

pNK289 衍生质粒在芽孢杆菌中的分离稳定性*

赵芳懿** 白艳玲 张秀明 高才昌***

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

摘要:报道关于一系列 pNK289 衍生质粒分离稳定性研究结果。这些起源相同的质粒在 *Bacillus subtilis* AS1.1176 中的分离稳定性存在差异,这种差异与质粒的大小和复制方式无关,而与质粒的拷贝数有一定的关系。由于不稳定质粒 pNK219 在 *B. subtilis* BD224 宿主中能稳定遗传,所以推测宿主的遗传背景可能影响质粒的分离稳定性。这些研究不仅为进一步寻找与 pNK289 衍生质粒稳定性相关的基因奠定了基础,而且为在芽孢杆菌中构建稳定的重组质粒提供了理论依据。

关键词:质粒,芽孢杆菌,分离稳定性

中图分类号:Q75 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0050-06

SEGREGATIONAL STABILITY OF THE pNK289-DERIVED PLASMIDS IN *BACILLUS SUBTILIS**

ZHAO Fang-Yi BAI Yan-Ling ZHANG Xiu-Ming GAO Cai-Chang

(Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39370406)

Project Granded by chinese National Natural Science Fund (No. 39370406)

** 现在美国明尼苏达大学攻读博士学位

*** 联系人

收稿日期:1999-10-25,修回日期:2000-01-18

Abstract: This paper reports the results of a study about the segregational stability of a series of pNK289-derived plasmids. The segregational stability in *B. subtilis* AS1. 1176 was found to be different among these same originated plasmids. The difference in segregational stability was shown not to be related to the sizes or replication patterns of the plasmids, but to have some relation to their copy numbers. As the unstable plasmid pNK219 can be maintained stably in *B. subtilis* BD 224, it can be inferred that the host inheritable background could affect the segregational stability of plasmid. These results not only have laid a foundation for finding out some genes related to the stability of pNK289-derived plasmids, but also provided theoretical basis for constructing stable recombinant plasmid in *Bacillus*.

Key words: Plasmid, *Bacillus subtilis*, Segregational stability

在应用重组 DNA 技术进行生物制品的开发研究中,面临的重大难题就是如何选用合适的受体菌和构建稳定的重组质粒,以提高基因产物的表达量及便于产品的分离与纯化。由于有些芽孢杆菌具有很好的分泌性能,所以芽孢杆菌表达系统优于大肠杆菌,已经成为重要的工业发酵菌。然而,重组质粒的不稳定现象时有发生并经常给研究工作带来很大的阻力。本课题组曾经用短小芽孢杆菌(*B. pumillus*) 隐秘质粒 pNK289(7.2kb)和含有 Cat-86(氯霉素乙酰转酶)基因的地衣芽孢杆菌质粒 pPL601 构建芽孢杆菌重组质粒,当用限制性内切酶 *EcoRI* 消化 pNK289 和 pPL601 时,pNK289 产生 1.6kb 和 5.6kb 两种酶切片段,pPL601 产生 1.3kb(含 Cat-86 基因)和 4.2kb 两个酶切片段,经过连接反应并转化枯草芽孢杆菌 AS1. 1176,应该得到预期 2.9kb 和 6.9kb 两种抗氯霉素的 pNK289 衍生质粒。但实际得到的却是分子大小及酶切图谱不同的一系列重组质粒,推测这些现象可能与质粒的稳定性有关^[1]。一般地说,质粒的不稳定包括分离不稳定和结构不稳定两个方面,前者是指质粒在受体细胞传代过程中整个质粒的丢失,后者是指质粒的结构因某种诱因而发生改变。尽管质粒稳定性的相关因素已有一些报道,例如质粒的大小、复制方式和宿主的遗传背景^[2~5]以及培养条件^[6],但到目前为止这些影响质粒稳定的因素仍然属于个别报道,多数尚未得到一致的证明或解释,不少还存在争议,有待广泛深入的研究。因此,我们选择有应用价值的芽孢杆菌质粒为研究对象,在不影响质粒稳定性的温度(37℃)及常用培养基条件下对一系列 pNK289 衍生质粒的分离稳定性进行测定,各组实验的培养条件保持一致。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验所用菌株的来源及遗传特性见表 1。

