

# 短小芽孢杆菌抗药性质粒 pCJ3 的分离及分子特性的研究

周桢林 陈家平

(中山大学, 广州)

温晋 刘飞鹏

(暨南大学, 广州)

周进 左立人

(广州市微生物研究所, 广州)

从短小芽孢杆菌中分离出具有四环素抗性的质粒 pCJ3, 经抗性消除试验、转化活性测定、琼脂糖凝胶电泳分析和电镜观察等方面试验得到证实。电镜观察表明 pCJ3 质粒 DNA 分子具有共价闭合超螺旋环状和开放型环状两种构型。根据经验公式计算其分子量为  $4.33 \times 10^6$ 。

遗传工程的基因增殖目前主要采用大肠杆菌及其质粒作为 DNA 分子的无性繁殖系统。但大肠杆菌是人体肠道的共生菌, 从安全角度及从扩展分子无性繁殖技术范围的角度, 有必要寻找其他的无性繁殖系统<sup>[1]</sup>。芽孢杆菌一般不感染人类, 并且早已在发酵工业中广为应用。目前对某些芽孢杆菌, 特别是枯草芽孢杆菌遗传背景的了解, 仅次于大肠杆菌。因此利用芽孢杆菌发展另一个安全的无性繁殖系统是较为合宜的。

目前在芽孢杆菌中发现的质粒多数是功能未知的隐蔽质粒<sup>[2-5]</sup>。Loret (1973—1976) 报告了 pL576 及 pPL10 质粒分别具有控制芽孢形成及杀伤活性的功能<sup>[6-9]</sup>。范云六等(1978)在短小芽孢杆菌中分离了具有杀伤活性的质粒 pBP3<sup>[10]</sup>。在抗药性质粒方面, 仅 Bernhard 等(1978)从蜡状芽孢杆菌分离了具四环素抗性的 pBC16<sup>[12]</sup>, 但其转化能力较低。我们从短小芽孢杆菌中分离了具有四环素抗性的质粒 pCJ3, 报道如下。

## 材料和方法

### (一) 菌株

受体菌: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) SCR 2165 和 *B. subtilis* 168 trpC2, 由中国科学院微生物研究所提供。

具四环素抗性的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) A3 菌株, 自中山大学校园土壤中分离到。

### (二) 培养基

1. BPY 培养基 (g): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 葡萄糖 5, NaCl 5, 蒸馏水 1000ml, pH 7.2。用于活化细菌。

2. Spizizen 基本培养基 (%):  $K_2HPO_4$  1.4,  $KH_2PO_4$  0.6,  $(NH_4)_2SO_4$  0.2, 柠檬酸钠 0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02, 葡萄糖 0.5。转化试验中培养受体菌, 本试验中添加 0.2% 蛋白胨。

3. A 培养基 (g): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3,  $KH_2PO_4$  3,  $Na_2HPO_4$  6, 葡萄糖 5,  $NH_4Cl$  1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.49,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5mg,  $CaCl_2$  55mg, 甘油 3ml, 蒸馏水 1000ml, pH7.2。用于培养提取质粒的细菌。

### (三) 具四环素抗性质粒的芽孢杆菌的筛选

将土样悬液置 75°C 处理, 淘汰无芽孢菌类, 再用含 50  $\mu$ g/ml 四环素的 BPY 培养基培养。挑取并保存经镜检具芽孢的抗性菌株。

以质粒消除剂十二烷基硫酸钠 (SDS)<sup>[13, 14]</sup> 按

本文于 1980 年 9 月 18 日收到。

试验过程中承范云六同志提出宝贵意见, 并审阅本稿, 特此致谢。电镜照片由中小大学电镜室王克米、夏译等同志协助拍摄。

50 $\mu\text{g/ml}$  和 250 $\mu\text{g/ml}$  浓度分别处理抗性菌株,作质粒消除的预备性试验,初步选取经处理后对四环素敏感或在含四环素平皿上菌落数显著减少的菌株。然后进一步用一系列质粒消除剂,如 SDS、利福平及溴化乙锭对初选带质粒菌株重复质粒消除试验<sup>[11,13-15]</sup>,以确证抗性标记存在于质粒上。

