

芽孢杆菌质体的研究

I. 短小芽孢杆菌质体的分离和鉴定

范云六 徐婉学 赵敬稳 王清海 姜书勤

(中国科学院微生物研究所, 北京)

短小芽孢杆菌 AS 1.326 带有“杀死活性”质体。用琼脂糖-溴化胺乙苯菲啶凝胶电泳方法鉴别出质体带,用电镜方法观察到环状 DNA 分子,用溴化胺乙苯菲啶消除“杀死活性”质体试验及测定 AS 1.326 菌 Kill⁺ 表型试验证明 AS 1.326 菌带有 pBP 3“杀死活性”功能的质体。

近年来在好氧芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 的细菌中发现了质体^[1], 这些细菌包括 *Bac. pumilus*^[2-6], *Bac. subtilis*^[4,7,8], *Bac. megaterium*^[9-11], *Bac. thuringiensis*^[12,13] 及 *Bac. cereus*。在所报道的质体中除极少数几个质体(如 pPL 576 及 pPL 10)外,其余均为隐蔽质体 (cryptic plasmids)。隐蔽质体是遗传功能尚不清楚的质体。从研究质体遗传结构与功能或从遗传工程角度考虑,分子载体应具有选择标记 (selected marker) 以便鉴别重组体 DNA 分子诸方面来看,隐蔽质体有着缺点。因此,在芽孢杆菌中寻找有功能的质体具有较重要的意义。

我们曾报道金黄色葡萄球菌的质体^[14,15] 及大肠杆菌的质体^[16]。本文报道一株短小芽孢杆菌带有功能性质体——“杀死活性”质体 (“Killing activity” plasmid)。

材料与方 法

(一) 菌株

用来检测 *Bac. pumilus* 质体的菌株由中国科学院微生物研究所菌种保藏组供给。经预备试验,我们筛选了 AS 1.326 菌株。实验用的对照菌株有 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L10) 及 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20。

(二) 培养基

1. BPY 培养基^[17]: 用于活化细菌。固体培养基为 BPY 液体培养基中加上 2% 琼脂,半固体培养基加 1% 琼脂。

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 1000 毫升蒸馏水中, pH 7.0。

3. 加富培养基(克): 蛋白胨 5, 酵母膏 5, K₂HPO₄ 1, 葡萄糖 2 溶于 1000 毫升蒸馏水中。在此培养基中培养细菌供质体 DNA 提取用。

(三) 质体 DNA 提取

参照文献 [8, 16, 17] 进行。

(四) DNA 含量的测定

采用二苯胺法^[18]。

(五) 琼脂糖-溴化胺乙苯菲啶 (ethidium bromide) 凝胶电泳^[19-23]

自制垂直平板 (12×15×0.5 厘米) 及圆柱状 (15×0.6 厘米) 凝胶电泳装置。使用 DYN-II 电泳仪 (北京科学仪器厂制造)。制胶方法参照文献 [21]。电泳缓冲液用 0.04 M Tris, 0.02 M NaAc, 2 mM EDTA, pH 8.1 或 0.089 M Tris, 0.089 M 硼酸, 0.025 M EDTA, pH 8.3。琼脂糖浓度为 0.8%。指示剂为 7% SDS, 0.07% 溴酚兰及 33%

本文于 1978 年 6 月 8 日收到。

甘油。电泳在室温下 80 伏恒压进行 4—5 小时，或 40 伏进行 18 小时。将电泳后的琼脂糖凝胶板(或柱)取出，置内含 0.5 微克/毫升溴化胺乙苯菲啉的电泳缓冲液中浸泡半小时，置紫外灯(Chrom-portable ultraviolet lamp 英)下观察样品的荧光带。用装有 M52/φ54 红色滤光片的海鸥牌 DF-263170 型照相机拍照。

(六) “杀死活性”质体的消除

参照文献 [5, 16] 方法进行。实验中溴化胺乙苯菲啉浓度为 $3 \times 10^{-4} M$, $3 \times 10^{-5} M$ 及 $3 \times 10^{-6} M$ 。处理对数生长菌的浓度为 10^7 /毫升及 10^8 /毫升。用 *Bac. pumilus* ATCC12140 (L10) 作对照菌。通过检验对邻近菌落所产生“杀死活性”的敏感菌落而识别试验菌具有“杀死活性”质体。分纯敏感菌株(编号为相应菌号加上 S)为进一步测定带“杀死活性”质体菌株的 Kill⁺ 表型用。

