

蛭弧菌 BDG-9 质粒不稳定性研究*

焦 鹏

马成新 王书锦

(清华大学化工系生物化工研究所 北京 100084) (中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

摘 要:本文建立了研究难于单独连续培养的专性蛭弧菌质粒稳定性的方法体系。应用此方法体系发现并证明了在专性蛭弧菌 BDG-9 中所含的质粒 pST I 存在着独特的质粒缺失现象,当蛭弧菌 BDG-9 单独培养时,在通常决定质粒稳定性的复制功能和分配功能都正常的情况之下,随着细胞的传代,质粒 pST I 逐渐丢失,蛭弧菌的生长繁殖也逐渐停止,表明质粒 pST I 的存在对 BDG-9 细胞单独生长有重要作用。

关键词:蛭弧菌;质粒不稳定性;复制功能;分配功能

中图分类号:Q939.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0174-79

蛭弧菌(*Bdellovibrio*)是 1962 年 Stolp H 等人^[1]首先发现的。它们是一类可以吸附和侵染其它革兰氏阴性或阳性细胞的具有噬菌特性的革兰氏阴性细菌。从蛭弧菌的生长方式来分,它可以被分为专性寄生型(predatory strains)、非寄生型(pre-independent strains)和兼性寄生型(facultative strains)三类^[2]。专性寄生型蛭弧菌只有在寄主细胞或寄主细胞提取物存在的情况下才能生长繁殖;兼性蛭弧菌在有寄主存在的情况下可以侵染寄主细胞生长繁殖,在没有寄主存在的情况下,也可以自己生长繁殖;而非寄生型蛭弧菌已丧失了侵染寄主细胞的能力,只能自己生长繁殖。

我们近年来分离获得了多株蛭弧菌^[3],并从其中的一株蛭弧菌 BDG-9 细胞中获得了 23.7kb 的质粒 pST I。蛭弧菌 BDG-9 在没有寄主细胞(如沙雷氏菌 *Serratia* sp.)存在的情况下,即当 BDG-9 单独培养时,细胞生长繁殖逐渐减弱,并最终停止生长,从而初步表明是 BDG-9 是一株专性蛭弧菌;并且实验表明当 BDG-9 单独培养时,存在着独特的质粒丢失现象,质粒 pST I 的稳定性对其生长具有较为重要的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株

沙雷氏菌(*Serratia* sp.)蛭弧菌(*Bdellovibrio*)BDG-9,来源于中国科学院沈阳应用生态研究所微生物一室。

1.2 培养基

SMB 培养基:L-山梨糖 20g, KH_2PO_4 1.0g, 酵母膏 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 牛肉膏 3.0g, 尿素 1.0g, 玉米浆 4.0g, CaCO_3 1.0g, 蛋白胨 10g pH7.0, 定容至 1L, 0.08 MPa 灭

* 国家“九·五”科技攻关项目(96-C02-02-02)

作者简介:焦鹏(1972-),男(满族),内蒙古,博士,清华大学博士后,主要从事代谢工程研究

收稿日期:1999-01-25,修回日期:1999-09-07

菌 25min。

1.3 方法

1.3.1 显微镜直接计数法:取 0.01mL 待测菌液(或从平板上挑取菌落于 10mL 无菌水中,振荡均匀)与半滴刚果红染色液均匀涂布在载玻片上直径为 2.05cm 的圆面内,风干后滴盐酸酒精 1、2 滴,涂片变蓝,风干后在油镜下观察,数视野中菌数。共数 5~6 个视野中的菌数。显微镜油镜内径为 0.205mm,然后用下列公式计算:

菌数/毫升(或菌数/菌落) = 每视野中平均菌数 \times 100 \times 稀释倍数 \times 涂布面积/接物镜面积。

1.3.2 质粒 DNA 的微量快速提取^[4]:取纯培养的细菌发酵液 0.2mL 于离心管中离心收集菌体,去上清(或从平板挑取单菌落于离心管中)。将收集的菌体重悬于 50 μ L 灭菌的 EDTA(pH8.0)中,加入 50 μ L 新配制的 0.2mol/L NaOH-0.7% SDS-20% 蔗糖溶液,振荡 3min,然后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10min,冷却至室温后加入 2 μ L 4mol/L 的 KCl、1 μ L 0.4% 溴酚兰,再冰浴 20min 后离心 18000r/min,3min,取上清液直接上样电泳。

