

氧化葡萄糖酸杆菌及其伴生菌软化芽孢杆菌 原生质体融合的研究

盛 勤 冯瑞山 陈建华 王颜玉¹ 吴梧桐

(中国药科大学生物技术研究中心, 南京 210009)

摘 要 经紫外线单亲灭活的软化芽孢杆菌 *Bacillus macerans* 30-6 原生质体和氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 10-3 原生质体在 PEG(MW6000)诱导下进行融合。在含利福平的 YE 再生培养基上筛选融合子, 融合频率为 2.8×10^{-7} 。

关键词 软化芽孢杆菌; 氧化葡萄糖酸杆菌; 原生质体融合; 融合子

在维生素 C 工业生产中, L-山梨糖发酵生产 2-酮基-L-古龙酸的菌为氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 和其伴生菌软化芽孢杆菌 *Bacillus macerans* 等混合菌系。在其生产中涉及两种菌的不断分离、纯化、配比等, 给操作带来不便。本文设法通过原生质体融合技术, 构建融合子。最终目的是综合双亲优势, 简化工艺, 提高产量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 软化芽孢杆菌 B30-6, 氧化葡萄糖酸杆菌 G10-3。

1.1.2 培养基 山梨糖培养基(%): 山梨糖 0.5, 酵母膏 0.5, 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 硫酸镁 0.2, 碳酸钙 0.5, pH6.7; BPY 培养基; 甘露醇培养基^[1]; 分离培养基(%): 山梨糖 1.5, 玉米浆 0.3, 尿素 0.1, 酵母粉 0.5, 磷酸二氢钾 0.2, pH6.7; B.T.B 培养基: 分离培养基中加入 1/17000 的溴百里香酚兰(B.T.B)。

1.1.3 试剂 裂解液^[1]; SMMP 液即 SMM, PAB^[2]和牛血清白蛋白的混合液; 甘氨酸液; 青霉素液; 利福平: 配制 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$; PEG

(MW6000): 40%用 SMMP 配制。

1.2 方法

1.2.1 B30-6 和 G10-3 对茶啉酸和利福平抗药性测定 将 B30-6 和 G10-3 分别划线于含不同浓度利福平及茶啉酸的 YE 培养基上。29℃培养 7 d, 观察生长情况。

1.2.2 B30-6 原生质体的形成和再生^[3]

1.2.3 B30-6 原生质体紫外线灭活实验 取上述制备的原生质体悬液 5 ml 于直径 6 cm 的平皿中, 在 15 W 紫外光灯下, 距离 30 cm, 电磁搅拌下累积照射 30、45、60、90 min, 避光培养 30 min。用 YE 再生液体培养基适当稀释, 分离于含利福平 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 YE 双层再生培养基上, 29℃培养 4 d, 计数, 并计算存活率。

1.2.4 G10-3 原生质体的形成和再生^[3]

1.2.5 B30-6 和 G10-3 原生质体融合^[1,4]

取经紫外线灭活的 B30-6 原生质体悬液及其稀释 10 倍、100 倍的稀释液各 1 ml, 分别与 G10-3 原生质体悬液 1 ml 混合, 6000 r/min 离心 20 min。收集原生质体, 加入 SMMP 液 0.2 ml, 混匀, 然后加入 1.8 ml 预热的 40% PEG 液, 充分摇匀。30℃水浴作用 2~5 min 后, 立即加入 SMMP 液 6 ml, 29℃培养 7 d, 计

数,计算融合频率。二亲本同时同 SMMP 液代替 PEG,同融合处理作对照,长出的菌落为未被灭活的原生质体。

融合频率=(融合子数-亲株存活数)/双亲株原生质体总数 $\times 100\%$

1.2.6 融合子的检出及鉴定 将融合平板上的单菌落分别点种于分离培养基和 B. T. B 培养基上,同时点种二亲本株,29℃培养 5 d,观察菌落生长及其颜色变化。挑取连续三代在 B. T. B 培养基上生长的菌落移种斜面,发酵测定产酸情况。

1.2.7 酸度测定方法 吸取发酵液 2 ml,加 7 mol/L H_2SO_4 2 ml,放入沸水浴 30 min。取出后用蒸馏水 100 ml 分三次将溶液洗入 250 ml 的三角瓶中,加 2%淀粉指示剂数滴,用 0.1 mol/L 碘液滴定至变色即为终点。

产率(mg/ml)= I_2 消耗毫升数 $\times 7.58$

2 结果与讨论

2.1 B30-6 和 G10-3 对萘啶酸和利福平的抗药性试验

采用梯度平皿法获得 B30-6,在含萘啶酸 100 $\mu\text{g/ml}$ 、利福平 25 $\mu\text{g/ml}$ 的含药平板上生长,G10-3 在含利福平平板上不生长,在萘啶酸平板上培养至 7 d,有少量菌生长。结果见表 1。可见 B30-6 为对萘啶酸和利福平耐药的双重耐药菌,G10-3 对萘啶酸有弱抗性,对利福平敏感。对二菌基因重组筛选有用的选择标记应为利福平 25 $\mu\text{g/ml}$ 。

Tab 1. Drug resistance of B30-6 and G10-3

Strains	Nal, $\mu\text{g/ml}$	Rif, $\mu\text{g/ml}$		Nal + Rif, $\mu\text{g/ml}$
	100	25	50	100 + 25
B30-6	+	+	+	+
G10-3	±	-	-	-

