

研究报告

欧文氏菌和棒杆菌的属间融合研究*

林红雨** 陈策实 尹光琳

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要 研究了用原生质体融合技术获得欧文氏菌和棒杆菌的融合细胞。串联发酵 D-葡萄糖产生 2-酮基-L-古龙酸的第一步发酵菌株欧文氏菌 SCB247 经 0.8mg/mL 溶菌酶酶解 0.5h 后,原生质体的形成率和再生率分别为 99.8% 和 27.8%。第二步发酵菌株棒杆菌 SCB3058 经预处理后由 1.3mg/mL 溶菌酶酶解 2h,原生质体的形成率和再生率分别为 99.5% 和 56.3%。用携带氨苄青霉素抗性标记的 SCB247 和经热灭活的 SCB3058 为亲本,在 40%PEG 6000 和 0.2mol/L 新生磷酸钙等适宜条件下融合,融合频率为 3.6×10^{-6} 。在非选择和选择培养基上连续传代十几次后,对融合子的单菌形态、染色结果、菌落形态、色泽、总蛋白量、同工酶、发酵性能等方面与亲本进行了比较。结果表明,融合子确系棒杆菌和欧文氏菌的融合细胞。摇瓶发酵结果显示,所得的 38 株稳定的融合子中约 40% 能转化葡萄糖为维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸。

关键词 原生质体,融合子,棒杆菌,欧文氏菌,2-酮基-L-古龙酸

分类号 Q931 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-3-6

INTERGENERIC CELL FUSION OF *CORYNEBACTERIUM* AND *ERWINIA*^①

Lin Hongyu, Chen Ceshi, Yin Guanglin

(Shanghai Research Centre of Biotechnology Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract Given the known information of D-glucose tandem fermentation, this paper did the cell fusion of the two strains involved in the tandem fermentation. Lysed in 0.8mg/ml lysozyme for half an hour, *Erwinia* sp. SCB247 was converted into protoplasts with the formation rate of 99.8% and regeneration rate of 27.8%. The protoplasts of *Corynebacterium* sp. SCB3058 were formed after being treated with 1.3mg/ml lysozyme, formation rate and regeneration rate were 99.5% and 56.3% respectively. Ampicillinresistant strain *Erwinia* sp. SCB247 protoplasts and heat-inactivated *Corynebacterium* sp. SCB3058 protoplasts were fused in 40% PEG 6000 and 0.2mol/L newly-made $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ with a fusion rate of 3.6×10^{-6} . After 15 generations, the fusion cells were compared with parents cells in terms of single cell morphology, colony morphology, protein staining, isozymes and fermentation properties. The comparison showed that about 40 percent of the fusants can fermentate D-glucose directly and convert it to 2-keto-L-gulonic acid, the precursor of vitamin C.

Key word Protoplast, Fusion, *Corynebacterium* sp., *Erwinia* sp., 2-keto-L-gulonic acid.

^① Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development

* 国家“八五”科技攻关计划项目

** 1993年毕业硕士研究生,现在美国纽约州大学学习

1998-02-23收稿,1998-05-06修回

细胞融合技术是一项成熟的细胞工程技术。近30年来,这项技术迅速发展,取得了大量的研究成果^[1,2]。本文报道细胞融合技术在维生素C串联发酵菌的原生质体融合方面的应用。

维生素C又名L-抗坏血酸,是人体必需的一种维生素^[3]。80年代初,Sonoyama等人用两株细菌串联发酵D-葡萄糖来产生2-酮基-L-古龙酸^[4],尹光琳等人于90年代初也在国内首先报道了串联发酵研究^[5]。1989年,Verma报道了一批维生素C发酵生产菌脱壁方法^[6]。D-葡萄糖串联发酵菌株中一个是革兰氏阳性菌,另一个是革兰氏阴性菌。其中革兰氏阴性菌欧文氏菌的脱壁国内外未见报道,而以革兰氏阳性和革兰氏阴性为亲本的细胞融合研究目前在国内同样亦未见成功的报道。从长远来看,以D-葡萄糖串联发酵为基础,开展串联发酵菌株的细胞融合研究有一定的理论意义和重要的生产应用价值^[7,8]。

1 材料和方法

1.1 菌株

欧文氏菌 SCB247(*Erwinia* sp.), 棒杆菌 SCB3058(*Corynebacterium* sp.), 均由本组保存。

1.2 培养基

基本培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, 尿素 3, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2×10^{-3} , K_2HPO_4 1, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2×10^{-3} NaCl 5×10^{-2} , 生物素 5×10^{-5} , 琼脂 20, pH 7.0。

选择培养基(g/L): 琥珀酸钠 81, 乳糖 50, 以基本培养基为母液配制, pH 7.0。

传代培养基(g/L): 乳糖 20, 琼脂 20, 氨苄青霉素 0.1, 以基本培养基为母液配制, pH 7.0。

融合子斜面培养基(g/L): 乳糖 20, 多聚蛋白胨 5, 酵母膏 5, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, pH 7.0。

