

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 19/42

C12N 5/10 C12N 9/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816355.9

[43] 公开日 2004 年 11 月 10 日

[11] 公开号 CN 1545556A

[22] 申请日 2002.8.20 [21] 申请号 02816355.9

[30] 优先权

[32] 2001.8.22 [33] DE [31] 10141131.6

[32] 2001.10.11 [33] DE [31] 10150323.7

[86] 国际申请 PCT/EP2002/009271 2002.8.20

[87] 国际公布 WO2003/018825 德 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.20

[71] 申请人 巴斯福股份公司

地址 德国路德维希港

[72] 发明人 A·金克尔 H·巴尔格 D·耶恩

J-H·马腾斯 M·瓦伦

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

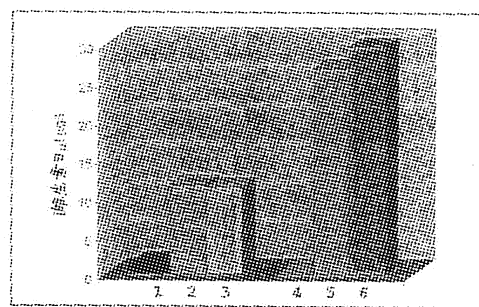
代理人 黄革生 魏永良

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 6 页

[54] 发明名称 制备维生素 B12 的方法

[57] 摘要

本发明涉及用巨大芽孢杆菌制备维生素 B12 的方法。



ISSN 1008-4274

1. 用包含巨大芽孢杆菌的培养物制备维生素 B12 的方法，其中发酵是在需氧条件下于至少含有钴和/或至少含有钴和 5-氨基乙酰丙酸的培养基中进行的。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中钴以约 200 至 750 μM 的浓度范围加入，优选地以约 250 至 500 μM 的浓度范围加入。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 5-氨基乙酰丙酸以约 200 至 400 μM 的浓度范围加入，优选地以约 300 μM 的浓度加入。
4. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法，其中发酵是在含有甘油作为碳源的培养基中进行的。
5. 如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的方法，其中发酵第一步在需氧条件下进行，且第二步在厌氧条件下进行。
6. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的方法，其中从需氧发酵到厌氧发酵的转变发生在需氧发酵细胞的指数生长期。
7. 如权利要求 1 至 6 中任意一项所述的方法，其中从需氧发酵到厌氧发酵的转变发生在需氧发酵细胞指数生长期的中期或末期，优选地在末期。
8. 如权利要求 1 至 7 中任意一项所述的方法，其中一旦需氧培养物达到其最大光密度或光密度至少在约 3 至 12 的范围时将需氧发酵转变为厌氧发酵。
9. 如权利要求 1 至 8 中任意一项所述的方法，其中 *cobA* 基因显示增强的表达和/或 *cobA* 基因以增加的拷贝数存在的巨大芽孢杆菌菌株用于发酵。
10. 用于如权利要求 1 至 3 或 5 至 9 中任意一项所述方法中的经转化巨大芽孢杆菌菌株，它显示来自巨大芽孢杆菌的编码 S-腺苷甲硫氨酸-尿嘧啶原 III 甲基转移酶的 *cobA* 基因的核苷酸序列表达增强和/或拷贝数增加。
11. 来自巨大芽孢杆菌的编码 S-腺苷甲硫氨酸-尿嘧啶原 III 甲基转移酶的、在需氧条件下表达的 *cobA* 基因的核苷酸序列的用途，用于产生如权

利要求 10 中所述的经转化巨大芽孢杆菌菌株。

12. 如权利要求 10 所述的经转化巨大芽孢杆菌菌株的用途, 用于制备维生素 B12。

制备维生素 B12 的方法

本发明涉及用巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 制备维生素 B12 的方法。

早在本世纪三十年代, George Minot 和 William Murphy 通过维生素 B12 在人体中的作用而间接发现了维生素 B12 (Stryer, L., 1988, 生物化学 (Biochemie), 第四版, 528-531 页, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 柏林, 纽约)。在 1948 年, 维生素 B12 首次得到纯化和分离, 而直到八年后的 1956 年, Dorothy Hodgkin 才阐明了维生素 B12 复杂的三维晶体结构 (Hodgkin, D.C. 等人, 1956, 维生素 B12 的结构 (Structure of Vitamin B₁₂), 自然 (Nature), 176, 325-328 和 自然, 178, 64-70)。维生素 B12 生物合成的天然最终产物是 5'-脱氧腺苷钴胺素 (辅酶 B12) 和甲基钴胺素 (MeCbl), 然而维生素 B12 被定义为氰钴胺素, 这是工业上制备和处理的主要形式。在本发明中, 除非专门指出, 维生素 B12 总是指所有这三种类似分子。

100 多年前 (1884) De Bary 首次对巨大芽孢杆菌这一物种进行了描述。尽管通常将巨大芽孢杆菌归类于土壤细菌, 但在多种其它生境如海水、沉积物、水稻、干肉、牛奶或蜂蜜中也可检测到巨大芽孢杆菌。巨大芽孢杆菌通常与假单胞菌属 (*pseudomonads*) 和放线菌属 (*actinomyces*) 相关联。象它的近亲枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 一样, 巨大芽孢杆菌是革兰氏阳性细菌, 并且可以通过, 特别是通过其相对明显的个体大小 $2 \times 5 \mu\text{m}$, 据此而得名巨大芽孢杆菌, 约 38% 的 G+C 含量和很强的芽孢形成能力辨别出来。在生长培养基中即便是微量的锰也足以使巨大芽孢杆菌进行完全的芽孢形成, 这种能力只有一些嗜热细菌 (*thermophilic bacilli*) 的芽孢形成效率能比得上。正是由于它的大小和非常有效的芽孢形成和发芽能力, 针对巨大芽孢杆菌中这些过程的分子基础开展了不同的研究, 以至于目前已有 150 多个涉及芽孢形成和发芽的巨大芽孢杆菌基因得以阐述。

关于巨大芽孢杆菌的生理学方面的研究 (Priest, F.G. 等人, 1988, 芽孢杆菌属的一种数值分类法 (A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*), 普通微生物学杂志 (J. Gen. Microbiol.), 134, 1847-1822) 将这一物种归类于专性需氧的芽孢形成菌, 该类细菌为尿素酶阳性和伏-波试验阴性, 且不能够还原硝酸盐。巨大芽孢杆菌最显著的特征之一是它利用大量碳源的能力。因此它可以利用大量的糖并且发现存在于如玉米糖浆、肉类加工业的废弃物甚至石油化学废弃物中。鉴于其能够代谢极广泛碳源的能力, 巨大芽孢杆菌可以不受限地等同于假单胞菌属 (Vary, P. S., 1994, 微生物学 (Microbiology), 40, 1001-1013, 研究巨大芽孢杆菌的全盛期 (Prime time for *Bacillus megaterium*))。

