

# 维生素 C 生产用菌系 2980 产酸菌基因转移的筛选模型及转座子 Tn5 诱变

赵 巍<sup>1</sup> 张成刚<sup>1</sup> 刘宏迪<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

<sup>2</sup>(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 维生素 C 的生产目前国内广泛采用由产酸菌 (*Gluconobacter oxydans*) 与伴生菌 (*Bacillus megaterium*) 组成的 2980 菌系, 在 2980 中 *G. oxydans* 单独生长传代困难, 其生长和产酸需要 *B. megaterium* 参与。以 *Bacillus subtilis* Ki-2-132 (pUB110) 作为伴生菌与原 2980 的 *G. oxydans* 组合, 获得稳定产酸的新菌系。在此基础上建立了适合我国混菌发酵产酸菌外源基因 (Kan<sup>r</sup>) 转移的筛选模型。同时报道了以携带有自杀性载体 P1::Tn5 的大肠杆菌 *E. coli* W3110 为供体菌对 *G. oxydans* 进行 Tn5 诱变的条件和结果。

**关键词** 维生素 C 生产用菌系 2980, 筛选模型, Tn5 诱变

**分类号** Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0202-06

我国特有的“二步发酵法”是对维生素 C 生产的重大贡献。目前, 国内维生素 C 生产厂家广泛采用宁文珠、尹光琳等申请专利, 由产酸菌 *Gluconobacter oxydans* 与伴生菌 *Bacillus megaterium* 组成的 2980 菌系<sup>[1]</sup>。由此构成的“二步发酵法”的第二步发酵是我国科学家对维生素 C 生产的巨大贡献。我国“二步发酵法”在维生素 C 微生物发酵方面处于领先水平, 但与国外采用的化学合成法“莱氏法”相比存在转化率低的缺陷, 且基础研究一直十分薄弱, 基因水平的工作还未见报道, 主要原因是产酸菌 *G. oxydans* 的单独生长传代困难, 其生长和产酸需要伴生菌的参与。

本文用转座子诱变技术对 2980 菌系进行初步研究。利用转座子 Tn5 所带抗性可以方便地了解外源基因转移的情况, 再进一步进行基因的分离和操作。同时也可以得到突变株进行特定表型(如高产菌, 营养缺陷型等)的筛选。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、噬菌体和质粒:** 巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 和氧化葡萄糖酸杆菌 (*G. oxydans*) 来自 2980 菌系<sup>[1]</sup>; 枯草芽孢杆菌: *B. subtilis* (pUB110)<sup>[2]</sup>; 大肠杆菌: *E. coli* AS 1.1694(pKan2)<sup>[3]</sup>。 *E. coli* W3110(P1::Tn5)购自美国农业部菌种保藏中心。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基参见文献[4], P1 培养基为含 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mg/mL 胸腺嘧啶核苷的 LB 培养基。 MCB 缓冲液含 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>。 2980 种子

收稿日期:1998-03-05, 修回日期:1998-08-31。

培养基为每升含山梨糖 20g, 玉米浆 15g,  $\text{CaCO}_3$  2g, 葡萄糖 2g, 尿素 1g, 用 40% NaOH 调 pH 值为 7.0, 115℃ 高压蒸汽灭菌 30min。2980 分离培养基为每升含酵母膏 3g, 牛肉膏 3g, 玉米浆 3g, 蛋白胨 10g, 尿素 1g, 山梨糖 20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g,  $\text{CaCO}_3$  1g, 用 40% NaOH 调 pH 为 7.0, 115℃ 高压蒸汽灭菌 30min。

**1.1.3 试剂:** 胸腺嘧啶核苷: Sigma 公司产品, 限制酶以及 DIG 标记和检测试剂盒为宝灵曼公司产品, 其它为分析纯试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 生长曲线的测定:** 生长曲线的测定方法采用纯化后的单菌落 1~2 环于装有 20mL 培养基的 250mL 三角瓶中, 培养至对数后期, 取 0.5mL 接种于装有 50mL 预热液体培养基的 250mL 三角瓶中, 振荡培养, 每隔一定时间取样, 测定其光吸收值, 至下降为止。

**1.2.2  $\text{Kan}^r$  自发突变率的测定:** 每次实验同时取待测菌培养液, 浓缩至每毫升达  $10^{10}$ , 涂含  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan 的固体培养基, 以原培养基为对照, 计生长菌落数。

