

枯草芽孢杆菌转化育种中几个有关问题的探讨

薛禹谷 董可宁 韩文珍

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1. 肌苷生产菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B₃-3 (产肌苷 6—7 克/升) 的 DNA 转化给枯草芽孢杆菌 Ki-2-148 时, 于受体菌对数生长期后期, 在转化培养基中处理 60 分钟, 转化频率最高。

2. 转化体 Ki-2-148-4 积聚痕迹量的肌苷, 经单菌分离, 得到 Ki-2-148-4-8 菌株, 摇瓶发酵试验积聚肌苷 4.1 克/升。

3. 转化处理时, 加入溶菌酶 5 微克/毫升, 可以提高转化频率约 6 倍。

4. 用电子显微镜观察到, 枯草芽孢杆菌 B₃-3 的 DNA 与处于感受态的受体细胞接触时, 一部分 DNA 比较集中在受体细胞的分裂面上, 并有垂直于分裂面的趋势。此现象未见报道过, 其机理有待进一步研究。

在微生物育种工作中, 如何在广泛应用诱变育种的基础上, 比较定向地选育优良菌种, 这是当前迫切需要解决的问题。国外对遗传转化的研究虽然较多, 但应用在育种工作中的还很少^[1-3]; 国内对遗传转化育种的研究已开始进行了^[4]。本文报道了利用国内已经建立的枯草芽孢杆菌的一个转化系统^[5], 通过肌苷生产菌株的转化试验、研究遗传转化在枯草芽孢杆菌育种中的应用方法; 探索了溶菌酶对转化频率的影响; 并对转化时 DNA 进入受体的过程进行了一些电镜观察, 初步探索了枯草芽孢杆菌的转化机理。

材料和方法

(一) 菌株

给体菌株: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B₃-3 (ade⁻, thi⁻, str^R)*——由 B₃^[6] 菌株得到的抗链霉素 (500 微克/毫升) 的菌株。

枯草芽孢杆菌 K-S-5-1 (str^R)——由 Ki-2-148^[7] 得到的抗链霉素 (500 微克/毫升) 的菌株。

受体菌株: 枯草芽孢杆菌 Ki-2-148 (ura⁻), 和枯草芽孢杆菌 Ki-2^[3], 均由中国科学院遗传研

究所提供。

(二) 培养基

基本培养基 (%) : 葡萄糖 1, L-谷氨酸 0.65%, K₂HPO₄ 0.3, KH₂PO₄ 0.1, Na₂SO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.01, 生物素 0.2 微克/毫升。

肉汤培养基 (%) : 牛肉膏 1, 蛋白胨 1, 氯化钠 1, pH 7.0。

无机生长培养基 (SI 培养基) 和转化培养基 SII 培养基: 按 Anagnostopoulos 等^[8]的方法配制。

(三) 转化 DNA 的制备和测定

基本上按 Saito 等^[9]的方法制备。将处于对数生长期的菌液, 在 0℃ 下 3000 转/分离心 30 分钟, 用 NaCl-EDTA 溶液洗涤菌体两遍, 收集和称量菌体。于菌体中加入溶菌酶和 NaCl-EDTA 溶液 (pH 8.0), 置 37℃ 保温 10—20 分钟, 菌液变稀后, 立即放入干冰或液氮中冷冻, 然后加入 Tris-SDS 缓冲液 (pH 9.0), 60℃ 保温, 待菌体溶解

本文于 1976 年 10 月 22 日收到。

* ade⁻ 腺嘌呤缺陷型
thi⁻ 硫胺素缺陷型
str^R 链霉素抗性
ura⁻ 尿嘧啶缺陷型
purA 嘌呤 A 基因位点
thyB 胸腺嘧啶基因位点

后加入等体积的 90% 重蒸苯酚,于 0℃ 冰浴中振荡 20 分钟,4500 转/分离心 30 分钟,吸取上清液,用重蒸苯酚再处理一次,吸取出上清液,放入烧杯中,沿烧杯边缘慢慢加入二倍体积的预冷的 95% 乙醇,轻轻摇动, DNA 呈絮状沉淀析出,收集沉淀,溶于 0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸钠溶液 (pH7.0) 中,存放于 4℃ 冰箱中,加溶菌酶后的制备过程须在无菌条件下操作。用此法制备的 DNA 仍含有部分 RNA 和蛋白质,但可有效地进行转化。