(七) 测定 *Bac. pumilus* 的 Kill⁺ 表型

对“杀死活性”呈敏感的敏感菌，经纯化后，用双层法或交叉划线法测定试验菌的 Kill⁺ 表型。

(八) 电镜质体 DNA 样品制备

按文献 [16] 所述方法进行。

结果与讨论

(一) 用琼脂糖-溴化胺乙苯菲啉凝胶电泳法来鉴别质体 DNA。

琼脂糖-溴化胺乙苯菲啉凝胶电泳可以用来检测质体 DNA^[24,25]。最近, Meyers^[24] 用此法检测了许多菌的质体 DNA 及分析质体 DNA 分子的某些分子特性。这个方法比较灵敏,同时不必要求用超速平衡离心来制备质体 DNA。

根据我们的实验条件,我们利用此方法检测出一株带有质体的短小芽孢杆菌,电泳条件如材料和方法部分所述。在实验中利用 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L10) 的 DNA 及 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 的 DNA 作为对照,因为已知 *Bac. pumilus* ATCC12140 (L 10) 带有一个质体,即 pPL 10 质体,而 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 是已知无质体的菌,它是由 NRS 576 (pPL

576) 自发消除 pPL 576 质体后的衍生菌。通过与这两个对照菌的 DNA 在凝胶电泳上比较后可鉴别出试验菌中除染色体 DNA 带外有无染色体外质体 DNA 带。

图版 I-1 为琼脂糖-溴化胺乙苯菲啉凝胶垂直平板电泳结果。图中 A 槽样品为 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 DNA。该菌是一个不带质体的菌,它的 DNA 在电泳上呈现出一个不均一的扩散区带,为染色体 DNA 带(箭头①处)。图中 D 槽为 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L 10) DNA。该菌带有已知 pPL 10 质体,在这个电泳图谱上可看出,除染色体 DNA 带外,还有二条质体 DNA 带位于染色体带下面(箭头②及③处),图中 C 槽为试验菌株 *Bac. pumilus* AS 1.326 DNA,对比 A 及 D 槽对照菌株 DNA 电泳图谱,除染色体带以外,在箭头②处还可看出一个细小整齐的质体带。

我们用不同次数抽提的 DNA 样品进行琼脂糖-溴化胺乙苯菲啉垂直平板电泳,电泳结果为图版 I-2 所示,图中 D 及 E 槽为 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 DNA, C 及 F 槽为 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L10) DNA, A 及 B 槽为试验菌 *Bac. pumilus* AS 1.326 DNA。从图版 I-2 可以看出,在不同次数抽提的 AS 1.326 DNA 样品的琼脂糖-凝胶电泳图谱中也可看到质体 DNA 带。

根据在琼脂糖-凝胶电泳上与两个对照菌 DNA 的图谱比较的结果,我们可以初步判断 AS 1.326 是一个带有质体的菌。

从图版 I-1,2 可以看出,在琼脂糖-溴化胺乙苯菲啉凝胶电泳图谱上 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L10) DNA 有两条质体带,这个结果与 Lovett^[5] 报道相符, Lovett 的工作表明,这是由于 pPL 10 DNA 的不同构形的结果:最下面的一个 DNA 带为 pPL 10 DNA 共价闭合环状构形,另一个 DNA

带为 pPL 10 DNA 开环 (open circular) 构形。从图版 I-1 及图版 I-2 看出的 *Bac. pumilus* AS 1.326 的质体 DNA 带与 pPL 10 质体开环 DNA 带的位置相近。

根据我们对大肠杆菌 R 40 质体纯化工作的结果以及 Meyers 报道^[24], 在琼脂糖凝胶电泳图谱上染色体 DNA 和质体 DNA 在带形方面有一定特点, 前者多为扩散状宽区带, 后者多为整齐的细带。*Bac. pumilus* 不同菌株的染色体及质体 DNA 电泳带形 (图版 I-1, 2), 看来, 也有这个特点。

(二) *Bac. pumilus* AS 1.326 质体 DNA 的电镜观察

用制备琼脂糖凝胶电泳纯化 *Bac. pumilus* AS 1.326 质体 DNA 后, 用蛋白单分子层法制片。在日立 Hu-11 A 电子显微镜下进行观察。电镜观察结果证明 *Bac. pumilus* AS 1.326 中有质体 DNA 分子。图版 I-3a, 3b 示明 pBP 3 质体环状 DNA 分子, 我们称此质体为 pBP 3 质体。