1.3.3 质粒的提取及纯化:参见文献[4]。

1.3.4 微量 DNA 的电泳检测:0.7% 琼脂糖凝胶电泳,缓冲液为 1 \times TAE,电压降为 3~5V/cm,EB 染色,260nm 紫外灯下观察。拍照:光圈 2,速度: B,加紫外滤光片,延长曝光时间至 15~20min,可以拍摄到微量的 DNA(有时肉眼观察不到)。

1.3.5 DNA 纯度及含量的检测^[4]:质粒提取后,用 TE 溶液溶解质粒 DNA 沉淀,稀释后,分别在 260nm 和 280nm 波长下测吸收度。 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.0 之间,可以认为质粒 DNA 为纯品。此时,OD 值为 1 相当于 50 μ g/mL 的双链 DNA。

1.3.6 蛭弧菌 BDG-9 质粒稳定性的研究^[4~7]:通常决定质粒稳定性的因素为质粒的复制功能和分配功能。通过检测细胞中质粒复制功能和分配功能的情况,对细胞中质粒的稳定性加以描述。(1)蛭弧菌 BDG-9 在 SMB 平板上的传代培养:将在液体摇瓶中活化后的蛭弧菌 BDG-9 细胞经过稀释,涂 SMB 平板,作为 BDG-9 的 1 级平板。从 1 级平板上挑取单菌落,用 20mL 无菌水稀释后,取 0.1mL 涂 SMB 平板,作为 2 级平板。其它 3,4,5 级平板依此类推。(2)单细胞中质粒的拷贝数的检测:从 BDG-9 的平板上将菌体用无菌水洗脱下来,应用方法 1.3.3 提取并纯化质粒 pST1,同时应用方法 1.3.1 检测平板上细胞的总数(N)。将所提取并纯化的质粒 DNA 通过方法 1.3.5 检测其含量,在已知质粒分子量为 1.51×10^7 D(23.7kb)的情况下,根据文献[4]得出每 50 μ g pSTI DNA 相当于 2.0×10^{12} 个 pSTI 质粒,从而可以得出所纯化的 DNA 相当于 pSTI 质粒的总个数(P');进而得出单细胞中所含质粒的拷贝数(p): $p = P'/N$ 。(3)BDG-9 细胞在 SMB 平板分裂次数(代数)的确定:依据方法 1.3.1 所得的平板上细胞总数,并且根据平板上的菌落数,可以通过下式得出细胞所传的代数: $N = M \times 2^n$;则 $n = 3.32 \lg(N/M)$;N:平板上细胞总数;M:平板上菌落数;n:细胞分裂次数(代数)。(4)细胞中质粒复制功能的检测:通过上述方法得出平板上单细胞中质粒的拷贝数(p)后,依据前述方法转涂下一级平板。初步设定转接的每一个单细胞都生长成单个菌落,从而在细胞转接平板之初,其平板上细胞所含初始质粒数 $P_0 = \text{平板上的菌落数} \times p$ (初始质粒数 = 菌落数 \times 单细胞质粒拷贝数);而当细胞在平板培养结束后,可以通过上述方法 A 测出平板上细胞所含质粒的总数 P',当 $P' \gg P_0$

时,可以认为质粒在细胞培养过程中,依然正常复制即细胞的复制功能没有关闭,反之,则认为细胞中质粒的复制功能已经关闭。(5)细胞中质粒分配功能的检测:由于单菌落由单细胞生长得来,所以从单菌落中检测出质粒的存在,可以得出原单细胞中也必然含有质粒。每次从平板上随机挑取 10~30 个菌落,通过方法 1.3.2 和方法 1.3.4 检测菌落中质粒的有无。并以下式得出含有质粒的细胞占总细胞的百分含量:含有质粒的百分率(%) = 有质粒的菌落/挑取的菌落总数 $\times 100$