DNA 的含量按改进的二苯胺法^[10]测定,在本文所报道的转化实验中, DNA 用量是: B₅-3 菌株的 DNA 为 26 微克/毫升; K-S-5-1 菌株的 DNA 为 14 微克/毫升。

(四) 受体菌株培养感受态的方法

按改良的 Anagnostopoulos 等^[4]的方法进行,先做不同生长阶段的转化率试验,确定感受态最高的生长阶段。

(五) 转化操作

将受体菌株在肉汤培养基中培养到对数生长期初期(光密度 O.D.₆₆₀ 毫微米 约 0.1—0.4, 菌数约 0.5—3 × 10⁸),离心收集菌体,悬浮在等体积的 SI 培养基中,在 37℃ 恒温水浴内振荡培养(往复式,振幅 5 厘米,92 次/分)到对数生长期的中后期(光密度 O.D.₆₆₀ 毫微米 约为 0.4—0.9, 菌数约 5—9 × 10⁸),离心,将菌体悬浮在等量或稍少的 SII 培养基中,进行转化操作时,按表 1 所列比例、分别加入试管(16 × 160 毫米)中,在 37℃ 恒温水浴中振荡培养 60 分钟。

表 1 转化液的组成

	SI 培养基 (毫升)	核酸液 (毫升)	菌液 (毫升)
转化	1.7	0.1	0.2
受体对照	1.8	0	0.2
核酸对照	1.9	0.1	0

(六) 转化体的检出

有营养缺陷型标记的转化体,在基本培养基平皿上检出。将 ura⁻已转化为 ura⁺的菌落,即能在基本培养基上生长的转化体挑出后,再分别用基本培养基、加有硫胺素(30 微克/毫升)的基本培养基、加有腺嘌呤(30 微克/毫升)和硫胺素(30 微克/毫升)的基本培养基及加有腺嘌呤(30 微克/

毫升)的基本培养基检出可能积聚肌苷的 ade⁻, thi⁻双缺陷菌株。

检出有链霉素抗性标记的转化体用双层法。方法是:先将 0.1 毫升转化后的菌液涂布在 10 毫升肉汤固体培养基上,37℃ 培养 3 小时后,将含有一定量链霉素硫酸盐的 1% 的琼脂 5 毫升覆盖在上层,使链霉素扩散后最终浓度达到所要求的水平,37℃ 培养 48 小时后记录转化结果,所用给体菌株(str^R)耐受链霉素的最高浓度是 500 微克/毫升,受体菌株 Ki-2 和 Ki-2-148 是链霉素敏感株,培养基中链霉素浓度大于 40 微克/毫升即不能生长,用于测定链霉素抗性标记转化的肉汤固体培养基中,链霉素最终浓度为 100 微克/毫升。

(七) 电镜观察

除注明用蛋白质单分子膜展开法^[11]制备的电镜观察样品外,其它均用载有火棉胶-碳膜的铜网蘸取样品制备,用真空镀膜机旋转投影后,用电镜观察。电镜照片见图版 1, II*。

(八) 肌苷发酵试验

方法同王成全等^[4]。

结 果

一、Ki-2-148(ura⁻)菌株在 SI 培养基内不同生长阶段的转化频率比较

分别将处于停滞期,对数生长期初期,对数生长期后期和静止期的 Ki-2-148 (ura⁻)菌株作为受体,以 B₅-3 菌株的 DNA 作为给体进行转化,测定 ura⁻ → ura⁺ 的转化频率。在所采用的 SI 培养基内,于振荡培养条件下发现 Ki-2-148 菌株感受态出现的高峰是在对数生长期的中后期,对数期以后转化频率急剧下降。结果见表 2。