1.3 脱壁液和融合液

SSME(3058 酶解液): 乳糖 15%(W/V), 琥珀酸钠 0.2mol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02mol/L, EDTA 5mmol/L, pH 8.3。SSM(3058, 247 稀释

缓冲液): 乳糖 15%(W/V), 琥珀酸钠 0.2mol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02mol/L, pH 6.5。融合液: PEG 6000 50%, EDTA 5mmol/L。

新生磷酸钙: K_2HPO_4 0.54g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 29.4g 分别溶于 100 毫升水中, 灭菌后等体积混合。溶菌酶: 中科院上海生物化学研究所提供, 100mg/mL 用 SSM 配制, 过滤灭菌, 4℃ 保存。

1.4 欧文氏菌原生质体的形成

SCB247 新鲜斜面接 3mL 种子试管, 28~30℃, 260r/min 旋转培养过夜, 8% 接种量接种二级摇瓶, 在对数中期离心收集菌体, 用 TE (10mmol/L Tris-HCl, 5mmol/L EDTA, pH 7.4) 洗涤两次后用酶解液悬浮, 加溶菌酶至终浓度为 1mg/mL, 37℃ 保温 10min 后加 EDTA 至终浓度为 60mmol/L, 继续酶解 20min 后 4500r/min 离心 10min, 收集原生质体用 SSM 高渗稳定液洗涤, 得 247 原生质体悬液。

1.5 棒杆菌原生质体的形成

SCB3058 新鲜斜面接 3mL 种子试管, 28~30℃, 260r/min 旋转培养过夜, 8% 接种量接种二级摇瓶, 2h 后加入终浓度为 2% 的甘氨酸和终浓度为 0.8% 的氨苄青霉素, 2h 后离心收集菌体, 洗涤菌体两遍后用酶解缓冲液悬浮, 加溶菌酶至终浓度为 1mg/mL, 37℃ 保温 2h, 4500r/min 离心 10min 收集原生质体, 用 SSM 高渗稳定液洗涤, 悬浮, 55℃ 水浴 30min 后 4500r/min 离心 10min 收集原生质体, SSM 高渗稳定液悬浮, 得 SCB3058 原生质体。

1.6 融合及融合子的检出

等体积混合 3058 和 247 的原生质体悬液, 4500r/min 离心 10min, 加少许 SSM 轻轻混合均匀, 加融合液至 PEG 6000 终浓度为 40%, 新生磷酸钙为 0.2mol/L, 混合均匀 28℃ 保温 30min, 4500r/min 离心 10min 收集融合子, 用液体基本培养基悬浮, 涂在传代培养基平板上, 28℃ 培养再生 8d。

1.7 检出和鉴定

用无菌牙签挑取原代融合平板上的菌落到选择培养基上, 并同时点接 SCB247 和 SCB3058 在 28℃ 培养 2d, 挑取未分化的融合菌

落继续传代,点接持续五代,后在选择培养基和传代培养基上交替传代直至不再有回复亲本的现象出现。以此融合子为材料做融合子的鉴定。

2 结果和讨论

2.1 影响棒杆菌原生质体形成的因素

采用在对数生长前期加青霉素和甘氨酸的预处理方法。从理论上讲,预处理后,菌体表面的肽聚糖单位之间的交联程度降低,整个肽聚糖层变疏松,对溶菌酶的敏感性增加。以此达到用少量的溶菌酶来酶解和剥离细胞壁而保留完整质膜的目的。

溶菌酶浓度分别选择为 0.7mg/mL、1.0mg/mL、1.3mg/mL。随着溶菌酶浓度的增加,棒杆菌原生质体形成率略升高,而再生率却下降。本文选取的酶量为 1.3mg/mL,时间为 2h。

2.2 影响欧文氏菌原生质体形成的因素

采用在酶解 10min 以后的酶解缓冲液中补加 EDTA 的方法,目的在于改变酶解环境中的离子强度和渗透压,细胞的脱壁不仅取决于酶活力的大小,还取决于酶与底物的充分接触。细胞外适当的渗透压能引起胞内和周质空间的蛋白分子流出细胞在外壁形成缺口,利于酶分子和细胞外壁充分接触,以加强酶解作用。

溶菌酶量分别为 0.3mg/mL、0.5mg/mL、0.8mg/mL。随着溶菌酶量的增加,欧文氏菌原生质体的形成率升高而再生率略下降。本文采用的酶解条件是 0.8mg/mL,时间是 30min。

2.3 融合、检出和鉴定

融合液中除常规的 40% PEG 6000 和 10μg/mL DNA 酶外,另加新生磷酸钙 0.2mol/L,原代融合细胞的再生需要经过 DNA 的重组、修整和部分新蛋白质的表达、原生质体外壁的再生等一系列复杂的过程,因此原代融合平板上不加抗生素,以保证一个温和的恢复再生环境,传代培养基上补加抗生素以维持融合菌性状。以第 15 代融合菌为材料进行以下几方面的性状鉴定(表 1,表 2)。

