

细菌质粒的消除*

娄 恺^{1,2} 班 睿¹ 赵学明¹

(天津大学化工学院 天津 300072)¹ (新疆农科院微生物研究所 乌鲁木齐 830000)²

摘要: 利用化学消除剂或改变生长条件可以消除细菌中的质粒。除宿主菌的特性及其所含质粒分子量大小之外, 消除率还与消除剂浓度、作用时间有关。嵌合染料适用于消除大肠杆菌中的质粒。十二烷基硫酸钠对具有性纤毛的细菌作用效果较好。适当提高培养温度可消除一些细菌中的质粒, 胸腺嘧啶限量法仅适用于其营养缺陷型菌株的质粒消除。利用原生质体的形成与再生及反复冻融菌体均可消除细菌中的质粒。

关键词: 质粒, 细菌, 消除

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0099-05

PLASMID CURING IN BACTERIA

LOU Kai^{1,2} BAN Rui¹ ZHAO Xue-Ming¹

(School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)¹

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agriculture, Wulumuqi 830000)²

Abstract: Plasmids in bacteria can be cured by using chemical curing agents or changing growth conditions. Besides the character of host strains and the molecular weight of the plasmid, the efficiency of curing was also related to the concentrations of curing agents and the time of treatment. Intercalating dyes were suitable for curing the plasmids in *E. coli* while sodium dodecyl sulfate can gain good results in the bacteria which have sex pili on their cell surface. Elevated growth temperature has been successfully used in curing plasmids of some strains. Thymine limitation can only be used to cure thymine-requiring auxotrophs. The elimination of plasmids in certain bacteria can occur during the formation and regeneration of protoplast and repeatedly freezing and thawing of cells.

Key words: Plasmids, Bacteria, Curing

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20036010)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20036010)

收稿日期: 2001-05-31, 修回日期: 2001-06-21

质粒是共价闭合环状的小型 DNA 分子, 作为独立于染色体外能够自主复制的遗传因子, 在细菌细胞内普遍存在。细菌的某些表型特征, 包括抗性、代谢能力、致病性、共生现象、接合转移等往往由质粒控制^[1]。对质粒进行遗传学研究时, 常希望得到其消除质粒的衍生菌株, 以便两者比较观察质粒的遗传功能。某些质粒可自发的从细胞中丢失, 但大多数质粒在细胞内很稳定。要想获得消除质粒的菌株, 需要使用合适的物理或化学方法干扰质粒复制、或降低质粒的稳定性, 人为地提高质粒丢失的频率^[2], 以达到质粒消除的目的。由于结构及生理上的独特性, 不同菌株的质粒消除机制各不相同, 到目前为止, 尚没有普遍适用的质粒消除方法。但不同研究者使用不同的方法, 对某些具体菌株或质粒的消除已获得满意的结果, 本文将对常见质粒消除方法的适用范围及效果作一简要评述。

1 利用消除剂对细菌质粒的消除

1.1 嵌合染料 (Intercalating dyes) 嵌合染料包括吡啶黄 (Acriflavine)、吡啶橙 (Acridine orange, AO)、溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB)、喹啉因 (Quinacrine) 等可用作质粒消除剂 (Curing agent), 其作用机理是选择性地抑制质粒的复制。Singh M 等^[3]用 AO 消除 *E. coli* K12 J53 中的质粒 R27、RP4、R1 及 pBR322, 每种质粒的消除率均不同, 并随着 AO 浓度的增加而提高。对于质粒 R27, AO 最有效浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$, R1、pBR322 均为 200 $\mu\text{g/mL}$, RP4 为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。质粒 R27 最高消除率为 41.2%, R1 为 35%, pBR322 为 16.5%, RP4 为 10%。当 *E. coli* K12 J53 处于指数生长期时, AO 作用效果最佳, 细胞处于其它生长阶段或 AO 过量, 质粒消除率极低或根本无效。除吡啶类物质外, EB 也被广泛用于细菌质粒的消除。Bouanchaud 等^[4]用 EB 以较高的频率消除了肠细菌 (*Enterobacteria*) 和葡萄球菌 (*Staphylococci*) 中带有抗生素抗性的质粒, 实验结果的可重复性也优于吡啶类物质。除上述菌株之外, 嵌合染料还能消除真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 中的各种质粒。但是某些根瘤菌 (*Rhizobium* spp.) 及农杆菌 (*Agrobacterium* spp.) 中的大质粒 (>370kb) 则难以用嵌合染料消除。

