

一株可提供分子量参照物的含多质粒不动杆菌

江宁 余茂勃

(中国科学院微生物研究所,北京)

作者研究了一株有 10 种质粒的不动杆菌 (*Acinetobacter*), 其质粒的分子量分别为 1.6、2.3、2.6、3.1、3.7、4.2、4.5、6.0、7.2 和 14.0Md。这套质粒在宿主中相当稳定,并能用简单方法提取,可以用作琼脂糖凝胶电泳中 cccDNA 的分子量参照物,其性能优于目前常用的 *E. coli* V517 的质粒。

关键词 含多质粒菌株;不动杆菌;分子量参照物

利用琼脂糖凝胶电泳测定质粒或 DNA 片段的分子量,已成为分子生物学最常用的方法之一。在一定范围内,cccDNA 在琼脂糖凝胶中的泳动距离与分子量对数呈线性关系^[1]。因此,可以用已知分子量的不同质粒 DNA 作为分子量参照物进行测定。Marcrina 等曾报道一株含有可作分子量参照物的 8 种质粒的菌株——*E. coli* V517^[2]。由于不同构型的 DNA 泳动速度不同^[3],因此只有相同构型的 DNA 才能比较,对于酶切后的线状片段,常采用 λ 噬菌体 DNA 的限制酶切片段作为分子量参照物^[4]。

我们分离到一株含 10 种不同大小质粒的不动杆菌 (*Acinetobacter*) A309,可以作为琼脂糖凝胶电泳测定质粒分子量的一套参照物。

材料和方法

(一) 菌株

Acinetobacter A309, 本实验室分离。

E. coli V517^[2], 由姜书勤同志馈赠。

(二) 培养基

LB 培养基^[5]。用作平板时加入 2% 琼脂。

(三) 方法

1. 菌株 A309 的抗药性和 Hg²⁺ 抗性的测定:

将 A309 分别在含氨苄青霉素 (50 μ g/ml)、氯霉素 (34 μ g/ml)、四环素 (12.5 μ g/ml)、卡那霉素 (50 μ g/ml)、红霉素 (10 μ g/ml)、链霉素 (25 μ g/ml) 和 HgCl₂ (25 μ g/ml) 的 LB 平板上划线接种, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 观察生长情况。

2. A309 质粒的快速抽提: 用 Holmes 和 Quigley 方法^[6]提取。

3. A309 的一套质粒分子量的测定: 用 *E. coli* V517 的一套质粒 pVA517-A—pVA517-H 作分子量参照物, 与 A309 的一套质粒 pA309-1—pA309-10 一起进行琼脂糖凝胶电泳。凝胶浓度 0.7%, Tris-醋酸缓冲液^[7], 电压 2V/cm。电泳后按 Francis 方法^[8]测定质粒 pA309-1—10 的分子量。

4. pA309 系列质粒的双向琼脂糖凝胶电泳: 将 pA309 系列质粒在 0.7% 琼脂糖凝胶上以 0.8 V/cm 电压进行电泳, 缓冲液同方法 3。电泳后切下凝胶, 置于 0.8% 琼脂糖凝胶上进行第二向电泳, 电压升至 2V/cm。电泳 4—5 小时后, 上述凝胶经溴化乙锭染色后在 260nm 波长的紫外光下照相。

5. pA309 质粒拷贝数的测定: 按 Davis 方法^[9]提取 A309 的总 DNA, 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳将染色体和各质粒 DNA 分开后, 分别测定其紫外吸光度 A₂₆₀, 由它们的相对含量根据其

本文于 1985 年 12 月 8 日收到。

菌株由本所二室蔡妙英同志鉴定, 谨致谢忱。

各自的分子量计算拷贝数。

结 果

菌株 A309 的抗药性和对 Hg^{2+} 抗性测定结果见表 1。

pVA517 和 pA309 系列质粒的电泳结果见图 1。pA309 系列质粒双向琼脂糖凝胶电泳的结果 (图 2) 表明, 图 1 所表

示的 pA309-1—10 的 10 条质粒带都是 cccDNA^[9]。因此可根据已知的 pVA517 各质粒的分子量, 由图 3 按 Meyer 等人^[1]的方法得到 pA309 系列质粒分子量的近似值(表 2)。

