

芽孢杆菌质粒的研究

II. 几种芽孢杆菌质粒的分离与鉴定

徐婉学 范云六

(中国科学院微生物研究所, 北京)

侧孢芽孢杆菌 AS 1.864, 多粘芽孢杆菌 AS 1.794, 球形芽孢杆菌 AS 1.560 是带有质粒的菌株, 通过琼脂糖凝胶电泳图谱分析, 回收质粒 DNA, 并经电镜观察证明质粒 DNA 分子的存在。首次发现 AS 1.864 菌株的培养液及其无菌过滤液对蚊幼虫有显著的致死作用。

1978 年我们曾在短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) AS 1.326 菌株中分离到一个具有“杀死活性”功能的质粒^[1]。近年来国外报道了含有质粒的芽孢杆菌有 *Bacillus megaterium*^[2], *B. pumilus*^[3-5], *B. thuringiensis*^[6], *B. subtilis*^[7], *B. brevis*^[8]。为了扩大分子载体的范围和研究质粒的复制与功能, 对芽孢杆菌属中的部分菌种进行了质粒的分离与鉴定。本文报道侧孢芽孢杆菌 (*B. laterosporus*) AS 1.864, 多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*) AS 1.794, 球形芽孢杆菌 (*B. sphaericus*) AS 1.560 三个菌种中质粒 DNA 的分离与鉴定。芽孢杆菌属中的这三个种中含有质粒, 目前在国内外尚未见报道。

材料与方 法

(一) 菌种

菌种来自中国科学院微生物研究所菌种保藏室。

(二) 培养基

见文献 [1]

(三) 质粒 DNA 的分离与鉴定

1. 琼脂糖-溴化乙锭 (Ethidium bromide) 凝胶电泳: 垂直平板 (13.5×14×0.2cm) 及圆柱状 (15×0.6cm) 凝胶电泳, 使用 DY-II 电泳仪。电泳缓冲液为 Tris base 89 mM, boric acid

89mM, EDTA 2.5mM, pH 8.3, 琼脂糖浓度为 0.9%。电压 30—40V 1 小时, 然后 200V 电泳 2 小时。

2. 溶菌混合液: 参照文献 [10]。

3. 质粒 DNA 的分离: 取 40μl 溶菌混合液置指形管中, 挑取菌龄为 16—24 小时的单菌落与溶菌混合液充分混匀, 放置室温 40—50 分钟, 然后取 15μl 放至凝胶槽中, 加入 2% SDS 混合液 30μl, 加入上层混合液 100μl, 最上层覆盖冷至 45℃ 的琼脂糖凝胶液。电泳时先以 2mA, 30—40V 进行一小时, 然后改为 200V 电泳, 当指示剂前沿接近末端时停止电泳, 取出凝胶浸泡于含有 0.5μg/ml 溴化乙锭的电泳缓冲液中约 15 分钟, 置紫外灯下观察结果, 含有质粒的样品在凝胶带上可以见到除了扩散状的染色体带之外, 还存在细而整齐的荧光区带即质粒 DNA 带。

4. 质粒 DNA 的回收: 将含有质粒 DNA 的琼脂糖凝胶切下, 盛入玻璃柱中, 两端用琼脂糖凝胶接封后, 柱底端浸于含有 0.2ml 电泳缓冲液的透析袋内, 以 100V 电泳使质粒 DNA 充分洗脱, 收集洗脱液, 于 260nm 波段测紫外吸收, 求出 DNA 含量, 回收的样品用于电镜制片。

5. 消除质粒的方法: 用溴化乙锭为质粒消除剂, 浓度为 $3 \times 10^{-4}M$ 和 $3 \times 10^{-5}M$, 处理时间 24 小时, 菌龄为对数生长期。

6. 质粒 DNA 的电镜观察: 每株菌分别回

本文于 1981 年 1 月 19 日收到。

收各条质粒带的 DNA 液,用单分子层技术制片,以日立牌 H-500 型电子显微镜观察结果。

结果与讨论

(一) 菌落法快速琼脂糖凝胶电泳分离质粒 DNA

用菌落法快速琼脂糖凝胶电泳分离质粒 DNA,证实侧孢芽孢杆菌 AS 1.864,多粘芽孢杆菌 AS 1.794,球形芽孢杆菌 AS 1.560 都是含有质粒的菌株。这三株菌的琼脂糖凝胶电泳图谱中,在扩散状的染色体带下面,每个菌分别可以见到三条清晰的荧光吸收带(图版 I-1—3)。至于每株菌在凝胶上不同部位所出现的各条质粒带,它们是否属于不同的质粒还是同一种质粒的不同构型,尚待深入研究。

