

## 工程菌的不稳定性及对策

李永红 王二力 俞俊棠

(华东化工学院, 上海)

近几年来,重组DNA技术正在从实验室水平的研究转向工业生产规模的应用。具有较高产酶能力的 $\alpha$ -淀粉酶克隆菌已经用于生产<sup>[1]</sup>。有几种昂贵的但十分有用的蛋白质如胰岛素和人干扰素也已较大规模发酵生产<sup>[2]</sup>。从细胞水平来说,这些目标常可以通过质粒或其他载体上含有的克隆基因的表达而实现。然而许多研究<sup>[3-7]</sup>发现,克隆菌在自然环境中不稳定。显然,在利用克隆菌进行大规模发酵生产时,重组质粒(或其他载体)在宿主细胞中的稳定性就成为一个至关重要的问题,因而受到了广泛的重视。

重组质粒的稳定性受遗传及环境等诸多因素的影响,对这一问题的理解将有助于我们使用有效的手段来克服其不稳定性,从而提高克隆菌的生产率。近年来,生物化学及分子遗传学方面的研究有了许多进展,影响某些质粒稳定性的各个过程(如质粒的复制<sup>[8]</sup>,质粒的转移<sup>[9]</sup>,复制子间的不相容性<sup>[10]</sup>以及质粒在子代细胞中的分配<sup>[11]</sup>等)的基因及顺序已经确定。与此同时,应用微生物学家及生物工程工作者也从细胞水平和工程水平两方面对质粒不稳定性及其对克隆菌发酵生产的影响进行了研究,提出了关联细胞生长、质粒合成、质粒分配、产物合成等诸关系的数学方程<sup>[3,7,12]</sup>,从而为设计、控制、优化克隆菌的发酵生产以及解释各种

实验现象提供了依据。总之,这些研究成果推动了重组DNA技术走向商业化的道路。

### 重组质粒不稳定的倾向

所谓的重组质粒不稳定性,是指克隆菌在生长过程中不能维持重组质粒不发生变化,结果不呈现原有的表型特征。依据重组质粒的变化本质,可将其不稳定性分为两种类型,一种是因质粒在细胞分裂时的缺陷分配导致整个质粒丢失而引起,称为“分配性不稳定”(Segregative instability);另一种是因重组质粒DNA上的缺失、插入或重排而引起,称为“结构性不稳定”(Structural instability)。

由于重组质粒的不稳定性,克隆菌发酵过程中的培养物往往是含有两种或两种以上菌种的混合物。除了含有重组质粒的克隆菌外,还可能含有因分配性不稳定而产生的宿主菌,以及因结构性不稳定而产生的含有结构改变了的质粒的菌种。克隆菌与其他菌种在产物形成速率、基质利用速率、形态、比生长速率、耗氧量等其中一方面或多方面具有不同特性,其中克隆菌与宿主菌在比生长速率之间的差异对质粒稳定性影响很大。

本文于1987年7月9日收到。

一般来说,要求质粒有效地复制并且合成我们需要而不是菌体本身所需要的蛋白质或者进行其他功能活动妨碍了克隆菌的生长(相对于宿主细胞而言)。这是因为质粒基因和染色体基因的表达利用共同的起始因子、酶、核糖体、代谢能量和生物合成的前体,其间必然发生竞争。另一方面,高水平的外源蛋白的次级生理和代谢效应有时对宿主细胞来说是有害的,特别当克隆基因的表达产物是高度疏水性蛋白如膜蛋白<sup>[13]</sup>、激素<sup>[14]</sup>和干扰素<sup>[15]</sup>时,情况就更严重。Zabeau等人<sup>[13]</sup>还提出另一种机制,认为对克隆基因连续不断地转录会从质粒的其他位置上产生生长阻遏物(在目的基因和复制起始区之间增加一个终止子可以减轻这一影响)。因此,在非选择性条件下,含有重组质粒的克隆菌的比生长速率( $\mu^+$ )往往小于不含重组质粒的宿主菌的比生长速率( $\mu^-$ ) (表1)。