在各种各样的酶、维生素等的工业生产中广泛应用巨大芽孢杆菌的优点是多样的。这些优点包括, 其中首要且确定的优点是转化进巨大芽孢杆菌的质粒的环境证明是很稳定的。这被认为是与迄今已建立起来的例如用聚乙二醇处理来转化这一物种的可行性有直接关系。直到几年前, 转化的可行性仍然是利用巨大芽孢杆菌作为生产菌株的一个主要障碍。认为相对充分研发的遗传学的优势与转化的可行性相关联, 在芽孢杆菌属中这一点只有枯草芽孢杆菌超过了它。第二, 巨大芽孢杆菌没有碱性蛋白酶, 所以在产生异源蛋白质时几乎不发生降解作用。另外我们还知道巨大芽孢杆菌可高效分泌一些具有商业价值的产物, 如利用它生产 α -和 β -淀粉酶。而且, 巨大芽孢杆菌的大小使它能够在达到致死的过密种群密度之前积累大量的生物量。在用巨大芽孢杆菌进行工业生产中一个更有利且非常重要的情况是该物种能够从废弃物和低质量物质中制备高价值和非常高质量的产品。巨大芽孢杆菌的这种能够代谢极广泛底物的能力也反映在它可以作为土壤解毒菌的用途上, 它甚至可以分解各种氰化物、除草剂和残留性农药。最后, 巨大芽孢杆菌完全是非病原性的且不产生毒素, 这是非常重要的, 尤其是在生产食品和化妆品方面。正是由于以上这些优点, 巨大芽孢杆菌已经广泛应用于大量工业生产, 如生产 α -和 β -淀粉酶、青霉素酰胺酶、有毒废弃物的处理或需氧维生素 B12 的生产 (总结见 Vary, P. S., 1994, 微生物学, 40, 1001-1013, 研究巨大芽孢杆菌的全盛期 (Prime time for

Bacillus megaterium))。

由于在用生物技术生产各种具有工业利益的产品时，巨大芽孢杆菌具有大量优点，因此巨大芽孢杆菌的使用就具有了巨大的经济利益。因此，在用巨大芽孢杆菌制备维生素 B12 时，优化发酵条件和进行分子遗传学改造就具有巨大的商业利益。

本发明的一个目的是用巨大芽孢杆菌优化维生素 B12 的制备。

我们已经发现通过使用一种含有巨大芽孢杆菌的培养物制备维生素 B12 的方法可以达到这个目的，其中发酵作用在需氧条件下进行，并且培养基中至少含有钴和/或至少含有钴和 5-氨基乙酰丙酸。

为了本发明的目的，原则上可使用所有适于作为维生素 B12 的生产菌的普通巨大芽孢杆菌。为了本发明的目的维生素 B12 的生产菌是指巨大芽孢杆菌菌株或同源微生物，它们已经用经典方法和/或分子遗传学方法进行了改造，使它们的代谢流向在生物合成维生素 B12 或其衍生物的方向上得以增加(代谢工程)。例如，在这些生产菌中将一个或多个位于代谢途径关键位置上的基因和/或相应的酶进行调节上修饰或甚至去调节，其中所述的基因和/或相应的酶是至关重要的并受到相应的复杂的调节作用(瓶颈)。在这方面本发明包含了所有以前已知的维生素 B12 生产菌，优选地为芽孢杆菌属或同源生物。根据本发明这些具优势的菌株包括，特别是包括巨大芽孢杆菌的 DSMZ 32 菌株和 DSMZ 509 菌株。

在制备维生素 B12 的本发明方法的一个改变形式中，以从约 200-750 μM 之间的浓度范围加入钴，优选地从约 250-500 μM 之间。

在本发明方法的一个进一步改变形式中，加入了 5-氨基乙酰丙酸，其浓度范围从约 200-400 μM ，优选地约 300 μM 。

根据本发明，通过单一或组合地加入诸如甜菜碱、甲硫氨酸、谷氨酸(glutamate)、二甲基苯并咪唑或胆碱这种优化方式使用巨大芽孢杆菌，也可改进维生素 B12 的制备。

根据本发明，发酵作用发生在包含以葡萄糖作为碳源的培养基中。在本发明方法的一个特别有利的改变形式中，发酵作用发生在包含以甘油为碳源的培养基中。

以甘油为碳源的巨大芽孢杆菌发酵作用比以葡萄糖为碳源的发酵作用通常能够达到较高的细胞密度。在这方面，令人感兴趣的是在需氧发酵条件下加入钴和 5-氨基乙酰丙酸的培养基比不加这些添加物的相应培养基可以达到较高的维生素 B12 产量。

根据本发明，通过将发酵巨大芽孢杆菌的生长条件从需氧转变成厌氧可以进一步提高维生素 B12 的产量。根据本发明，使用含有甘油、钴和 5-氨基乙酰丙酸的培养基也证明是特别有利的。在需氧条件下，实施发酵作用优选地加入大约 250 μM 的钴，而在厌氧条件下加入大约 500 μM 的钴则有利。

将培养物从需氧转变成厌氧生长条件使得同时获得高维生素 B12 含量和高细胞密度成为可能。

本发明因此也涉及到这样一种方法，其中发酵的第一步在需氧条件下进行，第二步则在厌氧条件下进行。

在本发明的一个特殊的改变形式中，发酵作用从需氧到厌氧的转变发生在需氧发酵细胞的指数生长期。本发明的进一步改变形式提供了一种方法，这种方法就是使从需氧到厌氧发酵的转变发生在需氧发酵细胞指数生长期的中期或末期，优选地是在末期。在这方面本发明优选的方法是—旦需氧培养物达到最大的光密度就将发酵作用转变成厌氧，但光密度至少要达到约 2-3。

为了本发明的目的，厌氧条件是指将需氧培养后的细菌转移到厌氧瓶并在其中发酵时的种种条件。这就意味着在细菌只消耗厌氧瓶里存在的氧，而不再进一步供氧。这些条件也可以说成是半厌氧。相应的步骤是常规的实验室操作并且为技术人员所熟知。起初将细菌在发酵罐里进行需氧发酵然后将氧的供应逐渐减少并最终建立起半厌氧条件也是一种流行的相似方法。在本发明的一个特殊改变形式中，例如通过向培养基中加入还原剂建立严格的厌氧条件也是可能的。

根据本发明，发酵培养基含有作为碳源的葡萄糖。本发明方法的一个有利的改变形式包含巨大芽孢杆菌在含甘油的培养基中进行发酵。另一个更有利的改变方式涉及到一种发酵培养基，在这种培养基中含有作为碳源

的葡萄糖或甘油，并且至少含有钴和/或钴和 5-氨基乙酰丙酸作为添加物。这种两阶段方法能够使维生素 B12 的产量比完全在需氧条件下至少增加 2.6 倍。如果培养基中含有葡萄糖、钴和 5-氨基乙酰丙酸，则两阶段发酵有可能使维生素 B12 的产量比完全需氧条件下增加至少 2.2 倍。

根据本发明，通过使用经遗传学操作的巨大芽孢杆菌菌株，也能进一步提高维生素 B12 的产量。通过经典的诱变或靶向分子生物学技术和恰当的选择方法可产生这种遗传修饰的细菌菌株。靶向遗传学操作的令人感兴趣的起始点特别是导致维生素 B12 分支的生物合成途径的点，通过它可使代谢流向有意地引导到维生素 B12 最大产量一方。

涉及代谢流向调节作用的基因的靶向修饰也包括对结构基因上游和下游调节区的研究和改变，比如对启动子、增强子、终止子、核糖体结合位点等的优化和/或互换。本发明也包括提高 DNA、mRNA 或由它们编码的蛋白质的稳定性，例如通过降低或阻止核酸酶或蛋白酶的降解作用。