1.2 香豆霉素 (Coumestrol) 及新生霉素 (Novobiocin) 香豆霉素及新生霉素是 DNA 解旋酶 (DNA gyrase) 的抑制剂。DNA 解旋酶能使完成了复制的两个子代环状双链 DNA 互相分开, 当它被抑制时, 质粒 DNA 复制中间物大量积累, 不能产生子代 DNA。低浓度的香豆霉素就可有效地消除 *E. coli* K12 中的质粒 pBR322、pMB9^[5]。

此外用浓度为 1~7 $\mu\text{g/mL}$ 的香豆霉素还可消除 *E. coli* K12C600 中的 ColEI 质粒, 当香豆霉素浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 效果最佳并且细胞存活率最高。

1.3 利福平 (Rifampicin) 利福平能直接与细胞中的 RNA 聚合酶结合并抑制其活性。Johnston 等^[6]研究了用利福平消除金黄色葡萄球菌 (*Staphylococci aureus*) 中的质粒 ComI, ComI 编码青霉素抗性、镉离子抗性、红霉素抗性基因。当初始细胞量为 10⁵/mL, 利福平浓度为 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 时, 质粒消除效果最佳, 对青霉素敏感的菌落同时也失去了对镉离子及红霉素的抗性, 表明整个 ComI 质粒已被消除。该作者还做出推论, 即由于利福平对细菌生长及质粒维持 (Plasmid maintenance) 的作用不同, *S. aureus* 中质粒的复制及分离也许与某个专一 RNA 聚合酶有关, 不久此推论即得到其他人的证实^[7]。如果没有这种

专一性的 RNA 聚合酶存在,那么对利福平有抗性的细菌,不宜用利福平作为质粒消除剂。

1.4 丝裂霉素 C (Mitomycin C) 丝裂霉素 C 能抑制菌体的代谢活动,其自身被还原为相应的氢醌 (hydroquinone) 并进一步生成有活性的、能对嘌呤碱基进行亲核攻击的中间反应物,使 DNA 双链产生交联,阻止了 RNA 的转录。Rheinwald 等^[8]用丝裂霉素 C 成功地消除了恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 中编码氧化蒽酮 (Camphor, CAM) 基因的质粒。用含有亚致死浓度丝裂霉素 C 的 LB 培养液培养细胞 48h,分离单菌落,将其转移至基本培养基或含 D-蒽酮平板,鉴定质粒消除的菌落,结果表明质粒的消除率达 23%。

丝裂霉素 C 既是 DNA 合成的阻遏物又是诱变剂,其有效浓度和致死浓度随菌株的不同而有很大变化,原因之一就在于细胞膜对其通透性的差异。因此,在使用丝裂霉素 C 时,同时使用表面活性剂改变膜的通透性,能改善丝裂霉素 C 的使用效果。在假单胞菌属的质粒消除中使用丝裂霉素 C 的报道较多,很少有消除其它菌属质粒的报道。另外丝裂霉素 C 的价格昂贵,对其应用有所限制。

1.5 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 细菌染色体 DNA 与质粒 DNA 的一个共同特点是它们均附着于细胞膜上进行复制。SDS 是一种离子型表面活性剂,在合适的浓度下它能溶解膜蛋白,破坏细胞膜,SDS 可改变质粒在细胞膜上的结合位点,使其不能精确复制,并最终导致质粒不能正确地分配到子细胞中,从而达到消除质粒的目的。SDS 另一个可能的作用机理是:当它进入细胞质后,使某些与质粒复制及分配有关的蛋白部分或完全失活,造成质粒的丢失。肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 中大的内生质粒 (96kb) 编码异柠檬酸脱氢酶,使用新生霉素、EB、丝裂霉素 C 等难以将它消除^[9]。当用 4% (w/v) 的 SDS 作为质粒消除剂,处理浓度为 1.28×10^8 mL 的菌细胞悬液,可达到 6.25×10^{-4} 的质粒消除频率,此时细胞的致死率为 94.7%。除此之外,用 0.002% (w/v) SDS 还能极有效地消除 *S. aureus* 中编码青霉素酶的质粒,当接种量为 10^3 mL 时,质粒消除率为 96.1% ~ 100%,相比之下,EB 的消除率为 26%,提高 *S. aureus* 的生长温度可获得 16.7% 的质粒消除率。对某些接合质粒的消除,SDS 法比较有效。

