

高效检测分析玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 线性质粒

孙伟明¹, 郭巍^{1,2*}, 刘大群^{2*}

(¹河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

(²河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定 071001)

摘要:【目的】建立一种高效检测和分析玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 内源质粒的方法。【方法】根据“链霉菌线性质粒 5' 末端都结合有共价蛋白”这一性质, 通过改进琼脂糖包埋块制作方法, 发明了一项快速高效检测链霉菌质粒种类、构型及大小的技术, 称为“包埋块二次处理法”, 该方法还能从正反两方面表明共价蛋白的存在与否。【结果】利用此方法高效检测出了玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中存在两种线性质粒, 双向电泳验证了该方法的正确性, 推测质粒大小分别约为 47 kb 和 53 kb。【结论】利用本研究发明的方法首次成功地检测了玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中的内源线性质粒。

关键词: 链霉菌; 线性质粒; 琼脂糖包埋块; 双向电泳

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1671-04

链霉菌中存在环型和线型结构的质粒^[1]。其中, 线性质粒存在的生物学意义引起了人们的浓厚兴趣。近 30 年来, 有关链霉菌线性质粒复制机理和端粒结构得到了阐明, 但都是通过小线性质粒来完成的^[2], 而大线性质粒的检测、分离、回收及物理图谱的构建等遗传操作都有相当的难度^[3]。

玫瑰黄链霉菌 (*S. roseoflavus*) Men-myc-93-63 是一株从马铃薯疮痂病自然衰退的土壤中分离得到的生防菌, 该菌株能够产生多种脂溶性抗生素。从发酵液中分离的抗生素除对马铃薯疮痂病菌具有明显抑菌活性外, 还对棉花黄萎病菌、小麦根腐病菌、番茄灰霉病菌、黄瓜白粉病菌、蔬菜根结线虫等多种植物病原菌有抑制作用, 温室和田间试验均表明该菌对马铃薯疮痂病和棉花黄萎病具有较好的防治效果^[4]。因此, 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 在植物病害防治方面具有重要的开发和应用前景。

在定位筛选玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 抗生素合成基因簇的研究过程中, 首次发现内源线性质粒

的存在。本研究首次对未用 Proteinase K 处理的包埋块进行再处理, 发明了一种高效检测和分析链霉菌线性质粒的方法, 此方法能直接表明线性质粒结合有共价蛋白。内源线性质粒的研究将为开发适合于自身的载体, 定位并筛选抗生素生物合成基因簇, 验证其基因对菌体发育的影响等方面奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 生防菌株玫瑰黄链霉菌 (*Streptomyces roseoflavus*) Men-myc-93-63 由河北农业大学生物防治实验室提供。

1.1.2 培养基和试剂: 培养基参照文献^[5]配制, Lysozyme 购自 Sigma 公司, Proteinase K 购自 Roche 公司, SDS 购自上海生工, 以上试剂均按文献^[6]配制。

1.2 菌丝体培养

将 5 μ L 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 孢子悬浮液接种于含有玻璃珠的 50 mL TSB 培养基, 28 $^{\circ}$ C,

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10A211)

*通讯作者: Tel: +86-312-7528178; E-mail: guowei@hebau.edu.cn, ldq@hebau.edu.cn

作者简介: 孙伟明(1982-), 男, 河北望都人, 硕士研究生, 从事农业微生物与基因工程方面的研究。E-mail: swimming122@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-07-16; 修回日期: 2008-09-16

220 r/min 培养 48 h。

1.3 标准琼脂糖包埋块的制备

参照文献^[5]。

1.4 非标准琼脂糖包埋块的制备

为了保护线性质粒末端蛋白,非标准琼脂糖包埋块制备方法不同于标准琼脂糖包埋块,中间过程不用 Proteinase K 和 SDS 共同处理,而只用 SDS 处理包埋块,并且最后必须将 SDS 洗涤干净^[5]。

