

质粒 pULB113(RP4::Mini-Mu) 引起的氧化葡萄糖 酸杆菌染色体转移

褚 西 宁

(山西大学生物系,太原)

戴 秀 玉 陆 德 如

(中国科学院微生物研究所,北京)

通过接合转移, 质粒 pULB 113 能从大肠杆菌转移到氧化葡萄糖酸杆菌和弱氧化醋杆菌中。带有 pULB 113 的氧化葡萄糖酸杆菌 AS 1.114 与它的各种营养缺陷型 (Met⁻、Arg⁻、His⁻、Gly⁻、Ade⁻…) 之间的交配试验表明, pULB 113 能引起该菌的染色体标记转移。pULB 113 在转移接合子中很不稳定, 经五次传代后绝大多数的菌落已失去卡那霉素抗性和四环素抗性, 而营养标记十分稳定。即使所有抗性都失去后, 它们仍然存在于转移接合子中。说明这种基因转移是由 RP4 诱动的染色体转移。这是一个对葡萄糖酸杆菌进行基因定位和杂交育种的良好遗传系统。

关键词 质粒 pULB 113; 染色体转移; 氧化葡萄糖酸杆菌

葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter*) 是一类革兰氏阴性杆菌, 它的代谢特征之一是能不完全氧化底物产生相应的酮或有机酸。这一性质在工业上已用来生产葡萄糖酸、 α -酮基古龙酸、山梨糖等。这是工业发酵中很有潜力的一类菌^[1], 但至今还没有人对它们进行遗传学研究。

Mu 噬菌体是细菌转座子中的一种, 对大肠杆菌能引起多种遗传学效应^[2]。现在它已广泛用于大肠杆菌的基因融合、细胞内克隆等, 并逐步扩展到其它革兰氏阴性菌的遗传学研究中去。据报道它也能使假单胞菌、沙门氏菌等不同种属间的基因转移^[2], 但是否对葡萄糖酸杆菌有类似作用还没有人研究过。我们试验了带有广泛寄主范围质粒 RP4 上的 Mu 噬菌体对它们的染色体转移作用, 试验结果表明该质粒能进入山梨糖产生菌——氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和弱氧化醋杆菌 (*Acetobacter suboxydans*), 并能引起

氧化葡萄糖酸杆菌间的染色体基因转移。这一结果为研究葡萄糖酸杆菌的遗传学和遗传育种提供了有用的方法。

材料与方 法

(一) 细菌菌株见表 1。

(二) 培养基

醋酸杆菌完全培养基 (1号完全培养基): 葡萄糖 50g, 酵母膏 10g, 碳酸钙 10g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1,000ml, pH 6.8, 8 磅 30 分灭菌。

醋酸杆菌基础培养基 (1号基础培养基): 盐酸硫胺素 1mg, 尼克酸 1mg, DL-泛酸钙 1mg, 对氨基苯甲酸 0.5mg, 硫酸铵 10g, 溶液 A 5ml, 溶液 B 5ml, 葡萄糖 10g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1,000ml, pH 6.8, 8 磅 30 分灭菌。

溶液 A: K₂HPO₄ 10g, KH₂PO₄ 10g, 蒸馏水 100ml。

本文于 1984 年 10 月 22 日收到。

本工作由中国科学院基金资助, 工作中曾得到王大帮教授、王敖全、王雪松等同志的帮助, 特此致谢。

表 1 细菌菌株
Table 1 Bacterial strains

菌株 Strains	性状 Character	来源 Source
大肠杆菌 K-12 <i>Escherichia coli</i> K-12		
MXR (pULB 113)	F ⁻ lac pro thiA recA galE	A. Toussaint
Am8220	F ⁺ pro lacI::Mu cts62	A. Bukhari
氧化葡萄糖杆菌 <i>Glucanobacter oxydans</i> ^a		
AS 1.114	能转化山梨醇为山梨糖 with ability to transform sorbitol to sorbose	中国微生物菌种保藏委员会 from CCCCM ^b
AS 1.114-1	Str ^r	AS 1.114 的自发突变株 spontaneous mutant of AS 1.114
AS 1.114-15	Ade ⁻	由 AS 1.114 经 NG 诱变而来
AS 1.114-16	Met ⁻	以下同
AS 1.114-27	Met ⁻	derived from AS 1.114 by NG mutagenesis, below is the same
AS 1.114-67	Arg ⁻	
AS 1.114-70	His ⁻	
AS 1.114-72	His ⁻	
AS 1.114-77	Met ⁻	
AS 1.114-107	Ade ⁻	
AS 1.114-120	Gly ⁻	
AS 1.114-124	Met ⁻	
弱氧化醋杆菌 <i>Acetobacter suboxydans</i>		
AS 1.110	能转化山梨醇为山梨糖 with ability to transform sorbitol to sorbose	中国微生物菌种保藏委员会 the same as above
AS 1.116		