2 控制菌体的生长条件或生理状态对质粒的消除

2.1 提高生长温度 将实验菌株在高于其正常或最适生长温度 $5^\circ\text{C} \sim 7^\circ\text{C}$ 的条件下培养,并在相同温度下连续转接培养数次,得到的指数生长期培养物,系列稀释涂平板,根据单菌落的表型特征,验证其质粒存在与否。Morrison NA 等^[9]将带有编码固氮酶质粒的快生型根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) 的培养温度从 30°C 提高至 37°C 后,质粒的消除率约为 23%。根瘤菌在正常温度下生长时,质粒的复制与菌细胞的分裂同步;当温度升至 37°C 后,质粒的复制受到抑制,随着培养时间的延长及传代次数的增加,部分子代菌体中的质粒就被消除了。

另外某些细菌中的内生质粒在高温下结构不稳定,也可导致质粒的丢失。Ghosh S 等^[11]为了确定酸杆菌 (*Acidocella* sp.) Gs19 中,大小分别为 26.7kb、36kb、77kb 的内生质粒是否编码对 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 的抗性,首先用 AO ($10 \sim 400 \mu\text{g/mL}$) 及吡啶黄 ($10 \sim 700 \mu\text{g/mL}$) 消除质粒,结果表明 Gs19 菌对这两种物质均不敏感,内生质粒一直稳定存

在。将培养温度从 30℃ 升至 42℃, 并经过两轮转接培养后, 3 种质粒的构型均发生了变化, 又经过 10 轮转接培养, 3 种质粒被完全消除。

提高培养温度消除质粒是一种物理处理方法, 与化学消除剂相比其最大优点是能均匀地作用于全部被处理细胞, 在细胞内外无落差, 能简单地调节作用强度, 不存在滞后效应。除上述菌株与质粒外, 提高培养温度还能有效地消除 *E. coli* 与 *S. aureus* 中的 F 质粒及四环素抗性质粒。

2.2 原生质体再生法 Novick R 等^[12]报道了在 *S. aureus* 的原生质体形成与细胞壁再生过程中, 质粒的消除率可达到 80%。其作用机理据推断是: 细胞失去细胞壁后, 质粒的分配机制同时遭到破坏, 导致质粒丢失。原生质体再生法特别适用于其它质粒消除方法难以奏效, 并且很容易得到原生质体的革兰氏阳性细菌的质粒消除。

2.3 质粒不相容消除法 根据质粒的不相容性这一特点, 可以用来进行质粒的消除。首先将某个与宿主菌质粒不相容的质粒引入宿主中, 然后选择出带有新质粒表型特征的菌株, 再用合适的方法消除新的质粒, 得到的菌株即为质粒消除菌株。此法关键在于选择合适的相容性质粒, 这种质粒应具有明显的表型特征, 易于通过转化等方法引入宿主菌中, 也易于从宿主菌中消除^[2], 最好为温度敏感型或其它条件不稳定型质粒。当某种菌株的质粒消除率很低, 且质粒本身的表型特征不明显, 质粒消除菌株难于分离和选择时, 采用质粒不相容消除法来获得质粒消除菌株, 有一定实用价值。

2.4 胸腺嘧啶限量法 此法仅适用于胸腺嘧啶营养缺陷型菌株, 其机理在于胸腺嘧啶限量限制了质粒的复制而染色体不受影响, 致使子代细胞中的质粒丢失。将受试菌株接入含有胸腺嘧啶 (50 μg/mL) 的基本培养基中, 过夜培养, 再将其转接至胸腺嘧啶浓度梯度为 0 ~ 25 μg/mL 的相同基本培养基中过夜培养, 然后系列稀释于胸腺嘧啶补充培养基平板, 即可检测单菌落的质粒是否存在。*E. coli* k12 中的 R1818 抗性质粒用吡啶类物质和 EB 难以消除, 当将其胸腺嘧啶营养缺陷型菌株在胸腺嘧啶限量的条件下培养时, 就成功地消除了该抗性质粒。

