

大线性质粒 pHZ1000 ,pHZ1001 在链霉菌种间的接合转移^{*}

赵书春¹ 周秀芬 邓子新^{* * *}

(华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

关键词:大线性质粒,高压脉冲电泳,接合转移

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0435-39

从 1979 年首先在娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*) 中发现第一例原核生物线性质粒 pSLA2^[1]至今,人们已在多种链霉菌中发现了线性质粒,大小 12kb 到 640kb 不等^[2]。从红球菌^[3]和诺卡氏菌中^[4],在硫杆菌属和螺旋体属中,以及酵母、丝状真菌等真核生物中也都陆续发现了线性质粒的存在^[5],大肠杆菌噬菌体 N15 的原噬菌体也是一种特殊的线性质粒^[6]。

线性质粒存在的生物学意义引起了人们的浓厚兴趣。然而 20 多年以来,链霉菌线性质粒,尤其是大线性质粒的研究始终进展不快。目前有关链霉菌线性质粒复制机理、端粒结构的阐明,都是通过小线性质粒来完成的。与较小的线性质粒相比,大线性质粒的检测、分离、回收及物理图谱的构建等遗传操作都有相当的难度。但大线性质粒的研究前景是诱人的,其意义不仅在于分子生物学理论的发展,也在于对潜在的原核生物线性基因工程载体的探索。

利用高压脉冲电泳技术,从链霉菌 T8-4 中分离出两个大的质粒,依照分子量从大到小的顺序分别将其命名为 pHZ1000 和 pHZ1001。并经双向脉冲电泳等方法检测,证实其构型为线状。尝试通过“麻点”形成特征,利用接合转移的方法分离和鉴定了 5 株含有 pHZ1000 ,pHZ1001 的变铅青链霉菌 ZX1 的衍生菌株。本文主要报道大线性质粒 pHZ1000 和 pHZ1001 向异源寄主转移的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) ZX1(str. p_{pro}) ,作为接合转移的受体,链霉菌 T8-4(携带线性质粒 pHZ1000 和 pHZ1001) ;FR-008 及其限制性缺陷菌株 DX60(均携带 pHZ227 和 pHZ228)。

1.2 培养基和试剂

除特殊说明外,本研究用到的培养基和试剂均参考文献 [7]。

1.3 方法

1.3.1 高压脉冲电泳技术:参照文献 [8]。

1.3.2 接合转移的方法:参照文献 [7]。

1.3.3 线性质粒 DNA 片段的回收:线性质粒 DNA 片段的回收采用 Bio 101 Incorporation 生产的 GENE CLEAN™ Kit 和透析袋电洗脱法^[9]。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39770396 和 39830210)

^{* * *} 通讯作者

¹ 现在中国科学院微生物研究所工作(北京 100080)

作者简介:赵书春(1971—),男,山东临沂人,中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室工作,硕士,主要从事链霉菌分子生物学方面的研究

收稿日期:1999-10-11 修回日期:2000-03-09 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.3.4 双向高压脉冲电泳技术:将第一向电泳后的凝胶取出,经溴化乙锭染色后,在紫外透射仪上照射适当的时间,切下凝胶中的质粒 DNA 带,水平转动 90°,在制备第二向电泳凝胶时镶嵌到凝胶的点样孔部位,进行第二向电泳。

1.3.5 DNA 杂交及 Southern 印迹分析:参照文献 [9]。

2 结果和分析

2.1 利用高压脉冲电泳分离线性质粒 pHZ1000 和 pHZ1001

在发展链霉菌 T8-4 菌株的基因克隆体系时,首先想到的是菌株自身的质粒。然而,利用常规的碱性溶菌法抽提质粒进行普通琼脂糖凝胶电泳,没有检测到质粒的存在。利用高压脉冲电泳技术,在 T8-4 菌株中观察到两个大的质粒,经与已知分子量 DNA 分子同步电泳,估测其分子量约为 230kb 和 90kb,并按照分子量从大到小的顺序分别命名为 pHZ1000、pHZ1001。