a. 菌种目录(中国科学院微生物研究所)中的名称为生黑醋杆菌。(*Acetobacter melanogenum*)。最近据王大和鉴定为此名。

a. Which was *Acetobacter melanogenum* in Catalogue of Culture (Institute of Microbiology, Academia Sinica) but reidentified as this name by Wang, D. S. 1984.

b. 中国微生物菌种保藏委员会

b. China Committee for Culture Collection of Microorganisms.

溶液 B: MgSO₄ · 7H₂O 4g, NaCl 0.2g, FeSO₄ · 7H₂O 0.2g, MnSO₄ · 7H₂O 0.2g, 蒸馏水 100ml。

上述成份中,葡萄糖、维生素、溶液 A、溶液 B 均配成母液,分开灭菌,使用前混合。

LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, 氯化钠 5g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1,000ml, pH7.0, 15 磅 30 分灭菌。

(三) N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(简称 NG) 诱变

将要诱变的菌种 AS 1.114-1 接种于 1 号完全培养液, 30℃ 振荡培养过夜, 次日再活化 3 小时, 离心, 用 pH 6 的 Tris-maleic acid 缓冲液洗涤菌体一次, 用同一缓冲液溶解 NG, 终浓度为 1mg/

ml, 将菌体悬浮于 NG 溶液中, 37℃ 保温 30 分钟, 离心。NG 处理完毕, 菌体用 1 号完全培养液洗一次, 再悬浮于 1 号完全培养液中, 并在 30℃ 振荡培养 2 小时, 然后将培养液稀释涂平皿, 于 30℃ 温箱培养 48 小时, 即可看到大小不同的菌落。

营养缺陷型的检出与测定按 R. W. Davis 方法^[3]。

(四) 交配

将供体菌、受体菌分别接种于 1 号完全培养液, 30℃ 振荡培养过夜, 供体菌次日再活化一次。然后将供体菌, 受体菌各吸 0.1ml 于 1 号完全培养基琼脂平皿, 涂布均匀后在 30℃ 温箱培养过夜

使之发生交配。次日将 I 号完全培养基琼脂平皿上的菌落用 10mM MgSO₄ 溶液制成悬浮液, 适当稀释后涂布于选择培养基平皿, 30℃ 温箱培养 3 天, 即可得到转移接合子。

(五) Mu 的免疫性试验

Mu 裂解液的制备: 将 Am 8220 接种于 LB 液体, 30℃ 振荡培养过夜, 次日活化 2 小时, 42℃ 诱导 30 分钟, 在 37℃ 继续振荡培养直至细胞裂解释放出噬菌体。加一滴氯仿, 离心。上清液即为噬菌体液。将噬菌体作不同浓度的稀释, 滴在混有供试菌的 LB 软琼脂平皿上, 置 30℃ 温箱培养过夜, 带有 Mu 噬菌体的供试菌对 Mu 的侵染有免疫性, 不能形成噬菌斑, 不带 Mu 的供试菌则能够形成噬菌斑。

(六) 质粒的制备和电泳

质粒的制备按 D. Ish-Horowicz^[4]。电泳按 Maniatis 方法^[4]。

结 果

(一) 质粒 pULB 113 从大肠杆菌转移到葡萄糖酸杆菌和醋杆菌

Mu 噬菌体的寄主范围很窄, 只能感染大肠杆菌、志贺氏菌和柠檬酸杆菌。为了扩大它的应用, Dénarié^[5]、Faelen^[6] 等将它插入到广泛寄主范围的质粒 RP4 上, 通过 RP4 的接合转移, 可将 Mu 引入到许多