根据本发明，在这方面还包括多肽，与相应的原始蛋白质相比这些多肽的活性已经被减弱或增强，例如通过氨基酸互换的方法。该方法同样应用于细胞内的本发明酶的稳定性，这些酶对于蛋白酶降解的敏感性例如有所增强或减弱。

本发明也涉及到相应的多肽，这些多肽的氨基酸序列已经经过修饰以至于它们对具有调节活性的化合物，如调节它们活性的代谢终产物是不敏感的（反馈脱敏）。

本发明也涉及到一种制备维生素 B12 的方法，在这种方法中用于发酵的巨大芽孢杆菌菌株的 *cobA* 基因表达增强和/或拷贝数增加。因此，使维生素 B12 的产量增加至少 2 倍是可能的。

通过增加适当基因的拷贝数可以提高基因的表达（过表达）。以适当的方式修饰位于结构基因上游的启动子区和/或调节区和/或核糖体结合位点来增加表达效率也是进一步可能的。整合到结构基因上游的表达盒也能够以同样的方式发挥作用。此外，在维生素 B12 的生产中，通过诱导型启动子来增加表达也是可能的。

通过延长 mRNA 的寿命同样可以提高表达。这些基因或基因构建体或者

以不同拷贝数存在于质粒上或者整合到染色体上并得到扩增。

通过抑制酶蛋白质的降解作用提高或增强酶自身的活性也是进一步可能的。通过改变培养基的成分和培养物的处理方法也是获得相应基因过表达的另一可供选择的可行方法。

本发明包括这样的基因结构,该结构包含巨大芽孢杆菌 *cobA* 基因的核苷酸序列或其部分以及与其可操作连接并具有调节功能的核苷酸序列,其中所述 *cobA* 基因编码在需氧条件下表达的 S-腺苷甲硫氨酸-尿嘧啶原 III 甲基转移酶 (SUMT)。

可操作地连接是指诸如启动子、编码序列、终止子和合适时进一步的调节元件的按序排列,这种排列使得在编码序列的表达过程中这些调节元件中的每一个都可以发挥其适当的功能。这些调节性核苷酸序列可以是天然来源的,或是通过化学合成获得的。合适的启动子原则上是指能在适宜的宿主生物中控制基因表达的任何启动子。根据本发明,启动子也可能是化学诱导的启动子,该启动子能够控制受其调控的基因在宿主细胞特定时期表达。 β -半乳糖苷酶或阿拉伯糖系统在此作为实例被提到。

通过常规的重组和克隆技术将合适的启动子和至少一个本发明的核苷酸序列融合构建了基因结构,这些重组和克隆技术是由诸如 Sambrook, J. 等人在分子克隆: 实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约 (1989) 一书中描述。

连接物或接头可以附加到片段中用于将 DNA 片段连接起来。

本发明还包括载体,所述载体包含 *cobA* 基因的核苷酸序列或其部分核苷酸序列或包含上述类型的基因结构,还包含一些额外的核苷酸序列,这些额外的核苷酸序列是用于选择、用于在宿主细胞内复制和/或整合到宿主细胞基因组。目的基因在巨大芽孢杆菌中转化和过表达的适宜体系为诸如 pWH1510 和 pWH1520 质粒以及无质粒的过表达巨大芽孢杆菌菌株 WH320,这些是由 Rygus T. 等人描述的 (1991, 利用木糖操纵子的调节元件在巨大芽孢杆菌中诱导异源基因的高效表达 (Inducible High-Level Expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the Regulatory Elements of the Xylose-Utilization Operon), 应用微生物学和生物技

术 (Appl. Microbiol. Biotechnol.), 35, 594-599)。根据本发明, 巨大芽孢杆菌菌株 DSMZ509 是有利的。然而, 所提到的体系不用于限制本发明。

本发明进一步涉及到用于上述类型方法中的已经转化了的巨大芽孢杆菌菌株, 这种菌株的不同之处在于它使编码 S-腺苷甲硫氨酸-尿嘧啶原 III 甲基转移酶的 *cobA* 基因的核苷酸序列得到增强的表达和/或拷贝数得到增加。

根据本发明, 在这方面还包括这样的经转化巨大芽孢杆菌菌株, 该菌株具有上述类型的基因结构或载体的复制型, 其中所述基因结构或载体包含来源于巨大芽孢杆菌的编码在需氧条件下表达的 S-腺苷甲硫氨酸-尿嘧啶原 III 甲基转移酶的 *cobA* 基因。而包含于上述类型的基因构建体或载体中的 *cobA* 基因在需氧和厌氧条件下均可表达。

本发明包括了适宜用于维生素 B12 生产的所有巨大芽孢杆菌菌株。这些菌株也可能是经过遗传学修饰的细菌菌株, 它们通过经典诱变方法或靶向分子生物学技术和适合的选择方法产生。

靶向遗传学操作的令人感兴趣的起始点特别是导致维生素 B12 分支的生物合成途径的点, 通过它可使代谢流向有意地引导到维生素 B12 最大产量一方。

本发明的一种改变形式包括转化了的巨大芽孢杆菌菌株, 该菌株的不同之处在于根据本发明它在需氧发酵条件下显示出比未转化的菌株增加维生素 B12 的产量, 未转化的菌株即它不含有 *cobA* 基因、不含有上述类型的基因构建体或载体。

在本发明方法的一种改变形式中, 优选地将已经转化了的巨大芽孢杆菌菌株在含葡萄糖的培养基中发酵。含有甘油作为碳源的培养基是特别优选的。本发明方法的一个进一步有利的改变形式包括在除了含有葡萄糖或甘油以外还至少额外含有钴和/或钴和 5-氨基乙酰丙酸的培养基中进行发酵。根据本发明中制备维生素 B12 的方法, 转化了的巨大芽孢杆菌菌株的两阶段发酵也是有利的。

本发明进一步涉及到编码巨大芽孢杆菌 S-腺苷甲硫氨酸-尿嘧啶原 III

甲基转移酶的 *cobA* 基因核苷酸序列的用途, 用于产生上述类型转化了的巨大芽孢杆菌菌株。本发明还包括上述类型的已经转化了的巨大芽孢杆菌菌株的用途, 用于制备维生素 B12。

下面提供示例性的实施方案用于阐明本发明, 并且这些实施方案对本发明没有限制作用。

1. 细菌菌株和质粒

本研究中使用的所有细菌菌株和质粒都列于表 1 和表 2 中。

2. 缓冲液和溶液

2.1 基本培养基

Mopso 基本培养基

Mopso (pH 7.0)	50.0 mM
N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine) (pH 7.0)	5.0 mM
MgCl ₂	520.0 μM
K ₂ SO ₄	276.0 μM
FeSO ₄	50.0 μM
CaCl ₂	1.0 mM
MnCl ₂	100.0 μM
NaCl	50.0 mM
KCl	10.0 mM
K ₂ HPO ₄	1.3 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	30.0 pM
H ₃ BO ₃	4.0 nM
CoCl ₂	300.0 pM
CuSO ₄	100.0 pM
ZnSO ₄	100.0 pM
D-葡萄糖	20.2 mM
NH ₄ Cl	37.4 mM

