

蛋白酶产生菌种间原生质体的转化

诸葛健 秦 武

摘 要

以地衣形芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) AS 1,807—9—9 ($\text{Thr}^- \text{Ade}^- \text{Str}^r \text{Rif}^s$) 的原生质体为受体, 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) AS1,398—28—6 ($\text{Arg}^- \text{Leu}^- \text{Rif}^r \text{Str}^s$)* 为供体菌, 添加聚乙二醇(分子量6000)至终浓度为30%, 经过一定时间的保温处理, 成功地获得了芽孢杆菌的种间转化子。转化子有的是原养型, 有的在含利福平(10单位/毫升)和链霉素(200单位/毫升)的培养基上能生长, 也有的兼而有之。上述标记的转化频率在 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 之间。转化子的产芽孢性能和在含葡萄糖的完全培养基上分泌红色色素的性能亦各有差异, 而受体菌是典型产芽孢和分泌红色色素的, 供体菌是寡芽孢产孢, 亦不分泌红色色素。溶菌酶处理时间不同致使原生质体再生率有改变或供体 DNA 添加量不同都会影响转化频率。转化子的次代回变率约大于60%。原生质体转化可以是转化育种的一种新途径, 原生质体也可能是经体外重组 DNA 的植入受体。

自1944年 Avery 证实了肺炎双球菌 S 型与 R 型之间转化作用的物质基础是 DNA 以来, 微生物转化的研究工作开展甚为广泛。细菌中已经报导具有转化作用的属有: 芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 嗜血杆菌属 (*Haemophilus*), 奈氏球菌属 (*Neisseria*), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 链球菌属 (*Streptococcus*) 和根瘤细菌属 (*Rhizobium*) 等^[1]。但其中目前具有工业价值的细菌主要为芽孢杆菌属, 转化的研究也集中在枯草芽孢杆菌中的某些菌株^[2]。实用性菌株的基因重组希望在亲缘关系较远的种间能实现, 原生质体间的融合是一条较为有效的途径^[3]。原生质体转化也是很有潜力的一种方法^[2], 但工业微生物间原生质体转化的研究尚少见。本试检选用了产蛋白酶的地衣形芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌作为两亲株, 继原生质体融合的成功试验后^[4]又进行了原生质体转化研究。结果证实该二亲株可以实现种间的原生质体转化, 其基因重组频率较原生质体融合有了提高, 可以作为工业微生物育种的一种有效手段。

本文收到日期1982年12月11日

* Str^r ——链霉素抗性和敏感性。 Rif^s ——利福平抗性和敏感性。 Thr^- ——苏氨酸缺陷型。 Ade^- ——腺嘌呤缺陷型。 Arg^- ——精氨酸缺陷型。 Leu^- ——亮氨酸缺陷型。

材 料 和 方 法

一、菌 种

(一) 受体菌:地衣形芽孢杆菌 (*B.licheniformis*) AS1.807—9—9(Thr⁻Ade⁻Str^rRif^s) 抗链霉素(200单位/毫升),产芽孢。原始亲本为野生型,系碱性蛋白酶产生菌,由无锡酶制剂厂提供;标记变异株由本院菌种保藏室提供。

(二) 供体菌:枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*) AS1.398—28—6(Arg⁻Leu⁻Rif^rStr^r), 抗利福平(10单位/毫升),不产或寡产芽孢。原始亲本为野生型,系中性蛋白酶产生菌,由本院发酵厂提供;标记变异株由本院菌种保藏室提供。

二、培 养 基

(一) 完全培养基(CM):肉汤培养基^[5]。

(二) 基本培养基(MM):Spizizen培养基^[5]

(三) 高渗完全培养基:完全培养基中加0.5M蔗糖和20mM MgCl₂。

(四) 高渗基本培养基:基本培养基中加入0.5M蔗糖和20mM MgCl₂;或0.5M NaCl;或0.5M蔗糖;或0.5M蔗糖和单独灭菌的20mM MgCl₂。

