

研究报告

大肠杆菌 R40 质体的鉴别、转化及其分子量

范云六 姜书勤 郭殿瑞 王清海

(中国科学院微生物研究所,北京)

用 Q β 噬菌体鉴别出大肠杆菌 PH116 为 F⁻ 菌株。此菌株抗四环素, 对利福平敏感。通过与菌株 W1177F⁻Tet^S Rif^R 的接合转移试验, 肯定了 PH116 菌株的四环素抗性基因位于 R40 质体上。R40 质体的接合转移频率为 10⁻⁷。除接合转移外, R40 质体还可通过转化途径进行传递。R40^{*} 质体 DNA 分子呈超线团状及开放形环状。测量了 103 个 R40 质体 DNA 的外形长度, 求得平均长度为 1.03 微米 \pm 0.10。R40 质体 DNA 的分子量为 2 \times 10⁶ 道尔顿左右。

细菌质体是研究基因复制及表现的很好材料, 又是遗传工程的重要分子载体之一, 因此, 近年来关于细菌质体的研究正愈来愈引起重视。我们曾报道金黄色葡萄球菌的青霉素酶质体^[1]及四环素质体^[2]。本文报道大肠杆菌 PH116 菌株的 R40 质体鉴别、转化、分子长度及其分子量。

材料与amp;方法

(一) 菌株

大肠杆菌菌株 PH116 由首都医院供给。该菌株抗四环素、链霉素及磺胺。接合转移试验用大肠杆菌 AB311 Hfr^{**} Tet^S Rif^R, W1485 F⁺ Tet^S Rif^R, W1177 F⁻ Tet^S Rif^R 为受体, 转化试验用 C₆₀₀ 菌株为受体。用 Q β 噬菌体鉴别 PH116 菌株的致育性, 用大肠杆菌菌株 K12HfrH, K12HfrC, W1485 F⁺, W1177F⁻, H174F⁻, K12F⁻-Lac⁺2^S 作为对照菌株。

(二) 培养基

1. BPY 培养基⁽¹⁾: 用于活化细菌。

2. HI 培养基(克): 蛋白胨 5, 牛肉膏 1.5, 酵母膏 1.5, 糊精 1, 葡萄糖 1, K₂HPO₄ 3.68, KH₂PO₄ 1.32, NaCl 3.5, 维生素 B₁ 0.01, L-亮氨酸 0.1, L-苏氨酸 0.01, 溶于蒸馏水 1000 毫升中, pH

7.0。固体培养基则加 2% 琼脂。此培养基用于接合转移试验中细菌的培养。

3. A 培养基 (克): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, KH₂PO₄ 3, Na₂HPO₄ 6, 葡萄糖 5, NH₄Cl 1, MgSO₄ · 7H₂O 0.49, FeSO₄ · 7H₂O 0.0005, CaCl₂ 0.055, 甘油 3 毫升, 溶于蒸馏水 1000 毫升中, pH7.0。在提取质体 DNA 试验中用此培养基培养细菌。

(三) 紫外线诱变大肠杆菌获得抗利福平突变株

按文献(1)方法进行。

(四) Q β 噬菌体的增殖及利用对 Q β 噬菌体的敏感性来测定大肠杆菌 PH116 菌株的性因子

Q β 噬菌体在大肠杆菌 W2252 上增殖, 效价为 1 \times 10¹⁰ 颗粒/毫升。用点滴法^[3]测定 PH116 菌株对 Q β 噬菌体的敏感性。

(五) R 因子的接合转移 (Conjugal transfer)

给体及受体菌接种在 BPY 固体斜面上活化后, 分别接在 HI 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。各取给体及受体菌 0.1 毫升加入 5 毫升新鲜的

本文于 1976 年 7 月 12 日收到。

* R40 质体 DNA 103 个分子的电镜照片由生物物理所付广礼, 张锦珠同志拍照。本所乔宝义、刘如臻同志帮助电镜制片, DNA 分子长度由地理所李琳、金学英、陈宝文同志帮助测量计算。

** Tet^R——抗四环素, Rif^R——抗利福平, Tet^S——对四环素敏感, Rif^S——对利福平敏感。

HI 培养液中,混合菌液(细菌浓度为 5×10^8 细胞/毫升)置 37°C 静止培养,15 分钟后取出 0.1 毫升菌液,经适当稀释,分别涂布在选择培养基上,并作给体及受体的对照。 37°C 培养 24 小时,记录结果。

