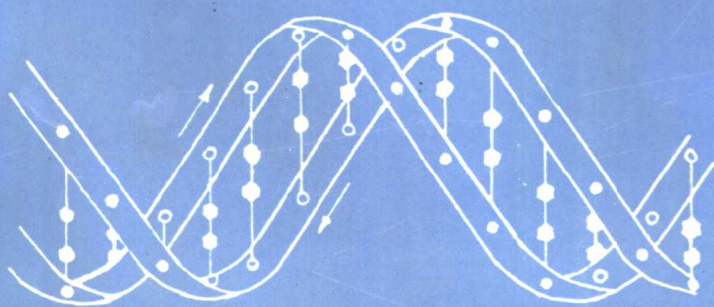


环境生物技术 实验指南

A Laboratory Manual of
Environmental Biotechnology

主编 程树培



南京大学出版社

(苏)新登字 011 号

内 容 提 要

《环境生物技术实验指南》与新兴边缘学科《环境生物技术》一书配套,从实验操作技术的角度,在国内首次系统介绍高、中、低三个层次生物技术在污染控制领域内有关实验与研究的应用现状、目的原理、材料方法、操作过程、结果分析和适用范围。

全书分为环境遗传工程生物技术、污染处理生物技术、废物资源化与能源化生物技术和监测与评价的生物技术四个部分。它包括污染防治基因工程、细胞工程、发酵工程、生化工程、生物处理工程、遗传毒理学和生物监测等有关的实验与研究的生物技术。内容新颖,系统性与适用性强。

本书可作为有关专业高校本科生和硕士生教材,其他有关的科技人员和生产管理人员也可从中获取有用的实验手段、技术信息和研究思路。

环境生物技术实验指南 A Laboratory Manual of Environmental Biotechnology

主编 程树培

*

南京大学出版社出版

(南京大学校内 邮编 210093)

江苏省新华书店发行 丹阳市兴华印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张 17 字数 421 千

1995 年 11 月第 1 版 1995 年 11 月第 1 次印刷

印数 1—1500

ISBN 7-305-02840-1/Q·21

定价 19.50 元

(南大版图书若有印、装错误可向承印厂退换)

责任编辑 王兆先

《环境生物技术实验指南》

编著人员名单

主 编	程树培			
副 主 编	孔繁翔	马文漪	崔益斌	周风帆
顾 问	丁树荣			
编著人员	(姓名以笔画为序)			
	丁树荣	马文漪	孔繁翔	王玉水
	邓良伟	刘征涛	李顺鹏	李宗林
	李 霞	乐科易	朱怀兰	朱忠贵
	余令玮	周风帆	吴 江	张 彤
	杨柳燕	庞金梅	施蕴中	夏伏虎
	章 敏	林 哲	葛 岚	秦梅枝
	崔益斌	程树培		

序

《环境生物技术实验指南》针对生物技术 in 环境科学领域中的应用与研究现状,汇集了有关的实验,其中高新生物技术的实验内容占全书内容的一半以上,在国内尚属首创。

现代生物技术拉开了生命科学时代的序幕,在生物技术广阔的科学大道上,医药生物技术、食品生物技术、农业生物技术、海洋生物技术和环境生物技术等生物技术科学并驾齐驱,正在共同创造生命科学时代的繁荣。经济与环境的协调发展已被列入国策,在即将跨入 21 世纪的今天,急需培养环境保护的高新技术人才,提供治理污染的有效技术途径。

要培养造就环境生物技术人才,创建相应的支撑性产业,使我国的环境生物技术与国际发展趋势接轨,就有必要建立相关配套的实验技术,以增加内涵潜力。因此,《环境生物技术实验指南》的出版,意义深刻且应用前景广阔。

相信该书的出版,对生物技术在我国环境科学领域内的研究与应用以及培养人才,将会受到关注并起到积极的促进作用。

李 博

1995.04

编 者 的 话

继 1994 年《环境生物技术》出版之后,紧接着编写出版《环境生物技术实验指南》,这是环境生物技术新兴边缘学科发展的需要,也是开拓环境污染治理高新技术途径的需要。

26 位编写人员从环境生物技术实验的各个方面,广泛收集资料,吸取国内外信息,力求在内容新颖、适用性强、应用前景广阔、技术层次全面、与国际同类学科发展趋势接轨等方面,编写出本书的特色。全国高等学校环境科学教学指导委员会主任委员丁树荣教授为本书的出版提出了宝贵的建议,兼任本书的编写顾问,同时亲自编写了三个实验。中国科学院院士李博教授为本书写了序言,给予了热情的支持与指导。孔繁翔负责全书内容的校核与汉文编目,马文漪负责全书生物学名校核,崔益斌负责全书图表校核,施蕴中负责全书英文编目与校核。本书从高新科学技术着手培养人材,去实现控制环境污染的目标,得到多方的理解、支持和努力配合,在此表示深切的感谢。

