

## 高温细菌质粒的调查

江行娟 任大明 杨庆云\* 冯德鑫

张君凯 叶银凤 沈仁权

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

由于高温细菌在发酵工业和重组 DNA 研究中具有潜力, 近年来已经有几个实验室开始从事高温细菌的质粒和基因克隆的研究。Nagahari 等<sup>[1]</sup>应用大肠杆菌质粒作载体, 将嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 的染色体基因 *leuB* 克隆在大肠杆菌中, 获得了最适温度为 80℃ 的  $\beta$ -异丙基苹果酸脱氢酶, 这酶的耐热性决定于 *leuB* 基因本身。至于宿主、载体都用高温细菌的系统迄今未见报道。Hishinuma 等<sup>[2]</sup>在栖热菌属中发现隐蔽性质粒。Bingham 等<sup>[3]</sup>和 Imanaka 等<sup>[4]</sup>分别在嗜热芽孢杆菌中找到抗药性质粒。

我们用琼脂糖凝胶电泳快速检测法, 从来自云南、广东、湖南、海南岛等地的温泉土样中得到的能在 60℃ 生长的 204 株菌种中找到 4 株带有质粒的菌株, 并在电泳下测量了开环分子的周长。

### 实验方法

#### (一) 培养基

肉汤培养基成份为: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, pH7.2。

#### (二) 高温细菌筛选

将土样加入肉汤培养基中, 在 60℃ 振荡培养 12 小时后, 在肉汤固体培养基上(60℃)划线分离单菌落。抽提质粒时都在 55℃ 中培养。

#### (三) 快速抽提质粒方法

抽提的前阶段大体上参照 H'egaral 和 Anagnostopoulos<sup>[5]</sup>用于抽提枯草杆菌的方法。为了简化手续, 将溶菌酶配制在 25% 蔗糖溶液中。溶菌时间和温度稍有改动。细菌裂解后的操作步骤参照 Klein 等<sup>[6]</sup>的方法, 用酸及氯仿-异戊醇脱蛋白。所得产物为质粒 DNA 的粗制品。

5ml 55℃ 振荡培养 12 小时的菌液经离心收

集菌体, 加入 60 $\mu$ l 含溶菌酶的蔗糖溶液(25% W/V 蔗糖, 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 溶菌酶 10 mg/ml)和 20 $\mu$ l 0.2M Na<sub>2</sub>-EDTA 溶液(pH8.0)均匀混合后在 25℃ 水浴中保温 10 分钟左右。加入 80 $\mu$ l 1% Triton X-100 (配在 TE 缓冲液中, Tris-HCl 0.05M, pH8.0, Na<sub>2</sub>-EDTA 0.05M)。轻轻振荡后在 15℃ 水浴中保温 5 分钟。加入 200 $\mu$ l 0.1M Tris 缓冲液(pH8.0)平衡的酸及 100 $\mu$ l 氯仿-异戊醇(24:1), 振荡后在台式高速离心机(15,000rpm)上离心 5 分钟。上清液用等体积的氯仿-异戊醇再脱一次蛋白, 即可作电泳检查。

#### (四) 质粒 DNA 大量制备法

参照 Bingham<sup>[3]</sup>的方法, 稍加修改, 用中性去污剂 TritonX-100 代替 SDS, 脱蛋白时用缓冲液饱和的酚和氯仿-异戊醇混合溶剂。

300ml 55℃ 培养 12 小时后收集的菌体, 用 TES 缓冲液(30mM Tris-HCl, pH8.0; 5mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 50mM NaCl)洗涤一次, 再悬浮于 4.5ml 含蔗糖 25%(W/V)的 TES 缓冲液中, 加入 0.2M Na<sub>2</sub>-EDTA 0.75ml, 溶菌酶溶液 1.5ml (用 TES 缓冲液配制, 15mg/ml)。在 25℃ 水浴中保温 10 分钟左右, 轻轻振荡, 加入 1% Triton X-100 6.75ml (配在 0.05M 的 TE 中), 加入 3.4ml 5M NaCl 溶液, 置于 4℃ 冰箱过夜。18,000rpm 冷冻离心 30 分钟, 上清液用 0.1M Tris pH8.0 平衡的酚脱蛋白三次, 再用氯仿-异戊醇脱蛋白一次。上清液中加入 1/10 体积的 2M 醋酸钠溶液(pH5.6)和二倍体积冷的无水乙醇, 置于 -20℃ 低温冰箱过夜, 离

