

质粒 RP4::Mu 引起霍乱弧菌基因的突变和转移

苏国富 徐永强 孔道春* 杨长告**

(军事医学科学院, 北京)

陆 德 如

(中国科学院微生物研究所, 北京)

质粒 pULB 11 (RP4::Mu_{cts}) 通过接合能从大肠杆菌转移到霍乱弧菌——吴江 2 (*Vibrio cholerae*——Wu Jiang 2) 中去。带有 pULB 11 的霍乱弧菌经 42℃ 诱导后能以 0.5% 的突变率产生营养缺陷型, 这些营养缺陷型十分稳定, 在 10° 细胞中还不能测出它们的回复突变体, 这与 Mu 对大肠杆菌的诱变作用十分相似。质粒 RP4 及其抗药性很容易从霍乱弧菌中失去, 这说明营养缺陷型的产生是由于 Mu 的插入而不是 RP4 的整入, 所以 pULB 11 可以作为诱变剂来诱变霍乱弧菌的包括毒素基因在内的各种突变体, 这在构建霍乱弧菌活菌苗方面有一定的意义。pULB 113 (RP4::Mini-Mu) 还能诱动霍乱弧菌染色体基因, 这也是研究霍乱弧菌遗传学的有用手段。

关键词 霍乱弧菌; 质粒 RP4::Mu_{cts}; 基因突变和转移

霍乱弧菌是引起人类腹泻的一种烈性病原菌, 由它分泌的外毒素——霍乱毒素 (CT) 致病。CT 与大肠杆菌肠毒素 LT 相类似, 都由一个 A 亚单位和五个 B 亚单位组成^[1], 作用机理也十分相似。B 亚单位为毒素分子的结合部分, 能与细胞膜上的受体神经节苷脂 (GM1) 相结合, 形成通道, 使 A 亚单位通过, 作用于靶细胞, 发挥毒性作用, 所以 A 亚单位具有毒性, 而 B 亚单位无毒性, 但有保护作用。LT 的结构基因位于一个大质粒上, 而 CT 的结构基因位于染色体上^[2]。以往预防霍乱均采用死菌苗或类毒素, 但效果不够理想, 近年来对活菌苗的研究进展较快。活菌苗菌种主要利用毒素基因突变株, 例如 Honda 等^[3]用亚硝基胍诱变获得一株 A⁻B⁺ 弱毒株, 但它们的回复突变频率较高; Mekalanos^[4]用霍乱弧菌噬菌体 VcA 1 和 VcA 2 cts 1 诱变获得五株 A⁻B⁻ 弱毒株。最近 Mekalanos^[5]和 Kaper^[6]分别用体外 DNA 重组技术获

得了 A⁻B⁺ 弱毒株, 但都还在试验阶段。

Mu 噬菌体是一种温和型大肠杆菌噬菌体, 也有转座子作用, 即能引起寄主基因突变、缺失等一系列遗传效应。最近 Toussaint 等^[7]已把 Mu 插入广泛寄主范围质粒 RP4, 通过 RP4 的接合转移能力可将 Mu 引入到其他革兰氏阴性细菌中去。如果 RP4::Mu 能进入霍乱弧菌并对它有与对大肠杆菌相似的作用, 那么它也可用来诱变霍乱弧菌的毒素基因突变株。由于 Mu 是一种已研究得很清楚的噬菌体, 有许多方法和突变株可利用, 操作也比较方便, 利用 Mu 将比 VcA 等噬菌体有利得多。另外, RP4::Mu 还能引起一些菌的基因转移和在细胞内克隆基因, 所以这方面的试验对霍乱弧菌的遗传学研究也有重要意义。本文报导这方面的研究结果。

本文于 1984 年 11 月 7 日收到。

* 兰州生物制品研究所。

** 山东医学院。

材料与方法

(一) 试验菌株见表 1。

(二) 培养基及细菌培养条件

本试验采用的营养培养基均为 LB^[12], 基础培养基为 M63^[12]。霍乱弧菌培养基的 pH 值为 7.8。除含质粒 RP4::Mu_{cts} 的菌株置于 30℃ 培养外, 其余均于 37℃ 培养。基础培养基中补加的各氨基酸浓度为 20μg/ml。培养基中各抗菌素浓度: 氨基苄青霉素 (Ap)、卡那霉素 (Kan)、四环素 (Tc) 均为 20μg/ml, 利福平 (Rif) 为 50μg/ml, 链霉素 (Sm) 为 100 μg/ml。