滴定试剂为 KOH 溶液。

鼠伤寒沙门氏杆菌 (Salmonella typhimurium) 基本培养基

NaCl	8.6 mM
Na ₂ HPO ₄	33.7 mM
KH ₂ PO ₄	22.0 mM
NH ₄ Cl	18.7 mM
D-葡萄糖	20.2 mM
MgSO ₄	2.0 mM
CaCl ₂	0.1 mM

固体培养基中加入 15 g/1 琼脂。

2. 2 用于巨大芽孢杆菌的原生质体转化的溶液SMMP 缓冲液

3号抗生素培养基 (Difco)	17.5 g/1
蔗糖	500.0 mM
马来酸钠 (pH 6.5)	20.0 mM
MgCl ₂	20.0 mM

滴定试剂为 NaOH 溶液。

PEG-P 溶液

PEG 6000	40.0% (w/v)
蔗糖	500.0 mM
马来酸钠 (pH 6.5)	20.0 mM
MgCl ₂	20.0 mM

滴定试剂为 NaOH 溶液。

cR5 上层琼脂

蔗糖	300.0 mM
Mops (pH 7.3)	31.1 mM

NaOH	15.0 mM
L-脯氨酸	52.1 mM
D-葡萄糖	50.5 mM
K ₂ SO ₄	1.3 mM
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	45.3 mM
KH ₂ PO ₄	313.0 μM
CaCl ₂	13.8 mM
琼脂	4.0 % (w/v)
酪蛋白氨基酸	0.2% (w/v)
酵母提取物	10.0 % (w/v)

滴定试剂为 NaOH 溶液。

2. 3 用于制备巨大芽孢杆菌染色体 DNA 的溶液

EDTA 盐 (S-EDTA)

EDTA	80.0 mM
NaCl	150.0 mM

0.1 × SSC 溶液

二水合柠檬酸三钠	1.5 mM
NaCl	50.0 mM

用 HCl 调至 pH7.0。

2. 3 琼脂糖凝胶电泳的溶液和标记物

TAE 缓冲液

Tris 乙酸 (pH=8.0)	40.0 mM
EDTA	1.0 mM

样品缓冲液

溴酚兰	350 μM
-----	--------

二甲苯青 FF	450 μ M
橘黄 G	0.25 % (w/v)
蔗糖水溶液	115.0 mM

溴化乙锭溶液

溴化乙锭水溶液	0.1 % (w/v)
---------	-------------

GeneRuler DNA Ladder 混合物

标记物包括下列片段 (碱基对, bp):

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500,
1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

 λ DNA/Eco91I (BstEII) 标记物

用 Eco91I 完全消化的 λ -DNA 水溶液。标记物包括下列片段 (碱基对, bp):

8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371,
1264, 702, 224, 117

2. 4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 的溶液和标记物丙烯酰胺贮液

丙烯酰胺	39.0 % (w/v)
N, N'-亚甲双丙烯酰胺	1.0 % (w/v)

溶剂是水

浓缩胶缓冲液

SDS	0.4 % (w/v)
Tris-HCl (pH 6.8)	1.5 % (w/v)

溶剂是水

分离胶缓冲液

SDS	0.4 % (w/v)
-----	-------------

Tris-HCl (pH 8.8) 1.5 % (w/v)

溶剂是水

APS 溶液

过硫酸胺 (APS) 10.0 % (w/v)

溶剂是水

浓缩胶 [6% (w/v) 5 块微型胶]

丙烯酰胺贮液 1.5 ml

浓缩胶缓冲液 2.5 ml

去离子水 6.0 ml

TEMED 10.0 μ l

APS 溶液 100.0 μ l

分离胶 [12% (w/v) 5 块微型胶]

丙烯酰胺贮液 6.0 ml

分离胶缓冲液 5.0 ml

去离子水 9.0 ml

TEMED 20.0 μ l

APS 溶液 200.0 μ l

电泳缓冲液

甘氨酸 385.0 mM

SDS 0.1% (w/v)

Tris-HCl (pH 8.8) 50.0 mM

溶剂是水

样品缓冲液

甘油 40% (w/v)

β -巯基乙醇 2.0 mM

SDS 110.0 mM

溴酚兰 3.0 mM

Tris-HCl (pH 6.8) 100.0 mM

染色液

醋酸 10.0 % (v/v)

考马斯亮兰 (G-250) 1.0 g/l

溶剂是水

脱色液

乙醇 30.0 % (v/v)

冰醋酸 10.0 % (v/v)

溶剂是水

道尔顿蛋白质标记物 VII

(每一个表明的是相对摩尔质量 Mr)

α -乳清蛋白 14200

胰蛋白酶抑制剂 20100

胰蛋白酶原 24000

碳酸酐酶 29000

3-磷酸甘油醛脱氢酶 36000

卵清蛋白 45000

小牛血清白蛋白 66000

2. 5 用于蛋白质表达实验的溶液裂解缓冲液

EDTA (pH 6.5) 20.0 mM

Na₃PO₄ 100.0 mM

溶菌酶 5 mg/ml

滴定试剂为 H₃PO₄ 溶液。

2. 6 用于 Southern 印迹分析的溶液变性液

NaOH 500.0 mM

NaCl 1.5 M

中和液

Tris-HCl (pH 7.2) 400.0 mM

NaCl 1.5 M

20 × SSC 溶液

二水合柠檬酸三钠 300.0 mM

NaCl 3.0 M

用 HCl 调至 pH7.0.

10% 封闭试剂

奶粉溶于缓冲液 1 100 g/l

缓冲液 1 (马来酸缓冲液)

马来酸 (pH 7.5) 100.0 mM

NaCl 150.0 mM

NaOH 200.0 mM

用 HCl 调至 pH7.0.

缓冲液 2

溶于缓冲液 1 的 10% 强度的封闭液 100 g/l

缓冲液 3 (检测缓冲液)

Tris-HCl (pH 9.5) 77.0 mM

NaCl 100.0 mM

洗涤缓冲液

吐温 20 溶于缓冲液 1 3 ml/l

预杂交液

20 × SSC	250 ml/l
N-月桂基肌氨酸	3.7 mM
10%强度 SDS	2 ml/l
20%强度封闭液	100 ml/l

杂交液

20 × SSC	250 ml/l
N-月桂基肌氨酸	3.7 mM
10%强度 SDS	2 ml/l
20%强度封闭液	100 ml/l
探针溶液	5 ml/l

3. 培养基和培养基添加剂

3.1 培养基

除非特别声明，均使用 Sambrook J. 等人 (1989, 分子克隆; 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约) 所述的 Luria-Bertani 肉汤 (LB) 完全培养基。对于固体培养基, 需在每升培养基中额外加入 15g 琼脂。

3.2 添加剂

添加剂, 诸如碳源、氨基酸、抗生素或盐, 可以加入到培养基中一起高压灭菌, 或者用水配成浓缩贮液灭菌, 适当时通过过滤除菌。将这些物质加入到已高压灭菌并冷却到 50°C 以下的培养基中。若含有对光敏感的物质如四环素, 要注意在暗处培养。通常使用的终浓度如下:

ALA	298 μM
氯苄青霉素	296 μM
酪蛋白氨基酸	0.025 % (w/v)

CoCl ₂ (在需氧培养物中)	250 μM
CoCl ₂ (在厌氧培养物中)	500 μM
半胱氨酸	285 μM
葡萄糖	22 mM
甘油	217 mM
溶菌酶	1 mg/ml
甲硫氨酸	335 μM
四环素 (在固体培养基中)	23 μM
四环素 (在液体培养基中)	68 μM
木糖	33 mM

