

# 大肠杆菌苏氨酸操纵子的体内克隆和诱变<sup>\*</sup>

王敖全 陈秀珠 孙天鹤

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

潘仁瑞

(中国科学技术大学生物系 合肥 230026)

**摘 要** 报道了产 1.2% 大肠杆菌菌株的选育、野生型苏氨酸操纵子的体内克隆、体外再克隆、再克隆的体外诱变以及苏氨酸克隆 pTHR12-9-1 的获得。还研究了产酸克隆对产酸受体产苏氨酸的影响。发现 pTHR12-9-1 对低产菌有增产效应,对高产菌则相反;并对此现象作了讨论。

**关键词** 苏氨酸操纵子,体内克隆,克隆的体外诱变

L-苏氨酸是人和动物体的必需氨基酸之一,可用于配制复合氨基酸营养注射液。由于大肠杆菌生长快,遗传背景清楚,并有可供基因操作用的一系列遗传系统。近年来已成功用于氨基酸基因工程研究<sup>[1-3]</sup>。本工作将基因体内克隆新技术应用于苏氨酸基因工程,试图通过与常规育种相结合,组建高产工程菌,并探讨将产酸克隆引入高产寄主菌提高工程菌产量的可能。结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、噬菌体和质粒

实验所用菌株、噬菌体和质粒见表 1<sup>[4-6]</sup>。

### 1.2 培养基

基本培养基用 M63,丰富培养基为 LB,均按文献[7]配制。当 LB 补加四环素和卡那霉素时终浓度分别为 20 $\mu$ g/ml 和 50 $\mu$ g/ml。而它们在基本培养基的用量减半。发酵培养基组成:葡萄糖 4%, (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.2%, 酵母粉 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 和 MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 分别 20 $\mu$ l/100ml (1%母液), 维生素 B1 加 10 $\mu$ l/100ml (1%母液), L-蛋氨酸 7.5mg/100ml, 调 pH7.0。

### 1.3 苏氨酸结构类似物抗性突变体的分离

按文献[8]进行。

### 1.4 NTG 诱变

按文献[9]进行。

\* 安徽省省科委资助项目。

本文于 1993 年 3 月 12 日收到。

表 1 实验用菌株、噬菌体和质粒  
Table 1 Strains, phages and plasmids used

菌株 Strain	遗传型 Genotype	来源 Source
<i>E. coli</i>		
C600	thr leu	This lab.
C600-1	leu	This study
C600-2	prototroph	This study
C600-3	met	This study
C600-4	△thr met	This study
C600-5	met Mucts	This study
CSH28	△(lac pro)p1kc	This lab.
CSH64	Hfr thi	This lab.
GT2018	HfrH thi △(gal bio att UV <sup>r</sup> ) △thr	B. Williams <sup>[4]</sup>
MH125	leu::mucts	M. M. Howe <sup>[5]</sup>
2122	met AHV <sup>r</sup> (2mg/ml)	This study
595	met AHV <sup>r</sup> (5mg/ml)	This study
1545	met AHV <sup>r</sup> (15mg/ml)	This study
3053	met AHV <sup>r</sup> (15mg/ml)	This study
	Asp <sup>r</sup> (30mg/ml)	This study
3053-1	met AHV <sup>r</sup> ileA::Tn10	This study
<i>S. typhimurium</i>		
TT60	ileA::Tn10	J. Roth lab.
TGM300	galE496 rpsL120 xy1404 hsdL6 hsdSA29 (r <sup>-</sup> m <sup>+</sup> )H1-b man1 H22 lux(Tels2)?	J. Roth lab.
Phage		
P1kc	Kan <sup>r</sup>	This lab.
Mucts	cts	M. M. Howe
Plasmid		
pEG5005	Mucts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> repMB1	A. Groisman <sup>[6]</sup>
pBR322	Ap <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	This lab.