(三) 分离营养缺陷型和抗药性突变体

用于交配试验的霍乱弧菌吴江 2 (埃尔托生物型) 的各种氨基酸营养缺陷型由 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NG) 诱变获得^[9]。链霉素和利福平抗性突变体系自发突变体^[10]。

(四) 细菌交配

细菌交配基本参照 Gijsegem^[11] 的方法进行。

先分别将 0.1ml 指数生长期的供体菌和静止期的受体菌混合, 然后滴加至干燥的 LB 固体培养基上, 置 30℃ 杂交过夜, 用 1ml 10mM MgSO₄ 从 LB 平皿上洗下经交配过的细胞, 吸 0.1ml 该菌液 (或经一系列 10 倍稀释后的菌液) 涂布于合适的选择培养基上 (选择培养基只允许转移接合子或重组子生长, 抑制供体和受体菌生长), 置 30℃ 培养 3—4 天后, 观察重组子或转移接合子菌落, 计算它们的形成频率。

(五) 质粒的分离和电泳

按照 Betlach^[12] 的方法从霍乱弧菌中分离质粒。琼脂糖凝胶电泳条件: 采用水平电泳仪, 琼脂糖浓度为 0.7%, 电泳缓冲液为 Tris-Borate, 100V 电泳 3 至 4 小时。

结果与讨论

(一) 质粒 pULB 11 RP4::Mu 从大肠杆菌转移至霍乱弧菌

Murooka 等^[13] 曾报导 RP4::Mu 能通

表 1 细菌菌株
Table 1 Bacterial strains

菌 株 Strains	有关性状 Relevant character	来 源 Source
霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>		
RV 79	wild	Mekalanos
M 792	ilv::VcA1	Mekalanos
吴江 2	wild	生物制品检定所
吴江 2 derivatives		
Vc 1	Str ^r	spontaneous mutant
Vc 2	Rif ^r	spontaneous mutant
Vc 3	His ⁻ Str ^r	mutagenized by NG
Vc 4	Met ⁻ Str ^r	mutagenized by NG
Vc 5	Arg ⁻ Str ^r	mutagenized by NG
Vc 6	Leu ⁻ Str ^r	mutagenized by NG
Vc 7	Ile ⁻ Str ^r	mutagenized by NG
Vc 8	Str ^r (pULB 11)	Vc1 × MXR (pULB 11)
Vc 10	Rif ^r (pULB 113)	Vc2 × MXR (pULB113)
Vc 3-1	Vc 3 × Vc 10	Vc 3 × Vc 10
Vc 4-1	Vc 4 × Vc 10	Vc 4 × Vc 10
Vc 5-1	Vc 5 × Vc 10	Vc 5 × Vc 10
Vc 6-1	Vc 6 × Vc 10	Vc 6 × Vc 10
Vc 7-1	Vc 7 × Vc 10	Vc 7 × Vc 10
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> K-12		
MXR (pULB11)	Δ(Lac-pro) thiA recA gelE (pULB11)	Gijsegem
MXR (pULB113)	Δ(Lac-pro) thiA recA gelE (pULB 113)	Gijsegem

