

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 轉化的研究

I. 受体菌株的篩选*

湯懋竑 童克忠

陈 慎 相望年

(中国科学院遗传研究所, 北京)

(中国科学院微生物研究所, 北京)

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 由于营养要求简单, 能在基本培养基上生长, 便于篩选营养缺陷型, 并且某些代謝途径也研究得較清楚, 因而用来作轉化材料, 有利于研究轉化条件和机制, 以及 DNA^[1] 与代謝間的关系^[1-3]。此外, RNA 作为枯草杆菌轉化因素的問題^[4,4a], 也有待进一步研究。

細菌的轉化現象, 已在不少細菌物种中发现^[5], 然而在同一个細菌物种中, 仅有少数菌株可以作为受体。現有資料表明, 适于轉化某一性状的受体菌株, 往往也适合于轉化其它性状^[1,6-8], 而由某一給体引起轉化的受体菌株, 經常亦可由其它給体引起^[9]; 因此, 在选择轉化材料时, 首先須着重寻找受体菌株。

在选用轉化性状时, 一方面由于抗鏈霉素的轉化已有不少报导, 另一方面則因为枯草杆菌野生型菌株对鏈霉素敏感, 并容易获得抗鏈霉素的突变体。因此, 本文先用抗鏈霉素突变体作給体, 从大量鏈霉素敏感的野生型菌株中篩选可以轉化的受体菌株, 然后以篩选到的受体菌株誘变营养缺陷型, 再用作受体进行轉化。

一、材料和方法

用作受体菌株的来源 为获得大量的菌株, 曾向北京、上海、浙江、江西、湖南、湖北和四川等省市有关的 17 个单位²⁾ 搜集到枯草杆菌 33 株, 加上微生物研究所保存的 116 株, 共 149 株, 从中篩选受体菌株。其中 Ki-2 系江西农学院贈与, 6633 由北京农业大学贈与, IRC-2 和 IRC-7 由科学院植物生理研究所轉送, 1.373 系微生物研究所保存的菌株。所有菌株都不能在含有鏈霉素硫酸盐 50 微克/毫升的肉湯琼脂上生长, 大部分不能在 10 微克/毫升的培养基上生长。

用作給体的菌株

1.373 Sm-r-1: 系由 1.373 于含鏈霉素硫酸盐 5 微克/毫升的肉湯琼脂上挑选单菌落后, 再在 20 微克/毫升的上述培养基上分离所得的突变体, 能在含鏈霉素硫酸盐 100 微克/毫升的培养基上正常生长。

6633Sm-r-5: 在含鏈霉素硫酸盐 40 微克/毫升的肉湯琼脂上, 从 6633 中分离的突变体, 能在

* 彭德兴参加整个技术工作, 金振华和王清海同志曾参加部分工作, 特此致謝。

1) 本文所用簡称: DNA——脱氧核糖核酸; RNA——核糖核酸; DNase——脱氧核糖核酸酶; RNase——核糖核酸酶; Sm-r——抗鏈霉素突变体。

2) 承江西农学院, 江西医学院, 浙江农业大学, 浙江医科大学, 湖南医学院, 武汉大学, 湖北医学院, 四川医学院, 四川大学, 北京大学, 北京农业大学, 化工部上海医药工业研究所, 卫生部生物制品鉴定所, 輕工业部发酵研究所, 后字 231 部队, 中国科学院植物生理研究所和中国科学院药物研究所等 17 个兄弟单位寄贈菌株, 特此致謝。本文为中国微生物学会 1963 年学术年会轉稿。

含鏈霉素硫酸盐 500 微克/毫升的培养基上正常生长。

Ki-Sm-r-4: 由 Ki-2 在含鏈霉素硫酸盐 50 微克/毫升的肉湯琼脂上分离的突变体, 能在含鏈霉素硫酸盐 100 微克/毫升的培养基上正常生长。

IRC-7 Sm-r-1: 由 IRC-7 在含鏈霉素硫酸盐 50 微克/毫升的肉湯琼脂上分离的突变体, 能在含鏈霉素硫酸盐 100 微克/毫升的培养基上正常生长。

