

通过接合作用质粒从大肠杆菌到棒状杆菌的转移

钱 红 范 伟 吴俊林 郑兆鑫

(复旦大学遗传所, 上海 200433)

摘 要 构建了可接合转移的穿梭质粒 pXZ911、pBZ51 和 pBZ52。这些质粒中含有具转移功能的 Mob 片段和在棒状杆菌中复制的复制区。以大肠杆菌 S17-1 为供体菌, 通过接合转移作用, 可将这些质粒转移到谷氨酸棒杆菌 ATCC13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC21543、北京棒杆菌 B3、北京棒杆菌 1.299、裂氏棒杆菌 B43、黄色短杆菌 ATCC 14067 等棒状杆菌菌株, 接合转移频率分别为: 9×10^{-5} , 1×10^{-4} , 8.5×10^{-5} , 2.3×10^{-4} , 6×10^{-5} , 2.9×10^{-5} 。本文还探索了大肠杆菌和几种革兰氏阳性棒状杆菌间基因转移的方法、转移频率、影响转移频率的因素、宿主范围等问题。

关键词 接合作用, 质粒 DNA 转移, 棒状杆菌质粒 pXZ10145, 氨基酸

细菌接合作用是通过细胞间紧密接触而实现遗传物质交换的过程, 并广泛存在于许多革兰氏阴性和阳性细菌中。常见的可接合转移的质粒如 F 因子和 R 因子。包括 R 因子的 IncP 不亲和群质粒群有极广泛的宿主⁽¹⁾, 它们可在多数革兰氏阴性菌中通过接合作用转移质粒, 其中代表性的如来自 *Pseudomonas aeruginosa* 的质粒 RP4⁽²⁾。RP4 不仅能自我转移, 而且还可以诱动共存于同一细胞中的原来无转移能力的质粒从供体细胞转移到受体细胞。这种诱动作用已被用于构建诱动系统。完成这一诱动过程必须具备以下条件: 首先需组建一诱动供体菌株。在该菌中 RP4 的衍生质粒已经整合到染色体上, 使该菌株能提供转移功能, 可将被诱动的质粒从该供体菌株诱动转移到合适的受体菌中。已建成的诱动供体菌株如大肠杆菌 S17-1⁽³⁾。其次是组建被诱动质粒, 因为通常细菌中的质粒是不能被 RP4 诱动的。要使质粒成为可诱动质粒, 需插入 RP4 特异的 Mob 片段。此片段中有 oriT, 可以被 RP4 的转移功能识别, 如 pK18: Mob⁽⁴⁾。第三, 一旦被诱动质粒已转移到受体菌中, 应该具有在受体菌中复制区, 从而能在受体菌中稳定存在。在革兰氏阴性菌种之间研究转移的可能性, 宿主的广谱性及转移机制等已有过不少报道⁽⁵⁻⁷⁾至于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌之间是否能够利用这一转移系统报道不多, 仅有少数报道说明在大肠杆菌和芽孢杆菌之间的接合转移作用是可能的⁽⁸⁾。在棒状杆菌中 Schafer 等⁽⁹⁾首先报道利用这一接合转移系统可将质粒从大肠杆菌转移到棒状杆菌。由于棒状杆菌是生产氨基酸、核苷酸的主要生产菌株, 因此建立高效的质粒转移方法极为重要。我们利用棒状杆菌质粒 pXZ10145⁽¹⁰⁾和 pK18: Mob 构建了 3 个可被带动转移的穿梭质粒, 探索了在革兰氏阴性菌大肠杆菌和属于革兰氏阳性菌的棒状杆菌之间质粒通过接合而转移的方法及其影响因素。发现这一穿梭质粒的接合转移过程方法简便且频率较高。这个转移系统

的构建有助于在棒状杆菌及相关菌种中进行基础理论及氨基酸基因工程的研究,为棒状杆菌中的基因操作提供了一个有效的方法,也为研究遗传物质在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌之间的转移机制提供了一个典型的模型。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

