

放线菌 15 个属中线型染色体和线型质粒的检测

马 宁¹ 马 伟¹ 姜成林² 方 萍³ 覃重军^{1*}

(¹中国科学院上海植物生理生态研究所 上海 200032)

(²云南大学微生物研究所 云南 650091)

(³同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化国家重点实验室 上海 200092)

关键词 放线菌 线型染色体 线型质粒

中图分类号 :Q934.3 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)05-0666-05

在属于放线菌目(Actinomycetales)链霉菌属(Streptomyces)下的不同种中发现了约 5000 种抗生素和生理活性物质,其作用包括抗菌、抗真菌、除草、杀虫、抗肿瘤和免疫抑制剂等^[1]。在属于放线菌目的红球菌属(Rhodococcus)和诺卡氏菌属(Nocardia)中有许多种可以降解多种工业有毒化合物,如苯酚、多卤联苯、脂环烃和硝基芳族等^[2]。

一般细菌的染色体和质粒 DNA 为环型结构。近年来,人们利用脉冲电泳技术发现在链霉菌等少数细菌中存在线型结构的染色体和质粒^[3],有的巨大线型质粒上还带有完整的抗生素生物合成基因簇^[4]或降解多种工业上有毒化合物的基因^[5]。功能研究表明,链霉菌的线型质粒和线型染色体,尤其是端粒在 DNA 复制、重组和修复等方面具有不同于环型复制子的新的机制^[6~9]。在属于放线菌的 4 个属的菌株[包括菲律宾游动放线菌(Actinoplanes philippinensis)、青铜小单孢菌(Micromonospora chalybeata)、星状诺卡氏菌(Nocardia asteroides)和阿孙链轮丝菌(Streptovorticillium abikoense)]中发现了线型染色体^[10]。本文报道了利用脉冲电泳技术对来自放线菌 15 个属 19 个不同种的染色体和质粒的大小和结构进行的研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

表 1 为赠送或本室收藏的来自放线菌 15 个属 19 个不同种的菌株。

表 1 本研究所选用的菌株

属 名	种 名	来 源
Streptomyces	S. lividans ZX7	本实验室收藏
	N. asteroides 334	中国科学院微生物研究所
Nocardia	N. corallina 38	中国科学院微生物研究所
	N. uniformis II - 102	姜成林教授
	N. mexicana IFO - 3927	姜成林教授
Amycolatopsis	A. mediterranei WT	本实验室收藏
	A. dassonvillei 41170	姜成林教授

基金项目 :上海市自然科学基金(02ZA14096)

* 通讯作者。Tel 86-21-64042090-4717 ;Fax 86-21-64170709 ;E-mail :qin@iris.sipp.ac.cn

作者简介 :马 宁(1978-),女,辽宁省沈阳市,硕士生,从事放线菌线型染色体和线型质粒的分子生物学的研究。

E-mail :nma@iris.sipp.ac.cn

其他作者 张亚协³

收稿日期 :2002-11-25,修回日期 :2003-06-23

续表 1

属 名	种 名	来 源
<i>Actinomadura</i>	<i>A. chengduensis</i> 4259	姜成林教授
<i>Saccharopolyspora</i>	<i>S. aurantiaca</i> 4001	姜成林教授
<i>Actinoplanes</i>	<i>A. yunnanensis</i> 21	姜成林教授
<i>Ampullarieda</i>	<i>A. kunmingensis</i> 15	姜成林教授
<i>Dactylosporangium</i>	<i>D. fuscoaurantiacum</i> 2063	姜成林教授
<i>Micromonospora</i>	<i>M. yulongensis</i> 917	本实验室收藏
<i>Actinobispora</i>	<i>A. xingjiangensis</i> CCTCC97020	马 伟博士
<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. C-14-1	张亚雷和方 萍博士
<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces</i> sp. 13.7	中国科学院上海药物研究所
<i>Microbispora</i>	<i>M. griseoalba</i> 2491	本实验室收藏
<i>Streptosporangium</i>	<i>S. rubroaurantiacum</i> 4.180	中国科学院微生物研究所
<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. ATCC607	中国科学院微生物研究所

