

玫瑰红链霉菌 336 质粒 (pSR336) DNA 的分离及特性研究

还连栋 董可宁 谭华荣 庄增辉 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从葡萄糖异构酶产生菌——玫瑰红链霉菌 336 中分离得到质粒 pSR336。经电泳检测和电镜观察证实, 存在共价闭合超螺旋和开环两种分子构型, 分子量约为 6.35kb, 拷贝数约为 130。采用高温 (40℃), 吡啶橙、溴化乙锭和 SDS 等物理、化学因素消除 pSR336, 均未获得质粒消除株, 表明 pSR336 质粒是非常稳定的。用变铅青链霉菌 TK21 作受体, 进行平皿杂交以检测 pSR336 的接合转移能力, 未观察到麻点 (pock) 的形成。用 HindIII 分别酶切 pSR336 和 pIJ486, 连接得到一个嵌合质粒 pIR30, 检测玫瑰红链霉菌 336 (pSR336)、变铅青链霉菌 TK54 (pIR30)、变铅青链霉菌 TK54 (pIJ486) 及变铅青链霉菌 TK54 这 4 株菌的葡萄糖异构酶活性及对硫链丝菌肽等 21 种抗生素的抗性, 结果表明 pSR336 与葡萄糖异构酶的产生没有明显的联系; 该质粒不含有硫链丝菌肽等 16 种抗生素的抗性, 是否含有庐山霉素、洋红霉素、莫能菌素、春雷霉素这 4 种抗生素和乳链菌肽的抗性尚需进一步加以确定。

关键词 玫瑰红链霉菌, 质粒

玫瑰红链霉菌 (*Streptomyces roseoruber*)

336 是沈阳市食品发酵研究所从东北原始森林土样中筛选得到的一株葡萄糖异构酶产生菌。70 年代末用于工业化生产^[1]。我们首次从玫瑰红链霉菌 336 中分离到质粒 pSR336。由于该质粒分子量较小, 拷贝数较高, 比较稳定, 很适于改造成一个新的克隆载体。为此, 我们对 pSR336 与葡萄糖异构酶产生的关系及其他特性进行了研究, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。SPP1 DNA / EcoR I 酶切样品为分子量标准, 系本研究室郑文尧同志赠送。

1.2 培养基和抗生素

1.2.1 培养基配制: 链霉菌生长培养基 (CM)^[2]。平皿杂交或原生质体再生培养基 R5^[3]。葡萄糖异构酶测定所用的种子培养基和

表 1. 菌株与质粒

菌株或质粒	遗传型或表型	来源
玫瑰红链霉菌 (<i>S.roseoruber</i>)		本组保藏
336(pSR336)		
变铅青链霉菌 (<i>S.lividans</i>)	—	D.A.Hopwood 教授惠赠
TK21		
变铅青链霉菌 (<i>S.lividans</i>)	his-2 leu-2 spc-1	D.A.Hopwood 教授惠赠
TK54		
变铅青链霉菌 (<i>S.lividans</i>)	his-2 leu-2 spc-1 tsr	D.A.Hopwood 教授惠赠
TK54(pIJ486)		
变铅青链霉菌 (<i>S.lividans</i>)	his-2 leu-2 spc-1 tsr	本工作构建
TK54(pIR30)		

本研究系国家“七五”攻关项目部分内容
1995-08-31 收稿

发酵培养基^[1]。

1.2.2 抗生素:实验中所用 21 种抗生素的贮存液浓度为 5mg/ml 或 10mg/ml, 于 -20℃ 冰箱保存。除硫链丝菌肽用二甲基亚砜 (DMSO) 配制; 氯霉素、土霉素、红霉素、螺旋霉素、莫能菌素用无水乙醇配制; 乳链菌肽用 0.02mol/L HCl 配制; 利福平先溶于少量无水乙醇, 后加无菌水定容外, 其余 13 种抗生素均用无菌水配制。

1.3 质粒 DNA 的提取与纯化^[4]