2.2 双向脉冲电泳等方法确定质粒 pHZ1000、pHZ1001 的构型为线状

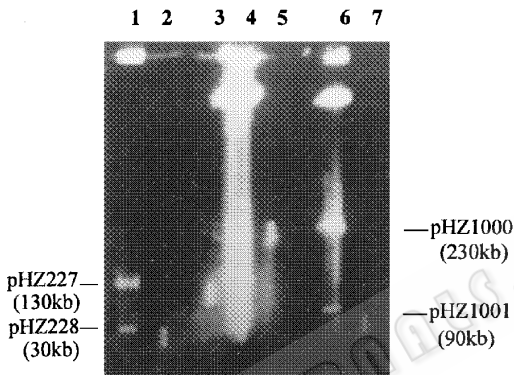


图 1 双向高压脉冲电泳检测质粒 pHZ1000 和 pHZ1001 的构型

1、4、6 为第一向电泳的样品;2、3、5、7 为第一向电泳后的琼脂糖经紫外线照射后取出的含质粒 DNA 带,垂直镶嵌在第二向电泳凝胶的点样孔,与第一向电泳样品同步进行高压脉冲电泳。

1. DX600; 2. pHZ228; 3. pHZ227; 4. FR008; 5. pHZ1000; 6. T8-4; 7. pHZ1001。

链霉菌大线性质粒提取方法的难度以及 T8-4 菌株遗传背景的复杂性是干扰对大线性质粒 pHZ1000 和 pHZ1001 自身分子生物学及其控制的遗传表型研究的最大障碍。为此,我们尝试了通过“麻点”形成将其转移到遗传背景较为清晰的变铅青链霉菌中的可能性。

2.3.1 利用种间接合转移将线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 导入变青链霉菌 ZX1 中:在 HAUCM¹⁰ 平板上涂布浓的 ZX1 孢子悬液($>2 \times 10^8$ 孢子/皿)和稀释了的 T8-4 菌株的孢子悬液(50~500 孢子/皿),30℃ 培养 4d 后观察到了清晰的“麻点”。用接种针挑取“麻点”边缘的菌落,放入含有 1mL 无菌水的菌种管中进行系列稀释,之后分别涂布到已吹干的 HAUCM 平板上,30℃ 培养数天至产孢丰满后,将其影印在涂布有 ZX1 孢子悬液的 HAUCM 平板上(加有 30μg/mL 链霉素,抑制 T8-4 菌株的生长),30℃ 培养,待有“麻点”出现后(见图 2),在影印的母平板上找到相应的单菌落,划线接种,即得到接合子的纯培养。

2.3.2 高压脉冲电泳和 Southern 印迹分析对接合子中所含质粒来源的验证:选取 ZX1、ZX2、ZX4、ZX5、

按 1.3.4 节所述方法对质粒 pHZ1000 和 pHZ1001 进行构型分析,结果如图 1 所示:可见第二向电泳的质粒与第一向电泳中对应的质粒平行泳动在同一个水平上,暗示在脉冲电泳凝胶上看到的质粒 DNA 分子的构型为线状。此外,多次脉冲电泳分析发现,线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 分子与 λ 多聚体 DNA 样品及其它菌株中线性质粒的相对位置始终保持不变,这是线性分子在脉冲电泳上的典型表现,而环型分子在脉冲电泳条件改变的情况下,与已知线性分子的相对位置则会发生或迟滞或超前的变化。

2.3 大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 向异源寄主的接合转移

当携带有接合性质粒的链霉菌在缺乏这个质粒(或与其亲缘相近的质粒)的“菌丝坪”上发育时,由于受体在接受供体的质粒后,其生长受到暂时抑制,常显示出一种典型的“麻点”表型(也称 Ltz^+ 或致死接合反应)^[7]。这一现象被广泛地用于鉴别链霉菌中可以自我转移的质粒。