《环境生物技术实验指南》全书分为四个部分。第一部分为遗传工程生物技术,介绍 DNA 分子克隆、分子杂交、原生质体融合等有关基因工程技术在污染治理研究与应用中的实验。第二部分为污染处理生物技术,重点介绍废水生物处理新工艺和传统工艺的动力学参数测定、工艺设计等。第三部分为废物资源化与能源化生物技术,从废物资源化角度,设计了单细胞蛋白工程、生化工程、产氢工程、产甲烷工程和产清洁能源燃料乙醇工程等实验。第四部分为监测与评价的生物技术,根据国内外广泛研究和已使用的高新技术,编写了污染环境中生物群落、生物个体、生物细胞及生物基因 DNA 的监测实验。全书共收入 50 个实验。每个实验从国内外应用与发展趋势、实验目的原理、材料方法、操作过程、结果分析和适用范围等方面进行阐述,并提供相当数量的参考信息、便于读者在此基础上进行深入研究。

经济与环境的协调发展,已成为现代人类文明的奋斗目标。环境污染问题的解决必须依赖开辟新的技术途径,包括对传统技术的改造和革新。要实现这个目标,需要加强基础研究。基础扎实才可能架设起稳固的桥梁。本书从培养跨世纪的环境生物技术人才角度编写了有关的实验,以促进对污染治理新技术的研究与开发。环境生物技术层次多,涉及的学科范围广泛,并具有相互交叉渗透综合性强的特点,对于每一个实验所涉及的内容,均要给出详细的描述,几乎是不可能的,只能就实验本身的主要目的,对主体操作技术进行描述,故称为指南。对于需要探索与讨论之处,恳请有关专家和同行给予指导。

编 者

1995 年于南京大学

责任编辑 王兆先

ISBN 7-305-02840-1
Q·21 定价:19.50 元

目 录

内容提要

序	(I)
编者的话	(II)
汉文目录	(III)
英文目录	(V)
指南正文	(1)
汉文索引	(249)
外文索引	(254)

第一部分 环境遗传工程生物技术

1. 用质粒(YRpGLEF 14)转化酵母的絮凝基因(FLO1)的分子克隆	(1)
2. 纤维素酶基因克隆及其在酵母中的表达	(6)
3. 鸟枪法分离恶臭假单胞菌降解 4-氯联苯基因	(12)
4. 含有降解 PCB 基因质粒的菌株整治土壤PCB污染	(16)
5. 应用 PCR 考察降解除草剂 2, 4-D 基因工程菌目的基因	(25)
6. Southern 印迹分子杂交鉴定环境微生物 DNA	(31)
7. 原生质体融合构建高效抗害虫杂种菌株	(35)
8. 电融合技术选育利用木糖和纤维二糖产乙醇菌株	(38)
9. 光合细菌与酵母原生质体融合降解味精废水	(42)
10. 连续处理系统中紫外诱变菌降解有机污染物	(46)
11. 工业废水苯酚高效降解菌的驯化与筛选	(50)
12. 有机磷农药厌氧降解菌筛选与鉴定	(54)
13. 含改良植物蛋白品质基因的工程农杆菌转化苜蓿	(57)

第二部分 污染物处理生物技术

14. 化学需氧量的测定——重铬酸钾法和仪器法	(61)
15. 生化需氧量的测定——标准稀释法和仪器法	(68)
16. 污染物生物可降解性快速测定	(76)
17. 活性污泥废水处理系统中起泡丝状菌分类的微操作方法	(80)
18. 有机污染物厌氧生物降解潜力测定标准实验	(85)
19. 测定废水 BOD 降解生化稳定速率常数与可生化性	(90)
20. 光合细菌降解味精废水的反应动力学参数测定	(95)
21. 废水好氧生物处理过程中氧总转移系数 K_{La} 测定	(100)

22. 活性污泥法处理生活污水模型实验	(105)
23. 生物膜法处理生活污水模型实验	(111)
24. 固定化微生物处理含氨废水	(116)
25. 生物处理污水的气升式反应器设计	(122)
26. 厌氧生物转盘处理高浓度有机废水	(125)
27. UASB 反应器处理有机废水实验	(131)
28. 风眼莲大型水生植物塘处理印染废水模型实验	(134)

第三部分 废物能源化与资源化生物技术

29. 废物乙醇化处理实验	(141)
30. 光合细菌产氢实验	(144)
31. 光合细菌处理有机酸发酵废水生产 SCP 模型实验	(149)
32. 光合细菌球形红假单胞菌红色类胡萝卜素提取与测定	(152)
33. 继丝汰头工业废水废物开发利用生化技术实验	(155)
34. 蚯蚓净化有机污染物技术	(159)
35. 利用氨基酸、核苷发酵废液生产 SCP 的菌种筛选和工艺设计	(162)
36. NOC-1 微生物絮凝剂菌株筛选及其性能测定	(168)
37. 转化有机废物生产食用菌及蔬菜	(173)