1.2 方法

放线菌菌株分别接种在燕麦粉琼脂、酵母膏麦芽膏琼脂或本氏固体培养基^[11],于 28℃ 生长 4d。转接在酵母膏麦芽膏液体培养基,于 28℃ 生长 36~48h,收集菌丝体。菌体处理和脉冲电泳参照文献[12]稍微修改:用 TE25S 缓冲液(20mmol/L Tris·HCl(pH8.0),25mmol/L EDTA,10%蔗糖)悬浮菌体。采用比色法对包埋的菌体浓度进行测定,按一定的比例将菌体与 2% 低熔点琼脂糖混合,菌体终浓度控制在 OD₆₀₀ 为 1.0~6.0,琼脂糖终浓度为 1%。胶块凝固后,用 2mg/mL 溶菌酶处理 2h 后,用 2mg/mL 蛋白酶 K 处理 24~48h。经 TE 洗涤 4 次后,在 4℃ 下保存于 TE 中。高分子量 DNA Marker 购自 Bio-Rad 公司,其余生化试剂购自 Promega、华美、上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 脉冲场电泳

脉冲电泳仪采用 Bio-Rad CHEF DR III 型脉冲场电泳仪(Richmond,California)脉冲电泳条件见表 2。

表 2 脉冲电泳条件

DNA 大小 /kb	转换时间 /s	电泳时间 /h	电压 (V/cm)	电泳角度	琼脂糖浓度 /%	电泳 缓冲液
2~50	1~6	11	6	120	1.0	0.5×TBE
50~1000	50~90	22	6	120	1.0	0.5×TBE
220~2200	60~120	24	6	120	1.0	0.5×TBE
3500~5700	1800	72	2	106	0.8	1.0×TAE

1.4 质粒拷贝数测定

将电泳凝胶用 IS-1000 全自动数字成像系统(Alpha Innotech Corporation)扫描分析,得出染色体与质粒分数,根据公式计算质粒拷贝数。质粒拷贝数(个/细胞)计算公式:

$$N = \frac{C_p \times B_c}{C_c \times B_p}$$

N 是质粒拷贝数;C_p 是质粒分数;B_c 是染色体大小(kb);C_c 是染色体分数;B_p 是质粒大小(kb)。

2 结果

2.1 来自放线菌 15 个属的菌株均含有线型结构的染色体

属于革兰氏阳性细菌的放线菌有 56 个典型属^[13]。在链霉菌等 5 个属中检测到线型染色体,而红球菌属和拟无枝菌酸菌属的染色体可能为环型^[3,10]。我们以来自放线菌 15 个属 19 个不同种的菌株(表 1)为对象,利用脉冲电泳技术检测染色体的构型和大小。图 1 表明 19 株放线菌染色体 DNA 经过原位溶菌和蛋白酶 K 处理后,均可以进入凝胶,暗示这些菌株的染色体 DNA 均为线型结构。所有菌株染色体

DNA 在凝胶中的电泳位置与变铅青链霉菌 ZX7 染色体 DNA(约 8600kb , 见文献 [14]) 相似。除染色体 DNA 外 , 在珊瑚诺卡氏菌(图 1 泳道 18) 和桔橙糖多孢菌(图 1 泳道 19) 中还检测到线型质粒 DNA 带。