ZC6 共五个接合子菌株,接种加有链霉素(30 μ g/mL)的 34% YEME 进行摇瓶培养,收获菌丝体,制备各菌株的 plugs(将菌丝体包埋在低熔点琼脂糖中进行原位处理)进行高压脉冲电泳,结果见图 3A:

由图 3A 可以看出,接合子 ZC1、ZC2、ZC6 含有和 pHZ1001 相同大小的质粒 DNA 分子,ZC4、ZC5 则含有两个分别和 pHZ1000、pHZ1001 大小相同的质粒 DNA 分子。

将图 3A 所对应的高压脉冲电泳凝胶进行适当的处理后,其所含的 DNA 分子转移到了尼龙膜上,用 α - 32 P 标记的 pHZ1000 质粒 DNA 作为探针与尼龙膜上的 DNA 分子杂交,结果如图 3B 所示:

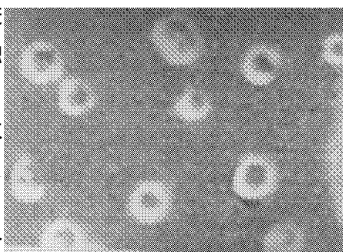


图2 链霉菌 T8-4 和变青链霉菌 ZX1 平板杂交形成的麻点(5 \times)

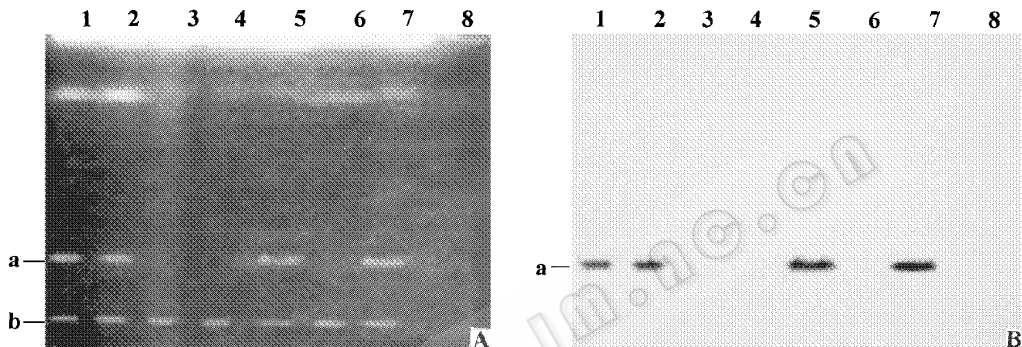


图3 链霉菌 T8-4 及接合子中线性质粒的检测和 Southern 印迹杂交分析

A. 链霉菌 T8-4 及接合子中的线性质粒高压脉冲电泳检测 B. 链霉菌 T8-4 及接合子中线性质粒的 Southern 印迹杂交分析

1. 2. T8-4 3. ZC1 4. ZC2 5. ZC4 6. ZC6 7. ZC5 8. ZX1 a. pHZ1000 b. pHZ1001.

T8-4、ZC4、ZC5 中都有一条阳性杂交带,未经接合转移的 ZX1(负对照)没有质粒带的出现,揭示了菌株 ZC4、ZC5 中的质粒和大线性质粒 pHZ1000 是完全同源的。高压脉冲电泳和 Southern 杂交的结果表明:1. 接合子中的质粒来自于链霉菌 T8-4 菌株;2. 大线性质粒 pHZ1000 在染色体上没有拷贝;3. 大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 之间不存在同源性。