表1 不含质粒与含质粒的菌体生长速率之比

宿主	质粒	$\mu^-/\mu^+$	文献
<i>E. coli</i> C600	F <sup>'</sup> Jac	0.99—1.10	16
<i>E. coli</i> K12EC1005	R1drd-19	1.05—1.12	17
<i>E. coli</i> JC7623	ColE1	1.06—1.20	18
<i>P. aeruginosa</i> PA <sub>01</sub>	TOL	2.00	19
<i>E. coli</i> K12IR713	TP120	1.50—2.31	20

宿主菌的生长优势对克隆菌发酵极为不利。Imanaka等人<sup>[3]</sup>从理论上分析了质粒丢失速率及克隆菌与宿主菌比生长速率之间的差异对克隆菌发酵生产的影响,假设开始时培养液中全为含重组质粒的细胞,生长在对数期的细胞每代时间内质粒的丢失速率为 $p$ , $\mu^-$ 与 $\mu^+$ 之比为 $\alpha$ ,则经过25代后,含有重组质粒的细胞数占总细胞数的分数 $F_{25}$ 与 $p$ 、 $\alpha$ 之间的关系可用图1表示。

从图1来看,如果宿主细胞具有生长

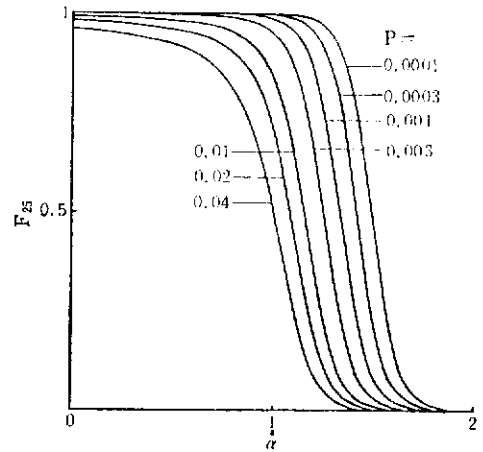


图1  $F_{25}$ 与 $\alpha$ 之关系,  $p$ 为参数

优势( $\mu^- > \mu^+$ ),那么即使质粒丢失速率很小,在经过一定代数后,也会出现大量的非克隆菌。例如当 $\alpha = 1.0$ ,  $p = 0.0001$ 时,  $F_{25} = 99.8\%$ ,而当 $\alpha = 2.0$ ,  $p = 0.0001$ 时,  $F_{25} = 0.0\%$ 。当接入的菌种不纯时(由于质粒不稳定的缘故,种子液中往往含有丢失了质粒的菌种),质粒不稳定性引起的后果就更严重。

## 重组质粒不稳定的原因及对策

重组质粒导入宿主细胞后,引起宿主细胞和重组质粒功能之间的相互作用,在一定的环境中,其结果是重组质粒上基因表达或不表达,重组质粒遗传稳定或不稳定。因此,重组质粒的稳定性取决于重组质粒本身的分子组成、宿主细胞的遗传特性及环境条件等三方面。

### (一) 构建合适的载体

质粒复制子在细胞中稳定地维持受着许多不同的过程控制,为了保证质粒稳定地遗传,除了必须具有复制控制系统外,还需要有一个控制质粒在细胞分裂时适当分配的分配系统。某些质粒如pSC101<sup>[21]</sup>、

RI<sup>[22]</sup>, F<sup>[23]</sup> 等的分配系统在质粒上的位置已经确定, 质粒 C10 DF 13 有两个 DNA 顺序 parA 和 parB 对它的稳定维持起着不可缺少的作用<sup>[11]</sup>。YRp 是能够在酵母中进行独立复制的多拷贝环状质粒, 它含有酵母染色体 DNA 的起始区, 这种质粒很不稳定, 即使在有选择压力时, 也有 90% 的细胞丢失质粒<sup>[24]</sup>。酵母系统常用的另一种质粒是 YEp, 它含有酵母质粒 2 $\mu$  DNA 的一部分或全部, 由于 2 $\mu$  质粒含有一稳定区 (分配系统), 因而 YEp 质粒就比 YRp 质粒稳定得多<sup>[25]</sup>。Nordstrom 等利用一个质粒上的分配系统使另一个分配系统缺陷的质粒获得稳定<sup>[26]</sup>。

