

四种不同细菌质粒转化庆丰链霉菌的研究

余茂勋 江 宁

(中国科学院微生物研究所, 北京)

利用四种不同质粒 (pBR322、pUB110、pKT071 和 pAO1) 在 10—15% 聚乙二醇 6000 存在时, 可以成功地转化到庆丰链霉菌受体; 其中转化的 pBR322 质粒经过 20 次传代后, 仍有 30% 左右可稳定地存留, 而其它三种质粒经 2—3 次传代后立即消失。用无细胞胞外粗抽提物证实 pBR322 质粒基因在庆丰链霉菌细胞中得到表达。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳证实转化子胞外抽提物中显著呈现一条分子量为 30,000 左右的蛋白质带, 与已知的 pBR322 编码的 β -内酰胺酶分子量相一致。

关键词 庆丰链霉菌; 转化; pBR322

链霉菌在抗生素工业中占有重要的地位, 天然抗生素中有一半以上来自链霉菌^[1]。链霉菌也产生多种胞外酶, 其中有些已用于生产。在链霉菌的培养技术和发酵工艺中, 人们已经积累不少经验, 同时也拥有一套较为完整的技术措施。此外, 至今尚未发现对人畜致病的链霉菌^[2]。因此, 利用现有条件把具有经济价值的外源基因克隆到链霉菌, 在生产中提高和改进产物的设想是十分有意义的。目前, 较多的工作集中在天蓝色链霉菌 (*Sireptomycetes coelicolor*) 和变青链霉菌 (*S. lividans*) 的研究^[3-5]。

庆丰链霉菌 (*S. qingfengmyceticus*) 是一株产农用抗生素的菌株^[6,7]。它能利用简单成分的培养基, 产生种类不多的胞外蛋白或多肽, 这将有助于产物的分离和提纯^[8]。我们用四种不同来源的质粒转化庆丰链霉菌, 观察并分析它们在细胞中的表达, 试图建立一种载体-受体体系用于基因克隆。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

所使用的菌株和质粒, 及其标记和来源列入表 1。

(二) 主要试剂、溶液和培养基

溶菌缓冲液^[12]、GP 培养基^[8]和 P 培养基^[12]均按已报道的配方配制。R5 培养基按 Hopwood 实验室使用的配方, 每升含蔗糖 103g、K₂SO₄ 0.25g、MgCl₂·6H₂O 10.12g、葡萄糖 10g、水解酪素 0.1g、微量元素^[12] 2ml、酵母抽提物 (Oxoid) 5g、三羟甲基甲胺乙基磺酸 (TES) (Aldrich) 5.73g、琼脂粉 22g, 用 1M NaOH 调 pH 至 7.0。酵母麦芽汁培养基, 每升含酵母抽提物 3g、蛋白胨 (Difco) 5g、葡萄糖 10g、蔗糖 114g、MgCl₂·6H₂O 1g、16° 波美麦芽汁 300 ml, 8 磅 15 分钟灭菌。溶菌酶购自 Sigma。聚乙二醇 (PEG) 6000 来自 BDH, 使用时取 2.5g 溶于 7.5 ml 的 P 培养基中。

(三) 方法

1. 质粒 DNA 的制备和转化:

按 Holmes 和 Quigley 方法^[12]提取表 1 中细菌质粒 DNA。取在酵母麦芽汁培养基中生长 2 天的庆丰链霉菌 Q3 菌体, 参照 Hopwood 等人的方法^[12]制备原生质体。将 50 μ l 原生质体悬液和 10 μ l 质粒 DNA (同时以质粒 DNA 和 DNA 酶 I 消化作对照), 加入 50 μ l 溶于 P 培养基的 PEG 6000 溶液, 混合均匀, 然后再加入 0.5ml P 培养基