1.5 二次处理

对 1.4 制备的包埋块进行 Proteinase K 再处理。

1.6 电泳检测质粒构型

普通琼脂糖凝胶电泳检测以上 3 种包埋块。

1.7 双向电泳验证

第一向电泳后凝胶经 EB 染色,在 310 nm 波长的紫外投射仪上照射 3~5 min,然后将凝胶水平转动 90°,进行第二向电泳^[7]。

1.8 脉冲场凝胶电泳(PFGE)检测质粒种类

通过改变脉冲变化时间及凝胶浓度来检测玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中内源质粒的种类^[5,6]。

1.9 电泳验证质粒大小

普通琼脂糖凝胶电泳检测标准琼脂糖包埋块,验证质粒大小。

2 结果

2.1 “包埋块二次处理法”检测质粒构型

通过 0.5% 的普通琼脂糖凝胶电泳检测标准琼脂糖包埋块、非标准琼脂糖包埋块和“二次处理法”包埋块,结果显示标准琼脂糖包埋块和“二次处理”包埋块均有两条带型出现,而非标准琼脂糖包埋块没有出现(图 1)。非标准琼脂糖包埋块在线性质粒末端结合有共价蛋白时,不能在凝胶中泳动(见 5、6 泳道),从侧面表明结合有共价蛋白。线性质粒末端共价结合蛋白被 proteinase K 降解后,“二次处理”包埋块中的质粒又会出现(见 3、4 泳道),并且与标准琼脂糖包埋块中的质粒大小一致(见 1、2 泳道),直接表明结合有共价蛋白,然而只有链霉菌线性质粒符合这种情况,因此说明玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中存在的两种内源质粒为线性,并结合有共价蛋白。

2.2 双向电泳验证

利用双向电泳验证“包埋块二次处理法”得出的结论,通过 0.5% 的琼脂糖凝胶进行第一向电泳(图 2-A),EB 染色后显示两条带型。经紫外照射,再进

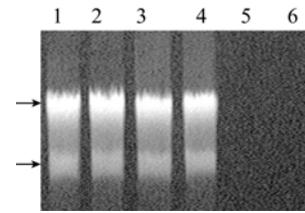


图 1 琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose Gel Electrophoresis. 1-2: standard agarose embedding block; 3-4:second processing of the agarose embedding block; 5-6: the unstandard agarose embedding block.

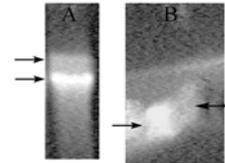


图 2 双向电泳

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis.

行第二向电泳(图 2-B),结果仍显示两种质粒带型并没有发生分离,验证了“包埋块二次处理法”的正确性。

2.3 PFGE 检测质粒种类及大小

PFGE 结果显示有两条明显带型(图 3),表明玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中存在两种内源质粒, λ -DNA Markers 指示其大小分别约为 33 kb 和 27 kb(图 3),但由于链霉菌基因组中 G+C 的含量较高,使得 PFGE 所用 λ -DNA Marker 显示结果(Y)与链霉菌线性质粒真实大小(X)符合方程: $Y=0.96X-18$ ^[8],因此推测两种线性质粒大小分别约为 53 kb 和 47 kb,依次命名为 pSR53 和 pSR47。

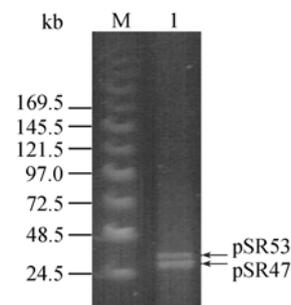


图 3 脉冲场凝胶电泳

Fig. 3 Pulsed Field Gel Electrophoresis M:MidRange PFG Markers; I: standard agarose embedding block.

2.4 验证线性质粒大小

由普通琼脂糖凝胶电泳(图 4)可知,两种线性质粒大小分别约为 47 kb 和 53 kb,与脉冲场凝胶电泳推测结果一致。由于质粒较大,分辨率受限,因此明确质粒的大小需将普通琼脂糖凝胶电泳与脉冲场凝胶电泳结合起来进行分析。

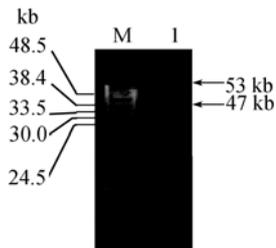


图 4 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose Gel Electrophoresis M:λ-mix Markers; I: standard agarose embedding block.

