

质粒 RSF 1010 寄主范围特性的遗传学分析*

孙 熙 年

(辽宁大学生物系, 沈阳)

采用 Tn5 插入诱变、限制性核酸内切酶作图以及 DNA 转化等方法, 对广泛寄主范围型质粒 RSF 1010 的衍生体——pKT 240 进行研究。证实质粒的寄主范围决定于它在遗传背景不同的寄主中复制并保存自身的能力, 而 *repA*, *repB* 和 *repC* 基因为该质粒复制所必需。

关键词 质粒; 寄主范围

广泛寄主范围型质粒可在许多细菌中转移和复制, 它对于细菌遗传学的基础研究以及基因工程极其有用^[1]。但是关于此种质粒的广泛寄主范围特性的研究不多, 而且均集中于 IncP-I 群中的 R18 (=RP1 = RP4 = RK2 = R68)^[2-6]。

RSF 1010 是 G⁻ 细菌中一个小的 (8.7kb) 非接合型、多拷贝 (在大肠杆菌中拷贝数为¹⁰⁻¹²/细胞) 可诱动的质粒, 属于 Q 不相容群 (IncQ)。本实验采用其衍生体——pKT 240^[7], 分子量为 12.5kb, 携有 Km^r (卡那霉素抗性基因) 与 Cb^r (羧苄霉素抗性基因)。

我们利用转座子 Tn5 插入诱变以产生寄主范围改变的突变型质粒, 然后用限制性核酸内切酶作图法确定其插入位置, 从而得知影响寄主范围改变的基因, 最后提取质粒 DNA 以转化不同的受体, 进一步验证其寄主范围特性的表现。

材料和方法

(一) 菌株与质粒

1. 细菌菌株: 大肠杆菌 (*E. coli*) S17-1 (*his::Tn5*), S17-1 *rif^r* *pro trp*, DH1

(*thi-1*) 和 C2110 (*polA1 his*), 铜绿色假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PA01, 腐臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) PPN 1028。均为 Monash 大学遗传系保藏菌株。

2. 质粒: pKT240、pMO58 及其 Tn5 插入突变型 pMO793、pMO794、pMO795、pMO796、pMO797、pMO798 (除 pKT 240 外, 均为本实验所构建)。

(二) 培养基

1. 完全培养基 (固体): Oxoid 血琼脂 17 g, Oxoid 酵母膏 2g, 蒸馏水 400 ml。

2. 完全培养基 (液体): Oxoid 2 号营养肉汤 25g, Oxoid 酵母膏 5g, 蒸馏水 400 ml。

3. 基本培养基: Difco bacto-agar 6g, 蒸馏水 400ml。灭菌后冷却至 55℃, 加入 50 倍盐溶液** 8ml 和 50% 葡萄糖溶液

本文于 1989 年 3 月 9 日收到。

* 本文在澳大利亚 Monash 大学遗传系进修期间完成, Viji Krishnapillai 教授给予不少帮助, 深表谢意。

** 50 倍盐溶液的配制: MgSO₄ · 7H₂O 10g, 柠檬酸 100g, 无水 K₂HPO₄ 500g, NaNH₄HPO₄ · 4H₂O 175ml, 蒸馏水 670ml

2mi。

如需加入氨基酸时则每 400 ml 加入 8ml 50mmol/L 溶液。

4. 硝酸钾肉汤培养液 (用以培养铜绿色假单孢菌): 在每升液体完全培养基中添 4g 硝酸钾。

(三) 质粒 DNA 操作

1. 质粒 DNA 的提取: 按 Holmes 等^[8]的方法加以修改以快速提取质粒 DNA, 采用氯化铯-溴化乙锭梯度离心法纯化。

2. 质粒 DNA 的酶切: 所有核酸内切酶的消化均使用 TA 缓冲液^[9], 处理温度 37℃, 时间为 2 小时。

3. 琼脂糖凝胶电泳: 使用小型凝胶板时琼脂糖浓度为 0.8%, 电泳时电压 40V, 时间为 1.5 小时。用以内切酶作图时的凝胶电泳, 其胶浓度为 1.2%, 电泳时电压为 25V, 时间 18 小时。以同时进行电泳的 Hind III 或 Hind III/EcoRI 酶切过的 λ DNA 作为计算各个 DNA 片段大小(即