上述培养基中加入1.5%琼脂则成固体培养基。

三、缓 冲 液 和 二 苯 胺 试 剂

(一) 高渗SMM:0.5M蔗糖加入SMM^[4]中。

(二) 二苯胺试剂^[5]。

四、专 用 试 剂

(一) 溶菌酶:BR级,上海禽蛋品公司禽蛋二厂出品。

(二) 聚乙二醇(PEG):分子量6000,日本产品。

(三) 脱氧核糖核酸(DNA):BR级,上海牛奶公司综合厂产品,含量>85%。

(四) 利福平:医用,900毫升/毫克,无锡第一制药厂产品。

(五) 链霉素:医用,100万单位/瓶,华北制药厂出品。

(六) 脱氧核糖核酸酶(DNAase II):美国Sigma化学公司产品,每毫克固体含429单位。

五、供体菌的DNA提取及DNA含量的测定

(一) DNA的提取基本按Marmur的方法^[5]进行。

(二) DNA的含量测定按改良二苯胺法^[5]进行。

六、受体菌的原生质体制备

按参考文献^[4]方法进行。

七、受体菌“感受态”的培养

按参考文献^[6]方法进行。

八、转化操作

(一)体细胞转化：将受体菌在肉汤培养基中培养至对数生长后期，离心去上清液，用0.55M NaCl液洗涤二次，将菌体悬浮于适量的SMM高渗液中。添加PEG至终浓度为30%，加入供体DNA至终含量为20微克/毫升左右，混合均匀，置30℃恒温水浴，定时取样涂布高渗基本培养基平板，培养3~5天，观察结果。

(二)原生后体转化：受体菌在肉汤培养基中培养至对数生长后期，用0.55M NaCl液洗涤二次，悬浮于高渗SMM液中，使菌体数浓缩5倍。添加溶菌酶液至终浓度为500微克/毫升，置40℃水浴中处理50分钟。用高渗SMM洗涤离心二次，原生质体以适当密度悬浮于高渗SMM中，添加PEG至终浓度为30%，供体DNA终浓度为20微克/毫升左右。混合均匀，置30℃水浴，定时取样涂布于高渗基本培养基平板，培养3~5天观察结果。

结果和讨论

一、供体菌与受体菌遗传标记的稳定性

每次进行转化试检前都进行菌株遗传标记稳定性的测定。测试结果表明它们的遗传标记是稳定的。营养缺陷和抗性标记的回复突变频率(表一)是很低的，可以用于转化试检。

表一 供体和受体细胞的回变频率

菌株	遗传标记	营养缺陷回变频率	抗性回变频率
AS1.807—9—9	Thr ⁻ Ade ⁻ Str ^r Rif ^s	$< 5.76 \times 10^{-9}$	$< 5.76 \times 10^{-9}$
AS1.398—28—6	Arg ⁻ Leu ⁻ Rif ^s Str ^s	$< 1.28 \times 10^{-9}$	$< 1.28 \times 10^{-9}$

二、供体菌与受体菌的体细胞转化

在我们的试验条件下，该二株变异株能实现体细胞转化，这在以往文献中尚未见报导，但转化频率仅在 10^{-7} 左右。从图1可以看到受体细胞于对数生长期的后期，转化处理时间以60分钟较好，此时转化频率较高(6.0×10^{-7})。处理时间过短过长，转化频率都低，体细胞似存在一个“敏感期”逐渐产生与消失的过程。

在该试验中，若添加PEG对转化作用有影响。从图2的二次实验可观察到，转化频率虽增加但不很大，而PEG却能促进“敏感期”的提前到来，因此PEG不仅在原生质体融合中是一种有效的促进剂，在体细胞转化中也可考虑予以使用。