核酸的提取 比較过一些方法以后, 基本上按照 Nester 和 Lederberg^[11] 所采用的方法进行。將給体菌株接种在肉湯培养基中 (其成分为: 肉膏 0.3%、蛋白胨 0.6%、酵母膏 0.3%、氯化鈉 0.1%), 37°C 振荡培养 (每分鐘 170 轉, 振幅 6 厘米) 16 小时, 离心收集細菌, 用 0.14M 氯化鈉和洗两次, 按照細菌湿重每克加入 4 毫升的比例, 將細菌悬浮于含有 0.14M 氯化鈉, 0.01M 檸檬酸鈉, 0.01M 磷酸緩冲液 (pH 6.6) 和 1 毫克/毫升溶菌酶的溶液中, 在 37°C 水浴中保温, 直至悬浮液变成半透明的粘液。加入 10 倍体积的 0.14M 氯化鈉和 0.01M 檸檬酸鈉, 在 0°C 18,500g 离心 20 分鐘, 將沉淀悬浮于 4 倍体积 (指溶菌酶溶解时的体积) 的 2M 氯化鈉, 在 4°C 的冰浴中, 用磁力攪拌器攪拌半小时, 然后在 0°C 18,500g 离心 30 分鐘, 在上清液中加入 2 倍体积預冷至 0°C 的 95% 乙醇, DNA-蛋白成纖維状沉淀, 用玻璃棒挑出, 溶于 2M 氯化鈉中, 在冰箱放置过夜后, 加入等体积的氯仿-辛醇 (5:1) 混合液, 手搖 10 分鐘后, 于 2000 轉/分离心 10 分鐘, 吸出上层液体, 繼續用氯仿-辛醇混合液脫蛋白, 直至中层的蛋白質不見为止 (一般需脫蛋白 5—7 次)。最后一次脫蛋白离心后, 吸出上层清液, 加入 2 倍体积的 95% 乙醇, DNA 成纖維状沉淀, 用玻璃棒挑出, 溶于 2M 氯化鈉和 0.01M 磷酸緩冲液 (pH 7.4), 于冰箱保存备用。这样提取的核酸中, 既有 DNA, 也有 RNA。为了保证所提的核酸无菌, 自溶菌酶溶解以后的步驟都用无菌操作, 磁力攪拌后高速离心, 以及多次用氯仿-辛醇处理, 都是比較重要的步驟。

DNA 的測定采用二苯胺反应^[10], 并排除了盐浓度的影响^[11]。RNA 的測定利用地衣酚反应^[12]。

轉化的步驟^[13] 將受体菌株接种于 3 毫升肉湯培养基中, 37°C 振荡培养 16 小时, 离心, 將菌体用第一种无机培养基¹⁾洗一次, 再悬浮于 3 毫升第一种培养基中, 37°C 振荡培养 4 小时后离心, 將菌体悬浮在 1 毫升第二种无机培养基²⁾中。將此悬浮液接种在 16×160 毫米試管中, 进行下列处理:

处 理	第二种无机培养基 (毫升)	核 酸 (毫升)	菌 液 (毫升)	2M NaCl + 0.01M 磷酸緩冲液 (pH 7.4) (毫升)
轉 化	1.7	0.1	0.2	0
受体对照	1.7	0	0.2	0.1
核酸对照	1.9	0.1	0	0

各种处理的試管都斜放在搖床上, 在 37°C 振荡培养 90 分鐘^[14]后, 經不同倍数稀释, 取 0.1 毫升涂布在含有鏈霉素硫酸盐 (100 微克/毫升) 和普通的肉湯琼脂上, 一般每管作五个培养皿, 37°C 培养两天后, 分別計数抗鏈霉素轉化体的数目和总細菌数。

所用的营养缺陷型的菌株, 系經紫外綫誘变得到的。它的轉化的基本步驟与抗鏈霉素轉化步驟相同, 不同的是: 当用氨基酸缺陷型作受体时, 則在第一种无机培养基中用 1% 水解酪蛋白代替酵母膏, 在第二种无机培养基中补加 0.1% 水解酪蛋白; 当用尿嘧啶缺陷型作受体时, 則在第一种无机培养基中用 0.2% 核糖核酸水解液代替酵母膏, 在第二种无机培养基中补加 0.02% 核糖核酸水解液。在 Demain 无

1) 第一种无机培养基成分:

(NH₄)₂SO₄ 0.2%; K₂HPO₄ 1.4%; KH₂PO₄ 0.6%; 檸檬酸鈉 0.1%; 葡萄糖 0.5%; 酵母膏 0.01%; MgSO₄·7H₂O 0.02%。

2) 第二种无机培养基成分:

(NH₄)₂SO₄ 0.2%; K₂HPO₄ 1.4%; KH₂PO₄ 0.6%; 檸檬酸鈉 0.1%; MgSO₄·7H₂O 0.02%; 葡萄糖 0.5%; 乙二胺四乙酸鈉 20 微克/毫升。