2 结果和讨论

2.1 SMB 1 级平板细胞的质粒稳定性

由于单菌落是由涂布在平板上的单细胞生长形成的,如果所检测的单菌落中含有质粒,则说明形成这个菌落的初始单细胞中也必然含有质粒 DNA,所以可以通过检测含有质粒的菌落的百分率来表示最初涂布于平板上含有质粒的单细胞的百分率。将活化后的 BDG-9 稀释涂 SMB 平板,选择菌落分布均匀且菌落数适宜的平板,随机挑取 10~30 个单菌落,通过质粒的快速提取法检测每个菌落中质粒的有无,并计算出含有质粒细胞占总细胞的百分率。将整个平板上的细胞洗下来,提取并纯化其中的质粒。通过紫外分光光度计测定质粒提取物的纯度和含量。

BDG-9 在 SMB 平板上经过 60h 的培养后,选取其中三个平板,其菌落数分别为 890、1020、1240 个。从平板上任意挑取的菌落通过快速提取质粒并电泳,在每一个菌落中都提取出了质粒 DNA,即 100% 的菌落中含有质粒 DNA,从而可以认为在最初涂布于 1 级平板上的细胞中 100% 含有质粒 DNA。在表 1 中给出了在各 SMB 1 级平板上, BDG-9 细胞中所含质粒的情况:

表 1 第一平板上的 BDG-9 单细胞中的质粒拷贝数

Table 1 pST1 copy number of the first plating cell of the strain BDG-9

Number of colonies	Total cells	Percentage of cells containing plasmid/%	Total mass of plasmid DNA/ μg	Number of plasmid DNA	Plasmid copy number of single cell
890	4.27×10^9	100	0.95	3.80×10^{10}	8.9
1020	4.89×10^9	100	0.98	3.92×10^{10}	8.0
1240	5.95×10^9	100	1.105	4.42×10^{10}	7.4

此外, BDG-9 细胞在 SMB 1 级平板上经过 60h 的培养后,通过方法 1.3.1 可以测知每个菌落中含有约 4.8×10^6 个细胞,从单个菌落是单细胞分裂增殖生成的结果来看, BDG-9 细胞大约经过了 22 次分裂。同时从上表可以看出,此时每个 BDG-9 细胞中平均含有 8~9 个质粒 pST I 的拷贝。

2.2 SMB 2 级平板上 BDG-9 单细胞中质粒的稳定性

从 1 级平板上挑取单菌落用 20mL 无菌水稀释后,取 0.1mL 涂 2 级平板。经过 72h 培养后,从稀释度上可以认为每一个单细胞都繁殖成了单个菌落。通过 1.3.6 中的方法确定含有质粒 pST I 的细胞占总细胞的比率,以及单细胞中质粒的拷贝数。其结果如下表:

表 2 2 级平板上 BDG-9 单细胞中质粒的拷贝数

Table 2 pST1 copy number of the second plating cell of the strain BDG-9

Number of colonies	Total cells	Percentage of cells containing plasmid/%	Total mass of plasmid DNA/ μg	Number of plasmid DNA	Plasmid copy number of single cell
1050	5.04×10^9	90	0.695	2.78×10^{10}	6.1
1980	9.50×10^9	95	1.17	4.68×10^{10}	5.2
2130	10.2×10^9	95	0.91	3.60×10^{10}	3.7

从上表可以看出,虽然细胞中质粒拷贝数比 1 级平板上有所降低;但在细胞中依然有较高的质粒含有率。另外,从 1 级平板上挑取的单菌落的稀释液涂平板后,每个平板上约含有 2000~3000 个 1 级平板上的单细胞;此时细胞中所携带的质粒总数为 18000~27000 个,经过 72h 的培养后,平板上细胞所含质粒数达到 3.0×10^{10} 个以上;细胞中质粒的数量增加,说明在细胞的繁殖传代过程中,其质粒的复制功能依然正常。并且,从表 2 可以得出在二级平板上单菌落中细胞的个数平均为 5.0×10^6 个,由 1.3.6 中(3)可以得到,此时每个菌落是从单细胞经过约 23 代的繁殖产生的。从最初的 0 代细胞,经过两次平板转移,约 45 代的传代,其中含有质粒的细胞依然占细胞总数的 95% 以上,说明质粒的分配功能也没有关闭,并且如表 2 所示,单个细胞中质粒的拷贝数约为 4~6 个。

