

研究报告

苏氨酸操纵子的克隆与诱变

吴汝平 杨胜利 金科铭* 褚昕 李美英

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

本文报道用Hind III + BamHI 双酶切方法, 从大肠杆菌 K12 的野生型菌株染色体上克隆苏氨酸操纵子的三个基因 (*thr A*, *thr B*和*thr C*) 到载体 pBR322 上, 在合成培养基上筛选带*thr*操纵子的转化子。所得杂种质粒pTH1经羟胺体外诱变, 筛选得到抗氨基酸类似物 α -氨基- β -羟基戊酸(AHV)的突变质粒pTH2和pTH3, 在宿主大肠杆菌 C600 中产苏氨酸量比初级克隆株高20倍以上; 在解除天冬氨酸激酶-高丝氨酸脱氢酶(AKI-HDI)反馈抑制的宿主大肠杆菌A56-121中产苏氨酸量可达11g/L, 比初级克隆株大肠杆菌C600 (pTH1)高100倍以上。

关键词 苏氨酸; 操纵子; 克隆; 诱变

苏氨酸是人体需要的八种必需氨基酸之一, 它在医药、农业以及食品工业上都有重要的作用。目前生产苏氨酸的方法有两种: 化学合成物理拆分和发酵法。随着氨基酸发酵工业的发展, 用发酵法生产苏氨酸已占显著优势。生产上采用的菌种有棒状杆菌、沙雷氏菌及大肠杆菌, 它们的生物合成苏氨酸途径相同, 只是调节因子略有不同。苏氨酸是天冬酰胺属氨基酸, 从天冬氨酸合成苏氨酸有四个酶催化五步反应。苏氨酸操纵子的三个基因*thr A*、*thr B*和*thr C*分别编码一个双功能酶, 即天冬氨酸激酶-高丝氨酸脱氢酶(AKI-HDI)、高丝氨酸激酶及苏氨酸合成酶, 参与苏氨酸生物合成的四步反应。天冬氨酸磷酸转为天冬氨酸半醛由*asd*基因产物催化, *asd*基因位于染色体66分钟(*thr*操纵子在0分钟), 它不是苏氨酸生物合成的限制步骤。野生型菌株只产生满足于它自身需要的苏氨酸, 其生物合成过程受产物反馈抑制及多价阻遏严格调节。高产优种主要是采用诱变选育去除支路代谢的营养缺陷型菌种和解除反馈抑制改变遗传性状的产生

菌。近年来, 随着重组DNA技术的发展, 已进行用细胞融合和基因工程来改良菌种。苏联和日本先后构建了大肠杆菌高产苏氨酸的基因工程菌, 产量达13.4—30g/L^[1-4]。通过基因工程与发酵工程的密切配合, 其产量进一步提高到60g/L以上^[5,6], 但均未见详细报道。我国生产苏氨酸主要采用化学合成物理拆分法, 产量低, 价昂贵。1982年黄和容等^[7,8]报道诱变选育棒状杆菌, 用发酵法生产苏氨酸产量可达13g/L。本文报道从大肠杆菌K12的野生型菌株染色体上, 克隆苏氨酸操纵子的三个基因; 并用羟胺进行体外诱变, 选育解除反馈调节的突变基因。

材料与方 法

(一) 大肠杆菌菌株与质粒

所用大肠杆菌菌株见表1。质粒pBR322用作克隆载体。

本文于1986年7月23日收到。

* 中国科学院上海生物工程实验基地

(二) 培养基与培养条件

1. LB培养基, 用于染色体和质粒DNA提取时培养菌体, 37°C, 过夜培养。

2. 培养基 I (%) : K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1,

柠檬酸钠 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 葡萄糖 0.2,

* 氨基酸 10 μ g/ml, B_1 5 μ g/ml, 生物素 0.5 μ g/ml pH7.0

(*苏、赖、蛋、天冬、亮、异亮、脯、和谷等八种氨基酸) 此培养基用于大肠杆菌C600培养。

表 1 大肠杆菌菌株

Table 1 *E. coli* strains

菌株 Strain	遗传型或表型 Genotype or phenotype	参考文献 Reference
K12	野生型	本实验室
C600	<i>thrB</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i>	
A56	<i>recA</i>	
CSH68	<i>met</i> ⁻	Miller, (9)
CSH68-216	<i>met</i> , AHV ^r	本实验室, (17)
A56-121	<i>recA</i> , AHV ^r	本实验室, (17)