#### (四) 质粒 DNA 的分离

按文献[16-18]的方法略加修改。用 A 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养细菌至对数期。收集菌体,以溶菌酶及 SDS 先后处理,将破裂裂解后的粘稠物加入 5M NaCl 至浓度为 1M,以沉淀染色体 DNA。置冰箱过夜,取出于 0—3 $^{\circ}\text{C}$  离心(17,000—20,000g)1 小时,取上清液加入 10 $\mu\text{g/ml}$  核糖核酸酶消除 RNA。继加入固体聚乙二醇(MW 6,000)至 10% 浓度(W/V)沉淀质粒 DNA。0—3 $^{\circ}\text{C}$  放置 20 小时以上,离心(600g)2 分钟得沉淀。将沉淀悬浮于 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.05M Tris·HCl (pH8.0)-0.05M NaCl-5mM EDTA 中,离心(3,500 转/分)10 分钟除去液面之悬浮物及聚乙二醇和下面的蛋白质沉淀。将溶液以 50mM Tris-HCl (pH7.5)-5mM EDTA-5mM NaCl 低温透析过夜。透析液用酚抽提三次后再用氯仿抽提三次。最后以 50mM Tris-HCl pH7.5-20mM NaCl-10mM  $\text{MgCl}_2$  透析一次。取出用紫外分光光度计测定含量后置 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### (五) 琼脂糖凝胶电泳

垂直平板(12 $\times$ 10 $\times$ 0.5cm)凝胶电泳装置,制胶方法见文献[19]。电泳缓冲液用 0.04M Tris, 0.02M NaAc, 2mM EDTA pH8.1。琼脂糖浓度为 0.8%,电泳在室温下 80V 恒压进行 3—4 小时。电泳后的凝胶板取出置于含 0.5 $\mu\text{g/ml}$  溴化乙锭的电泳缓冲液中浸泡半小时。取出用紫外分析仪观察样品的荧光带。

#### (六) 限制性内切酶 *EcoRI* 的酶切试验

取 100 $\mu\text{l}$  质粒 DNA 抽提液(内含 5 $\mu\text{g}$  DNA)置于盛有 25 $\mu\text{l}$  的 5 倍浓缩反应液(6mM Tris-HCl pH7.5, 50mM NaCl, 6mM  $\text{MgCl}_2$ , 6mM 巯基乙醇)的小试管中,再加入 10 $\mu\text{l}$  *EcoRI* 酶液,置 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 1 小时后,于 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴作用 5 分钟终止反应。对照组不加酶液。用琼脂糖凝胶电泳观察酶切情况。

#### (七) pCJ3 质粒 DNA 的转化活性试验

采用对四环素敏感的枯草杆菌 SCR 2165 及

168trpC2 为受体菌。参照文献[20]的方法进行转化试验。仅在加入质粒抽提液前,受体菌先用 0.002%  $\text{MgSO}_4$  及 0.03M  $\text{CaCl}_2$  处理。每 ml 受体菌悬液加入 0.1ml 的质粒抽提液。混合液置 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 90 分钟。取 0.1ml 涂布于含 50 $\mu\text{g/ml}$  四环素的 BPY 固体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时观察结果。

#### (八) 质粒 DNA 的电镜观察

参照文献[21]等的方法,将质粒 DNA 样品用上相液(1.5M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 0.001M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 细胞色素 C 100—200 $\mu\text{g/ml}$ )稀释至适当浓度,使 DNA 含量为 5 $\mu\text{g/ml}$  左右。将直径 6cm 的培养皿均匀涂布固体石蜡,注满下相溶液(0.2M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ )。另取一长约 10cm, 1cm 见方的硬质木条亦均匀涂布石蜡。横置培养皿液面的一侧,并轻轻推向液面的另一侧,将液面上可能有的漂浮杂物驱赶到一边。再将一洁净的载玻片放在下相液中并斜置在木条上。在微量进样器吸取稀释好的含质粒 DNA 的上相液 50 $\mu\text{l}$ ,在距液面 1cm 左右的载玻片上徐徐滴下。凸起液面的表面张力有利于质粒 DNA 展开成单分子层。静止 1—2 分钟后,取载有火棉胶-碳膜的铜网,使支持膜朝下蘸取单分子层,将铜网在无水酒精中浸 2 次,每次 20 秒钟,以除去多余水份。用日立 Hus-5 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为 7 度,旋转台转速为 90 转/分,制好的片用日立 Hu-12A 型电镜观察并拍片。

#### (九) 质粒 DNA 分子量测定

将电镜照片用图形数字转换器测定质粒 DNA 分子的长度,除以放大倍数便得到各个分子的实际长度。然后求得平均长度,并按经验公式<sup>[22]</sup> ( $1\mu\text{mDNA} = 2.07 \times 10^6$  道尔顿)计算分子量。

