

# 枯草芽孢杆菌分子克隆系统受体的改造

郭兴华 贾士芳 许怡

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 实验证明枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BR151 和 MI112 中的 pUB110 质粒, 在液体中传代要比固体斜面传代稳定。通过 NTG 诱变获得了对 pUB110 稳定的受体 BSG。来自大肠杆菌的穿梭质粒在 BSG 菌中转化频率较亲本高。小的外源 DNA 片段插入 pBE2 后在 BSG 菌中转管传代 30 次是稳定的。

**关键词** 枯草芽孢杆菌; 对质粒稳定的受体

重组质粒 (或载体) 在宿主细胞中的稳定性, 直接影响分子克隆的工程菌走向工业化的进程, 因而受到研究单位和实业界的广泛重视, 为基因工程研究中的重要课题。

质粒的不稳定性主要有两种类型<sup>[1,2]</sup>: 一种是分离的不稳定性, 它可以使质粒从宿主细胞中丢失, 这是由于细胞在分裂过程中质粒的不准确分配造成的; 另一种类型是结构的不稳定性, 它可以使质粒缺失、重组或插入新的 DNA 片段, 这是由宿主本身具有很强的重组能力所

引起的分子内或分子间重组造成的。质粒的不稳定性和宿主细胞的遗传特性、重组质粒分子结构和大小 (包括插入片段的大小) 以及培养条件有关。同种质粒在不同的宿主中稳定性不一样<sup>[3]</sup>。反过来, 同种宿主对不同质粒稳定性也不一样。对于载体, 除了具有复制控制系统外, 还要有一个控制质粒在细胞分裂时适当分配的系统。对于宿主、重组质粒在枯草芽孢杆菌中比

国家自然科学基金资助项目 3870281。

印小明, 赵明同志参加部分工作, 特此致谢。

在大肠杆菌中稳定度要差一些<sup>[4,5]</sup>。因为枯草芽孢杆菌内DNA的重组频率很高,因此质粒很容易发生结构上的变化。

本文通过自发突变和人工诱变对枯草芽孢杆菌BR151和MI112<sup>[6]</sup>进行遗传特性的改造,使它们成为对质粒pUB110以及杂种质粒pPTE4<sup>[7]</sup>和pBE2<sup>[8]</sup>有较高的转化频率和稳定度的宿主。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 材料

1. 菌株: 所用菌株和质粒见表1。
2. 培养基: LB培养基<sup>[9]</sup>用于细菌的培养。枯草杆菌转化用培养基按郭兴华<sup>[10]</sup>方法配制。

3. 酶和试剂: 限制酶和连接酶为华美生物工程公司产品。NTG为西安制药厂产品,氯化铯和SDS为Sigma公司产品。

#### (二) 方法

1. DNA的提取: 大肠杆菌和枯草杆菌质粒的快速和大量提取方法均按分子克隆一书<sup>[9]</sup>的方法进行。枯草杆菌染色体DNA提取按Marmur<sup>[11]</sup>的方法以及Young<sup>[12]</sup>修改的方法进行。限制酶和T4DNA连接酶的使用按生产厂家说明的条件进行。噬菌体 $\rho$ 11DNA的提取按郭兴华<sup>[13]</sup>方法进行。

2. 转化: 大肠杆菌转化按Maniatis<sup>[9]</sup>方法进行。枯草芽孢杆菌转化按郭兴华<sup>[10]</sup>方法。

3. NTG诱变: 按贾士芳<sup>[14]</sup>的方法进行。

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	基因型和表型	来源
<i>Bacillus subtilis</i>		
BR151	trpC2,metB5,lys3	中国科学院微生物研究所
MI112	arg15,leuB8,thr5,r <sup>-</sup> ,m <sup>-</sup> ,recE4	中国科学院微生物研究所
AS.1.1660	tryC2, $\rho$ 11	中国科学院微生物研究所
BSG	同 MI112	本实验室分离得到
BSG-R	除 rif <sup>r</sup> 外, 同 BSG	本实验室分离得到
BR151-A	对 pUB110 质粒稳定的受体	本实验室分离得到
MI112-C	对 pUB110 质粒稳定的受体	本实验室分离得到
<i>E. coli</i>		
RR1	F <sup>-</sup> , pro, leu, thi, lacy, r <sup>-</sup> , m <sup>-</sup> , EndoI	中国科学院微生物研究所
C600	F <sup>-</sup> , thr-1, leu-6, th-1, supE44	中国科学院微生物研究所
pBE-2	Amp <sup>r</sup> , Kam <sup>r</sup> 或 Neo <sup>r</sup>	本实验室构建 <sup>[8]</sup>
pUB110	Kam <sup>r</sup> 或 Neo <sup>r</sup>	中国科学院微生物研究所
pPTE4	Amp <sup>r</sup> , Kam <sup>r</sup> 或 Neo <sup>r</sup>	陈永南 <sup>[7]</sup>
pBE2-0.2	pBE2 质粒插入不同大小的枯草杆菌或噬菌体 $\rho$ 11 的 DNA 片段	实验室构建
pBE2-1.3		实验室构建
pBE2-2.5		实验室构建
pBE2-4.0		实验室构建
pBE2-5.6		实验室构建
pBE2-7.8		实验室构建
pBE2-8.4		实验室构建
pBE2-11		实验室构建