**1.2.3 转导:** 取单菌落 *E. coli* W3110 于 LB 培养基, 30℃ 通气培养 18~20h, 将 1mL 培养液稀释到 100mL P1 培养基中, 并于 30℃ 培养至  $A_{550}$  为 0.092, 将细胞用冰冷却 10min, 于 6℃ 2500r/min 离心沉淀 10min, 并重新悬浮在 20mL P1 培养基中, 42℃ 保温 20min, 37℃ 保温 90min 进行噬菌体诱导。加入 0.5mL 氯仿, 剧烈搅拌混合。室温保温 5min, 使细胞完全溶解。以 10 000r/min 离心 15min 以沉淀细胞碎片。上清液稀释到过量 10 倍的 MCB buffer 中。此为噬菌体悬浮液。

2980 菌体在种子培养基中 29℃ 通气培养 20~24h。取 1mL 至 29mL 于种子培养基中, 通气培养至  $A_{550}$  为 0.4。6℃ 2500r/min 离心 10min, 细胞重悬于 1.8mL 种子培养基中。

0.1mL 噬菌体悬浮液加 0.1mL 2980 细胞, 29~30℃ 吸附 60min, 加入 0.8mL 种液, 再培养 2h。加入适量 *B. subtilis*。取不同稀释度涂布于含 Kan(浓度为  $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的分离培养基平板上, 29℃ 培养 3~4d。至 *B. subtilis* 和 *G. oxydans* 长出。

**1.2.4 2-KGA 含量的测定:** 参见文献[5]。

**1.2.5 总 DNA 制备:** 参见文献[6]。

**1.2.6 探针标记和点杂交:** DIG 系统, 分别参照宝灵曼公司 DIG 标记和检测试剂盒说明和文献[4]进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 新组合菌系

由于 2980 菌系的特殊情况: *G. oxydans* 的生长和产酸需要 *B. megaterium* 的参与, 在筛选过程中的第一个问题是针对筛选培养基构建相应的大菌。采用 Tn5 诱变, 要用 Tn5 上的卡那霉素抗性( $\text{Kan}^r$ )筛选 Tn5 插入 *G. oxydans* 的突变子, 而原伴生菌不带抗性选择标记; 因此要寻找含有  $\text{Kan}^r$  的伴生菌。这可以对原 2980 菌系的 *B. megaterium* 进行改造, 使其带有  $\text{Kan}^r$ ; 还可以使用本身带有  $\text{Kan}^r$  的菌株与 2980 的 *G. oxydans* 组合成新菌系。这里采用从我国的枯草杆菌中筛选到的 *B. subtilis* Ki-2-132 并带有 pUB110 ( $\text{Kan}^r$ )<sup>[2]</sup> 的菌株作为伴生菌, 可以保证 *G. oxydans* 的正常生长和产酸。进行产酸的测定

是有必要的,因为据研究,伴生菌对 *G. oxydans* 的生长和产酸的影响因素很可能不一样。仅仅保证 *G. oxydans* 能够生长并不能保证它可以正常产酸。对 *B. subtilis* 和 *G. oxydans* 组合菌系的产酸情况进行了测定,同时以原 2980 菌系产酸情况为对照,结果表明, *B. subtilis* 与 *G. oxydans* 组合的新菌系产酸与 2980 相近,且产酸量稳定(见表 1), *B. subtilis* 可以作为 *G. oxydans* Tn5 突变子在筛选过程中的伴生菌。

表 1 *B. subtilis* 与 *G. oxydans* 组合的新菌系产酸结果  
Table 1 2-KGA productivity by *B. subtilis* and *G. oxydans*

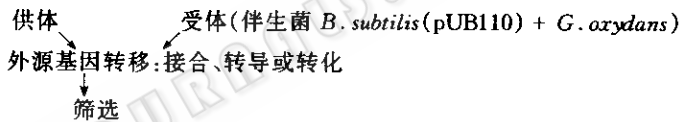
No.	1	2	3	4	5	CK
2-KGA/ (mg/mL)	68.25	73.24	71.29	68.60	62.00	75.98