## 结果和讨论

### 一、质粒消除试验

从质粒消除的预备性试验中选出对四环素抗性水平为 50 $\mu\text{g/ml}$  的短小芽孢杆菌 A3 菌株,即以此菌株进行质粒消除试验。

#### (一) SDS 消除质粒试验

用 5 个不同浓度的 SDS 处理 A3 菌株后, 得到较多的抗性消失的菌落, 消除率随 SDS 浓度提高而增加(表 1)。当 SDS 浓度为  $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  时, 消除率达 63.67%, 而自发消除率则为 4.5%。SDS 是表面活性剂, 通过破坏质粒-膜的附着位点而有消除质粒的作用<sup>[13,14]</sup>。经 SDS 处理后, 抗性消失, 说明抗性标记存在于质粒上。

表 1 SDS 消除质粒试验

Table 1 Plasmid Elimination by SDS

浓度 Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	总菌落数 Total colonies	抗性消失 菌落数 Tc <sup>-</sup> colonies	质粒消除率 (%) per cent elimination
0	888	40	4.50
2	371	19	5.12
10	530	47	8.87
50	610	129	21.15
150	699	299	42.78
250	545	347	63.67

### (二) 利福平消除质粒试验

利福平能高度专一性地抑制原核细胞中依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶, 亦被用作质粒消除剂<sup>[11,15]</sup>。从表 2 所示, 所用 5 个不同浓度的利福平对 A3 菌株的抗性均有消除作用。当浓度适当( $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 时, 质粒消除率最高, 可达 41.52%。

表 2 利福平消除质粒试验

Table 2 Plasmid Elimination by Rifampicin

浓度 Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	总菌落数 Total colonies	抗性消失 菌落数 Tc <sup>-</sup> colonies	质粒消除率 (%) Per cent elimination
0	646	21	3.25
0.001	135	2	1.46
0.01	448	186	41.52
0.05	128	34	26.56
0.1	320	75	23.44

### (三) 溴化乙锭消除质粒的试验

用溴化乙锭试验发现也有不同程度的质粒消除作用(表 3)。

以上三个试验的对照总菌落数为

表 3 溴化乙锭消除质粒试验

Table 3 Plasmid Elimination by Ethidium Bromide

浓度 Conc. (M)	总菌落数 Total colonies	抗性消失 菌落数 Tc <sup>-</sup> colonies	质粒消除率 (%) Per cent elimination
0	189	14	7.40
$1 \times 10^{-6}$	125	10	8.00
$1.5 \times 10^{-6}$	23	10	0.43

1723, 自发消除菌落数为 75, 平均自发消除率为 4.37%。

自发消除及经药物处理后消除抗性的四环素敏感株, 在 BPY 斜面上经多次传代, 未发现回复为四环素抗性菌株, 亦说明抗性基因存在于质粒上。

以上实验初步表明 A3 菌株带有四环素抗性标记的质粒, 暂定名为 pCJ3。

## 二、A3 菌株质粒 DNA 的转化作用

分离 A3 菌株质粒 DNA, 以不抗四环素的枯草杆菌 SCR 2165 作受体进行转化。结果获得四环素抗性的 SCR 2165 转化体 T<sub>A</sub>。转化率为每  $\mu\text{g}$  质粒抽提液 DNA 可得  $6.7 \times 10^2$  转化体。若以不抗四环素的枯草杆菌 168trpC2 为受体进行转化, 也可获得具抗性的转化体 T<sub>B</sub>, 转化率达每  $\mu\text{g}$  质粒抽提液 DNA 得  $4.1 \times 10^3$  转化体。T<sub>A</sub> 及 T<sub>B</sub> 的抗四环素水平均为  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。随机挑选 T<sub>A</sub>6 菌株按同样方法分离质粒 DNA, 对 SCR 2165 进行再转化, 也得到转化体。转化率达每  $\mu\text{g}$  质粒抽提液 DNA 得  $2 \times 10^3$  转化体。两种转化体的抗性水平与 A3 基本相同。转化体经多次传代其抗性稳定。以上表明从 A3 菌株提取的质粒 DNA 具有转化活性, 若将 A3 菌株消除质粒后按同法提取的抽提液则不具转化作用。同时, SCR 2165 具 *recE* 标记, 从而排除了是染色体 DNA 转化的可能。从转

化率看,在同样条件下,168 trpC2 比 SCR 2165 高一个数量级(表 4)。

表 4 质粒 pCJ3 转化活性试验

Table 4 Transforming Activity of Plasmid pCJ3

供体菌株 Donor strain	受体菌 Recipient	转化体数/ $\mu\text{g}$ DNA**Transformants/ $\mu\text{g}$ DNA
A3	SCR 2165	$6.7 \times 10^2$
A3	168 trpC2	$4.1 \times 10^3$
T <sub>A6</sub> *	SCR 2165	$9.5 \times 10^2$
T <sub>A6</sub> *	168trpC2	$2 \times 10^3$

\* SCR 2165 转化体。Transformant of SCR 2165

\*\* 质粒 DNA 提取物中杂有少量染色体 DNA。  
Some chromosomal DNA was contaminated in plasmid DNA extract.

