

大肠杆菌质粒突变体 (p[#]GTE5) 的特性分析

陈月仙 毛小洪*

(北京大学生物系, 北京)

大肠杆菌 (*E. coli*) RRI 质粒 (pGTE5) 的 β -内酰胺酶基因 (β -lactamase *gnc*) 可以在 *E. coli* 与枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中复制和表达。但是,在 *E. coli* 细胞中向胞外分泌 β -内酰胺酶量少,活力低,对氨苄青霉素 (Ampicillin, 简称 Ap) 的抗性也低。将该菌株用紫外线 (30w, 40cm, 150s) 和硫酸二乙酯双重诱变,在含 Ap 的 LB 平板上筛选到 *E. coli* 质粒突变体 (p[#]GTE5)。

对质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶胞外酶活性进行分析表明,质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶基因的胞外酶含量、活力及对 Ap 的抗性增加约 10 倍。质粒突变体的 DNA 能在枯草杆菌原生质球中转化,而且 β -内酰胺酶基因也能在转化细胞中表达,质粒突变体 (p[#]GTE5) 仍然保持穿梭质粒的特性。

关键词 *E. coli* 质粒突变体; β -内酰胺酶; 穿梭质粒

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 染色体上的 β -内酰胺酶基因能编码 β -内酰胺酶。这种酶能专一性地水解含有 β -内酰胺环的抗生素,例如氨苄青霉素 (Ampicillin, 简称 Ap)、青霉素 G (简称 PG) 等。将这基因克隆到 *E. coli* 质粒 (pMB9) 上,然后把这重组质粒与枯草杆菌质粒 (pUB110) 重组,构建穿梭质粒 (pGTE5)^[1]。穿梭质粒转化到枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中,由于宿主细胞膜上有一种能特异地水解地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶上“信号肽”的蛋白酶, β -内酰胺酶就可以分泌到胞外,但是, *E. coli* 质膜上没有这种特异水解蛋白酶,穿梭质粒转化到 *E. coli* 细胞中, β -内酰胺酶很少分泌到细胞外,胞外酶活性很低,对 Ap 的抗性也很低。本实验将 *E. coli* RRI (pGTE5) 菌株用紫外线 (Ultraviolet rays, 简称 UV) 和硫酸二乙酯 (Diethyl sulfate, 简称 DES) 双重诱变,在含有不同浓度的 Ap 平板上筛选了突变体。用在 Ap 平板

上计算卫星菌落法和 Sargent 法^[2] 分析质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶的活力、诱变后质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶向胞外分泌量增加,胞外酶活性提高,对 Ap 的抗性也增加,而且又保持了穿梭能力。若用突变的 (p[#]GTE5) 质粒构建成载体将有利于基因的表达,有利于微生物发酵工艺。

材料和方法

(一) 菌株

E. coli 受体菌: RRI F⁻. pro. leu. thr. lacy. str^R. rk. mk.

B. subtilis 受体菌: BR151 urp. met. lys. spo⁺.

E. coli 质粒: SF8 (pBR322) Tc^R. Ap^R,
C600 (pCH23-5) Tc^R. Ap^R.
RRI (pGTE5-B7-E4) 简称
RRI (pGTE5) Ap^R. Neo^R.

B. subtilis 质粒: BR151(pGTE5-B7-E4-B4)

本文于 1986 年 8 月 29 日收到。

* 本校生物系遗传专业毕业生。

简称 BR151 (pGTE5-B) Ap^r.
Neo^r.