见表 1。

表 1 实验用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the experiments

Strains	Source
<i>Escherichia coli</i>	
<i>E. coli</i> C600	Inst. of Genetics, Fudan University
<i>E. coli</i> S17-1	Dr J. Frey, Bern University, Switzerland
* <i>Corynebacterium</i>	
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Prof. A. Puhler, Univ. of Bielefeld, Germany
<i>C. herculis</i> B43	Inst. of Industrial Microbiology of Shanghai
<i>B. flavum</i> ATCC14067	Dept. of Microbiology, Fudan Univ.
<i>C. pekinense</i> B3	Inst. of Industrial Microbiology of Shanghai
<i>C. pekinense</i> AS1. 299	Dept. of Microbiology, Fudan Univ.
<i>C. glutamicum</i> ATCC21543	Dept. of Microbiology, Fudan Univ.
Plasmids	Source and resistance marker
pK18, Mob	Prof. A. Puhler, Univ. of Bielefeld, Germany Km
pXZ10145	Inst. of Genetics, Fudan University Cm
pXZ10	Inst. of Genetics, Fudan University Tc
pXZ911	This work Km
pBZ51	This work Km
pBZ52	This work Km

* All coryneform bacteria used here are resistant to nalidixic acid

1.2 培养基

细菌生长培养基为 LB 液体培养基: 蛋白胨 1%, 酵母浸出粉 0.5%, 氯化钠 1%, pH7.2—7.4, 121℃ 湿热灭菌 20 分钟。在 LB 液体培养基加入 2% 琼脂粉并灭菌即为 LB 固体培养基。临用时加入适量抗生素即为抗性培养基。

1.3 方法

1.3.1 质粒 DNA 的分离纯化及操作: 大肠杆菌质粒 DNA 的提取用碱变性法^[11]或煮沸法^[12]。棒状杆菌质粒 DNA 提取按郑兆鑫等介绍的氯化铯密度梯度离心法^[10]。质粒 DNA 的电泳分析用 0.8—1.0% 的琼脂糖凝胶。限制酶, T4 连接酶, RNase A, 溶菌酶等分别从 Biolabs, Sigma, 华美生物工程公司购买, 反应条件按照上述公司介绍的方法。重组质粒 DNA 在大肠杆菌中的转化用氯化钙法^[12]。

1.3.2 接合转移实验: 按 A. Schäfer^[9]的方法稍加修改后如下: 带有 pXZ911 或 pBZ51

或 pBZ52 的 *E. coli* S17-1 菌株,经过活化后以 1% 接种量转接入新鲜 LB 培养基 (Km 为 20 μ g/ml) 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5—1.0。受体棒状杆菌 30 $^{\circ}$ C 过夜活化后以 1% 接种量转接入 LB 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 3—4。约 10⁸ 左右的供体菌 (5ml 左右) 和 5 倍以上数目的受体 (1ml 左右) 混合, 室温 4 000r/min 沉淀菌体, 再用 100—200 μ l 新鲜 LB 液体悬浮。将所有菌体悬浮液铺在一张孔径为 0.45 μ m 的硝酸纤维素膜上, 在铺菌液前应将硝酸纤维素膜放在 LB 固体培养基平板上, 并在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。铺菌液后, 将带有硝酸纤维素膜的平板置于 30 $^{\circ}$ C 下培养 20 小时左右, 然后用 200—1000 μ l LB 液体培养基将细菌从膜上全部冲洗下来, 在每个含 Km 20 μ g/ml, Nx 40—50 μ g/ml 的选择性固体培养基平板上涂布 130 μ l 左右的菌液, 30 $^{\circ}$ C 培养 2—4 天, 接合转移的频率=接合子数/供体菌数。

2 结 果

2.1 质粒 pXZ911、pBZ51、pBZ52 的构建

棒状杆菌质粒 pXZ10145, 大小 5.3kb。在 EcoRI 大片段上, 具有能在棒状杆菌中启动质粒复制的复制区以及单酶切位点 PstI。pK18: Mob 为一大肠杆菌质粒, 大小为 3.6kb, 带有在大肠杆菌中的复制区, 接合转移所必需的 Mob 片段, 多种单一限制酶位点和 Km^r。通过 EcoRI 酶切将 pXZ10145 的 EcoRI 大片段克隆到 pK18: Mob EcoRI 位点上构建既有棒状杆菌复制区又有大肠杆菌复制起点的质粒 pXZ911, 大小 8.3kb。通过 EcoRI 和 PstI 双酶切将 pXZ911 上来自 XZ10145 的片段克隆到 pK18 中得到质粒 pBZ52, 大小约 7.2kb。pXZ10 为 pXZ10145 上 EcoRI-EcoRI 大片段克隆到大肠杆菌质粒 pGA46-4 中而得到的穿梭质粒, 其上没有与诱动转移有关的 Mob 区, 用 PEG 介导的原生质体转化法可将它转入裂氏棒杆菌 B43, 得到转化子。通过 EcoRI 和 PstI 双酶切将 pXZ10 上来自 pXZ10145 的 EcoRI-PstI 片段克隆到 pK18 中得质粒 pBZ51, 约 6.7kb, 因其 EcoRI-PstI 片段发生天然重组缺失而比 pBZ52 的 EcoRI-PstI 片段小 500bp 左右。pXZ911、pBZ51 和 pBZ52 都含有 Mob 片段, 有接合转移能力。

