

链霉素产生菌——灰色链霉菌质粒的分离和电镜观察

薛禹谷 董可宁 祝英芳 李 敏 许 怡 庄增辉

(中国科学院微生物研究所, 北京)

杨 乃 权

(华北制药厂, 石家庄)

本工作首次从具有临床应用价值的抗菌素产生菌——灰色链霉菌中分离得到质粒 DNA (SGP 1), 并经电镜观察证实。

用琼脂糖凝胶电泳分析, 初步证明灰色链霉菌和天蓝色链霉菌质粒 DNA 分子大小相似, 限制性内切酶 *Eco* R1 对灰色链霉菌质粒 DNA 可能只有一个切口。

电镜观察表明灰色链霉菌质粒 DNA 具有共价闭合超螺旋环状和开放形环状两种构型, 根据经验公式计算, 灰色链霉菌质粒 DNA 分子量为 1.9×10^7 道尔顿左右。经紫外分光光度计测定灰色链霉菌质粒 DNA 解链温度 (T_m 值) 为 80.8°C , G-C 克分子百分数为 76.8%。我们所获得的灰色链霉菌质粒 DNA (SGP 1) 是否即是前文报道的^[10]经高温消除, 并与链霉素生物合成有关的质粒, 则尚待进一步证实。

60年代初已从遗传学上证明链霉菌属中存在质粒, 并证明某些抗菌素的生物合成和质粒有关^[1-6], 例如通过遗传学研究曾证明了天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 的 IF 菌株中具有 SCP 1 质粒^[7], 这个质粒包含导致致育作用和合成次甲霉素的全部基因^[8], 最近发表的工作^[9]表明从天蓝色链霉菌的不同致育性 (IF、NF 和 UF) 的菌株中, 都能分离到并由电镜观察到分子量约为 2.0×10^7 道尔顿的共价闭合环状质粒 DNA (CCC DNA)——PSH 1, 这种质粒 DNA 的性状并不与遗传学研究结果所显示的 SCP 1 质粒的致育性状相符, 这是链霉菌中最早直接观察到的质粒 DNA。

我们在链霉菌质粒遗传学研究中, 初步证实了链霉素产生菌——灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* 中存在质粒, 这个质粒和链霉素的生物合成有一定的相关性^[10], 我们在此基础上利用生物化学的方法直接

从灰色链霉菌中提取出共价闭合环状质粒 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳和电子显微镜进行了观察, 并测量了它的分子量, 应用限制性内切酶 *Eco* R1 进行了酶切试验, 通过灰色链霉菌质粒 DNA 解链温度 (T_m 值) 的测定, 计算得到质粒 DNA 中 G-C 克分子的百分数。

对灰色链霉菌质粒的分离和用电镜观察直接证明质粒存在, 不仅对链霉菌质粒的遗传学研究有着重要的意义, 而且将为抗菌素产生菌的育种提供更多的理论依据。

材料和方法

(一) 菌株

灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) No. 45, 链霉素产生菌。

本文于 1978 年 6 月 20 日收到。

天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor* 12, phe A1, SCP1⁺)^[1]。

