

脂质体介导的染色体和质粒 DNA 对链霉菌的转化

徐小雪 张庭芝 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

一般认为放线菌细胞不易呈现感受态, 而且分泌较多的细胞外核酸酶, 致使放线菌的转化不易成功。虽然典型的转化存在于普通高温放线菌中^[1], 但已认为它们在进化上和大多数其他放线菌类群不同, 缺乏代表性。因之, 迄今以染色体 DNA 进行放线菌细胞转化的报道不多。以卡那链霉菌^[2]和灰色链霉菌^[3]的质粒消除株作为受体的转化是用质粒 DNA 对链霉菌感受态细胞转化取得成功的二个例子。Bibb 等^[4]以 SCP2⁺ 质粒转化天蓝色链霉菌原生质体选择具有接合致死特性的转化子获得成功, 建立了 PEG 诱导的链霉菌原生质体-质粒有效的转化系统。Isogai 等^[5]在 PEG 存在下以染色体 DNA 转化小小链霉菌营养缺陷型原生质体, 得到了 10^{-6} — 10^{-8} (Cys⁺), 10^{-7} — 10^{-8} (His⁺) 的低频转化。Markins 等^[6]报道了一个以脂质体包裹染色体 DNA 对链霉菌原生质进行高效转化的系统。Radicio 和 Chater^[7]按 Markins 的方法, 以脂质体包裹链霉菌噬菌体 DNA 企图提高转染频率, 但没有成功, 却意外地发现不包裹 DNA 的小颗粒脂质体 (表面电荷阳性) 有明显提高转染频率的作用。我们试验了脂质体包裹 DNA-原生质体转化系统对链霉菌质粒和染色体 DNA 转化的影响, 实验证明都有明显的促进作用。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株: 变铅青链霉菌 1326, 变铅青链霉菌 3041 带有 pIJ303 (Thior) 质粒, 均由 Hopwood 教授赠送。庆丰链霉菌 M15, 是庆丰霉素产生菌。庆丰链霉菌 A544 (Pro⁻Qm⁺)。

2. 培养基和溶液: 菌丝生长培养基 ME-

YE; 原生质体稳定液 P; 原生质体再生培养基 R2YE; 基本培养基 MM; 基本高渗培养基 (在 MM 培养基内增补 10% 蔗糖, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.012%, 每 100ml 培养基中补加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.68% 10ml); 转化液等^[8]; G 缓冲液^[7]; LSM^[7]。

(二) 方法

1. 原生质体的制备和再生: 基本按前报^[9]。

2. 质粒 DNA 和染色体总 DNA 的提取: 参见文献^[8]。

3. 脂质体-DNA 的制备: 卵磷脂 (L- α -Phosphatidylcholine) 和十八胺 (Stearylamine) 以 20:1 (wt/wt) 混合, 置小梨形瓶内, 在蒸发器上减压旋转 10min, 50—55℃, 除去氯仿, 形成脂膜, 然后加入变铅青链霉菌质粒 pIJ303 DNA 溶液或庆丰链霉菌染色体全 DNA 30—60μl, 再加 0.3ml G 缓冲液, 在室温下慢慢旋转 10min, 使其充分包裹, 形成大小不一的表面带有阳性电荷的脂质体-DNA 小球 (为多层泡囊即 MLV), 离心沉淀, 以 LSM 溶液洗涤, 再以 10000rpm 离心 5 min, 取下沉的脂质体-DNA。

4. 转化及转化子的检出: 将已制备好的脂质体-质粒 DNA 和脂质体-全 DNA 在 50% PEG 1000 的存在下分别对变铅青链霉菌 1326 菌株和庆丰链霉菌 A544 菌株原生质体进行转化。在含有硫链丝菌肽 50μg/ml 平板上直接检出变铅青链霉菌 1326 抗性转化子。

庆丰链霉菌缺陷型 A544 经脂质体-全 DNA 转化后, 将原生质体涂布于 R2YE 培养基平板上, 待菌落长成后, 再分别影印到 MM 平板上及

本文于 1989 年 8 月 28 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

补充了2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆丰霉素MM平板上, 分别检出原养型及原养型并抗庆丰霉素的转化子。