碱基对数目)的参照。电泳时使用 TAE 缓冲液 (组成为: 40mmol/L Tris, 10mmol/L 醋酸钠, 1mmol/L EDTA)。

(四) 转化方法

在 4℃ 条件下用 100mmol/L $MgCl_2$ 和 75mmol/L $CaCl_2$ 处理大肠杆菌, 用 100mmol/L $MgCl_2$ 和 150 mmol/L $MgCl_2$ 处理假单孢菌, 使之呈现感受态。将感受态细胞悬液与 DNA 溶液 (其浓度视需要而定) 按 2:1 体积比混合, 置冰溶中进行转化半小时 (假单孢菌可延长至 1 小时), 然后于 37℃ 水溶中保温 5min。

结 果

(一) 质粒 pMO58 的构建

由于 Tn5 插入诱变的选择条件是卡那霉素抗性, 而 pKT 240 已经携有此基因, 为此先用 SmaI 和 HpaI 酶切此质粒, 以除去 Km^r 基因, 此即为 pMO58 [图 1]。其分子量从 12.5kb 减至 11kb 左右。(pKT 240 中的 HpaI-PstI 片段来自 RSF 1010^[7],

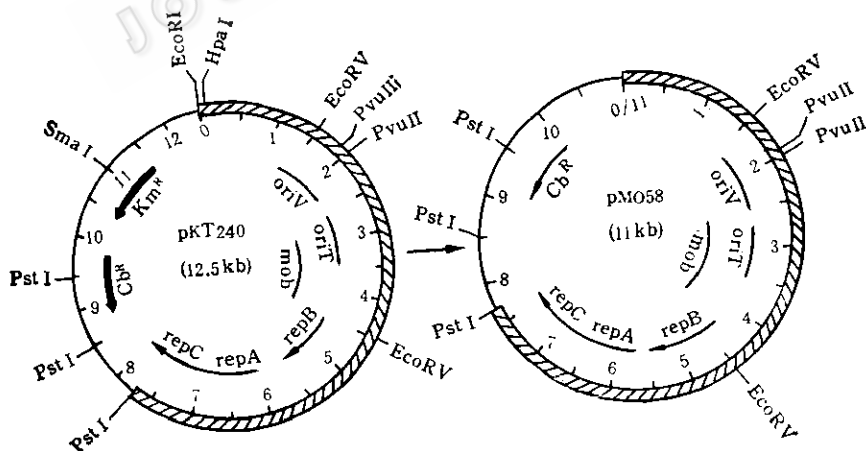


图 1 质粒 pMO58 的构建

Fig. 1 The construction of pMO58

它是由质粒 pKT240 经用酶切除去 SmaI-HpaI 片段而成。图中斜线部分来自质粒 RSF 1010。

It was constructed from pKT 240 by enzymatic removing the SmaI-HpaI segment.

The part of oblique line was derived from RSF1010.

图 1 中以斜线表示)。

(二) pMO58 寄主范围突变型的分离

1. 参照 Cowan 等^[2]的方法,采用 Tn5 插入诱变以获得此类突变型: 以快速提取的质粒 pMO58 DNA 转化 *E. coli* S17-1 (*his::Tn5*), 在加有卡那霉素 (20 μg/ml) 和羧苄霉素 (250 μg/ml) 的完全培养基上挑出转化子, 记为 S17-1 (*his::Tn5*)/pMO58, 其转化频率为 10⁻⁶。提取此菌的质粒 DNA,经琼脂糖凝胶电泳后确证 Tn5 已插入。再以此菌为供体,以 S17-Irif^r pro trp 为受体,各取 0.1ml 菌悬液混合铺于完全培养基上,37℃ 培养 3 小时后洗下菌细胞,再涂于加有 Cb 250 μg/ml, Rif 200 μg/ml 和 Km 20 μg/ml 的完全培养基上,37℃ 培养过夜,生长出的菌落初步定为 Tn5 插入后 pMO58 突变型,记为 S17-1 (Rif^r)/pMO58::*Tn5*。

2. 寄主范围改变的测定: 分别用大肠杆菌 C2110 和铜绿色假单胞菌 PA01 作为受体,将上述的 S17-1 (rif^r)/pMO58::*Tn5* 作为供体进行质粒诱动转移,即将在加有上述三种抗生素的平板上长出的菌落