3. 培养基 II (%) : K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, 柠檬酸钠 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 葡萄糖 2.0, * 氨基酸 20 μ g/ml, B_1 5 μ g/ml, 生物素 0.5 μ g/ml, 琼脂 1.5, pH7.0。

(*除苏氨酸外的其他七种氨基酸), 此培养基用于检测菌大肠杆菌 C600 生长, 用以检测发酵液中苏氨酸产量。

4. 发酵培养基 (%) : 葡萄糖 5.0, KH_2PO_4 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CaCO_3$ 1.0, 蛋氨酸 10mg, 异亮氨酸 10mg, 消毒后 pH6.5。菌种在 LB 培养基上培养过夜, 以 1% 接种量移入发酵培养基, 28°C, 72h, 20ml/500ml 三角瓶, 250r/min。

(三) DNA 体外重组法

质粒和染色体 DNA 的提取、质粒的转

化、酶切、电泳及体外重组方法参照文献 (10—13)。

(四) 质粒的体外诱变

20 μ l 纯化的 DNA 样品 (7 μ g), 加 100 μ l 0.1M 磷酸缓冲液, pH6.0, 含 1mM EDTA, 再加 80 μ l 1M 盐酸羟胺, pH6.0, 含 1mM EDTA, 总体积为 200 μ l。75°C, 培养 30min。反应结束后, DNA 用异丙醇沉淀二次, 以除去羟胺。

(五) 苏氨酸含量的测定

用生长圈方法测定苏氨酸含量。大肠杆菌 C600 菌株于液体培养基中培养过夜, 按 1% 接种量接于培养基 I, 37°C, 培养 3h, 离心收集菌体, 用生理盐水洗二次, 再悬浮于原体积五分之一量的生理盐水中, 按 10% 量加到培养基 II 中, 混匀铺板。用微量注射器取 5 μ l 发酵液 (或其稀释液) 加到 0.5cm 的无菌滤纸片上, 放到凝固的培养基上, 等体积 L- 苏氨酸标准液 (不同稀释度) 加到纸片上, 并放在同一块板上, 37°C, 培养 16h, 测量纸片周围出现的 C600 生长圈直径。用生长圈直径与 L- 苏氨酸浓度作标准曲线, 苏氨酸浓度在 2mg/ml 以下为直线, 由标准曲线计算发酵液中 L- 苏氨酸的含量。

结 果

(一) 苏氨酸操纵子基因的克隆

大肠杆菌 K12 野生型菌株的染色体上有苏氨酸操纵子基因, 在正常情况下受菌体调节系统的严格控制, 几乎测不出苏氨酸。为克隆苏氨酸操纵子基因, 采用 Hind III + BamH I 双酶切法水解 K12 染色体 DNA 和载体 pBR322 DNA。酶切后的两种 DNA 经 T4DNA 连接酶连接, 转化苏氨酸缺陷型菌株大肠杆菌 C600 (*thr B*), 在有氨基青霉素 (50 μ g/ml) 但不含苏氨酸的合

成培养基 II 上得到能互补 *thr B* 的转化子 (图 1)。为确证转化子带苏氨酸操纵子的杂合质粒, 排除宿主菌回复突变产生的假阳性, 从转化子中提取质粒 DNA, 再

转化大肠杆菌 C600, 在无苏氨酸的合成培养基上得到大量能互补 *thrB* 的转化子, 说明杂合质粒带 *thr B* 基因, 称此杂合质粒为 pTH1。为进一步证实质粒 pTH1 带有