2.2 可接合转移的穿梭质粒 pXZ911、pBZ51、pBZ52 的接合转移频率

将质粒 pXZ911、pBZ51、pBZ52 经过转化进入 *E. coli* S17-1 作为供体, 然后在 *E. coli* S17-1 和受体菌谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 之间进行接合转移, 在含卡那霉素 (20 μ g/ml) 和萘啶酮酸 (40—50 μ g/ml) 的平板上筛选出 Km^r 和 Nx^r 的接合子。经显微镜检, 及挑选接合子抽提质粒, 琼脂糖凝胶电泳检查等都证明接合子确为棒状杆菌且含有转移进去的质粒, 其大小及限制酶酶切图谱分别与 *E. coli* S17-1 中的 pXZ911、pBZ51、pBZ52 相同。这些质粒经接合转入谷氨酸棒杆菌的频率分别为 9 $\times 10^{-5}$, 4 $\times 10^{-7}$, 5 $\times 10^{-5}$, 结果见表 2。同时, 分别以 *E. coli* C600 (pXZ911)、*E. coli* JM103 (pXZ911)、*E. coli* S17-1 (pXZ10)、pXZ911 质粒 DNA 为对照, 实验说明, 通过接合作用转移质粒必须以 *E. coli* S17-1 为供体菌株, 而且在质粒载体上需带具有转移功能的 Mob 片段, 而仅用不含此片段的 pXZ10 或仅用质粒 DNA 转化都不能得到接合子。

2.3 pXZ911 质粒接合转移的宿主范围

实验结果说明, pXZ911 质粒不仅能通过接合作用, 从大肠杆菌 S17-1 转移到谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032, 还能转移到谷氨酸棒状杆菌 ATCC21543、裂氏棒状杆菌 B43、北京棒状杆菌 AS1. 299 及黄色短杆菌 ATCC14067。其中谷氨酸棒状杆菌 ATCC21543 和北京棒状杆菌 AS1. 299 的接合转移频率较高, 分别为 2.3×10^{-4} 和 1×10^{-4} (表 2), 而其它菌株的接合频率也在 10^{-6} 左右。说明 pXZ911 都可在其中很好复制且稳定存在, 而且几株菌在生理、遗传上同源性很强。棒状杆菌在分类学上是一个较大的革兰氏阳性细菌类群, 根据 H. Seiler 的棒状杆菌的分类标准^[33], 黄色短杆菌 ATCC14067 和谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032, 谷氨酸棒状杆菌 ATCC21543, 裂氏棒状杆菌 B43 在分类上都属于同一簇 (cluster E), 北京棒状杆菌 *C. pekinense* B3 和 AS1. 299 虽然没有纳入该分类系统中, 但根据对菌株特征的描述, 它们与 *Corynebacteria-Brevibacterium* 有极强的同源性。由此可见, 同一穿梭质粒在亲缘相近的不同菌株中, 易于通过接合作用转移, 并可稳定复制。

2.4 影响接合转移频率的因素

2.4.1 受体细胞的热处理对接合转移频率的影响: Schäfer 等报道^[9], 接合前将宿主细胞在 48—49℃ 热处理 9 分钟的可以最大限度地破坏受体细胞内的限制系统, 而提高棒状杆菌的接合频率, 但是过高的温度反而会导致细胞的存活率降低。我们对以上 6 种棒状杆菌也做了加热或不加热处理的比较, 发现热处理对不同菌株的影响各异。接合频率的变化如表 2。实验结果证明, 对于谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032, 加热处理后, 接合转移频率由 3×10^{-7} 提高到 9×10^{-5} , 北京棒状杆菌 AS1. 299、黄色短杆菌 ATCC14067、谷氨酸棒状杆菌 ATCC21543 等经热处理后转移频率也明显提高了几十到几百倍。但是对于裂氏棒状杆菌 B43 和北京棒状杆菌 B3, 加热处理并不能显著地影响接合转移频率。