(六) 质体 DNA 的分离

按文献^[4,5,6,7] 方法进行。经活化的大肠杆菌 PH116 在 50 毫升的 A 培养液中, 37°C 振荡培养至对数期,冷却,离心(5000 转/分)10 分钟。用 25 毫升冷的 0.05M Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}8.0$)洗 2 次,菌体重新悬于 5 毫升 25% 蔗糖液中(用 0.05M Tris-HCl 缓冲液 $\text{pH}8.0$ 配制),在细胞悬液中加入 0.5 毫升新鲜配制的溶菌酶(10 毫克/毫升)及 1 毫升 0.5M EDTA ($\text{pH}8.2$), 25°C 恒温水浴中保温 10 分钟,用冷的吸管将其移至裂解混合液中,裂解混合液含 5% Brij58 0.8 毫升, 0.1M MgSO_4 0.8 毫升。在冰浴中使之作用 1—2 分钟。加核糖核酸酶使最后浓度为 50 微克/毫升[核糖核酸酶溶于 0.1M NaCl— 0.01M 醋酸盐缓冲液($\text{pH}5.2$) 中, 80°C 处理 10 分钟,除去可能存在的脱氧核糖核酸酶], 37°C 保温 60 分钟。加十二烷基硫酸钠(SDS)使最终浓度为 0.2%,至细胞裂解成粘稠状,立即加等量水饱和的重蒸酚,强烈振荡 10 秒钟后,在室温下缓和地振荡 20 分钟, 4°C 13000 转/分离心 15 分钟,小心地取出水相,加 2 倍体积 95% 的冷乙醇,用玻璃棒搅动,将 DNA 粗制品挑出,溶于等体积的 0.1 倍浓度 SSC— 0.005M EDTA 溶液(SSC 溶液: 0.15M 氯化钠和 0.015M 柠檬酸钠溶液)。待 DNA 完全溶解后,加入 1/10 体积的 10 倍浓度的 SSC,再加入 1M Tris-HCl ($\text{pH}9.0$) 缓冲液,使其最后浓度为 0.1M 。再重复两次酚处理,处理后的水相用等体积的乙醚处理 3 次,加冷 95% 乙醇沉淀 DNA。DNA 溶在等体积的 0.1 倍浓度的 SSC 溶液中,置 4°C 保存。

(七) R40 质体的转化 (Transformation)

受体菌为大肠杆菌 C_{600} , 在盛有 5 毫升 HI 培养液的大试管中(直径 2.0 厘米)培养,当在 590 毫微米波长处测定培养物光密度为 0.85 时,即将其于 4°C 4000 转/分离心 5—10 分钟,将细菌重新悬浮在 2.5 毫升冷的 0.01M NaCl 溶液中,离心,再悬浮于 2.5 毫升的 0.03M CaCl_2 溶液中,在

冰浴中保持 20 分钟后,4000 转/分离心 5—10 分钟,用 0.5 毫升 0.03M CaCl_2 溶液将细菌作成均匀的悬浮液。取 0.2 毫升悬浮液至灭菌试管中,用予先冷却的吸管取 0.1 毫升给体 DNA (含 0.03M CaCl_2) 加到细菌悬浮液中,试管在冰浴中静止 60 分钟后, 42°C 处理 2 分钟,重新置冰浴中冷却。取 0.1 毫升菌液涂布在每毫升含 25 微克四环素的 BPY 固体培养基上。 37°C 培养 24—48 小时后观察结果。同时作受体菌对照及给体 DNA 对照。在转化试验中所用 CaCl_2 溶液均经 1 公斤/厘米² 蒸汽压力灭菌 30 分钟,直接与菌有关的操作均在无菌室中进行。