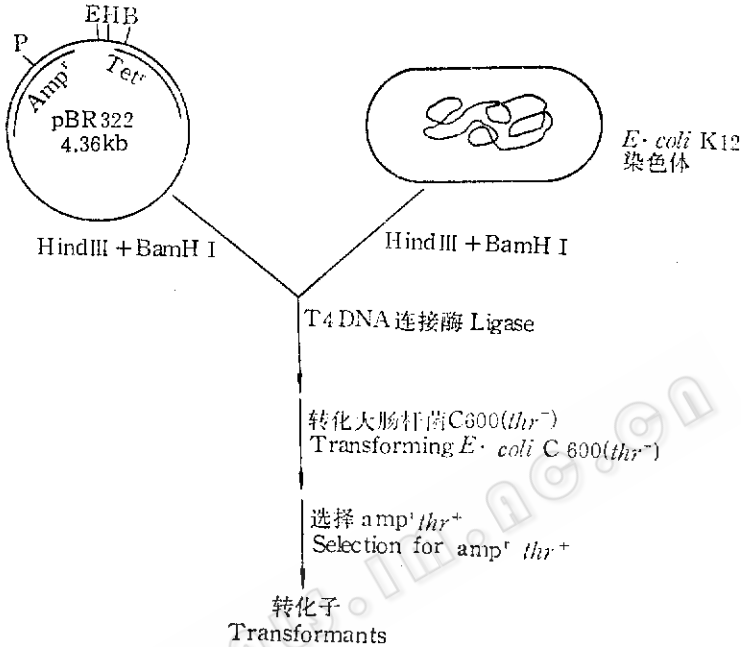


图 1 苏氨酸操纵子克隆路线
Fig.1 The Scheme of cloning threonine operon B—BamHI, E—EcoRI, H—HindIII, P—PstI

完整的苏氨酸操纵子三个基因 *thr A*、*thr B* 和 *thr C*, 分别用 BamHI + HindIII, SalI, EcoRI 水解质粒 pTH1DNA 及用 BamHI + HindIII 水解载体 pBR322DNA。图版 1 指出质粒 pTH1 由 pBR322 上的 BamHI + HindIII 双酶切得到的大片段 (4kb) 和染色体上 6.5kb 的 BamHI - HindIII 片段重组。由于 pBR322 上各限制酶切点的相对位置已知, 故可根据电泳图酶切片段的大小排出 EcoRI 和 SalI 在 6.5kb 上的位置 (图 2)。其中 HindIII - EcoRI 片段为 4kb, 与文献报道的 4018bp 完全一致 [14,15], 此片段包括苏氨酸操纵子的启动子、减弱子、操纵基因以及结构基因 *thr A*、*thr B* 和 *thr C* 的一部份。EcoRI -

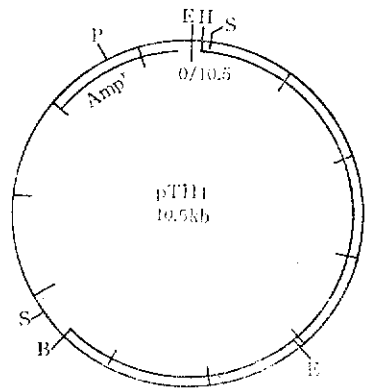


图 2 质粒 pTH1
Fig.2 Plasmid pTH1
H—HindIII, B—BamHI, E—EcoRI, P—PstI, S—SalI

BamHI 片段也与文献报道相同 [8]。证明

pTH1中克隆的 6.5kb BamH I -Hind III 片段含完整苏氨酸操纵子。

(二) 苏氨酸操纵子基因的体外诱变

大肠杆菌 C600 (pTH1) 只产生少量苏氨酸,这是由于苏氨酸操纵子的基因剂量虽然随着质粒拷贝数的增加而增加,但 *thr A* 基因产生的 AK I -HD I 仍受最终产物苏氨酸的反馈抑制,且宿主菌大肠杆菌 C600的 *thr A* 基因产物也属野生型,受反馈抑制。AK I -HD I 是苏氨酸生物合成的关键酶,要提高苏氨酸产量,首先需解除反馈抑制,故用羟胺进行体外诱变。纯化过的质粒 pTH1 DNA 经羟胺处理后转化大肠杆菌 C600,在含氨基青霉素 50 μ g/ml AHV 3mg/ml 无苏氨酸的培养基 II 上,于 37 $^{\circ}$ C 培养两天,得到 7 株 AHV 抗性转化子,选择其中 C600(pTH2)和 C600(pTH3) 进行发酵试验,比较产苏氨酸量。表 2 指出此两株转化子产酸能力均比初级克隆株 C600 (pTH1) 高 20 倍以上。说明由于质粒 pTH2 和 pTH3 编码的 AK I -HD I 已解除了反馈抑制,使苏氨酸产量大幅度提高。

表 2 野生型质粒与 AHV 抗性质粒合成苏氨酸能力比较
Table 2 Comparison of ability of wild and AHV resistant threonine operons to synthesize threonine

菌株 (质粒) Strain (plasmid)	产苏氨酸量 Yield of threonine(g/L)
<i>E. coli</i> K12	0
<i>E. coli</i> C600	0
<i>E. coli</i> C600 (pTH1)	0.1
<i>E. coli</i> C600 (pTH2)	2.2
<i>E. coli</i> C600 (pTH3)	2.5

