

质粒 RSF1010 从大肠杆菌到稀有放线菌头状链轮丝菌和星状诺卡氏菌的接合转移*

李维泉 沈美娟 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所微生物次生代谢分子调控研究开放实验室 上海 200032)

赵国屏

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

关键词 接合转移, 质粒, 稀有放线菌

分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0376-80

1987 年, Trien-Cuot 等人^[1]证明穿梭质粒可以在革兰氏阴性的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和多种革兰氏阳性细菌之间发生接合转移。在这种转移中质粒需具备大肠杆菌的复制起始位点, 同时又具备革兰氏阳性细菌的广宿主范围复制起始位点。转移作用依赖于顺式作用(cis-acting)的转移起始位点(oriT)又依赖于 IncP 群质粒 RP4 以反式方式(trans)提供的转移基因(tra)的转移功能^[2]。此后, 许多研究者利用体外构建的类似的穿梭质粒, 证明了接合转移可以在分类学上亲缘关系遥远的生物中发生^[2-4]。这些研究中最好的例子是将质粒从浓杆菌转移到烟草植物细胞中^[5], 以及将穿梭质粒从大肠杆菌转移到酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中^[6]。1991 年, Davies 实验室证明了大肠杆菌的天然质粒 RSF1010 可以通过接合转移到变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中, 并稳定遗传^[7]。本文报道, 大肠杆菌的天然质粒 RSF1010 能通过接合转移到稀有放线菌—头状链轮丝菌(*Streptoverticillum caespitosus*) ATCC27422 和星状诺卡氏菌(*Nocardia asteroides*) 3927 中去, 并获得稳定的遗传。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养条件 本研究所用到的菌株和质粒列于表 1。大肠杆菌的培养基为 LB, 培养温度为 37℃。头状链轮丝菌 ATCC27422 和星状诺卡氏菌 3927 的液体培养基为 YEME^[8]或 148G^[9], 固体培养基为 R2YE^[8]或本氏培养基^[10], 培养温度为 30℃, 孢子和菌丝体的处理方法参照文献[7, 8]。培养基中抗生素的含量为, 链霉素: 20μg/mL, 蔡淀酮酸: 40μg/mL。

1.2 主要药品来源 限制性内切酶, Prime-a-gene Labling System, T4DNA 连接酶购自 Promega 公司, 抗生素和常用药品购自华美生物工程公司, [α -³²P]dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司。

1.3 接合过程

参考文献[5~7]进行。

1.4 DNA 提取 将头状链轮丝菌的接合子的孢子以及星状诺卡氏菌接合子的菌丝体接种在含链霉素和蔡淀酮酸的 YEME 液体培养基中, 分别培养 48h 及 36h, 收集菌丝体, 然后按照文献[7, 8]的方法抽提两种菌的总 DNA。一般 DNA 操作按文献[11]的方法进行。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39630010)

收稿日期: 1997-09-08, 修回日期: 1998-03-02

1.5 限制性酶切分析和 Southern 印迹分析^[7,8,11]

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	基因型	来源或文献
大肠杆菌 HB101	<i>supE44 hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara - 14</i>	[11]
大肠杆菌 DH5α	<i>ProA lacY1 galK2 rpsL20 xy1-5 mt1-1</i> <i>supE44 lacU169 hsdR17 recA1 endA1</i>	[11]
大肠杆菌 S17.1	<i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	[7]
变铅青链霉菌 TK54	大肠杆菌 294 整合了 RP4 <i>tra</i>	[8]
头状链轮丝菌 ATCC27422	<i>His-2 Leu-2 spe-1</i>	ATCC
星状诺卡氏菌 3927	野生型	本实验室
头状链轮丝菌 ATCC2742/RSF1010	<i>Str^r Sul^r</i>	本研究
星状诺卡氏菌 3927/RSF1010	<i>Str^r Sul^r</i>	本研究
变铅青链霉菌 TK54/RSF1010	<i>Str^r Sul^r</i>	本研究
大肠杆菌质粒 RSF1010	<i>oriT Mob⁺ Str^r Sul^r</i>	[7]

2 结果和讨论

2.1 RSF1010 通过接合从大肠杆菌 S17.1 转移到头状链轮丝菌 ATCC27422 和星状诺卡氏菌 3927

配对接合转移及接合子的选择方法,参照文献[5~7]进行。大肠杆菌 S17.1/RSF1010 和头状链轮丝菌 ATCC27422 接合 6~10d 后,在链霉素抗性选择平板上,可以得到可能的