本文于 1982 年 6 月 23 日收到

\* 复旦大学生物系。

承复旦大学遗传所电镜室汪训明、王顺德同志指导并协助电镜工作; 复旦大学生物系黄静娟同志协助鉴定菌种; 安徽师范学院张学岭同志参加部分工作在此一并致谢。

心、沉淀用 1mM TE pH8.0 缓冲液溶解后加入 RNase, 使最终浓度达  $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$  作用 1 小时 (RNase 配在 pH4.8 的 0.01M 醋酸钠缓冲液中, 浓度为  $2\text{mg}/\text{ml}$ ,  $100^\circ\text{C}$  水浴处理 10 分钟, 除去混杂在 RNase 中的 DNase. RNase 作用时的 pH 约为 7.2)。

### (五) 粗制质粒 DNA 的纯化

采用 Ohlsson 等<sup>[7]</sup>的两相法或 Chuika 等<sup>[8]</sup>的割胶电泳洗脱法。电泳样品用后法纯化。

### (六) 凝胶电泳

采用盘状立式电泳。电泳缓冲液内含有  $2.5\text{mMNa}_2\text{-EDTA}$ ,  $89\text{mMTris}$ ,  $89\text{mM}$  硼酸, pH8.4<sup>[9]</sup>。琼脂糖凝胶浓度为 0.7%。胶内含溴化乙锭  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。电泳样品中 DNA 溶液与蔗糖-溴酚兰的体积为 4:1。蔗糖-溴酚兰配方为 100ml 重蒸馏水中含蔗糖 50g, 溴酚兰 0.2g。胶长 8.5cm, 电压 60V, 电泳时间约 3 小时左右。

### (七) 电镜技术

按 Ferguson 及 Davis<sup>[10]</sup> 方法。

## 结 果

从四株高温细菌 T507、T525 T526、T586 中检出有质粒存在。用快速抽提方法制得的 DNA, 再经二相法纯化后, 染色体 DNA 明显减少, 质粒 DNA 则呈 OC 型和 CCC 型二条带, 在电镜中

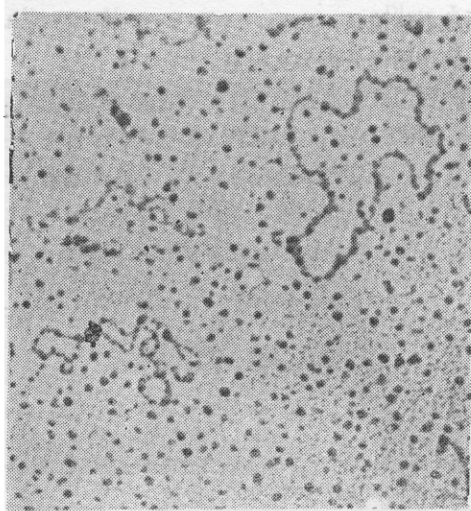


图 2 T526 的质粒的电镜图

Fig. 2 Electromicrograph of plasmid from T526 ( $\times 60,000$ )