(三) 宿主对苏氨酸操纵子基因表达的影响

由于大肠杆菌 C600 的 *thr A* 基因产物 AK I -HD I 受反馈抑制,在一定程度上影响质粒 pTH2 和 pTH3 产苏氨酸能力。采用解除反馈抑制的宿主可增加带去反馈抑制苏氨酸操纵子产苏氨酸量^[3]。大肠杆菌

A56-121 和 CSH68-216 是本实验室选育得到的两株去苏氨酸反馈抑制的菌株,产苏氨酸量约 2g/L。用 pTH2 和 pTH3 转化 A56-121 和 CSH68-216,发酵比较所得各菌株的产苏氨酸能力。表 3 指出带质粒 pTH2 或 pTH3 的工程菌产酸能力不仅比宿主菌本身高,而且比工程菌 C600 (pTH2)、C600 (pTH3) 产苏氨酸能力明显增高,A56-121 (pTH2) 产苏氨酸量可达 11g/L,比初级克隆株 C600 (pTH1) 高 100 倍以上。

表 3 AHV 抗性宿主对苏氨酸合成的影响
Table 3 The effect of AHV resistant hosts on threonine biosynthesis

菌株 (质粒) Strain (plasmid)	产苏氨酸量 Yield of threonine(g/L)
<i>E. coli</i> A56-121	2.0
<i>E. coli</i> A56-121 (pTH2)	11.0
<i>E. coli</i> A56-121 (pTH3)	10.0
<i>E. coli</i> CSH68-216	2.0
<i>E. coli</i> CSH68-216 (pTH2)	7.0
<i>E. coli</i> CSH68-216 (pTH3)	6.0

讨 论

本文报道了用鸟枪法从大肠杆菌 K12 野生型菌株染色体上克隆苏氨酸操纵子到载体 pBR322 中。用 BamH I -Hind III 双酶解法,不仅使体外重组效率提高^[16],而且避免了用一种限制酶水解或部分水解可能引起的片段重排,这种情况在用 4 碱基限制酶部分水解时可能性增加,若筛选目的基因方法不当,常会导致错误结论。用 *thr B* 缺陷的大肠杆菌 C600 作受体,在无苏氨酸的培养基中只有能互补 *thr B* 基因功能的转化子生长,这种从选择性培养基上直接筛得带目的基因克隆的正筛选方法,大大简化了用鸟枪法克隆需要在大量转化子中筛选目的基因的方法。但由于正筛选采用的互补基因只是 *thr B*,在 *thr B* 基因前有内在启动子^[17],为排除只带染

色体 *thr* B 基因片段的克隆, 对质粒 pTH1 进行了两方面分析: 首先用合适的限制酶水解 pTH1、证明 BamHI、HindIII、SalI 和 EcoRI 等限制位点和各相应片段与文献报道完全一致, 提供了克隆到三个基因的有力证据; 其次, 用诱变剂诱变质粒 pTH1, 若能筛得明显提高苏氨酸产生能力并抗 AHV 的突变质粒, 则证明在 pTH1 上有编码已解除苏氨酸反馈抑制的 AKI-HDI 基因 *thr* A 存在。用羟胺体外诱变 pTH1 得 AHV 抗性质粒 pTH2 及 pTH3, 带 pTH2 及 pTH3 转化子产苏氨酸量大大超过初级克隆株, 进一步证实 *thr* A 的存在。本文采用羟胺进行体外诱变, 因为羟胺是一种温和诱变剂, 只引起 C 转换成 T 的点突变, 不会引起缺失、插入或密码移位, 故不会产

生错译。

质粒 pTH2 和 pTH3 都已解除了苏氨酸对 AKI-HDI 的反馈抑制, 宿主 A56-121 和 CSH68-216 也解除了反馈抑制, 但表 3 说明带质粒的转化子比不带质粒的宿主产酸量只增加 3—5 倍, 虽有基因剂量效应, 但不与基因剂量成正比。这可能由于苏氨酸操纵子调节系统极为复杂, 除有反馈调节外, 还存在减弱子^[18]、几种阻遏蛋白——操纵基因机制^[19-21]等多价阻遏作用及 *rel* A 基因对苏氨酸操纵子转录起始的调控作用^[22]。在相同培养条件下, 苏氨酸产量的高低是这些调节网综合作用的结果, 用基因工程手段去除负调控机制, 加强正调控作用将有助于进一步提高基因工程菌产苏氨酸的能力。