2.2 B30-6 原生质体紫外线灭活条件实验

将制备的 B30-6 原生质体在紫外光下,累积处理不同时间,测定原生质体的存活率,结果见表 2。为使原生质体灭活完全,便于融合子的检测,实验中采用紫外线灭活处理 90

min。紫外线灭活,引起 DNA 不同位点的损伤,通过融合造成遗传物质互补,形成有活性的融合细胞。

考虑紫外线灭活较之加热灭活“致死损伤”大,我们也曾试验,在 65℃水浴中加热 45 min 和 60 min,测定其原生质体存活率。结果见表 2。从表中看 B30-6 原生质体对热不太敏感,加热 60 min,存活率达 1.1×10^{-2} ,故未采用。热灭活的原发作用于细胞质,高温使蛋白质、酶等大分子变性失活,其作用位点差别不大^[5]。

Tab 2. Survival rate of protoplast after UV irradiation and 65℃ heating

Treatment	Survival rate			
	30 min	45 min	60 min	90 min
UV	1.03×10^{-3}	5.5×10^{-5}	9.7×10^{-6}	4.0×10^{-6}
Heating	3.5×10^{-2}		1.1×10^{-2}	

2.3 原生质体融合及融合子测定

将紫外线单亲灭活的原生质体 B30-6 和原生质体 G10-3 在 PEG 诱导下,融合,然后分离在含利福平 25 $\mu\text{g/ml}$ 的双层 YE 再生平板上,计算融合频率^[6]。由于 B30-6 已被灭活钝化,G10-3 对药物敏感,两亲本在含利福平的 YE 再生平板上均不能生长,只有融合产生的抗药细胞才能再生,出现菌落。但菌落形态类似亲本 B30-6,因此可能含有未完全灭活的亲本。经进一步实验发现,融合平板上的菌落数明显高于同一稀释度下经紫外线灭活的 B30-6 对照平板的菌落数,因此可以肯定两者确实发生了融合。经测定,平均融合率仅为 2.8×10^{-7} ,这可能是因为两种菌分属两个完全不同的属,形态、染色性、生理生化反应均完全不同,可见其基因组差别亦很大,属远缘原生质体融合,因而融合频率低。

随机挑取融合平板上的菌和二亲本一起分别点种在 B. T. B 培养基和分离培养基上。结果在分离培养基上均生长,在 BTB 培养基上,B30-6 不生长,G10-3 生长且菌落呈黄色,而挑选的菌中有的不生长,这是未被灭活的

B30-6, 有的培养 1 d, 略显黄色生长, 3 d 后转为白色, 这是真正的融合子。根据培养基中指示剂颜色的变化, 认为其产酸能力较低。将融合子在 B、T、B 培养基上连续传代 3 次, 结果仅少数株在 B、T、B 培养基上仍生长。融合子的培养特征和染色性类似于 B30-6。另几株经传代有双亲本混合菌出现。由此可见融合子不稳定, 传代中, 遗传因子发生分离, 恢复了亲本性状。

将稳定的融合子经摇瓶发酵, 产酸量为 13.5 mg/ml, 低于亲本混合菌系的 70.5 mg/ml, 可见 G10-3 与 B30-6 虽然发生了融合, 但与产酸有关的一系列编码酶的基因可能未完全与 B30-6 中有关基因组发生重组, 或虽重组但表达差。

原生质体由于去除了细胞壁, 在融合中无明显供受体之分。本实验融合子的获得再次证明远缘微生物融合育种是可行的, 如何使融合子能综合双亲本的优势, 提高产量是我们下一步研究的课题。

3 小 结

1) 紫外线单亲灭活 B30-6 原生质体, 经

紫外线处理 90 min, 存活率为 4.0×10^{-6} 。

2) 单亲灭活 B30-6 原生质体和 G10-3 原生质体在 PEG 诱导下融合, 分离在选择标记为利福平的 YE 再生平板上, 融合频率为 2.8×10^{-7} 。

参 考 文 献

- 1 Teruhide S, Tatsuo H, Setsuko M, et al. Microbial production of 2-keto-L gulonic acid from L-sorbose and D sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. *Agric Biol Chem*, 1990, 54: 1201
- 2 Chang S, Cohen SN. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Mol Gen Gene*, 1979, 168: 111
- 3 冯瑞山, 陈建华, 盛 勤等. 软化芽孢杆菌原生质体的形成和再生研究. 中国药科大学学报, 1996, 27(10): 621
- 4 吕群燕, 王书锦, 周东坡等. 用原生质体融合技术选育 2-酮基-L-古龙酸高产菌株的研究. 微生物学杂志, 1994, 15(1): 1
- 5 Fodor K. Polyethylene glycol-induced fusion of heating activated and living protoplast of *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol*, 1989, 135: 68
- 6 洪益国, 郑幼霞. 棒状杆菌灭活原生质体种间融合. 遗传, 1988, 10(3): 24

Protoplast Fusion of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus macerans*

Sheng Qin, Feng Ruishan, Chen Jianhua, Wang Yanyu, Wu Wutong

Biological Research Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The fusion of UV irradiated protoplast of *Bacillus macerans* B30-6 and living protoplast of *Gluconobacter oxydans* G10-3 was presented. The experiment of fusion was carried out in hypertonic buffer containing PEG₆₀₀₀. Fused cells were screened in YE medium with rifomycin and BTB medium, and the frequency of fusion was 2.8×10^{-7} .

Key words *Bacillus macerans*; *Gluconobacter oxydans*; Protoplast fusion; Fused cell