E. coli 40R-25^[2], Col E1 产生菌。

(二) 培养基

培养菌体用豌豆汁培养基^[10]。

(三) 灰色链霉菌和天蓝色链霉菌质粒 DNA 的提取

参照 Schrepf 等^[9,11] 方法稍作改进。

将灰色链霉菌的孢子悬浮液或菌丝体接种在豌豆汁培养基中, 28℃ 振荡培养 50 小时左右。后在 0—4℃, 10,000 转/分离心收集菌体, 菌体以 0.03 M Tris-0.005 M EDTA-0.05 M NaCl 组成的 TES 液, pH 8.0, 洗 2—3 次后, 悬浮于含 25% 蔗糖的 0.01 M Tris-HCl 缓冲液中, pH 7.3。每毫升 Tris-HCl 缓冲液中, 加入 0.3 毫升 0.25 M, pH 8.0 的 EDTA 液。每一克湿菌体加 5—10 毫克溶菌酶, 于 37℃ 保温 30—60 分钟, 加核糖核酸酶至最终浓度 100 微克/毫升 (核糖核酸酶用 0.1 M NaCl-0.01 M 醋酸缓冲液, pH 5.2, 先配成 1 毫克/毫升, 预先加热至 80℃ 处理 5—10 分钟, 以破坏可能存在的脱氧核糖核酸酶的活性), 再加 10% SDS 至最终浓度 1%。37℃ 继续保温 15 分钟, 细胞裂解成粘稠状后, 在 0—4℃, 10,000 转/分离心 30 分钟, 弃去菌体沉淀, 收集上清液, 准确加入 5 M NaCl, 缓缓混匀至最终浓度为 1M, 0—4℃ 静置过夜后, 在 0—4℃ 17000 转/分离心 30 分钟, 除去分子量较大的染色体 DNA 的沉淀, 收集含有质粒 DNA 的上清液, 以重蒸馏的苯酚或氯仿-异戊醇溶液 (24:1) 去蛋白 2—3 次, 于 0—4℃, 10,000 转/分离心 5 分钟, 吸取上清液, 徐徐加入 2 倍体积于预冷的 95% 乙醇沉淀质粒 DNA, 以玻棒收集后溶于 0.1×SSC 溶液中 (0.015 M NaCl + 0.0015 M 柠檬酸钠, pH 7.0), 加入 10×SSC 溶液于质粒 DNA 液中至最终浓度为 1×SSC 溶液, 加 EDTA 于质粒 DNA 溶液至最终浓度为 0.005 M 即得质粒 DNA 溶液, 在 0—4℃ 保存备用。

(四) 大肠杆菌 Col E1 质粒 DNA 的提取

参照 Clewell^[12] 和 Guerry 等^[13] 方法。

(五) DNA 含量的测定

按改进的二苯胺法^[14] 测定。

(六) 琼脂糖凝胶电泳

参照 Aaiz 等^[15] 和 Schrepf 等^[9] 方法进行。

(七) Eco R1 限制性内切酶的酶切试验

参照文献^[16] 所叙述的方法进行。

将所需酶切的质粒 DNA 样品, 用 Tris-HCl 50 mM, Mg Cl₂ 5—10 mM, NaCl 50 mM 组成的酶切反应液透析过夜, 将透析好的 DNA 样品按二苯胺法测定其含量, 酶解反应时, 底物与酶量的比例一般按 90 微克底物用 Eco R1 酶液³⁾ 2—5 微升以及底物等体积的酶切反应液, 37℃ 处理 30 分钟到 1 小时, 终止反应时, 加入总反应体积 1/10 的 200 mM EDTA 溶液, 用琼脂糖凝胶电泳后观察酶切情况。

(八) 电镜质粒 DNA 样品的制备

参照文献^[17,18] 所叙述的方法进行。

将质粒 DNA 样品用上相溶液 (1.5 M NH₄AC + 0.001 M Na₂-EDTA + 细胞色素 C 100 微克/毫升) 稀释成适当浓度, 使 DNA 含量均为 5 微克/毫升左右。在直径 9 厘米的洁净培养皿中加入 20 毫升 0.2 M NH₄AC 作为下相溶液, 液面喷入少量滑石粉, 使其均匀薄层浮在下相液面上, 将洗净微湿的载玻片的一端轻轻放入下相溶液中, 另一端斜靠在培养皿的上沿, 用微量注射器吸入 20—30 微升稀释好的 DNA 溶液, 在距下相液面 1—2 厘米处的载玻片上徐徐滴下, 能清晰看到滴下的 DNA 溶液推动滑石粉形成单分子层, 静止约 4—5 分钟后, 用载有火棉胶-碳膜的铜网蘸取单分子层, 将铜网在无水酒精中浸二次, 每次 20 秒钟左右, 以除去多余液体, 用国产 DM-300 型真空镀膜机旋转投影, 样品与铂铱合金蒸发源之间投影角度约 7 度, 旋转台转速为 90 转/分, 制片后用日立 HS-7S 型和 JEM-100 B 型电镜观察摄片⁴⁾。

(九) 质粒 DNA 分子量测定

将电镜底片均放大成 8 万倍左右, 求得平均长度后按经验公式 (1 微米 DNA = 2.07×10^6 道

- 1) 英国 John Innes 研究所 D. A. Hopwood 赠送。
- 2) 中国科学院生物物理研究所三室三组赠送。
- 3) 由中国科学院生物物理研究所三室三组赠送。
- 4) 本文全部所摄电镜片由中国科学院生物物理研究所、广东省微生物研究所、中国科学院感光研究所和北京大学的电镜室摄制。