三、供体菌与受体菌的原生质体转化

(一)对应于添加PEG体细胞转化的原生质体转化的部分条件

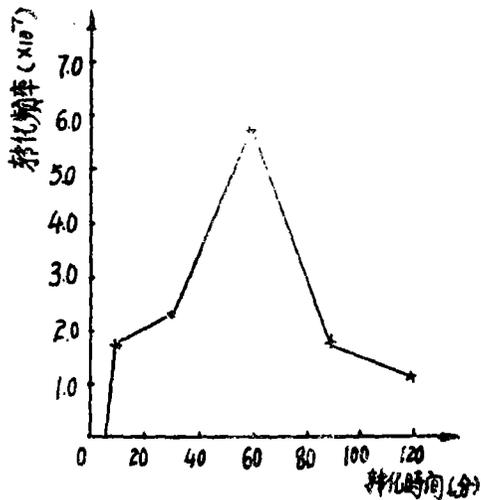


图1 体细胞转化时间与转化频率的关系

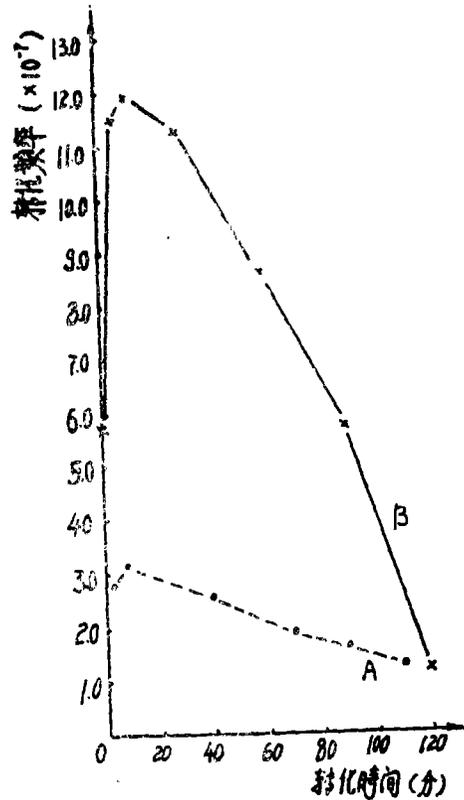


图2 添加 PEG 对体菌细胞转化时间与转化频率的关系

表二 转化的部分条件

实验序号	菌体浓度(个/毫升)	破壁率 (%)	再生率 (%)	供体 DNA(微克/毫升)
A	5.06×10^8	99.80	1.02	14
B	6.95×10^8	99.09	3.58	27

(二) 原生质体转化条件对转化频率的影响

在 PEG 存在下, A 和 B 的实验结果如图 3。可以看到, 在开始阶段转化频率随转化处理时间的延长而增加。以 B 而言转化频率在 110 分钟达到了 9.33×10^{-3} , 与同样转化条件下的体细胞转化频率(10 分钟时)的 1.90×10^{-6} 相比, 竟高出 5000 倍。原生质体转化在高峰前后也存在转化频率上升与下降的情况, 可能是 DNA 的转入数在前期有一逐步累加的过程, 而后期则可能可转化的 DNA 量大大减小, 与此同时 PEG 对原生质体的损伤则逐渐显著。但若将此转化系统 30°C 转化处理 100 分钟, 将其置于 4°C 保藏 2 天后, 再行涂布至高渗基本培养基上, 培养 3~5 天, 可以发现转化子数与转化处理几十分钟的结果比较似差不多(表三)。

在试验中我们还注意了转化处理时间到达后残留的供体 DNA 对转化频率的影响, 在转化处理 70 分钟后即加入 DNAase II, 结果表明对转化频率无甚影响。从而估计供体 DNA 转入主要作用于前期, 后期的影响主要依赖于原生质体的损伤情况。

表三 长期转化处理对转化频率的影响

转化时间(分)	50	70	2880(2天)
转化频率	5.15×10^{-5}	2.57×10^{-5}	4.18×10^{-5}

从图3的A和B二次试验中,还可以得到转化条件对转化频率有较大的影响。由于转化条件的不同,在我们的多次试验中转化频率在 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 之间波动。影响较大的是再生率和供体DNA的加量。转化频率随再生率的增加而增加,在一定范围内随供体DNA加量的增加而上升。