质粒本身结构对其稳定性影响的机理还不甚明瞭。在 *B. subtilis* 质粒 pC194 的 Hind III 切口处插入一段 DNA, 形成的重组质粒的稳定性比原来的质粒差得多。在无选择压力时, 经过 20 世代后, 含有质粒 pC194 的菌体占总菌体的 99.5% 以上, 而含有重组质粒的菌体只占总菌体的 20—90%。该重组质粒的不稳定性不会是由于外来片段使 pC194 上与稳定有关的区域插入灭活, 因为即使去掉 pC194 质粒 Hind III 切口周围的 600 个碱基, 产生的新质粒也与原来的质粒同样稳定<sup>[27]</sup>。

## (二) 选择适当的宿主细胞

重组质粒的稳定性在很大程度上受宿主细胞遗传特性的影响。相对而言, 重组质粒在大肠杆菌中比较稳定, 在枯草杆菌和酵母中较不稳定, 但后两者恰是最有工业生产价值的宿主菌。

Imanaka 等<sup>[28]</sup>研究了质粒 pSC101-trp 在 *E. coli* W3110 的三种不同突变型中的稳定性, 结果见表 2。由此可见宿主细胞遗传特性对重组质粒稳定性的影响。

枯草杆菌系统的菌株, 体内重组的频率很高, 因此非常容易发生基因结构上的

表 2 宿主细胞对克隆菌稳定性的影响

宿主细胞	pSC101-trp 的稳定性
W3110 trpAE1	稳定
W3110 trpAE1 trpRam27	稍不稳定
W3110 trpAE1 trpR tnaA	很不稳定

trpAE1, trpA-E 缺失突变型

Ram, trp 阻遏物琥珀型突变型

Tna, 色氨酸合成酶缺陷突变型

变化<sup>[28,30]</sup>。使用重组缺陷型的宿主, 如 recE 株, 可以提高重组质粒的稳定性。

## (三) 施加选择压力

从遗传学来说, 选择意味着利用生长条件使得只有那些具有一定遗传特性的细胞才能够生长。在重组 DNA 技术中, 有好几个方面利用选择压力, 转化后用选择压力确定含有重组质粒的克隆株, 而在利用克隆菌进行发酵生产时, 经常采取施加选择压力的方法消除重组质粒的分配性不稳定, 提高菌体纯度和发酵生产率。

1. 抗生素添加法: 通常, 重组质粒上含有抗药性基因。将含有抗药性基因的重组质粒转入不耐药的宿主细胞后, 克隆菌也获得了抗药性。在克隆菌发酵时, 于培养基中加入适量的相应抗生素, 就可阻止丢失了重组质粒的非生产菌的生长。

但这种方法在大规模生产时并不可取。相对于简单培养基而言, 加入大量的抗生素会使生产成本增加。对于一些易被酶水解失活的抗生素来说, 添加抗生素造成的选择压力只能维持一定的时间。例如, Ap<sup>r</sup> 基因是经常使用的抗药性标记, 该基因通过编码 $\beta$ -内酰胺酶使氨苄青霉素

(Ap) 水解失活而使克隆菌具有抗药性, 也正因为这一原因, 只有在培养基中加入大量的 Ap 才能维持较长时间的选择压力。Meyerink 等<sup>[31]</sup>报道, 带有 Ap<sup>r</sup> 基因的克隆菌在 Ap 浓度分别为 50, 200, 1000 $\mu$ g/ml 的培养基中培养 16h 后, 含有重组质粒的细胞占总细胞的 40、60、

100%。另外如前所述,添加抗生素对结构性不稳定无能为力。Dwivedi 等<sup>[32]</sup>报道,在含有四环素(Tc)的培养基中,克隆菌 W3110 Tna (pSC101-trp115.14) 连续培养 36h 后,重组质粒高度不稳定,绝大部分菌体能抗 Tc,但不产色氨酸。