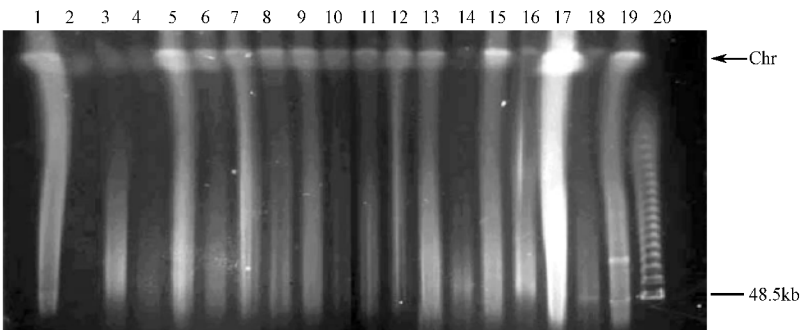


图 1 脉冲电泳检测放线菌线型染色体

1. *S. lividans* ZX7 (SLP2) ; 2. *N. corallina* 37 ; 3. *N. asteroides* 334 ; 4. *N. mexicana* IFO-3927 ; 5. *A. chengduensis* 4259 ; 6. *Actinomyces* sp. 13.7 ; 7. *S. rubroaurantiaum* 4.180 ; 8. *A. xingjiangensis* CCTCC97020 ; 9. *M. yulongensis* 917 ; 10. *D. fuscoaurantiacum* 2063 ; 11. *A. kunmingensis* 15 ; 12. *A. yunnanensis* 21 ; 13. *A. dassonvillei* 41170 ; 14. *N. uniformis* II-102 ; 15. *Rhodococcus* sp. C-14-1 ; 16. *Mycobacterium* sp. ATCC607 ; 17. *A. mediterranei* WT ; 18. *N. corallina* 38 ; 19. *S. aurantiaca* 4001 20. λ DNA multimer Marker. Conditions : 0.5% agarose gel , 6 v , 22 h , 50 ~ 90 s pulse. Chr : Chromosome.

2.2 在放线菌 5 个属的菌株中检测到不同大小和拷贝数的线型质粒

为了研究放线菌中存在的线型质粒 , 我们改变了脉冲电泳的条件。以检测约 2 ~ 50kb 范围的条件电泳 , 图 2 表明在珊瑚诺卡氏菌(泳道 18) 中存在大小约 48kb 线型质粒 DNA 带 , 拷贝数 30 个/细胞 , 分枝杆菌(泳道 16) 中存在约 35kb 和 45kb 两种线型质粒 DNA 带 , 拷贝数分别为 12 个/细胞和 9 个/细胞 , 而桔橙糖多孢菌(泳道 19) 中则检测到约 25kb 的质粒 DNA 带 , 拷贝数 11 个/细胞。

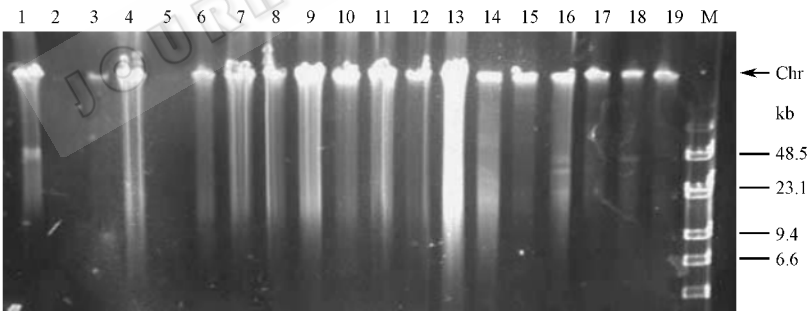


图 2 改变脉冲电泳条件以检测小的线型质粒

1. *S. lividans* ZX7 (SLP2) ; 2. *N. corallina* 3 ; 3. *N. asteroides* 334 ; 4. *A. chengduensis* 4259 ; 5. *N. mexicana* IFO-3927 ; 6. *Actinomyces* sp. 13.7 ; 7. *S. rubroaurantiaum* 4.180 ; 8. *A. xingjiangensis* CCTCC97020 ; 9. *M. yulongensis* 917 ; 10. *D. fuscoaurantiacum* 206 ; 11. *A. kunmingensis* 15 ; 12. *A. yunnanensis* 21 ; 13. *A. dassonvillei* 41170 ; 14. *N. uniformis* II-102 ; 15. *Rhodococcus* sp. C-14-1 ; 16. *Mycobacterium* sp. ATCC607 ; 17. *A. mediterranei* WT ; 18. *N. corallina* 38 ; 19. *S. aurantiaca* 4001 ; M. λ DNA/ *Hind* III Marker. Conditions : 0.5% agarose gel , 6 v , 11h , 1 ~ 6s pulse. Chr : Chromosome.