过接合转移至假单胞菌和沙门氏菌等一系列革兰氏阴性菌中去。但能否转移至霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 还未有报导。我们为了将质粒 pULB 11 RP4::Mu 通过交配转移至霍乱弧菌, 先分离霍乱弧菌吴江 2 的链霉素抗性突变体 (Vc1), 以链霉素抗性作为反选择标记, 然后进行交配, 以大肠杆菌 MXR (pULB 11) 作供体、以霍乱弧菌吴江 2 的链霉素抗性突变体 (Vc1) 为受体进行交配。以含 Kan、Tc 和 Sm 的 LB 平皿为选择平皿。Sm 抑制供体生长, Tc 和 Kan 抑制受体生长, 只有受体接受了质粒 pULB 11 后才能在此平皿上生长。供体菌 MXR (pULB 11) 和受体霍乱弧菌 Vc1 的过夜液均不能在上述选择平皿上生长, 只有经交配过的细菌才能在上述平皿上生长。质粒 pULB 11 从大肠杆菌至霍乱弧菌的转移频率为 5×10^{-4} /每受体。转移接合子 Vc 8 在上述平皿上纯化二次, 经 42℃ 热诱导后, 未见菌体裂解。但能从转移接合子 Vc 8 中分离到质粒, 其分子量与 pULB 11 相同。而未经交配的 Vc1 无质粒。这表明质粒 pULB 11 确实能从大肠杆菌转移至霍乱弧菌。

(二) 从霍乱弧菌的 Mu 溶源菌中分离突变体

Johnson 等^[4]和 Mekalanos 等^[4]曾报导在霍乱弧菌中有一种类似于 Mu 的 VcA 噬菌体, 它能引起霍乱弧菌产生营养缺陷型和缺失突变体, 但霍乱弧菌噬菌体 VcA 的遗传背景不清楚, 且操作比较麻烦, 所以我们试图用霍乱弧菌的 Mu 溶源菌诱变营养缺陷型。其方法是: 先将 Vc8 在 LB 液内培养过夜, 过夜培养液以 LB 培养基 50 倍稀释后, 继续培养 1—2 小时, 然后在 42℃ 诱导 20 分钟, 再在 30℃ 培养 4 小时, 适当稀释后涂布 LB 平皿, 分离单菌落, 测定产生营养缺陷型的频率和类型。同时也试验了霍乱弧菌噬菌体 VcA1 对霍乱弧菌 RV79 的诱变作用, 结果见表 2。由表 2 可见, 噬菌体 Mu 与霍乱弧菌噬菌体 VcA 1 十分相似, 都能引起各种不同的营养缺陷型, 其诱变频率也十分相近。所以 Mu 噬菌体通过广泛宿主范围质粒 RP 4 引入霍乱弧菌后, 能整合至霍乱弧菌染色体, 它的整合也能失活所在基因, 可用来诱变霍乱弧菌。

(三) Mu 插入突变体的特性

1. 质粒 RP 4::Muets 在霍乱弧菌中的稳定性: 任意挑选四个菌株 Vc8、Vc8-1、Vc8-2 和 Vc8-5 进行试验 (后三个是通过热诱导 Vc8 后获得的营养缺陷型衍生株)。

表 2 Rp4::Muets 和 VcA 1 对霍乱弧菌的诱变作用
Table 2 Mutagenesis of *V. cholerae* by RP4::Muets and VcA 1

菌 株 Strains	营养缺陷型产生频率(%) Frequency of auxotrophic mutants	营养缺陷突变体类型数 Number of phenotypes of auxotrophic mutants
Vc1 (pULB 11)	0.55(34/6,000)	Lys ⁻ (7), Met ⁻ (1), Leu ⁻ (2), Thr ⁻ (2), Trp ⁻ (1), Cys ⁻ (1), Pro ⁻ (1), His ⁻ (1) undetermined (18)
RV79 (VcA 1)	0.77(31/4,000)	His ⁻ (5), Trp ⁻ (2), Leu ⁻ (3), Arg ⁻ (3), Lys ⁻ (1), Cys ⁻ (1), Pro ⁻ (1) undetermined (15)
Vc1	9(0/2,200)	—

先将它们在不含药物的平皿上传 10 代,然后对每个菌株任意挑选 100 个单菌落至含 Ap、Tc 和 Kan 的 LB 平皿上。测定它们对上述药物的抗性。结果,所测定的四个菌株都不能在含 Ap、Tc 和 Kan 的 LB 平皿上生长,表明该质粒在霍乱弧菌内是极不稳定的。