参 考 文 献

- [1] Debabov, V. G. et al.: US.4, 278, 765, 1981.
- [2] Debabov, V.G. et al., Fr.Demande 2, 461, 006, 1981.
- [3] Miwa, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 47:2329, 1983.
- [4] Schmid, R.D.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22:157, 1985.
- [5] Enei, H. and Hirose, Y.: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2:101, 1984.
- [6] Zilinskas, R.: *Biotechnology*, 2:610, 1984.
- [7] 黄和容等: *微生物学报*, 22:276, 1982.
- [8] 黄和容等: *微生物学报*, 22:345, 1982.
- [9] Miller, J.H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.22, 1972.
- [10] Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [11] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.104, 1982.
- [12] Cohen, S.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110, 1973.
- [13] Dugaiczzyk, A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 96:171, 1975.
- [14] Katinka, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5730, 1980.
- [15] Cossart, P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 9:339, 1981.
- [16] 杨胜利等: *生物工程学报*, 1(1):29, 1985.
- [17] Saint-Girons, I. et al.: *J. Bacteriol.*, 161:461, 1985.
- [18] Gardner, J.F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1706, 1979.
- [19] Johnson, D.I. and Somerville, R.L.: *Mol. Gen. Genet.*, 195:70, 1984.
- [20] Saint-Girons, I.: *Mol. Gen. Genet.*, 162:95, 1978.
- [21] Bogosian, G. and Somerville, R.: *Mol. Gen. Genet.*, 191:51, 1983.
- [22] Клялюк, Е.В. Т.Д.: *Биохимия*, 48(7):1095, 1983.

CLONING AND MUTAGENESIS OF THREONINE OPERON

Wu Ruping Yang Shengli Jin Keming* Chu Xin Li Meiyang
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

The chromosome DNA of *E. coli* K12 was purified and digested with Hind-III and BamH I and the restriction fragments were cloned on pBR322. The hybrid plasmid containing the wild threonine operon was selected on basic medium and was designated as pTH1. The plasmid pTH1 was treated with hydroxyamine mutagenesis in vitro and the mutant plasmids resistant to AHV were selected. Two of them, pTH2 and pTH3, were tested for threonine production. The yields of *E. coli* C600(pTH2) and *E. coli* C600(pTH3) were twenty-fold higher than those of *E. coli* C600(pTH1). In AHV resistant host *E. coli* A56-121, the yields of threonine increased to 11g/L and were hundredfold higher than those of *E. coli* C600 (pTH1).

Key words

Threonine; operon; cloning; mutagenesis

*(Shanghai Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences)

图版说明

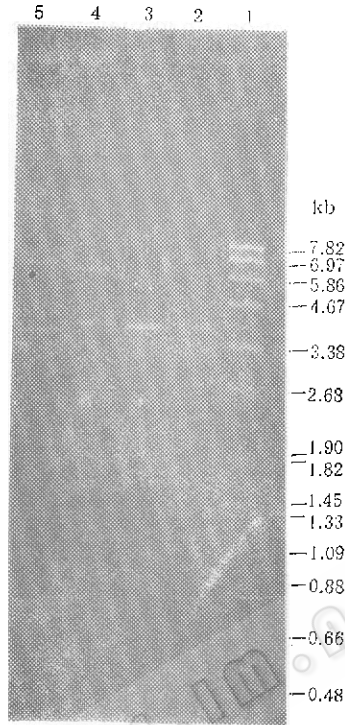
1. 分子量标准, EcoR I 酶切的 Spp I
Molecular Weight standard, Spp I digested with EcoR I
2. Hind III-BamH I 酶切的 pTH1,
pTH1 digested with both Hind III and BamH I
3. Hind III-BamH I 酶切的 pBR322,
pBR322 digested with both Hind III and BamH I
4. EcoR I 酶切的 pTH1, pTH1 digested with EcoR I
5. Sal I 酶切的 pTH1, pTH1 digested with Sal I

吴汝平等：苏氨酸操纵子的克隆和诱变

Wu Ruping et al.: Cloning and mutagenesis of threonine operon

图版 I

Plate



吴晓军等：含口蹄疫病毒O₁K亚型VP₁基因的重组痘苗病毒的构建及表达

Wu Xiaojun et al.: Construction of recombinant vaccinia virus containing V₁P gene of FMDV(O₁K subserotype) and the expression of V₁P gene

图版 I

Plate