本文于 1984 年 8 月 23 日收到。

表 1 菌株、质粒及其来源

Table 1 Strains, plasmids and its sources

菌株 strain	质粒 plasmid	标记 Marker	来源* Source	参考资料 Reference
<i>Streptomyces qingfengmyceticus</i> Q3		Tet ^r , Amp ^r , Kan ^r		9
<i>Escherichia coli</i> KH802	pBR322	Tet ^r , Amp ^r		10
<i>E. coli</i> C600	pKT071	Kan ^r , Cam ^r	K. N. Timmis	11
<i>E. coli</i> HB101	pAO1	Kan ^r	侯云德	
<i>Bacillus subtilis</i> BD366	pUB110	Kan ^r	J. Spizizen	

* 作者对提供材料的各位同事表示谢忱。

进行稀释,混匀,分别涂布在 R5 培养基平板和已选择的抗生素的 R5 培养基平板上,在 30℃ 培养 3 天后,观察计数,按下式计算转化率。

转化率

$$= \frac{\text{在含选择抗生素的 R5 培养基上生长的菌落数}}{\text{在 R5 培养基上生长的菌落数}}$$

$\times 100\%$

2. 细菌质粒在庆丰链霉菌中的稳定性:

将生长在含选择抗生素的 R5 培养基上的转化子转接在土豆葡萄糖培养基斜面上,连续转接传代。用无菌水洗下各代孢子,并制成悬液,进行适当稀释,涂布在 GP 培养基平板上,在 30℃ 培养 3 天,待长出单菌落后,挑取单菌落转接到含有选择抗生素的 GP 培养基平板上,经过培养,出现生长后进行计数。

质粒消失率

$$= \frac{\text{挑取菌落总数} - \text{在选择抗生素的培养基上生长的菌落数}}{\text{挑取菌落总数}} \times 100\%$$

3. 细菌质粒基因在庆丰链霉菌中的表达:

取质粒 pBR322 DNA 转化的庆丰链霉菌[简称 SQ(pBR322)]和未经转化的庆丰链霉菌(简称 SQ)分别在 GP 培养基中于 30℃ 振荡培养 48 小时。离心去除菌体,用 40% 硫酸铵盐析,经离心后把沉淀物溶于少量 50mM Tris-HCl(pH8.0) 缓冲液中,用同一缓冲液在 4℃ 透析,所得液体为胞外无细胞粗抽提物,其体积减少至原液的 1/200。将两种无细胞粗抽提物各 50μl 经 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,比较所出现的蛋白质区带。

此外,分别取 0.2ml SQ(pBR322) 粗抽提物

加入 100ml 含氨基青霉素 (25 μg/ml) 和四环素 (25μg/ml) 的 GP 培养基中,接入庆丰链霉菌 Q3 孢子,在 30℃ 振荡培养 40 小时,测定菌体的生长。

结 果

所用四种不同质粒都能以较高效率转化庆丰链霉菌。当聚乙二醇浓度为 10—15% 时,转化率接近最高水平,趋于稳定(图 1)。DNA 浓度超过 8 μg/ml 时,它的浓度改变对转化率没有显著的影响(图 2)。

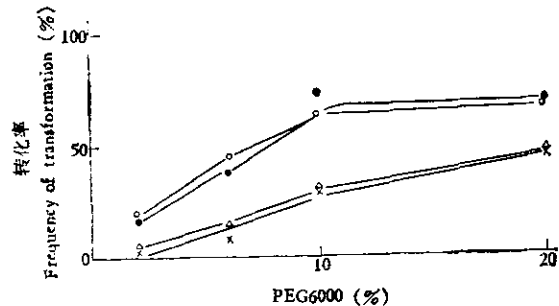


图 1 聚乙二醇的浓度对转化率的影响

Fig. 1 The effect of concentration of PEG 6000 on the frequency of transformation

● pUB110 ○ pBR322 △ pKT071 × pAO1

在不同浓度的聚乙二醇下,将转化时间从 2 分钟延长至 10 分钟,对 pBR 322 的转化率基本上没有什么变化(表 2),说明转化过程的完成所需的时间是很短暂的。

虽然四种质粒都能成功地转化庆丰链霉菌,但随着细胞的增殖,它们会逐渐消

表 2 延长时间对 pBR322 转化率的关系

Table 2 The effect of time duration on the frequency of transformation

时间(分) t(min)	PEG6000 (%)	0.7	2	5	7	10	20
2		20	43	46	54	64	66
10		18	33	44	56	64	71