与添加PEG的体细胞转化比较,不仅转化频率大幅度提高,而且转化频率高峰的出现时间也延迟。看来由于细胞壁消除后,在高渗介质中转化过程显得也有差别了。

(三) 在各种高渗培养基上转化子的检出

表四结果表明高渗基本培养基中所用的高渗稳定剂对转化子的检出是有影响的。以NaCl为高渗稳定剂转化子几乎检不出;对蔗糖而言,MgCl₂是否添加,如何添加对菌落形成及生长速度有关,但对转化频率影响不很大。不添加MgCl₂的生长速度最快,培养2天就能看到再生菌落;单独添加MgCl₂的次之;MgCl₂加入后与蔗糖一起蒸汽灭菌的生长极慢,达七天之久。原因可能是产生磷酸盐沉淀,致使缺少磷源,因此高渗基本培养基只需加入蔗糖即可。

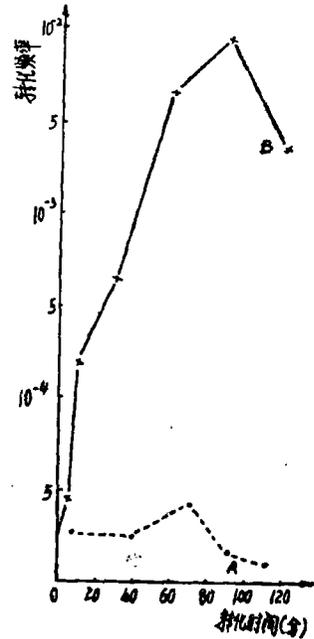


图3 PEG存在下的原生质体转化

表四 高渗稳定剂对转化频率的影响

细胞浓度 (个/毫升)	破壁率 (%)	再生率 (%)	高 渗 稳 定 剂			
			MgCl ₂ +蔗糖	蔗 糖	蔗糖和MgCl ₂ 分开灭菌	NaCl
4.91×10^8	99.76	0.28	4.18×10^{-5}	3.86×10^{-5}	3.54×10^{-5}	0