第四部分 污染监测与评价生物技术

38. 应用 Ames 试验检测河水中致突变污染物	(177)
39. 大气污染物诱发紫露草产生微核实验	(186)
40. 鱼类和两栖类胚胎幼体存活致畸试验	(191)
41. 天然水体和生活污水中细菌总数及大肠菌群的检测	(198)
42. 发光菌检测环境样品中污染物毒性	(204)
43. 鱼类急性毒性试验监测废水废物毒性	(210)
44. 用枝角类毒性试验监测污染物毒性	(216)
45. 沉积生物对水生生物的毒性测试	(222)
46. 测定蜻蜓呼吸和排泄速率作为环境污染的监测短期指标	(224)
47. 应用 PCR 与基因 DNA 分子探针监测污染水体大肠杆菌	(229)
48. 监测肠道病毒污染地下水的 PCR	(235)
49. 固定化藻细胞生物传感器监测水生生态系统污染	(240)
50. 水生生态系统藻类生长潜力测试	(243)

CONTENTS

OUTLINE

PREFACE.....	I
GUIDE TO THE MANUAL	II
CONTENTS IN CHINESE	III
CONTENTS IN ENGLISH	V
MANUAL TEXT	(1)
INDEX IN CHINESE	(249)
INDEX IN ENGLISH AND LATIN	(254)

Part One Environmental Biotechnology of Genetic Engineering

1. Molecular Cloning of a Flocculation Gene (FLO1) on Vector Plasmid (YRpGLF14) for <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(1)
2. Gene Clone and Expression of Cellulase in Yeast	(6)
3. Shotgun Cloning of Genes Specifying Degradation of 4-Chlorobiphenyl from <i>Pseudomonas putida</i>	(12)
4. Application of Vectors for Bioremediation of Soil Contaminated by Polychlorinated Biphenyl(POB)	(16)
5. Detection of Targeted Gene for the Degradation of 2, 4-D with Polymerase Chain Reaction(PCR)	(25)
6. Identification of Genome DNA for Environmental Microorganisms by Molecular Hybridization with Southern Blot Technique	(31)
7. Construction of Hybrid Strains through Protoplast Fusion for Killing Diptera and Lepidoptera	(35)
8. Selection of Ethanol-Producing Strains by Electric Field-Induced Protoplast Fusion for Fermentation of D-Xylose and Cellobiose	(38)
9. Photosynthetic Bacteria and Yeast Protoplast Fusion for Biodegradation of Monosodium Glutamate Wastewater	(42)
10. Biodegradation of Recalcitrant Organic Pollutants in Continuous-Flow Treatment System by the Technique of UV-Induced Mutation	(46)
11. Acclimation and Screening of Bacteria for Highly Effective Degradation of Phenol in Industrial Wastewater	(50)

12. Screening and Identification of Anaerobic Bacteria for the Degradation of Organic Phosphorus Insecticides..... (54)
13. Transformation of *Medicago* sp. by *Agrobacterium tumefaciens* Containing the Gene for the Improvement of Plant Protein Characteristics..... (57)

Part Two Biotechniques in the Treatment of Pollutants

14. Determination of Chemical Oxygen Demand — with the Oxidizing Agent $K_2Cr_2O_7$ and with Instruments..... (61)
15. Determination of Biochemical Oxygen Demand with Standard Dilution Method and with Instruments..... (68)
16. Ready Biodegradability Test for Wastes..... (76)
17. Classification of Foam-Causing Filamentous Bacteria in Activated Sludge Processes by a Micromanipulation..... (80)
18. Standard Test for Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Pollutants..... (85)
19. Measurement of Biochemical Specific Rate Constant for BOD Biodegradation and Wastewater Biodegradability..... (90)
20. Kinetics of Photosynthetic Bacteria (PSB) Biodegradation of Pollutants in Monosodium Glutamate (MSG) Wastewater..... (95)
21. Measurement of Total Oxygen Transfer Coefficient (K_{La}) in Wastewater Treatment System..... (100)
22. Model Experiment of Activated Sludge Method to Treat Domestic Wastewater..... (105)
23. Model Experiment of Biofilm Process to Treat Domestic Wastewater..... (111)
24. Treatment of Cyanide-Containing Wastewater by Immobilized Microbial..... (116)
25. Design of Air Lift Bioreactor for Wastewater Treatment..... (122)
26. Treatment of High Concentrated Organic Wastewater by Anaerobic Rotating Biological Disc Contactor..... (125)
27. Treatment of Organic Wastewater with UASB Reactor..... (131)
28. A Macrophyte Pond Model Experiment for the Treatment of Dyeing Wastewater with Water Hyacinths..... (134)