分别影印于事先涂有这两种受体菌的选择培养基(基本培养基加入组氨酸和 Cb 250 μg/ml 选择 C2110, 基本培养基加 Cb250 μg/ml 选择 PA01)。经过培养挑出在前一种培养基上生长、而不能在后一种培养基上生长的菌落,此即为寄主范围改变的突变型(pMO798 则是一种特殊的突变型,由于它是 Tn5 插入 *mob* 基因所致,因而它对上述两种受体菌株均不能被诱动转移)。

随机挑选 32 个突变型,并用点滴配对法进一步测定质粒在这两个寄主中的转移频率: 当带突变型质粒的供体菌被稀释到 10⁻⁶ 时,在涂有 C2110 的选择平板上仍有菌落生长,且与带有对照 pMO58 的供体菌生长相近;但是如用 PA01 作为受体菌,则稀释到 10⁻² 时,就几乎没有菌落生长,对照组则生长正常。这表明由于 Tn5 插入所造成的寄主范围改变,使两者的转移频率可相差约 10⁴ 倍。

(三) pMO58 寄主范围突变型的物理图谱

由于 pKT 240^[7] (图1)和 Tn5^[10-12] (图

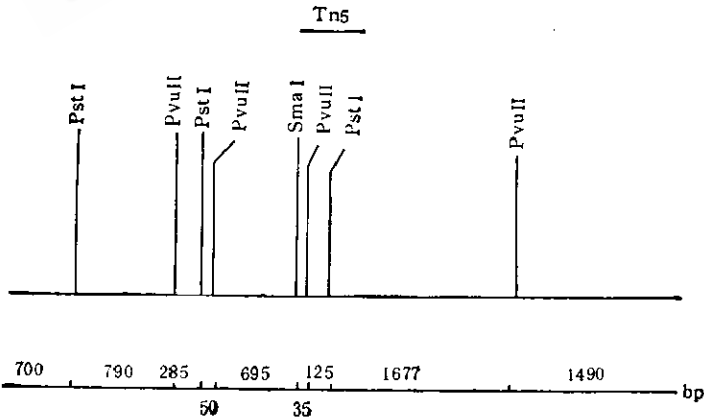


图 2 Tn5 的酶切图
Fig. 2 The physical map of Tn5

图中只列出本实验中所使用的酶以及这些酶切点之间的距离(碱基对数)
Only list the restriction endonucleases using in this experiment and the distances (bps) between their cutting sites

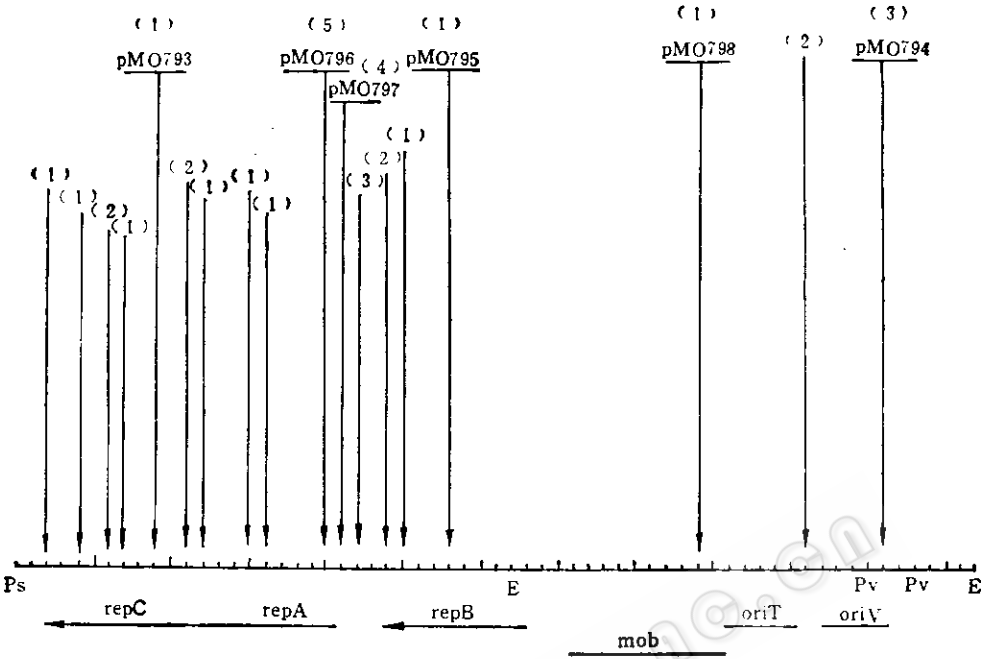


图 3 pMO58 寄主范围突变型中 Tn5 插入的位置
Fig. 3 The sites of Tn5 insertion in pMO58 host range mutant
括号中的数字是该位置处所有突变型的总数

