

用多寄主质粒 pSUP106 转化荧光假单胞菌 Pfx-18*

刘子铎 洪玉枝 汤江武 喻子牛

(华中农业大学农业微生物重点开放实验室 武汉 430070)

摘要 构建了荧光假单胞菌工程菌的转化系统,探索了多寄主质粒 pSUP 106 在不同 CaCl_2 浓度、不同热激时间和荧光假单胞菌受体在不同生长期的转化频率,建立了一个简便可行的荧光假单胞菌转化方法。结果表明,在荧光假单胞菌 Pfx-18 生长到 $0 D_{600} \approx 0.55$ 时,用 25 mmol/L CaCl_2 处理细胞,热激 2 min ,转化频率最高,可达 $10^5/\text{ng DNA}$ 。同时讨论了 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对转化频率的影响,以及电转化的效果,为进一步利用该转化系统进行异源基因的克隆与表达研究奠定了基础。

关键词 荧光假单胞菌,转化频率

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 为革兰氏阴性菌,是土壤和水微生物区系中的普遍成员,尤其在植物根际极为丰富,它繁殖快,生命力强,营养随便,能利用 60—80 种不同的有机化合物作为碳源和能源,荧光假单胞菌能在 $4-40^\circ\text{C}$ 范围内生长,抗逆能力强,对人、动物、植物无致病作用,有的菌株还有抗病能力^[1]。因此,一个简便易行,且效率高的转化系统对于研究异源基因在荧光假单胞菌中的克隆和表达不仅有一定的理论意义,而且有着极大的应用价值。但到目前为止,尚未看到使用于荧光假单胞菌转化系统的报道,不少学者采用接合方法通过带有 Mob 基因的质粒或转座子^[2,3]将遗传物质引入荧光假单胞菌细胞,但频率都不高,且普通质粒的转化受到限制。近几年来,一些学者用电场脉冲将遗传物质导入假单胞菌属的一些种,但未见有转化荧光假单胞菌的报道。鉴于荧光假单胞菌所处的生态地位和应用前景,我们利用多寄主质粒 pSUP106 对荧光假单胞菌 Pfx-18 进行了不同转化条件的摸索,建立了一个简便的转化方法,为进一步研究异源基因在荧光假单胞菌中的克隆与表达及荧光假单胞菌杀虫工程菌的构建奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒(见表 1)

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基: 10% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 10% NaCl, pH7.5。

1.2.2 KB 培养基: 0.5% 酪蛋白水解物, 0.25% 甘油, 0.25% KH_2PO_4 , 0.25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16% 琼脂粉, 3% 明胶。

1.2.3 选择培养基: 在上述培养基中加四环素,使终浓度为 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 。

* 国家自然科学基金资助项目。
本文于 1994 年 1 月 14 日收到。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株 Strains	性质 Character	来源 Source
荧光假单胞菌 Pfx-18 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfx-18	Tc ^r plasmid-Cm ^r	由华中农业大学王平博士提供 From Dr. Wang in Huazhong Agricultural University
大肠杆菌 TG1 <i>E. coli</i> TG1	thi ⁻ , strA, supE endA, sbcB, hsdR ⁻ Δ(Lacpro), F' traD36, proAB, Lac Iq, ΔM15	英国剑桥大学 Dr. D. Ellar 惠赠 From Dr. Ellar in Cambridge University U. K.
多寄主质粒 pSUP 106 Multi-host plasmid	MW 9.9kb TC ^r , Cm ^r	德国 Bielefeld 大学 Dr. UB Priefer 惠赠 From Dr. U. B. Priefer in Bielefeld University

1.3 质粒抽提^[4]

1.4 感受态细胞的制备和转化

从 KB 培养基中挑取荧光假单胞菌菌落接种到盛 10ml LB 的 250ml 三角瓶中, 于 28℃ 振荡培养过夜, 按 1% 接种量转接 LB 培养液中, 于 28℃, 240r/min 振荡培养摇至 OD₆₀₀ = 0.55, 置冰浴 10min, 以 4℃ 条件下 5000r/min 离心 5min, 将沉淀悬浮于预冷的 0.5 倍体积的 25mmol/L CaCl₂ 中, 取 0.2ml 分装于预冷的 Eppendorf 离心管中, 置冰浴 2—6h, 即可进行转化实验。涂皿后, 28℃ 培养 36h 计数转化子, 计算转化频率。