机培养基^[15]上計算轉化体, 在补充了所需生长因素的 Demain 无机培养基或普通的肉湯琼脂培养基上計算总菌数。

結 果

从抗鏈霉素突变体 1.373 Sm-r-1 和 6633 Sm-r-5 分別提取核酸后, 将其核酸等量混合, 对 149 株鏈霉素敏感的菌株进行轉化試驗, 观察到混合核酸可以将鏈霉素敏感的菌株 Ki-2 轉化为抗鏈霉素的菌株。随后又从 Ki-2 分离到抗鏈霉素的突变体 Ki-Sm-r-4, 从中提取核酸, 再分別以 Ki-Sm-r-4、6633 Sm-r-5 和 1.373 Sm-r-1 的核酸与 Ki-2 所进行的轉化以及用誘变 Ki-2 获得的营养缺陷型作受体的轉化, 都証明 Ki-2 是一个可以轉化的受体菌株。

1. DNA 的特异性 从抗鏈霉素的 Ki-Sm-r-4、6633 Sm-r-5 和 1.373 Sm-r-1 所提取的核酸, 都可使鏈霉素敏感的 Ki-2 轉化成抗鏈霉素, 而 Ki-2 自身的核酸以及商品的魚精 DNA 都沒有轉化活性。若轉化以前, 分別用 10 微克/毫升的 RNase (結晶, 德国

表 I 枯草杆菌不同給体 DNA 对 Ki-2 的轉化活性

給 体	核 酸 含 量 (微克/毫升)		酶 处 理	抗鏈霉素 (100 微克/毫升) 的轉化体数	
	DNA	RNA		菌落数/培养皿*	轉化頻率
Ki-Sm-r-4	5.00	0.78	—	653.0	4.5×10^{-5}
Ki-Sm-r-4	5.00	0.78	DNase	0	0
Ki-Sm-r-4	5.00	0.78	RNase	637.3	4.4×10^{-5}
Ki-Sm-r-4 核酸对照	5.00	0.78	—	0	—
6633 Sm-r-5	5.00	0.38	—	361.8	2.5×10^{-5}
6633 Sm-r-5	5.00	0.38	DNase	0	0
6633 Sm-r-5	5.00	0.38	RNase	278.5	1.9×10^{-5}
6633 Sm-r-5 核酸对照	5.00	0.38	—	0	—
1.373 Sm-r-1	2.50	0.43	—	67.0	4.7×10^{-6}
1.373 Sm-r-1	2.50	0.43	DNase	0	0
1.373 Sm-r-1	2.50	0.43	RNase	167.2	1.2×10^{-5}
1.373 Sm-r-1 核酸对照	2.50	0.43	—	0	—
Ki-2	1.00	0.72	—	0	0
Ki-2 核酸对照	1.00	0.72	—	0	—
魚精 DNA	5.00	—	—	0	0
—**	—	—	—	0	—

* 每一培养皿接种 0.1 毫升, 重复 5 次。

** 不加核酸的受体对照。

Carlroth Karlsruhe 出品) 或 DNase (活性 25%, 德国 Carlroth Karlsruhe 出品) 处理核酸, 则 DNase 可将其转化活性完全破坏, 而 RNase 则否 (表 1)。

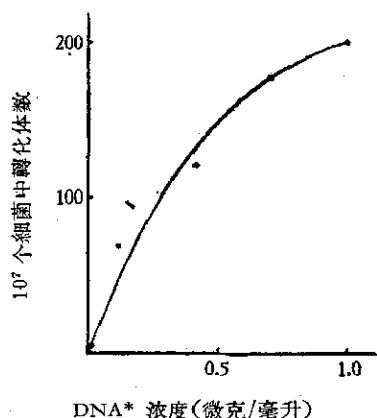


图 1 DNA 浓度与转化频率的关系

* 从 Ki-Sm-r-4 提取的核酸转化前经 10 微克/毫升 RNase 处理。

2. DNA 浓度与转化频率的关系 如图 1 所示, 在一定浓度范围以内, 随着 DNA 浓度的增加, 转化体数亦随之增加。

3. 转化体 DNA 的转化活性 Ki-2 为受体, 以 1.373 Sm-r-1 和 6633 Sm-r-5 的混合核酸进行转化, 从所获得的抗链霉素转化体中, 随机挑出一个单菌落, 所提取的核酸同样也可使 Ki-2 转化成抗链霉素。这个转化体 DNA 的转化活性亦被 DNase (10 微克/毫升) 完全破坏, 而 RNase (10 微克/毫升) 则毫无作用 (表 2)。

4. 混合核酸中, 没有转化活性的 DNA 对转化作用的影响 前面的试验结果已经证明 1.373 Sm-r-1、6633 Sm-r-5 和 Ki-Sm-r-4 三个抗链霉素突变体的核