(二) 质粒 DNA 的电镜观察

电镜观察发现侧孢芽孢杆菌 AS 1.864、多粘芽孢杆菌 AS 1.794、球形芽孢杆菌 AS 1.560 都存在环状 DNA 分子(图版 I-4—6)。

(三) AS 1.864、AS 1.794 的杀虫抑菌作用

实验发现 AS 1.864 菌株对蚊子幼虫有显著的致死作用。用该菌的培养液及其培养液的无菌滤过液分别稀释处理孑孓,16—18 小时后,孑孓死亡率为 95%,而对对照组为零。在芽孢杆菌属中,侧孢芽孢杆菌能使孑孓致死,国内外尚未见报道。至于致死作用与质粒之间有无相关性,尚在研究中。

多粘芽孢杆菌 AS 1.794 菌株对 *E. coli* 44102 (多粘菌素敏感株)^[2] 有明显的抑制作用,但经溴化乙锭处理后消失了抑制作用(图 1),这可能是由于溴化乙锭对产生或控制抑菌物质起作用的某些基因失活所致,是否与质粒的基因有关,尚待研究。

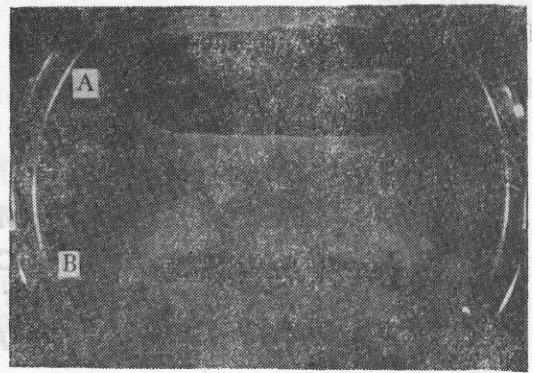


图 1 AS 1.794 菌株对 *E. coli* 44102 的抑制作用 (A), AS 1.794 经过溴化乙锭处理后失去了抑制作用 (B)

Fig. 1 The inhibition of *E. coli* 44102 by *B. polymyxa* AS 1.794 (A) no inhibition of *E. coli* 44102 by *B. polymyxa* AS 1.794 after treatment with ethidium bromide (B)

(四) 关于快速检测质粒方法的讨论

Thomas 的方法中以溶菌酶溶解细胞壁^[10],在本实验中,仅仅利用 Ficoll 400,000 和 SDS 的作用就可以使细胞壁破碎,在凝胶电泳图谱中的质粒带也很清晰。所以,不同的菌种对溶菌混合液的要求也有不同。

此外,溶菌混合物加入后处理菌体的时间是影响质粒分离效果的原因之一。本实验表明:处理时间在 20 分钟以下时,凝胶电泳上见不到质粒带,处理 30 分钟时虽可见到质粒带但不清楚,适宜的处理时间是 40—50 分钟。

参 考 文 献

- [1] 范云六等:微生物学报, 18 (4): 293—297, 1978.
- [2] Carlton, B. C. and D. R. Helinski: *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 64: 592—599, 1969.
- [3] Lovett, P. S. and M. G. Bramucci: *J. Bact.*, 124: 484—490, 1975.
- [4] Lovett, P. S.: *J. Bact.*, 115: 291—298, 1973.
- [5] Lovett, P. S.; and B. D. Burdick: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54: 365—370, 1973.
- [6] Debabov, V. G. et al.: *Genetika*, 13: 496—

- 501, 1977.
- [7] Tanaka, T. et al.: *J. Bact.*, 129: 1487—1494, 1977.
- [8] Dobritsa, A. P. et al.: *Molec. gen. Genet.*, 164: 195—204, 1978.
- [9] 中华人民共和国药品标准, 人民卫生出版社, 北京, 1963年, 附录 61 页。
- [10] Thomas Eckhardt: *Plasmid*, 4: 584—588, 1978.

STUDY ON PLASMIDS OF BACILLI

II. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PLASMIDS FROM *BACILLUS LATERSPORUS* AS 1.864, *B. POLYMYXA* AS 1.794 AND *B. SPHAERICUS* AS 1.560

Xu Wanxue Fan Yunliu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The presence of plasmids in *Bacillus laterisporus* AS 1.864, *B. polymyxa* AS 1.794, and *B. sphaericus* AS 1.560 has been examined by agarose gel electrophoresis, the recovery of the DNA and electron microscopic method.

Both culture and culture filtrate of AS 1.864 can kill larvae of mosquito, the rela-

tionship between the presence of plasmids of AS 1.864 and killing function is under investigation.

AS 1.794 can produce the antibiotic which has manifested antibiosis on the *E. coli* 44102. The plasmids with this effect is to be studied later.