转化频率 = 转化子数/再生原生质体数

实 验 结 果

(一) 质粒 DNA pIJ303 对变铅青链霉菌原生质体的转化

将制备好的包裹pIJ303质粒的脂质体和变铅

青链霉菌原生质体在 50%PEG1000 (用转化液配) 存在下进行转化。转化原生质体以一定稀释度涂布於R2YE培养基平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24h 后在转化平板上加含硫链丝菌肽R2YE 3ml, 使含硫链丝菌肽最终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4—5 天, 长出的菌落即为抗硫链丝菌肽的转化子, 结果见表 1。

质粒pIJ303变铅青链霉菌原生质体的转化频

表 1 脂质体-pIJ303DNA对提高转化频率的作用

受体原生质体/ml	条 件	转化子数/ml	转化频率	提高倍数
变青链霉菌1326 1.8×10^8	游离DNApIJ303	4×10^2	2.2×10^{-6}	35.9
	脂质体-DNA	1.43×10^4	7.9×10^{-5}	
3.84×10^8	游离DNApIJ303	1.5×10^2	3.9×10^{-7}	207
	脂质体-DNA	3.1×10^4	8.1×10^{-5}	

率为 2.2×10^{-6} — 3.9×10^{-7} , 而经脂质体包裹的pIJ303质粒转化频率为 7.9×10^{-5} — 8.1×10^{-5} , 脂质体包裹DNA的转化比常规转化高出 35.9—207倍。

(二) 庆丰链霉菌M15全DNA对庆丰链霉菌缺陷型A544的转化

我们提取了庆丰链霉菌M15菌株的总 DNA (1.875mg/ml), 经脂质体介导对庆丰链霉菌

A544菌株(Pro $^{-}$ 、Qm $^{+}$)原生质体进行转化。

表 2 结果表明, A544 缺陷型菌株转化成原养型频率为 1.46×10^{-4} , 而经脂质体-DNA介导的转化频率为 1.27×10^{-3} 。A544 菌株不产庆丰霉素, 经脂质体-DNA介导转化获得产庆丰霉素的转化频率为 1.69×10^{-3} , 而对照为 7.6×10^{-5} 。从上二表结果表明, 脂质体这一技术能提高质粒和染色体DNA的转化频率。

表 2 脂质体包裹染色体DNA对提高转化频率的作用

受体原生质体/ml	转化DNA	转化子数/ml		转化频率		提高倍数	
		Pro $^{+}$	Qm $^{+}$	Pro $^{+}$	Qm $^{+}$	Pro $^{+}$	Qm $^{+}$
庆丰链霉菌 A544(Pro $^{-}$ 、Qm $^{+}$) 1.3×10^7	野生型总DNA	1.9×10^3	1.2×10^3	1.46×10^{-4}	0.92×10^{-4}	8.7	18.4
	脂质体-DNA	1.65×10^4	2.2×10^4	1.27×10^{-3}	1.69×10^{-3}		

(三) 脂质体对核酸酶降解DNA的作用

将游离的 pIJ303 DNA 及经包裹 pIJ 303 DNA脂质体悬液加 DNase酶(最终浓度为1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$)处理, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1h, 使游离的DNA被酶降解。在PEG存在下对变铅青链霉菌原生质体进行转化,

实验表明, 用脂质体介导的质粒 pIJ303 + DNase 对变铅青链霉菌原生质体的转化频率为 4.4×10^{-5} , 而游离质粒DNA经DNase作用转化频率为 0。可见, 脂质体对防止核酸酶降解 DNA 有明显的保护作用。

表 3 脂质体对核酸酶降解DNA的保护作用

受体原生质体/ml	条 件	转 化 子	转化频率
变铅青链霉菌 1326 5.9×10^7	游离 DNA ^p IJ303	1.2×10^2	2.03×10^{-6}
	游离 DNA + DNase	0	0
	脂质体-DNA	2.9×10^3	4.92×10^{-5}
	脂质体-DNA + DNase	2.0×10^3	3.39×10^{-5}