表 1 菌株来源及遗传特性

菌 株	基因型或表型	来 源
枯草芽孢杆菌 AS1. 1176	Su ^r ,aro ⁻ ,amy ⁻	中国科学院微生物研究所
枯草芽孢杆菌 BD224	trpC2,thr ⁻ 5,recE4	南开大学生命科学院
短小芽孢杆菌 289	Wild type	本 室

1.2 酶和试剂

限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶购自中国医学科学院基础医学研究所。琼脂糖和尼龙

膜均为NRL公司产品, [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP 购自北京福瑞公司, 聚乙二醇-6000 为上海化学试剂一厂产品。氯霉素(Cm)和氨苄青霉素(Amp)购自中国药品生物制品检定所。

1.3 方法

LB 培养基用于细菌培养, DM3 培养基用于芽孢杆菌原生质体转化。质粒 DNA 提取按 Birnboim 和 Doly 方法。琼脂糖凝胶电泳制备 DNA 片段, 缺口平移标记探针和分子杂交按 Maniatis 方法。原生质体转化按 Change 方法。质粒分离稳定性的测定按乔明强等人的方法^[1]。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的大小与分离稳定性

pNK289(7.2kb)是本研究组发现的短小芽孢杆菌 *B. pumilus*289 中的隐秘质粒, 带有 Cat-86 基因的质粒 pPL601(5.5kb)来自地衣芽孢杆菌。由这两种质粒构建的重组质粒均带有 Cat-86 基因。挑选其中 9 种 pNK289 衍生质粒(2.4kb~6.6kb), 以枯草芽孢杆菌 AS1.1176 为宿主, 经过 25 代、50 代、75 代和 100 代培养, 分别测定这些质粒的分离稳定性。测定的结果列于表 2 中, 结果表明这些质粒的稳定性存在差别。质粒在经过 100 代培养后, 大多数的保持率超过 90%, 只有 pNK220(5.8kb)、pNK223(4.0kb)和 pNK219(2.4kb)分离不稳定, 培养 100 代时保持率分别为 0、1%和 0, 其中 pNK219 最不稳定, 在培养 25 代时只有 15%的保持率。根据以上结果可以确定 pNK289 衍生质粒的分离稳定性与其分子大小无关。然而, 我们的测定结果与 1993 年 Wojcik 等人的相关报道不一致。他们研究 4 个 pBCH 和两个 pAEC 杂交质粒在枯草杆菌中的稳定性并指出重组质粒的大小与其稳定水平有明显的关系, 那些较大的衍生质粒表现出分离高度不稳定^[2]。不过, 1997 年 Hoflack 等人 and 1993 年 Ceglowski 等人相继研究证明了较大的质粒 pG13(11356bp)和 pBT233 (9.0kb)在枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌中分离是稳定的。由此说明, 质粒的稳定性与其大小并不存在简单的直接关系。由于不同研究者所研究的质粒结构迥然不同, 而且所用受体菌的遗传背景存在差异, 甚至有报道培养条件等都有可能影响质粒的分离稳定性^[7], 所以, 在质粒的稳定性研究中, 质粒的分子大小只是一个次要参数, 而研究不同稳定性质粒的结构差异可能更有价值。

表 2 pNK289 衍生质粒的分子大小和分离稳定

质粒	分子大小 (kb)	在枯草芽孢杆菌 AS1.1176 中的保持率(%)			
		25 代	50 代	75 代	100 代
pNK201	6.6	98	97	97	90
pNK231	6.5	100	99	98	98
pNK220	5.8	95	84	48	0
pNK216	4.5	100	100	99	99
pNK207	4.1	100	100	100	99
pNK223	4.0	45	5	1	1
pNK218	3.2	100	99	97	96
pNK402	3.0	100	100	97	96
pNK219	2.4	15	5	4	0