1.5 荧光假单胞杆菌 Pfx-18 的电转化

电转化参考文献[5]进行。首先将荧光假单胞菌在 LB 培养液中培养至 OD₅₄₀ = 0.3—0.5, 于 4℃ 条件下 5000r/min 离心收集细胞, 并悬浮于等体积的 300mmol/L 蔗糖溶液中, 同上离心, 再用 0.5 倍体积的 300mmol/L 蔗糖溶液洗一次, 同上离心, 最后悬浮在少许 300mmol/L 蔗糖溶液中(使细胞浓度为 10¹¹/ml) 置冰浴 30min, 加入 DNA 使终浓度为 2μg/ml, 混匀后注入电击杯中, 置冰浴 5min。然后在电容为 25UF、电阻为 400Ω、电压为 8kV/cm 条件下进行脉冲。脉冲后, 加 1ml LB 培养液, 于 28℃ 回复 3—5h, 涂抗性平板检测转化频率。

2 结果和讨论

2.1 不同 CaCl₂ 浓度对转化频率的影响

当采用处理大肠杆菌感受态细胞的 CaCl₂ 浓度 (50mmol/L 和 100mmol/L CaCl₂) 处理荧光假单胞杆菌细胞时, 在四环素平板上均无菌落形成, 即无转化子产生, 同时在 LB 非抗性平板上也无菌落出现, 说明浓度为 50mmol/L 或 100mmol/L 的 CaCl₂ 对荧光假单胞菌的生长有抑制作用, 这可能正是不能用常规转化方法对荧光假单胞菌进行转化的缘故。用不同浓度 CaCl₂ 处理荧光假单胞菌, 结果发现, 用 40mmol/L CaCl₂ 处理荧光假单胞菌时有转化子出现(见图 1, plate V), 但转化子很少, 用 25mmol/L CaCl₂ 处理时, 其转化频率最高(见图 2)。由此可见, CaCl₂ 处理不仅可使质粒 DNA 转化进入荧光假

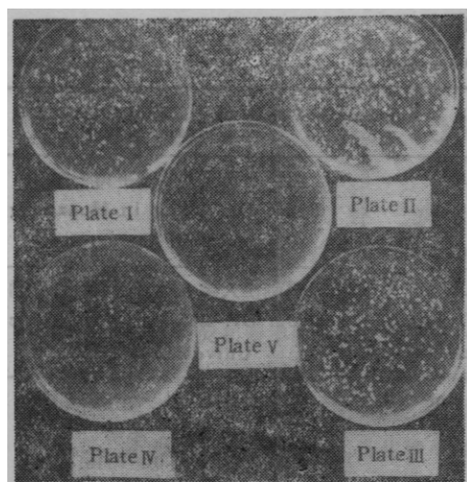


图1 不同 CaCl_2 浓度处理荧光假单胞菌感受态细胞的转化结果

Fig. 1 Transformation results of Pfx-18 treated with different concentration of CaCl_2 . 平板 I—V 的 CaCl_2 浓度分别为 20、25、30、40 和 50 mmol/L。

The CaCl_2 concentration of plates I—V are 20, 25, 30, 40 and 50 mmol/L, respectively.

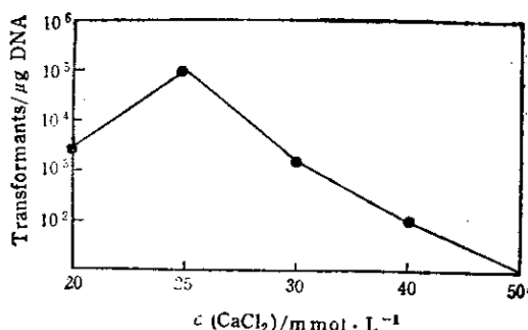


图2 不同浓度 CaCl_2 处理荧光假单胞菌的转化频率

Fig. 2 Transformation frequency of Pfx-18 treated with different concentration of CaCl_2 .

单胞菌,而且转化频率在最佳条件下可达 $10^5/\mu\text{gDNA}$ 。

2.2 不同生长时期的荧光假单胞杆菌对转化频率的影响

分别取不同培养时间的荧光假单胞菌 Pfx-18, 用 25 mmol/L CaCl_2 相同浓度处理进行转化实验, 结果表明在 $\text{OD}_{600} = 0.55$ 时转化频率最高。当 OD_{600} 大于或小于 0.55 时, 转化频率均表现为下降趋势(见图 3)。

2.3 CaCl_2 处理时间对转化频率的影响

感受态细胞用 25 mmol/L CaCl_2 悬浮后, 置于冰浴处理不同时间, 由图 4 可见, 冰浴时间 2—6 h, 转化频率呈上升趋势, 但随着时间延长, 转化频率不再提高, 这和大肠杆菌感受态细胞有很大的区别。