2. 由 RP4::Mu 引起的营养缺陷型突变体的稳定性: 将 Vc 8 经热诱导后获得的 8 株营养缺陷型突变体 (Vc8-1 Vc8-8) 在 LB 液内培养过夜,涂于 M 63 基础平皿,观察回复突变频率,结果见表 3。由 RP4::Muets 引起的营养缺陷型突变体是非常稳定的,Vc8-1、Vc8-2 和 Vc8-5 经传代失去 RP4::Muets 后,仍是营养缺陷型,这表明营养缺陷型的产生不是 RP 4 的整入,而是 Mu 的插入,这对用 RP4::Muets 构建霍乱弧菌毒素基因缺失突变体十分有利。因为 RP4::Muets 对三种药物有抗性(Ap、Tc 和 Kan),用抗药性弱毒株作口服活菌苗是不合适的,但该质粒在霍乱弧菌内极不稳定,我们可在获得弱毒株后,方便地去除该质粒。

3. 多重营养缺陷型: 从表 2 可见,在所获得的 34 个营养缺陷型突变体中,有 18 个菌株只补充一种营养成分时仍不能生长,它们大都是多重营养缺陷型。这种缺陷型的产生很可能是 Mu 插入霍乱弧菌

染色体后引起的缺失突变体。

表 3 由 RP4::Muets 引起的营养缺陷型突变的特性

Table 3 Properties of auxotrophic mutants isolated from phage Mu lysogens of <i>V. cholerae</i>		
菌株 Strains	营养缺陷型类型 phenotype of auxotrophic mutants	回复频率 reversion frequency
Vc8-1	Met ⁻	<10 ⁻¹⁰
Vc8-2	Lys ⁻	<10 ⁻¹⁰
Vc8-3	Leu ⁻	<2×10 ⁻⁹
Vc8-4	Thr ⁻	<10 ⁻¹⁰
Vc8-5	Trp ⁻	<3×10 ⁻⁹
Vc8-6	Cys ⁻	<10 ⁻⁹
Vc8-7	Pro ⁻	<10 ⁻⁹
Vc8-8	His ⁻	<10 ⁻⁹

(四) 质粒 RP4::Mini-Mu 对霍乱弧菌染色体转移的诱动

RP4::Mini-Mu 即 pULB 113 对革兰氏阴性菌染色体基因转移的诱动已有若干报导^[11,13,15,16],但对霍乱弧菌的作用还没有人作过研究。为试验质粒 RP4::Mini-Mu 对霍乱弧菌染色体基因的诱动作用,以 MXR(pULB 113) 为供体,Vc 2 为受体,用平皿杂交法将 pULB 113 转移至 Vc 2,获得转移接合子 Vc 10。在经二次单菌落纯化后,再以它为供体,分别与受体 Vc 3、Vc 4、Vc 5、Vc 6 和 Vc 7 进行平皿杂交,在含 Sm、Tc 和 Kan 的基础平皿上筛选重组子,结果见表 4。通过平皿杂交,质粒 RP4::Mini-Mu 可将霍乱弧菌供体 (Vc 10) 的染

表 4 由质粒 RP4::Mini-Mu 引起的霍乱弧菌染色体基因的转移

Table 4 Transfer of Chromosomal genes of *V. cholerae* by RP4::Mini-Mu

供体 Donor	受体 Recipient	选择标记 Selection markers	回复频率 Frequency of reversion	标记转移频率* Frequency of transfer
Vc10	Vc4	Met	<1×10 ⁻⁹	1.3×10 ⁻⁶
	Vc3	His	<1×10 ⁻⁹	3.7×10 ⁻⁶
	Vc6	Leu	<1×10 ⁻⁹	3.3×10 ⁻⁶
	Vc5	Arg	<1×10 ⁻⁹	2.2×10 ⁻⁶
	Vc7	Ile	<1×10 ⁻⁹	2.4×10 ⁻⁶

* 每受体 per recipient.