4. 质粒稳定性的检测: 采用液体和固体传代的方法。固体传代: 将培养24小时的斜面菌转接新斜面, 在37℃培养过夜。液体传代: 将培养24小时的菌液(2mlLB/管), 取0.01ml接

种到新鲜的LB液体管(2mlLB/管), 37℃摇床培养过夜。不论液体还是固体传代, 每传10次测定一次质粒的稳定性。测定的方法: 将菌的稀释液涂在LB平板上, 37℃过夜。随机挑选300

个单菌落,用牙签分别点接在含和不含抗生素的平板上,37℃培养后计算质粒丢失百分数。

5. 质粒的消除<sup>[15]</sup>:将活化的菌接种到LB液体管中,37℃摇床培养到对数前期,再接种到含0.001—0.003%SDS的LB液体培养基中,37℃摇床过夜,适当稀释涂布在LB平板上。37℃培养后挑单菌落到含和不含抗生素的平板上。经37℃培养后计算消除百分数。

## 结果和讨论

### (一) 传代对质粒稳定性的影响

用pUB110质粒转化BR151和MI112菌株,转化子分别在液体和固体转管传代,在转接10次、20次和30次时,分别检查质粒丢失情况,同时核对菌株的遗传特性,以排除杂菌污染。

表2 BR151和MI112菌株在固体和液体培养基中传代时质粒pUB110的自发消除率

菌株	培养基	质粒丢失率(%)		
		传10次	传20次	传30次
BR151	LB斜面	0	1.9	74.04
	LB液体	0	0	0
MI112	LB斜面	0	42.31	95.15
	LB液体	0	0	0

由表2看出:在固体斜面上转管传代比液体容易丢失,当转管30次后,在液体培养基中培养的菌无一丢失质粒,而在LB斜面上培养的BR151和MI112,其质粒的丢失率分别为95.15%和74.04%。为什么在液体传代时质粒不易丢失,而在固体传代时容易丢失,机理尚不清楚。但这对工业发酵可能是有利的。对于pUB110质粒,在宿主BR151中比在宿主MI112中更稳定些。另外,一旦质粒丢失,菌的生长速度比含有质粒时快一些。

### (二) 通过自发突变和人工诱变筛选对质粒稳定的受体

1. 从自发突变中选择对质粒稳定的受体:挑选在斜面上转管30次仍含质粒pUB110的BR151和MI112菌株,继续传代30次,检测质粒是否存在,挑取含质粒的菌再传代30次,两

菌株分别随机挑选2个含质粒的菌,用SDS或吡啶类消除质粒,对已消除质粒的菌检测其遗传特性,然后用pUB110质粒进行遗传转化,任意挑选3个转化子,经转管传代150次,检查质粒丢失情况,并检测其遗传特性。结果见表3。

表3 对pUB110质粒稳定的自发突变体

菌株	培养基	传150次后质粒消除的百分数(%)
BR151-A	LB斜面	0
BR151-B	LB斜面	4
BR151-C	LB斜面	8
MI112-A	LB斜面	9
MI112-B	LB斜面	20
MI112-C	LB斜面	0

2. NTG诱变后筛选对穿梭质粒稳定的受体:为将来工作方便,用自发突变的方法对MI112菌株标记上利福平抗性标记。陈永南<sup>[7]</sup>报道第一次从大肠杆菌来的穿梭质粒转化枯草杆菌时,转化频率极低,而且生长很慢(甚至要10天)。我们用他构建的质粒pPTE4转化BR151和MI112证实了他的结论。根据这一事实,我们认为,如果在诱变之后的群体中出现的转化子比在诱变之前的群体中多,且生长快,其中可能有对该质粒稳定的受体。我们以MI112为诱变菌株,诱变之后用pPTE4转化,结果诱变前和诱变后的群体转化频率有明显的不同。诱变前MI112的群体中只出现8个转化子,而诱变后的MI112在相同大小的群体中出现90个转化子,而且长出菌落的时间为2—8天。我们从转化子中随机选择生长最快的10个菌落,核对了它们的遗传特性,之后对这10株菌进行质粒消除,再用pPTE4分别进行转化,结果其中一株的转化率是亲本株的80倍。将此菌株定名为BSG。