革兰氏阴性细菌中去。Murooka 等^[7]和 Lejeune 等^[8]曾将 Mu 从大肠杆菌转移到不同属的 22 种细菌中, 其中包括弱氧化醋杆菌, 但转移频率只有 5×10^{-10} 。为了研究 Mu 对氧化葡萄糖酸杆菌染色体的转移作用, 我们试验了质粒 pULB 113 从大肠杆菌转移到氧化葡萄糖酸杆菌和醋杆菌的能力。该质粒是在 RP4 上插入了一个致死功能缺失的 Mu 噬菌体, 所以当进入一个新的寄主时将没有杂合诱导效应 (Zygotic induction)。表 2 为 pULB 113 从大肠杆菌转移到上述菌时的转移频率。这比 Murooka 的结果高 10^4 倍, 可能是没有杂合诱导的结果。

为了证明除了四环素抗性基因以外的 RP4 其它抗药性基因和 Mu 噬菌体都转入了氧化葡萄糖酸杆菌, 我们在含有 20μg/ml 卡那霉素和氨基苄青霉素的 I 号完全培养基琼脂平皿上测定了对这两种抗生素的抗性, 发现它们都是 Kan^r 和 Amp^r (AS 1.114 在未引入 pULB 113 之前就是 Amp^r)。说明这些基因和 tet^r 基因一起进入了氧化葡萄糖酸杆菌。由于氧化葡萄糖酸杆菌对 Mu 噬菌体不敏感, 不能直接用该菌来测定对 Mu 噬菌体的免疫性以及 pULB 113

表 2 质粒 pULB 113 从大肠杆菌转移到葡萄糖酸杆菌^a
Table 2 Transfer of pULB 113 from *Escherichia coli* K12 to *Gluconobacter* and *Acetobacter*

供 体 Donor	受 体 Recipient	选择标记 ^b Selected marker	质粒转移频率 ^c Plasmid transfer frequency
<i>Escherichia coli</i> K12 MXR (pULB 113)	<i>Gluconobacter oxydans</i> AS 1.114	Tet ^r	2×10^{-3}
	<i>Acetobacter suboxydans</i> AS 1.110	Tet ^r	4×10^{-3}
	AS 1.116	Tet ^r	6×10^{-3}

a 交配条件见正文
Mating were performed as described in the text
b 培养基为基础培养基
Medium was minimum No. 1
c 质粒转移频率以每个受体细胞所得到的质粒计
Plasmid frequency was estimated with per recipient cell

的 Mu 不能形成噬菌体颗粒,所以我们将 pULB 113 从氧化葡萄糖酸杆菌再转移到大肠杆菌 HB 101,测定后者对 Mu 的免疫性。测定结果表明,从氧化葡萄糖酸杆菌得到 pULB 113 的 HB 101 对 Mu 具有免疫性,说明 Mu 也随 RP4 进入了氧化葡萄糖酸杆菌。

(二) 质粒 pULB 113 引起氧化葡萄糖酸杆菌之间的染色体转移

为了试验 pULB 113 对氧化葡萄糖酸杆菌染色体转移的作用,我们首先选择了一株 AS 1.114 链霉素抗性的自发突变株,

其频率为 10^{-10} , (此标记作为交配时的反选择标记)——AS 1.114-1, 然后再以 NG 诱变该菌,得到 22 株不同营养需要的营养缺陷型。交配实验以带有 pULB 113 的野生型 AS 1.114 为供体,以一系列营养缺陷型为受体在完全培养基琼脂平皿上进行。并在基础培养基加链霉素、卡那霉素的琼脂平皿上选择转移接合子,其结果见表 3。经过交配,营养缺陷型以 10^{-7} — 10^{-8} 的频率转变为原养型,而自发回复的频率低于 10^{-10} 。不同的标记,其转移频率也不一样, Ade^{-} 高达 10^{-6} , 而 Arg^{-} 仅为 6×10^{-8} 。

表 3 质粒 pULB 113 引起氧化葡萄糖酸杆菌染色体标记的转移

Table 3 Transfer of chromosome markers mediated by plasmid pULB 113

供体 Donor	受体 Recipient	选择标记 ^b Selected marker	回复频率 Reversion frequency	标记转移频率 ^a Marker transfer frequency
氧化葡萄糖酸杆菌 <i>Gluconobacter oxydans</i> AS 1.114	氧化葡萄糖酸杆菌 <i>Gluconobacter oxydans</i> AS 1.114-27	Met	10^{-10}	4×10^{-8}
	AS 1.114-67	Arg	10^{-10}	6×10^{-8}
	AS 1.114-72	His	2×10^{-10}	1.5×10^{-7}
	AS 1.114-107	Ade	1.2×10^{-10}	1×10^{-6}
	AS 1.114-120	Gly	1×10^{-10}	2×10^{-6}

a 标记转移频率以每个受体细胞所得到的标记计。

Marker transfer frequency was estimated with per recipient cell

b 反选择标记是 Str^r 。

Counter selection marker was Str^r .