1.5 克隆的体外诱变

按文献[2]进行。

1.6 苏氨酸产量测定

用生长谱法按文献[10]测定。

2 结果和讨论

2.1 苏氨酸产生菌的常规选育

2.1.1 出发株的构建:大肠杆菌 C600 生长快,遗传背景清楚,又适合于质粒转化,被选

作苏氨酸产生菌选育的起始菌株。已有研究表明,获得过量合成苏氨酸菌株的最有效方法之一,是诱变分离抗苏氨酸结构类似物突变体。我们对 C600 的苏氨酸营养缺陷型回复子 C600-1 进行诱变,在诱变分离  $\beta$ -羟基戊酸(下简称 AHV)的抗性突变体时发现,当 M63 培养液的 AHV 终浓度达 1mg/ml 时仍不能抑制细胞生长,但用另 1 株大肠杆菌 CSH64 作同样试验表明,仅需加入 50 $\mu$ g/ml AHV 便完全抑制细胞生长。在探寻造成上述差异的原因时,我们注意到 C600-1 和 CSH64 在遗传上的区别之,前者为亮氨酸营养缺陷型,必须加亮氨酸才能生长,是否亮氨酸导致 C600-1 对 AHV 不敏感? 为证实这一推测,我们通过 p1 转导将 C600-1 的  $Leu^-$  转导成  $Leu^+$  (编为 C600-2),并作了如下实验:取对数生长期的 C600-1 和 C600-2 各 1ml,经生理盐水洗涤二次后各取 0.1ml,分别涂布 M63 和补加亮氨酸的 M63 平板,再在每个平板中央放少量 AHV(固体)后放 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。如果涂布菌对 AHV 敏感,则应在放有 AHV 处形成透明的抑菌圈,若不敏感则反之。试验结果表明 C600-2 在不加亮氨酸的 M63 平板上可见抑菌圈,而在添加了亮氨酸的平板无抑菌圈。证实了我们的推测。为什么亮氨酸对 AHV 有拮抗作用,对这一发现的分子机理有待研究。

2.1.2 苏氨酸产生菌的选育步骤和结果:以 C600-2 为常规选育苏氨酸产生菌的出发株,为解除甲硫氨酸对苏氨酸生物合成酶系的抑制和阻遏,亦为此后一系列的遗传操作提供一个检测标记,我们将 C600-2 诱变加上了甲硫氨酸营养缺陷型,此菌株编为 C600-3。常规选育步骤和结果示于图 1。

菌株 Strain	遗传型 Genotype	产量(g/L) Yield(g/L)
C600	thr <sup>-</sup> leu <sup>-</sup>	
↓ 自发突变		
C600-1	leu <sup>-</sup>	
↓ p1 转导		
C600-2	leu <sup>+</sup>	
↓ NTG		
C600-3	met <sup>-</sup>	trace
↓ NTG		
2122	met <sup>-</sup> AHV <sup>r</sup> (2mg/ml)	2
↓ NTG		
595	met <sup>-</sup> AHV <sup>r</sup> (5mg/ml)	4—5
↓ NTG		
1545	met <sup>-</sup> AHV <sup>r</sup> (10mg/ml)	8
↓ NTG		
3053	met <sup>-</sup> AHV <sup>r</sup> (15mg/ml) Asp <sup>r</sup> (30mg/ml)	10
↓ p1 转导		
3053-1	met <sup>-</sup> AHV <sup>r</sup> Asp <sup>r</sup> ileA <sub>1</sub> : Tn10	12

图 1 苏氨酸产生菌的选育

Fig. 1 Breeding of threonine producing strain

2.2 L-苏氨酸操纵子的体内克隆

利用 Mini-Mu 在帮助噬菌体 Mucls 存在下进行基因体内分子克隆,可省去一系列体外 DNA 分子克隆所必需的操作步骤,具有克隆频率高、操作简便等优点。现已越来越多地应用于分子生物学研究。我们采用这一克隆技术克隆了苏氨酸操纵子<sup>[11]</sup>。实验得苏氨

酸操纵子克隆的频率为  $10^{-3}/\text{Kan}^r$  转导子。遗传互补和琼脂糖电泳证明,所得的  $\text{Thr}^+$  克隆含有完整的苏氨酸操纵子(结果未列出)。

### 2.3 苏氨酸操纵子的再克隆及其体外诱变

体内克隆虽有上述优点,但获得的克隆片段常含目的基因外的未知 DNA,为使体外诱变集中于目的基因,我们随意挑取 1 个  $\text{Thr}^+$  克隆 pTHR12-8 进行再克隆。已知完整的苏氨酸操纵子位于 6.5kb 的 Hind III 和 Pst I 的双酶切片段<sup>[2]</sup>。实验将目的片段与 pBR322 连接,转化我们自己构建的苏氨酸操纵子缺失株 C600-4,在含有 Ap 的 M63+Met 平板上选择  $\text{Thr}^+ \text{Ap}^r$  转化子。从获得的转化子提取质粒,经 Hind III 和 Pst I 双酶切分析表明都含 6.5kb 片段。择 1 编为 pTHR12-9 次克隆按文献<sup>[2]</sup>作羟胺诱变。取诱变后的质粒转化苏氨酸操纵子缺失株,将转化混合物接入含 1mg/ml AHV 的 M63 培养液,选择 AHV<sup>r</sup> 突变体。由于转化受体为苏氨酸操纵子缺失株,因此转化子的 AHV<sup>r</sup> 突变必定发生在苏氨酸操纵子克隆上。对 20 个 AHV<sup>r</sup> 转化子作了摇管发酵产酸测定,获得 1 个可产酸 2g/L 的克隆,编为 pTHR12-9-1。从上述产酸菌提取 pTHR12-9-1 杂性质粒,再次转化 C600-4,在补加 Ap 的 M63 平板上选择  $\text{Thr}^+ \text{Ap}^r$  转化子,再挑取 20 个转化子作产酸测定,结果表明,每一转化子均产约 2g/L 的苏氨酸。由此证明,转化子产酸是克隆的苏氨酸生物合成调控改变的结果。