测试不同的脉冲电泳条件 , 以及多次重复实验 , 在所检测的 19 株菌中我们还发现存在其他不同大小和拷贝数的线型质粒。图 3 显示红球菌(泳道 1) 中存在一个约 140kb 的线型质粒 DNA 带 , 拷贝数为 3 个/细胞。除约 40kb (在该电泳条件下 35kb 和 45kb 的线型 DNA 电泳几乎在同一位置) 的高拷贝数线型质粒外 , 在分枝杆菌(泳道 2) 中还存在一个约 520kb 的线型质粒 DNA 带 , 拷贝数 2 个/细胞。除约 25kb 的低拷贝数线型质粒外 , 在桔橙糖多孢菌(泳道 3) 则还检测到一个约 160kb 的高拷贝数线型质粒 DNA 带 (拷贝数

15个/细胞)和一条约410kb的低拷贝线型质粒DNA带(拷贝数<1个/细胞)地中海拟无枝菌酸菌(泳道5)中存在一个约750kb的线型质粒DNA带,拷贝数<1个/细胞。

3 讨论

在常规脉冲电泳条件下线型DNA大分子能够进入凝胶中运动,而高分子量的环型超螺旋DNA则无法离开上样孔进入凝胶^[3,10]。利用线型与环型DNA大分子在脉冲电泳条件下这个特点,我们对来自放线菌15个属19个不同种的菌株进行分析,确定均存在线型结构的染色体,排除了Redenbach等^[10]认为的红球菌属和拟无枝菌酸菌属的染色体可能为环型结构的假设。Redenbach等^[10]发现在不同脉冲电泳条件下,不同大小的线型DNA分子得到不同程度的分开。类似地,通过改变脉冲电泳条件以及重复试验,我们还发现放线菌5个属的菌株中存在不同大小和拷贝数的线型结构的质粒。

红球菌C-14-1对石油废料中的十六烷烃具有降解能力(曹薇寰,未发表),了解该菌株中存在的大的线型质粒是否携带降解十六烷烃相关的基因是有非常重要的意义。与红球菌属亲缘关系近的珊瑚诺卡氏菌38菌株中发现的较小的高拷贝线型质粒,可用于研究链霉菌之外的放线菌线型质粒是否具有不同与链霉菌的新的生物学功能。此外,可利用红球菌或诺卡氏菌线型质粒稳定复制和接合转移所需的基本单元,发展放线菌人工线型染色体,来构建可以降解多种有毒化合物的超级降解菌株。

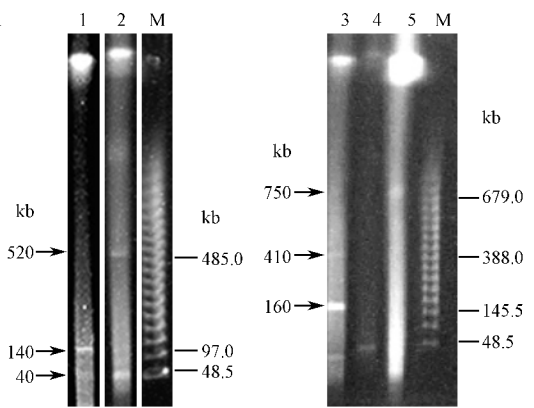


图3 脉冲电泳检测放线菌线型质粒

1. *Rhodococcus* sp. C-14-1; 2. *Mycobacterium* sp. ATCC607; 3. *S. aurantiaca* 4001; 4. *N. corallina* 38; 5. *A. mediterranei* WT; M. λ DNA multimer ladder. Conditions: 0.5% agarose gel, 6 v, 22 h, 50 ~ 90 s pulse. Arrow figure plasmid band.