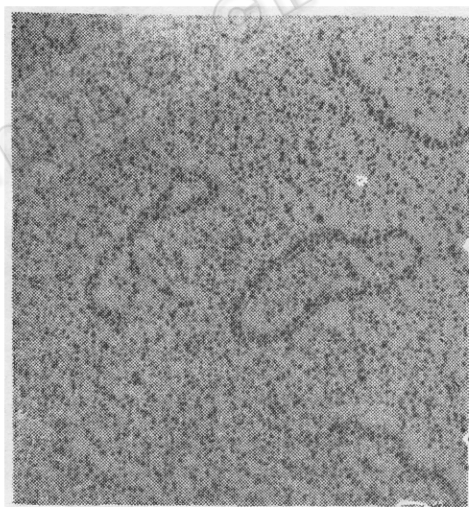


图 3 T586 的质粒的电镜图

Fig. 3 Electromicrograph of plasmid from T586 ( $\times 120,000$ )

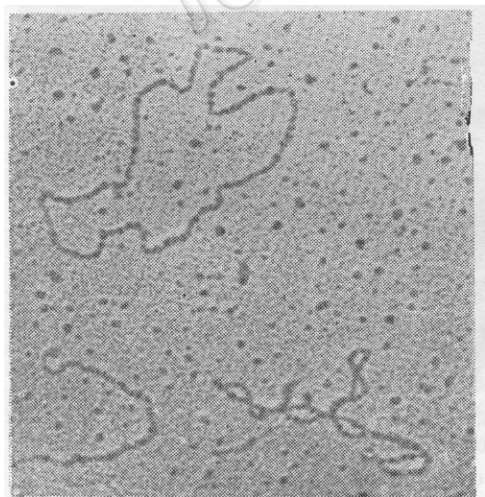


图 1 T507 的质粒的电镜图

Fig. 1 Electromicrograph of plasmids from T507 ( $\times 60,000$ )

也未观察到周长相差悬殊的两种质粒。T507 的质粒 DNA 经纯化后的电泳图上可见二条极为接近的带, 电镜测量 DNA 分子的周长也呈双峰分布, 说明可能是分子量相差不大的两种质粒; 周长分别为  $1.81 \pm 0.02\mu\text{m}$  和  $2.00 \pm 0.01\mu\text{m}$  (图 1)。T526 的质粒为  $1.6 \pm 0.1\mu\text{m}$  (图 2)。T586 的质粒为  $0.47 \pm 0.02\mu\text{m}$  (图 3)。制片时都没有加入内标。根据 T525 质粒的电镜测量值和电泳测量值甚为接近 (另文报道), 我们认为这里报道的三个

质粒电泳值是可靠的。关于 T525 的质粒分子量及酶切图谱分析另文报道。

这四株高温细菌经鉴定都是嗜热脂肪芽孢杆菌。测试过它们对链霉素、新霉素、林可霉素、氯霉素、利福平、红霉素、四环素、氨基青霉素、卡那霉素九种药物的抗性,当浓度为 2—5 $\mu\text{g/ml}$  时都是敏感的,初步认为这几种质粒都属于隐蔽性质粒。

### 参 考 文 献

- [1] Nagahari, K. et al.: *Gene* 10: 137—145, 1980.
- [2] Hishinuma, F. et al.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 104: 193—199, 1978.
- [3] Bingham, A. H. A. et al.: *Jour. Gen. Microbiol.*, 114: 401—408, 1979.
- [4] Imanaka, T. M. et al.: *Jour. Bacteriol.*, 146: 1091—1097, 1981.
- [5] Le Hegarat, J. C. and C. Anagnostopoulou: *Mol. Gen. Genet.*, 157: 167—174, 1977.
- [6] Klein, R. D. et al.: *Plasmid*, 3: 88—91, 1980.
- [7] Ohlsson, R., *Nucleic Acid Research* 5: 583—590, 1978.
- [8] Chouik, Y. et al.: *Molec. Biol. Rep.*, 5: 237—239, 1979.
- [9] Meyers, J. A. et al.: *Jour. Bacteriol.*, 129: 1171, 1977.
- [10] Ferguson, J. and R. N. Davis Quantitative electron microscopy of nucleic acids in "Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy" Edited by Kochler, K. Springer-Verlag. 1978.