### 2.4 pTHR12-9-1 对产酸菌产酸的影响

吴汝平等报道<sup>[2]</sup>,将产酸克隆转化引入产酸寄主可明显提高寄主的产酸量。我们对此作了试验,将 pTHR12-9-1 分别转化产苏氨酸水平不同的寄主 212、595、1545 和 3053,在 M63+Met+Ap 的平板上选择  $\text{Ap}^r$  转化子,各取 10 个经纯化后作产酸测定。我们发现 pTHR12-9-1 只对产酸水平较低的 2122 和 595 有促进产酸效应,可使前者产酸从 2g/L 提高到 6—8g/L,使后者产酸从 4—5g/L 提高到 12g/L。但在寄主 1545 和 3053 中则无此增产效应,相反使寄主产酸量分别下降为 3g/L 和 3—5g/L。这一现象的发现给基因工程与常规选育相结合组建高产工程菌提出了一个问题,从理论上阐明这一现象的分子机理有重要意义。作者认为,从苏氨酸生物合成调控入手,是揭示这一现象本质的有效途径。本文的产酸克隆是从抗低水平 AHV<sup>r</sup> (1mg/ml) 突变体中获得的。产酸水平较低的寄主 2122 和 595 亦是从抗较低水平 AHV 突变体获得的,可以推测,二者的苏氨酸生物合成调控改变是一致的,这可能是增产效应的物质基础。而高产寄主是经抗高浓度 AHV 和 Asp 获得的,显然他们的苏氨酸生物合成调控改变不大可能一致。如果能搞清高产菌苏氨酸生物合成调控改变的突变部位,进而对产酸克隆作定向突变,使之与高产寄主一致,那么,大幅度提高苏氨酸的产酸水平是完全可能的。

## 参 考 文 献

- [1] Dehahov V G. Kokai Tokkyo Koho81 15, 1981, 696(14 Feb).
- [2] 吴汝平,杨胜利,金科铭,等. 生物工程学报. 1987, 3(3): 177—182.
- [3] Aiba, S. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 43(2): 289—297.
- [4] Williams B W. *J. M. B.*, 1966, 16: 118.
- [5] Howe M M. *Virology*, 1973, 54: 93—101.
- [6] Croisman E A, Casadaban M. J. *J. Bacteriol*, 1986, 168: 357—364.

- [7] Miller, J. H. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab, 1972. 431—433.
- [8] 陈 琦. 产氨基酸抗反馈调节突变株的选育. 见: 焦璐身, 周德庆编. 微生物生理代谢实验技术. 北京: 科学出版社, 1990. 268—276.
- [9] Silhavy J T, Berman M L, Engquist L W. Experiments With Gene Fusions. Cold Spring Harbor Lab. , 1984. 129.
- [10] 黄和容, 李玲阁. 微生物学报, 1982, 22: 276.
- [11] 王放全, 焦红, 黄和容. 生物工程学报, 1990, 6(1) 18—23.

## THE CLONING OF THREONINE OPERON *IN VIVO* AND MUTAGENESIS *IN VITRO* IN *E. COLI*\*

Wang Aoquan

Chen Xiuzhu

Sun Tianhe

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Pan Renrui

(Department of Biology, University of Chinese Sciences and Techniques, Hefei 230026)

**Abstract** Report here was the selection of the *E. coli* strain producing 1.2% threonine. The wild type threonine operon was cloned *in vivo* and subcloned *in vitro*. The subclone was mutagenized *in vitro* and a clone pTHR12-9-1 producing threonine was obtained. Also the effect of pTHR12-9-1 on threonine yield of hosts producing different amount of threonine was studied. We found that pTHR12-9-1 could promote the production of threonine in lower yield hosts, but it reduced the production of threonine in higher yield hosts. The phenomenon was discussed.

**Key words** Threonine operon, Cloning *in vivo*, Mutagenesis of clone *in vitro*.

\* This work supported by Committee of Science and  
Techniques of An Hui province.