4. 微生物学技术

4.1 灭菌

除非特别说明，所有的培养基和缓冲液均在 120℃，1 巴压力下，蒸汽灭菌 20 分钟。对热敏感物质需通过过滤除菌（滤器孔径为 0.2 μm），玻璃器具在 180℃ 高热灭菌至少 3 小时。

4.2 细菌液体培养物的一般生长条件

使用无菌接种环将细菌从 LB 琼脂平板或甘油培养物中取出并放入营养培养基中，如果需要，营养培养基中含有抗生素。

需氧细菌培养物在挡板摇瓶中 37℃ 培养，转速为 180 转/分钟。培养时间根据预期所要达到得细菌培养物的光密度而有所不同。

4.3 巨大芽孢杆菌生长的条件

为了尽可能给需氧培养物通气，巨大芽孢杆菌应在 37℃ 培养于转速为 250 转/分钟的挡板摇瓶中。厌氧培养物在 37℃ 以 150ml 的体积培养于 150ml 的厌氧瓶中，转速为 100 转/分钟。在这两种情况下，都应注意以 1:100 的比例对过夜培养物进行接种，并要使用同过夜培养一致的条件。为了在厌氧条件下获得较高的生物量产量，应将巨大芽孢杆菌培养物进行需氧预培养，并且在达到所预期的密度时改为厌氧生长条件。为了实现该目的，在最初应将巨大芽孢杆菌 37℃ 培养于转速为 250 转/分钟的挡板摇

瓶中。在指数生长期的中期或稳定期的起点，将全部培养物转移到 150ml 的厌氧瓶中并在 37℃，100 转/分钟的条件下继续培养。

4.4 细菌平板培养物

用无菌的接种环从含甘油的培养物中挑取细菌并在 LB 琼脂平板上划线接种，如果需要，该平板中含有合适的抗生素，这样经 37℃ 过夜培养后平板上可见单菌落。如果要使用液体培养物中的细菌，需使用 Drygalski 刮铲将细菌划线于 LB 琼脂平板上并 37℃ 培养过夜。

4.5 细胞密度测定

通过测定 578nm 波长下的光密度 (OD) 来测定细菌培养物的细胞密度，假定 1 OD₅₇₈ 相当于 1×10^9 个细胞。

4.6 细菌的贮存

制备所谓的甘油培养物用来长期贮存细菌。为此，应将 850 μl 细菌过夜培养物与 150 μl 灭菌的 85% 甘油完全混合，然后贮存于 -80℃。

5. 分子生物学方法

DNA 分离和包括限制性酶切、克列诺酶和碱性磷酸酶处理、测序、PCR 等的所有技术都是常规的实验室操作，这些均在 Sambrook J. 等人的关于分子生物学方法的权威著作中有所描述 (1989, 分子克隆; 实验室手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约)。

5.1 将 cob A 克隆入 PWH1520

所使用的克隆和表达载体是 pWH1520 (Rygus 等人, 1991)。PBR322 衍生物具有四环素抗性和氨苄青霉素抗性，并含有在大肠杆菌 (*E. coli*) 和芽孢杆菌亚种 (*Bacillus* spp) 中复制至关重要的元件。该体系可适用所有建立在大肠杆菌中的克隆技术并且同时可用于在巨大芽孢杆菌中进行基因的表达。该载体包含巨大芽孢杆菌的带有相应调节序列的 *xy1* 操纵子的 *xy1A* 和 *xy1R* 基因 (Rygus 等人, 1991)。*xy1A* 基因编码木糖异构酶而 *xy1R* 基因编码一种调节蛋白质，这种调节蛋白质对 *xy1A* 启动子进行强转录调控。当缺乏木糖时，*xy1A* 基因受到 *Xy1R* 的抑制。当加入木糖时，通过 *xy1A* 的去抑制作用可以产生约 200 倍的诱导量。质粒中与 *xy1A* 具有相同阅读框

的多接头使得将靶基因与 *xy1A* 融合在一起成为可能,因此靶基因同样也处于 *Xy1R* 的强转录控制之下。而且,由于位于多接头上游的 *xy1A* 阅读框仍是完整的,所以选择是形成转录融合还是形成翻译融合也是可能的。

为了构建 *cobA* 过表达克隆,已知的序列 (Robin 等人, 1991) 获自巨大芽孢杆菌基因组。用于产生 *CobA* 和木糖异构酶翻译融合的 PCR 引物也源于巨大芽孢杆菌基因组。因此,在表达载体 pWH1520 中,利用了 *xy1A* 基因的核糖体结合序列。在 PCR 引物中加入了一个 *Spe I* 酶切位点和一个 *BamHI* 酶切位点,通过 PCR 从巨大芽孢杆菌基因组 DNA 中扩增了所需的 *cobA* 序列。然后,扩增得到的基因序列和过表达载体 pWH1520 均用 *Spe I* 和 *BamHI* 酶切,连接所产生的粘性末端。分离到一些通过 *Spe I* 和 *BamHI* 消化后能够产生预期大小插入片段的克隆是可能的。通过全部 DNA 序列测定检查克隆的 DNA 的完整性。克隆策略以图表的形式描述于图 5。

5.2 感受态细胞的产生

通过用 LB 培养基培养 500ml 液体培养物,直到 OD_{578} 达到 0.5-1,来生产大肠杆菌和巨大芽孢杆菌感受态细胞。培养物在冰上冷却并离心 (4000 × g; 15 分钟; 4℃)。细胞沉淀物完全重悬于灭菌去离子水,离心 (4000 × g; 8 分钟; 4℃),再用灭菌去离子水洗一遍并再次离心 (4000 × g; 8 分钟; 4℃)。沉淀物用 10%强度 (v/v) 的甘油溶液洗,然后离心 (4000 × g; 8 分钟; 4℃),沉淀物重悬于最小量的 10%强度 (v/v) 的甘油溶液中。大肠杆菌和巨大芽孢杆菌感受态细胞立即用于转化。

5.3 电穿孔法转化细菌

用与脉冲控制仪连接的基因脉冲发生器 (BioRad) 进行电穿孔转化。为了达到该目的,140 μl 大肠杆菌或巨大芽孢杆菌感受态细胞与 1 μg 质粒 DNA 加入到转化杯,将其置于基因脉冲发生器中,在 25 μF 和 200Ω 并联电阻条件 12 kV/cm 的场强下脉冲。

为了随后的恢复,转化后产生的转化细胞立即加入到 1ml LB 培养基中并置于 37℃ 温度摇床中培养半小时,对于巨大芽孢杆菌则培养 1 小时。然后,将不同体积的混合物涂布于含有适当抗生素的 LB 平板上,37℃ 培养过夜。

5.4 巨大芽孢杆菌的原生质体转化

原生质体制备

将 1ml 巨大芽孢杆菌过夜培养物接种于 50ml LB 培养基中，置 37℃ 进行培养。当 OD_{578} 为 1 时，离心细胞 ($10\ 000 \times g$; 15 分钟; 4℃) 并重悬于 5 ml 新鲜制备的 SMMP 缓冲液中。在 SMMP 缓冲液中加入溶菌酶，接着将悬浮物 37℃ 培养 60 分钟，在显微镜下监测原生质体的形成。离心 ($3000 \times g$; 8 分钟; 室温) 收获细胞，然后将细胞沉淀物小心重悬于 5ml SMMP 缓冲液中，重复离心和洗涤步骤一次。当加入 10% (v/v) 甘油后，可以将原生质体悬浮物分装成小份冻于 -80℃。