酸对 Ki-2 都有转化活性, 但在所试验的给体菌株中, 并不是每一菌株都有这样的活性。例如, 从我们的抗青霉素转化试验中, 观察到 IRC-7 并不能作为 Ki-2 (对青霉素敏感) 的给体。为了明确 IRC-7 是否可作为抗链霉素的给体, 从 IRC-7 中选出抗链霉素突变体 IRC-7 Sm-r-1, 从中提取核酸, 以 Ki-2 为受体, 进行抗链霉素转化。试验结果表明, IRC-7 Sm-r-1 不能当作抗链霉素转化的给体。考虑到以混合核酸来筛选受体菌株时, 有可能遇到不能作给体的抗链霉素突变体, 因此, 进一步研究了无转化活性的 DNA (IRC-7 Sm-r-1 的 DNA) 与有转化活性的 DNA 以不同比例的混合对转化的影响。表 3 的资料说明, 在混合核酸中, IRC-7 Sm-r-1 的 DNA 所占的比例越大, 抑制转化活性的百分率也越大。

表 2 枯草杆菌 Ki-2 转化体 DNA 的转化活性

受 体	给 体	核 酸 含 量 (微克/毫升)		酶 处 理	抗链霉素(100 微克/毫升) 的转化体数	
		DNA	RNA		菌落数* 培养皿	转化频率
Ki-2	转化体	5.00	1.37	—	75.2	5.2×10^{-6}
Ki-2	转化体	5.00	1.37	DNase	0	0
Ki-2	转化体	5.00	1.37	RNase	75.3	5.2×10^{-6}
Ki-2 受体对照	—	—	—	—	0	—
—	转化体 核酸对照	5.00	1.37	—	0	—

* 每一培养皿接种 0.1 毫升, 重复 5 次。

5. 菌株 Ki-2 经紫外线照射后获得的各种突变体的转化 菌株 Ki-2 经紫外线照射后获得了在 Demain 无机培养基^[15]上需要补充尿嘧啶、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬

表 3 枯草桿菌 IRC-7 Sm-r-1 DNA 对轉化的抑制作用

受体	給 体		IRC-7 Sm-r-1 的 DNA 所占 DNA 总量的 %	轉化活性降低 %
	菌 株	混合比例		
Ki-2	Ki-Sm-r-4:6633 Sm-r-5: 1.373 Sm-r-1: IRC-7 Sm-r-1	1:1:1:1	25	29.4
Ki-2	Ki-Sm-r-4: 6633 Sm-r-5:1.373 Sm-r-1: IRC-7 Sm-r-1	1:1:1:3	50	42.4
Ki-2	6633 Sm-r-5:IRC-7 Sm-r-1	1:10	90.9	95.7
Ki-2	6633 Sm-r-5:IRC-7 Sm-r-1	1:100	99	100

酸+异亮氨酸、苏氨酸+蛋氨酸、纈氨酸+亮氨酸+异亮氨酸、苏氨酸+异亮氨酸+纈氨酸、苏氨酸+亮氨酸+异亮氨酸+纈氨酸才能生长的突变体各一株。用这些营养缺陷型作受体,以野生型 Ki-Sm-r-4 的核酸为給体进行轉化,結果証实,所有这些营养缺陷型对营养要求的特性和抗鏈霉素的特性一样也可进行轉化,它們的轉化頻率一般也在 10^{-6} — 10^{-5} 之間。

討 論

从 149 株枯草杆菌中,获得一株抗鏈霉素特性和多种营养要求性状都可轉化的受体菌株,而作为給体的四个菌株中,則只有 IRC-7 Sm-r-1 的核酸沒有轉化抗鏈霉素的活性。因此,在寻找轉化材料时,应着重寻找受体菌株。从多量菌株中篩选受体时,只需用少数給体进行測定,这样較之用所有菌株互为受体和給体进行篩选,可以大大減少工作量。

在本实验所用的几个抗鏈霉素突变体中,也有个别突变体不能作为給体菌株。这个現象在 *Hemophilus influenzae* 荚膜性状的轉化中,也曾有过报导^[9]。在篩选受体菌株时,若只用单个的給体进行篩选,可能出現两种不利的情况:第一,个别菌株不能作給体;第二,有些給体对某些受体有效,而对另一些受体則沒有轉化活性^[9]。为了克服这些困难,可以混合几个核酸来进行篩选工作。

沒有轉化活性的 DNA,对具有轉化活性的 DNA 能产生竞争性的抑制作用,然而不能作为給体的菌株仅占少数,所以等量混合若干菌株的核酸进行轉化測定,即使其中有个別核酸对轉化具有抑制作用,也不致完全抑制轉化的进行,从而影响結果。