表 2 穿梭质粒从大肠杆菌到棒状杆菌的接合转移频率^{a,b}

Table 2 Transfer frequency of *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle vector from *E. coli* S17-1 to different strains of coryneform bacteria^{a,b}

Donor	Recipient	Transfer frequency	
		Heat treatment 48—49℃ for 9min	No heat treatment
S17-1(pXZ911)	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	9×10^{-5}	3×10^{-7}
	<i>C. hercutis</i> B43	6×10^{-5}	3×10^{-5}
	<i>C. pekinense</i> B3	8.5×10^{-5}	1.3×10^{-5}
	<i>C. pekinense</i> AS1. 299	2.3×10^{-4}	6.1×10^{-4}
	<i>B. flavum</i> ATCC14067	2.9×10^{-5}	1.3×10^{-8}
	<i>C. glutamicum</i> ATCC21543	1×10^{-4}	3×10^{-6}
S17.1(pBZ51)	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	4×10^{-7}	
S17.1(pBZ52)	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	5×10^{-5}	
S17-1(pXZ10)	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	$<10^{-9}$	
C600(pXZ911)	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	$<10^{-9}$	
pXZ911	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	$<10^{-9}$	

a: The mating procedure was performed as described in the text. The values shown were means of three independent matings and were reproducible within 1 order of magnitude

b: The natural mutation rate of *C. glutamicum* ATCC13032 was less than 10^{-10}

2.4.2 棒状杆菌质粒功能片段与接合转移频率的关系:除了受体细胞的热处理影响接合

转移频率以外, 还观察到供体质粒对接合转移频率会产生一定影响。虽然 pBZ52 与 pXZ911 相比, 前者缺少 pXZ10145 上 EcoRI-PstI 约 1.1kb 左右的片段, 但是接合转移频率却差别不大, 两者都为 10^{-6} 左右。pBZ51 和 pBZ52 尽管都有 pXZ10145 的 EcoRI-Pst I 片段, pBZ51 的接合转移频率却比 pBZ52 低约 100 倍。这是由于 pBZ51 中的 EcoRI-PstI 片段比 pBZ52 中的小 500bp, pBZ51 是一天然缺失质粒, 可能该缺失的片段对质粒复制产生较大的影响。

3 讨 论

通过细菌的接合作用将质粒转移到棒状杆菌细胞中是既高效又简便的一种方法。接合频率的高低显然受到多种因素的影响。上述实验结果说明, 对受体菌株进行加热处理, 可以提高接合频率。但是频率是否提高以及提高的幅度, 因菌株不同而异。如 *C. glutamicum* ATCC13032 经 48.5℃ 9 分钟处理后, 接合频率显著提高 100 倍左右, 但是热处理对 *C. herculis* B43 却没有明显的影响。如果改用原生质体转化方法转移质粒, 则转化 *C. glutamicum* ATCC13032 几乎得不到转化子, 而 *C. herculis* B43 为一株常用的受体菌, 利用原生质体转化方法可将穿梭质粒转入且稳定地进行质粒复制, 转化频率为 10^4 转化子/微克 DNA (未发表)。造成这种差别的原因可能是前者细胞中有较强的 DNA 限制系统存在, 而后者可能是一株 Res⁻ 的菌株。有报道证明棒状杆菌细胞中的限制系统的确会影响外源 DNA 导入受体细胞^[14,15], 而高温处理导致接合转移频率的显著提高, 可能是由于高温直接导致对温度敏感的限制酶的失活, 也可能间接的, 如 UV 照射一样, 在 SOS 修复损伤的 DNA 的过程中导致限制系统的破坏^[16]。而对于细胞内限制系统不强的菌株如 *C. herculis* B43, 原来 DNA 转化频率和接合转移频率都比较高, 因此不受加热处理的影响。