转化

将 500 μ l 的原生质体悬浮物与 0.5-1 μ g 在 SMMP 缓冲液中的 DNA 进行混合，并加入 1.5 ml PEG-P 溶液。室温孵育 2 分钟后，加入 5 ml SMMP 缓冲液并小心混匀，并将悬浮物离心 ($3000 \times g$; 5 分钟; 室温)。之后，立即去除上清液并且将几乎看不见的沉淀物重悬于 500 μ l SMMP 缓冲液中。悬浮物在 37℃ 轻轻振荡孵育 90 分钟。然后将 50-200 μ l 转化了的细胞与 2.5 ml cR5 上层琼脂混合，铺到含有适于选择的抗生素的 LB-琼脂平板上。37℃ 培养一天后可见到转化了的菌落。

5.5 维生素 B₁₂ 的定量分析

在巨大芽孢杆菌培养物的不同生长期抽取样本用于维生素 B₁₂ 的定量测定。测定 OD_{578} 之后，离心 ($4000 \times g$; 15 分钟; 4℃) 从培养基中分离细胞。用 40 ml 等渗的 NaCl 溶液洗涤，然后再离心 ($4000 \times g$; 15 分钟; 4℃)。随后，所得到的细胞沉淀物和去除的培养基冷冻干燥。鼠伤寒沙门氏杆菌 metE cysG 双突变体接种在含有甲硫氨酸和半胱氨酸的基本培养基中 37℃ 培养过夜，然后从平板上刮下来并用 40ml 等渗的 NaCl 溶液洗涤。离心后，细胞沉淀物重悬于等渗的盐溶液。将洗涤后的细菌培养物小心地与 400 ml 含有半胱氨酸的基本培养基琼脂在 47-48℃ 混合。

已经重悬于灭菌去离子水并经沸水浴 15 分钟后的 10 μ l 巨大芽孢杆菌的样本涂于冷却的平板上，37℃ 孵育 18 小时。长出的沙门氏菌的菌落直径与所用的巨大芽孢杆菌样本中的维生素 B₁₂ 含量成比例。通过加入 0.01、

0.1、1、10 和 40pmol 的维生素 B12 做出校准图，通过与此相比较可以推测出所研究的样本中维生素 B12 的含量。这种标准方法可对生物材料中小量维生素 B12 进行快速和可重复性的监测。

5.6 巨大芽孢杆菌染色体 DNA 的制备

为了得到染色体 DNA，将巨大芽孢杆菌接种于 150 ml LB 培养基中，在 37℃，250 转/分钟的条件培养过夜。离心培养物（4000 × g；10 分钟；4℃）并将细菌沉淀物重悬于 13ml S-EDTA。取一刮铲尖的先前溶于 1ml S-EDTA 内的溶菌酶加入到悬浮物中。再向溶液中加入 800 μl 25%强度的 SDS 溶液，并在温度摇床中 37℃ 孵育 30 分钟。在 65℃孵育 1 小时后将该溶液与 3.5 μl 5 M 的高氯酸钠和 20ml 氯仿/异戊醇（24:1）混合物混合。混合物在 0℃振荡 30 分钟，然后离心（12 000 × g；10 分钟；4℃）。小心取出含有 DNA 的上层相，转移到 50 ml 刻度量筒中并在上面慢慢覆盖一层 30ml 的乙醇。旋转玻璃棒使沉淀于界面相的染色体 DNA 缠绕在玻璃棒上，再将之展开于 5ml 0.1 × SSC 溶液中。

6 蛋白质表达

6.1 S-腺苷-L-甲硫氨酸-尿嘧啶原 III 甲基转移酶（SUMT）在巨大芽孢杆菌中过表达

将 1.5 ml 巨大芽孢杆菌过夜培养物接种于 150 ml LB 培养基中，37℃需氧培养。加入四环素筛选含有 pWH1520-cobA 表达质粒的细菌。当 OD₅₇₈ 达到 0.3 后，加入 0.5% (w/v) 的木糖诱导表达质粒的 xyl 启动子。在诱导之前和诱导后每小时取相当于 2 OD₅₇₈ 量的样本。将取出的样本离心（12 000 × g；3 分钟；室温）并将沉淀的细胞重悬于 40 μl 裂解缓冲液中。然后重悬液在 37℃孵育 30 分钟。将 20 μl 裂解后的物质与 5 μl SDS-PAGE 样品缓冲液混合，水浴煮沸 15 分钟后 15 000 转/分钟离心 30 分钟（8000 × g；10 分钟；室温）。上清液用于 SDS-PAGE 分析。

图表说明

所使用的细菌菌株和质粒列于表 1 和表 2 中。

表 1: 所使用的细菌菌株

表 2: 所使用的质粒

用下列图表进一步解释本发明。

图 1 显示在需氧生长条件下于 Mopso 基本培养基中巨大芽孢杆菌 DSM509 的维生素 B₁₂ 的产量。维生素 B₁₂ 的含量, 以每升细菌培养物中的 μg 数表示, 分别是在不含添加物的葡萄糖 (1), 添加 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ 的葡萄糖 (2), 添加 $298\ \mu\text{M}$ ALA 和 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ 的葡萄糖 (3), 不含添加物的甘油 (4), 添加 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ 的甘油 (5), 添加 $298\ \mu\text{M}$ ALA 和 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ 的甘油 (6) 进行培养的含量。

图 2 显示巨大芽孢杆菌 DSM509 在需氧生长条件下和转移到厌氧生长条件下的维生素 B₁₂ 产量的比较, 在每种情况下均加入 $298\ \mu\text{M}$ ALA 和 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ (需氧) 或 $500\ \mu\text{M}$ CoCl₂ (厌氧)。维生素 B₁₂ 的含量, 以每升细菌培养物中的 μg 数表示, 分别是在需氧条件下含葡萄糖培养物 (1), 在指数生长期的中期 ($\text{OD}_{578}=3.0$) 转移的含葡萄糖培养物 (2), 在指数生长期的末期 ($\text{OD}_{578}=5.9$) 转移的含葡萄糖培养物 (3), 在需氧条件下含甘油培养物 (4), 在指数生长期的中期 ($\text{OD}_{578}=4.7$) 转移的含甘油培养物 (5), 在指数生长期的末期 ($\text{OD}_{578}=12.0$) 转移的含甘油培养物 (6) 进行培养的含量。

图 3 显示用 pWH1520-cobA 转化了的巨大芽孢杆菌菌株 DSM509 与巨大芽孢杆菌菌株 DSM509 在需氧生长条件下于 LB 培养基中培养, 维生素 B₁₂ 产量的比较。维生素 B₁₂ 的含量, 以每升细菌培养物中的 μg 数表示, 分别为:

DSM509: 不含添加物 (1), 添加 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ (2), 添加 $298\ \mu\text{M}$ ALA 和 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ (3)。

DSM509-pWH1520-cobA: 不含添加物 (4), 添加 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ (5), 添加 $298\ \mu\text{M}$ ALA 和 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂ (6)。