(八) 电镜 DNA 样品的制备

DNA 样品经 TEN 缓冲液 [0.02M Tris ($\text{pH}8.0$)— 0.001M EDTA ($\text{pH}8.0$)— 0.02M NaCl] 透析后,稀释 10 倍, $O.D_{260}$ 为 0.26 左右 (DNA 含量为 13.7 微克/毫升)。取 4 微升 DNA 样品放在 36 微升 1.5M 的 NH_4AC — 0.001M EDTA 溶液中(每毫升溶液含 100—200 微克细胞色素 C),作为上相溶液。在直径为 9 厘米的培养皿中加入 0.2M NH_4AC 为下相溶液,将一片经洗液及蒸馏水洗涤过的载玻片斜放于培养皿中,载玻片的一端浸入下相溶液中,另一端搁在培养皿的边上。在下相溶液表面放少量滑石粉,用微量注射器吸取一滴上相溶液滴在距下相溶液 1 厘米左右的载玻片上,使液滴徐徐下流,当接触下相溶液表面时,滑石粉层后退,单分子层形成,静止约 1—2 分钟后,用载有火棉胶—碳膜的铜网,使支持膜向下,蘸取单分子层。将铜网在无水酒精中浸 2 次,每次 10—20 秒钟,以除去支持膜上多余液体。用国产 DM-300 型真空镀膜机旋转投影。真空度 5×10^{-3} “托”,钨丝直径 0.8 毫米,钨钨合金直径 0.02 毫米,用量每次 40 毫克,样品与金属蒸发源之间的投影角约 6—8 度,旋转台转速每分钟为 90 转。旋转投影后用日立 Hu-11A 电子显微镜观察。

(九) R40 质体 DNA 分子长度测量

用 50000 倍电光放大的 6×8 干板,以光学放大 2 倍,制成正片,然后用图形数字化器转换成数字,电子计算机计算。

(十) DNA 的测定

用二苯胺法^[16]。

实验结果及讨论

(一) 大肠杆菌 PH116 菌株四环素抗性标记的接合转移——R40 质体的鉴别

大肠杆菌 PH116 菌株抗四环素, 对利福平敏感。以 PH116 为给体, 用对四环素敏感的、经紫外线诱变后得到的抗利福平突变株 AB311Hfr, W1485F⁺, W1177F⁻ 为受体, 进行接合转移试验。选择标记是四环素抗性。在每毫升含 100 微克四环素及 50 微克利福平的 HI 培养基上选择接合转移子。实验结果(表 1) 表明, PH116 菌抗四环素标记的转移频率为 10⁻⁷。

表 1 大肠杆菌 PH116 四环素抗性标记的转移

给 体	受 体	接合转移频率
E. Coli PH116 Tet ^R Rif ^S	AB311 Hfr Tet ^S Rif ^R	1.4 × 10 ⁻⁷
E. Coli PH116 Tet ^R Rif ^S	W1485F ⁺ Tet ^S Rif ^R	6.0 × 10 ⁻⁷
E. Coli PH116 Tet ^R Rif ^S	W1177F ⁻ Tet ^S Rif ^R	9.8 × 10 ⁻⁷

注: 给体菌及受体菌分别在此每毫升含四环素 100 微克, 利福平 50 微克的 HI 培养基上均不生长。

我们知道, 抗药性标记的转移可以是 R 因子的转移, 但染色体上的抗药性标记也可通过 F 因子来转移(即使频率很低)。为了确定 PH116 菌株抗四环素的基因位置是否在质体上, 在实验中首先应考虑这个转移是否由于 F 因子所引起。Q β 噬菌体是 F⁻ 噬菌体, 可用来鉴别大肠杆菌的致育性(Fertility)。实验结果(表 2) 表明: PH116 菌株为 F⁻。根据表 1 中 PH116 为给体, W1177F⁻ 为受体菌进行四环素抗性标记的转移实验的结果, 可以判断四环素抗性标记是 R 因子接合转移, 因为这里不存在 F 因子的转移问题。从以上试验的结果我们得出下面的结论: 大肠杆菌 PH116 菌株的四环素抗性基因位于质体上, 这个质体(命名为 R40 质体) 是一个传递

性的质体(transmissible plasmid)。

表 2 用 Q β 噬菌体鉴别大肠杆菌 PH116 的致育性

菌 株		对 Q β 噬菌体的敏感性	致 育 性
对 照	Hfr C	+	F ⁺
	Hfr H	+	
	W1485 F ⁺	+	
菌 株	W1177 F ⁻	-	F ⁻
	H174 F ⁻	-	
	K12F ⁻ -Lac ⁺ λ ^S	-	
实验菌株 PH116		-	F ⁻

