和重组子筛选

热击转化参考文献 [19], 热击 90 s. 在其中加入 900 μ L 的 LB 培养基, 37 °C 140 r/min 培养 2 h, 取 100 μ L 菌液涂布在固体 LB 培养基表面, 其中包括 100 μ g/mL 的 Amp, 24 μ g/mL 的 IPTG 和 40 μ g/mL 的 X-Gal. 用封口膜封好后, 倒置放入 37 °C 恒温箱中过夜培养 20 h.

6) 重组质粒的鉴定

经蓝白斑筛选后, 随机选取 200 个白色单菌落, 每个单菌落先挑出一部分到事先分装好的 1 mL 的 LB 培养基中 (含有 100 μ g/mL 的 Amp), 另一部分挑入配好的 PCR 体系中, PCR 反应体系为 25 μ L, 使用 M13 通用引物; 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 接下来进行 30 个循环反应: 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 3 min; 72 °C 最终延伸 10 min. 然后使用 0.9% 的琼脂糖电泳检测结果. 在离心管中的培养液送入 37 °C 摇床, 140 r/min 培养 3 h. 对琼脂糖电泳结果中出现目标条带的菌液送至上海生工公司测序.

7) 序列结果分析

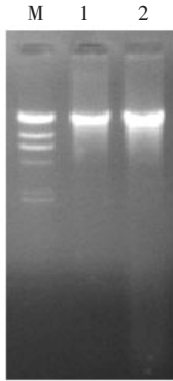
由生物公司测序结果在 NCBI 的核酸和蛋白质序列数据库进行比对分析.

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取和不完全酶切

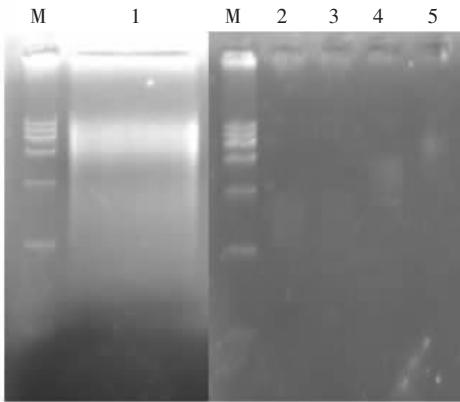
构建基因组文库的关键和前提是得到大量的

高质量基因组 DNA。为得到适于构建文库的部分消化产物, DNA 初始长度至少应是用于克隆片段的 4 倍, 否则酶切连接后产生的有效片段较少。本实验在部分酶切时选择较高浓度的 DNA 酶切结果, 分别切取在 1 000 ~ 7 500 bp 左右的片段进行回收。(基因组电泳见图 1, 部分酶切和胶回收结果见图 2)



M: λ -Hind III; 1, 2: 基因组 DNA。

图 1 基因组 DNA 组抽提结果



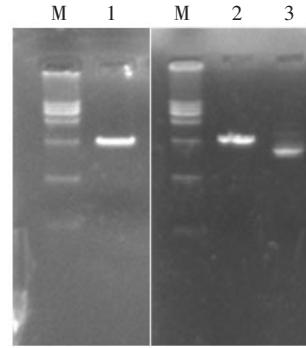
M: DL-15000; 1: *Sau*3A I 酶切 DNA; 2~5: 分别回收的 1.0~7.5 kb DNA 片段。

图 2 *Sau*3A I 酶切 DNA 及胶回收结果

2.2 质粒 pUC 19 的酶切和去磷酸化

由于限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sau*3A I 具有同样的黏性末端, 酶切后所产生的黏性末端能够很好地连接, 因而选用 *Bam*H I 切割质粒 pUC 19 (酶切结果如图 3 所示)。在质粒的提取过程中, 由于机械力、酸碱度或试剂的原因, 可能会使质粒 DNA 链发生不同程度的断裂。所以, 多数质粒抽提物种含有 3 种构型的质粒: 共价闭合环状 DNA (cccDNA), 质粒的两条链没有断裂, 超螺旋状态; 开环 DNA (ocDNA), 质粒的一条链断裂, 松弛的环状分子; 线性 DNA (lDNA), 质粒的两条链均断裂, 线性分子。由于不同构象的质粒电泳迁移率不同, 会呈现出 3 条荧光带, 其中超螺旋状态的质粒

迁移速率较快, 因此会在最前端, 如图 3 中泳道 3 所示, 超螺旋状态的质粒数量最多, 也证明提取的质粒的完整性较高; 经过酶切后质粒被切成相同的直线型构象, 所以只在 2.7 kb 处有唯一一条带。为了降低酶切后质粒的自连, 提高连接效率, 实验采用碱性磷酸酶 (CIAP) 对酶切后的质粒进行去磷酸化。在蓝白斑筛选重组子时计算白斑所占比例将近 95%, 说明载体酶切后的去磷酸化取得了很好效果。如图 3 所示。