尔顿)计算得到分子量。

(十) DNA 解链温度值 (T_m 值) 测定

参照文献^[19-21]所述的方法进行。

根据 DNA 的 G-C 碱基对之间有三个氢键相连,而 A-T 碱基对之间只有二个氢键相连,因此 DNA 中 G-C 碱基对含量百分比高的其 T_m 值也高。将双链 DNA 加温到一定温度即解离成单链,增大了对紫外线(260毫微米)的吸收,随着温度增加,对紫外线的相对吸收值 (OD_T/OD_{T_0}) 迅速直线上升,它的最高和最低值的中点即为 T_m 值,再按经验公式 $T_m = 49.3 + 0.41 (GC)$ 计算^[19,20]即可得到 G-C 对的克分子百分数,我们用 SP-700 双光束紫外分光光度计 (Unican) 附加加热装置 (Cell temperature unican) 和降温装置 (SYB-2 输液泵) 测定。

结果和讨论

(一) 灰色链霉菌质粒 DNA 分子的琼脂糖凝胶管电泳结果

我们将用上述方法得到的质粒 DNA 和天蓝色链霉菌质粒 DNA 以及 Col E1 质粒 DNA 进行 *Eco* R1 内切酶酶切前后琼脂糖凝胶管电泳比较,结果见图版 I-1。

图版 I-1 表明:

(1) 灰色链霉菌和天蓝色链霉菌质粒 DNA 的泳动率相似。

(2) 灰色链霉菌和天蓝色链霉菌质粒 DNA 与 Col E1 (分子量为 4.2×10^6 道尔顿)的泳动率相比,估计分子量在 10^7 道尔顿左右。已知天蓝色链霉菌质粒 DNA (PSH 1) 的分子量为 2.0×10^7 道尔顿,所以从电泳结果分析,灰色链霉菌质粒 DNA 的分子量也可能与此相似。

(3) 图版 I-1 中第 1、3 两管结果表明灰色链霉菌质粒 DNA 经 *Eco* R1 酶切前后泳动率没有变化,根据天蓝色链霉菌质粒 DNA 经 *Eco* R1 酶切前后虽泳动率未变,但从已经证明 *Eco* R1 对它确有一个

切口^[9]来看,很可能 *Eco* R1 对灰色链霉菌质粒 DNA 也有二个切口,只是由于线性 DNA 和共价闭合构型 DNA 在所用电泳条件下无法分辨,所以泳动率未变。

(4) 图版 I-1 中所用的 Col E1 样品都是经制备电泳除去染色体 DNA 后再进行管电泳的。从第 4、5 两管结果表明 Col E1 有三条泳动带,经 *Eco* R1 酶切后,只留下一条清晰的带,说明 Col E1 质粒 DNA 的三种构型经酶切后都为线性构型,其中第一和第三条带可能分别代表开放形环状和共价闭合超盘构型,而第二条带则可能是线性型带。

(二) 灰色链霉菌质粒 DNA 分子的电镜观察及其分子量的测定

根据上述方法摄制的灰色链霉菌质粒 DNA 电镜照片见图版 I-2 和图版 I-3。图版 I-2 是开放型环状构型,图版 I-3 是共价闭合超盘构型。(图 1、图 2 为示意图)。从电镜照片测得质粒 DNA 平均长度后,根据经验公式^[22] 计算得知灰色链霉菌质粒 DNA 的分子量为 1.9×10^7 道尔顿左右。与已报道的天蓝色链霉菌质粒 DNA (PSH 1) 分子量 2.0×10^7 道尔顿相似。这也与两者的凝胶电泳的泳动率结果相符。