(四) 脂质体表面电荷对介导转化的影响

以各种比例配合的不同脂质(Sigma)分别做成包裹pIJ303 DNA的脂质体,其表面电荷为阳性(PC:SA:Chol:63:18:9)、阴性(PC:Dicetylphosphate:Chol:63:18:9)和中性(PC)。在PEG的存在下,分别对变铅青链霉菌1326菌株原生质体进行转化,结果表明,带中性表面电荷的脂质体DNA对变铅青链霉菌原生质体的转化频率略高于阳性和阴性。

表 4 脂质体表面电荷对转化的影响

受体原生质体/ml	条 件	转化频率
变 青 链 霉 菌 1326 1.26 × 10 ⁹	游离DNA pIJ 303	4.13 × 10 ⁻⁷
	脂质体-DNA	
	中性	2.75 × 10 ⁻⁵
	阳性	2.62 × 10 ⁻⁶
	阴性	1.77 × 10 ⁻⁵

讨 论

脂质体是一种以二性类脂为材料,在液相介质中形成的小泡囊,其主要成分是磷脂。磷脂分

散于水中能形成脂双分子层,成为一个封闭的囊状物。我们选用卵磷脂在一定比例及条件下形成脂膜,包裹DNA,人为的制造成一个类似原生质体的小球,在PEG的存在下和受体细胞原生质体进行膜的融合,结果是具有供体菌某一遗传特性的转化子出现了,其转化频率明显高于对照。高频转化的获得是和脂质体介导密切相关,包裹DNA后的脂质体成为一个封闭的囊状物,能防止核酸酶降解DNA,而脂质体的优劣又与磷脂的纯度有关^[10]。

庆丰链霉菌染色体DNA的转化频率较高是与原生质体转化系统有关,而脂质体-DNA能进一步促进转化,提高转化频率。

本试验在染色体DNA转化中出现了具有双重表型的转化子(Pro⁺, Qm⁺),据我们以前的报道^[11],庆丰霉素的生物合成受质粒SQP1控制,因此推测脯氨酸和庆丰霉素的抗性基因分别位于染色体和质粒上,又据Hotchkiss和Marmur^[12]报道,双转化子只有在同一个供体细胞提取的DNA情况下才能发生,我们初步分析二个基因间有一定的连锁关系。

参 考 文 献

- [1] Hopwood, D.A. and Merrick, M.J.: *Bacteriological Reviews*, 41(3):595-635, 1977.
- [2] 王嶽五等: 遗传学报, 7(3):270-276, 1980.
- [3] 庄增辉等: 微生物学报, 7(4):291-298, 1980.
- [4] Bibb, J.M. et al.: *Nature*, 247:398-400, 1978.
- [5] Isogai, T. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27:431-433, 1981.
- [6] Markins, J.F. and Holt, G.: *Nature*, 293:671-673, 1981.
- [7] Rodicio, M.R. and Chater, K.F.: *J. Bacteriology*, 151(3):1078-1085, 1982.
- [8] Hopwood, D.A.: *Genetic Manipulation of Streptomyces Laboratory Manual*, 1985.
- [9] 王洪洲, 郑幼霞: 遗传学报, 9(3):172-179, 1982.
- [10] 李炉杞等: 药学报, 17(3):218-221, 1982.
- [11] 郑幼霞等: 遗传学报, 7(2):111-118, 1980.
- [12] Hotchkiss, R.D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.*, 40:55, 1954.

Liposome Mediated Transformation of *Streptomyces* Chromosomal and Plasmid DNA

Xu Xiaoxue Zhang Tinglan Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

This paper reports that L- α -phosphatidylcholine and stearylamine (ratio 20:1 (wt/wt)) as lipid film encapsulated *S. lividans* plasmid pIJ303 and *S. qingfengmyceticus* chromosomal total DNA respectively and transformed *S. lividans* 1326 and *S. qingfengmyceticus* A544 protoplasts in the presence of 50% PEG1000. Transformation frequencies increased 35.91—207 times and 8.7—18.4 times higher than that of conventional transformation for liposome-pIJ303 DNA and liposome-chromosomal DNA respectively, besides, liposome encapsulation can protect DNA from the nuclease degradation. There is no significant effect of different liposome surface charge on transformation of *S. lividans* 1326 protoplast.

Key words

L- α -phosphatidylcholine ; liposome; transformation