

大肠杆菌粘端质粒 pJRD215 在兼性自养多能硫杆菌中的带动转移*

金松谟 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

摘要 通过接合将广泛寄主范围的转移性 IncP 质粒 RP₄、R68.45、RP₁::Tn501 和 pUB307 从大肠杆菌转移到了兼性自养多能硫杆菌中, 质粒上的 Ap、Tc 和 Km 抗性基因在多能硫杆菌中均得到表达。IncQ 类群的粘端质粒 pJRD215 在转移性 IncP 质粒的带动下, 从大肠杆菌转移到了多能硫杆菌, 转移频率为 8.9×10^{-5} —— 8.1×10^{-4} , 并对 pJRD215 在多能硫杆菌中的稳定性进行了测定。本文首次将非转移性质粒载体引入到兼性自养多能硫杆菌中。

关键词 兼性自养多能硫杆菌; 带动转移; 粘端质粒载体

多能硫杆菌 (*Thiobacillus versutus*) 是兼性自养化能无机营养细菌, 它既能利用硫酸钠作为能源, 通过卡尔文循环固定 CO₂ 进行自养生长; 又能利用多种有机物进行异养生长。该菌生长速度快, 细胞得率高, 是研究硫杆菌生理、生化、遗传学比较理想的材料。1984 年 Maria Plasota 等人将 IncP 类群中的 R68.45 质粒从大肠杆菌接合转移到了多能硫杆菌^[1]。

但转移性质粒带动的非转移性质粒载体在多能硫杆菌中的转移至今尚未见报道。本文就具有广泛寄主范围的转移性 IncP 质粒以及由 IncP 质粒带动的非转移性的粘端质粒 pJRD215 从大肠杆菌接合转移到多能硫杆菌进行了研究。

* 本工作为国家自然科学基金资助项目。

材料与方法

(一) 菌株与质粒

本实验使用的菌株与质粒列于表 1。

(二) 培养基与培养条件

1. 大肠杆菌采用 LB 培养基^[1], 37℃ 培养。

2. 多能硫杆菌异养生长采用 LB 培养基。

3. 多能硫杆菌自养生长采用无机盐培养基 (MM):

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10—20g; KH_2PO_4 1.5g;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.9g; NH_4Cl 0.8g;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g; 溶液 T* 5—10ml。

加蒸馏水至 1000ml, 调 pH7.6—8.5。固体培养基加 1.5% 琼脂粉, 0.8kg/cm² 灭菌 20min。多

表 1 菌株与质粒

菌株与质粒	遗传型/表型*	来源或参考文献
菌株		
<i>E. coli</i> C600	thr leu hsd	中科院微生物研究所
<i>T. versutus</i> SM-1 (pTA1)	wild-type Gm ^r Asa ^r Hg ^r	英国 Kelly 实验室 ^[2]
质粒		
RP,	Ap ^r Tc ^r Km ^r IncP Tra ⁺	中科院微生物研究所
R68.45	Ap ^r Tc ^r Km ^r IncP Tra ⁺	本所刘纯强博士
RP ₁ ::Tn501	Ap ^r Tc ^r Km ^r Hg ^r IncP Tra ⁺	同上
pUB307	Tc ^r Km ^r IncP Tra ⁺	文献 [3]
pJRD215	Sm ^r Km ^r IncQ mob ⁺	J. Davidson ^[4]

* Ap: 氨苄青霉素 (Ampicillin), Tc: 四环素 (Tetracycline), Km: 卡那霉素 (Kanamycin), Gm: 庆大霉素 (Gentamycin), Sm: 链霉素 (Streptomycin)

能硫杆菌采用 30℃ 培养。

(三) 抗生素与重金属盐

抗生素与重金属盐的使用浓度如下:

Ap 50μg/ml, Tc 12μg/ml, Km 50μg/ml, Sm 100μg/ml, Gm 20μg/ml, Na_2HAsO_4 8×10^{-2} mol/L, HgCl_2 5×10^{-2} mol/L。

(四) 接合条件

用 LB 液体培养供体菌至对数中期, 受体菌至稳定期, 按 1:1 体积混合, 取适量混合的菌液滴加在滤膜上, 在 LB 固体平板上, 30℃ 培养 16 小时使之接合。取下滤膜, 用生理盐水洗下菌体, 稀释后涂布选择性平板。分别涂布供体菌和受体菌作为对照。

质粒转移频率以接合后每个受体菌所产生的转移接合子的数目表示。

(五) 质粒的提取与检测

质粒提取采用 Birnbiom 和 Doly 的方法, 略加修改^[5]。电泳及照相条件见前文^[7]。

(六) 粘端质粒 pJRD215 在多能硫杆菌中的稳定性测定

在含有 Sm 的 LB 平板上挑取一个 T.