Part Three Biotechniques in the Conversion of Wastes into Energy and Resources

29. Ethanol Production by the Fermentation of Wastes..... (141)
30. Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria..... (144)
31. Model Test of SCP Production with Photosynthetic Bacteria to Treat

Organic Wastewater	(149)
32. Extraction and Determination of Red Carotenoids in Photosynthetic Bacteria <i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>	(152)
33. Biochemical Technique for the Full Exploitation of Wastes in Silk- Reeling Effluent	(155)
34. Earthworm Chamber for the Treatment of Organic Chemicals	(159)
35. Strain Screening and Process Designing for SCP Production with Amino Acid or Nucleoside Fermentation Wastewater	(162)
36. Strain Screening and Feature Determination of Microbial Flocculant NOC-1	(168)
37. Transformation of Organic Wastes for the Production of Edible Fungi and Vegetables	(173)

Part Four Biotechniques for Monitoring and Evaluation of Environmental Pollution

38. Ames Test for the Determination of Mutagens in River Water	(177)
39. Micronucleus Determination of Atmospheric Pollution with <i>Tradescantia</i>	(186)
40. Fish and Amphibian Embryo-Larva Survival and Teratogenicity Test	(191)
41. Determination of Total Bacterial Count and Coliform Group in Natural Water and Sewage	(198)
42. Monitoring of Pollutant Toxicity in Environmental Samples with <i>Photobacterium phosphoreum</i>	(204)
43. Acute Toxicity Test with Fish to Test the Toxicity of Wastes	(210)
44. Toxicity Test with Cladocera for Monitoring Pollutants	(216)
45. A Bioassay for the Toxicity of Sediment with Aquatic Organisms	(222)
46. Measurement of Dragonfly Respiratory and Excretory Rates as Short-Term Indices of Stress	(224)
47. Detection of Coliform Bacteria in Water with PCR-Gene Probe	(229)
48. Detection of Enterovirus Pollution in Ground Water with Polymerase Chain Reaction	(235)
49. Biosensors with Immobilized Alga Cell to Monitor the Pollution of Aquatic Ecosystem	(240)
50. Algal Growth Potential Assay in Aquatic Ecosystem	(243)

第一部分 环境遗传工程生物技术

Part One Environmental Biotechnology of Genetic Engineering

1 用质粒(YRpGLF14)转化酵母的 絮凝基因(FLO1)的分子克隆

Molecular Cloning of a Flocculation Gene (FLO1) on Vector Plasmid (YRpGLF14) for *Saccharomyces cerevisiae*

一 概 述

酵母用于高浓度有机废水处理生产单细胞蛋白(single cell protein, SCP)是一项成熟的生物技术(金新梅 1990, 程树培 1993)。在该项工艺中,如果增加菌体自身的凝集与絮凝作用,则可大大地提高 SCP 的产率和废水的净化效率,达到降低处理成本,增加经济效益的目的。酵母絮凝性的研究与应用是酵母工业中的热点之一(Watari 1990, 1991)。我国江慧修等(1993)利用融合技术对啤酒凝集性酵母进行了研究,得到凝集性强、发酵功能好和酿造风味佳的菌株。凝集是絮凝的先导,只有凝集性好才可能絮凝性能强。裴疆森(1990)应用絮凝性酵母 IFFI 1792 连续发酵酒精,实现了高细胞浓度高强度酒精的连续发酵。

酵母絮凝遗传学的研究起始于 Gilliland 和 Thorne (1951)。到目前为止,关于酿酒酵母的絮凝基因已发现 10 多种,如, FLO1, FLO2, FLO4, FLO5, FLO8, fl03, fl06, fl07, fsu 1, fsu 2, Lup1, amy 2 等 (Johnston 1983, Yamashita 1983, Lipke 1984, Watari 1991)。FLO1 是目前研究得最为清楚的一个絮凝基因。它存在于染色体 1 号的 adel 片段末端。关于 FLO1 基因表达呈现出絮凝性已有报导 (Lewis 1976, Skatrud 1982)。

本实验为强化酵母絮凝性进行了 FLO1 基因 DNA 的分子克隆,根据物理图谱,进行稳定的操作,证实应用絮凝基因 FLO1 的 DNA 片断所构建的菌株具有絮凝的功能。

二 实验条件

1. 酵母菌株 作为目的基因 FLO1 转化的受体细胞,均为酿酒酵母,见表 1.1。
2. 大肠杆菌 *Escherichia coli* K-12 菌株 jA221 (recA1, LacY, leuB, trp Δ E5, thr, thi, hsdR, hsdM)用于制备质粒 DNA,即扩增质粒。
3. 培养基 YEPD 培养基中含 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨和 2% 的葡萄糖。MM 基础培养基中含 2% 葡萄糖和 0.67% 的无氨基酸的酵母含氮物质。如果需要补充氨基酸和含