1.4 工具酶及反应缓冲液

限制性内切酶 Hind III 为华美生物工程公司产品。小牛肠道碱性磷酸酯酶 (CIAP) 和 T4 DNA 连接酶为 Boehringer 公司产品。酶反应条件均按厂商提供说明书进行。

1.5 链霉菌原生质体制备和再生^[3]

1.6 体外重组和转化^[3,5]

1.7 质粒拷贝数的测定^[6]

1.8 质粒 DNA 的电镜观察^[2]

1.9 平皿杂交^[3]

1.10 葡萄糖异构酶活性测定

葡萄糖异构酶液制备按文献[7]方法。葡萄糖异构酶定量测定按半胱氨酸-吡唑法^[8]。蛋白质定量按 Folin 法^[9]。

2 结果与讨论

2.1 玫瑰红链霉菌 336 的质粒 pSR336 的分离及电镜观察

在研究葡萄糖异构酶产生菌——玫瑰红链霉菌 336 的过程中, 我们首次从玫瑰红链霉菌 336 中分离到质粒 DNA。经电泳检测, 发现该质粒比 pIJ486 (6.2kb) 略大。后经酶切分析, 分子量约为 6.35kb^[10]。将质粒 DNA 样品制片后, 用日立 H600 电子显微镜观察, 比较容易找到共价闭合超螺旋和开环两种分子构型 (图 1), 这就进一步证实玫瑰红链霉菌 336 中确实存在质粒。将该质粒命名为 pSR336。

2.2 pSR336 的拷贝数

提取玫瑰红链霉菌 336 的总 DNA, 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色后用蒸馏水

洗涤数次, 然后在岛津 CS-930 型分光扫描仪上扫描, 根据得到的数据计算出 pSR336 的拷贝数约为 130。

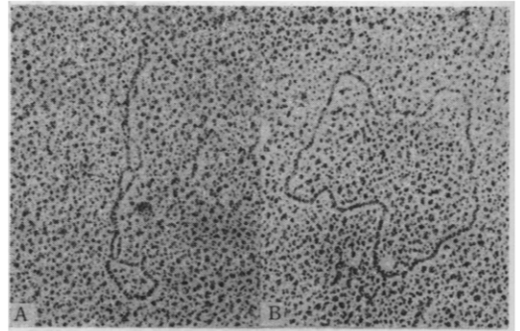


图 1 玫瑰红链霉菌 336 质粒 DNA 的电镜照片 (80,000×)

A. cccDNA B. ocDNA

2.3 pSR336 的稳定性

将玫瑰红链霉菌 336 划线分离单菌落, 多次抽提上百个单菌落的质粒 DNA, 没有发现质粒丢失的现象。此后, 采用高温 (40℃)、吡啶橙、溴化乙锭和 SDS 等物理、化学因素消除 pSR336, 均未获得质粒消除株。表明 pSR336 质粒是非常稳定的。

2.4 pSR336 接合转移能力的检测

以玫瑰红链霉菌 336 (pSR336) 作供体菌, 变铅青链霉菌 TK21 作受体菌, 进行平皿杂交以检测 pSR336 的接合转移能力。将玫瑰红链霉菌 336 (pSR336) 的孢子悬液经一系列稀释后加入到 TK21 孢子悬液中, 在含 R5 培养基的平皿上涂匀, 同时涂布不加供体菌或受体菌孢子悬液的平皿作为对照。不时观察受体菌菌坪上是否出现麻点。连续观察 2 周, 未在 TK21 菌坪上发现麻点。为了排除杂交的一方强烈抑制另一方, 而不能形成麻点, 又将供体菌或受体菌先在 R5 平皿上生长 24h, 然后再接种另一方, 结果也未观察到麻点的形成。据此, 可以认为 pSR336 可能是一个非接合转移性质粒, 或不能以变铅青链霉菌 TK21 作受体进行接合转移。