versutus 转移接合子单菌落, 接种到不含抗生素的 LB 液体中, 30℃ 振荡培养 24 小时, 然后按 1:10000 的比例接种, 连续转接 5 次。稀释后涂布不含抗生素的 LB 平板, 30℃ 培养。菌落长出后, 在含 Sm + Km 的 LB 平板上点种 100 个菌落。根据抗性菌落的数目算出 pJRD215 质粒在多能硫杆菌中的稳定性。

结果与讨论

(一) IncP 类群的质粒从大肠杆菌接合转移到多能硫杆菌中

在接合实验之前, 我们对多能硫杆菌进行了质粒检测, 通过琼脂糖凝胶电泳可以看到一条分子量约为 57×10^6 道尔顿的大质粒带, 这与文献报道一致^[2]。实验表明, 该菌对 Ap、Tc、Km、Sm 敏感, 对砷酸盐、氯化汞、庆大霉素有较高的抗性^[4]。

本实验用含有不同 IncP 质粒的 *E. coli* C600 作为接合的供体菌, 用多能硫杆菌作为受

* 溶液 T 为多种微量元素的混合液。

体菌,用滤膜法进行接合。为了比较多能硫杆菌转移接合子在异养和自养生长条件下出现的频率,将接合后的菌体分别涂布 LB 培养基和无机盐培养基,进行转移接合子计数,其结果从表 2 中可以看出,同一质粒在 LB 平板上的转移频率要略高于无机盐平板上的转移频率。 RP_1 、R68.45、 $RP_1::Tn501$ 三个质粒的转移频率相近,而 pUB307 的转移频率明显低于前三个质粒。

据文献报道^[4],在多能硫杆菌中,R68.45 质

粒只有 Km 抗性基因能够表达,Tc 和 Ap 抗性基因不能表达,而在我们的实验中,以 *E. coli* C600(RP_1) 为供体菌,以 *T. versutus* SM-1 为受体菌,在 Tc 或 Ap 平板上也得到了 *T. versutus* SM-1 (RP_1) 转移接合子,从而证明了 IncP 质粒上的 Km、Tc、Ap 抗性基因在多能硫杆菌中均能得到表达。

为了进一步验证 IncP 质粒从大肠杆菌转移到了多能硫杆菌中,我们对含有 R68.45 和 $RP_1::Tn501$ 的多能硫杆菌转移接合子进行了

表 2 IncP 质粒在多能硫杆菌中的接合转移结果

供 体	受 体	接合培养基	选择性培养基	接合转移频率
<i>E. coli</i> C600(RP_1)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	LB/Gm + Km MM/Km	1.9×10^{-5} 1.1×10^{-5}
<i>E. coli</i> C600(R68.45)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	LB/Gm + Km MM/Km	4.35×10^{-5} 2.1×10^{-5}
<i>E. coli</i> C600 ($RP_1::Tn501$)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	LB/Gm + Km MM/Km	2.34×10^{-5} 1.2×10^{-5}
<i>E. coli</i> C600 (pUB307)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	LB/Gm + Km MM/Km	7.9×10^{-6} 1.7×10^{-6}

质粒检测,结果见图 1。通过比较可以看出,R68.45 和 $RP_1::Tn501$ 质粒从大肠杆菌转移到了多能硫杆菌中。

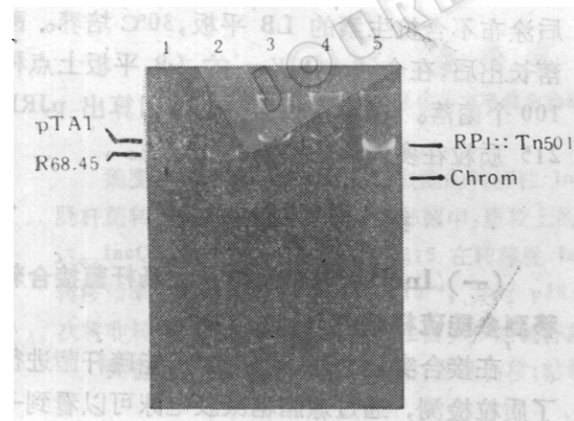


图 1 大肠杆菌和多能硫杆菌质粒图谱

1. 多能硫杆菌 SM-1(R68.45) 转移接合子
2. 大肠杆菌 C600(R68.45) 供体菌
3. 多能硫杆菌 SM-1 受体菌
4. 多能硫杆菌 SM-1($RP_1::Tn501$) 转移接合子
5. 大肠杆菌 C600 ($RP_1::Tn501$) 供体菌

(二) 粘端质粒 pJRD215 在多能硫杆菌中的带动转移

pJRD215 质粒具有广泛的寄主范围^[4],它

本身不具有接合转移的能力,但可以在转移性质粒的带动下转移。首先,我们将 pJRD215 质粒分别转移到含有 RP_1 、R68.45、 $RP_1::Tn501$ 和 pUB307 质粒的 *E. coli* C600 菌株中,在 LB/Sm + Tc 平板上,得到两种质粒共存的 *E. coli* C600 菌株。以此为供体菌,以多能硫杆菌为受体菌,进行接合。在含有 Sm 的无机盐平板上筛选转移接合子,其结果从表 3 可以看出,IncP 类群的 4 个质粒带动 pJRD215 质粒到多能硫杆菌的频率相差不大,但都高于这 4 个质粒本身的转移频率(见表 2)。pJRD215 的转移频率远远高于多能硫杆菌的 Sm^r 自发突变频率 (2.6×10^{-8})。