表 1.1 实验中可采用的酿酒酵母菌株

菌 株	基 因 型	菌 株	基 因 型
YJW2A	MATa FLO1 his4	W204	未知(底层发酵酵母)
YJW6	MATa adel ural his4	W164	未知(底层发酵酵母)
AH22	MATa his4 leu2 can1	obg-160	未知(顶层发酵酵母)
23,20	mata/trp1 leu2 ura3 his4	AHU2200	未知(Whisky 酵母)
2055-19C	MATa/MATa adel/adel his4/ his4 leu2/leu2 thr4/thr4	IAM4175	未知(Wine 酵母)
M1-7C	MATa/MATa adel/ADE1 trp1/trp1	Kyokai No. 6	日本米酒酵母
		IFO 0282	日本 Shochu 酵母

氮物,可使其终浓度达 20 $\mu\text{g/ml}$ 。 *E. coli* 的细胞培养应用 LB 培养基,其中含 1% 的 bacto-胰蛋白胨,0.5% 的酵母提取物和 0.5% 的 NaCl,必要时增加抗菌素。以 2% 和 1.5% 的琼脂分别使酵母和大肠杆菌的培养基固化。

4. 质粒 本实验中使用的质粒结构,见图 1.1。关于用于转化酵母含有 FLO1 基因的质粒 YRpGLF14 的构建步骤如下:

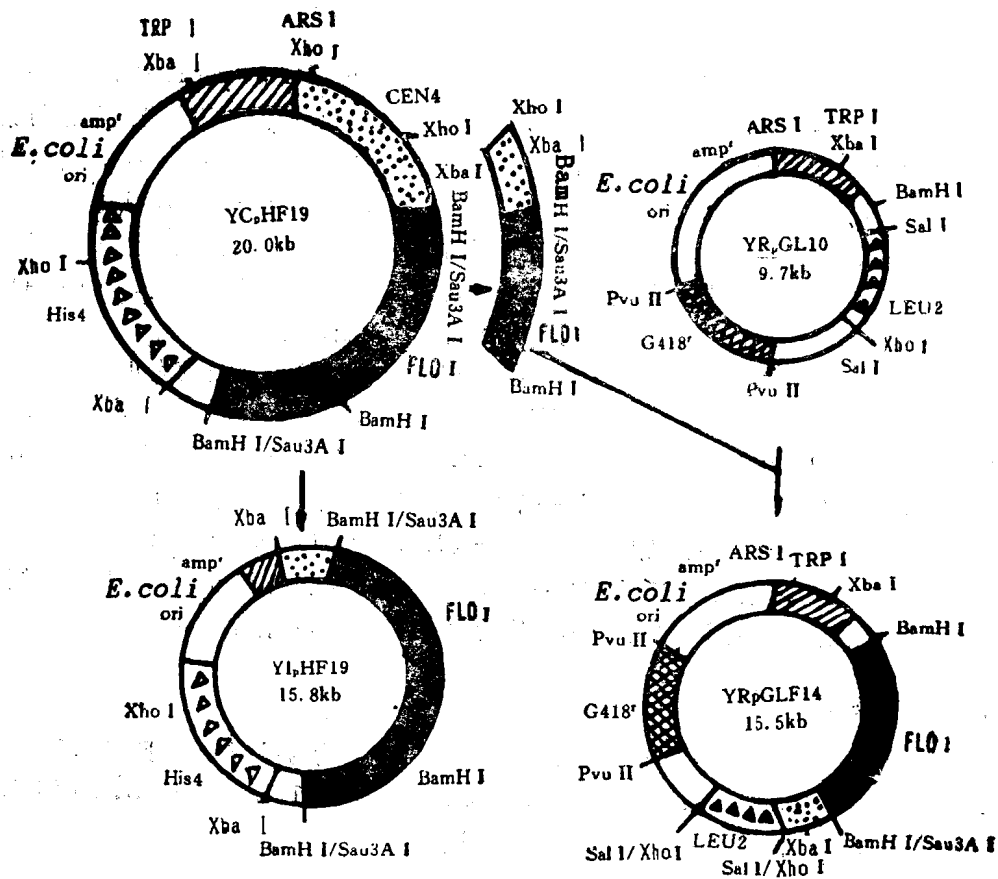


图 1.1 实验中质粒构建示意图 BamHI/Sau3AI 和 SalI/XhoI 表示两个位点之间的连接处

从 Tn903 上获得一段 1.7-Kb 长的 PvuII 片段,它在酵母中具有抗 G 418 的功能,可由美国纽约 Grand Island 的 Gibco 实验室提供。Pvu II 片段插入穿梭载体 YRp 7 中的 Pvu II 限制性内切酶位点,组合成质粒 YRpG1。然后由质粒 YEp 13 上 2.2 kb 的 LEU 2 基因插入 YRpG1 中的 SalI 限制性内切酶位点,构建成 YRpGL10(见图 1.1)。原 LEU2 基因存在于 YEp13 上的 SalI 和 xhhI 位点之间的 2.2 kb 片段上。