图 4 显示巨大芽孢杆菌 DSM509 pWH1520-cobA 在需氧 (1) 和厌氧 (2) 生长条件下于 LB 培养基中培养并与转移到厌氧生长条件下 (3) 培养的维生素 B₁₂ 产量的比较。转移发生在 OD_{578} 为 6.9 的对数生长期的末期。所显示

的维生素 B₁₂ 的含量以每升细菌培养物中的 μg 数表示。所有的培养物中均含有 $298\ \mu\text{M}$ ALA 和 $250\ \mu\text{M}$ CoCl₂。

图 5 图示了将来源于巨大芽孢杆菌的 *cobA* 基因克隆到过表达载体 pWH1520 的过程。通过 PCR 方法扩增的基因和质粒都用 Spe I 和 BamH I 酶切，并将所产生的粘性末端连接起来，使在新构建的 pWH1520-*cobA* 过表达载体中实现 *xylA-cobA* 的翻译融合。

表 1

菌株	描述	参考文献 / 来源
大肠杆菌 DH5 α	F λ ⁻ supE44 Δ (argF-lac) U169 ϕ 89dlacZ Δ M15hsdR17recA lendAlgyrA96thi-1relA1	Sambrook 等人, 1989
巨大芽孢杆菌 DSMZ32 DSMZ509 WH320	野生型 维生素 B12 生产菌 DSMZ319 lac	DSMZ [*] DSMZ [*] Rygus 等人, 1991
鼠伤寒沙门氏杆菌 AR 3612	Leu ⁺ cysG metE, Sm ^r	Raux 等人, 1996

^{*} DSMZ: 德国微生物菌种保藏中心
(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Brunswick

表 2

质粒	描述	参考文献 / 来源
pWH1520	用于芽孢杆菌亚种的克隆和表达载体 Ap ^r , Tc ^r	Rygus 等人, 1991
pWH1520-cobA	巨大芽孢杆菌 cobA 的 716bp BamHI-SpeI 片段位于 pWH1520 中	本研究