(三) 质粒 pULB 113 引起营养标记转移的方式

1. pULB 113 在转移接合子中的稳定性: 据 Van Vliet 等人报道^[9], 当 RP4 进入土壤杆菌时, 结构上很不稳定, 他们从氨基青霉素平皿上选择到的 25 个转移接合子中有 5 个 Kan^s 。pULB 113 是否有与此相似的现象呢? 我们将从不同交配所得到的 Kan^s 、 Tet^r 原养型转移接合子在 I 号完全培养基琼脂平皿上连续传代五次, 然后将培养物稀释, 涂布在 I 号完全培养基琼

脂平皿上使形成单菌落, 并随机挑 50 个菌落测定它们的抗药性和营养标记。表 4 数据表明 pULB113 在 AS 1.114 中很不稳定。例如在 AS 1.114-27 (pULB 113) 中经五次传代培养后, 100% 的菌失去 Kan^s 。其它菌株也不同程度的失去了抗药性。进一步检查 Kan^s 菌落的 Tet^r , 发现它们也失去了 Tet^r 。与此相反, 营养标记却非常稳定, 所测定的每个菌落都保持原养型。特别值得注意的是 AS 1.114-27 (pULB113), Kan^s 、 Tet^r 虽已完全失去, 但仍保持原养

表 4 pULB 113 在转移接合子中的稳定性*

Table 4 The stability of pULB 113 in transconjugants

供 体 Donor	受 体 Recipient	试验转移接合子菌落数 Number of colonies tested	有关标记的菌落数 No. of colonies with	
			Kan ^r	Prototroph
氧化葡萄糖酸杆菌 <i>Gluconobacter oxydans</i> AS 1.114	氧化葡萄糖酸杆菌 <i>Gluconobacter oxydans</i> AS 1.114-27	50	0	50
	AS 1.114-67	50	23	50
	AS 1.114-72	50	4	50
	AS 1.114-107	50	1	50
	AS 1.114-120	50	39	50

* 稳定性试验: 先将转移接合子在选择平皿上纯化一次, 接着在完全培养基上连续传代五次, 然后将所得培养物稀释并涂布在完全培养基平皿上使之产生单菌落, 每个培养物测定 50 个单菌落的 Kan^r 和营养需要。

The stability of the transconjugants was tested by growing them on No. 1 medium plate for 5 generation. The resulting culture was diluted and plate onto No. 1 minimum medium, then 50 colonies of each culture were tested for the presence of Kan^r and nutritional markers.

型。说明供体菌的基因已通过重组进入受体菌的染色体, 这种基因转移是由 RP4 诱动供体菌染色体进入受体菌并发生基因重组的结果。

2. 转移接合子中营养标记的再转移: 为了进一步说明这种转移是 RP4 的诱动, 而不是形成 RP4 的 R', 我们将所得到的原养型接合子再一次与利福平抗性的原受体菌进行交配, 观察营养标记能否和 pULB 113 一起转移到受体菌中去。结果表明质粒的抗性标记与营养标记不能以相似的频率转移。也说明不是形成 RP4 的 R'。

(四) 电泳检查转移接合子中的质粒

提取转移接合子的质粒 DNA 并进行琼脂糖凝胶电泳, 从电泳照片 (图 1) 可以看到刚分离到的原养型转移接合子中都带有 pULB 113 的质粒 DNA, 而且它们的分子量与原来的一样, 说明 pULB 113 与供体菌的染色体一起进入了受体菌。但经过几次传代后失去了抗药性的原养型转移接合子已失去了质粒, 这就进一步证明, pULB 113 是诱动染色体转移而不是形成 R'。