质粒检测结果表明, RP_1 、R68.45、 $RP_1::Tn501$ 和 pUB307 四个质粒均将 pJRD215 质粒带动转移到了多能硫杆菌中,结果见图 2。

(三) pJRD215 质粒在多能硫杆菌中的稳定性

将含有 pJRD215 质粒的 *T. versutus* SM-1 转移接合子在不含抗生素的 LB 液体中,连续转接 5 次。转接 1、3 次,质粒的存在率均为 100%、转接 5 次,质粒的存在率为 92%,表明

表 3 粘端质粒 pJRD215 在多能硫杆菌中的带动转移结果

供 体	受 体	接合培养基	选择性培养基	带动转移率
<i>E. coli</i> C600(RP ₄ , pJRD215)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	MM/Sm	3.0×10^{-4}
<i>E. coli</i> C600(R68.45, pJRD215)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	MM/Sm	1.5×10^{-4}
<i>E. coli</i> C600(RP ₄ ::Tn501, pJRD215)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	MM/Sm	8.1×10^{-4}
<i>E. coli</i> C600(pUB307, pJRD215)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	MM/Sm	8.9×10^{-5}
<i>E. coli</i> C600 (pJRD215)	<i>T. versutus</i> SM-1	LB	MM/Sm	$< 2 \times 10^{-5}$

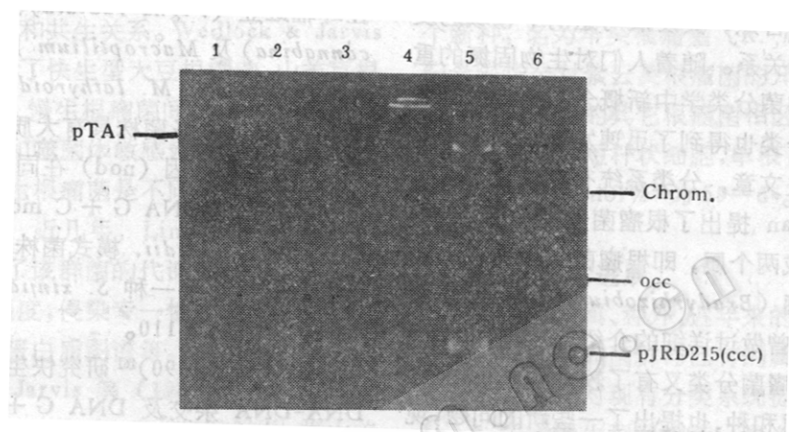


图 2 pJRD215 接合转移质粒图谱

1. 多能硫杆菌 SM-1 受体菌
2. RP₄ 带动的 pJRD215 多能硫杆菌 SM-1 转移接合子
3. R68.45 带动的 pJRD215 多能硫杆菌 SM-1 转移接合子
4. RP₄::Tn501 带动的 pJRD215 多能硫杆菌 SM-1 转移接合子
5. pUB307 带动的 pJRD215 多能硫杆菌 SM-1 转移接合子
6. 大肠杆菌 C600(pJRD215)

粘端质粒 pJRD215 在多能硫杆菌中具有较高的稳定性。

IncP 类群的粘端质粒 pVK100 通过 pRK 2013 质粒的带动已从大肠杆菌转移到了新型硫杆菌 (*Thiobacillus novellus*)^[9], 但非转移性的质粒载体在其他硫杆菌中的转移尚未见报道。本文首次将 IncQ 类群的粘端质粒 pJRD 215 从大肠杆菌转移到了多能硫杆菌, 这使得我们有可能在大肠杆菌与硫杆菌之间通过接合转移的方法建立一个遗传信息的转移系统, 将异养细菌的某些有用的基因引入到硫杆菌, 特别是浸矿细菌, 因而该方法有着重要的实用价值。

参 考 文 献

1. Plasota M et al.: *Microbios*, 41: 81—89, 1984.
2. Marta Bednarska et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 16: 183—185, 1983.
3. Peter M Benoit et al.: *Molec. Gen. Genet.*, 154: 205—211, 1977.
4. Davison J et al.: *Gene*, 51: 275—280, 1987.
5. Maniatis T et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
6. 金松谟, 顾望明: *微生物学通报*, 18(3): 180—182, 1991.
7. 金松谟, 顾望明: *微生物学通报*, 15(1): 20—21, 1988.
8. Davidson M S et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1436—1441, 1985.
9. Davidson M S et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 565—572, 1983.