质粒 YCpHF 19 上有一段 5.8 kb 含 BamHI 和 XhoI 位点的 DNA 片段,该片段含有 FLO1 絮凝基因,将这段基因插入 YRpGL10 的 BamHI 和 SalI 的开口处,组合成 YRpGLF14 质粒,用于转化酵母。YIpHF19 质粒是由 YCpHF19 去掉 XbaI 片段而形成,XbaI 中含有 CEN4 和 ARS1。

三 操作过程

1. 大肠杆菌的质粒转化用 $\text{CaCl}_2/\text{RbCl}$ 法 (Maniatis 1982) 酵母菌的质粒转化用 Li_2AC 法 (Ito 1983)。抗菌素 G 418 抗性筛选参照 Sapai 和 Yamamoto 法 (1986),有关的修改如下:加热振荡处理菌液后收集菌体细胞,清洗后细胞重新悬浮在 28℃ 的培养基中培养 18 h,取 100 μl 的菌液涂布在含有适当浓度 G418 的 YEPD 琼脂平板上,共涂 15 块平板。底层发酵酵母平板上的 G 418 的浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,顶层和 Whisky 酵母为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,其余酵母为 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$,平板置于 28℃ 培养 3 d 后,鉴定所试酵母抗 G418 的特征。

2. 测定絮凝性 将待测定絮凝性的酵母细胞于 28℃ 在 Monod-型试管中振荡培养 3 d,振速为 100 rpm,试管中含 YEPD 和 G418 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 共 10 ml 培养液,也可少于这个体积。培养后在 Vortex-混合器上室温下剧烈混合 1 min,用肉眼观察絮体的快速形成和评价絮体的大小。按照 Johnston (1983) 制定的标准,将絮凝的等级分为零级(无絮凝)至 4 级(絮凝性特佳)。其测定过程基本如下:用 10% 的麦芽抽提物 10 ml 21℃ 培养酵母 3 d,离心分离菌体,重新将菌体细胞悬浮于水中,定位 10—15 秒为分散块状体和絮体,再离心分离菌体细胞,重新将菌体细胞悬浮于 10 ml 的 0.05 mol 醋酸缓冲液中,该缓冲液的 pH 为 4.5 并含有 150 mg/L 的 Ca^{2+} 。样品静放 10 min 之后,用肉眼观察,按 4 个等级的标准,将酵母菌的絮凝性能分为相应的级别。

3. 鉴定酵母细胞絮凝性的表现型 用 Hodgson (1985) 的方法,采用加热和糜蛋白酶处理细胞。

4. 遗传学方法 采用 Spencer 和 Spencer (1988) 的性接合和 tetrad 分析法。

5. 在糖蜜培养基中生产乙醇的实验 在 Monod-试管中将有 10 ml 的 YEPD 培养液,其中 G418 为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,28℃ 振荡培养 (100 rpm) 3 d,生成预培养物。将这预培养物转入 190 ml 的糖蜜培养液中,其中总糖为 25% (W/W),在 Erlenmeyer 烧瓶中 28℃ 振荡培养 2 d (100 rpm)。用 SCABA 分析仪测定乙醇含量 (Servo-Chem Automatic Beer Analyzer, Stockholm, Sweden 产品)。

四 实验结果

1. 组建絮凝基因 FLO1 的图谱

为了证明克隆的 FLO1 基因在染色体 1 上,先要证实组建质粒中的 FLO1 目的基因的 DNA 片段进入了酵母的染色体 1。图 1.1 中构建出的 YIp-型的质粒 YIpHF19 含有克隆的

FLO1 基因片段。用 BamHI 使 YIpHF19 质粒线性化,然后引入 YJW2A (MAT α FLO1 his4) 酵母菌株中,获得了 His⁺ 转化子,并用该转化子之一与 YJW6 (MAT α ade1 ura1 his4) 酵母杂交,得到的二倍体菌株能产生孢子并有 4-孢子子囊裂开。该项结果即可证明含有 His⁺ 表现型的基因与染色体 1 上的 ADE1 相连接。(见表 1.2)。因为在染色体 1 上没有发现其他絮凝基因的存在,以上的结果最可以表明克隆的 FLO1 基因存在于染色体 1 上。所获得的二倍体菌株具有产生孢子并有 4-孢子子囊裂开的现象,则会增加菌液中出现絮体块的可能,即提高了絮凝性能。

