

球形芽孢杆菌的抗药标记及外源 DNA 的转化与表达

张培德 周 华* 吴 蓉

(复旦大学生物化学系 上海 200433)

摘 要 用亚硝基胍 (NTG) 对球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 进行化学诱变, 筛选到利福平 (Rif) 和链霉素 (Sm) 二个标记菌株。抗药浓度均达 100 μ / ml 培养基。其抗药性状能够获得较好地遗传。用含溶葡萄球菌酶基因的质粒 DNA 对 Rif^r 菌株进行原生质体转化, 酶基因在该抗药菌株中获得了高效表达。经摇瓶发酵试验, 溶葡萄球菌酶的活性约为 122 μ / ml 培养液。

关键词 球形芽孢杆菌, 诱变, 亚硝基胍, 溶葡萄球菌酶

分类号 Q522

基因的表达最终是在宿主细胞中实现的, 所以受体菌的研究一直是基因工程研究中的重要课题。标记工作就是其中一个内容。让宿主标记上遗传标记 (如营养标记和抗性标记), 使菌体带上抗性标记, 不但方便了筛选, 而且可以通过加入抗生素来防止受体菌培养和发酵生产中由于操作问题而可能引起的杂菌污染。球形芽孢杆菌是芽孢杆菌属中蛋白酶活性较低的一种^[1], 有可能成为一个理想的基因工程受体菌株。本文利用 NTG 对球形芽孢杆菌进行诱变, 使该菌标记上抗药标记, 与载体 DNA 上所带有的红霉素 (Em) 二个抗性标记, 更加有利于菌株的筛选和发酵生产的条件控制。经诱变, 筛选到二个链霉素和利福平的标记菌株。

溶葡萄球菌酶是个专一作用于葡萄球菌细胞壁的溶解酶, 尤其能作用于导致人类疾病且耐药的一类金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。实验结果表明, 该酶具有很强的杀菌作用^[2]。我们用含该酶基因的重组质粒转入利福平抗性菌株, 并且对转化方法及基因表达情况进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 DNA: 球形芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为本室保存菌, 载体 DNA 为本室构建的表达溶葡萄球菌酶基因的表达载体, 带有 Em 抗性基因。载体 DNA 和酶基因都来自于葡萄球菌。构建结果见文献 [3]。

1.1.2 试剂: NTG: Fluka 产品; 红霉素 (Em)、链霉素 (Sm)、卡那霉素 (Km)、氨苄青霉素 (Ap)、庆大霉素 (Gm)、氯霉素 (Cm)、四环素 (Tc) 和利福平 (Rif) 分别为上海第三、第四和五洲制药厂产品, 其他试剂均为分析纯或化学纯。

*生物化学系96届大学生。

收稿日期: 1996-06-17

1.1.3 培养基: VY 培养基含 2.5% 小牛肉膏粉, 1.0% 酵母粉; 原生质体转化用培养基和试剂 DM3、PAB、SMM 和 SMMP 参照 Chang 等人方法^[4]略作修改; CAA 培养基参照文献 [5] 方法制备。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的分离提纯: 含溶葡萄球菌酶基因的质粒 DNA 提取参照文献 [6] 方法进行, 总 DNA 提取参照文献 [7] 方法进行。

1.2.2 KNR-PG 底物: 参照文献 [8] 方法制备。

1.2.3 球形芽孢杆菌的抗药标记: 取已活化过夜的单菌落接种于 3 ml VY 液体培养基中, 于 37℃ 振荡培养过夜, 转接 1% 到新鲜培养液中, 振荡培养约 2.5 h, 待菌长到 $OD_{660} \approx 0.5$ 时, 吸取该菌液 0.2 ml 涂布在 VY 固体培养基上, 待水份吸收后, 挑取 5 mg NTG 固体放于涂有菌体的培养基上, 继续培养 20 h 左右。由于 NTG 溶解扩散于培养基有一个浓度梯度, NTG 浓度高的地方菌不长, 浓度低的地方长菌, 出现一个抑菌圈。挑取抑菌圈边缘的少量菌, 转入 VY 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜。

1.2.4 抗药标记菌株的筛选: 挑取一环经 NTG 处理后培养过夜的菌, 划线于含有 10 u/ml 的不同药物 (Sm、Rif、Ap、Cm、Km、Tc、Gm 和 Em 8 u/ml 平皿上。在药物平皿上长出的单菌落用作复筛。