CK: Original strain system 2980; *B. megaterium* and *G. oxydans*

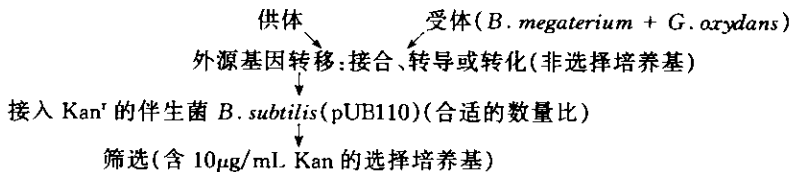
## 2.2 筛选模型的建立

得到了合适的伴生菌,可以保证 *G. oxydans* 突变子在筛选培养基上生长的外部必要条件。但是仅仅保证 *G. oxydans* 能够生长产酸还不够,还要解决混菌发酵在筛选时的多菌数量配比的问题。

外源基因转移的方法如接合、转导和转化等都需要对数期的菌体作为受体菌,也就是把菌系共同培养,使其中的产酸菌达到对数期易于接受外源 DNA 片段的状态,然后再进行外源 DNA 的转移。外源基因转移的一般程序可以简示如下:



我们通过实验发现,用以上的方法根本无法进行筛选。外源 DNA 片段转移的频率,一般为 $(10^{-5} \sim 10^{-7})$ /受体。在混菌培养至对数期时单位体积的 *G. oxydans* 菌数与 *B. subtilis* 菌数之比约为 1~100。小菌在固体培养基上生长较慢,需 3d 左右,而 *B. subtilis* 第一天即已长好,3d 已经长得很大。为了给可能出现的一个抗性突变子留下一席之地,每个平板的菌落数不能超过  $10^3$  数量级,一般约 100~200 个菌落。如果外源片段的转移频率为  $10^{-5}$  受体时,为了确定是否有外源基因转移,需铺多至上百个平板,这样算来工作量过于庞大。为了解决此问题,设计了适合我国 2980 混菌发酵外源基因转移的筛选模型:



这样通过后接入  $Kan^r$  *B. subtilis* (pUB110) 伴生菌的方法,既没有改变原 2980 菌系的组合,又可以调整多种菌的数量比,大大减少了工作量,使筛选能够顺利地进行。我们实验中采用上述方法,一般常规的工作量,如两个摇瓶分别培养供体菌和受体菌,用 3~6

块培养皿就可以筛选到成百上千的 *G. oxydans* 突变子。

### 2.3 Tn5 诱变

**2.3.1 转导条件的确定:** 因为 Tn5 从载体质粒上转座到染色体 DNA 上的频率为  $10^{-3} \sim 10^{-2}$ <sup>[7]</sup>, 再考虑质粒本身从供体到受体的转移频率, 转导中用到的其它生物标记突变的频率应该较小, 这样才能进行有效的筛选。为此我们进行了受体菌自发突变频率的测定。通过测定, 结果表明 2980 菌系 *B. megaterium* 和 *G. oxydans* 的 Kan<sup>r</sup> 自发突变频率小于  $10^{-10}$ , 符合上述的要求。

转导要求对数期的菌体, 所以进行生长曲线的测定, 找到合适的培养时间是很必要的。通过测定, 得到 *E. coli* W3110(P1::Tn5) 的生长曲线如图 1。为了确定 2980 菌系中小菌 *G. oxydans* 生长到对数期的时间, 2980 的生长曲线采用二级种子进行测定。这种情况下大小菌的配比比较稳定, 受接种时两种菌的数量和配比影响较小, 使转导的重复性很好。2980 二级种子早对数期的生长曲线如图 2。由图可见, *G. oxydans* 在早对数期增长迅速, 并且远远大于 *B. megaterium* 的数量。

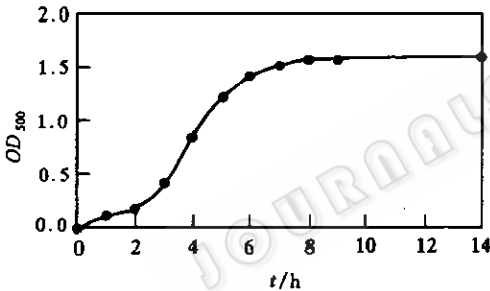


图 1 *E. coli* W3110 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *E. coli* W3110

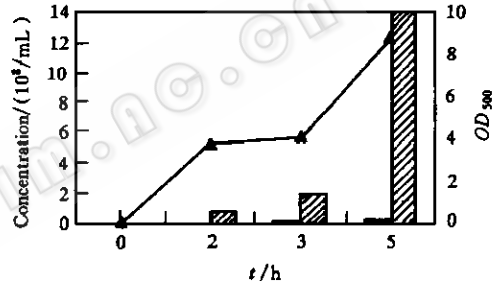


图 2 2980 二级种子生长曲线(对数早期) 大小菌活菌计数

Fig. 2 Growth curve (early logarithmic phase) and counting on viabel bacteria of 2980 2nd seed.