E = EcoRV Ps = PstI Pv = PvuII
The numbers in the brackets were the summation of all mutant in that site

表 1 用质粒 pMO58 及其寄主范围突变型 DNA 转化受体菌的结果*

Table 1 The result of transforming various recipients with pMO58 and its host range mutants DNA (Number of transformant/ μ g DNA)

供体 Donor	Tn5 插入 位点 The sites of Tn5 insertion	受 体 Recipient			
		大肠杆菌 <i>E. coli</i>		假单胞菌 <i>Pseudomonas</i>	
		C2110	DH 1	铜绿色假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	腐臭假单胞菌 <i>P. putida</i>
pMO 793	repC	3.0×10^4	1.1×10^4	3.1×10^4	8×10^2
pMO 794	oriV	3.8×10^4	1.6×10^4	0	8×10^2
pMO 795	repB	3.6×10^4	1.7×10^4	0	8×10^2
pMO 796	repA	3.6×10^4	1.7×10^4	0	10×10^2
pMO 797	repA	3.0×10^4	1.5×10^4	0	9×10^2
pMO 798	mob	4.0×10^4	1.5×10^4	2.1×10^4	9×10^2
pMO 58	野生型	4.1×10^4	1.8×10^4	3.9×10^4	8×10^2

* 选择培养基使用的是加有羧苄霉素 250 μ g/ml 的肉汤平板培养温度：大肠杆菌 37 $^{\circ}$ C；铜绿色假单胞菌 43 $^{\circ}$ C；腐臭假单胞菌 28 $^{\circ}$ C。

The selective medium is broth plate adding carbonicilline 250 μ g/ml.
The culture temperature are: *E. coli* 37 $^{\circ}$ C; *P. aeruginosa* 43 $^{\circ}$ C; *P. putida* 28 $^{\circ}$ C.

2) 的物理图谱已经知道, 故可利用相应的内切核酸酶 (EcoRV, PstI, PvuII 和 SmaI) 进行酶切作图, 从而确定 Tn5 在突变型质粒中的插入位置。

我们获得的结果总结于图 3。

(四) 利用寄主范围突变型的 DNA 转化不同的受体菌株

由图 3 可见, 这些寄主范围突变型的 Tn5 插入位置是不同的, 大致可分五种类型, 即插入于三个不同的复制基因 (repA, repB, repC)、复制起始点 (oriT 或 oriV) 以及诱动转移基因 (mob) 处。据文献报道^[4], 质粒的广泛寄主范围特性主要取决于它们在遗传基础不同的寄主中其复制和保存自身的能力。

为了从遗传学上获得此项证据, 我们选择了 6 个突变型 (即 pMO793、pMO794、pMO795、pMO796、pMO797、pMO798) 以及野生型 (pMO58) 质粒, 提取并纯化其 DNA, 对下述四个受体菌 (*E. coli* C2110 和 DH1, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *P. putida* PPN1028) 进行转化, 结果列表 1。

讨 论

1. mob 突变型质粒 (pMO 798) 已失去被诱动转移的功能, 所以不再能转入任何受体菌。但这并非其寄主范围特性的真正改变, 因为其 DNA 的转化效率与 pMO58 相似 (表 1), 这就进一步证实质粒的寄主范围广泛与否在于其能否在遗传背景不同的受体中进行复制从而保存自身。mob 突变型的复制基因与复制起始点均未受损, 其寄主范围特性仍属正常。

2. 根据 Scherzinger, E. 等的研究^[4], 质粒 RSF1010 的复制起始于 oriV 处, 而突变型质粒 pMO794 中由于 Tn5 插入了 oriV, 因此使其复制不能正常起始, 即其