3 讨论

本研究首次将琼脂糖包埋块技术进行改进,发明出快速高效检测链霉菌质粒构型的方法——“包埋块二次处理法”,该方法可以广泛用于链霉菌质粒的快速高效检测。并利用此方法第一次成功检测出玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 存在两种线性质粒,推测了两种线性质粒的大小。此方法根据“链霉菌线性质粒 5' 末端都结合有共价蛋白”^[5]这一现有事实的假定设计而成,不仅能高效地检测出链霉菌线性质粒的种类、构型及大小,还具有重复性好,操作简单等特点,特别是对分离提取比较困难的大线性质粒更加简便易行,最重要的是该方法能从正反两方面表明共价蛋白的存在与否。但如果超出这一假设,就必须在此基础上利用双向电泳技术加以验证,才能区分是发夹结构的线性质粒还是环状质粒。

一般而言,质粒的大小可以选择几种链霉菌中中等切割频率的酶进行酶切和电泳分析得出,这种方法对于大于 50 kb 的质粒很实用,但也存在一定的缺点:(1)当酶切片大小相似时,由于电泳无法有效分离而导致分析结果的不准确;(2)若酶切出现小片段,电泳漏检会出现误差;(3)酶切片与 Marker 之间存在误差,加和结果会更加不准确。鉴于以上原因,本研究利用一种脉冲场凝胶电泳推测和普通凝胶相结合的方法检测小于 50 kb 线性质粒的大小。链霉菌基因组中 G+C 的含量较高,平均为 73%,使得 PFGE 中样品与 λ-DNA Marker 存在一定差距。线性质粒真实大小(X)与 λ-DNA Marker 显示结果(Y)符合方程: $Y=0.96X-18$,但由于不同菌株基因组的 GC 含量不同,方程 $Y=0.96X-18$ 的应用有一定局限性,因此需结合普通琼脂糖凝胶电泳来验证脉冲场凝胶电泳推测结果的准确性。

与电镜观察^[9]、PFGE^[10~14]、SDS-PFGE^[15]和双向电泳检测方法相比,这种检测方法对未用 Proteinase K 处理的包埋块进行再处理,设计更加完善,获得的结果明显,推测的结论准确。但在制备非标准包埋块过程中,SDS 必须洗涤干净,否则会由于末端蛋白亚基变性封闭有负电荷而出现错误结论。有研究认为一些末端共价结合蛋白亚基分子量较小,并且带负电荷比例较高的线性质粒,在进行脉冲场凝胶电泳过程中不会出现明显的滞后现象^[16]。之所以得出这样的结论,可能是 SDS 未去除彻底引起的。本研究在 1×TAE 普通琼脂糖凝胶电泳和 0.5×TBE 脉冲场凝胶电泳实验中都存在基因组 DNA 不明原因的降解,特别是电泳缓冲液使用时间较长时更为明显,因此当脉冲变换时间不适当时就会出现假质粒带型,这时就需要变化脉冲变换时间反复验证。这种基因组 DNA 不明原因降解所引起的电泳积压带,可能是因为链霉菌基因组 DNA 存在硫修饰,会在电泳过程中发生断裂^[17,18]。

玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 线性质粒的发现为分子遗传方面的操作奠定了基础,为构建适合自身的载体提供了平台,从而为筛选抗生素合成基因簇提供了新途径,进而可以通过质粒消除、质粒异源转移、分子克隆等手段对质粒的功能进行研究。

参 考 文 献

- [1] 田永强,褚以文,赵国屏,等. 在新分离的稀有放线菌群体中检测线型染色体、质粒和噬菌体. 中国抗生素杂志 (*Chinese journal of antibiotics*), 2006, 31(7): 403-405.
- [2] Xuan M,Zhao GP, Qin ZJ, et al. Characterization of the Genetic Components of *Streptomyces lividans* Linear Plasmid SLP2 for Replication in Circular and Linear Modes. *J Bacteriol*, 2006, 188(19): 6851-6857.
- [3] 赵书春,周秀芬,邓子新. 大线性质粒 pHZ1000, pHZ1001 在链霉菌种间的接合转移. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2000, 40(4): 435-439.
- [4] Meng QF, Yang WX, Liu DQ, et al. Field Evaluation of antagonistic *Streptomyces* Men-myc-93-63 preparation in biocontrol of cotton Verticillium Wilt. Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress. Beijing: Foreign Languages Press, 2004.
- [5] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: the John Innes Foundation, 2000.
- [6] Sambrook J, Fritsch MF, Manual T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999.