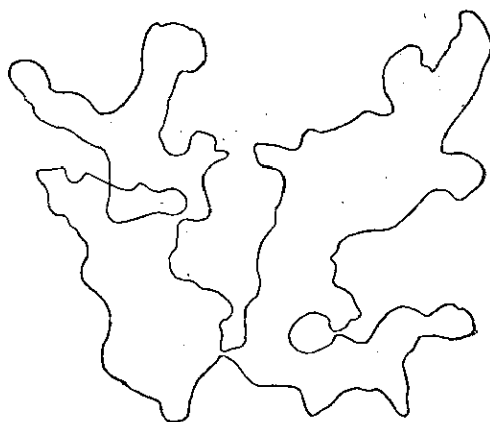


图 1 灰色链霉菌开放形环状的质粒 DNA 分子电镜照片的示意图

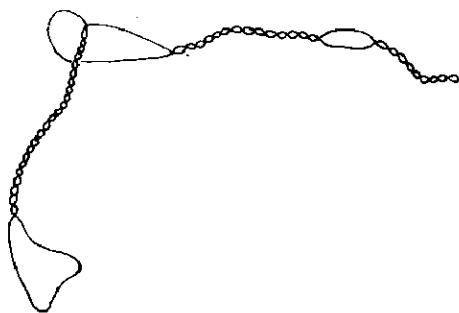


图2 灰色链霉菌共价闭合超盘旋的质粒 DNA 分子电镜照片的示意图

从电镜观察到的灰色链霉菌质粒 DNA, 除分子量为 1.9×10^7 道尔顿(SGP1) 的之外, 尚有分子量较小的质粒 DNA 分子, 从图版 I-2、3 的左下角右下角可见, 但在本实验所用电泳系统上未曾反映出来。此外, 根据经高温处理灰色链霉菌所得到的气生菌丝生长受抑制的突变株 No. 45-3^[10] 中仍能提取到, 并经电镜观察到质粒 DNA 分子的存在来分析, 表明在灰色链霉菌中, 至少存在一种以上的质粒。

(三) 灰色链霉菌质粒 DNA 的解链温度 (T_m 值) 测定

用 SP 700 双光束紫外分光光度计测

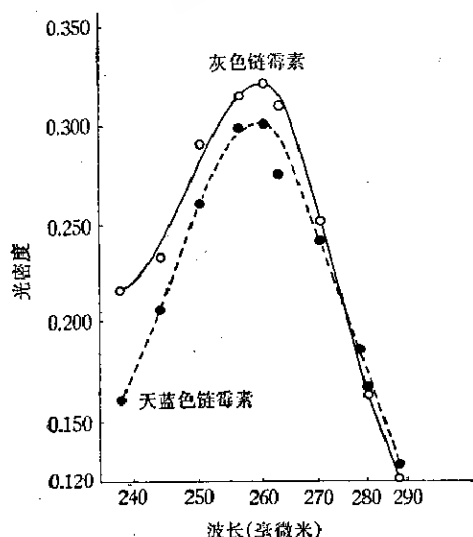


图3 灰色链霉菌的与天蓝色链霉菌的质粒 DNA 的紫外吸收曲线

定灰色链霉菌和天蓝色链霉菌质粒 DNA 的紫外吸收曲线, 见图 3。

从图 3 中可测得灰色链霉菌质粒 DNA 和天蓝色链霉菌质粒 DNA 的最大吸收值都在 260 毫微米, 前者 OD_{280} 毫微米/ OD_{260} 毫微米 = 0.51, 后者为 0.55。根据 OD_{280}/OD_{260} 光密度比值和紫外吸收曲线表明所测定的灰色链霉菌的, 和天蓝色链霉菌的质粒 DNA 的纯度都合乎要求。

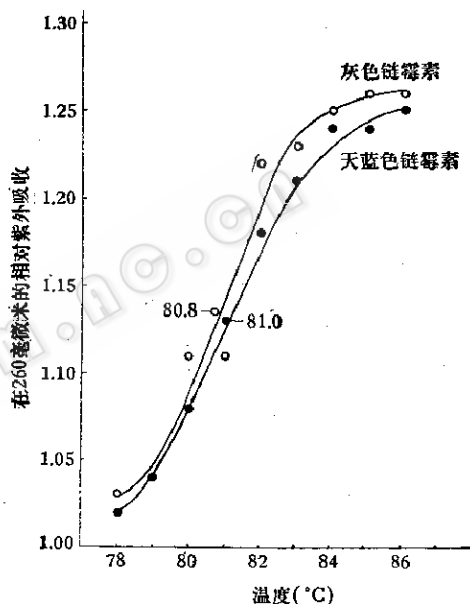


图4 灰色链霉菌的和天蓝色链霉菌的质粒 DNA 解链增色性曲线(图中数字即 T_m 值)