表 2 RSF1010 从大肠杆菌到头状链轮丝菌和星状诺卡氏菌的转移

大肠杆菌供体和质粒	受体菌及转移频率			接合子抗性
	头状链轮丝菌	星状诺卡氏菌	变铅青链霉菌	
S17.1(RSF1010)	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	<i>Str^r Sul^r</i>
HB101(RSF1010)	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	<10 ⁻⁹	无

接合子。计算接合频率的结果见表 2。大肠杆菌 S17.1/RSF1010 和星状诺卡氏菌 3927 滤膜上的配对,其抗性接合子出现的频率比头状链轮丝菌高一个数量级。在对照实验中,供体菌为普通的大肠杆菌 HB101/RSF1010,其染色体上缺乏 RP4 编码的转移功能基因,在抗性平板上没有得到接合子。同时,将大肠杆菌 S17.1/RSF1010 和变铅青链霉菌 TK54 配对接合,作为阳性对照—在抗性平板上能以较高频率获得接合子,约 10⁻⁶。头状链轮丝菌,星状诺卡氏菌和变铅青链霉菌 TK54 的自发突变株的产生频率均低于 10⁻⁹。

为证实 RSF1010 确实存在于接合子中,抗性菌落先在抗性选择培养基中重复多次单菌落培养,纯化抗性稳定的接合子。从稳定期的接合子菌丝体中提取总 DNA。总 DNA 经限制性内切酶 *EcoRI* 或 *EcoRV* 切割,琼脂糖凝胶电泳分离和 Southern 转移到尼龙膜上;然后,用³²P 标记的来自大肠杆菌的 RSF1010 的 *EcoRV* 片断作探针进行杂交,放射性自显影表明 RSF1010 确实存在于新的宿主中(图 1),将变铅青链霉菌 TK54 的接合子作为阳性对照,也能得到阳性杂交带,未经接合的受体菌(负对照)没有杂交带出现(图 1)。

由于 RSF1010 在放线菌中的拷贝数很低,难以从琼脂糖凝胶带上观察到明显可见的大小一致的条带。除了从 Southern 杂交带来证明接合子以外。还可用从头状链轮丝菌和星状诺卡氏菌中分离得到的总 DNA 去转化大肠杆菌 DH5α,结果得到了具有链霉素抗性(*Str^r*)和磺胺抗性(*Sul^r*)的转化子。从这些转化子分离提取的质粒,经用 *EcoRI* 和 *EcoRV* 酶切分析,其大小和原始的 RSF1010 是一致的(图 2)。这进一步说明 RSF1010 是通过接合作用转移到了头状链轮丝菌和星状诺卡氏菌中。

2.2 RSF1010 在接合子中的稳定性

为确定质粒在两种放线菌中的稳定性,将接合子在没有抗生素的本氏培养基上,单菌落传代至少五

代。然后将大量菌落转至含有链霉素和磺胺的平板上培养,没有发现有抗性丧失的菌落。随机选择单菌落培养,提取其总 DNA,转化大肠杆菌 DH5 α ,再从中提取质粒,经酶切分析与 RSF1010 是一致的。