2.3 SMB 3 级、4 级平板上 BDG-9 单细胞中质粒的稳定性

采用如 2.1 和 2.2 中所述的方法,对 BDG-9 在 3 级及 4 级 SMB 平板上的生长及细胞中所含质粒的拷贝数进行了测定。在三级平板上时,单细胞中质粒的拷贝数约为 2~3 个,含有质粒细胞的百分率约为 90%;从而进一步说明此时细胞中质粒 pST I 的分配功能没有关闭。在 4 级平板上,细胞生长已较为微弱,经过 120h 培养后,可形成单菌落中含 0.8×10^5 个细胞的菌落,菌落直径小于 0.2mm,此时单细胞中质粒的拷贝数已接近为 0。

2.4 SMB 5 级平板上 BDG-9 单细胞中的质粒的稳定性

BDG-9 在第五级 SMB 平板上已较难以获得生长,经过一周的培养后,BDG-9 在平板上并没有获得明显的生长。说明随着细胞中质粒的消失,细胞的生长也随之逐渐停止。

2.5 BDG-9 生长的恢复

将质粒拷贝数已接近为 0 的 4 级平板上的细胞接种于 SMB 培养液中,同时接入 BDG-9 的寄主菌沙雷氏菌,经过 48h 的培养后,BDG-9 又获得了生长,转接二级摇瓶后,经过 36h 的培养,BDG-9 生长丰富,此时涂平板,可以观察到在 SMB 平板上生长的 BDG-9 单菌落和沙雷氏菌生长的菌落。将平板上的 BDG-9 单菌落转接 SMB 二级平板,菌体细胞可以获得生长,通过检测,细胞中已不含质粒 pST I。由此证明,4 级平板上的 BDG-9 细胞,已确实缺失了质粒 pST I。另外,将这些不含有质粒 pST I 的 BDG-9 细胞转接下一级平板,细胞生长微弱,在 SMB 平板上并没有获得明显生长。说明缺失质粒的 BDG-9 细胞,虽然依然可以获得一定程度的单独生长,但已无法长期连续生长繁殖。上述各步实验可总结如下表 3。

表 3 蛭弧菌 BDG-9 质粒稳定性

Table 3 Plasmid instability of *Edelweibrio* BDG-9

SMB plates	Plasmid pST I instability of cells
1 st plating cells	Extraction and purification of plasmid DNA. By measuring the total number of plasmid DNA and total cell, it could be concluded that the plasmid copy number of single cell was about 8~9
2 nd plating cells	Plasmid copy number of single cell was about 4~6. After nearly 45 generations of BDG-9, the total number of plasmid increased greatly and above 95% cells contained plasmid. The results showed that the replication function and distribution function of plasmid pST I still worked.
3 rd plating cells	Plasmid copy number of single cell was about 2~3.
4 th plating cells	Plasmid copy number of single cell decreased gradually to zero.
5 th plating cells	No growth of cells happened.

2.6 讨论

通常决定质粒稳定性的因素为质粒的复制功能和分配功能^[5-7]。当质粒的复制功能丧失后,随着细胞的繁殖传代,造成单细胞中质粒的拷贝数越来越少,并最终造成质粒的丢失。质粒分配功能的缺损,造成质粒不能平均分配到子代细胞中,从而含有质粒的细胞占总细胞的比率越来越低,进而最终导致细胞中质粒的丢失。通过对 BDG-9 中质粒 pST I 的稳定性研究表明,在细胞中质粒 pST I 的复制功能和分配功能都正常,都没有关闭。这说明在影响 BDG-9 中质粒的稳定性的因素中,通常决定质粒是否丢失的两个因素并没有发生作用。那么是何种原因造成了 BDG-9 中质粒 pST I 的丢失呢?通过对蛭弧菌的生物学特性的研究表明,蛭弧菌对寄主的侵染过程中,蛭弧菌 DNA 合成的前体物质有 70-80% 来源于寄主菌的 DNA^[8-10];寄主细胞的单核苷酸可直接用于蛭弧菌核酸的生物合成,寄主细胞核酸中的高能磷酸键的能量可保存于蛭弧菌中,供其生长代谢需要。可以说蛭弧菌本身起到了一个 DNA 装配工厂的作用,将寄主的 DNA 经过改装后装配成自己的 DNA。这种作用在专性蛭弧菌中更为明显。蛭弧菌 BDG-9 作为专性蛭弧菌,其自身合成 DNA 的能力并不能完全满足自己的需要。当 BDG-9 单独培养的初期,由于失去了寄主这一赖以生存的“沃土”,其生存面临着威胁;质粒作为菌体生存非必需的细胞质中 DNA 大分子,在菌体需要的时候,提供并用于菌体生长繁殖所必需的基因组 DNA 的合成,从而在菌体中出现了一方面质粒具有正常复制和分配功能,另一方面质粒 DNA 作为一种原料被菌体利用来合成基因组 DNA,进而造成菌体中质粒的拷贝数逐渐降低,并最终消失的现象。上述这种质粒自我消耗很可能是蛭弧菌 BDG-9 中质粒缺失的原因,但进一步的证实还有待于深入的研究。