将未经质粒 DNA 转化的对照受体菌和质粒 DNA 提取物,分别涂布在含四环素的培养基上,均不出现抗性菌落,从而排除了受体菌染色体基因自发突变及质粒 DNA 制备中混染抗性细菌的可能。

### 三、A3 菌株质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳

从短小芽孢杆菌 A3 菌株及经消除质粒处理后的 W10 菌株,枯草杆菌 SCR 2165

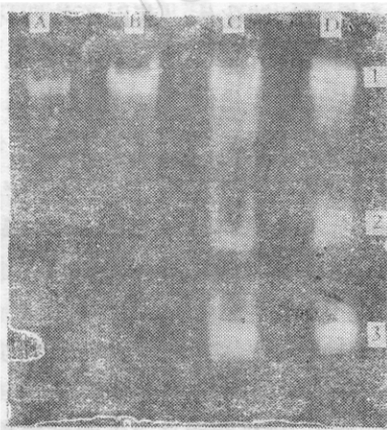


图 1 四个菌株的 DNA 琼脂糖平板凝胶电泳

Fig. 1 Vertical slab agarose gel electrophoresis of 4 strains DNA

A. *B. subtilis* SCR 2165; B. *B. pumilus* A3 W10 C. *B. subtilis* SCR 2165 T<sub>A6</sub>; D. *B. pumilus* A3

及其转化体 T<sub>A6</sub> 分别以同样抽提质粒 DNA 方法取得的提取液进行琼脂糖电泳分析。

从图 1 可见 A3 菌株除染色体 DNA 带(箭头 1)外还有两条质粒 DNA 带,位于染色体带下面(箭头 2、3)。上面一条可能为开环构型,下面一条可能为共价闭合超螺旋构型。消除质粒的 W10 即消失了质粒 DNA 带,SCR 2165 不具质粒 DNA 带。但当被转化为具抗性的转化体 T<sub>A6</sub> 后即出现两条质粒 DNA 带,位置与 A3 菌株相似。从电泳结果表明,A3 菌株的质粒 DNA 确实进入了受体菌 SCR 2165,其所带的抗性基因得到表达。根据质粒的存在与消失与抗性的表现有平行关系,因此可以认为 A3 菌株的质粒带有四环素抗性标记。

同时我们用限制性内切酶 *EcoRI* 对 A3 菌株的质粒 DNA 进行切割试验后,用琼脂糖凝胶电泳检查,从图 2 可见原来两条质粒 DNA 带消失,而在原来两条带的中间出现一条新带(箭头 4 处)。这表明 *EcoRI* 限制性内切酶对该质粒只有一个切点,这条新带可能是将两种构型的环状分

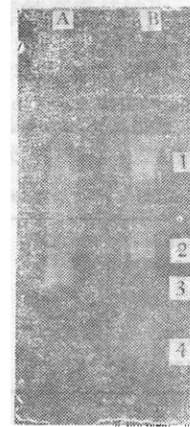


图 2 pCJ3 质粒 DNA 经酶切后的琼脂糖平板凝胶电泳

Fig. 2 Vertical slab agarose gel electrophoresis of plasmid pCJ3 A. Plasmid pCJ3 cleaved by *EcoRI*; B. Plasmid pCJ3 as control.

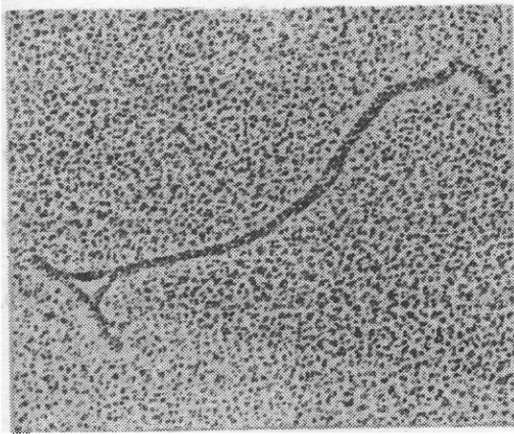


图3 pCJ3 质粒 DNA 分子的共价闭合超螺旋环状构型( $\times 120,000$ )