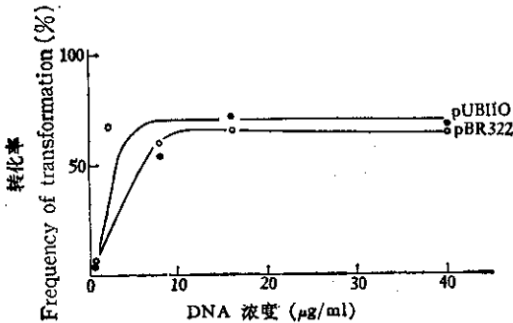


图 2 不同浓度的 DNA 与转化率的关系

Fig. 2 The relationship between DNA concentration and frequency of transformation

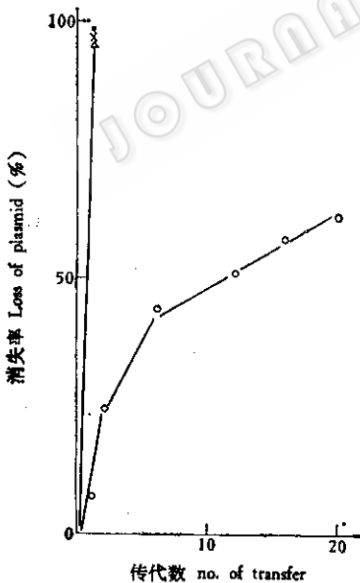


图 3 不同质粒在庆丰链霉菌中的消失

Fig. 3 The loss of transformed plasmids in recipient cells

● pUB 110 ○ pBR322 △ pKT071 × pAO1

失, 质粒 pUB110、pKT071 和 pAO1 经过 2—3 次细胞传代后, 基本上已从宿主细胞中消失, 因此, 我们只能根据抗药性的表现来判断这三种质粒的转化; 而经过 20 次传代后, 质粒 pBR322 仍有 30% 左右存留, 表明它在庆丰链霉菌中相对比较稳定 (图

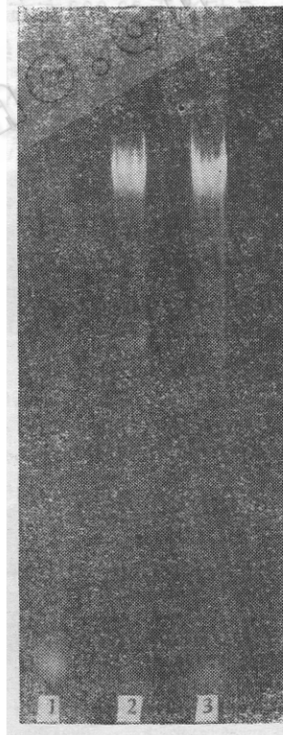


图 4 质粒分离结果的比较

Fig. 4 The isolation of plasmids

1. 大肠杆菌 KH802 的 pBR322
 2. 庆丰链霉菌的 pBR322
 3. 庆丰链霉菌
1. pBR322 from *E. coli* KH802
 2. pBR322 from *S. qingfengmyceticus*
 3. *S. qingfengmyceticus*

表 3 庆丰链霉菌在含胞外粗抽提物中的生长

Table 3 The growth of *S. qingfengmyceticus* in the presence of cell free extracts

A ₆₀₀	GP	GP + 氨基青霉素 GP + Ampicillin	GP + 四环素 GP + Tetracycline
未加 SQ(pBR322) 胞外抽提物 -SQ(pBR322)extract	1.45	0	0
加入 SQ(pBR322) 胞外抽提物 +SQ(pBR322)extract	1.45	1.50	0.02

3)。图 4 指出多次传代后从 SQ(pBR322) 细胞中分离到的质粒 DNA 与大肠杆菌 KH802 中所分离到的质粒 pBR 322 DNA 处于相同位置。