1.2.5 抗药菌株的复筛: 挑取单菌落在不同药物浓度的平皿上点种传代, 最后挑取在最高药物浓度的平皿上生长、稳定传代且菌落形态好的诱变菌保存。

1.2.6 死细胞的制备: 金黄色葡萄球菌在 CAA 培养基上培养过夜, 然后以高压灭菌法灭活菌体, 离心后收集菌体, 4℃ 保存备用。

1.2.7 原生质体制备和质粒转化: 原生质体制备参照文献 [4] 方法略作修改。把丁二酸钠改为 0.3 mol/L, 用甘油代替葡萄糖, 所有转化培养基和试剂均含 2% 牛血清白蛋白, 在 PEG 6000 中同时加入 5×10^{-5} mol/L CaCl_2 。原生质制备时, 采用溶菌酶作用后的不同时间取样, 然后用 SMMP 稀释离心去除溶菌酶。用对 TE 透析过夜的质粒 DNA 进行转化。即接一环耐 Rif 100 u/ml 的菌株于含 Rif 20 u/ml (因出发菌株本身可耐 Sm 10 u/ml, 诱变后仍耐药, 在进行转化及其它研究时不再加入 Sm) 的 5 ml VY 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日转接 2% 菌种到含 Rif 20 u/ml 的 30 ml 液体培养基中, 振荡培养到 $OD_{660} \approx 0.8$, 然后离心, 菌体用 1 ml $2 \times \text{SMM}$ 悬浮, 再加等体积新鲜配制的溶菌酶, 使溶菌酶终浓度为 200 u/ml, 37℃ 保温 20 min 左右, 菌体基本上已呈现球状。用 10 ml SMMP 溶液稀释, 3000r/min 离心。原生质体加 0.5 ml SMM 悬浮, 加 5 μg 质粒 DNA 混匀, 立即加 1.5 ml PEG 6000, 滴管吹吸两次, 37℃ 作用 2 min, 立即加 10 ml SMMP 稀释。3000r/min 离心, 用 1 ml SMMP 悬浮原生质体, 然后 30℃ 慢摇 90 min, 分别吸取 0.15 ml 涂布于对照平皿和加了终浓度为 Em 8 μg /ml, Rif 20 μg /ml, 0.1% 死菌的再生平皿上, 室温放置 1 h 后再倒置培养至转化子长出。挑取水解死菌形成溶菌斑的转化子菌落, 在含不同浓度 Rif 和 Em 8 μg /ml 的平皿上划线供筛法, 挑取抗药浓度高且稳定的转化子进行摇瓶发酵试验。

1.2.8 质粒稳定性和溶葡萄球菌酶的测定: 参照文献 [8] 方法, 定时取发酵液离心, 测定酶与底物反应后释放的有色底物, 读出 OD_{595} 。从所作标准曲线查出发酵液的酶量。质粒稳定

性的测定是在平皿上点种一定数量的菌落,以直接观察其表达产物溶葡球菌酶水解死菌的溶菌斑为指标,鉴定质粒的丢失情况。

2 结果和讨论

2.1 抗药标记

球形芽孢杆菌经 NTG 化学诱变前后对抗生素的耐药情况示于表 1。

从表 1 可知,球形芽孢杆菌在诱变前只对 Sm 具有抗性。经 NTG 诱变后,在不抗 Rif 的球形芽孢杆菌中出现了 Rif^R菌株,经反复筛选得到耐 Rif 浓度达 100 u / ml 的菌株。另外诱变前的球形芽孢杆菌虽然抗 Sm,但最高浓度仅为 10 u / ml,经过 NTG 诱变,结果出现抗 Sm 终浓度为 100 u / ml 的抗性菌株。

表1 NTG诱变后的结果
Table 1 Results of NTG mutagenesis

抗生素* Antibiotic	Em	Sm	Cm	Rif	Gm	Km	Tc	Ap
诱变前 Before mutation	-	+	-	-	-	-	-	-
诱变后 After mutation	-	+	-	+	-	-	-	-

* Em, 8u/ml; the others, 10u/ml.