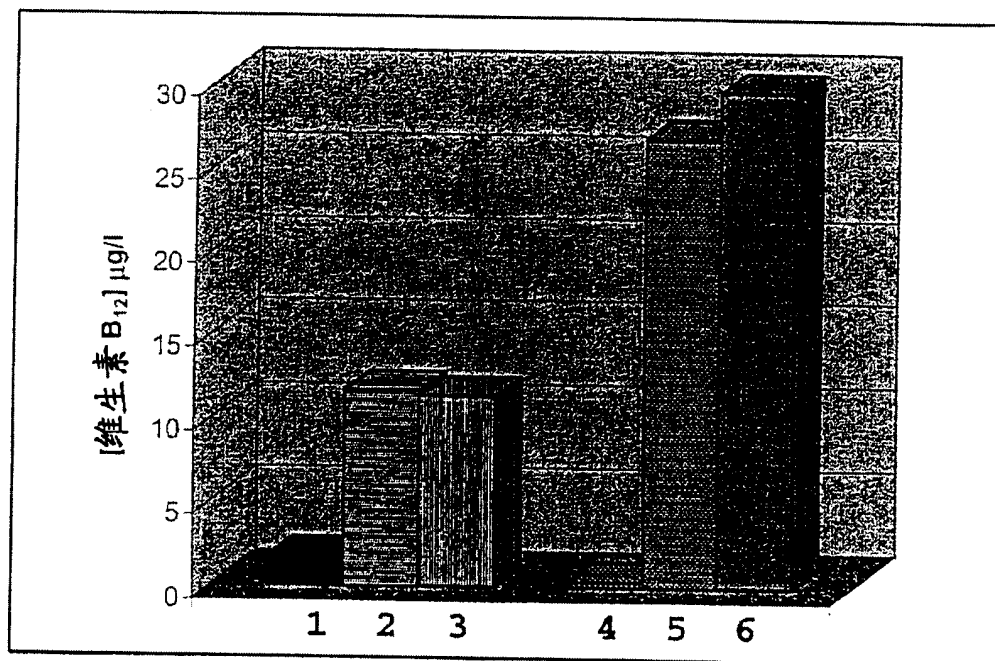


图 1

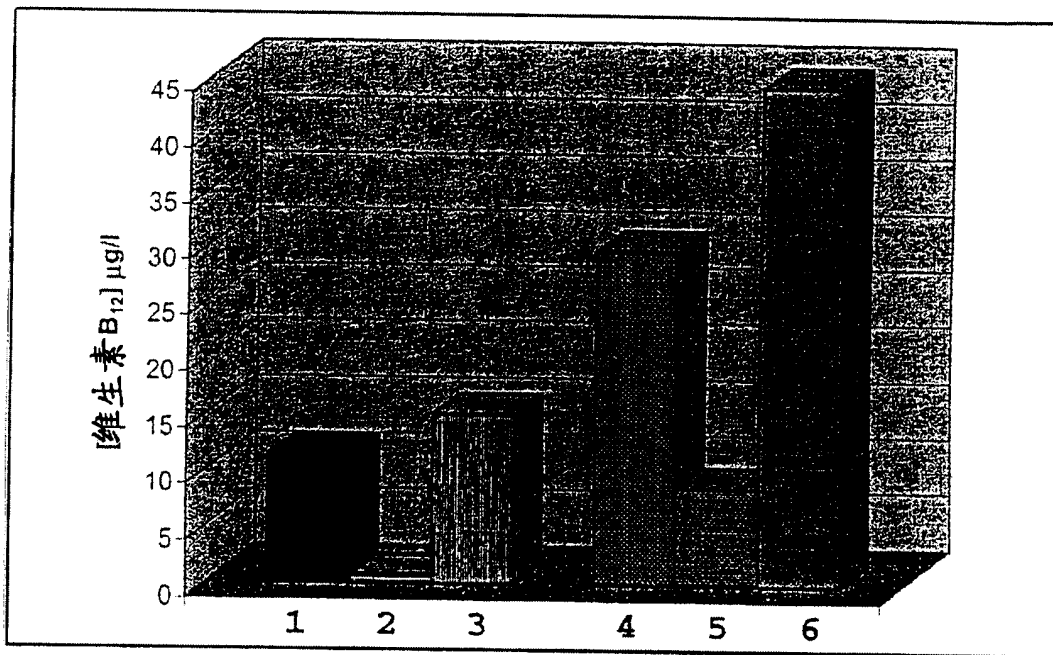


图 2

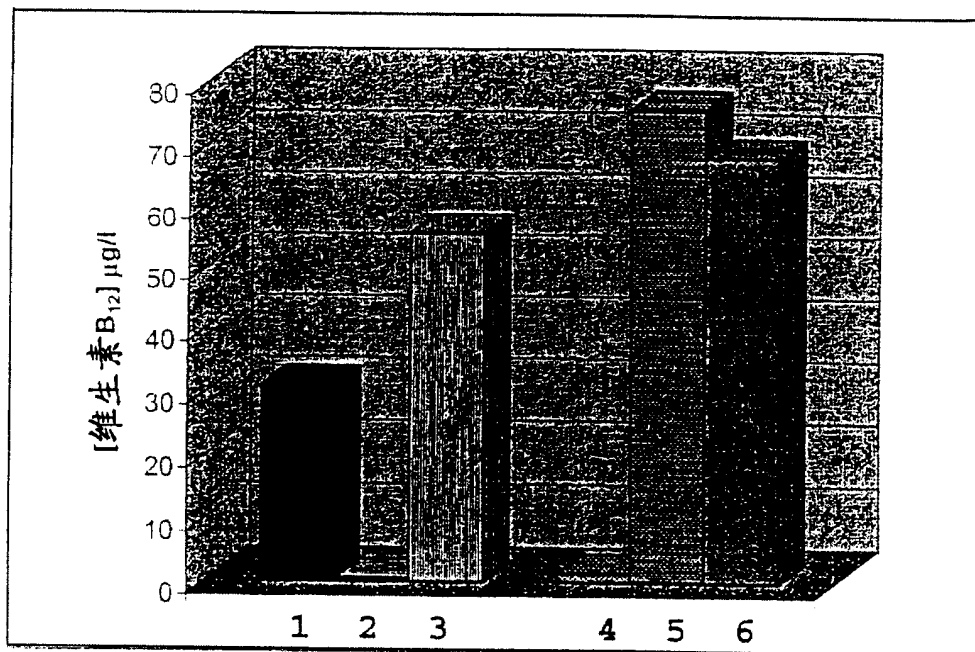


图 3

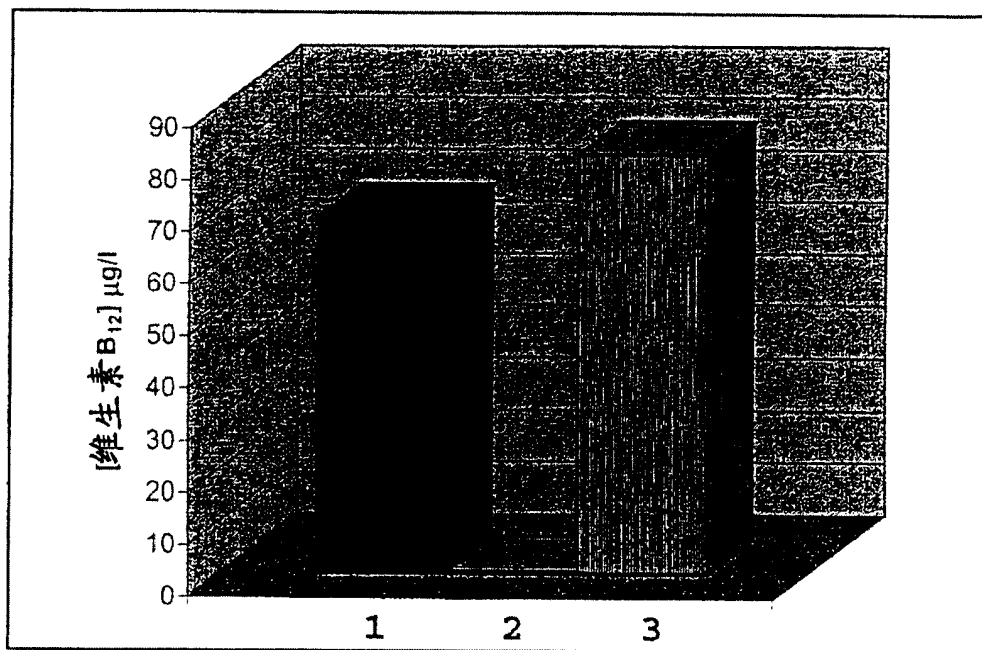


图 4

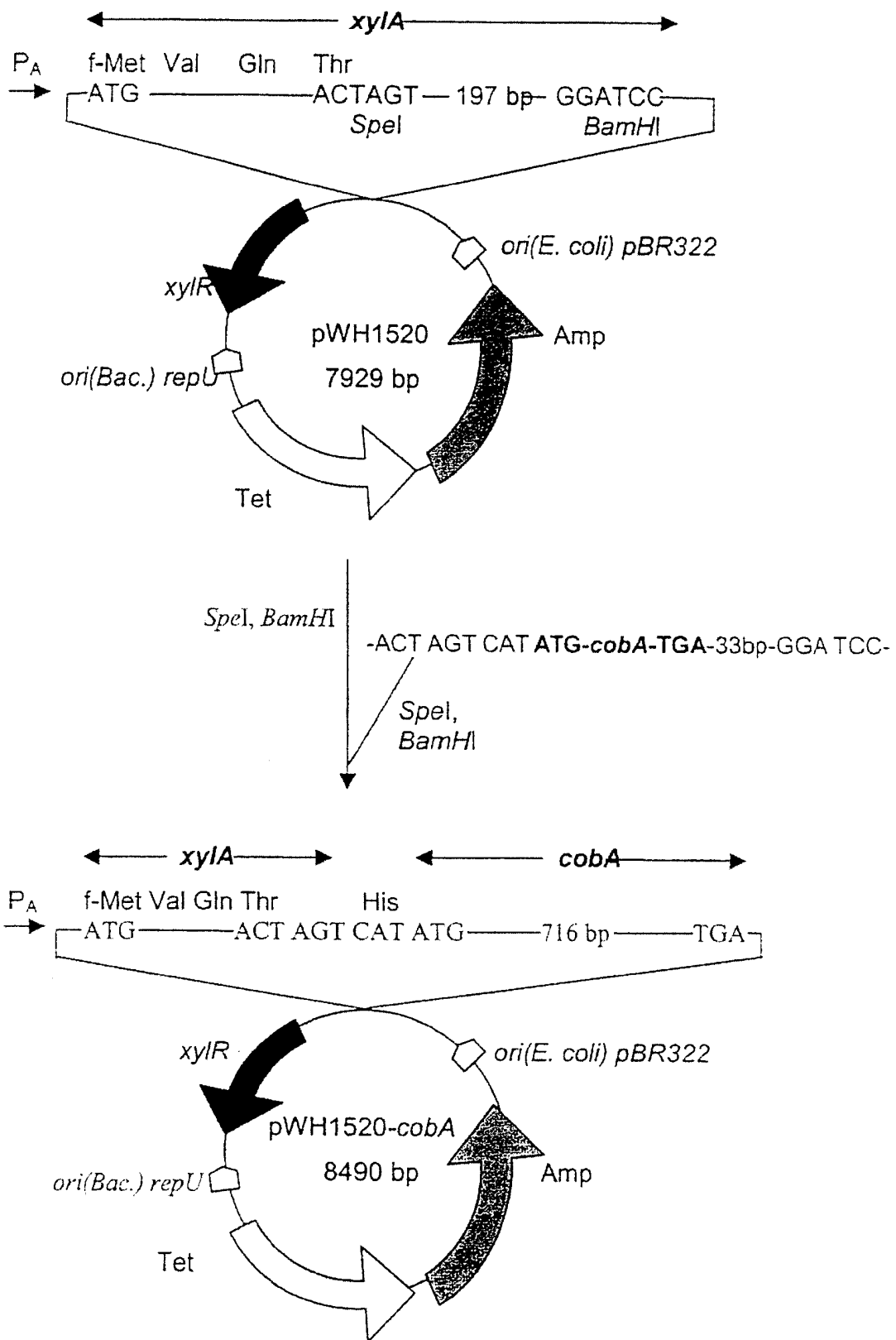


图 5