图 5 指出 SQ (pBR322) 和 SQ 胞外粗抽提物的电泳分析结果。在前者中可以明显地看到一条相当于 30,000 左右分子量的蛋白质带, 这与已知的 pBR322 编码的 β -内酰胺酶的分子量相同^[4]。将 SQ(pBR322) 胞外粗抽提物加在含氨基青霉素的 GP 培

养基中, 使对氨基青霉素敏感的庆丰链霉菌能良好地生长, 说明粗抽提物中存在 β -内酰胺酶活性。但是, 当这种粗抽提物加入含四环素的培养基中, 并未能恢复庆丰链霉菌的生长, 表 3 列出有关试验的测定结果。

讨 论

选择适当的受体系统对基因操作、基因表达及其产物的分离和提纯, 无疑具有十分重要的作用。通过长期的研究, 人们对大肠杆菌的遗传背景和生化组分比较清楚了解。所以, 至今大多数工作中采用大肠杆菌作为基因克隆的受体, 但在其产物的分离和提纯方面, 却还存在一些不易克服的困难, 其中主要是热源问题。随着遗传工程的发展, 需要开发具有工业生产价值的受体系统。因此, 近年来已相继出现利用枯草芽孢杆菌^[15]、酵母菌^[16]和链霉菌^[13,17]作受体的研究。这些菌不仅是重要的生产用菌, 而且对人体也较为安全。其中链霉菌在抗生素工业中拥有特殊重要的地位, 因此, 开发链霉菌作为受体系统是十分重要的, 并且日益受到广泛的重视^[2]。

目前, 在链霉菌中已发现不少质粒^[18-20], 有的正在被构建成有用的载体^[20,21]。大肠杆菌-链霉菌的双功能载体的构建十分引人注目^[22,24]。我们使用的四种细菌质粒都能转化庆丰链霉菌, 在适宜的条件下, 转化率可达到 40--70% 左右(图 1)。

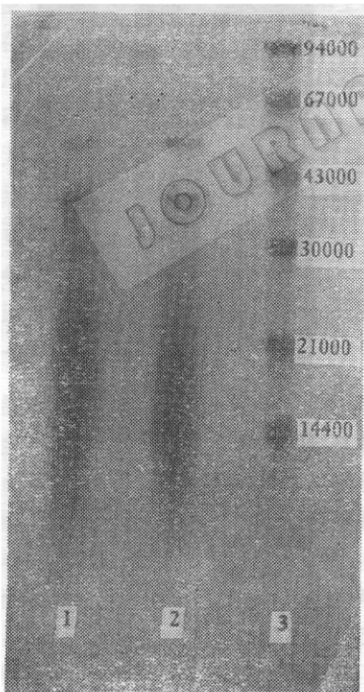


图 5 胞外粗抽提物的电泳图谱

Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cell free extracts

1. SQ(pBR322) 2. SQ 3. 分子量参照物
Molecular weight markers

这与 Bibb 等人^[4]在一些链霉菌中所报道的结果大致相同。但质粒 pUB110、pKT071 和 pAO1 在庆丰链霉菌中经过 2—3 次传代后易于消失, 它们不适宜用作载体-受体系统。质粒 pBR322 在新的宿主细胞中较为稳定, 经过 20 次传代, 仍保留 30% 左右。从这种转化细胞所分离到的质粒 DNA 与大肠杆菌 KH802 中所分离到的质粒 pBR322 处于相同的位置。从 SQ(pBR322) 粗提物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析中可检测到相当于 pBR322 基因编码的 β -内酰胺酶分子的一条蛋白质带, 而这种粗提物加入含氨苄青霉素的培养基中, 能使对这种抗生素敏感的庆丰链霉菌生长。这些结果说明 pBR322 基因的部分表达, 但在我们的试验中还没有证明四环素抗性基因的表达。Chater 等人^[2]利用噬菌体和质粒构建的杂种质粒 ϕ C31:pBR322 能使四环素抗性基因在链霉菌中获得表达; 按 Backman 和 Boyer^[23] 最近报道决定四环素抗性仅仅是一种分子量为 36,500Dal 的多肽, 在图 5 的甬道中没有发现相应位置的区带。至于在链霉菌中能进行表达的其它抗药性基因, 除已报道的新霉素^[24, 25]、潮霉素^[24]、氯霉素和卡那霉素抗性^[26]外, 还未见其它报道。

从以上的初步试验结果分析, 我们认为利用质粒 pBR322 转化庆丰链霉菌, 可以为基因克隆和表达提供载体-受体系统。

参 考 文 献

[1] Bedy, J.: *Process Biochem.* Oct./Nov. pp. 28—35, 1980.
 [2] Chater, K. F. et al.: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, (eds.) W.