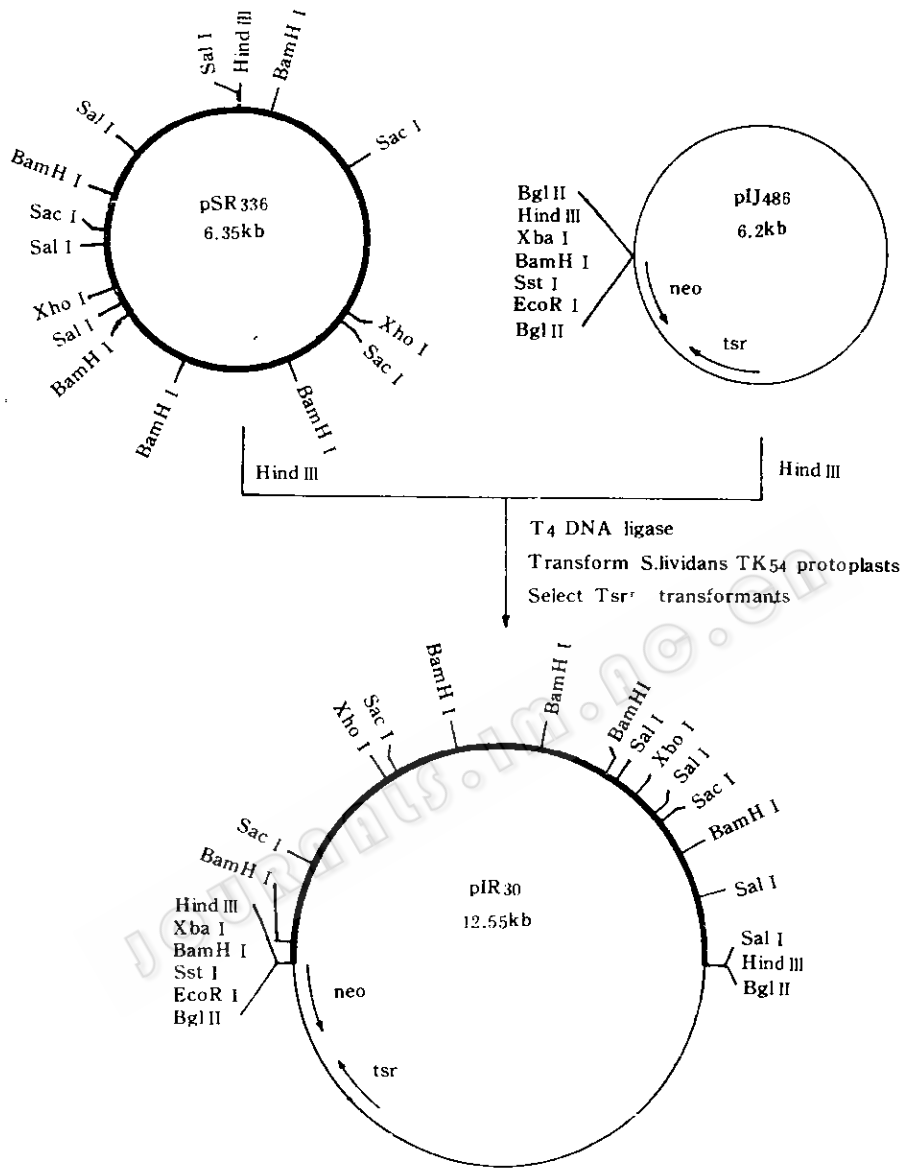


图 2 嵌合质粒 pIR30 的构建

2.5 pSR336 与葡萄糖异构酶产生的关系

玫瑰红链霉菌 336 是一株葡萄糖异构酶产生菌, pSR336 与葡萄糖异构酶产生的关系自然成了人们关注的问题。根据 pSR336 限制酶图谱, 质粒 pSR336 有一个 Hind III 切点^[10]。为此, 我们将 pSR336 与具有硫链丝菌肽抗性的另一链霉菌质粒 pIJ468^[11]用 Hind III 酶切, 连接得到一个嵌合质粒 pIR30(图 2), 将

pIR30 转化进入遗传背景比较清楚的变铅青链霉菌 TK54 中。抽提 pIR30 DNA, 并用 EcoR I 和 Hind III 酶切, 结果 pIR30 有一个 EcoR I 切点, 有 2 个 Hind III 切点; Hind III 酶切 pIR30 所得 2 个片段的分子量分别与经 Hind III 酶切得到的 pIJ486 和 pSR336 DNA 分子量相同(图 3)。表明 pIR30 确是 pIJ486 与 pSR336 连接所得嵌合质粒。