我们曾报道大肠杆菌 R40 质体的外形长度及其分子量 (2.13×10^6 道尔顿)。对于 *Bac. pumilus* pBP3 质体 DNA 分子的大小及其分子量尚未进行精确测量。但 R40 质体 DNA 放大 10 万倍的电子显微图像大小与 pBP3 质体 DNA 放大 5 万倍的电子显微图像大小可相比拟, 不难看出 *Bac. pumilus* pBP 3 质体 DNA 分子要比 R40 质体 DNA 分子大。这一点从 pBP 3 质体 DNA 在电泳上与 pPL 10 质体 DNA 带位置相近 (pPL 10 质体 DNA 分子量为 4.4×10^6 道尔顿) 也能得到证实。

(三) *Bac. pumilus* AS 1.326 “杀死活性”质体的消除及 Kill⁺ 表型的测定

根据上述琼脂糖-凝胶电泳及电镜观察结果, *Bac. pumilus* AS 1.326 有质体存在。这个质体是否具有生物功能? 我们进行了质体消除试验和 Kill⁺ 表型测定。

1976 年 Lovett 首先报道具有“杀死活性”功能的 pPL 10 质体。根据他的报道, 经特定质体消除剂处理后, 具有“杀死活性”质体的细胞群体中既含有消除质体后的菌也含有没有消除质体的亲本菌, 由于消除“杀死活性”质体后的菌受亲本质体的“杀死活性”作用, 因此, 用氯仿蒸气处理后, 可以根据在平皿上形成含有中央菌落的清亮“斑”来判断“杀死活性”质体的消除, 从而验证亲本菌有“杀死活性”质体。

在我们实验中, 采用了类似方法来检验 *Bac. pumilus* AS 1.326 是否有“杀死活性”质体。我们用不同浓度 ($3 \times 10^{-4} M$, $3 \times 10^{-5} M$ 及 $3 \times 10^{-6} M$) 的溴化胺乙苯菲啶处理 *Bac. pumilus* AS 1.326, 用 ATCC 12140 (L10) 作为对照。实验结果表明: 在所试验的三种溴化胺乙苯菲啶浓度下, 均观察到“杀死活性”质体消除的现象。我们从平皿上将“杀死活性”质体消除的敏感菌挑出纯化后, 进一步测定 *Bac. pumilus* AS 1.326 的 Kill⁺ 表型。

图 1 是 *Bac. pumilus* AS 1.326 菌株消除“杀死活性”质体后的 AS1.326-S1 菌对 *Bac. pumilus* AS 1.326 Kill⁺ 表型测定的照片。AS1.326-S1 是用 $3 \times 10^{-6} M$ 溴化胺乙苯菲啶处理 10^4 菌/毫升 *Bac. pumilus* AS 1.326 而得到的敏感菌。

除用同一亲本中经消除质体后的敏感菌来测定含有“杀死活性”质体的 Kill⁺ 表型外, Lovett 报道还可用 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 来测定 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L10) 的 Kill⁺ 表型。在实验中, 我们以 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 为指示菌来测定 *Bac. pumilus* AS 1.326 Kill⁺ 表型, 用 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20 来指示 *Bac. pumilus* ATCC 12140 (L10) Kill⁺ 表型, 以此作为对照 (图版 I-4b)。图版 I-4a 表明, *Bac. pumilus* AS 1.326 的“杀死活性”

质体也可作用于 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20。用划线法测定也得到重复的结果(图2)。

根据上述“杀死活性”质体消除试验以及 Kill⁺ 表型测定结果,可以看出 *Bac. pumilus* AS 1.326 带有“杀死活性”质体。

我们从消除“杀死活性”质体后的 *Bac.*

pumilus AS 1.326-S1 菌中提取 DNA, 并用 DNA 来进行琼脂糖垂直平板电泳, 电泳结果表明质体 DNA 带的消失(图版 I-1B 槽)。这个结果不仅进一步证明 *Bac. pumilus* AS 1.326 有 pBP 3 质体存在, 同时表明这个质体具有“杀死活性”功能。



图1 双层法测定 *Bac. pumilus* AS1.326 Kill⁺ 表型
底层为 *Bac. pumilus* AS 1.326
上层为 *Bac. pumilus* AS 1.326-S1