实验结果表明,质粒 pST I 对维持 BDG-9 的单独生长起到了很重要的作用。含有质粒 pST I 的 BDG-9 细胞,可以单独生长繁殖 80 代以上,而丢失质粒 pST I 的 BDG-9 细胞即使在经过活化后,其单独生长繁殖也不会超过 20 代。另外,更为重要的是,在蛭弧菌 BDG-9 中发现的这种质粒 pST I 的复制和分配功能并没有关闭,但随着菌体生长的减弱而逐渐造成质粒的缺失。这种质粒缺失是蛭弧菌中一种独特的质粒缺失现象。这种质粒丢失现象的发现和研究的,对于蛭弧菌生理及遗传特性,尤其对于质粒稳定性的研究都具有重要意义。

致谢 中科院沈阳应用生态研究所的周樱桥同学做了部分工作;清华大学的曹竹安教授也对本文工作提出了宝贵意见,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Stolp H, Starr M P. *Phytopathol Z*, 1962, **45**:64.
- [2] Kriey N R, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Volume I, London: Williams & Wilking, 1991. 221~227.
- [3] 焦鹏,胡江春,王书锦.微生物学杂志,1997,**17**(4):1~6.
- [4] 萨母布鲁克 J,弗里奇 M F,曼尼阿蒂斯 T 著(金冬雁等译).分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1993.20~25,940~943.
- [5] 盛祖嘉等编著.分子遗传学.上海:复旦大学出版社,1988.27~35.
- [6] 盛祖嘉等编著.微生物遗传学.北京:科学出版社,1981.275~310.
- [7] Meyer R J, Lin L, Kim K M A. Brasch Broad host-range plasmid R1162: Replication, incompatibility, and copy number control. In: Helinski S N, cohen D B, Clewell D A, *et al.* Plasmids in Bacteria, New York/London: Plenum Press, 1985. 173~188.
- [8] 秦生巨.微生物学通报,1992,**19**(6):357~362.
- [9] Starr M P, Seidler R J, Mandel M. *Adv Physiology*, 1972, **8**: 215.
- [10] Rosson R A, Rittenberg S C. *J Bacteriol*, 1981, **146**(1):108~116.

STUDY ON THE PLASMID INSTABILITY OF *BDELLOVIBRIO* BDG-9*

Jiao Peng¹ Ma Chengxin² Wang Shujin²

(¹ Department of Chemical Engineering, Institute of Biochemical Engineering, Tsinghua University, 100084)

(² Shenyang Applied Ecology Institute, Sinica of China, 110015)

Abstract: A new method system was established in this paper to study the plasmid in stability of *Bdellovibrio* BDG-9. Using this system, it was found that when BDG-9 was cultured singly on the SMB plate, plasmid pST I was unstable although pST I still replicated and distributed to progeny cell normally. The results showed that the pST I copy number in single cell of BDG-9 decreased gradually to zero with the propagation of BDG-9. Additionally, plasmid pST I was very important for the growth of BDG-9, and with the lacking of pST I s, the growth and propagation of BDG-9 ceased.

Key words: *Bdellovibrio*, Plasmid instability, Replication function, Distribution function

* This work granted by National Nine-Five Key Task Project (96-C02-02-02).