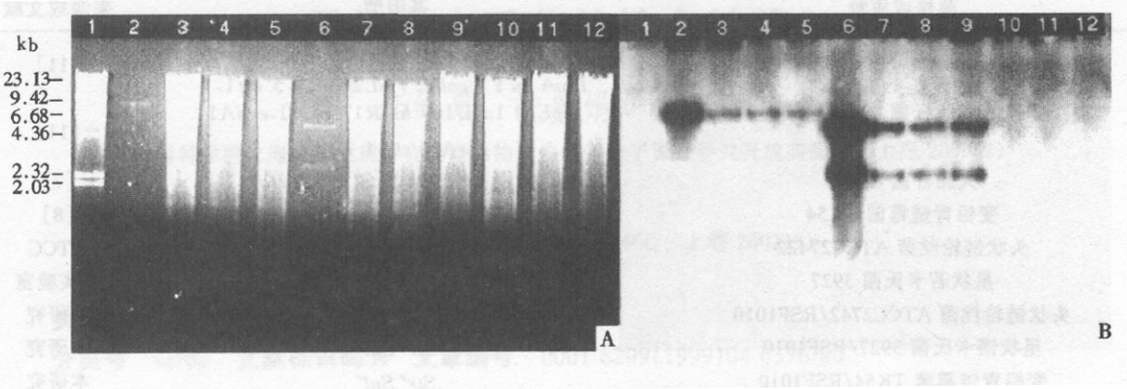


图 1 大肠杆菌与放线菌接合子的 RSF1010 的 Southern 印迹杂交分析

A:DNA 的琼脂糖凝胶电泳图 B:DNA southern 印迹杂交图。

2~5.DNA/*Eco*RI;6~12.DNA/*Eco*RV。2~5 和 6~9 的顺序依次为大肠杆菌 SI7.1RSF1010 的质粒 DNA,星状若卡氏菌 3927/RSF1010 接合子总 DNA,头状链轮丝菌 ATCC27422/RSF1010 接合子总 DNA,变青铅链霉菌 TK54/RSF1010 接合子总 DNA。10~12 分别为星状诺卡氏菌 3927,头状链轮丝菌 ATCC27422 和变青铅链霉菌 TK54 总 DNA 的负对照;1 为细菌噬菌体 λ DNA 的内切酶 *Hind* III 酶切产物作为分子量大小标准。

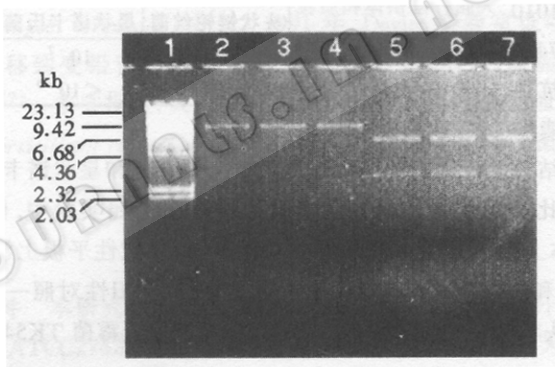


图 2 放线菌 RSF1010 接合子总 DNA 的大肠杆菌转化子的质粒内切酶 *Eco*RI 和 *Eco*RV 酶切分析
2~4 为 *Eco*RI 酶切;5~7 为 *Eco*RV 酶切。2 和 5 为供体菌大肠杆菌 SI7.1 的质粒 RSF1010;3 和 6 为以星状诺卡氏菌 3927/RSF1010 接合子总 DNA 转化的大肠杆菌 DH5 α 转化子的质粒;4 和 7 为以头状链轮丝菌 ATCC27422/RSF1010 接合子总 DNA 转化的大肠杆菌 DH5 α 转化子的质粒;1 为细菌噬菌体 λ DNA 的内切酶 *Hind* III 酶切产物作为分子量大小标准。

2.3 RSF1010 在大肠杆菌中的稳定性

在本研究中,发现 RSF1010 在部分大肠杆菌中有不稳定的现象,即在大肠杆菌 HB101 和 DH5 α 中有两种形式的质粒存在。从这两株菌中提取的质粒 DNA,用 *Eco*RI 酶切,经琼脂糖凝胶电泳,出现两条带。一条是与 RSF1010 大小一致的,另一条则与酶切与否无关,酶切前后都在同一位置出现的条带,大小约为 2.3kb(图 3A)。分别回收这两条带,各自用连接酶连接后,转化 DH5 α ,在链霉素抗性平板上选择转化子,仅有经连接的大的条带得到了转化子。从中提取质粒,酶切分析,证明它们是与 RSF1010 大小相一致的。在部分转化子中又出现了额外的另一条小带,大小仍为 2.3kb。因此,RSF1010 有可能发生了缺失,为证明这小的条带来自于 RSF1010 发生缺失后保留下来的基本复制单位,进行了 DNA 的 Southern 印迹杂交实验,探针为 RSF1010 经 *Eco*RI 酶切的大小约为 8.7kb 的片断,并经 P-³²标记,结果