温度对灰色链霉菌的和天蓝色链霉菌的质粒 DNA 的解链增色效应见图 5。

从图 4 中测得的 T_m 值和从经验公式^[20]中求得 GC 克分子百分数见下表

质粒 DNA 的来源	T_m (°C)	GC (%)
灰色链霉菌	80.8	76.8
天蓝色链霉菌	81.8	77.3

上表表明灰色链霉菌质粒 DNA 的 T_m 值和 GC 克分子百分数和天蓝色链霉菌的相应的值都十分接近, 并与文献报道的灰

色链霉菌的染色体 DNA 的 T_m 值(80.8°C)和 GC% (76.8%)^[20] 基本一致。

根据限制性内切酶 *Eco* RI 的特定碱基序列切点 **NGAATTGN**
NCCTTAAGN 来考虑, 该酶对灰色链霉菌和天蓝色链霉菌的质粒 DNA 可能只有一个切点以及从 T_m 值演算到的 GC% 为 76.8% 来看, 可以认为灰色链霉菌的和天蓝色链霉菌的质粒 DNA 中 AT 碱基对比较少, 而 GC 碱基对则比较多。

参 考 文 献

- [1] Boronin, A. M. et al.: *Genetika*, 8: 174, 1972.
- [2] Boronin, A. M. et al.: In Abstracts of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, p. 103. (Academic Press, New York and London), 1974.
- [3] Kirby, R. et al.: *Nature*, 254: 265, 1975.
- [4] Noáck, D.: Abstracts of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. p. 103. (Academic Press, New York and London), 1974.
- [5] Okanishi, M. J.: *J. Antibiotics*, 23: 45, 1970.
- [6] 冈西正则: 发酵学会(大阪), 昭和 50 年 11 月 1 日报告, 1975.
- [7] Vivian, A. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 64: 101, 1970.
- [8] Wright, L. F. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 95: 96, 1976.
- [9] Schrempf, H. and Coebel, W.: *J. Bacteriol.*, 131 (1): 251—158, 1977.
- [10] 薛禹谷等, 微生物学报, 18 (3): 195—201, 1978 年。
- [11] Schrempf, H., H. Bujard, D. A. Hopwood and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, 121: 416—421, 1975.
- [12] Glewell, D. B.: *J. Bacteriol.*, 110 (2): 667—676, 1972.
- [13] Guerry, P. et al.: *J. Bacteriol.*, 116: 1064—1066, 1973.
- [14] 李载平等: 生物化学与生物物理学报, 2 (3): 182—193, 1962 年。
- [15] Aaij, C., and P. Borst.: *Biochim. Biophys. Acta*, 269: 192—200, 1972.
- [16] Greene, P. J., et al.: “*Methods in Molecular Biology Vol. 7 DNA Replication*” edited by R. B. Wickner, p. 91—94, 1974. by MARCEL DEKKER, INC. New York.
- [17] Bujard, H.: *J. Mol. Biol.*, 49: 125—137, 1970.
- [18] 徐有成、戴培桦、龚祖坝等: 生物化学与生物物理进展, 2: 9—12, 1975。
- [19] Marmur, J. & Doty, P.: *J. Mol.*, 5: 109, 1962.
- [20] Frontali, C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 38: 243—250, 1965.
- [21] 周慧玲: 微生物学报, 18 (2): 134—139, 1978。
- [22] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, 54: 557, 1970.

ISOLATION AND ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF PLASMID FROM *STREPTOMYCES GRISEUS*

Xue Yu-gu Dong Ke-ning Li Min Zhu Ying-fang

Xu Yi Zhuang Zeng-hui

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Yang Nai-quan

(*The North China Pharmaceutical Industry, Shijiazhuang*)

Plasmid DNA has been isolated for the first time from an industrial strain of *Streptomyces griseus*. The plasmid DNA has also been observed and verified by electron microscope.

Plasmids from *S. griseus* and *S. coelicolor* are indistinguishable in their electrophoretic patterns in agarose gel analysis, and the plasmid DNA of *S. griseus* may carry single site by the restriction endonuclease *Eco* R1.

Two forms of DNA molecules from *S. griseus* plasmid were observed under

electron microscope. The one is covalently closed circular, and the other, open circular. The molecular weight of this plasmid DNA calculated by experimental formula is about 1.9×10^7 daltons. Its denaturation temperature (T_m) measured by UV spectrometer is 80.8°C . The percentage of GC content determined from T_m value is 76.8%. Whether the plasmid of *S. griseus* described above is identical to the one which can be eliminated by high temperature and is related to streptomycin synthesis remains to be proven.