各质粒与染色体 DNA 的紫外吸光度及由此计算各个质粒的拷贝数见表 3。

表 1 菌株 A309 对抗生素和 Hg^{2+} 的抗性

Table 1 The resistance of strain A309 against different antibiotics and Hg^{2+}

氨基苄青霉素 Amp (50 μ g/ml)	氯霉素 Cm (34 μ g/ml)	卡那霉素 Kan (50 μ g/ml)	红霉素 Em (10 μ g/ml)	四环素 Tet (12.5 μ g/ml)	链霉素 Str (25 μ g/ml)	氯化汞 $HgCl_2$ (25 μ g/ml)
+	-	-	-	+	+	+

“+”表示生长 Growth; “-”表示不生长 Without growth

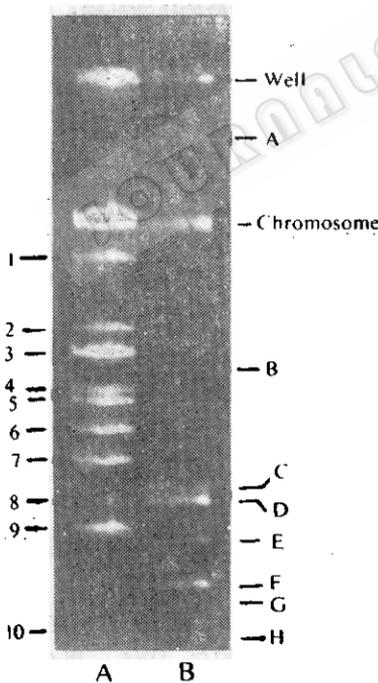


图 1 pA309 和 pVA517 系列质粒的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of series of plasmids pA309 and pVA517
A = pA309; B = pVA517

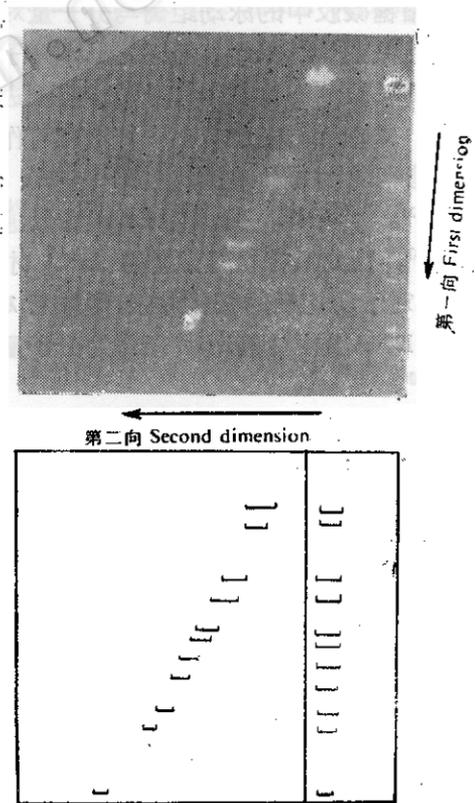


图 2 pA309 系列质粒的双向琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Two-dimensional agarose gel electrophoresis of pA309 series 1—10

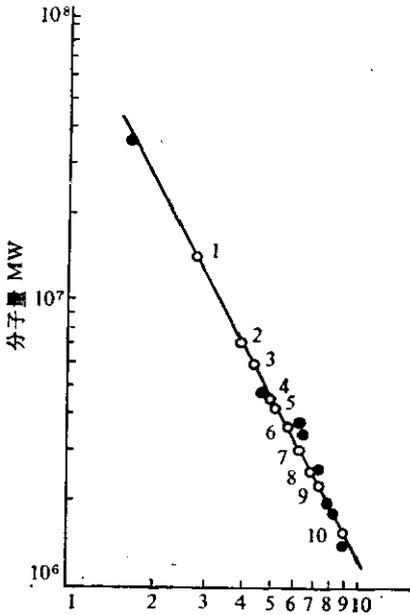


图 3 pA309 系列质粒的分子量与琼脂糖凝胶电泳的泳动距离

Fig. 3 Molecular weights and moving distances on agarose gel electrophoresis of pA309 series 1—10

○ pA309 ● pVA517

表 2 pA309 系列质粒的分子量

Table 2 Molecular weights of pA309 series 1—10

质粒 Plasmid	分子量 Molecular weight(Md)
pA309-1	14.0
pA309-2	7.2
pA309-3	6.0
pA309-4	4.5
pA309-5	4.2
pA309-6	3.7
pA309-7	3.1
pA309-8	2.6
pA309-9	2.3
pA309-10	1.6