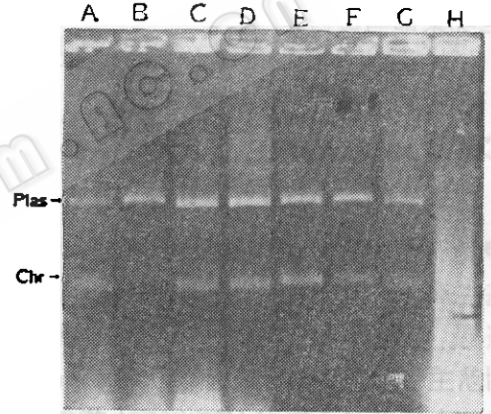


图 1 大肠杆菌和氧化葡萄糖酸杆菌中的 pULB 113 质粒及它们的转移接合子电泳
A. 大肠杆菌 MXR (pULB 113), B. 带有 pULB 113 质粒的氧化葡萄糖酸杆菌 AS 1.114 C. D. E. F. G. AS1.114(pULB113) 与 AS 1.114 营养缺陷型的转移接合子 H. 氧化葡萄糖酸杆菌 AS 1.114

Fig. 1 Agarose electrophoresis of plasmid pULB113 in *Escherichia coli* K12, *Gluconobacter oxydans* and their transconjugants
A. *E. coli* K12 MXR (pULB 113)
B. *G. oxydans* AS 1.114 (pULB 113)
C. *G. oxydans* AS 1.114 (pULB 113) × *G. oxydans* 124
D. *G. oxydans* AS1.114(pULB 113) × *G. oxydans* 107
E. *G. oxydans* AS 1.114 (pULB 113) × *G. oxydans* 72
F. *G. oxydans* AS 1.114 (pULB 113) × *G. oxydans* 70
G. *G. oxydans* AS 1.114 (pULB 113) × *G. oxydans* 27
H. *G. oxydans* AS 1.114

Plas: 质粒 DNA.
Chr: 染色体 DNA.

讨 论

许多试验表明, 当一个运载体把转座子引入细胞时, 转座子能随机地插入到宿主染色体上去, 这样在染色体上就出现运载体上转座子的同源区, 运载体通过这个同源区可进行重组而整合到染色体中去, 从而形成一个不稳定的共整合结构。如果运载体是一个接合型质粒, 染色体就随此质粒一起进入受体菌。pULB 113 对氧化葡萄糖酸杆菌的诱动可能就是通过这个过程进行的。另外, 由于这种共整合结构是不稳定的。所以重组子 DNA 电泳中质粒 pULB 113 是与染色体 DNA 分开的。这些现象都与该假定一致。

参 考 文 献

- [1] Doelle, H. W.: *Biotechnology I*, Edited by H. J. Rehm et al., Verlag chemie, 164—165, 1981.
- [2] Frederique, V. G.: *Plasmid*, 7: 30—44, 1982.
- [3] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbour Lab., N. Y. 207—208, 1980.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Lab. N. Y. 368, 1982.
- [5] Dénarié, J. et al.: *ibid*, 507—520, 1977.
- [6] Fzelen, M. et al.: *ibid*, 521—530, 1977.
- [7] Murooka, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 47: 1807—1815, 1983.
- [8] Lejeune, P. et al.: *J. Bacteriol*, 155: 1015—1026, 1983.
- [9] Van Vliet, F. V. et al.: *Plasmid*, 1: 446—455, 1978.

CHROMOSOME TRANSFER IN *GLUCONOBACTER OXYDANS* MEDIATED BY pULB 113 (RP4::MINI-Mu)

Chu Xining

(Department of Biology, Shanxi University, Taiyuan)

Dai Xiuyu Lu Deru

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

We have transferred plasmid pULB-113, RP4::Mini-Mu, from *Escherichia coli* into *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter suboxydans*. The results from mating between *G. oxydans* AS1.114 (pULB113) and a series of auxotrophs (Met⁻, Arg⁻, His⁻, Gly⁻, Ade⁻ ...) of *G. oxydans* AS1.114 showed that pULB113 was able to mediate the transfer of chromosome markers. pULB113 in transeconjugants of *G. oxydans* AS1.114 was unstable, but chro-

mosome markers were very stable. It could be concluded that pULB113 induced chromosome mobilization in *G. oxydans* AS 1.114. This is a fine genetic system for gene mapping and hybrid breeding.

Key words

Plasmid pULB113; Chromosome transfer; *Gluconobacter oxydans*