2.2 质粒的复制模式与分离稳定性

芽孢杆菌中质粒的复制方式与其稳定性的关系始终是引起重视的问题。八十年代末和九十年代初的一些文献曾报道,芽孢杆菌中较小的质粒多以滚环方式复制,较大的质粒采取 θ 型方式复制,滚环复制是造成质粒结构和分离不稳定的重要原因。但是,最近的有关研究结果对此提出了质疑。为了确定质粒的复制模式与分离稳定性的关系,本文分别选取在枯草芽孢杆菌 AS1. 1176 中分离稳定的质粒 pNK216、pNK402、pNK289 和分离不稳定的质粒 pNK219,提取含上述质粒的菌体全部 DNA 进行电泳,然后,将非变性和变性 DNA 转入尼龙膜上,以 pNK216 的 DNA 为探针进行 Southern 杂交,确定复制方式。因在非变性条件下,只有 ssDNA 才能转移到尼龙膜上,所以,如果在此条件下

有杂交结果,则可以证明质粒中含有 ssDNA 并可确定为滚环复制。相反,不能杂交的质粒以 θ 方式复制。从图 1 和图 2 中可以看出在 DNA 变性条件下 4 种质粒均能与探针杂交,但在非变性条件下 pNK219 和 pNK402 能杂交,从而可以证明这两种分离稳定性不同的质粒均以滚环方式复制,pNK289 衍生质粒的滚环复制与其分离不稳定性无关。

一般认为不对称滚环复制所产生的单链 DNA 是短的正向重复序列,所以是造成质粒结构和分离不稳定的重要因素,而以 θ 型复制的质粒比较稳定^[8,9]。不过,也有一些相反的研究结果,例如 Hoflack 报道一个 11356bp 质粒 pG13 家族在苏云金杆菌中以滚环方式复制,这些质粒无论在枯草杆菌还是在苏云金杆菌中分离都是稳定的^[3]。Meijer 等人研究了带有一个 55kb 大质粒 pLS20 全部自动复制信息的衍生小质粒的稳定性与复制方式的关系,结果显示这个不能稳定保持的微小质粒以 θ 型方式复制^[10]。这说明,质粒的分离稳定性与滚环复制或 θ 型复制的关系比较复杂,质粒的稳定性可能是多种因素相互作用的结果,复制方式的影响还需要在不同的研究中进一步得到验证。

2.3 拷贝数与分离稳定性

挑选稳定性质粒 pNK289 和 pNK218 及不稳定质粒 pNK223 和 pNK219,分别测定这些质粒的拷贝数。DNA 点样量在 15~700ng 范围内,使荧光强度与 DNA 的量呈线性关系,按染

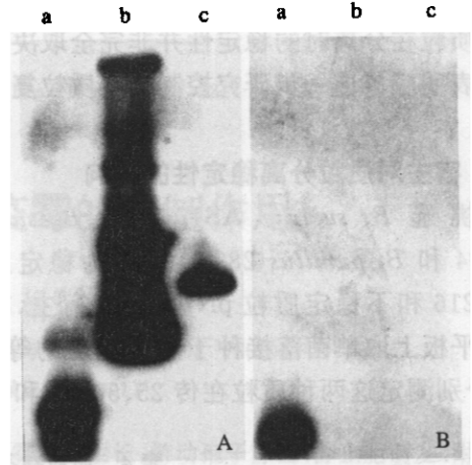


图 1 质粒 pNK219(a)、pNK216(b)和 pNK289(c)的 Southern 杂交图

pNK219(a)、pNK216(b)和 pNK289(c)在 DNA 变性(1A)和非变性(1B)条件下与³²P 标记的 pNK216 探针的 Southern 杂交

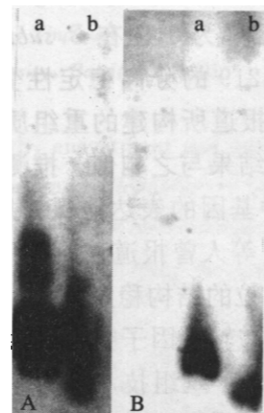


图 2 质粒 pNK402 和 pNK219 的 Southern 杂交图
质粒 pNK402(a)和 pNK219(b)在 DNA 变性(2A)和非变性(2B)条件下与³²P 标记的 pNK216 探针的 Southern 杂交

