

# 酶切枯草芽孢杆菌染色体 DNA 的转化

门大鹏 郭三堆 贾士芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

李 秀 玉

(北京农业大学植保系微生物遗传教研组, 北京)

对枯草芽孢杆菌的转化已经进行了相当深入的研究。人们对菌株 168 进行诱变处理, 得到了许多衍生菌。我们收集了一些衍生菌, 用它们作为受体菌株, 来比较它们之间的转化活性。观察限制性核酸内切酶对枯草芽孢杆菌 DNA 处理后转化遗传性状的效应已有报道<sup>[1,2]</sup>。进行这方面的观察, 对于克隆基因(无性繁殖基因)时选择合适的核酸内切酶及其控制条件, 都是重要的。现将试验结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

1. 菌株 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*): 168 (trpC<sub>2</sub>); 103 (trp, lys, amy), 由本组用紫外线诱变得到; QB935 (trpC<sub>2</sub> lys1aroD), 1089 (trpC<sub>2</sub> leu 9 amy), 系法国巴黎大学赠送。BR 151 (trpC<sub>2</sub> metB10 lys1), SR22 (trp<sup>+</sup> spo<sup>-</sup>), SR22I<sup>-</sup> (trpC<sub>2</sub> spo<sup>-</sup>), GSY 1027 (trp met), 系美国亚利桑那大学 J. Spizizen 教授赠送。

2. 限制性核酸内切酶 Eco RI 及 Bgl II 系本所工厂制备。

3. 转化所用的培养基及其条件 按 Anagnostopoulos 及 Spizizen 报道的方法<sup>[3]</sup>。Eco RI 酶切 DNA 的条件, 如前文报道<sup>[4]</sup>。Bgl II 按 Miles Biochemicals 公司 1979—80 年产品目录中介绍的条件。

## 结 果 和 讨 论

### 一、受体菌株的转化活性比较

用菌株 168 的 DNA 作为供体, 对不同的受体菌株进行转化。从表 1 的结果来看, 以 BR

151 和 GSY 1027 的转化活性为高。相同的 DNA 转化 QB 935 的不同遗传标记, 其转化活性是有差异的。

表1 菌株168 DNA 对不同受体菌转化活性的比较

供体 DNA	受体菌株	转化性状	转化子数/ DNA(μg)
168	103	lys	$1.6 \times 10^3$
	QB935	lys1	$2.9 \times 10^3$
	QB935	aroD	$1.4 \times 10^3$
	BR151	metB lo	$2.2 \times 10^4$
	GSY1027	met	$2.2 \times 10^4$

lys: 赖氨酸 aro: 芳香族氨基酸 met: 蛋氨酸

用菌株 SR 22 的 DNA 对不同的受体菌株转化色氨酸 C<sub>2</sub> 基因, 转化的结果如表 2。其中以 BR 151 的转化活性为高。该菌是目前研究枯草芽孢杆菌的分子遗传学中常用的受体菌株之一。

表2 菌株 SR22DNA 对不同受体菌株转化色氨酸 C<sub>2</sub> 基因的比较

供体 DNA	受体菌	转化子数/微克 DNA
SR22	168	538
	1089	681
	SR22I <sup>-</sup>	568
	BR151	4750

在我们的试验中, 用 168 DNA 作为供体时, 提取的 DNA 溶液中, 总是难免有少量芽孢污染。而菌株 SR 22 是不产生芽孢的, 提取的 DNA 溶液中一般都没有细胞污染。该菌株的色氨酸基因的表型又是正的。所以菌株 SR 22 是用于研究转化的良好供体菌株。

表 3 EcoRI 酶切菌株 168 DNA 对氨基酸等标记的转化活性

受体菌及 转化标记	酶切时间(min) 转化子数 /DNA (μg)	0	30	60	90	120
103 (lys)		164	204	195	21	13
QB935(lys)		385	174	135	17	3
103 (amy)		20	1.5	0	0.5	1.5
QB935(aroD)		1355	370	365	22	83

amy: 淀粉酶

二、核酸内切酶酶切 DNA 后对氨基酸标记转化的影响

在进行基因克隆的工作中，首先要用合适的核酸内切酶对供体 DNA 进行酶切，然后和用相同的核酸内切酶酶切的质粒相联，转入受体菌株。除了已知的基因 DNA 序列外，对无性繁殖未知 DNA 序列的基因选用合适的核酸内切酶以保持其转化活性是很重要的。我们用 Eco RI 和 Bgl II 对供体 DNA 进行了酶切。

1. Eco RI: Eco RI 酶切供体菌株 168DNA，1 μl 核酸内切酶作用 1 μg DNA，分别酶切 0、30、60、90、和 120min。从表 3 的结果来看，菌株 168 DNA 经 Eco RI 酶切后，不同的遗传标记转化活性是不同的。但是转化活性都下降。

这表明赖氨酸、芳香族氨基酸和淀粉酶的基因 DNA 序列中，都有 Eco RI 的识别序列（—G<sup>+</sup>AATTC—），被 Eco RI 酶切后降低了其转化活性。在不同的基因 DNA 序列中其碱基对的排列是不相同的，Eco RI 酶切 DNA 后对不同的基因转化活性的影响也就不同了。所以，在无性繁殖基因选择核酸内切酶时，应选择对该基因 DNA 序列无识别位点或对其转化活性影响较小的为好。Eco RI 酶切 DNA 90 min 或更长，其转化活性下降更大。因此，若在挑选核酸内切酶的种类受到限制时，酶切 DNA 时应注意控制时间。