- [7] 覃重军, 邓子新, 周启, 等. 吸水链霉菌应城变种的四个内源质粒及其逐个消除的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 1995, 35(1): 14–20.
- [8] Gravius B, Cullum J, Hranueli D. High G+C-content DNA markers for pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechniques*, 1994, 16(1): 52.
- [9] 还连栋, 董可宁, 谭华荣, 等. 玫瑰红链霉菌 336 质粒 (pSR336)DNA 的分离及特性研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 1996, 23(3): 155–160.
- [10] Evans M, Kaczmarek FS, Stutzman-Engwall K, *et al.* Characterization of a *Streptomyces-lividans*-type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2. *Microbiology*, 1994, 140(6): 1367–1371.
- [11] Zotchev SB, Soldatova LI, Orekhov AV, *et al.* Characterization of a linear extrachromosomal DNA element (pBL1) isolated after interspecific mating between *Streptomyces bambergiensis* and *S. lividans*. *Res Microbio*, 1992, 143(9): 839–845.
- [12] Kinashi H, Shimaji-Murayama M. Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 1991, 173(4): 1523–1529.
- [13] Hosted TJ, Wang T, Horan AC. Characterization of the *Streptomyces lavendulae* IMRU 3455 linear plasmid pSLV45. *Microbiology*, 2004, 150(6): 1819–1827.
- [14] Dai Y, Zhou M, Qin Z. Detection of linear and circular plasmids among *actinomycetes* isolated from acid and alkaline soils. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2008, 4; 48(2): 244–246.
- [15] Shimizu S, Kobayashi H, Masai E, *et al.* Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(5): 2021–2028.
- [16] 肖湘, 周秀芬, 邓子新. 线性质粒——链霉菌基础生物学研究的一个新热点. *国外医药. 抗生素分册(World Notes on Antibiotics)*, 1999, 20(2): 49–53.
- [17] Zhou XF, He XY, Liang JD, *et al.* A novel DNA modification by sulphur. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5): 1428–1438.
- [18] Zhou XF, Deng ZX, Firmin JL, *et al.* Site-specific degradation of *streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(10): 4341–4352.

Efficient detection and analysis of linear plasmid in *Streptomyces Men-myco-93-63*

Weiming Sun¹, Wei Guo^{1,2*}, Daqun Liu^{2*}

(¹College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(²Biological Control Center of Plant Pathogens and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract: [Objective] To develop an efficient method to detect and analyze the endogenous plasmid in *Streptomyces Men-myco-93-63*. [Methods] According to the property of ‘the linear chromosomes and plasmids of *Streptomyces* spp. have proteins covalently bound to the 5 ends of the DNA’, a novel method was established to detect the type, configuration and size of the *Streptomyces* spp. plasmids by improving the preparation of agarose embedded block. The method can also show whether the linear plasmids have proteins covalently bound to the DNA from both the positive and negative aspects. [Results] The type and configuration of two plasmids were determined efficiently from *Streptomyces roseoflavus Men-myco-93-63* and verified by the two-dimensional electrophoresis. The speculated sizes of these plasmids were 47 kb and 53 kb, respectively. [Conclusion] Two linear plasmids were detected successfully from *Streptomyces roseoflavus Men-myco-93-63* by a new method.

Keywords: *Streptomyces*; linear plasmid; agarose embedded block; two-dimensional electrophoresis

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A211)

*Corresponding author. Tel: +86-312-7528178; E-mail: guowei@hebau.edu.cn, ldq@hebau.edu.cn

Received: 16 July 2008/ Revised: 16 September 2008