### (三) 质粒在BSG菌株中的稳定性

用pUB110质粒转化BSG菌株,转化子在LB斜面和LB液体中转管传代150次,然后适当稀释后涂LB平板,再将单菌复制在含和不含抗生素的LB平板上,计算质粒丢失百分数,结果没有发现丢失。

### (四) 穿梭质粒在BSG菌株中的转化效率和稳定性

穿梭质粒 pPTE4 和 pBE2 在大肠杆菌中增殖后提取其 DNA, 然后分别转化 MI112 和 BSG 菌。结果见表 4。

表 4 转化效率

菌株	质粒	转化效率
BSG	pPTE4	$4 \times 10^3$ 转化子 / $\mu\text{g}$ DNA
BSG	pBE2	$5.4 \times 10^3$ 转化子 / $\mu\text{g}$ DNA
MI112	pPTE4	80 转化子 / $\mu\text{g}$ DNA
MI112	pBE2	$2 \times 10^2$ 转化子 / $\mu\text{g}$ DNA

随机挑选 BSG(pPTE4) 和 BSG(pBE2) 单菌落, 进行 LB 固体斜面传代 30 次, 未见质粒丢失。

#### (五) 插入外源 DNA 的嵌合质粒的 BSG 菌中的稳定性

用限制酶 BamHI 部分酶解枯草杆菌染色体 DNA 和彻底酶解噬菌体  $\rho 11$  DNA, 与 BamHI 酶解的 pBE2 质粒连接, 转化 BSG 菌, 得到大小不同的嵌合质粒, 插入片段从 0.2—11kb, 挑选 8 个大小不同的质粒, 在 LB 斜面上转管传代 30 次, 其结果表明插入的片段在 4.0kb 以下转管传代 30 次基本是稳定的, 4.0—8.0kb 则不稳定, 到 8.0kb 以上全部丢失 (表 5)。蒋如璋<sup>[16]</sup>用 0.2—1.12kb 的插入片段的嵌合载体, 传代 125 次仍无丢失。说明质粒的稳定性和插入片段的大小很有关系。

综上所述, 可以认为尽管 MI112 的基因型是  $r^-$ ,  $m^-$ ,  $recE4$ , 但仍具有很强的影响质粒稳定性的酶类或有关因子。推测突变体 BSG 中,

这些酶类或影响稳定性的关键因子的活力有很大降低。

表 5 嵌合质粒在 BSG 菌株中的稳定性

质粒	插入的片段 (kb)	丢失质粒的百分数 (%)
pBE2-0	0	0
pBE2-0.2	0.2	0
pBE2-1.3	1.3	0
pBE2-2.5	2.5	0
pBE2-4.0	4.0	7
pBE2-5.6	5.6	50
pBE2-7.8	7.8	87
pBE2-8.4	8.4	100
pBE2-11	11	100

#### 参 考 文 献

1. 郭兴华: 微生物学通报, 19(5):285—289, 1992.
2. 李永红等: 生物工程学报, 4(2):81—86, 1988.
3. Imanaka T et al.: *J.Gen.Microbiol.*, 118:253, 1980.
4. Gryczan T J and Dubnau D: *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 75:1428, 1978.
5. Keggins K M et al.: *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 75:1423, 1978.
6. Tanaka T: *Mol.Gen.Genet.*, 175:235—237, 1979.
7. 陈永南: 生物工程学报, 2(2):31—38, 1986.
8. 郭兴华等: 生物工程学报, 7(3):224—229, 1991.
9. Maniatis T et al.: *Molecular Cloning A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.*
10. 郭兴华等: 微生物学报, 22(3):263—268, 1982.
11. Marmur J: *J.Mol.Biol.*, 3:207—218, 1961.
12. Young F E et al.: *Handbook of Genetics*, Edited by R C King, Vol.1:69—114, 1974.
13. 郭兴华等: 微生物学报, 30(4):273—277, 1990.
14. 贾士芳等: 微生物学报, 30(1):83—85, 1990.
15. 范云六等: 微生物学报, 14(2):209—215, 1974.
16. 蒋如璋等: 生物工程学报, 4(4):278—286, 1988.

(1991-11-18 收稿)

## IMPROVEMENT OF MOLECULAR CLONING RECIPIENT IN *BACILLUS SUBTILIS*

Guo Xinghua Jia Shifang Xu Yi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080)

The results of experiment showed that *B. subtilis* BR151 and MI112 containing plasmid pUB110 in LB liquid medium is more stable than in LB slant. Stable recipient strain BSG for plasmid pUB110 was obtained by mutagenesis with NTG. The strain BSG is more efficient recipient of transformation for shuttle vectors pPTE4 and pBE2 from *E. coli* than its parent. The chimeric plasmids which contain small inserts are stable in strain BSG after 30 generations.

**Key words** *Bacillus subtilis*; stable recipient for plasmid