表 2 Ki-2-148(ura⁻)不同生长阶段的转化频率

生长阶段	O. D. ₆₆₀ 毫微米	ura ⁻ →ura ⁺ 转化频率	相对转化 频率
停滞期	0.17	2.7 × 10 ⁻³	5.4
对数生长初期	0.32	1.8 × 10 ⁻²	36
对数生长后期	0.55	5.0 × 10 ⁻²	100
静止期	0.81	3.0 × 10 ⁻⁴	0.6

* 除图版 I-2 由本所电镜室摄制外,余均由中国科学院生物物理研究所电镜室摄制。

据该菌株在 SI 培养基中的生长曲线计算出该菌的世代时间为 1 小时 36 分钟 (37℃)。

二、Ki-2-148(ura⁻)菌株从 SI 培养基转入 SII 培养基后，转化处理时间与转化频率的关系

为了在我们的实验条件下找出最适的转化处理时间，我们试验了 B₅-3 菌株的 DNA 转化给 Ki-2-148 菌株时，处理时间与转化频率的关系，结果见表 3。由表 3 可见，在我们的实验条件下，如受体细胞处理对数生长期的中后期，转化处理时间以 60 分钟较合适，时间延长，转化频率显著降低。

表 3 B₅-3 菌株的 DNA 转化给 Ki-2-148 菌株时，处理时间与转化频率的关系

处理时间	转化频率	相对转化频率 (%)
30	1.1×10^{-2}	64.7
60	1.7×10^{-2}	100
90	6×10^{-4}	3.5

三、枯草杆菌野生型菌株 Ki-2 菌株和营养缺陷型 Ki-2-148(ura⁻) 菌株间转化率的比较

为了明确 str^R 和 ura⁻ 两个遗传标记在不同的枯草杆菌菌株间转化时有无差异，以便于选择转化标志，我们比较了 str^R 和 ura⁻ 两个遗传标记在菌株内和菌株间的转化频率，结果见表 4。结果说明，在枯草杆菌

表 4 枯草杆菌中遗传标记 str^R 和 ura⁻ 在菌株内和菌株间转化率的比较

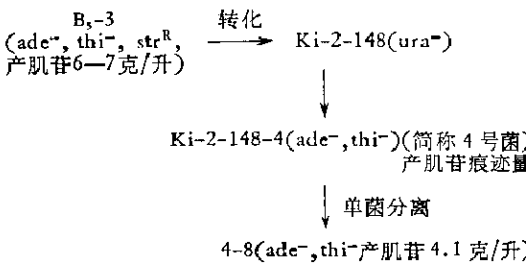
DNA 给体菌株	Ki-2		Ki-2-148(ura ⁻)			
	str ^R 转化频率	str ^R 相对转化频率	str ^R 转化频率	str ^R 相对转化频率	ura ⁺ 转化频率	ura ⁺ 相对转化频率
枯草杆菌 K-S-5-1(str ^R 500r/ml)	5×10^{-6}	100	1.3×10^{-5}	100	4×10^{-3}	100
枯草杆菌 B ₅ -3(ade ⁻ thi ⁻ str ^R)	3×10^{-7}	6	2.7×10^{-6}	20.7	5×10^{-3}	125

菌株间链霉素抗性标记的转化率小于菌株内的，但 ura⁻ 这个遗传标记的转化率，在菌株间不低于菌株内。

四、肌苷生产菌株的选育

我们在将 B₅-3 菌株的 DNA(ade⁻, thi⁻, str^R) 转化到 Ki-2-148(ura⁻) 的试验中，ura⁻ → ura⁺ 的转化率为 5×10^{-3} ，表明确已发生了遗传物质的转化传递。经测定，在这些转化体中、有 4 株 ade⁻ 菌株，转化频率为 1.0×10^{-6} ，其中 Ki-2-148-4 菌株(简称 4 号菌)是 ade⁻, thi⁻ 双重营养缺陷型菌株，转化频率为 2.5×10^{-9} 。用 4 号菌进行肌苷发酵试验，其仅积聚痕迹量的肌苷。由于最初所得的转化体几乎都是含有受体和转化体的混合菌株^[12,13]，所以我们又进行