2. 抗生素依赖变异法:三轮清志等<sup>[33]</sup>用抗生素依赖变异法代替上述抗生素添加法,取得了很好效果。其方法是,通过诱变使宿主细胞成为某抗生素的依赖性突变株,即只有在该抗生素存在时宿主细胞才能生长,而重组质粒上含有该抗生素的非依赖性基因,将重组质粒导入宿主细胞后,所得的克隆菌就能在不含抗生素的培养基中生长,因此在进行发酵生产时,不需要向培养基中加入抗生素就能起到消除重组质粒分配性不稳定的目的。这种方法可以节省大量抗生素,具有实用价值,它的缺点是宿主细胞容易发生回复突变。

3. 营养缺陷型法:与上述抗生素依赖变异法相类似,营养缺陷型稳定法是常用的一种非常有效的提高质粒稳定性的方法。其原理如下,通过诱变使宿主细胞染色体缺失生长所必需的某一基因,而将该基因插入到重组质粒中,然后选择适当组成的培养基使失去重组质粒的细胞不能存活,而只有含重组质粒的细胞才能生长。例如,将指导合成色氨酸的质粒转入 *E. coli* trp 突变株,由于该宿主细胞缺少合成生长所必需的色氨酸的基因,必须在培养基中补加色氨酸后才能存活,因此在利用克隆菌进行发酵生产时,如果使用的培养基不含色氨酸,就可消除失去重组质粒的菌体<sup>[34]</sup>。

#### (四) 控制基因过量表达

提高质粒稳定性的目的是为了提 高克隆菌的发酵生产率,但许多研究发现,外源基因表达水平愈高,重组质粒往往愈不

稳定,如果外源基因的表达受到抑制,则重组质粒可能不丢失。含有重组质粒的克隆细胞与不含重组质粒的宿主细胞的比生长速率可能相同<sup>[35]</sup>。因此可以采取两阶段培养法,即在发酵前期控制外源基因不过量表达,使重组质粒稳定地遗传,到后期通过提高质粒拷贝数或转录、转译效率使外源基因高效表达。

1. 可诱导性启动子:在构建表达质粒时,可以使用可诱导性的操纵子,如 lac<sup>[36]</sup>, trp<sup>[12]</sup>, P<sub>L</sub><sup>[37]</sup>等,在用含有这些启动子的克隆菌进行发酵生产时,可以选择培养条件使启动子受阻遏(抑制)至一定时期,在此期间质粒稳定地遗传,然后通过去阻遏(诱导)使质粒高效表达。例如利用 3-β-吲哚乙酸可以使 trp 启动子去阻遏。

2. 温度敏感型质粒:在对质粒复制控制机制认识后,产生了一些温度敏感型质粒<sup>[38,39]</sup>。温度较低时,质粒拷贝数较少;当温度升高到一定值时,质粒大量复制,拷贝数剧增,这种质粒称为“runaway plasmid”。Uhlin 等<sup>[39]</sup>获得的质粒 pKN402 和 pKN410 在 30℃ 时的拷贝数为 20—50 个/*E. coli* 细胞,35℃ 时质粒大量复制。将 β-内酰胺酶基因接在上述质粒中,经热诱导后,β-内酰胺酶活力可扩增 400 倍。

#### (五) 控制培养条件

克隆菌所处的环境条件对其质粒的稳定性和表达效率影响很大,对一个已经构建完成的克隆菌来说,选择最适的培养条件是进行工业化生产的关键步骤。环境因素对质粒稳定性的影响机制错综复杂,许多尚未得知。前面采取的施加选择压力和控制基因过量表达两种方法其实也是通过培养条件的控制而实现的。在众多的环境因素中,培养基的组成、培养温度、菌体的比生长速率三个方面尤为重要。

1. 培养基的组成：微生物在不同的培养基中进行不同的代谢活动。对克隆菌来说，培养基组分可能通过各种途径影响着质粒稳定地遗传。Imanaka 等<sup>[28]</sup>研究了两种培养基对克隆菌稳定性的影响，结果见表 3。表中结果说明，质粒在丰富培

表 3 培养基对克隆菌稳定性的影响

培养基	克隆菌	F <sub>20-25</sub>	不稳定类型
PBB MM	W <sub>3110</sub> trpAE1 trpRtnaA (RSF2124-trp)	7% 99%	结构性
PBB MM	W <sub>3110</sub> trpAE1 trpRam27 (pSC101-trp)	12% 48%	分配性