■ Concentration of *B. megaterium*  
 ▨ Concentration of *G. oxydans*  
 -▲-  $OD_{500}$

实验中确定 *E. coli* W3110(P1::Tn5) 进行转导的培养时间为 51min, 2980 的液体培养时间为 3.25h。

**2.3.2 转导子的稳定性及杂交验证:** 通过 *E. coli* W3110(P1::Tn5) 对 2980 的转导, 得到了大量在含卡那霉素的分离平板上单独生长的 *G. oxydans*, 同 *B. subtilis* Ki-2-132 (pUB110) 共同培养传代 10 代以上, 再接含 Kan 10 $\mu$ g/mL 的平板, 突变子仍然生长良好, 说明他们的抗性较稳定。冻干保存后再测定, 抗性也未丢失。

为了进一步证明 Tn5 片段的插入, 采用 pKan2 质粒上的 Tn5 片段制备探针。pKan2 质粒是把 Tn5 的 *Hind*III 酶切片段与 pBR322 质粒连接而成的<sup>[3]</sup>, 通过提取转导子单菌落的菌体总 DNA, 点膜, 与 DIG 标记的 pKan2-Tn5 探针杂交证明有 Tn5 插入(见图 3)。

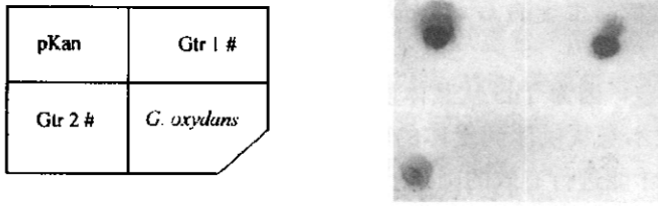


图 3 *G. oxydans* Tn5 转导子与 pKan-Tn5 探针杂交结果

Fig. 3 Dot hybridization of *G. oxydans* with Tn5 transposition by DIG-labelled pKan-Tn5 probe  
Gtr1 #, Gtr2 # were *G. oxydans* mutants with kanamycin resistance.

## 2.4 讨 论

以上用转座子诱变技术对 2980 菌系进行初步研究,以期能把分子生物学带入我国这一传统的生产技术中,进一步提高它在国际市场的竞争力。

## 参 考 文 献

- [1] W. Ning, Z. Tao, C. Wang. 1988, European Patent 0 278 447.
- [2] 汤懋弘,魏荣宣,杨月琴等. 遗传学报, 1981, 8(1): 8~13.
- [3] K. F. Scott, B. G Rolfe, J Shine. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1981, 1: 71~81.
- [4] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed, CSH Laboratory, New York. 1989.
- [5] 程茉莉,严杏珍. 医药工业, 1981, 6: 15~18.
- [6] F. M. Ausubel *et al.* (ed). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1988, Supplement 2.4.
- [7] D. E. Berg, E. Egner, B. J. Hirschel *et al.* Insertion, Excision and Inversion of Transposon Tn5, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1980, 45: 115~123.

## The Screening Model for Gene Transfer and Tn5 Mutagenesis in the 2-Keto-L-gulonic Acid Producing Strain from Vitamin C Producing Bacterial System

Zhao Wei<sup>1</sup> Zhang Chenggang<sup>1</sup> Liu Hongdi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015)

<sup>2</sup>(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Nowadays, Vitamin C is produced in China by widely used 2980 bacterial system, which comprises 2-Keto-L-gulonic acid(2-KGA) producing strain-Gluconobacter oxydans and the accompanying strain-Bacillus megaterium. In 2980, *G. oxydans* has difficulties in growing independently. It needs accompanying strain to grow and produce 2-KGA. A new bacterial system which can produce 2-KGA at a stable level was formed in this work by using *Bacillus subtilis* Ki-2-132(pUB110) as an accompanying strain. Then a model for the screening of *G. oxydans* clones with kanamycin resistance was set up. The conditions and results of transduction between the donor *E. coli* W3110 (carrying suicide P1::Tn5) and recipient *Gluconobacter oxydans* from 2980 are also reported.

**Key words** Vitamin C producing bacterial system 2980, screening model, Tn5 mutagenesis