值得一提的是,实验中筛选出的 34 株接合子,经高压脉冲电泳检测,有 28 株含有 pHZ1001,其它 6 株同时含有 pHZ1000、pHZ1001,没有筛选到只含有 pHZ1000 的接合子。尽管后来又进行了大量的平板杂交和接合子的筛选,一直没有分离出只含有 pHZ1000 的接合子,这是否意味着 pHZ1001 是可以自我转移的线性质粒,而 pHZ1000 的转移则可能依赖于 pHZ1001,正如玉米中的非自主成分转座依赖于自主成分的存在一样。但玉米中的非自主成分自主成分的缺失突变产物,而以 pHZ1000 为标记探针进行的 Southern 杂交表明 pHZ1000、pHZ1001 之间不存在同源性,这一问题可能会随着对接合转移区的深入研究而得以阐明。

2.3.3 接合子为变青链霉菌 ZX1 衍生后代的证实 接种挑取的“麻点”边缘的菌落中包含三种菌:链霉菌 T8-4、ZX1、和转移接合子。ZX1 菌株可以在含有链霉素的 HAUCM 培养基上生长,而 T8-4 菌株对链霉素是敏感的。因而在接合子的筛选过程中,采用了在 HAUCM 平板上添加适量链霉素的手段抑制 T8-4 菌株的生长。由表 1 可以看出,接合子对抗生素的抗性和 ZX1 菌株是一致的。同时,系列稀释后形成的单菌落的影印和挑选也保证了接合子的纯性,因为不含任何质粒的 ZX1 菌株是不能够形成“麻点”的。另外还通过比较菌株 T8-4、ZX1 和接合子对抗生素的抗性,证实了筛选出的接合子确为变青

链霉菌 ZX1 的衍生菌株。

表 1 链霉菌 T8-4、ZX1 及转移接合子对抗生素的抗性检测

抗生素($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抗生素抗性						
	T8-4	ZX1	ZC1	ZC2	ZC4	ZC5	ZC6
硫链丝菌素(50)	+	-	-	-	-	-	-
链霉素(50)	-	+	+	+	+	+	+
新霉素(10)	+	-	-	-	-	-	-
紫霉素(20)	+	-	-	-	-	-	-

2.3.4 大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 在接合子中的稳定性 在接合子的传代过程中,发现大线性质粒有遗传不稳定的现象,常以一定的频率发生丢失,即在和变青链霉菌 ZX1 平板杂交时,不再有“麻点”出现,筛选这些不能形成“麻点”的菌珠进行脉冲电泳时,看不到线性质粒的存在,可见质粒在传代的过程中确实丢失了。经多次(10 次以上)传代、接合转移观察,确定丢失的频率约为 20%。此外,从以上实验可以看出,大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 在转移到变青链霉菌 ZX1 的过程中保持了结构的稳定性。这说明大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 在 ZX1 中基本上是稳定自主存在的。

3 讨论

筛选的链霉菌 T8-4 菌株所产生的次生代谢产物具有广谱的抗真菌、抗革兰氏阳性细菌及抗酵母菌活性,是一株潜在的重要抗生素产生菌。遗憾的是在尝试构建其转化系统过程中发现,目前国际上广泛使用的许多质粒载体在转化 T8-4 菌株原生质体时,均不能得到转化子,实验室常用的链霉菌噬菌体也不能感染 T8-4 菌株,暗示着 T8-4 菌株中存在特异的限制—修饰系统,使其对外源 DNA 显示出较强的限制性。该菌株中两个大线性质粒 pHZ1000、pHZ1001 的发现,无疑为利用其内源复制子,为 T8-4 菌株的遗传操作提供了可能的途径。

文献中链霉菌环形质粒研究的报道甚多,尤其对接合转移系统的研究,无论在高拷贝还是低拷贝质粒中均分离了与接合转移有关的基因,已将负责接合转移的基因分为两类,一类是 *tra*,是负责链霉菌菌丝体之间的转移;另一类是 *spd*,负责质粒在菌丝体内的“扩散”,以保证菌丝分隔后浓缩形成的每一个孢子都获得一定拷贝数的质粒。链霉菌这类丝状 G^+ 细菌的接合转移系统比大肠杆菌简单的多。然而,对链霉菌线性质粒接合转移系统,目前却了解甚少,更不知道它与环形质粒存在什么区别和联系。大线性质粒 pHZ1000 和/或 pHZ1001 接合转移性能的发现、证实及其检测手段的发展,为我们起始线性质粒接合转移分子生物学的研究提供了丰富的信息和手段。

