

酸性和碱性土壤新分离的放线菌中线型和环型质粒的检测

代玉梅, 周敏, 覃重军*

(中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 从湖南、云南采集的 19 份酸性土壤样品分离到 50 株放线菌, 在 pH4.5 和 pH7.0 的培养基上都能生长。从新疆、青海、云南的 14 份碱性土壤样品中分离到 38 株放线菌, 在 pH10.0 和 pH7.0 的培养基上均能生长。因此, 这些菌株属于中度嗜酸或中度嗜碱放线菌。利用脉冲电泳技术和普通凝胶电泳在其中 12 株放线菌中检测到线型质粒, 其中 3 株放线菌中检测到环型质粒。这是首次在中度嗜酸和中度嗜碱的放线菌中报道线型和环型质粒。

关键词: 中度嗜酸放线菌; 中度嗜碱放线菌; 线型质粒; 环型质粒

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 02-0244-03

极端环境微生物由于其所处极端的生态环境而具有独特的生理、适应机制、基因和代谢产物, 是一类具有很大潜力的生物资源, 如嗜酸微生物可用于金属的回收和脱硫, 嗜碱微生物产生的蛋白酶可用于洗涤剂工业^[1]。

放线菌类群是革兰氏阳性细菌中的一个族群。放线菌引人注目的特点是产生了自然界发现的约 8700 种抗生素和生理活性物质, 以及具有复杂的发育分化周期。近年来, 国内外学者从热、冷、酸、碱、盐等极端环境中分离到一些放线菌。检查可能存在的内源质粒以及发展遗传操作系统是开发这些宝贵的极端放线菌资源的重要步骤, 目前, 对极端环境放线菌内源质粒的研究尚未见报道。

与大多数细菌不同, 在放线菌中发现了许多线型结构的质粒, 大小在 12~1700 kb^[2]。研究表明, 放线菌中的链霉菌线型质粒具有独特的端粒序列和新颖的 DNA 复制机制^[3, 4]。目前, 在链霉菌之外的稀有放线菌中也发现了一些线型质粒, 但是在极端环境放线菌中尚未见报道线型质粒。这里, 我们报道从新疆、云南、青海、湖南的碱性和酸性土壤中分离到 88 株放线菌, 并对其内源线型和环型质粒进行了检

测, 发现其中 12 株存在线型质粒, 3 株存在环型质粒。

1 材料

1.1 材料

1.1.1 培养基: 分离嗜酸性和嗜碱性菌株用的固体培养基分别为 YMS (每升含有麦芽膏 10 克, 可溶性淀粉 4 克, 酵母膏 4 克, 琼脂 20 克, pH 调至 4.5) 和 SC (每升含有可溶性淀粉 10 克, 酪蛋白 0.3 克, NaCl 0.5 克, KNO₃ 2 克, MgSO₄·7H₂O 0.05 克, K₂HPO₄·3H₂O 2 克, CaCO₃ 0.02 克, FeSO₄ 0.05 克, 琼脂 20 克, pH 调至 10.0)。检测菌株是否可以在 pH 中性环境上生长的固体培养基为高氏一号 (每升含有可溶性淀粉 20 克, KNO₃ 1 克, K₂HPO₄ 0.5 克, MgSO₄ 0.5 克, NaCl 0.5 克, FeSO₄ 0.01 克, 琼脂 20 克, pH 调至 7.0), 液体培养基为胰酪豆汤 (每升含有 Oxoid 的胰酪豆汤粉 30 克, pH 调至 7.0)。培养温度为 30 。

1.1.2 主要试剂和仪器: 高保真 DNA 多聚酶 pfu、低熔点琼脂糖购自于上海生工生物工程技术有限公司; PCR 产物回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 其它生化试剂和抗生素均为进口或国产生化或分析纯级。

基金项目: 国家自然科学基金(30325003, 30770045, KSCX2-SW-329-3, KSCX2-YW-G-014)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

作者简介: 代玉梅(1976-), 女, 辽宁沈阳人, 在读博后, 主要从事放线菌分子遗传学研究。E-mail: daysindy@hotmail.com

收稿日期: 2007-07-24; 修回日期: 2007-11-20

脉冲电泳仪器为 Bio-Rad 公司 CHEF DRIII 型。

1.2 样品的采集、菌株分离和鉴定

从湖南省、云南省、新疆、青海省采集土壤样品共计 33 份(详见表 1), 测定了土壤的 pH 值。样品经稀释涂布固体培养基平板, 30 °C 培养 1~2 周。根据菌落培养特征进行初步分离和纯化, 根据产生的基质菌丝与气生菌丝的形态结构初步鉴定其为放线菌^[5]。对