M: DL-15000; 1: 酶切的 pUC 19; 2: 去磷酸化的 pUC 19; 3: pUC 19。

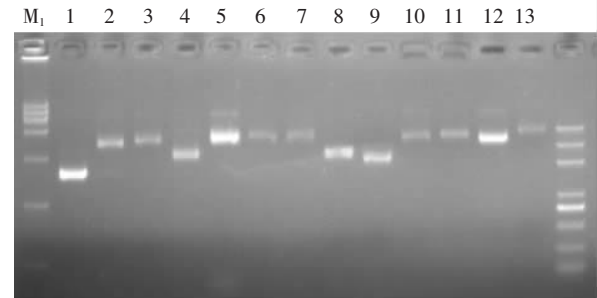
图 3 *Bam*H I 酶切 pUC 19 及去磷酸化结果

2.3 基因文库容量计算

根据公式 $N = \ln(1 - P) / \ln[1 - (I/G)]$ (N 为转化子数, P 为获得目的基因的可能性, 一般为 99%, I 为克隆片段的平均大小, G 为基因组大小, 虽然产乙醇杆菌属基因组大小没有完全确定, 但是有报道的最相近的梭菌属菌株平均的基因组为 4.6 Mb^[20]), 获得目的基因的可能性为 99% 时, 所需的最小基因文库的转化子数量为 6.9×10^3 个, 本实验转化得到 9×10^3 多个转化子, 大于目标要求, 说明具有较高的库容量。

2.4 重组子鉴定

随机挑取的白色菌落培养, 提取的重组质粒, 电泳迁移率均小于载体 pUC 19, 证明均有外源基因插入。如图 4 所示。



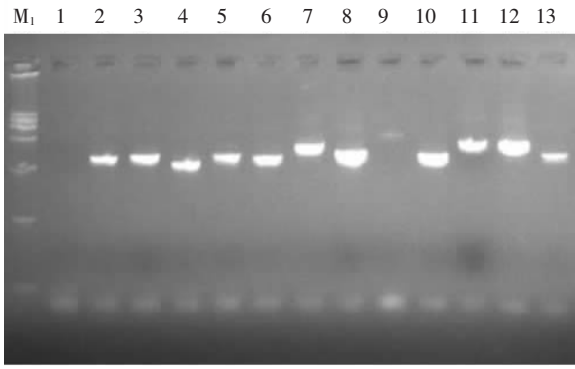
M₁: DL-15000; M₂: DL2000 Plus; 1: pUC 19; 2~13: 重组质粒。

图 4 抽提重组质粒结果

2.5 新基因的发现

随机挑取 200 个白色菌落, 经过菌落 PCR 检查

有重组子样品送出测序. 菌落 PCR 结果如图 5 所示.



M₁:DL-15000;1:空白对照;2~13:基因组文库菌落 PCR.

图 5 重组质粒菌落 PCR 电泳图

测序结果使用 NCBI 的 nucleotide blast 和 blastx 比对分析,200 个测序结果中,大多数片段

与一些经过全基因组测序之后的细菌的假想蛋白 (hypothetical protein) 相似性很高,很多相似性在 90% 以上. 在比对结果中,有 49 个包含功能蛋白基因的片段,其中涵盖较大的如表 1 所示. 这些片段特别是与数据库中一些梭菌属的对应基因有很高的相似性和亲缘性.

这些片段中,有 5 个包含了完整基因的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF): polysaccharide transporter、IstB helper protein、acetylmithine aminotransferase、hemerythrin-like metal-binding protein、phi13 family major tail protein. 使用 Cas-sette PCR 技术又获得了 hydroxylamine reductase 和 TerL 两个功能基因的 ORF,并将序列提交到 NCBI 数据库中,结果如表 2 所示.

表 1 相似性较高的功能片段名称

片段名称	最相近菌株	相似性/%
polysaccharide transporter	<i>Streptococcus gordonii</i> str. Challis substr. CH1	56
IstB helper protein	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	74
hydroxylamine reductase	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	93
TerL	<i>Clostridium botulinum</i> NCTC 2916	78
acetylmithine aminotransferase	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 7 AP76	68
ABC transporter related protein	<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	79
xylose isomerase domain-containing protein	<i>Candidatus Desulforudis audaxviator</i> MP104C	66
HK97 family major capsid protein	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	94
phi13 family major tail protein	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	95
SNF2 domain-containing protein	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	90
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	95
DNA topoisomerase III	<i>Clostridiales bacterium</i> 1_7_47_FAA	82
cystathionine gamma-synthase	<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	81
Acetyltransferase	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	71
hemerythrin-like metal-binding protein	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10	68
pyruvate/ferredoxin oxidoreductase	<i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328	82
guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolase	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	72
recombination & DNA strand exchange inhibitor protein	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	71
anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	89