2.2 原生质体转化

球形芽孢杆菌的转化在有关芽孢杆菌受体菌的转化中是较困难的一种^[4,9,10]。不同的球形芽孢杆菌有不同的转化效率,有的球形芽孢杆菌,如 AS 1,929 用质粒 DNA 进行原生质体转化尚未获得成功^[9]。Karen 等人在进行原生质体转化 *B. sphaericus* 1593 时发现,不同来源的质粒 DNA 产生不同的转化效率,*B. sphaericus* 来源的质粒 DNA 其转化效率是非 *B. sphaericus* 来源的质粒 DNA 的 10⁴ 倍。本文用诱变后的 Rif^R菌株,采用常规原生质体进行转化,成功率极低。于是,我们参照其他研究者的方法^[9~10],对转化培养基作了某些修改(见方法 7)。从结果看转化获得了成功,但转化效率还很低。经反复试验,转化成功率和转化频率仍然较低,通常为 10 个转化子 / μg 质粒 DNA。通过对出发菌株采用修改后的转化方法进行比较研究,得到类似的结果。Decastro-Costa 等人^[11]认为,转化不能成功的原因,可能是有些细菌菌株存在一种自溶酶,从而抑制了细胞壁的再生。

2.3 转化子与受体菌总 DNA 的比较

将原生质体转化获得的转化子和受体菌按文献 [7] 方法进行总 DNA 的抽提,并进行琼脂糖凝胶电泳。结果见图 1。

转化子总 DNA (3) 中包含有受体菌染色体 DNA 和质粒 DNA,而受体菌总 DNA (2) 中除染色体 DNA 外没有质粒 DNA 的存在,说明转化子中质粒 DNA 来自外源质粒 DNA (1),由此说明转化获得了成功。

2.4 溶葡球菌酶基因的表达

2.4.1 溶葡球菌酶基因在固体培养基上的表达:载体进入受体系统后,载体上的基因能否在该受体系统中获得高效稳定地表达,则受到多种因素的影响。为验证该基因的表达情况,我们把转化子单菌落点种在 Rif 20 u / ml 和 0.1% 死菌的固体 VY 平皿上,于 37℃ 培养过夜。结果见图 2。

图 2 显示,平皿上菌落 1、2 周围出现的透明斑表明有基因表达产物——溶葡球菌酶分解其底物死菌形成的溶菌斑。而菌落 3、4 没有类似的溶菌斑。结果表明酶基因在该菌中

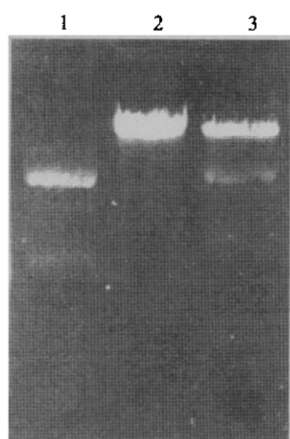


图1 总DNA的电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoretic pattern of total DNA

1. 转化用质粒 DNA Plasmid DNA for transformation;
2. 受体菌总 DNA Total DNA of recipient strain;
3. 转化子总 DNA Total DNA of transformant.

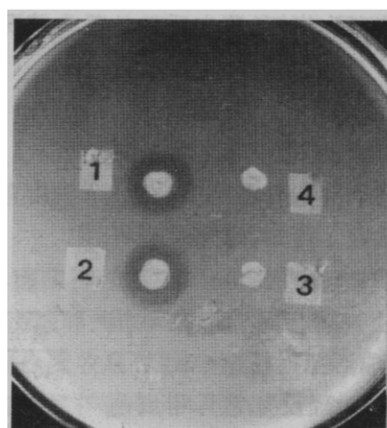


图2 溶葡萄球菌酶在VY平皿上的测定

Fig.2 Assay for lysostaphin on VY agar plate

- 1,2. 转化子 Transformant;
- 3,4. 受体菌 Recipient strain.