色体与质粒峰面积计算质粒的拷贝数。从表3结果可知稳定与不稳定质粒的拷贝数相差超过一倍。这一结果显示 pNK289 衍生质粒的分离稳定性与其拷贝数可能有一定的关系。不过, Ceglowski 等所研究的 pSM19035 衍生质粒(9.0kb)拷贝数低,但在枯草杆菌中能稳定遗传^[9]。这说明质粒在分离时的稳定性并非完全取决于它的拷贝数,其所在宿主的遗传背景不可忽视,同时也表明应该进一步研究控制这些质粒复制相关的蛋白质及其基因的特点与质粒稳定性的关系。

2.4 宿主对质粒分离稳定性的影响

挑选 *B. subtilis* AS1. 1176、*B. subtilis* BD224 和 *B. pumilus* 289 分别作为稳定质粒 pNK216 和不稳定质粒 pNK219 的宿主,在选择性平板上取单菌落接种于同批配制的等量培养基中,同时培养和传代,以保证培养条件相同,分别测定这两种质粒在传 25、50、75 和 100 代时的保持率,结果见表 4 所列。

表 3 质粒的拷贝数

质粒	pNK289	pNK218	pNK223	pNK219
拷贝数	20	152	8	<5

表 4 质粒在不同宿主中的分离稳定性

宿 主	质 粒	保持率(%)			
		25 代	50 代	75 代	100 代
<i>B. subtilis</i> AS1. 1176	pNK216	100	100	98	98
	pNK219	15	5	4	0
<i>B. pumilus</i> 289	pNK216	100	100	100	100
	pNK219	6	3	0	0
<i>B. subtilis</i> BD224	pNK216	100	100	100	100
	pNK219	100	100	100	100

pNK216 在 3 种宿主中的稳定性没有差异,传 100 代的稳定值均大于 98%。pNK219 在 *B. subtilis* AS1. 1176 和 *B. pumilus* 289 中很不稳定,传 25 代的稳定值分别只有 15%和 6%,传 100 代时均已降为 0,但在 *B. subtilis* BD224 中却相当稳定,传 100 代的稳定值为 100%。这说明质粒 pNK219 的分离稳定性受宿主遗传背景的影响,*B. subtilis* BD224 是 recE4 菌种, Wojcik 等人曾报道所构建的重组质粒 pBE 在 *B. subtilis* rec⁺中比 *B. subtilis* recE4 中保持性差^[2],本文研究结果与之相似。推测宿主 *B. subtilis* recE4 中可能存在抑制引起质粒不稳定因素的基因,这种基因的表达能保持质粒的稳定性。最近相关的研究报道也证明了上述推论,1996 年 Meima 等人曾报道,枯草芽孢杆菌中的一种同源重组酶 AddAB(ATP-dependent exonuclease)是质粒的结构稳定物质,AddAB 酶基因的缺失明显地减少质粒的结构稳定性^[4]。高拷贝的 pUC19 在转录因子突变的大肠杆菌(*E. coli* rho026)中是不稳定^[5]。这些研究结果充分说明,在利用 DNA 重组技术进行生物制品的开发研究及生产中既要重视构建稳定性高的重组质粒,同时也要重视对合适宿主的筛选,因为重组质粒的稳定性和拷贝数直接影响目的产品的产量。

参 考 文 献

[1] 乔明强,蒙宝立,蒋如璋,等. 遗传学报,1989,16(5):389~398.
 [2] Wojcik K, Wieckiewicz J, Kuczma M, et al. Acta Microbiol Pol, 1993, 42(2): 127~136.
 [3] Hofflack L, Seurinck J, Mahillon J. J Bacteriol, 1997, 179(16): 5000~5008.
 [4] Meima R, Venema G, Bron S. Plasmid, 1996, 35(1): 14~30.

- [5] Sozhamannan S, Morris J G Jr, Stitt B L. *Plasmid*, 1999, **41**(1):63~69.
- [6] Craynest M, Barbotin J N, Truffaut N, *et al.* *Ann N Y Acad Sci*. 1996, **782**:311~322.
- [7] Gupta R, Sharma P, Vyas V V. *J Biotechnol*. 1995, **41**(1):29~37.
- [8] Skam L, Venema G, Bron S. *Plasmid*. 1992, **28**:70~79.
- [9] Cegliwski P, Boitsiv A, Chai S. *Gene*. 1993, **136**:1~12.
- [10] Meijer W J, de Boer A J, van Tongeren S, *et al.* *Nucleic Acids Res*. 1995, **23**(16):3214~3223.