(二) 培养基和缓冲液

1. 细菌培养于 LB 液中或 LB 固体培养基上。
2. 原生质球转化实验按照文献[5]进行, 实验所用的再生培养基是 DM₃。
3. 0.1mol/L 硫酸二乙酯 (DES) 溶液用 75% 乙醇配制, 处理细菌时最终浓度为 0.01mol/L。
4. 质粒 DNA 分离按照文献[4]介绍的碱法裂解进行, 电泳缓冲液为硼酸缓冲液。

(三) 方法

1. 紫外线 (UV) 诱变: 接一环 *E. coli* RRI (pGTE5) 菌在 20ml LB 液中, 在 37°C 振荡培养至 OD₆₃₀ = 1, 经 5000 × g 离心 15min, 弃上清液, 菌块用 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) pH 7.0 洗涤一次。经离心后的菌块再用 20ml PBS 缓冲液悬浮, 将悬浮菌液均匀地分为四组, 每组为 5ml。每组照射紫外线 (30w. 40cm) 时间分别为 35s、60s、150s 和 240s。照射完毕, 各组再加 5ml LB 液, 暗修复 3 小时。从各试验组中取 2ml 菌液于 30ml LB 液中, 置 37°C 振荡培养至 OD₆₃₀ = 1, 测定被诱变菌的存活率, 并在含有不同浓度 Ap 平板上筛选突变菌。在照射 150s 试验组中筛选到高抗性突变菌。将突变菌划线, 在抗性平板上选单菌落并继代培养。

2. *E. coli* RRI (pGTE5) 突变菌株用 DES 进行第二次诱变: 接一环经 UV 诱变后的突变菌于 30ml LB 液中, 37°C 振荡培养至 OD₆₃₀ = 0.98。

将菌液均分为三组, 每组为 10ml, 每组菌液经 5000 × g 离心 15min, 弃上清液, 每组各加 4.6ml 0.1mol/L PBS (pH7.0) 缓冲液悬浮菌块。第一组另外加入 0.4ml 无菌水为对照。第二组和第三组各加入 0.4ml 0.1mol/L DES 为试验组。第二组在 37°C 处理 30 分钟, 第三组在 37°C 处理 45 分钟, 立即加入 0.5ml 25% 的硫代硫酸钠终止反应。试验组菌液经 5,000 × g 离心 15 分钟, 弃去上清液, 再加入 5ml LB 液悬浮菌块, 在含有 Ap 的平板上筛选高抗性突变菌株。

3. β-内酰胺酶活性的测定按文献[2]进行。

结 果

(一) UV 和 DES 双重诱变 *E. coli* RRI (pGTE5) 菌株

E. coli RRI (pGTE5) 菌株经 UV 诱变后, 在照射 150s 试验组中, 筛选到高抗性的突变体 (表 I)。

在 UV 照射 150s 存活率约为 1 的试验组中筛选到突变菌。经继代培养, 该菌再用 DES 处理, 结果见表 2。

E. coli RRI (pGTE5) 菌株经 DES 处理, 该菌株对 Ap 的抗性无明显增加, 在 Ap 浓度为 800 μg/ml 平板上筛选了双诱导突变菌, 划线挑单菌落继代培养三次, 筛选到质粒突变体 *E. coli* RRI (p^gGTE5)。随

表 1 UV 诱变 *E. coli* RRI (pGTE5) 菌株

Table 1 Induced variation of *E. coli* RRI (pGTE5) strain by ultraviolet rays

编 号 Number	UV 照射时间 UV irradiation time (s)	氨苄青霉素 Ampicillin (μg/ml)			
		200	400	600	800
1	35	-	-	-	-
2	60	-	-	-	-
3	150	*++++	+++	++	+
4	240	-	-	-	-
出发菌株 Starting strain	0	-	-	-	-

* + 表示菌落的数量 Amount of colonies

- 表示无菌落 No colony

表2 DES 处理 *E. coli* RRI (pGTE5) 突变体
Table 2 Treatment of *E. coli* RRI (pGTE5) mutant with DES

编号 Number	DES (mol/L)	处理时间 Treatment time (min)	突变体菌量 Amount of mutant (10^{-4}) (ml)	氨苄青霉素 Ampicillin($\mu\text{g/ml}$)		
				200	400	800
1	0	0	0.1	*++++	+++	+
2	0.01	30	0.1	++++	+++	+
3	0.01	45	0.1	++++	+++	+
出发菌株 Starting strain	0	0	0.1	-	-	-