表 1.2 整合质粒的物理图谱数据^②

Interval (间隔) ^③	亲株二型	非亲株二型	四型
His4(YIpHF19-INT)-ADE1	22	0	7
His4(YIpHF19-INT)-URA1	3	5	21
ADE1-URA1	6	3	20

② 是图 1 中整合质粒 YIpHF19 与酵母 YJW2A (MAT α ADE1 FLO1 his4 URA1) 的转化子跟酵母 YJW6 (MAT α ade1 his4 ura1) 的杂交产物,该产物菌株为二倍体并能产生和释放孢子。

③ ADE1 和 URA1 分别存在于染色体 1 和 XI 上。

2. 接合型调节 FLO1 基因

在野生型菌株等位基因(allele)上产生的 FLO1 突变是稳定的,但是在 MAT α /MAT α 二倍体的细胞中 FLO1 基因是隐性的或处于半稳定的状态。这就表明 FLO1 基因的表达受到 MAT 信息的控制,在 MAT α /MAT α 或 MAT α /MAT α 的二倍体细胞中 FLO1 均能稳定地表达。为了证实这种接合型控制 FLO1 表达的现象,用 YCpHF19(图 1.1 为单拷贝质粒)转化了几株单倍体和二倍体菌株见表 1.3。表 1.3 的结果表明,公认的 FLO1 基因存在于质粒上受到了宿主细胞接合型的调节,因为 mata1/MAT α 和 MAT α /MAT α 细胞均显示出强烈的絮凝性,而 MAT α /MAT α 细胞的絮凝性最弱。FLO1 可能受到 a1-a2 的抑制。一般工业菌株是多倍体而不受什么影响。a1-a2 的抑制作用只存在于实验室菌株内。工业菌株中有多拷贝的 FLO1 基因降低了接合型的抑制作用,因此,应用多拷贝质粒转化工业酵母菌株产生絮凝性是有希望的。

表 1.3 接合型对质粒上 FLO1 基因表达的影响

宿主菌株 ^②	接合型	用 YCpHF19 质粒转化后的絮凝等级 ^③
YJW6	MAT α	3
AH22	MAT α	3
YJW6 $\times$ AH22	MAT α /MAT α	1
2Sa20 $\times$ YJW6	mata1/MAT α	3
2055-19C	MAT α /MAT α	0
M1-7C	MAT α /MAT α	3

② 为无絮凝性宿主细胞的转化子。

③ 用 Johnston (1983) 的方法分级。

3. 将克隆 FLO1 基因的质粒转化工业菌株

按照图 1.1 构建含有 FLO1 基因的质粒 YRpGLF14, YRpGLF14 中含有一个 FLO1 基因

和一个抗 G418 基因(Tn903),将 YRpGLF14 转入无絮凝性的工业酵母,结果产生具有絮凝性的酵母基因工程菌,质粒上的 G418 基因用于筛选转化子,结果见表 1.4。

表 1.4 用含 FLO1 基因的 YRpGLF14 质粒转化工业酵母

宿主菌株 ^②	转化子絮凝性等级 ^③	絮凝表现型 ^④
底层发酵酵母 W204	4	t ^R c ^R
W164	4	t ^R c ^R
顶层发酵酵母 obg160	2	t ^R c ^R
Whisky 酵母 AHU3200	4	t ^R c ^R
葡萄酒酵母 IAM4175	1	n·d
日本米酒酵母 KyokaiNo.6	4	t ^R c ^R
日本 Shochu 酵母 IFD0282	2	n·d

② 宿主酵母为无絮凝性的转化子。

③ 按 Johnston (1983)年的方法分级。

④ t^R和 c^R表示细胞絮凝性形成分别受到热处理和染色体处理的抑制。n·d 为未测定。

表 1.4 的结果表明多拷贝 FLO1 基因存在于工业酵母中,菌株的接合型不对絮凝表达产生抑制作用即无限制性的调节功能。质粒 YRpGLF 14 在工业酵母中絮凝性产生的强弱取决于 Ca²⁺ 的浓度,EDTA 能抑制絮凝性。表 1.4 中的葡萄酒酵母转化子的絮凝性微弱,而其他转化子的絮凝性居中等或特优的水平,其中遗传学机理尚不清楚。

4. Whisky 工业酵母转化子利用糖蜜生产乙醇

应用含有 FLO1 基因的 YRpGLF 14 质粒转化的 Whisky 酵母转化子在 YEPD 培养基中具有高絮凝性能。利用糖蜜生产乙醇的发酵率和最终产量均同于亲株。发酵率指前 24 h 内每小时乙醇的平均产量,亲株是 2.75 g/L·h 转化子为 2.70 g/L·h 亲株的最终乙醇浓度为 67.4 g/L,转化子为 67.2 g/L。