表明小的带来自 RSF1010(图 3B)。

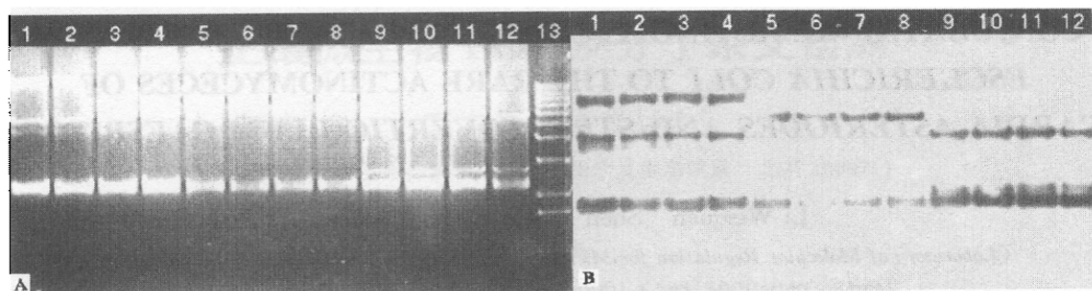


图 3 放线菌 RSF1010 接合子总 DNA 的大肠杆菌转化子的
质粒的 Southern 印迹杂交分析

1、5、9 为大肠杆菌 S17.1/RSF1010 中提取的质粒;2、6、10 为星状诺卡氏菌 3927/RSF1010 接合子总 DNA 大肠杆菌 DH5 α 转化子中提取的质粒 DNA;3、7、11 为头状链轮丝 ATCC27422/RSF1010 接合子总 DNA 大肠杆菌 DH5 α 转化子中提取的质粒 DNA;4、8、12 为变青铅链霉菌 TK54/RSF1010 接合子总 DNA 大肠杆菌 DH5 α 转化子中提取的质粒 DNA。5~8 的质粒 DNA 经 *Eco*RI 酶切;9~12 的质粒 DNA 经 *Eco*RV 酶切;13.1K 了 DNA 作为分子量大小标准。

本研究成功地将广宿主范围的大肠杆菌质粒 RSF1010 通过接合转移到稀有放线菌头状链轮丝菌和星状诺卡氏菌中。头状链轮丝菌是重要的抗肿瘤抗生素丝裂霉素的产生菌,而诺卡氏菌在许多方面也有重要的经济用途,如菌体的生物转化等。建立它们的遗传操作体系是对它们进行分子水平的研究不可缺少的。RSF1010 为这一目的提供了很有力的工具。接合转移是一种与通常使用的原生质体转化方法相比,既操作简单又高效率的方法。因此将 RSF1010 改造成能用在头状链轮丝菌和诺卡氏菌中进行遗传操作的载体是可行的。虽然质粒 RSF1010 在大肠杆菌中有缺失现象的发生,但这样并不影响构建新的载体,同时为确定其基本必需的复制子提供了方便。总之,这一实验为构建在两个重要的放线菌属中进行分子操作的遗传工具,进行了有意义的探索。

参 考 文 献

- [1] Trien-Cuot P, Carlier C, Martin P *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1987, **48**: 289~294.
- [2] Clewell D B. *Bacterial Conjugation*, New York: Plenum Press, 1993.
- [3] Schafer A, Klinowski J, Simon R *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**: 1663~1666.
- [4] Mazodier P, Petter R, Thompson C. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 3583~3585.
- [5] Buchanan-Wollaston V, Passiatore J E, Cannon F. *Nature*, 1987, **328**: 172~175.
- [6] Heinemann J A, Sprague G F. *Nature*, 1989, **340**: 205~209.
- [7] Gormley E P, Davies J. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 6705~6708.
- [8] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces: A laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.
- [9] Schupp T, Disvers M. *FEMS Microbiol Lett*, 1986, **36**: 159~162.
- [10] 李维泉,姚鹤鸣,沈美娟等.病毒学报,1998, in press.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [12] Sherzinger E, Bagdasarian M M, Scholz P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **84**: 654~658.
- [13] Scholz P, Haring V, Sherzinger E *et al.* *Gene*, 1989, **75**: 271~288.

CONJUGATIONAL ACTINOMYCETES OF PLASMID RSF101 FROM *ESCHERICHIA COLI* TO THE RARE ACTINOMYCECES OF *NOCARDIA ASTERIOIDES* AND *STREPTOVERTICILLUM CAESPITOSUS**

Li Weiquan Shen Meijuan Jiao Ruishen

(Laboratory of Molecular Regulation for Microbial Secondary Metabolism, Shanghai Institute
of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Zhao Guoping

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract RSF1010 is a naturally occurring *Escherichia coli* broad host-range plasmid about 8.7 kb in size. It can be mobilized at high frequency between different gram-negative bacterial species when transfer functions are available in *trans*. Following the pioneering work of conjugational transfer of RSF1010 from *E. coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*, the transfer of this plasmid by conjugation from *E. coli* S17.1 to two gram-positive rare actinomycetes, *Nocardia asteroides* 3927 and *Streptoverticillum caespitosus* ATCC27422 was first time reported in this study. Southern blot analysis of the total DNA extracted from the actinomycetes' exconjugants proved that RSF1010 had been transferred from *E. coli* into the two new hosts and maintained stably in the exconjugants. Meanwhile, partial deletions of RSF1010 replicon losing its antibiotics resistance markers were readily detected in *E. coli*. The implementation of this observation was discussed.

Key words Conjugational transfer, Plasmid, Rare actinomycetes

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39630010)