表 3 中转化遗传标记活性下降最大的是淀粉酶基因，可能该基因中 Eco RI 识别的碱基序

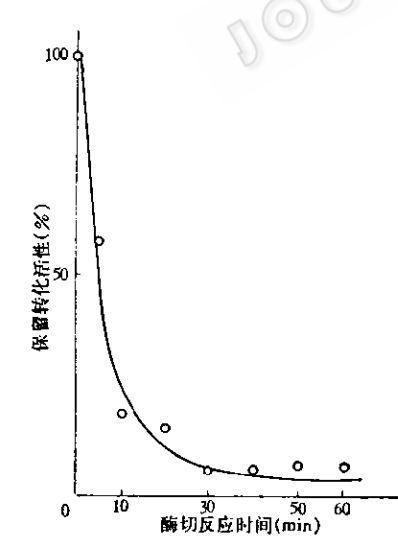


图 1 Eco RI 酶切 SR22 DNA 不同时间后，对 BR151 菌株赖氨酸标记的保留转化活性

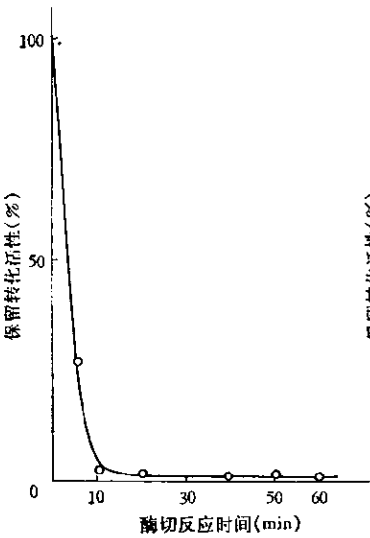


图 2 EcoRI 酶切 SR22 DNA 不同时间后，对 BR151 菌株蛋氨酸标记的保留转化活性

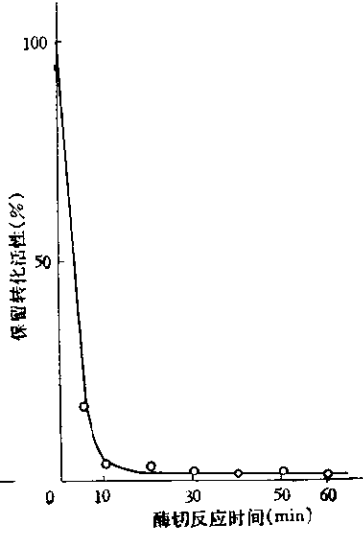


图 3 EcoRI 酶切 SR22 DNA 不同时间后，对 1089 菌株亮氨酸标记的保留转化活性

列位点多, 把该基因切成较多的无转化活性的小片断。其次, 淀粉酶转化子的选择是以选择赖氨酸转化子时进行的。而淀粉酶基因和赖氨酸基因在染色体上的位点并不靠近, 在用 EcoRI 酶切 DNA 后, 两个基因同时在一个片断上的机会是相当低的, 甚至是不可能的。若这两个基因的片断同时转入同一个受体细胞中去, 其机会也是相当低的。所以, 不酶切和酶切后的淀粉酶转化子都很少。

若 1  $\mu$ l SR22 DNA, 用 1.5  $\mu$ l Eco RI 酶切, 分别作用 0、5、10、20、30、40、50、和 60 min, 然后分别转化受体菌株 BR 151 和 1089 的赖氨

酸、蛋氨酸和亮氨酸标记, 结果如图 1, 2 和 3。由于 Eco RI 的用量加大, 酶切 5min 后, DNA 对赖氨酸、蛋氨酸和亮氨酸的转化活性就下降很大。酶切 30min 或再延长时间, DNA 的保留转化活性趋于平稳。图 1、2 和 3 的结果与表 3 的结果比较, 前者转化下降较后者为快。这也表明与 Eco RI 的用量有关。

## 2. Bgl II

取 0、20、40、60、80 和 100  $\mu$ l 核酸内切酶 Bgl II, 分别酶切 20  $\mu$ g 的菌株 SR22 DNA, 37°C 酶切 30min。酶切后的 DNA 转化受体菌株 BR 151, 选择赖氨酸和蛋氨酸基因的转化

表 4 Bgl II 酶切菌株 SR22DNA 对氨基酸的转化活性

转 化 遗 传 标 记	核酸内切酶( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
	转化子数/DNA ( $\mu$ g)						
lys		686	415	512	197	201	92
met		1194	1154	278	91	240	139

子。表 4 的结果指出, 用不同量的核酸内切酶在相同的时间内酶切相同量的同一种 DNA 时, 赖氨酸和蛋氨酸标记的保留转化活性相差很大。这可能是核酸内切酶酶切 DNA 时, 除了酶切基因内的 DNA 识别序列(—A<sup>+</sup>GATCT—)外, 还可以切开这些基因以外的 DNA 识别序列, 使原来已被酶切的基因片断变得更小。在 DNA 转化过程中, DNA 片断的大小(分子量大小)与转化活性有关。因此, 在上述条件下, 核酸内切酶的用量越大, 势必把 DNA 片断切得越小, 转化活性随之下降很大。在加大 EcoRI 用量的试验中, 可能也有类似的作用。所以, 若

使用可以酶切某一特定基因 DNA 序列的核酸内切酶时, 应注意酶的用量, 以保持该基因的转化活性。

## 参 考 文 献

- [1] Harris-Warriek, R. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 2207—2211, 1975.
- [2] Dean, D. H. et al.: In “*Microbiology—1976*” (Ed. by Schlessinger, D.), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1976, pp. 380—387.
- [3] Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J.: *J. Bacteriol.* 81: 741—746, 1961.
- [4] 门大鹏等: 微生物学报, 21(2): 204—207, 1981.