2.5 冻融法 在浓度为 $2 \sim 4 \times 10^9$ /mL 的受试菌株细胞悬液中加入 5% 的甘油, 置于 -20℃ 彻底冷冻后, 然后在 37℃ 下完全融化, 再于 -20℃ 速冻, 然后再融化, 如此重复 30 ~ 35 次后, 将其置于正常生长温度下过夜培养, 分离出单菌落, 即可筛选质粒消除菌株。某些牛肾孟炎棒杆菌 (*Cornegibacterium renale*) 中含有一些分子量不同的内生质粒, 用 EB (0 ~ 50 μg/mL), AO (0 ~ 100 μg/mL), 利福平 (0 ~ 1 μg/mL), 提高生长温度 (35℃ ~ 45℃) 及原生质再生等方法均不能使之消除^[14], 采用冻融法后, 这些不同的质粒发生重组, 形成两个较大质粒, 再用质粒不相容法最终使之消除。

3 小结

消除质粒是确定细胞某一表型特征是否由质粒控制的一个重要方法, 在质粒的生物学研究中具有重要作用。有关质粒消除方法的实践主要集中于 *E. coli*、*S. aureus*、*Pseudomonads* sp., 本文所列举的常见方法仅对某些菌株中的某些质粒有效, 即在不同的菌株之间, 或在不同的质粒之间, 某种质粒消除方法的有效性存在着极大的差异。因此, 当着手进行某种菌株质粒的消除时, 方法的选择应保持灵活性, 不能拘泥于某一种方法, 尽管它在其它菌株质粒消除上十分有效; 单一方法无效时, 应尝试化学消除剂与改变菌体生长条件这两者之间的组合^[15], 以获得最佳效果; 在构建基因工程菌

时, 为了获得宿主细胞而进行的质粒消除, 首选方法应该是改变菌体的生长条件或生理状态, 避免使用某些化学消除剂, 因为许多消除剂本身也是诱变剂, 容易引起宿主菌突变, 增加后续工作的复杂性。

参考文献

- [1] 吴乃虎编著. 基因工程原理(上册)第二版. 北京: 科学出版社, 1998. 176 ~ 179.
- [2] Caro L, Churchward G, Chandler M. *Methods in Microbiology*, 1984, 17: 97 ~ 122.
- [3] Singh M, Yadava J N S. *Indian J Exp Biol*, 1988, 26: 668 ~ 670.
- [4] Bouanchaud D H, Scauzzi M R, Chabert YA. *J Gen Microbiol*, 1969, 54: 417 ~ 425.
- [5] Danilevskaya O N, Gragerov A I. *Mol Gen Genet*, 1980, 178: 233 ~ 235.
- [6] Johnston J H, Richmond M H. *J Gen Microbiol*, 1970, 60: 137 ~ 139.
- [7] Bazzicaiupo P, Tocchini G P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 298 ~ 300.
- [8] Rhein Wald J G, Chakrabarty A M, Gunsalus I C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 885 ~ 889.
- [9] Mansi E M, Karen J, Craig A I. *Res Microbiol*, 2000, 151: 201 ~ 208.
- [10] Morrison N A, Hau C Y, Trinick M J. *J Bacteriol*, 1983, 153: 527 ~ 531.
- [11] Ghosh S, Mahapatra N R, Ramamurthy T, *et al.* *FEMS microbial Lett*, 2000, 183: 271 ~ 274.
- [12] Novick R, Sanchez C, Gruss A. *Plasmid*, 1980, 3: 348 ~ 358.
- [13] Pinney R J, Smith J T. *Genet Res Camb*, 1971, 18: 173 ~ 177.
- [14] Nath N, Deb J K. *Biotechnol Lett*, 1997, 19: 163 ~ 166.
- [15] 李 林, 杨 超, 刘子锋, 等. *微生物学报*, 2000, 40: 85 ~ 90.