五 实验结果的讨论

1. 该实验用于证实 FLO1 基因存在于染色体 1 上,FLO1 基因的表达受到宿主菌株接合型的影响。工业酵母的 FLO1 具有多拷贝性的特征,其 FLO1 的表达不受接合型的限制,含有 FLO1 的转化子除了具有高絮凝性特征外,其利用糖蜜的乙醇发酵率和最终产量同于原亲株酵母。

2. 图 1.1 中由质粒 YOpHF19 切掉 Xba1 片段后组建成 YIpHF19。YIpHF19 质粒上 FLO1 基因,经 BamH1 线性化后转化酵母,获得 His⁺ 转化子,再经杂交,得到二倍体能产生孢子并有 ϕ -孢子子囊裂开,表明获得的二倍体菌株为 His⁺,并在染色体 1 上有 FLO1 的存在。此即由表 2 中所测得的数据证实,因为 His⁺ 基因与染色体上的 ADE1 基因相连接。YIpHF19 用以证实 FLO1 存在于染色体 1 上。

3. 图 1.1 中由质粒 YRpGL10 和 YOpHF19 片段组合成的 YRpGLF14 质粒,用于转化工业酵母。该质粒上有 FLO1 和抗 G418 基因。结果表明转化子有絮凝性并有抗 G418 的标记,可以直接用于筛选。

4. 图 1.1 中的 YOpHF19 质粒,转化实验室菌株的宿主细胞,在该质粒上存在 FLO1 基因,结果表明絮凝性的表达受到接合型的调控。而工业菌株中不存在这个问题,因为工业菌株

中的 FLO1 基因是多拷贝的。YCpHF19 本身是单拷贝质粒。

六 注意事项

1. 本实验仅介绍 FLO1 基因分子克隆的主要操作步骤和实验结果,详细操作过程,需参考提供的有关文献。

2. 酵母菌株的絮凝性受染色体内或染色体外遗传物质及环境等多因素的影响。本实验中的 FLO1 基因克隆转化子,仅为一个证据。

参 考 文 献

- [1] Watari, J., M. Kudo, N., Nishikawa, and M. Kamimura, Construction of flocculent yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by mating or protoplast fusion using a yeast cell containing the flocculation gene FLO5, *Agric. Biol. Chem.* 54(7):1677-1681 1990.
- [2] Watari, J., Y. Takata, M. Ogawa, J. Murakami, and S. Koshino. Breeding of flocculent industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene FLO1, *Agric. Biol. Chem.* 55(6): 1547-1552, 1991.
- [3] Maniatis, T., E. F. Fritsh, and J. Sambrook in "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Labs, N. Y. 1982.
- [4] Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura, *J. Bacteriol.* (153): 163, 1983.
- [5] Sakai, K. and M. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.* (50): 1177, 1986.
- [6] Johnston, J. R. and H. P. Reader in "Yeast Genetics: Fundamental and Applied Aspects" ed. by J. F. F. Spencer and A. R. W. Smith, Springer Verlag, New York, 205-224, 1983.
- [7] 金新梅, 味精废水生产饲料酵母的研究, *环境污染与防治*, 12(1):27-30, 1990.
- [8] 程树培, 崔益斌, 张林波, 马文漪, 丁树荣, 构建酵母融合子净化味精废水及其性能研究, *环境污染与防治*, 15(5):5-7, 1993.
- [9] 江慧修, 张金玲, 周坚, 戈琳, 王丽和李景昆, 啤酒酿造用凝集性酵母融合育种的研究, *微生物学报*, 33(1):22-31, 1993.
- [10] 裴疆森, 莫湘筠, 絮凝性酵母 IFFI 1792 在酒精连续发酵中的应用, *食品与发酵工业*(2):1-8, 1990.

2 纤维素酶基因克隆及其在酵母中的表达

Gene Clone and Expression of Cellulase in Yeast

一 概 述

纤维素是一种线状多聚物,由 100—1000 个葡萄糖残基通过 β -1,4 葡萄糖苷键连接而成。它的酶水解至少包括三种纤维素酶的作用,① 内切-1,4- β -D 葡聚糖酶 (EC 3.2.14); ② 外切-1,4- β -D 葡聚糖酶 (EC 3.2.19); ③ β -1,4-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)。

用分泌 α -半乳糖苷酶 (α -Gal) 的啤酒酵母 MELI 基因构建载体。将编码粪肥纤维单胞菌 (*Cellulomonas fimi*) 外切 β -1,4 葡聚糖酶 (Exg) 基因 *cex* 插入载体,使产生 α -Gal 信号肽基因与 *cex* 融合。转化后的酵母含有这些结构的 DNA,当它在适合 MELI 启动子启动的条件下培养时,产生有活性的胞外 Exg,也产生有活性的胞内酶。用木聚糖、羧甲基纤维