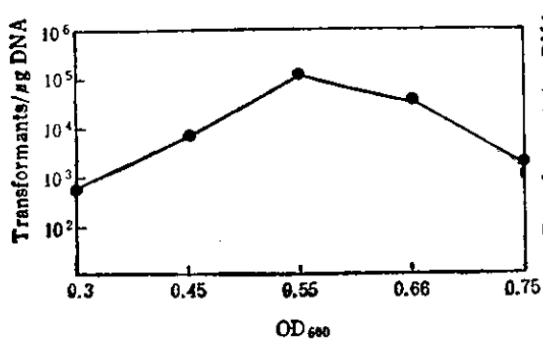


图3 不同生长时期荧光假单胞菌的转化频率
Fig. 3 Transformation frequency of Pfx-18 at different growth phase

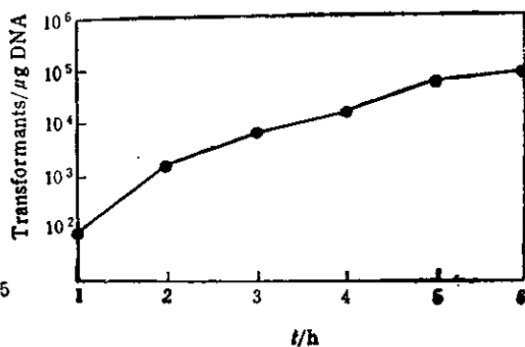


图4 CaCl_2 处理不同时间对转化频率的影响
Fig. 4 The effects of CaCl_2 incubation time on the transformation frequency of Pfx-18

2.4 不同热冲击温度和时间对转化频率的影响

本实验分别于 37℃ 和 42℃ 处理 2min, 发现经 42℃ 处理的转化频率比 37℃ 高, 在 42℃ 处理 2—4min 其转化频率较高, 但随着时间延长, 转化频率无上升趋势。

2.5 Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 离子对 Pfx-18 转化频率的影响

将 Pfx-18 受体菌在含有 Mg²⁺ 离子的培养基中进行培养, 对照受体菌在四环素平板上长满了菌, 这可能是 Mg²⁺ 对四环素具有拮抗作用的结果, 使得无法计算转化频率。至于 Mg²⁺ 离子对荧光假单胞菌的转化频率是否有促进作用, 需更换供体 DNA 用其它抗性谱予以选择证实。

据文献[6]报道, 用 45mmol/L MnCl₂ 代替 CaCl₂ 处理嗜麦芽假单胞菌, 能提高转化频率, 但用该浓度处理荧光假单胞杆菌 Pfx-18 时, 没有转化子出现, 说明 45mmol/L Mn²⁺ 对荧光假单胞杆菌的生长有抑制作用, 由此可见, 尽管荧光假单胞菌与嗜麦芽假单胞菌为同一属, 它们种间的生化差异是很大的。除此之外, 按前述方法同样用 pSUP106 作为供体 DNA 质粒对 Pfx-18 进行了电脉冲转化试验, 转化频率稍低于 CaCl₂ 法。再者, 电转化条件剧烈, 甚至影响到受体菌的生理生化特性。因此, 在一般条件下, 该法对荧光假单胞菌分子生物学研究具有一定的使用价值。

参 考 文 献

- [1] 彭于发, 陈善铭. 植物病理学报, 1990, 20(3): 229—233.
- [2] Bagdasarian M, Lurz R, Franklin F C H *et al*. *Gene*, 1981, 16:237—247.
- [3] Obukovoica M G, Perlak F J, Bolten S L *et al*. *Gene*, 1987, 51:91—96.
- [4] Manniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 90—91.
- [5] Smith A W, Lglewski B H. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17:10509.
- [6] 袁 斌, 沈 桦. 武汉大学学报, 1993, 1: 93—98.

TRANSFORMATION OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* WITH BROAD-HOST PLASMID pSUP 106

Liu Ziduo Hong Yuzhi Tang Jiangwu Yu Ziniu

(Laboratory of Agro-Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract In order to establish a transformation system for *Pseudomonas fluorescens*, different factors which effect transformation frequency of *Pseudomonas fluorescens* were tested. The result showed that transformation frequency could acheive 10⁵ cells /μg DNA when OD₆₀₀ of *Pseudomonas fluorescens* was 0.55 and the cells were treated with 25mmol/L CaCl₂ and heated for 2 minuts at 42℃. The effect of Mg²⁺ and Mn²⁺ on transformation frequency were also discussed. The system could be useful for the study of cloning and expression of heterologous genes in *P. fluorescens*.

Key words *Pseudomonas flourescens*, Transformation frequency