讨 论

菌株 A309 含有 10 种不同大小的质粒, 可以为制备 cccDNA 分子量参照物提供一个方便的来源。用 Holmes 和 Qui-

表 3 质粒 pA309 1—10 的拷贝数

Table 3 Copy number of plasmid pA309 1—10

DNA	DNA 浓度 Concentration of DNA ($A_{260} \times 20$)	DNA 浓度与分子 量之比 Ratio of DNA concentration to MW ($A_{260}/$ $MW \times 10^{-3}$)	拷贝数 Copy number
pA309-1	0.009	0.64	3
pA309-2	0.011	1.52	8
pA309-3	0.012	2.00	10—11
pA309-4	0.004	0.89	4—5
pA309-5	0.027	6.43	33—34
pA309-6	0.006	1.62	8—9
pA309-7	0.005	1.61	8—9
pA309-8	0.007	2.69	14
pA309-9	0.012	5.22	27
pA309-10	0.005	3.12	16
A309 染色体 Chromosome	0.575	0.192	1

gley^[6] 的快速方法抽提质粒, 从收获菌体到获得质粒只需 1 小时左右。虽然有时由于 ocDNA 与 cccDNA 同时存在, 对结果会带来一些干扰(如图 1 A 中 3—4 间的一些模糊带), 但可以通过双向电泳加以识别。双向电泳的结果表明只要在抽提质粒的过程中避免强烈的机械振荡和搅拌, 得到的质粒基本上是 cccDNA 的形式^[9]。

pA309 系列质粒在宿主中十分稳定。在无选择压力的培养基上连续转接 10 次以上, 并在 4℃ 保存半年之久, 质粒不会自行消失。

现在, 常用经限制酶处理过的 λ DNA 等作为 DNA 分子量参照物。这些 DNA 片段是线状的, 适宜用作酶切图谱等线状 DNA 的分子量参照物。而在筛选转化子和质粒分离等工作中, 常需要鉴定 cccDNA 的分子量。E. coli V517 为我们提供了一套质粒^[2], 可以作为 cccDNA 的分子量参照物。但是, pVA517 系列的 8 个质粒中有 7 个分子量集中在 5Md 以下, 另一个则高达 35.8Md, 因此在 4.8Md 至 35.8Md 的

广阔范围内出现了一段空白,而许多重组质粒的分子量正处在这一范围内。A309有助于弥补这一欠缺,它所含的一套质粒的分子量大小分布比较均匀,在大于和小于4Md的区域内各有5个质粒,因此我们认为用pA309系列质粒作为cccDNA的分子量参照物比pVA517系列较为理想。

此外,pA309还有一些其它特性,如对 Hg^{2+} 的抗性,可能对污水处理等有一定用途,尚有待研究。

参 考 文 献

[1] Meyer, J. A. et al.: *J. Bact.*, 127: 1529—1537,

1976,

- [2] Marcrina, F. L. et al.: *Plasmid*, 1: 417—420, 1978.
- [3] Aaji, C. & P. Borst: *Biochem. Biophys. Acta*, 269: 192—200, 1972.
- [4] Szybalski, E. H. & W. Szybalski: *Gene*, 7: 217—220, 1979.
- [5] Lennox, E. S.: *Virology*, 1: 190—195, 1955.
- [6] Holmes, D. S. & M. Quigley: *Anal. Biochem.*, 114: 193—197, 1981.
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, CSH, p. 156, 1982.
- [8] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, CSH, p. 120—121, 1980.
- [9] Hintermann, G. et al.: *Plasmid*, 5: 371—373, 1981.

A MULTIPLE PLASMID-HARBORING STRAIN OF *ACINETOBACTER*: CONVENIENT SOURCE OF SIZE REFERENCE OF PLASMID MOLECULES

Jiang Ning Yu Maoxiao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A strain of *Acinetobacter* harboring ten plasmids was studied. Their molecular weights were determined as 1.6, 2.3, 2.6, 3.1, 3.7, 4.2, 4.5, 6.0, 7.2 and 14.0 Md, respectively. The series of plasmids is stable in host cell and can be isolated by convenient method. As a molecular weight reference for cccDNA on

agarose gel electrophoresis, this series is better than that of *E. coli* V517.

Key words

Multiple plasmid-harboring strain; *Acinetobacter*; Molecular weight reference