* + 表示菌落的数量 Amount of colonies
- 表示没有菌落 No colony

之测定质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶基因产物的活力与枯草杆菌原生质球转化频率。

(二) 质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 的分离与枯草杆菌原生质球转化

用碱法裂解分离质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒带 (图 1)。

从泳道 A 和 G 电泳图象可见质粒 (pGTE5) 和质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 的泳动速率几乎一致。由于质粒 (pGTE5) 多年继代培养, 杂种质粒在 *E. coli* RRI (rec⁺) 细胞中形成二聚体, 在碱法裂解 DNA 过程中, 断裂为线形 DNA 和 oc DNA, 所以在泳道 A 和 G 中可见到 6 条带。

质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 转化枯草杆菌的原生质球, 将转化后的原生质球在 DM₃ 再生培养基 (含 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 Ap + 5 $\mu\text{g/ml}$ Neo) 平板上培养, 选择抗性转化细胞。在 18.9×10^8 的原生质球细胞中, 再生率达 10.5%, 获得转化细胞 7.7×10^2 , 转化频率为 3.8×10^{-5} 。

转化结果表明, 质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 仍然保持着从 *E. coli* 到枯草杆菌的转化。经琼脂糖电泳检测转化细胞质粒 DNA 带 (图 1) 可见, B、C、D 和 E、F 泳

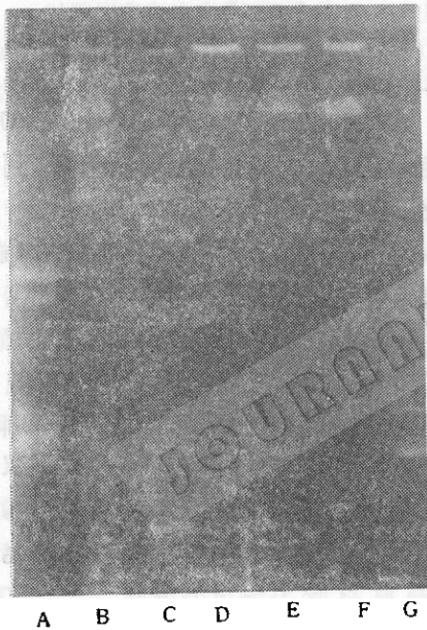


图 1 质粒 (pGTE5) 和质粒突变体 (p[#]GTE5) 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of plasmid (pGTE5) and plasmid mutant (p[#]GTE5)

- A. 质粒 (pGTE5) DNA 带
B, C, D. 质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 转化细胞 DNA 带
E, F. 质粒 (pGTE5) DNA 转化细胞 DNA 带
G. 质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 带
A. DNA bands of plasmid (pGTE5)
B, C, D. DNA bands of plasmid mutant (p[#]GTE5) in *B. subtilis*
E, F. DNA bands of plasmid (pGTE5) in *B. subtilis*
G. DNA bands of plasmid mutant (p[#]GTE5)

表 3 五种菌株的卫星菌落数

Table 3 The satellite colonies of five strains

编 号 Number	菌 株 Strain	卫星菌落数 Satellite colonies
1	<i>B. licheniformis</i>	>150
2	<i>E. coli</i> SP8 (pBR322)	>50
3, 4, 5	<i>E. coli</i> C600 (pCH23-5)	6
6, 7, 9	<i>E. coli</i> RRI (pGTE5)	2
8	<i>E. coli</i> RRI (p [#] GTE5)	>20