培养基 PBB 中比在最低限培养基 MM 中更加不稳定，而且对不同质粒来说，不稳定的本质也不相同，培养基引起质粒 RSF2124-trp 结构性不稳定，而对质粒 pSC101-trp 来说，则是分配性不稳定。

2. 培养温度：重组质粒引入细胞后，引起细胞发生一系列生理变化。前面说过，含有重组质粒的克隆菌的比生长速率往往比宿主细胞小。同样，有报道重组质粒引起宿主细胞生长温度范围的变化：*B. stearothermophilus* 的生长温度范围是 40—70℃，而 *B. stearothermophilus* (pLP11) 的生产温度范围是 40—63℃，由于重组质粒的导入，克隆菌生长温度的上限降低<sup>[40]</sup>。

通常而言，低温往往有利于重组质粒稳定地遗传。对前述克隆菌而言，当培养温度低于 50℃ 时，重组质粒非常稳定，而当温度高于 50℃ 时，重组质粒在间隙培养的对数后期和连续培养时均不稳定。

3. 菌体比生长速率：菌体比生长速率反映了许多环境因素如培养基组成、温度、pH、氧传递等对菌体代谢的影响，因而就菌体比生长速率对重组质粒稳定性的影响有过许多研究报道。

比生长速率对重组质粒稳定性的影响结果不尽一致，可能与克隆菌本身和培养条件有关。例如，在酵母系统中， $\mu$  对质粒 pJDB248 稳定性影响的结果是，比生长速率大有利于重组质粒稳定地遗传<sup>[41]</sup>。这种关系在细菌系统中也有报道，但在以氮为限制基质时就没有这一现象<sup>[42]</sup>。

从图 1 来看，如果不含重组质粒的宿主细胞不比含有重组质粒的克隆菌生长得快，则重组质粒的丢失也不会导致非常严重的后果。因此调整这两种菌的比生长速率可以提高重组质粒的稳定性，但这点往往难于达到，因为大多数环境条件同时提高或降低这两种菌的比生长速率。在某些情况下，可以利用分解代谢物效应控制菌的比生长速率，降低  $c$  值，提高重组质粒的稳定性<sup>[43]</sup>。

某些菌种利用碳水化合物作为碳源与能源时，如果基质浓度很低，则生长受到限制；如果基质浓度很高，则生长受到抑制，这种情况往往是由于高浓度底物抑制了代谢途径中的某个酶。如果重组质粒上含有编码该酶的基因和目的基因，将重组质粒转入上述菌种后，克隆菌可能不再受高浓度碳源抑制。即宿主细胞遵循典型的底物抑制方程，克隆菌遵循 Monod 方程（如图 2 所示）。

从图 2 来看，当  $S < S_0$  时， $\mu^- > \mu^+$ ，不

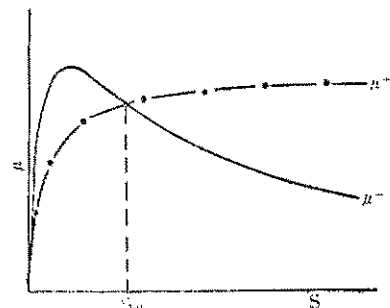


图 2  $\mu$  与  $S$  之关系

利于质粒稳定地遗传, 而当  $S > S_0$  时,  $\mu^- < \mu^+$ , 有利于质粒稳定地遗传。在恒化培养时, 基质浓度可以很容易地控制。

## 结束语

在影响重组质粒稳定性的诸多因素中, 宿主细胞的遗传特性、重组质粒的组成和克隆菌所处的环境条件等三方面更受人们的重视。就分子水平而言, 影响某些质粒稳定性的基因顺序已经定位, 从细胞水平来看, 有可能选择一些具有特定遗传

背景的细胞作为宿主获得比较稳定的克隆菌。但这两方面的研究尚需从广度和深度上进一步继续下去, 以期抽象其本质, 从根本上提高重组质粒的稳定性。另一方面, 在尚未彻底明瞭影响质粒稳定性的原因之际, 从工程水平上来研究影响重组质粒稳定性的各种因素及其对发酵生产的影响是十分必要的。总之, 重组质粒的稳定与否关系着重组 DNA 技术走向商业化之路的成败。对这一错综复杂的问题的解决, 需要多方面的努力。