(二) R40 质体的转化

确定 PH116 菌带有抗四环素的 R40 质体后, 提取质体的 DNA, 用该 DNA 对不抗四环素的受体菌 C₆₀₀ 进行转化。另外, 还从 1 株随机挑选的四环素抗性的转化体 C₆₀₀(t₅₇)^{*} 中提取质体 DNA, 以四环素抗性为选择标记, 在相同的转化条件下, 对 C₆₀₀ 受体进行转化。试验结果列于表 3。

表 3 大肠杆菌 PH116 抗四环素质体的转化

处 理	转化体数目/ 微克 DNA
R40 DNA + C ₆₀₀	4154
C ₆₀₀ (t ₅₇)DNA + C ₆₀₀	3200
R40 DNA + DNase (50 微克/ 毫升) + C ₆₀₀	0
C ₆₀₀ (t ₅₇)DNA + DNase (50 微克/毫升) + C ₆₀₀	0
C ₆₀₀	0
R40 DNA	0
C ₆₀₀ (t ₅₇)DNA	0

注: BPY 固体培养基中含四环素 25 微克/毫升, 受体菌 C₆₀₀。

从表 3 可以看出, 受体菌 C₆₀₀、R40DNA 及 C₆₀₀(t₅₇)DNA 在 25 微克/毫升四环素的 BPY 固体培养基上都无菌落生长。当 R40 DNA 及 C₆₀₀(t₅₇)DNA 加上受体菌 C₆₀₀ 后, 出现抗四环素的转化体。每微克 DNA 得到的转化体数目分别为 3.2 × 10³ 及 4.15

* 由给体 PH116 受体 C₆₀₀ 进行四环素抗性标记的转化体。

$\times 10^3$ 。但经 DNase 处理后的 R40 DNA 及 C_{600} (t_{57}) DNA, 作用于受体菌 C_{600} 后, 在四环素的选择培养基上无转化体出现, 这些结果表明, R40 质体有转化活性, R40 质体可以通过转化的途径进行传递。

我们的转化实验结果还表明, R40 质体四环素抗性标记转化后, 可立即将菌液涂在含有四环素的培养基上, 四环素抗性基因的表现不需要转化后的前培养步骤。

在转化试验中得到的抗四环素的转化体, 均能在含 70 微克/毫升链霉素的 BPY 固体培养基上生长, 而受体菌 C_{600} 不能生长。在接合转移实验中, 我们也观察到 PH116 菌株的四环素抗性与链霉素抗性的共同转移。因此, 我们认为, 大肠杆菌 PH116 的链霉素抗性基因和四环素抗性基因均位于 R40 质体上。但是, 用链霉素抗性标记作为选择标记时, 对受体 C_{600} 进行转化, 转化实验中包括感受态菌在 42°C 经 2 分钟、4 分钟、6 分钟、8 分钟及 10 分钟处理, 以及转化后进行不同时间的前培养, 实验均未获得阳性结果。对这个现象, Cohen^[12] 曾有过类似的报道, 其原因尚待进一步研究。

(三) R40 质体 DNA 分子的电镜观察及其分子量

R40 质体 DNA 制片方法是蛋白单分子层法。图版 I-1、2、3 中的 R40 质体 DNA 分子放大倍数为十万倍。图版 I-1 中 R40 质体 DNA 的一个分子为超线团状 (supercoiled form); 另一个 DNA 分子为开放形环状 (open circular form)。图版 I-2 和图版 I-3 分别为另一个超线团状和开放形环状的 R40 质体 DNA 分子。

我们共测量了 103 个超线团状及开放形环状的 R40 DNA 分子的长度, 用生物统计法求得 R40 质体 DNA 分子平均外形长度及标准误差为 $1.03 \text{ 微米} \pm 0.10$ ($p < 0.05$)。

根据经验公式^[8]: $1 \text{ 微米 DNA} = 2.07 \times 10^6 \text{ 道尔顿}$, 故 R40 质体的分子量为 2×10^6 道尔顿左右 (表 4)。

表 4 大肠杆菌 PH116 菌株 R40 质体 DNA 的外形长度及分子量

质体名称	DNA 分子外形长度 (微米)		分子量 (道尔顿)
	测量的分子数目	外形长度 ± 标准误差	
R40	103	1.03 ± 0.1 ($p < 0.05$)	2.13×10^6