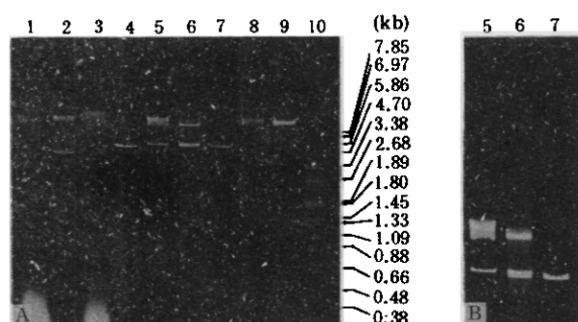


图3 pIR30等质粒的酶切电泳图

A. 全图 B. 局部放大图

1. pIJ486, 6. pIR30 / Hind III,
 2. pSR336, 7. pIJ486 / EcoR I,
 3. pIR30, 8. pSR336 / EcoR I,
 4. pIJ486 / Hind III, 9. pIR30 / EcoR I,
 5. pSR336 / Hind III, 10. SPP1 / EcoR I

接着检测了玫瑰红链霉菌 336(pSR336)、变铅青链霉菌 TK54(pIR30)、变铅青链霉菌 TK54(pIJ486)和变铅青链霉菌 TK54 四个菌株的葡萄糖异构酶活性(表 2)。如果 pSR336 与葡萄糖异构酶产生有关,则含嵌合质粒 pIR30 的变铅青链霉菌 TK54 的葡萄糖异构酶活性将与不含质粒的 TK54 和含有 pIJ486 的 TK54 有明显差异。但表 2 结果显

示,含 pIR30 的变铅青链霉菌 TK54 的酶活性与不含质粒的 TK54 和含有 pIJ486 的 TK54 没有差异。分析来自紫黑链霉菌葡萄糖异构酶结构基因的酶切图谱和 DNA 序列资料^[12,13],排除了 Hind III 酶切可能破坏了该基因的完整性。表明 pSR336 上不含有编码葡萄糖异构酶的结构基因。但 pSR336 上是否存在与葡萄糖异构酶合成有关的调控基因,尚有待进一步研究。

2.6 pSR336 对一些抗生素的抗性

为了检测 pSR336 质粒上是否具有抗药性标记,将玫瑰红链霉菌 336(pSR336)、变铅青链霉菌 TK54(pIR30)、变铅青链霉菌 TK54(pIJ486)和变铅青链霉菌 TK54 的菌液分别接种于硫链丝菌肽等 21 种抗生素的完全培养基上,以检测 pSR336 对这些抗生素的抗性(表 3)。从表 3 结果可知,玫瑰红链霉菌 336(pSR336)不能在含硫链丝菌肽等 16 种抗生素的培养基上生长,说明不具有这些抗生素的抗性;但可在含庐山霉素、洋红霉素、莫能菌素、春雷霉素这 4 种抗生素和乳链菌肽的培养基上生长,其抗性是由 pSR336 编码,还是由染色体编码,需将 pIR30 转化到对这些抗生素敏感的受体菌中或通过其他方法才能判定。

表 2 玫瑰红链霉菌 336 等菌株的葡萄糖异构酶活力测定

菌 株	胞 内 酶			胞 外 酶			合 计	
	酶活力 (u / ml)	蛋白含量 (mg / ml)	比活性 (u / mg)	酶活力 (u / ml)	蛋白含量 (mg / ml)	比活性 (u / mg)	总酶活力 (u / ml)	总比活性 (u / mg)
<i>S. roseoruber</i> 336 (pSR336)	25.54	7.49	3.41	24.33	8.16	2.98	49.87	3.19
<i>S. lividans</i> TK54	3.34	4.91	0.68	2.91	4.10	0.71	6.25	0.69
<i>S. lividans</i> TK54 (pIJ486)	2.01	3.41	0.59	2.36	4.14	0.57	4.37	0.58
<i>S. lividans</i> TK54 (pIR30)	2.23	3.98	0.56	2.93	6.81	0.43	5.16	0.48