于检测到质粒的菌株, 应用原核生物 16S rDNA 序列保守区段设计引物 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-TCAGGCTACCTGTGTTACGACTT-3') 对其进行 PCR 扩增和序列测定(在上海英骏生物技术有限公司(Shanghai Invitrogen Biotech Co. Ltd)完成), 通过 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 的 Blastn 程序进行核苷酸的序列对比, 确定到属下分类单元(见表 1)。

表 1 样品来源与分离的菌株

Table 1 Sample sources and isolated strains

Character of soil	Source	Medium	Number of sample	Number of isolated strains
pH5.4	Yongxing vanadium district, Hunan province (湖南)	YMS(pH4.5)	12	26
pH6.0	Lancang county, Yunan province (云南)	YMS(pH4.5)	7	24
pH8.9	Yuepu lake, Weili county, Xinjiang (新疆)	SC (pH10.0)	10	28
pH9.0	Yuxi, Yunan province (云南玉溪)	SC (pH10.0)	1	6
pH9.0	Xining, haiyan, guide, Qinghai province (青海)	SC (pH10.0)	3	4

1.3 放线菌线型质粒和环型质粒的检测

线型质粒的检测利用 Kieser 等^[6]的脉冲电泳方法, 稍做简化如下: 将菌丝体悬浮于 TE25S 溶液中 (0.3mol/L 蔗糖, 23mmol/L TrisHCl pH8.0, 25mmol/L EDTA pH8.0), 加入等体积的 2% 低熔点琼脂糖溶液, 混合液注入胶块模具, 放入 4 °C 冰箱 15min。将凝固的胶块推入溶菌酶溶液 (2 mg/mL 溶菌酶溶解在 TE25S), 37 °C 2h 后转入 1% NDS 溶液 (十二烷基肌氨酸钠溶于 0.5mol/L EDTA pH8.0), 加入蛋白酶 K 至终浓度 200 µg/mL, 于 50 °C 处理 24h。然后用 TE10 溶液 (10mmol/L TrisHCl, 10mmol/L EDTA, pH8.0) 洗涤 3 次, 每次 1h。将胶块放入 1% 脉冲电泳琼脂糖胶的样品槽中, 对于大的质粒脉冲时间 50~90 秒, 电压 6v/cm, 总时间为 22h; 对于小的质粒用 1~25s 的脉冲时间进行电泳。环型质粒的检测是根据 Kieser 等^[6]的碱变性方法抽提后进行普通凝胶电泳。

份碱性土壤样品中, 共获得具有典型放线菌培养特征的 38 株菌(表 1)。除了在 SC(pH10) 的固体培养基上生长外, 这些放线菌均能在 pH 中性的 G1 号固体培养基和胰酪豆汤液体培养基中生长。

2.2 新分离菌株的内源线型和环型质粒的检测

为了检测新分离到的嗜酸和嗜碱放线菌是否存在内源质粒, 利用脉冲电泳技术检测线型结构的质粒或染色体, 利用碱变性方法抽提环型质粒(见材料与与方法)。在部分中度嗜酸放线菌(图 1-A)和中度嗜碱放线菌(图 1-B)中可以检测到大的线型质粒和线型染色体(L-Chr)。在 88 株放线菌中总计有 12 株(约 14%)检测到线型质粒(表 2), 通过与已知大小的环型 DNA 对照进行同步的凝胶电泳, 发现 3 个菌株存在环型质粒(图片未列出)。对这些含有内源质粒的菌株进行 16S rDNA 的测序, 发现与链霉菌属的不同种高度相似(>97%), 因此均归于链霉菌属。

2 结果

2.1 从酸性和碱性土壤中分离和鉴定放线菌菌株

重金属污染土壤大多属于酸性土壤, 云南许多林地、耕地土壤也属于微酸性土壤。从湖南永兴的铅矿区和云南澜沧县林地采集的 19 份酸性土壤样品中, 共计获得 50 株放线菌(表 1)。除了在 YMS 平板上生长外, 这些菌株在 pH 中性的 G1 号固体培养基和胰酪豆汤液体培养基中也可以较好生长。

我国新疆、云南等省份有许多碱性温泉、湖泊和大量的盐碱土壤。从新疆尉犁县、岳普湖、云南省玉溪市、青海省西宁市、海宴、贵德等地采集的 14

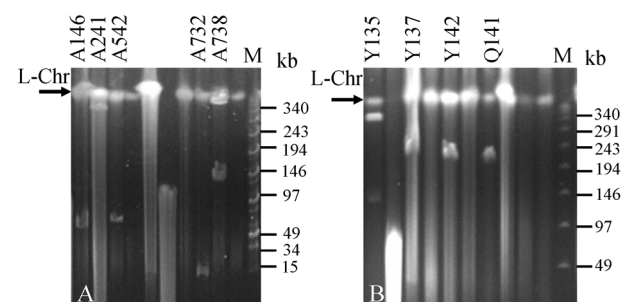


图 1 利用脉冲电泳检测部分中度嗜酸放线菌(A)和中度嗜碱放线菌(B)中的线型质粒

Fig. 1 Detection of linear plasmids of the moderately acidophilic (A) and moderately alkalophilic (B) actinomycetes strains. M: DNA size marker; L-Chr: linear chromosome.