(四) 转化子次代培养的稳定性

将初步认为的转化子再在选择性的培养基平板上划线,发现相当一部分转化子仍不稳定。表五的几次试验数据说明次代培养的不稳定数要超过60%。

表五 转化子次代培养的稳定性

实验序号	第一代长出转化子数	第二代长出转化子数	稳定率 (%)
1	170	50	29.4
2	201	85	42.3
3	564	217	38.5

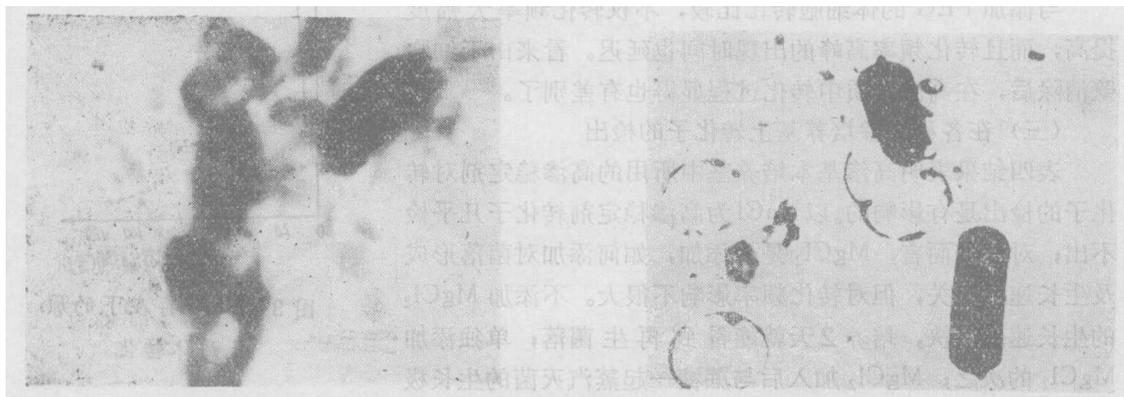
(五) 转化子性状的变化

转化子细胞形态是多样的,有长、较长及较短的杆状。产芽胞性能变化亦大。受体菌是

盛产芽孢的，供体菌少产或不产芽孢，而转化子则有的仍然盛产，但有的改变为少产或不产。在含葡萄糖的完全培养基上，受体菌能分泌红色色素，供体菌是不分泌的，而转化子则有的分泌，有的不分泌。这说明原生质体在转化性状上是为有效的，具有一定的定向性。由于几种性状能同时转化，说明可能转入原生质的 DNA 片段长些，机率也较多。因此原生质体转化不仅是转化育种的一种新形式，而且有可能作为遗传工程体外重组 DNA 植入的一种受体形式*。

部分转化子和两直接亲株的细胞形态及色素分泌、芽孢形成、MM 上生长情况和对利福平及链霉素抗性的特性见电镜照片。

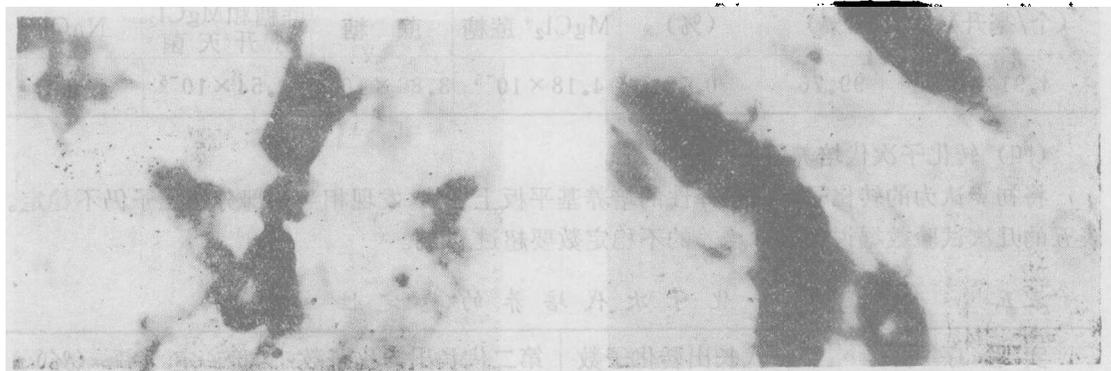
直接亲本形态电镜照片：



受体菌 AS1.807-9-9
Pig⁺SPO⁺MM⁻(Rif + Str)^r
×10000

供体菌 AS1.398-28-6
Pig⁺SPO⁺MM⁻(Rif + Str)^s
×10000

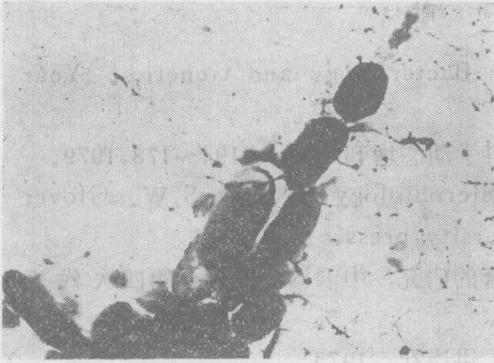
部分转化子形态电镜照片：



PT 9. Pig⁻SPO⁺MM⁻(Rif + Str)^r
×10000

PT 77. Pig⁺SPO⁺MM⁺(Rif + Str)^r
×10000

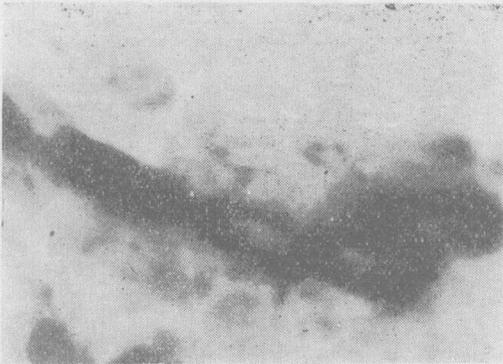
*英国约翰伊奈研究所的 F.K. 柴塔博士研究小组通过研究提出把基因组入放线菌时，使放线菌呈现裸露状态，(即原生质体)然后将核糖体作为基因的运载体，是利用基因工程改造放线菌的一种极有用的技术。