表1 亲本和融合菌的单个菌体单个菌落形态及特性的比较

项目	棒杆菌	欧文氏菌	融合菌
单个菌体形态	饱满,略呈纺锤形,栅栏状排列	短杆状,无规则排列	椭圆形或瓜子形,排列形态接近棒杆菌
单个菌落形态	桔黄色,透明,平坦,边缘光滑	乳白色半透明,微凸,边缘略有皱	鹅黄色,圆形光滑
革兰氏染色	G ⁺	G ⁻	G ⁻
氨苄青霉素抗性	S	R	R
碳源(蔗糖,乳糖, + 棉子糖和松三糖)		-	-
利用			

表2 亲本和融合细胞的长短轴、轴比和体积的比较

项目	棒杆菌	欧文氏菌	融合子1	融合子2
长轴(μm)	0.9	2.1	1.3	1.0
短轴(μm)	0.5	0.4	0.6	0.6
体积(μm ³)	0.118	0.176	0.245	0.207
长轴/短轴	1.8	5.25	2.17	1.83

2.3.1 亲本和融合细胞的总蛋白分析:从亲本和融合细胞的总蛋白电泳结果(图 1)看,融合子和两株亲本细胞的总蛋白种类和数量均有明显不同,而融合细胞之间却有明显的相似性。说明融合子明显区别于任何一个亲本。

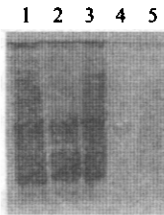


图1 融合子和亲本的总蛋白电泳比较
1,2,3. 融合子, 4. SCB247, 5. SCB3058

2.3.2 同工酶分析:同工酶是指同一种属中,由不同基因位点或等位基因编码的多肽链单体、纯聚体或杂聚体,其分子一级结构、理化性质和生理功能均不同,但催化功能相同或相似。同工酶的发生与基因进化和种的演变有关,表现出明显的组织、种属和发育的特异性,因此是一种可靠的遗传标记。对两亲本和融合子的过氧

化物酶进行了分析,结果融合子所有谱带都来自双亲,但又不完全等同于任何一方亲本(图2)。也证明了融合子确实是双亲的融合。

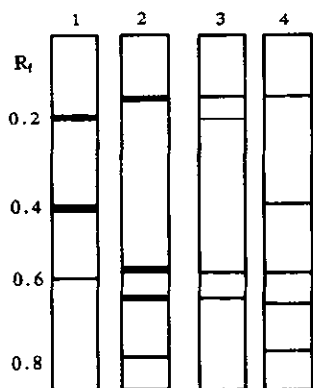


图2 亲本和融合子的过氧化氢酶聚丙烯酰胺电泳结果示意图

1. SCB247, 2. SCB3058, 3. 融合子1, 4. 融合子2

2.3.3 发酵性能检测:在融合子的发酵性能检测实验中,从38株稳定融合子随机挑取几株做发酵测定,结果40%的融合子能发酵产生少量的2-KLG。表3列出了融合子的发酵产酸结果。

本文在国内首次将欧文氏菌SCB247脱壁形成原生质体,并进行了欧文氏菌和棒杆菌的属间融合。从中选育得到了能利用糖直接发酵产生少量维生素C前体2-酮基-L-古龙酸的融

表3 融合子发酵结果

融合子1				
时间(h)	62	74	102	140
pH	7.04	6.99	9.96	6.81
2-KLG(mg/ml)	0.32	0.4	0.71	1.21
融合子2				
时间(h)	48	77	96	120
pH	7.21	6.96	6.71	7.01
2-KLG(mg/ml)	0.19	0.21	2.07	0.85

合菌株。就理论意义而言,本文为革兰氏阴性菌和阳性菌的细胞融合研究提供了参考方法和经验,同时为我国维生素C工业生产提供了一条新的可能途径,有一定的实际应用价值。

参 考 文 献

- [1] 辛明秀,马玉娥. 微生物学通报,1995, 22(6): 365~370.
- [2] 陈海昌,唐 屹,张岭花等. 微生物学通报,1994, 21(4): 213~217.
- [3] 尹光琳. 工业微生物,1991, 1: 29~37.
- [4] Sonoyama T, Tani H, Matsuda K *et al.* Appl Environ Microbiol, 1982, 43: 1064~1069.
- [5] 尹光琳,马志方,董文玲等. 微生物学报,1991, 31: 198~205.
- [6] Verma V. Plasmid, 1989, 22: 265~267.
- [7] 乔宝义,徐 浩. 微生物学报,1983, 23(1): 33~43.
- [8] Verma V. Biotechniques, 1989, 7(5): 449~451.