表 2 新分离的放线菌中内源线型和环型质粒的检测
Table 2 Detection of the endogenous linear and circle plasmids in the newly isolated actinomycetes

Sources	Strain number	Linear plasmid/kb	Circle plasmid/kb
Acid soil	10-3-1	300	50
	10-3-2	300	
	A146	65	
	A147		20
	A241	350	
	A542	70	
	A732	14	
	A738	140	
Alkaline soil	3-4-2	300	
	Y135	340, 135	16, 9
	Y137	240	
	Y142	230	
	Q141	230	

3 讨论

国内外关于嗜酸和嗜碱放线菌的研究很少,一般中度嗜酸放线菌可以在pH4.5~7.5条件下生长,严格嗜酸放线菌的生长pH范围为pH3.5~6.5^[7, 8];中度嗜碱放线菌在pH10.0和中性条件下均能生长,严格嗜碱放线菌生长范围为pH10~12,但在pH中性条件下不能生长^[9, 10]。由于本试验分离到的嗜酸、嗜碱放线菌均能在pH中性的固体培养基上生长,因此,应属于中度嗜酸、嗜碱而不是严格嗜酸、嗜碱放线菌。非极端环境分离到的放线菌菌株中常常存在内源线型和环型质粒,其中检测到线型质粒的菌株比例约为17%^[11]。本试验从新分离的88株中度嗜酸、嗜碱放线菌中检测到线型质粒的比例(14%)与非极端环境

中的放线菌的比例(17%)差别不大,表明土壤的酸碱度在一定范围内(约pH5.4~9.0)不会对放线菌线型质粒的存在丰度产生大的变化。本研究首次在嗜酸、嗜碱放线菌中检测到线型和环型质粒,对于开发极端放线菌资源具有意义。

参 考 文 献

- [1] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 第一版. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] Chen CW. Complications and Implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet.* 1996, 12: 192-196.
- [3] Chang PC, Cohen SN. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science.* 1994, 265: 952-954.
- [4] Qin Z, Cohen SN. Replication at the telomeres of the *Streptomyces* linear plasmid pSLA2. *Mol Microbiol.* 1998, 28: 893-903.
- [5] 姜成林, 徐丽华. 放线菌分类学. 第一版. 昆明: 云南大学出版社, 1997.
- [6] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics. 2nd ed. Norwich: Crowes, 2000.
- [7] Seong CN, Goodfellow M, Ward AC. Numerical classification of acidophilic actinomycetes from acid soil in Korea. *Kor J Microbiol.* 1993, 31: 355-363.
- [8] 崔庆锋, 王黎明, 刘志恒, 等. 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究. 微生物学报(Acta Microbiologica Sinica), 2004, 44(5): 571-575.
- [9] Krulwich TA, Guffanti AA. Alkalophilic Bacteria. *Annual Review of Microbiology.* 1989, 43: 435-463.
- [10] 张永光, 李文均, 张忠泽, 等. 碱性环境中的放线菌的生物学研究. 微生物学通报(Microbiology), 2003, 30(1): 73-77.
- [11] Zhang R, Yang Y, Fang P, et al. Diversity of telomere palindromic sequences and replication genes among *Streptomyces* linear plasmids. *Applied and Environmental Microbiology.* 2006, 72(9): 5728-5733.

Detection of linear and circular plasmids among actinomycetes isolated from acid and alkaline soils

Yumei Dai, Min Zhou, Zhongjun Qin*

(Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 20032, China)

Abstract: Fifty actinomycete strains isolated from 19 acid soil samples collected from Hunan and Yunnan provinces could grow on media at pH4.5 and pH7.0. Thirty-eight actinomycete strains isolated from 14 alkaline soil samples collected from Xinjiang, Qinghai and Yunnan provinces could grow on media at pH10.0 and pH7.0. Thus, they were moderately acidophilic or moderately alkalophilic actinomycetes. Twelve linear plasmids and 3 circular plasmids were detected among the 88 strains by the pulsed-field gel electrophoresis and standard alkaline-denaturation procedure, respectively.

Keywords: moderately acidophilic actinomycetes; moderately alkalophilic

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30325003, 30770045, KSCX-SW-329-3, KSCX2-YW-G-014)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-54924171; E-mail: qin@sibs.ac.cn

Received: 24 July 2007/ Revised: 20 November 2007