Fig. 3 EM of plasmid pCJ3 covalently closed circular DNA ( $\times 120,000$ )

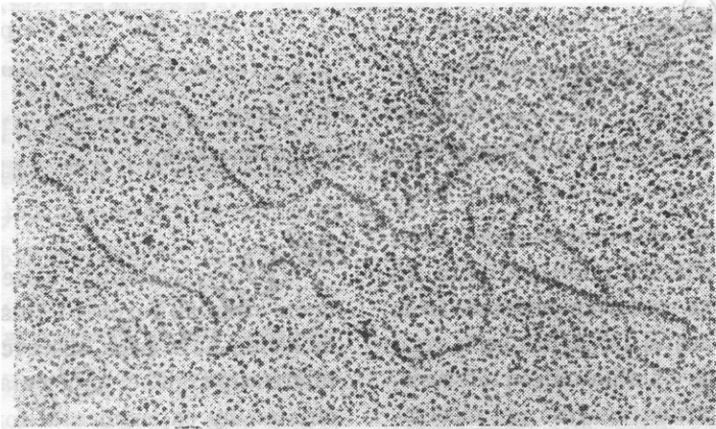


图4 pCJ3 质粒 DNA 分子的开放环状构型( $\times 120,000$ )

Fig. 4 EM of plasmid pCJ3 open circular DNA ( $\times 120,000$ )

子切开后所形成的线状分子。

#### 四、A3 菌株质粒 DNA 的电镜观察

A3 菌株的质粒 DNA 分子的电镜照片见图 3、4。图 3 为共价闭合超螺旋环状构型,图 4 为开放环状构型。

根据质粒消除、转化试验、琼脂糖凝胶电泳分析及电镜观察等的试验结果,短小芽孢杆菌 A3 菌株具有四环素抗性标记的质粒 DNA 已得到证明,定名为 pCJ3 质粒。

#### 参 考 文 献

- [1] Ehrlich, S. D. et al.: International Symposium on Genetic Engineering, Ed. by Boyer, H. W. and S. Nicosia, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1978, pp. 25—32.
- [2] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **124**: 484—490, 1975.
- [3] Carlton, B. C. et al.: *J. Bacteriol.*, **117**: 1201—1209, 1974.
- [4] Tanaka, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **129**: 1487—1494, 1977.
- [5] Tanaka, T. et al.: *J. Bacteriol.*, **131**: 699—701, 1977.
- [6] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **115**: 291—298, 1973.
- [7] Lovett, P. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**: 365—370, 1973.
- [8] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **120**: 488—494, 1974.
- [9] Lovett, P. S. et al.: *J. Bacteriol.*, **127**: 817—828, 1976.
- [10] 范云六等: 微生物学报, **18** (4): 293—297, 1978.
- [11] 范云六等: 微生物学报, **14** (2): 209—215, 1974.
- [12] Bernhard, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **133**: 897—903, 1978.

- [13] Sonstein, S. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **109**: 262—265, 1972.
- [14] Sonstein, S. A. et al.: *J. Bacteriol.*, **111**: 152—155, 1972.
- [15] Wehrli, W. et al.: *Bacteriol. Rev.*, **35**: 290—309, 1971.
- [16] Guerry, D. J. et al.: *J. Bacteriol.*, **116**: 1064—1066, 1973.
- [17] Hympherys, G. O. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **383**: 457—463, 1975.
- [18] Johnson, J. B. and Gunsalus, J. C.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **75**: 13, 1977.
- [19] Sharp, P. A. et al.: *Biochem.*, **12**: 3055—3063, 1973.
- [20] Anagnostopoulos, C. and J. Spizien: *J. Bacteriol.*, **82**: 741—746, 1961.
- [21] Bujard, H.: *J. Mol. Biol.*, **49**: 125—137, 1970.
- [22] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, **54**: 557—565, 1970.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLASMID pCJ3 IN *BACILLUS PUMILUS*

Zhou Zhenlin    Chen Jiaping  
(Zhongshan University, Guanzhou)

Wen Jin    Liu Feipeng  
(Jinan University, Guanzhou)

Zhou Jin    Zuo Liren  
(Institute of Microbiology of Guanzhou.)

A tetracycline resistant plasmid DNA pCJ3 has been detected and isolated in A3 strain of *Bacillus pumilus* isolated from the soil. The plasmid DNA has been verified through tests of elimination of resistance, transformation, agarose gel electrophoresis and electron microscopic observa-

tion.

Both covalently closed circular and open circular forms of this plasmid DNA molecule have been observed under electron microscope. The molecular weight calculated by experimental formula has been about  $4.33 \times 10^6$ .