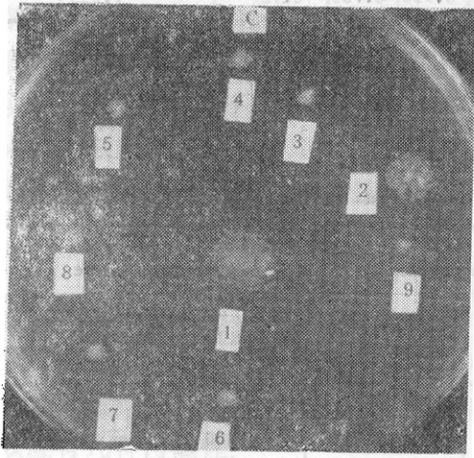


图 2 五种菌株的卫星菌落图

Fig. 2 Satellite colonies of five strains
编号见表 3, See the table 3.

道中二类转化细胞的质粒带完全一致, 表明双重诱变没有改变质粒的穿梭功能。

(三) 计算卫星菌落, 测定 β -内酰胺酶基因产物的胞外分泌量

E. coli RRI (Ap^s) 菌株在 37°C 振荡培养 3.5 小时后, 细菌处于对数生长的

早期, 取 10⁻² 浓度的菌液 0.1ml 涂于含有不同浓度 Ap 的 LB 平板上, 观察 *E. coli* RRI 的临界抗性。结果表明, *E. coli* RRI 对 Ap 的抗性临界浓度为 4 μ g/ml。

取 0.1ml *E. coli* RRI 菌液(对数生长早期)涂布在含 5 μ g/ml Ap 的 LB 平板上, 置室温 30 分钟, 菌液干后, 用牙签将测试菌的单菌落滴到此抗性平板上, 37°C 培养 48 小时后, 菌落向胞外分泌的 β -内酰胺酶将其周围培养基中的 Ap 分解, 在敏感菌周围形成卫星菌落(表 3, 图 2)。1 号地衣芽孢杆菌周围有数百个卫星菌落, 2 号质粒(pBR322)周围也有数十个, 8 号质粒突变体(p[#]GTE5)周围卫星菌落少于质粒(pBR322), 但比 6、7、9 号质粒(pGTE5)周围的卫星菌落多, 表明 p[#]GTE5 的 β -内酰胺酶向胞外分泌量大大提高。除地衣芽孢杆菌亲本外, 其余四种质粒的卫星菌落数目作统计学 t 测验(表 4)。

t 测验结果表明 (p[#]GTE5) 胞外分泌

表 4 四种质粒卫星菌落的 t 测验

Table 4 The t test of satellite colonies of four strains

编 号 Number	质 粒 Plasmid	测试数目 Number of test	平均卫星菌落数 Average number of satellite colonies	t ₁ 测验 t ₁ Test Comparison with plasmid (pBR322)	P $\alpha = 0.01$	t ₂ 测验 t ₂ Test Comparison with plasmid (pCH23-5)	P $\alpha = 0.01$
2	pBR322	10	77.3	—	—	13.4	2.76
3	pCH23-5	20	1.8	13.40	2.76	—	—
8	p [#] GTE5	5	22.0	3.64	1.77	2.83	2.807 $\alpha = 0.1$
6	pGTE5	5	0.2	6.85	1.77	0.73	1.74

表5 四种菌株的 β -内酰胺酶的活性比较Table 5 Comparison of β -lactamase activity of four strains

菌株 Strain	测试数 Number of test	\bar{A}_{499nm}				ΔA_{499nm}^{**}	青霉素酶单位 Paniclellinase unit $7.5 \times (\Delta A_{499nm})$ (u/ml)
		Aa*	Ab	Ac	As		
<i>E. coli</i> RRI (pGTE5)	3	1.075	1.167	0.995	0.869	0.034	0.255
<i>E. coli</i> RRI (p [#] GTE5)	3	1.075	1.167	0.960	0.521	0.347	2.602
<i>B. subtilis</i> BR151 (pGTE5-B)	3	1.075	1.167	0.972	0.731	0.149	1.118
<i>B. subtilis</i> BR151 (p [#] GTE5-B)	3	1.075	1.167	0.956	0.725	0.139	1.043