Henle et al. 96: pp. 69—95, 1982 Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg,
 [3] Hopwood, D. A. et al.: *Nature*, 268: 171—174, 1977.
 [4] Bibb, M. J. et al.: *Nature*, 274: 398—400, 1978.
 [5] Suarez, J. E. and K. F. Chater: *J. Bacteriol.*, 142: 8—14, 1980.
 [6] 中国科学院植物生理研究所微生物农抗组: *微生物学报*, 14: 42—46, 1974.
 [7] 中国科学院植物生理研究所微生物农抗组: *微生物学报*, 15: 101—109, 1975.
 [8] Yu, M. X. et al.: *Antimicrob. and Chemother.*, (in press)
 [9] 余茂勋等: *微生物学报*, 21: 57—62, 1981.
 [10] Bolivar, F. et al.: *Gene*, 2: 95—113, 1977.
 [11] Slocombe, P. M. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 7: 1469—1484, 1979.
 [12] Holmes, D. S. and M. Quigley: *Anal. Biochem.*, 114: 193—197, 1981.
 [13] Hopwood, D. A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 162: 307—317, 1978.
 [14] Dougan, G. et al.: *J. Bacteriol.*, 138: 48—54, 1979.
 [15] Nagahari, K. and K. Sakaguchi: *Mol. Gen. Genet.*, 158: 263—270, 1978.
 [16] Hinnen, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929—1933, 1978.
 [17] Hershberger, C. L.: *Ann. Rep. Ferment. Proc.*, 5: 101—126, 1982.
 [18] Okanishi, M. et al.: *J. Antibiotics* 33: 88—91, 1980.
 [19] Schrempf, H. and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, 131: 251—258, 1977.
 [20] Kieser, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 185: 223—238, 1982.
 [21] Richardson, M. A. et al.: *Gene*, 20: 451—457, 1982.
 [22] Suarez, J. E. and K. F. Chater: *Nature*, 286: 527—529, 1980.
 [23] Backman, K. and H. W. Boyer: *Gene*, 26: 197—203, 1983.
 [24] Kuhstoss, S. and R. N. Rao: *Gene*, 26: 295—299, 1983.
 [25] Bibb, M. J. et al.: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, (ed.) M. Inouye, Academic Press, London, p. 53—82, 1983.
 [26] Schottel, J. L. et al.: *J. Bacteriol.*, 146: 360—368, 1981.

TRANSFORMATION OF *STREPTOMYCES QINGFENGMYCETICUS* BY FOUR DIFFERENT BACTERIAL PLASMIDS

Yu Maoxiao Jiang Ning

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

Four bacterial plasmids, i.e. pBR322, pUB110, pKT071 and pA01 from different hosts were successfully transformed to *Streptomyces qingfengmyceticus* in the presence of 10—15% PEG 6000. Plasmid pBR322 more stably harboured than others. It was demonstrated that pBR322 DNA could be isolated from more than 30% of transformants even after 20 transfers. Plasmids pU110, pKT071 and pA01, however, rapidly disappeared from the recipient cells after 2 or 3 transfers. Partial expression of pBR322 genes was observed in cell free extract system. A protein band of molecular weight approx-

imately 30,000 daltons, which was similar to that of β -lactamase was demonstrated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The expression of tetracycline resistance gene of pBR322, however, was not visualized in cell free extract.

It is suggested that pBR322-*Streptomyces qingfengmyceticus* system can be further constructed to a vector-recipient system available for gene cloning and expression.

Key words

Streptomyces qingfengmyceticus;
Transformation; pBR322