摘 要

混合两个枯草杆菌抗鏈霉素突变体的核酸,对 149 株枯草杆菌进行轉化試驗,篩选到 Ki-2 为一可轉化的受体菌株。用紫外綫誘变,从 Ki-2 获得的 9 个营养缺陷型其中包括尿嘧啶、异亮氨酸、絲氨酸、苏氨酸、纈氨酸加异亮氨酸、苏氨酸加蛋氨酸、纈氨酸加亮氨酸加异亮氨酸、苏氨酸加异亮氨酸加纈氨酸、苏氨酸加亮氨酸加异亮氨酸加纈氨酸的缺陷型各一个,都可进行轉化。以单独核酸分別进行轉化試驗表明,四个抗鏈霉素突变体中,有一个不能作給体。观察了有轉化活性的 DNA 与无轉化活性的 DNA 按不同比例混合后对轉化作用的影响。討論了用混合不同給体核酸从大量菌株中篩选受体菌株的方法。

参 考 文 献

- [1] Nester, E. W. and Lederberg, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**:52—55, 1961.
- [2] Ephrati-Elizur, E., Srinivasan, P. R. and Zamehof, S.: *Ibid.*, **47**:56—63, 1961.
- [3] Anagnostopoulos, C. and Crawford, I. P.: *Ibid.*, **47**:378—390, 1961.
- [4] 沈善炯、洪孟民、蔡瑞珠、陈蕙珠、张文玲: 科学通报, 1960: 491—494.
- [4a] Shen, S. C., Hong, M. M., Cai, R. C., Chen, W. C. and Chang, W. L.: *Scientia Sinica* **11**:233—240, 1962.
- [5] Ravin, A. W.: *Advances in Genetics*, **10**:61—163, 1961.
- [6] Spizizen, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**:1072—1078, 1958.
- [7] ———: *Federation Proc.*, **18**:957—965, 1959.
- [8] Бреслер, С. Е. и Перумов, Д. А.: *Биохимия*, **27**: 927—937, 1962.
- [9] Alexander, H. E. and Leidy, G.: *J. Exptl. Med.*, **93**:345—359, 1951.
- [10] Schneider, W. C.: In *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. Colowick and N. O. Kaplan), Vol. III, pp. 680—684, 1957.
- [11] 李载平、甘人宝, 生物化学与生物物理学报, **2**: 182—193, 1962.
- [12] Schneider, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **161**:293—303, 1945.
- [13] Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J.: *J. Bacteriol.*, **81**:741—746, 1961.
- [14] Fox, M. S.: *J. Gen. Physiol.*, **43**:737—748, 1959.
- [15] Demain, A. L.: *J. Bacteriol.*, **75**:517—522, 1958.

STUDIES ON THE TRANSFORMATION OF *BACILLUS SUBTILIS*

I. SCREENING OF RECIPIENT STRAINS

TANG MOU-HUNG TONG KE-ZHONG CHEN SHEN SIANG WAN-NIEN

(Institute of Genetics, Academia
Sinica, Peking)

(Institute of Microbiology,
Academia Sinica, Peking)

For the isolation of recipient strains of *Bacillus subtilis* for transformation studies, streptomycin resistance was selected as a genetic marker. Two streptomycin-resistant mutants (100 $\mu\text{g/ml}$), viz., 1.373 Sm-r-1 and 6633 Sm-r-5, isolated from 1.373 and 6633 respectively, were used as donor strains. Nucleic acids were extracted separately from each strain and mixed in equal portions for study. Among 149 streptomycin-sensitive strains, a strain, Ki-2, was found to be transformable for streptomycin resistance (100 $\mu\text{g/ml}$) whether the two donor nucleic acids were used together or singly. The frequency of transformation was found to be 10^{-5} and the responsible agent was identified as deoxyribonucleic acid (DNA). The DNA extracted from IRC-7 Sm-r-1, a streptomycin-resistant mutant from strain IRC-7, was found to be inactive in transferring streptomycin resistance to Ki-2. The DNA of IRC-7 Sm-r-1 was found to be inhibitory to the transformation activity of the DNAs of 1.373 Sm-r-1 and 6633 Sm-r-5.

Nine amino acid and pyrimidine auxotrophs of strain Ki-2 were obtained with ultraviolet irradiation. These nutritionally deficient mutants were transformed to nutritional independence under the action of DNA from wild-type strain. The frequency of transformation of these nutritionally deficient markers were found to be about 10^{-6} — 10^{-5} .

The method for screening of transformable recipient strains of *B. subtilis* from a large number of strains is discussed.