色体基因转移至受体, 互补它们的营养缺陷, 对所试验的 5 个标记的转移频率在 $1-4 \times 10^{-6}$ 间, 这为霍乱弧菌基因作图和对霍乱弧菌的遗传学研究提供了有效手段。为了搞清 pULB 113 促进基因转移的作用方式, 我们进行了转移接合子的质粒 DNA 提取和电泳, 结果见图 1。

由图 1 可见, 重组子 Vc 3-1 和 Vc 4-1 内包含了一个质粒, 其分子量与供体 (Vc 10) 所含质粒 RP 4::Mini-Mu 相同, 所以 pULB 113 引起的基因转移不是形成 R', 而是诱动染色体。

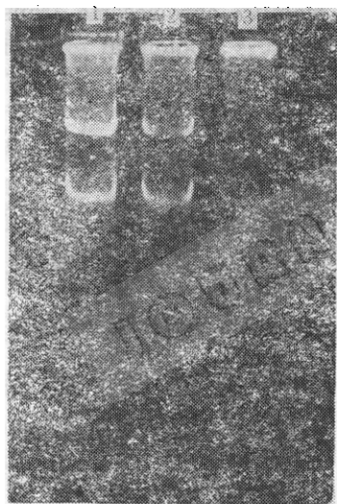


图 1 质粒 pULB 113 在霍乱弧菌及其转移接合子中的凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose electrophoresis patterns of plasmid pULB113 in *V. cholerae* and their transconjugants

1. Vc3-1 2. Vc10 3. Vc4-1

本试验结果表明, Mu 噬菌体在霍乱弧菌内有类似于它在大肠杆菌内的一些特性, 故可作为霍乱弧菌的诱变剂, 可能是一种构建霍乱弧菌毒素基因缺失突变体的有用工具。利用 RP4::Mucts 获得霍乱弧菌毒素基因缺失突变株的工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Clements, J. D. et al.: *Infect. Immun.*, 29: 9—97, 1980.
- [2] Sporecke, I. et al.: *J. Bacteriol.*, 157: 253—260, 1984.
- [3] Honda, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2052—2056, 1979.
- [4] Mekalanos, J. J. et al.: *Proc. Acad. Sci. USA*, 79: 151—155, 1982.
- [5] Mekalanos, J. J. et al.: *Nature*, 306: 551—557, 1983.
- [6] Kaper, J. M. et al.: *Nature*, 308: 655—658, 1984.
- [7] Toussaint, A. et al.: *Plasmid*, 1: 30—44, 1982.
- [8] Lennox, E. S.: *Virology*, 1: 190—206, 1955.
- [9] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1972.
- [10] Beringer, J. E.: *J. General. Microbiol.*, 84: 188—189, 1974.
- [11] Gijsegem, F. V. et al.: *Plasmid*, 7: 30—44, 1982.
- [12] Betlach, M. C. et al.: *Fed. Proc.*, 35: 2037—2043, 1976.
- [13] Murooka, Y. et al.: *J. Bacteriol.*, 145: 358—368, 1981.
- [14] Johnson, S. R. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 11: 13—16, 1981.
- [15] Lejeune, F. et al.: *J. Bacteriol.*, 155: 1015—1026, 1983.
- [16] Seeberg, A. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 157: 89—94, 1984.

GENE MUTATION AND TRANSFER CAUSED BY PLASMID RP4::Mu IN *VIBRIO CHOLERA*E

Su Guofu Xu Yongqiang Kong Daochun Yang Changgao

(The Academy of Military Medical Science, Beijing)

Lu Deru

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Plasmid pULB11 (RP4::Mu) was able to transfer from *Escherichia coli* to *Vibrio cholerae*——Wu Jiang 2. After 42°C induction, auxotrophic mutants were generated with a frequency of 0.5%. Those mutants were very stable, reversion frequency were lower than 10^{-8} , which resemble to those of Mu in *E. coli*. RP4 and its drug resistance in *V. cholerae*——Wu Jiang 2 tended to be cured and lose. All of these results showed that auxotrophic mutants were caused by Mu insertion rather

than RP4 integration, thus Mu is also a mutator in *V. cholerae*, and useful for construction of vaccine strain. pULB113 was able to mobilise chromosome transfer in *V. cholerae*, it is a potential tool for genetic analysis in this strain.

Key words

Vibrio cholerae; plasmid RP4::Mu;
Gene mutation and transfer