可以获得表达。

2.4.2 溶葡萄球菌酶基因在液体培养基中的表达:转化子活化后,挑取单菌落于 3ml VY 液体培养基中(Em 8 u / ml, Rif 20 μ g / ml),振荡培养过夜,次日转接 1% 于 50 ml VY 培养液中扩大培养,条件同前。定时取样,测定酶活性。结果见表 2。

表2 溶葡萄球菌酶的产酶过程

Table 2 The time course of lysostaphin production

时间 Time (h)	OD ₅₉₅							
	2	4	6	8	10	12	14	16
转化子 Transformant	0.068	0.167	0.257	0.263	0.285	0.349	0.399	0.377
受体菌 Recipient strain	0.018	0.035	0.016	0.043	0.015	0.042	0.032	0.087

表 2 显示,转化子在液体培养基中,同样具有分泌溶葡萄球菌酶的能力。发酵 4 h 左右,溶葡萄球菌酶开始分泌,到 14~16 h 时,酶活性达到最高。与 Sigma 产品制作的标准曲线比较,溶葡萄球菌酶的活性约为 122u / ml 培养液。而受体菌不表现酶活性,与诱变前的 *B. sphaericus* 转化子比较,结果无明显差别。

2.5 转化子的稳定性

Rif^r转化子在只有 Rif 和 0.1% 死菌,无 Em 的平皿上传代 30 代左右,非常直观地看到所有菌落都有分解死菌的溶菌斑,表明质粒没有丢失。继续传代,出现个别无溶菌斑的菌落,质粒的丢失率在 1% 以内。并发现质粒的丢失不随传代数的增加而增加。我们所用的质粒 DNA 和酶基因都是来自葡萄球菌,可能取自该葡萄球菌的载体 DNA 比较适应 *B. sphaericus* 的生理条件,所以比较稳定。质粒 DNA 的偶尔丢失很可能与培养条件的变化有关。Rif^r转化子在含有 Em 8u / ml、Rif 40u / ml 和 0.1% 死菌的药物平皿上传代达 60 代,全部菌落都有分解死菌的溶菌斑,表明该质粒 DNA 在 Rif^r菌株中是十分稳定的。液

体培养中也没有发现质粒 DNA 的丢失。这种稳定性对于分子克隆受体系统来说是非常重要的, 同样也有利于发酵生产。把转化子重新放回含 Rif 100u / ml, Em 8u / ml 和 0.1% 死菌的平皿上生长, 所有的点种菌落都能成活, 并有水解死菌的溶菌斑, 表明了筛选到的抗药菌株的耐药性状能够较好的遗传下去。

致谢 杨庆云老师参加诱变工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 宋大新, 范长胜, 徐德强, 等. 微生物实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1993. 234.
- [2] 周润琦, 马力, 张培德, 等. 生物化学杂志, 1993, 9(3): 358~363.
- [3] 张培德, 杨 军, 邵旭光, 等. 工业微生物, 1989, 19(6): 1~6.
- [4] Chang S S, Cohen S N. *Mol Gen Genet*, 1979, 168: 111~115.
- [5] Robinson J M, Hardman J K, Sloan G L. *J Bacteriol*, 1979, 137: 1158~1164.
- [6] 汤乃梅, 王晓民, 韩济生. 生命的化学, 1995, 15(3): 41.
- [7] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981. 232.
- [8] Zhou Runqi, Chen Shigen, Recsei P. *Anal Biochem*, 1988, 171(1): 141~146.
- [9] 陈乃用, 印小明. 微生物学报, 1986, 26(2): 134~142.
- [10] 郭兴华, 贾士芳, 陈乃用, 等. 微生物学报, 1982, 22(3): 263~268.
- [11] DeCastro-Costa M R, Landman O E. *J Bacteriol*, 1977, 129: 678~689.

SELECTION OF DRUG-LABELLED *BACILLUS SPHAERICUS* AND STUDIES ON TRANSFORMATION AND EXPRESSION OF FOREIGN DNA

Zhang Peide Zhou Hua Wu Rong

(Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract NTG was used to make chemical mutation for *Bacillus sphaericus*, Rif^R and Sm^R labelled strains were selected, which could resist drug as much as 100 u / ml. The resistance to drug was stably inherited. The Rif^R strain was used as recipient and the plasmid containing the lysostaphin gene was transferred into it by protoplasts. Results showed that the lysostaphin gene could be expressed stably at high level in *Bacillus sphaericus* and the lysostaphin activity was about 122 u / ml medium after shaking culture.

Key words *Bacillus sphaericus*, Mutation, NTG, Lysostaphin