## 参 考 文 献

- [1] Paula, M.A.N., Third European Congress on Biotechnology, Vol. 3, p.409, 1984.
- [2] Johnson, I.S., *Science*, 219:632, 1983.
- [3] Imanaka, T. and Aiba, S., *Ann. NY Acad. Sci.*, 369:1, 1981.
- [4] Ollis, D.F., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 297:617, 1982.
- [5] Ollis, D.F., *Biotech. Bioeng.*, 24:2583, 1982.
- [6] Anderson, T.F. and Lustbader, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:4085, 1975.
- [7] Walmsley, R.M. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 192:361, 1983.
- [8] Veltkakamp, E. et al., *J. Bacteriol.*, 118:165, 1974.
- [9] Snijders, A. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 192:444, 1983.
- [10] Stuitje, A.R. et al., *Nucleic Acid. Res.*, 8:1459, 1980.
- [11] Hakkaart, M.J.J. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 188:338, 1982.
- [12] Kim, S.H. and Ryu, D.D.Y., *Biotech. Bioeng.*, 26:497, 1984.
- [13] Zabeau, M. and Stanley, K.K., *EMBO J.*, 1:1217, 1982.
- [14] Fadan, E. et al., *J. Biol. Chem.*, 258:5666, 1983.
- [15] Remaut, E. et al., *Nucleic Acid. Res.*, 11:4677, 1983.
- [16] Collins, J. and Pritchard, R.H., *J. Mol. Biol.*, 78:143, 1973.
- [17] Engberg, B. and Nordstrom, K., *J. Bacteriol.*, 123:179, 1975.
- [18] Inselburg, I., *J. Bacteriol.*, 133:433, 1978.
- [19] Nakazawa, T., *J. Bacteriol.*, 133:527, 1978.
- [20] Godwin, D. and Slater, J.H., *J. Gen. Microbiol.*, 111:201, 1979.
- [21] Meacock, P.M. and Cohen, S.N., *Cell*, 20:529, 1980.
- [22] Nordstrom, K. et al., *Plasmid*, 4:215, 1980.
- [23] Ogura, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3993, 1980.
- [24] Murray, A.W. and Szostak, J.W., *Cell*, 34:961, 1983.
- [25] Jayaram, M. et al., *Cell*, 34:95, 1983.
- [26] Siegel, R. and Ryu, D.D.Y., *Biotech. Bioeng.*, 27:28, 1985.
- [27] Ehrlich, S.D. et al., *Curr. Topics in Microb. and Immunol.*, 96:19, 1982.
- [28] Imanaka, T. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 118:253, 1980.
- [29] Gryczan, T.J. and Dubnau, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1428, 1978.
- [30] Keggin, K.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1423, 1978.
- [31] Meyerink, J.H. et al., *Third European Congress on Biotechnology*, 3:389, 1984.
- [32] Dwivedi, C.P. et al., *Biotech. Bioeng.*, 24:1465, 1982.
- [33] 三輪清志ら, 生化学, 53, 816, 1981.
- [34] Skogman, G. et al., *Gene*, 23:105, 1983.
- [35] Steuber, D. and Bujard, H., *EMBO J.*, 1:1399, 1982.

(上接p.88)

- [36] Itakura, K.T.et al.: *Science*, 198:1056,1977.
- [37] Moir,A.and Brammar, W.J.,*Mol.Gen.Gent.*, 149:87, 1976.
- [38] Rao,R.N.and Rogers, S.G.: *Gene*, 3:247, 1978.
- [39] Uhlin,B.E.et al.: *Gene*, 6:91, 1979.
- [40] Aiba,S.and Koizumi, J.,*Biotech.Bioeng.*, 26:1026, 1984.
- [41] Kleinman,M.J.et al.:*Biotech.Lett.*, 8:225, 1986.
- [42] Noack,D.et al.: *Mol.Gen.Gent.*, 184:121, 1984.
- [43] Ryder,D.F.and DiBiasio, D., *Biotech.Bioeng.*, 26:942, 1984.