Cohen^[9] 报道了大肠杆菌 PSC101 质体, 它是从 R6—5 这个大质体中衍生出来的一个小质体, 这个质体带有抗四环素的基因, 分子长度为 3 微米, 分子量为 5.8×10^6 道尔顿。R40 质体在分子长度、分子量以及带四环素抗性基因等方面与 PSC101 质体相似, 同属于小质体。

根据我们的实际条件, 我们分离 R40 质体 DNA 采用的方法和原理是基于质体 DNA 比染色体 DNA 小, 以及质体 DNA 为环状等特点^[5]。根据文献报道, 用这个方法抽提质体 DNA, 纯度可达 95%^[10,11]。但是, 这并不影响我们电镜观察的结果, 因为, 从 DNA 分子长度来看, 大肠杆菌染色体 DNA 长度为 1000 微米, 而 R40 质体 DNA 分子长度为 $1.03 \text{ 微米} \pm 0.1$, 两者相差悬殊。不仅如此, 大肠杆菌染色体 DNA 要完整地保持环状易被抽提出来, 只有在严格特定的抽提条件下才有可能^[12,13,14], 而目前文献上所报道的抽提 DNA 的方法, 包括我们所采用的方法在内, 在抽提过程中, 染色体 DNA 由于受到各种切力 (shearing forces) 的作用, 不可能保持环状结构, 它们被断裂成为大小不同的直线片段。因此, 尽管在我们的 DNA 样品中还有 5% 的染色体 DNA, 但在电子显微镜下极易把这些直线状的片段与超线团状及开放形环状质体 DNA 分开。

参 考 资 料

- [1] 范云六, 姜书勤, 郭兴华, 王清海: 微生物学报, 14: 209, 1974.
- [2] 范云六, 姜书勤, 王清海: 微生物学报 16: 63, 1976.
- [3] Miller, J. H.: In "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, p. 98, 1972.
- [4] Godson, N. & Sinsheimer, R. L.: *Biochem. Biophys. Acta*, 149: 476, 1967.
- [5] Freifelder, D.: In "Methods in Enzymology", Vol. 21, Part D, p. 153, New York, Academic Press, 1971.
- [6] Cosloy, S. D. & Oishi, M.: *Molec. Gen. Genet.*, 124: 1, 1973.
- [7] Cohen, S. N. & Miller, C. A.: *J. Mol. Biol.*, 50: 671, 1970.

- [8] Lang, D. J. *Mol. Biol.*, 54: 557, 1970.
- [9] Cohen, S. N. & Chang, Annie C. Y.: In "Microbiology-1974", Edited by David Schlessinger, p. 66, 1975.
- [10] Clewell, D. B. & Helinski, D. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 62: 1159, 1969.
- [11] Meynell, G. G.: *Bacterial Plasmids*, Macmillan, p. 89, 1972.
- [12] Worcel, A. & Burgi, E.: *J. Mol. Biol.*, 71: 127, 1972.
- [13] Delius, H. & Worcel, A.: *J. Mol. Biol.*, 82: 107, 1974.
- [14] Kornberg, A.: In "DNA Synthesis", Freeman, W. H. & Company, p. 22, 1974.
- [15] Cohen, S. N. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 69: 2110, 1972.
- [16] Burton, K.: In "Methods in Enzymology" Vol. 12 Part B, p. 163, New York, Academic Press, 1968.

IDENTIFICATION, TRANSFORMATION AND MOLECULAR WEIGHT OF R40 PLASMID OF *ESCHERICHIA COLI* STRAIN PH116

Fan Yunliu, Jiang Shuqin, Guo Dianrui, Wang Qinghai

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The donor strain PH116 of *E. coli* was identified as F^- by its response to phage Q β . It is resistant to tetracycline but sensitive to rifampicin. Conjugal transfer was performed with W1177 F^- Tet^RRif^R as recipient. The frequency of conjugal transfer for plasmid R40 is 10^{-7} . In addition to conjugal transfer, the

transfer by plasmid R40 can be accomplished by transformation. Two kinds of circular DNA in plasmid R40, the open circular form and supercoiled molecules were observed. The average contour length of plasmid R40 DNA is $1.03\mu\text{m} \pm 0.1$. This plasmid is rather a small one, molecular weight is about 2×10^6 daltons.