表 2 获得完整开放阅读框的基因

基因名称	ORF 碱基数	编码氨基酸数	NCBI 登录号
polysaccharide transporter	1 431	476	FJ873726
IstB helper protein	798	265	FJ873727
hydroxylamine reductase	1 632	543	FJ873728
TerL	1 410	470	FJ889127
acetylmithine aminotransferase	1 191	396	FJ889128
phi13 family major tail protein	597	198	FJ889126
hemerythrin-like metal-binding protein	402	133	FJ859986

3 讨论

哈尔滨产乙醇杆菌经前期研究发现是不同于传统丁酸发酵产氢细菌的新型产氢菌属,它进行特有的乙醇型发酵,在低 pH 条件下具有较高产氢率,且产氢能力与丁酸发酵类型相当.因此推断该菌属可能会存在不同于已知丁酸发酵产氢细菌的代谢途径.

本研究构建了哈尔滨产乙醇杆菌属模式菌株 YUAN-3 的基因组文库,文库容量达到理论要求.对其中 200 个序列进行测序比对分析,并结合 Cassette PCR 技术共获得 7 个基因的开放阅读框.从 200 个序列比对的结果可以分析出,这些功能基因大多与梭菌属有很高的相似性和同源性.两个菌属的细菌在发酵产氢时代谢类型不同,但从很多测序结果的高度相似性可以推断,一定存在着某些特殊的功能基因或酶在关键的节点改变了细菌的代谢流,进而影响了两个菌属细菌的发酵类型和末端产物,从而产生了不同的发酵类型.对这一特殊菌属的细菌进行全基因组测序分析将有助于了解其不同于传统的发酵类型,并可能推断出新的代谢途径,为此全基因组序列分析工作将逐步在后续研究中开展.

参考文献:

- [1] DAS D, VEZIROLU T N. Hydrogen production by biological processes; A survey of literature [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2001, 26:13-28.
- [2] KOTAY S M, DAS D. Biohydrogen as a renewable energy resource - prospects and potentials [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33:258-263.
- [3] OH Y K, SEOL E H, KIM J R, et al. Fermentative bio-hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19 [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2003, 28:1353-1359.
- [4] OH Y K, SEOL E H, LEE E Y, et al. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4 [J]. International Journal Hydrogen Energy, 2002, 27:1373-1379.
- [5] KUMAR N, DAS D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT - BT08 [J]. Process Biochemistry, 2000, 35:589-593.
- [6] YOKOI H, TOKUSHIGE T, HIROSE J, et al. Hydrogen production by immobilized cells of *Enterobacter aerogenes* strain HO - 39 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83(5):481-484.
- [7] TAGUCHI F, CHANG J D, MIZUKAMI N, et al. Isolation of a hydrogen - producing bacterium *Clostridium beijerinckii* strain AM21B, from termites [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39:726-730.
- [8] 李宇亮, 李小明, 郭亮, 等. 高效产氢菌株 *Enterococcus* sp. LG1 的分离及产氢特性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9):1373-1378.
- [9] TANISHO S, SUZUKIY, WAKAO N. Fermentative hydrogen evolution by *enterobacter aerogenes* strain E82005 [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 1987, 12(9):623-627.
- [10] 林明. 高效产氢发酵新菌种的产氢机理及生态学研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2002.
- [11] REN N, WANG B, MA F. Hydrogen bio - production of carbohydrate fermentation by anaerobic activated sludge process [C]//Proceedings of the 68th Annual Water Environment Federation Conference and Exposition. Water Environment Federation. Alexandria, VA: [s. n.], 1995:145-153.
- [12] REN N, WANG B, HUANG J. Ethanol - type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 54:428-433.
- [13] REN N, XING D, RITTMAM B E, et al. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio - hydrogen production [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(5):1112-1125.
- [14] XING D, REN N, LI Q, et al. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56:755-760.
- [15] XING D, REN N, WANG A, et al. Continuous hydrogen production of auto - aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN - 3 under non - sterile Condition [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2008, 33:1489-1495.
- [16] 林海龙, 任南琪, 郑国香, 等. 高效产氢菌 B49 菌株 adh 和 L - ldh 基因克隆及序列分析[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5):788-797.
- [17] 林明, 任南琪, 马汐平, 等. 产氢发酵细菌培养基的选择和改进[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 35(4):398-402.
- [18] 孙继华, 申佩弘, 武波. 一株新的耐辐射菌 WGR702 的分离鉴定及耐辐射特性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8):1214-1218.
- [19] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等, 译. 北京:科学出版社, 1999.
- [20] WILKINSON S R, YOUNG M. Wide diversity of genome size among different strains of *Clostridium acetobutylicum* [J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(5):1069-1076. (编辑 刘 彤)