

质粒 pNK866 的拷贝数测定和限制酶图谱*

高才昌 张绪伦 蔡宝立

李秀敏** 乔明强 张秀明

(南开大学分子生物学研究所 天津 300071)

假单胞菌(*Pseudomonas*)降解质粒的基因组织和表达调控的研究,以及以这些质粒为基础的高效降解环境污染物菌株和产生精细化工产品菌株的构建,是当前一个极为活跃的研究领域^[1]。但是,由于假单胞菌基因在大肠杆菌中的表达水平非常低^[2],可用的假单胞菌载体又比较少,使这方面的研究遇到不少困难。目前使用较多的是来自质粒 RSF1010 的载体,但由于分子量较大,使用不方便^[3],因此构建新的假单胞菌载体是该领域研究的一项重要内容。我们从弯曲假单胞菌(*P. geniculata*)AS 1.866 中分离到质粒 pNK866^[4]。本文报道了该质粒的拷贝数和限制酶图谱,为假单胞菌新载体的构建奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

Pseudomonas geniculata AS 1.866: 含有质粒 pNK866, 中国科学院微生物研究所提供。

E. coli HB101: 受体菌, 本实验室保存。

pBR322 DNA: 购自中国医学科学院基础医学研究所。

1.2 培养基

见文献[5], 固体培养基中加氨苄青霉素(Ap)50 μ g/ml, 或四环素(Tc)25 μ g/ml。

1.3 质粒的分离和纯化

见文献[5]和[6]。

1.4 质粒限制片段的克隆和限制图谱

见文献[7]。

1.5 质粒拷贝数测定

见文献[8], DNA 浓度测定用二苯胺法^[9]。

2 结果和讨论

2.1 pNK866 的拷贝数测定

AS 1.866 菌株在液体培养基中震荡培养至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右, 用于下列测定。

2.1.1 质粒 DNA 与细胞总 DNA 比率(P)的测定: 取 1ml 菌液, 离心分离细胞, 按文献[8]的方法裂解细胞, 然后用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶用 1 μ g/ml 溴化乙锭染色 30 分钟, 在蒸馏水中脱色 1 小时, 用 CS-910 色谱扫描仪对凝胶中的 DNA 带进行扫描分析(图 1)。质粒和染色体 DNA 的峰面积分别是 24429 和 54236。峰面积与 DNA 的质量成正比, 但由于质粒是 cccDNA, 染色体是线状 DNA, 当两者质量

本工作得到国家自然科学基金和天津市自然科学基金资助。

** 现在工作单位: 秦皇岛市卫生学校(066000)。

本文于 1992 年 4 月 20 日收到。

相同时,后者的峰面积是前者的 1.33 倍^[4],所以在计算质粒与总 DNA 的比率时,质粒的峰面积应乘以 1.33。根据以上结果计算出质粒 DNA 与细胞总 DNA 的比率是:

$$P = \frac{1.33 \times 24429}{1.33 \times 24429 + 51236} = 0.375$$

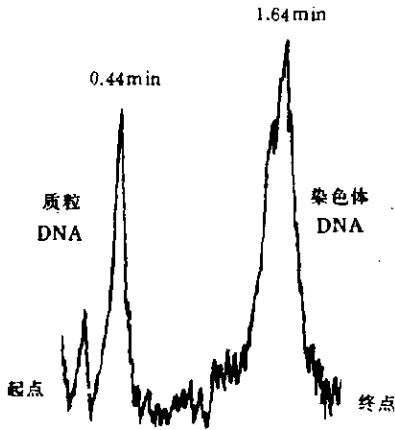


图1 AS 1-866 菌株质粒和染色体 DNA 的荧光扫描图

2.1.2 细胞计数(C):用无菌水稀释菌液,用血球计数板进行细胞计数,4 次计数的平均值为 $C = 1.41 \times 10^8$ 细胞/ml。

2.1.3 测定 1ml 菌液中细胞总 DNA 的质量(Mc):取 100ml 菌液,按文献[8]的方法制备总 DNA,按文献[9]的方法测定 DNA 浓度,结果为

$$Mc = 1.173 \times 10^{-7} \text{g/ml}$$

2.1.4 计算一个质粒的质量(Mp):pNK866 的分子大小为 38kb(见表 1),1bp = 650dal,1dal = 1.66×10^{-21} g,所以 $M_p = 38000 \times 650 \times 1.66 \times 10^{-21}$ g = 4.1×10^{-17} g

2.1.5 计算质粒的拷贝数(C):

$$C = \frac{M_c \times P}{M_p \times C} = \frac{1.173 \times 10^{-7} \times 0.375}{4.1 \times 10^{-17} \times 1.41 \times 10^8} = 76$$

pNK866 的拷贝数(76)及其在细胞总 DNA 中所占的比率(37.5%)如此之高,这在野生型细菌中是极为少见的,如果能利用其复制区构建假单胞菌载体,将具有重要的应用价值。

2.2 pNK866 的限制酶图谱

2.2.1 pNK866 的限制酶分析: pNK866 DNA 分别用 Hind III、EcoR I、EcoRV 三种酶进行单酶和双酶消化,然后进行琼脂糖凝胶电泳,以 λDNA 的 Hind III 片段为分子量标准,测出各限制片段的分子大小(表 1)。pNK866 为 38kb。