寄主范围发生了改变, 也就不能保持原先的寄主范围特性。

3. 上述学者的研究还指出: RSF 1010 的复制需有三种复制蛋白 RepA、RepB 和 RepC 参与, 它们分别由位于距 oriV 较远处的 repA、repB 和 repC 基因所编码, 这一点与此种质粒的广泛寄主范围特性有关 (狭窄寄主范围质粒例如 ColEI、F、RI 等, 其有关复制的基因不多, 且均集中于复制起始点附近)。因为我们已经指出寄主范围的宽窄主要由质粒的复制能力所决定, 而质粒的复制往往是质粒的基因与寄主的有关组分所共同决定的^[3], 质粒自身编码的复制蛋白愈多, 它对寄主的依赖性就愈小, 而其寄主范围也能更广泛些。

在上述三种复制蛋白中, RepA 和 RepB 蛋白的作用还不甚清楚, 可是它们显然是其复制所必需, 因为 repA 和 repB 的突变型 (pMO795、pMO796、pMO797) 均丧失在铜绿色假单孢菌 PA01 中复制的能力, 因而不可能转化此菌。

4. RepC 蛋白在质粒 RSF1010 的复制时, 可以特异性地结合于 oriV 处, 对复制起始的频率起着正调节作用, 它在细胞中的浓度可以控制质粒的拷贝数^[4], 但是它的突变型 (pMO793) 似乎还保留着其复制功能, 因而其寄主范围特性并无改变, 有可能 RepC 蛋白仅起调节作用。

pMO58 的寄主范围突变型的 DNA 在转化大肠杆菌和腐臭假单孢菌 PPN1028 时, 其效率与 pMO58 一样, 看来质粒 pMO58 突变型的寄主范围改变有一定局限性。这可能由于其受损伤的复制基因功能在某些寄主中被寄主的基因产物予以补偿的缘故。当然要阐明其确切机制还有待于深入研究所涉及的寄主基因组分。

5. 用质粒 DNA 转化不同受体菌时, 即使在同一种内, 其转化频率也并不相同,

例如在大肠杆菌中, DH1 和 C2110 两种受体其被转化效率相差约 2—3 倍(表 1), 这与受体菌的遗传背景有关, 因为 C2110 是 *polA* (DNA 多聚酶 I) 基因的突变型, 从而影响其生长繁殖。至于假单胞菌受体, 我们使用了两个种, 它们体内的 DNA 限制修饰系统有所差别, 腐臭假单胞菌 PPN1028 属于正常, 而铜绿色假单胞菌 PA01 的 DNA 限制修饰系统已经被改造为热敏型, 因而将其培养于 43℃ 高温时, 对 DNA 的限制作用失效, 转化效率就提高 40—50 倍。

参 考 文 献

- [1] Krishnapillai, V.: *J. Genet.*, 65: 103—120, 1986.
- [2] Cowan, P. et al.: *Plasmid*, 8: 164—174, 1982.
- [3] Krishnapillai, V.: *Plasmid*, 12: 170—180, 1984.
- [4] Schief, W. et al.: *Plasmid*, 15: 48—56, 1986.
- [5] Krishnapillai, V.: *Plasmid*, 17: 164—166, 1987.
- [6] Nash, J. et al.: *Plasmid*, 18: 35—45, 1987.
- [7] Bagdasarín, M. M. et al.: *Gene*, 26: 273—282, 1983.
- [8] Holmes, D. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 114: 193—197, 1981.
- [9] O'Farrell, P. H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 179: 421—435, 1980.
- [10] Ludwig, G. et al.: *Gene*, 19: 327—336, 1982.
- [11] Rothstein, S. J. et al.: *Cell*, 24: 191—199, 1981.
- [12] Mazodier, P. et al.: *Nucleic Acid Research*, 13: 195—205, 1985.
- [13] Scherzinger, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 654—658, 1984.
- [14] Haring, V. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6090—6094, 1985.

GENETIC ANALYSIS OF THE HOST RANGE OF THE PLASMID RSF1010

Sun Xinian

(Department of Biology, Liaoning University, Shenyang)

32 host range mutants of pMO58, which contains a 8.0 kb fragment of RSF1010, were screened, using the transposon Tn5 insertion mutagenesis. To judge the genes which affect the host range of plasmid, the Tn5 insertion sites were located with restriction endonuclease mapping. The ability of the plasmid replication in different recipients was checked with DNA transformation.

The results further confirmed the barrier to the host range of plasmid was their inabi-

lity to replicate and maintain themselves in genetically different host. The *repA* *repB* and *repC* genes were necessary for the plasmid replication, but the *repC* gene may be a positive regulator and its function may be complemented by host gene products.

Key words

Plasmid; Host range