PT 23 Pig⁺SPO⁻MM⁻(Rif+Str)^r
×7000



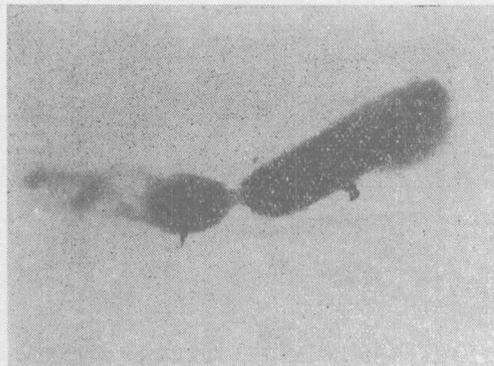
PT 180 Pig⁻SPO⁻MM⁺(Rif+Str)^r
×7000



PT 122 Pig⁻SPO⁺MM⁺(Rif+Str)^s
×9000



PT 98 Pig⁻SPO⁻MM⁻(Rif+Str)^r
×4000



PT 156 Pig⁺SPO⁻MM⁻(Rif+Str)^r
×1200

徐柔、袁身燕同志参加本题协作，吴亢同志协助拍摄电镜照片，仅此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] J.R. Sokatch and J.J. Ferretti; Basic Bacteriology and Genetics. Year Book Medical Publishers, Inc., 1976.
- [2] J. Spezizen (陈乃用, 门大鹏译): 生物科学动态增刊(一), p194~178,1979.
- [3] L. Ferenczy; Genetic as a Tool in Microbiology, ed. by S.W. Glover and D.A. Hopwood, Cambridge University press, 1981.
- [4] 诸葛健等: 蛋白酶产生菌种间原生质体融合的研究, 中国微生物学会第四次代表大会学术交流论文集, 1982.
- [5] 微生物研究法恳谈会编: 微生物学实验法, 讲谈社, 1975.
- [6] 薛禹谷等: 枯草芽孢杆菌转化育种中几个有关问题的探讨, 微生物学报 17(2), 108~113.

Research on protoplast Transformation Between Interspecific Strains of producing protease

Zhu-ge jian, Qin Wu

Abstract

Interspecific transformants have been obtained with *Bacillus subtilis* AS1—398—28—6 (Arg⁻ Leu⁻ Rif^r Str^s) and *B. licheniformis* 1—807—9—9 (thr⁻ Ade⁻ Str^s Rif^r). The starting strains of parent above are being used for producing enzymes in China, As 1—398 produces neutral protease and the others produces alkaline protease. The protoplast for transformation is prepared with lysozyme. The optimum conditions for preparing protoplast are lysozyme 250 mg/ml, pH 6.7~7.0, temperature 35°C in SMM. The rate of breaking wall of Cells is 99.99% and of regeneration 1~4%. The reverse frequency of donor and receptor for auxotroph and resistance is less than 10⁻⁹, protoplast transformation is carried out in SMM containing 30% polyethylene glycol (MW 6000) and 20mg/ml DNA at controlled time and temperature. The transformation frequency is about 10⁻²~10⁻⁵ which depends on the rate of regeneration and the concentration of DNA when fixed other conditions.

The stable rate of transformants through the first transfer is 40%. The transformants could grow in minimal medium added streptomycin 200 unit/ml and rifampin (10 unit/ml). The shape of cells of transformants is longer, long and short. The character of conditional sporulation of transformants have some variety. The donor is no or less sporulation and the receptor is more but some of transformants are less sporulation and some are more. Receptor could secrete red pigment in CM containing glucose and donor could not, but some of transformants are could not and some are could, these results might be to tell us that the protoplast transformation is not only a new way for transformation breeding but might be integrate longer fragment of DNA or more group of genes into protoplast.