表3 玫瑰红链霉菌 336 等 4 株菌在各种抗生素平板上的生长情况

抗生素	浓度 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	<i>S.roseoruber</i> 336(pSR336)	<i>S.lividans</i> TK54	<i>S.lividans</i> TK54(pIJ486)	<i>S.lividans</i> TK54(pIR30)
硫链丝菌肽					
Thiostrepton	30	-	±	+++	+
卡那霉素					
Kanamycin	25	-	±	-	-
新霉素					
Neomycin	5	-	±	-	-
链霉素					
Streptomycin	25	-	±	-	-
庆大霉素					
Gentamycin	25	-	±	±	-
氯霉素					
Chloramphenicol	25	-	+	+	±
四环素					
Tetracycline	100	-	+	-	+
土霉素					
Oxytetracycline	50	-	±	±	±
金霉素					
Aureomycin	200	±	++	++	+++
螺旋霉素					
Spiramycin	10	-	+++	++	+++
红霉素					
Erythromycin	5	-	++	±	++
氨基青霉素					
Ampicillin	50	-	+++	+++	+++
新生霉素					
Novobiocin	10	-	±	±	±
林可霉素					
Lincomycin	25	±	++	++	++
利福平					
Rifampicin	10	-	+++	++	+++
万古霉素					
Vancomycin	10	-	++	+	++
庐山霉素					
Lushanmycin	100	+++	+++	+++	+++
洋红霉素					
Carminomycin	100	+++	+++	+++	+++
莫能菌素					
Monensin	500	+++	+++	+++	+++
春雷霉素					
Kasugamycin	100	+++	+++	+++	+++
乳链菌肽					
Nisin	1000	++	+++	+++	+++
对照	0	+++	+++	+++	+++

致谢 北京大学生物系 1985 级学生李彤在我所毕业实习期间参加部分工作, 谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] 沈阳市食品发酵研究所. 轻工微生物, 1977, 1: 1~7.
- [2] 薛禹谷, 董可宁, 李敏, 等. 微生物学报, 1978, 18: 195~201.
- [3] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, England, 1985, 12~13, 61~63, 107~111, 236.
- [4] Kieser T. Plasmid, 1984, 12: 19~36.
- [5] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1982, 104~106, 133~134, 289~290.
- [6] Projan S J, Carleton S, Novick R P. Plasmid, 1983, 9: 182~190.
- [7] 胡学智, 梁天锡, 仇昌明, 等. 工业微生物, 1981, 125: 1~11.
- [8] Dische Z, Borenfreund E. J Biol Chem, 1951, 192: 583~587.
- [9] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导, 北京: 人民教育出版社, 1979, 73~74.
- [10] 还连栋, 李彤, 董可宁, 等. 生物工程学报, 1991, 7: 272~274.
- [11] word J M, Janssen R, Kieser T, *et al.* Mol Gen Genet, 1986, 203: 468~478.
- [12] Marcel T, Drocourt D, Tiraby G. Mol Gen Genet, 1987, 208: 121~126.
- [13] Drocourt D, Bejar S, Calmels T, *et al.* Nucl Acids Res, 1988, 16: 9337.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLASMID pSR336 FROM GLUCOSE ISOMERASE PRODUCING STRAIN *STREPTOMYCES ROSEORUBER* 336

Huan Liandong Dong Kening Tan Huarong Zhuang Zenghui Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Plasmid DNA has been isolated from glucose isomerase producing strain *Streptomyces roseoruber* 336. The plasmid was designated pSR336. Electron microscopic photographs demonstrated the existence of cccDNA and ocDNA. The molecular weight of pSR336 was about 6.35kb. The experimental results indicated that no relationship between plasmid DNA and glucose isomerase production was found.

Key words *Streptomyces*, Plasmid