参 考 文 献

[1] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich :The John Innes Foundation Press ,2000. 10 ~ 11.

[2] Warhurst A, Fewson C. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit Rev Biotechnol*, 1994, **14**(1) 29 ~ 73.

[3] Lin Y S, Kieser H M, Hopwood D A, et al. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol*, 1993, **10** : 923 ~ 933.

[4] Kinashi H, Shimaji M, Sakai A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature*, 1987, **328** : 454 ~ 456.

[5] Shimizu S, Kobayashi H, Masai E, et al. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** : 2021 ~ 2028.

[6] Chang P C, Cohen S N. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *streptomyces* plasmid. *Science*, 1994, **265** : 952 ~ 954.

[7] Qin Z, Cohen S N. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid pSLA2. *Mol Microbiol*, 1998, **28** : 893 ~ 903.

[8] Qin Z, Cohen S N. Long palindromes formed in *Streptomyces* by nonrecombinational intra-strand annealing. *Genes Dev*, 2000, **14** : 1789 ~ 1796.

[9] Qin Z, Cohen S N. Survival mechanisms for *Streptomyces* linear replicons after telomere damage. *Mol Microbiol*, 2002, **45** : 785 ~ 794.

[10] Redenbach M, Scheel J, Schmidt U. Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, **74** : 115 ~ 125.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Leeuwenhoek , 2000 , **78** : 227 ~ 235 .

[11] 卢振祖 . 细菌分类学 . 武汉 : 武汉大学出版社 , 1994 . 325 .

[12] Lezhava A , Mizukam T , Kajitani T , *et al.* . Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus* . *J Bacteriol* , 1995 , **177** : 6492 ~ 6498 .

[13] 姜成林 , 徐丽华 , 许宗雄 . 放线菌分类学 . 昆明 : 云南大学出版社 , 1993 . 3 ~ 5 .

[14] Bentley S D , Chater K F , Cerdeno-Tarraga A M , *et al.* . Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) . *Nature* , 2002 **417** : 141 ~ 147 .

Detection of Linear Chromosomes and Plasmids Among 15 Genera in the *Actinomycetales*

Ma Ning¹ Ma Wei¹ Jiang Chenglin² Fang Ping³ Qin Zhongjun^{1*}

(¹ Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China)

(² Yunnan Institute of Microbiology , Yunnan University , Yunnan 650091 , China)

(³ College of Environmental Sciences & Engineering , National Key Laboratory of Pollution Control & Reuse , Tongji University , Shanghai 200092 , China)

Abstract : Bacterial chromosomes and plasmids are commonly circular , however , linear chromosomes and plasmids were discovered among 5 genera of the *Actinomycetales* . Here , we use pulsed field gel electrophoresis to study the genomes of 19 species which belong to 15 genera in the *Actinomycetales* . All chromosomes of 19 species are linear DNA , and linear plasmids with different sizes and copy numbers are detected among 5 species . This work provide basis for investigating the possible novel functions of linear replicons beyond *Streptomyces* and also helps to develop *Actinomycetales* artificial linear chromosome .

Key words : *Actinomycetales* , Linear chromosomes , Linear plasmids

Foundation item : Shanghai Natural Science Foundation (02ZA14096)

* Corresponding author . Tel 86-21-64042090-4717 ; Fax 86-21-64170709 ; E-mail : qin@iris.sipp.ac.cn

Other author : Zhang Yalei³

Received date : 11-25-2002

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持！为了适应改革开放的需要，使科研成果尽快得到交流，2004年（44卷第1期开始）本刊将全新改版，更换彩色封面，由原来的小16开本改为标准大16开本（210×297），双月刊，每册128页，发表周期缩短，内容更加丰富详实。欢迎投稿！欢迎订阅！欢迎提出宝贵意见！

《微生物学报》编辑部

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>