对线性质粒分子生物学的研究,目前大多集中在对复制及其调控的研究方面。对线性质粒所编码的遗传性状,除知道天兰色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中的 SCP1 与次甲霉素 A 的生物合成有关以外,其它所知道甚少。因此,线性质粒 pHZ1000 和 pHZ1001 向异源宿主的转移十分有利于对其生物学功能的研究。诚然,这种研究将有助于阐明线性质粒在链霉菌中广泛存在的生物学意义。

参 考 文 献

- [1] Hayakawa T, Tanaka T, Sakaguchi K, et al. *J Gen Appl Microbiol*, 1979, **25**: 255~260.
- [2] Keen C L, Mendelovitz S, Cohen G, et al. *Mol Gen Genet*, 1988, **212**: 172~176.
- [3] Crespi M, Messens E, Caplan A B, et al. *EMBO*, 1992, **J11**: 795~804.
- [4] Kalkus J, Reh M, Schlegel H G. *J Gen Microbiol*, 1990, **136**: 1145~1151.
- [5] Sakaguchi K. *Microbiol Rev*, 1990, **54**: 66~74.
- [6] Svarchevsky A N, Rybchin V N. *Mol Gen Microbiol*, 1984, **5**: 34~39.

- [7] Hopwood D A ,Bibb M J ,Chater K F ,*et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. Norwich : John Innes Foundation ,1985.
- [8] Kieser H M ,Kieser T ,Hopwood D A. *J Bacteriology* ,1992 ,**174** :5496-5507.
- [9] 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,1992.
- [10] Qin Z ,Peng K ,Zhou X ,*et al.* *J Bacteriology* ,1994 ,**176**(7) :2090-2095.

TRANSFER OF TWO LARGE LINEAR PLASMIDS pHZ1000 AND pHZ1001 BY CONJUGATION FROM *STREPTOMYCES* T8-4 TO *S. LIVIDANS* ZX1 *

Zhao Shuchun Zhou Xiufen Deng Zixin

(College of Life Science and Technology ,Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070)

Abstract : Using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ,two indigenous large plasmids were isolated from *Streptomyces* T8-4. Two dimensional PFGE revealed that both plasmids were linear molecules. By parallel electrophoresis with linear plasmids of known sizes ,the two linear plasmids were estimated to be approximately 230kb and 90kb ,which were designated as pHZ1000 and pHZ1001 ,respectively. Both plasmids could be transferred into *S. lividans* ZX1 by conjugation , which is detectable by " pock " formation. Five *S. lividans* ZX1 derivatives which carry one or two plasmids were isolated and characterized by Southern hybridization and PFGE.

Key words : Large linear plasmid ,PFGE ,Conjugation

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (39770396 and 39830210)

聚羟基烷酸(PHAs)研究进展

中国科学院微生物研究所承担的国家“九五”攻关项目——可生物降解塑料已于 1999 年 12 月 11 日通过鉴定,采用真氧产碱杆菌以淀粉水解糖为原料发酵生产 PHB,在 1.2 吨发酵罐中试(五罐平均)发酵 58 小时,细胞浓度为 134.3g/(干重),PHB 占细胞干重的 78% ,PHB 提取收率 84% ,中试成本 40 元/kg,经中科院组织的专家鉴定认为已达到国内领先、国际先进水平。

聚羟基烷酸酯家族中的另一个聚酯——羟基丁酸与羟基戊酸共聚物 Poly-3(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) ,简称 PHBV] ,更有更好的柔性 ,日前也已完成中试。

中国科学院微生物研究所

联系人 翁维琦