了单菌分离，得到 4-8 菌株，摇瓶肌苷发酵试验，肌苷产量为 4.1 克/升。4-8 菌株的选育过程如下：



五、溶菌酶对枯草杆菌转化频率的影响

给体是 B₅-3 DNA，受体是 Ki-2-148 (ura⁻)，溶菌酶是在 SII 培养基中进行转化处理前先加入试管内，然后加入 DNA，最

后加入受体菌液,结果见表 5, 图版 I-4。

表 5 溶菌酶对枯草芽孢杆菌细胞壁和转化频率的影响

加溶菌酶量 (微克/毫升)	转化频率	相对转化 频率	电镜下观察细胞壁 情况
0 (对照)	1×10^{-2}	100	细胞壁清晰
1	1×10^{-2}	100	细胞壁界限模糊,但未破
5	6.2×10^{-2}	620	细胞壁有损伤,原生质收缩,部分外渗
50	7×10^{-3}	70	细胞壁溶解,原生质膨胀,菌体缩短,呈椭圆形

以上结果说明加 5 微克/毫升溶菌酶可以增加转化频率约六倍,加 1 微克/毫升溶菌酶对转化频率没有影响,加 50 微克/毫升溶菌酶会使转化频率降低,如加入溶菌酶大于 5 毫克/毫升时,往往有部分原生质外渗,电镜下观察时背景较杂乱,无法观察 DNA 进入受溶菌酶处理的受体菌的接触过程,但能从转化频率上看到它们之间的明显差异。

六、B₅-3 菌株的 DNA 转化到受体 Ki-2 菌株的电镜观察

从图版 II-1 可见,用前述方法提取的 B₅-3 菌株的 DNA 呈双螺旋曲线状,从图版 II-2 可见 B₅-3 菌株的 DNA 与处于感受态的 Ki-2 菌株细胞接触时,有些 DNA 比较集中在细胞分裂面,而且有垂直于分裂面的趋势,为了进一步明确此现象,我们将同样样品以蛋白质单分子膜制样时,则 DNA 为蛋白质单分子膜所撑开,平均分布在受体细胞周围,就不能见到 DNA 与感受态细胞接触时 DNA 的趋向性(见图版 II-3)。

讨 论

据报道,枯草芽孢杆菌一个基因组的 DNA 长度为 1700 微米,分子量为 3.3×10^9 ^[14],从枯草芽孢杆菌中提取的转化 DNA 的平均长度是 10 微米,平均分子量是 $2.1 \times$

10^{11} ^[15],这表明一个基因组平均断裂为 160 个碎片,有人曾发现,有多至 12 个基因可以连锁在一个 DNA 碎片上^[16]。一般转化时 DNA 的浓度用 1—10 微克/毫升,如用此水平的 DNA 转化,将有 5—10% 转化体能接受一个以上的 DNA 片段,并能同时转化两个不连锁的基因^[17]。我们用来转化的 DNA 的浓度是 14 微克/毫升(K-S-5-1)和 26 微克/毫升(B₅-3),得到三个不连锁标记(ura⁺, ade⁻, thi⁻)的转化频率为 2.5×10^{-9} ,而 ura⁻(pyrA), ade⁻(purA) 和 thi⁻(thyB)这三个标记有关的位点在枯草芽孢杆菌的基因图上相距较远,三者相互间距离远远超过 12 个基因以上,因而也可以推测吸附并进入同一个感受态细胞的可能是三个分别的 DNA 碎片。

由于我们所采用的转化育种步骤是首先要求证明确已转化,然后再从转化体中检出可能积聚肌苷的有双重营养缺陷标记(ade⁻, thi⁻)的转化体,因而这种检出程序所得转化频率不足以代表这三个遗传特性在其它检出步骤下的转化频率。