接合作用的频率高低和构建的接合转移质粒的功能片段有关。如组成 pXZ911 的质粒带有 pXZ10145 的 EcoRI-EcoRI 片段, 该片段长度约为 4.7kb, 而 pBZ51 和 pBZ52 虽然都带有 pXZ10145 的 EcoRI-PstI 片段, 但其大小不一样, pBZ51 可能为天然缺失子, 它的接合频率比 pXZ911 和 pBZ52 约低 100 倍。这一结果说明 pBZ51 可能缺失了一段编码与棒状杆菌质粒复制有关的基因或对质粒 DNA 复制起着正调控作用的片段。但是这段可能并不直接影响穿梭质粒的接合转移功能, 仅影响质粒 DNA 的复制功能。为了深入了解其作用机制, 对 pBZ51 和 pBZ52 中大小不等的 EcoRI-PstI 片段进行 DNA 顺序分析及进而了解其功能是完全必要的。

我们的实验证明, 用接合转移的方法, 质粒从革兰氏阴性菌如大肠杆菌转移到革兰氏阳性菌如棒状杆菌方便而高效。这一转移系统的建立有助于在氨基酸生产中采用基因工程技术选育高产菌株。这种可带动转移的系统, 还可用于那些用转化和转导等方法较困难的宿主系统。除了在细菌中应用以外, 如果能在基因工程操作菌如大肠杆菌和植物细胞之间找到合适的 DNA 转移系统^[17], 那将在植物遗传工程中有较大应用价值。

参 考 文 献

[1] Guiney D G. J infect Diseases, 1984, 149: 320—329.

- [2] Barth P T *et al.* J Bacteriol, 1978, 133: 43—45.
- [3] Simon R *et al.* Methods in Enzymology, 1986, 118: 640—658.
- [4] Simon R *et al.* Bio/Technology 1983, 1: 784.
- [5] Willetts N *et al.* Microbiol Reviews, 1984, 48: 24—41.
- [6] Guiney D G *et al.* in 'Promiscuous Plasmid of Gram-Negative Bacterium' (C. M. Thomas and D R Helinski ed.) 1989, p. 27—54.
- [7] Frey J *et al.* in 'Promiscuous Plasmid of Gram-Negative Bacterium'. (Christopher M Thomas and Daonald R. Helinski, ed.) 1989, p. 79—94.
- [8] Trieu-Cuot *et al.* FEMS Microbiol Lett, 1987, 48: 289—294.
- [9] Shafer A *et al.* J. Bacteriol, 1990, 172: 1663—1666.
- [10] 郑光鑫等. 生物工程学报 1987, 3(3): 183—188.
- [11] 彭秀玲等. (基因工程实验技术), 长沙, 湖南科学技术出版社, 1987, p. 8.
- [12] J Sambrook E F Fritsch and T Maniatis. Molecular cloning—A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harvor Laboratory Press, 1989.
- [13] Herbert Seiler. J Gen. Microbiol, 1983, 129: 1433—1471.
- [14] Katsumata R *et al.* J Bacteriol, 1984, 159: 306—311.
- [15] Santamarta R *et al.* J Bacteriol, 1985, 162: 463—467.
- [16] Beiley C R *et al.* J Gen Microbiol, 1986, 132: 2945—2947.
- [17] Buchanan-Wollaston V *et al.* Nature, 1987, 328: 172—175.

Plasmids Transfer from *Escherichia coli* to *Corynebacterium* by Conjugation

Qian Hong Fan Wei Wu Junlin Zheng Zhaoxin

(Institute of Genetics, Fudan university, Shanghai, 200433)

Abstract The mobilizable shuttle plasmids pXZ911, pBZ51, pBZ52, carrying the Mob site and replication origin of the *Corynebacteria* plasmid pXZ10145, were constructed. In *E. coli* S17. 1, they can be transferred to coryneform bacteria *C. glutamicum* ATCC13032, *C. glutamicum* ATCC21543, *C. pekinense* B3, *C. pekinense* AS1. 299, *C. herculis* B43, *B. flavum* ATCC14067 by conjugation and the transfer frequencies are 9×10^{-5} , 1×10^{-4} , 8.5×10^{-5} , 2.3×10^{-4} , 6×10^{-5} , 2.9×10^{-5} respectively. This plasmid transfer system which is convenient and highly effective should greatly facilitate the basic research and optimization of amino acid genetic engineering in coryneform bacteria and related species

Key words Conjugation, plasmid DNA transfer, plasmid pXZ10145 of *Corynebacteria*