表1 pNK866 质粒 DNA 的限制酶分析

片段序号	限制片段的大小(kb)					
	Hind III	EcoRV	EcoR I	Hind III + EcoR I	Hind III + EcoRV	EcoR I + EcoRV
1	21.2	31.2	13.7	13.7	18.8	10.1
2	16.8	5.9	9.6	7.6	12.2	9.6
3		1.1	7.6	7.5	3.5	7.6
4			5.5	4.5	2.4	3.1
5			1.1	2.1	1.1	2.5
6			0.6	1.1		2.1
7				1.0		1.1
8				0.6		1.1
9						0.6
总计	38.0	38.2	38.1	38.1	38.0	38.1

2.2.2 pNK866 Hind III 片段的克隆和限制酶图谱：pNK866 经 Hind III 消化产生 21.2kb 和 16.8kb 两个片段,使这两个片段与 Hind III 切下的 pBR322 DNA 连接,转化 *E. coli* HB101,从 Ap^rTc^r 转化子中得到 1 种质粒,其中两种分别含有连接方向相反的 16.8kb Hind III 片段,称为 pEP301 和 pEP302(21.2kb)。另外两种重组质粒分别含有连接方向相反的 21.2kb Hind III 片段,称为 pEP303 和 pEP304(25.6kb)。用 Hind III、EcoRI、Hind III + EcoRV 分别消化 pEP301 和 pEP303,用 EcoRI 部分消化 pEP303,所得限制片段的大小见表 2。根据表 1 和表 2 的结果,得到 pEP301 和 pEP303 的限制酶图谱(图 2)。

表 2 pEP301 和 pEP303 的限制酶分析

质粒	限制酶	限制片段的大小(kb)
pEP301	Hind III	16.8 4.4*
	EcoRI	13.7 5.4** 2.1
	Hind III + EcoRI	12.1 4.4* 3.5 1.1
pEP303	Hind III	21.2 4.4*
	EcoRI	11.9** 7.6 4.5 1.1 0.6
	Hind III + EcoRV	18.9 4.4* 2.1
pEP303	EcoRI	21.2** 16.4** 15.6** 11.9**
		8.7 7.6 4.5 1.1 0.6

* pBR322 DNA; ** 含有 pBR322 DNA 的限制片段

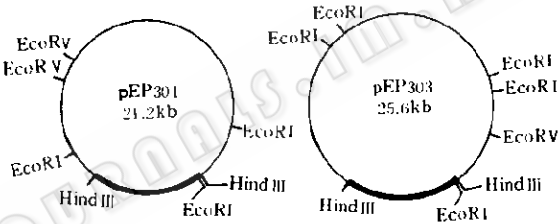


图 2 pEP301 和 pEP303 的限制酶图谱
粗线代表 pBR322 DNA, 细线代表 pNK866 的 Hind III 片段

2.2.3 pNK866 的限制酶图谱：从表 1 可知, Hind III 在 pNK866 DNA 的 EcoRI 片段 2 和片段 4 中各有一个切点,9.6kb 的片段 2 被切成 7.5kb 和 2.1kb 两个片段,5.5kb 的片段 1 被切成 4.5kb 和 1.0kb 两个片段。根据这些数据,把 pEP301 和 pEP303 中的两个来自于 pNK866 的 Hind III 片段连接起来,便得到 pNK866 质粒的 Hind III、EcoRI 和 EcoRV 三种酶 11 个切点的限制图(图 3)。该图谱为利用 pNK866 的复制区构建新的假单胞菌载体奠定了基础。

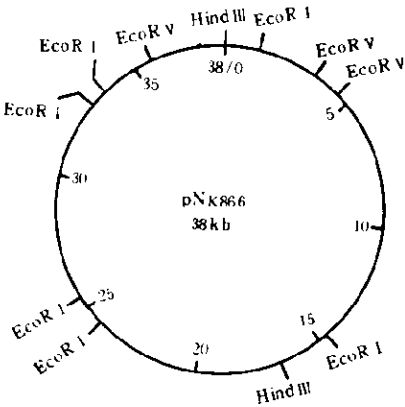


图 3 pNK866 的限制酶图谱

参考文献

- [1] 蔡宝立,等.微生物学通报,1987,14(4):180-184.
[2] Shell M A. *J Bacteriol*, 1983, 153:822-829.
[3] Franklin F C H. DNA Cloning, Glover D M ed. Washington DC: IRI Press, 1985.
[4] 高才昌,等.南开大学学报(自然科学),1983,1:100-103.
[5] 高才昌,等.遗传学报,1984,11(4):260-264.
[6] 蔡宝立,等.环境科学学报,1984,4(3):291-295.
[7] 蔡宝立,等.生物化学杂志,1986,2(4):49-57.
[8] Projan S J *et al.* *Plasmid*, 1983, 9:182-190.
[9] Giles K W *et al.* *Nature (London)*, 1965, 206:93.

COPY NUMBER DETERMINATION AND RESTRICTION MAP OF PLASMID pNK866

Gao Caichang Zhang Xulun Cai Baoli

Li Xiumin Qiao Mingqiang Zhang Xiuming

(Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The plasmid pNK866 was isolated from *Pseudomonas geniculata* AS1. 866. Restriction endonuclease analysis shown that the molecular size of pNK866 was 38kb. Copy number of the plasmid determined by fluorescence densitometry was seventy-six. The restriction map of pNK866 for the enzymes Hind III, EcoRI and EcoRV was established by restriction endonuclease analysis of the plasmid and its cloned Hind III fragments.

Key words *Pseudomonas geniculata*, Plasmid pNK866, Copy number, Restriction map