在实际应用于转化育种工作时,最好能选择与所需转化标记比较邻近的标记作为转化的测定指标,这样便于获得所需标记的较高转化频率。我们并未选用靠近 purA 旁边的 strA 的抗性标记,这是由于 str^R 标记在枯草杆菌基因图上有三个位点,(strA.B.C)且相离较远,需要抗较高浓度链霉素的表型才有较多可能将相应于 strA 的 str^R 基因位点包括在内。根据我们的实验,对链霉素抗性较高的菌株往往会影响肌苷积聚量,另一原因是链霉素的抗性标记在转化后的表型常常受分离延滞(segregational delay)以及抗链霉素转化株抗性回复的表型延滞(phenotypic delay)的影响。分离延滞期和抗性回复的表型延滞期的长短,因菌株和培养条件不同而不同,另外如以链

霉素抗性标记为指标,则在转化过程中不能排除由于突变产生链霉素依赖型菌株的干扰,由于以上种种原因,链霉素抗性基因转化与否往往不易确切识别,所以,我们认为在枯草芽孢杆菌中进行转化育种时,以链霉素抗性作为识别转化标记,不如用营养缺陷型方便明确。

如何提高转化频率,也是转化能否应用到育种中去的关键问题之一,曾有人提到加少量溶菌酶可以提高转化频率^[18],我们的实验结果表明加 5 微克/毫升溶菌酶可以提高转化频率约六倍,其效果高于以往报道,如溶菌酶用量为 50 微克/毫升,则反使转化频率降低。这一观察结果可以在今后转化育种中加以利用。为了进一步观察少量溶菌酶提高转化频率的原因,我们在电镜下观察了加入不同量的溶菌酶到受体细胞后的细胞变化,图版 I-1—4 说明溶菌酶确使细胞壁和原生质起了一定变化,但 5 微克/毫升为何能提高转化频率,这恐怕不能仅仅是因为完整细胞壁能阻止分子量为 1×10^6 以上的较大分子的进入,其机理尚有待更进一步探究。由于加入过量溶菌酶后,往往使细胞内部分原生质外渗,而使加入的转化 DNA 的动向看不清楚,我们虽也曾加入不同浓度的蔗糖溶液使菌体保持一定渗透压,防止细胞破损和原生质外渗,但蔗糖加入后也影响观察转化 DNA 进入受体的过程,所以电镜观察方法尚须作进一步改进,以便掌握合适条件、阐明机理,更好地应用于育种实践。

一个菌株能否进行转化育种,首先要有感受态,即细胞能从周围环境中吸收给体 DNA 分子而又不被本身 DNA 分解酶所破坏的细胞生理状态,感受态的出现虽受制于遗传,但环境条件和细胞本身的生理状态起着重要的作用。我们所用受体枯草

芽孢杆菌 Ki-2-148,菌株从生长培养基中转入转化培养基后,在我们的实验条件下,60 分钟时出现感受态高峰,此时受体细胞仍处于对数生长期末期,在电镜下仔细观察时可以找到有一些 DNA 集中在两个细胞分裂处,并有垂直于分裂面的趋势,此现象以往尚未见过报道,说明感受态出现可能与细胞分裂周期有关。由于感受态的出现,有一定的周期性^[19],也受培养条件的影响,有人用两个独立转化性状的转化频率以及双重转化频率计算出,枯草芽孢杆菌中感受态细胞不超过 10%^[20,21]。在这方面还应进行更多工作,以期有助于进一步阐明这一问题。

转化体获得以后,下一步如何筛选和提高产量这就和诱变育种得到的突变体一样,它需要进一步进行复测或通过单菌分离进行纯化,也可以用第一次得到的转化体作为受体进行第二次转化,将人们所需要的优良性状,逐步转移到同一菌株上去,在 α -淀粉酶产生菌株的转化育种中,有人就应用了多次转化,使酶活力得到很大提高^[3]。枯草芽孢杆菌遗传转化不仅在同种和亲缘关系较近的菌株中能进行,有人曾将亲缘关系较远的菌株,如放线菌中的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 的 DNA 和枯草杆菌进行过转化^[22],说明转化作为一种育种手段是很有前途的。它虽然存在着受体菌株的局限性,出现感受态的条件以及如何提高转化频率等问题,但遗传转化相对说是一个比较定向的育种方法,值得进一步研究。此外,近几年来对枯草芽孢杆菌进行的一系列包括基因工程在内的遗传研究,很有可能使枯草芽孢杆菌能成为抗菌素和酶制剂的优良产生菌株^[23],这就将使枯草芽孢杆菌的转化育种朝着定向目标飞跃性地迈一大步。