* Aa, Ab, Ac 为对照的吸光度 Control A_{499nm} As 为待测样品的吸光度 Sample A_{499nm} ** $\Delta A_{499nm} = Aa - (Ac - Ab) - As$

表6 四种菌株对氨苄青霉素 (Ap) 抗性菌落数

Table 6 The resistance colonies of four strains to Ampicillin

Ap ($\mu\text{g/ml}$)	菌液量 Amount of dilution (10^{-2}) (ml)	平板数 Number of plate	抗 Ap 的平均菌落数 Average number of colonies of resistance			
			<i>E. coli</i> RRI (pGTE5)	<i>E. coli</i> RRI (p [#] GTE5)	<i>B. subtilis</i> BR151 (pGTE5-B)	<i>B. subtilis</i> BR151 (p [#] GTE5-B)
50	0.1	5	48	> 300	> 300	> 300
100	0.1	5	3	> 300	> 300	> 300
200	0.1	5	—	> 300	> 300	> 300
400	0.1	5	—	> 100	> 200	> 200
800	0.1	5	—	32	> 100	> 150
1000	0.1	5	—	2	> 100	> 100
1500	0.1	5	—	—	72	> 100
2000	0.1	5	—	—	4	54
2500	0.1	5	—	—	—	6

量远远少于 pBR322 的分泌量。但是, p[#]GTE5 胞外分泌量与质粒(pCH23-5)相比差异显著,表明 p[#]GTE5 β -内酰胺酶的胞外分泌量比 pCH23-5 和 pGTE5 略高。质粒(pGTE5)的胞外分泌极少。

(四) β -内酰胺酶基因产物胞外酶的活性

将测试的四种菌株 *E. coli* RRI (pGTE5), *E. coli* RRI (p[#]GTE5), *B. subtilis* BR151 (pGTE5-B), *B. subtilis* BR151 (p[#]GTE5-B) 的菌液经离心后,分别取上层清液 2.5ml,测定上清液中青霉素酶的活性,结果见表 5。

质粒突变体 (p[#]GTE5) 的青霉素酶单位比正常质粒 (pGTE5) 约高 10 倍,比枯草杆菌质粒 (pGTE5-B) 的高一倍。这现象表明,质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶向胞外大量分泌。另外枯草杆菌的正常质粒和突变体质粒的青霉素酶单位数目差异不显著。表明质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 转化到枯草杆菌细胞中, β -内酰胺酶的胞外酶活性没有提高。

(五) 对氨苄青霉素 (Ap) 的抗性测定

将以上测试的四种菌株在 37℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 0.98$, 取菌液 (10^{-2}) 0.1ml

涂布在含不同浓度 Ap 的 LB 平板上, 37°C 培养 48 小时, 统计不同菌株的抗性菌落数目(表 6), 间接比较各菌株总的 β -内酰胺酶量。

UV 和 DES 双重诱变 *E. coli* RRI (pGTE5), 该菌对 Ap 的抗性由 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 增加到 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, 个别细胞抗 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。质粒突变体 (p[#]GTE5) 对 Ap 的抗性增加约 10 倍。在枯草杆菌细胞中质粒突变体 (p[#]GTE5-B) 对 Ap 的抗性也明显增加, 个别细胞可以抗 Ap 达到 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, 表明质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -内酰胺酶的胞内酶含量增高。

讨 论

1. *E. coli* RRI (pGTE5) 经 UV 和 DES 双重诱变, 提高了 β -内酰胺酶胞外分泌量, 增强了对 Ap 的抗性, 产生这些突变效应有几种可能性:

(1) 双重诱变使 *E. coli* 细胞外膜透性增大。1984 年日本科学家掘越弘毅^[9]认为杂种质粒使 *E. coli* 外膜透性增大, 本实验将杂种质粒 (pGTE5) 经双重诱变, 有很大可能是改变了 *E. coli* 外膜的透性, 使上层清液青霉素酶活性由 0.255u/ml 增加到 2.602u/ml, 分泌量增加约 10 倍。

(2) 改变了地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶的“信号序列”。地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因的“信号肽”和膜连结^[7-9], 该酶大量分泌到胞外。*E. coli* 的质粒上克隆了该基因, 它的信号肽不和 *E. coli* 的质膜结合。经诱变后, 可能改变了该基因的信号序列, 使质粒突变体 (p[#]GTE5) 的 β -

内酰胺酶能穿膜转位分泌到胞外。

(3) 质粒突变体对 Ap 的抗性增加很可能是 β -内酰胺酶基因的起动机附近序列发生了突变, 增强了转录功能。

以上这些推测还需以实验证明, 突变机制还有待深入研究。

2. 质粒突变体 (p[#]GTE5) 保持了在 *E. coli* 与 *B. subtilis* 之间穿梭的特性。

E. coli 质粒突变体 (p[#]GTE5) DNA 的 β -内酰胺酶基因能在枯草杆菌原生质球转化细胞中表达, 表明双重诱变不影响 Rep (E) 和 Rep (B) 的复制点。正如陈永南^[1]在其文章中所分析的: 第一次在 *B. subtilis* BR151 (R⁺, M⁺) 菌株中筛选到的转化细胞可能是一种突变体, 这种突变特性使杂种质粒 (pGTE5) 保持了稳定的穿梭功能。经诱变的质粒突变体 (p[#]GTE5) 仍然有穿梭的特性。设想杂种质粒 (pGTE5) 复制位点可能有特异的结构。

参 考 文 献

- [1] 陈永南: 生物工程学报, 2(2): 31, 1986。
- [2] Imamaka, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 147(3): 776, 1981.
- [3] Sherratt, D. J. and J. F. Collins: *J. Gen. Microbiol.*, 76: 217, 1973.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 90—91, 1982.
- [5] 北京大学生物系遗传学教研室编: 遗传学实验方法和技术, 高等教育出版社, p. 37—40, 1983.
- [6] Davis, B. D. and P. C. Tai: *Nature*, 283: 433, 1980.
- [7] Gray, O. and S. Chang: *J. Bacteriol.*, 145(1): 422, 1981.
- [8] Kroyer, J. and S. Chang: *Gene*, 15: 343, 1981.
- [9] 郭兴华等: 微生物学通报, 12(5): 215, 1985.

CHARACTERISTIC ANALYSIS OF *E. COLI* PLASMID MUTANT (p[#]GTE5)

Chen Yuexian Mao Xiaohong

(Department of Biology, Beijing University, Beijing)

β -lactamase gene of *E. coli* RRI plasmid (pGTE5) could express in Both *E. coli* and *Bacillus subtilis*, but the extracellular β -lactamase activity and resistance to Ampicillin in *E. coli* is very low. For increasing β -lactamase activity of plasmid (pGTE5), the *E. coli* RRI (pGTE5) strain was induced by both UV (30 w, 40 cm, 150 s) and diethyl sulfate. A plasmid mutant (p[#]GTE5) was selected by increasing it's resistance to Ampicillin (Ap).

Cells of *E. coli* with plasmid mutant (p[#]GTE5) which cloned the β -lactamase gene of *Bacillus licheniformis* were able to

secret a large amount of protein into the culture broth. The extracellular β -lactamase activity and resistance to Ampicillin is about ten times higher than cells containing normal plasmid (p[#]GTE5). The β -lactamase gene could express after transformation of (p[#]GTE5) DNA into spheroplast of *Bacillus subtilis*. The plasmid mutant (p[#]GTE5) remains the character of shuttle plasmid.

Key words

E. coli plasmid mutant; β -lactamase; Shuttle plasmid