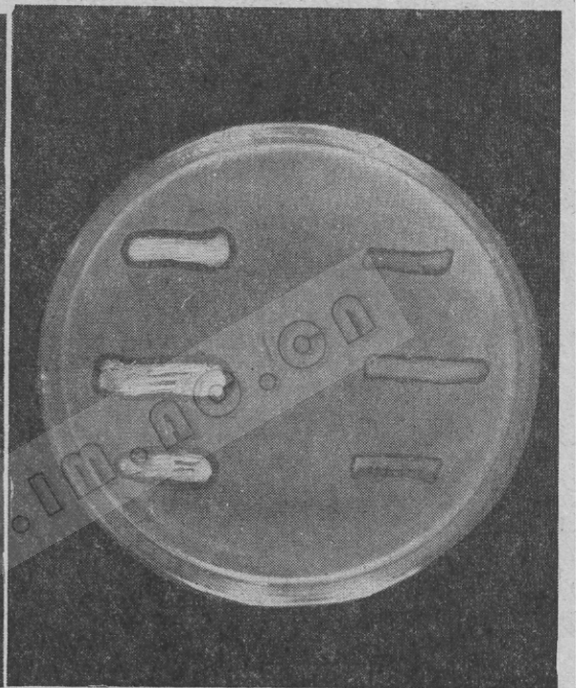


图2 划线法测定 *Bac. pumilus* AS1.326 Kill⁺ 表型
底层为 *Bac. pumilus* NRS 576 W 20;
左层上层划线者为 *Bac. pumilus* ATCC
12140 (L10);
右层上层划线者为 *Bac. pumilus* AS1.326。

参 考 文 献

- [1] Lovett, P. S. et al.: In "microbiology-1976" (ed. D. Schlessinger), p. 388—391, ASM, 1976.
- [2] Lovett, P. S.: *J. Bacteriol.*, 115: 291—298, 1973.
- [3] Lovett, P. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54: 365—370, 1973.
- [4] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, 124: 484—490, 1975.
- [5] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 817—828, 1976.
- [6] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, 120: 488—494, 1974.
- [7] Tanaka, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 131: 699—701, 1977.
- [8] Tanaka, T. et al.: *J. Bacteriol.* 129: 1487—1494, 1977.
- [9] Carlton, B. C. et al.: *Pro. Not. Aca. Sci. USA*, 64: 592—599, 1969.
- [10] Carlton, B. C., In "Microbiology-1976" (ed. D. Schlessinger), p. 349—405, ASM, 1976.
- [11] Carlton, B. C. et al.: *J. Bacteriol.*, 117: 1201—1209, 1974.
- [12] Галушка, Ф. П. и др.: *ДАН СССР.*, 236: 1233—1235, 1977.
- [13] Дебинов, В. Г.: *Генетика*, 13: 496—501, 1977.
- [14] 范云六、姜书勤、郭兴华、王清海: *微生物学报*, 14: 209—215, 1974.

- [15] 范云六、姜书勤、王清海: 微生物学报, 16:63—69, 1976.
- [16] 范云六、姜书勤、郭殿瑞、王清海: 微生物学报, 16:277—281, 1976.
- [17] Humphreys, G. O. et al.: *BBA.*, 383: 457—463, 1975.
- [18] Burton, K.: “*Methods in Enzymology*”, Vol. 12, Part B, p. 163, New York, Acad. Press, 1968.
- [19] Robert, B. H. et al.: *J. Virology*, 14: 1235—1244, 1974.
- [20] Thompson, R. et al.: *MGG.*, 133: 141—149, 1974.
- [21] Sharp, P. A. et al.: *Biochem.*, 12: 3055—3063, 1973.
- [22] Thomas, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 91: 315—328, 1975.
- [23] Aaij, C. et al.: *BBA.*, 269: 192—200, 1972.
- [24] Meyers, J. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529—1537, 1976.
- [25] 松原謙一著: プラスミド, 1976.

STUDIES ON PLASMIDS OF BACILLI

I. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A PLASMID FROM *BACILLUS PUMILUS*

Fan Yun-liu, Xu Wan-xue, Zhao Jing-wen,
Wang Qing-hai and Jiang Shu-qin
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Bacillus pumilus AS 1.326 harbors a plasmid-determined killing activity. A plasmid DNA band was detected in agarose-EtBr gel electrophoresis. Open circular DNA molecules were invariably

observed in plasmid samples by electron microscopy. The elimination of Killing activity by ethidium bromide indicated that determinant of this activity is located on the plasmid.