参 考 资 料

- [1] Biswas, G. D. and Sen, S. P.: *J. Appl. Bacteriol.*, **34**: 277—285, 1971.
- [2] Магемов, Б. П.: *Микробиол.*, **26**: 8—15, 1964.
- [3] Yoneda, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**: 765, 1973.
- [4] 苏州味精厂: *遗传学报*, **3**(2): 159—163, 1976.
- [5] 汤懋斌等: *微生物学报*, **11**: 544—553, 1964.
- [6] 王敖全等: *微生物学报*, **16**(2): 171—176, 1976.
- [7] 中国科学院遗传研究所一室三组: *遗传学报*, **1**: 139—146, 1974.
- [8] Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J.: *J. Bacteriol.*, **8**: 741—746, 1961.
- [9] Saite, H. and Miura, K.: *Biochem. Biophys. Acta*, **72**: 619—629, 1963.
- [10] 李载平等: *生物化学与生物物理学报*, **2**(3): 182—193, 1962.
- [11] 乔宝义等: *微生物学报*, **16**(1): 7—11, 1976.
- [12] Fox, M. S.: *J. Gen. Physiol.*, **49**: 183—196, 1966.
- [13] Guerrini, F. and Fox, M. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **59**: 429—436, 1968.
- [14] Dennis, E. S. and Wake, R. G.: In "Symposium on Replication and Recombination of Genetic Material". p. 61—70, 1968.
- [15] Bodmer, W. F.: *J. Gen. Physiol.*, **49**: 233—258, 1966.
- [16] Nester, E. W. et al.: *Genetics*, **48**: 529—551, 1963.
- [17] Young, F. E. et al.: *Handbook of Genetics Vol. I*. p. 72, 1974. (ed. King, R. C.)
- [18] Проколов, А. А.: *Докл. АН СССР*, **160**: 472—474, 1968.
- [19] Hotchkiss, R. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **40**: 49—55, 1954.
- [20] Nester, E. W. et al.: *J. Bacteriol.*, **86**: 785—796, 1963.
- [21] Somma, S. and Polsinelli, M.: *J. Bacteriol.*, **101**: 851—855, 1970.
- [22] Mergeny, M. P. et al.: In "Informative Molecules in Biological Systems." p. 51—53. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1971.
- [23] Young, F. E. and Wilson, G. A.: In *Handbook of Genetics Vol. I*. p. 104, 1974. (ed. King, R. C.)

STUDIES ON SOME RELATED PROBLEMS IN THE BREEDING OF *BACILLUS SUBTILIS* BY TRANSFORMATION

Xue Yugu, Dong Kening, Han Wenzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Bacillus subtilis Ki-2-148 was transformed with doxyribonucleic acid isolated from *Bacillus subtilis* B₅-3, an inosine-producing strain (6—7 g/l). The optimal conditions for the highest transformation frequency were found to be at the late logarithmic growth phase of the recipient strain after treatment with DNA for 60 minutes in SII medium.

It was found that one of the transformants, strain Ki-2-148-4 produced trace amount of inosine. After repeated single colony selection, strain 4—8, producing 4.1 g/l of inosine in shake culture was obtained.

Addition of lysozyme 5 µg/l during the transformation treatment exerted a significant effect on transformation frequency, which was increased about six times than that of the control. It might be useful in *Bacillus* breeding practice.

The behaviour of B₅-3 DNA touching with the competent cells of strain Ki-2 was observed under electron microscope. It was found that some parts of DNA concentrated at the division sections of the recipient cells and were perpendicular to the sections. This phenomenon seems having not yet been reported. It needs to do more work to make it clear.