

氧化硫硫杆菌接合转移系统的建立

金松漠 颜望明 王祖农

(山东大学微生物研究所, 济南 250100)

自从1980年Mao等人首次从硫杆菌中分离到质粒以来^[1], 硫杆菌的遗传学研究得到了较快的发展^[2-6]。近年来, 人们试图在嗜酸性硫杆菌中建立一个遗传信息的转移系统, 将外源基因引入这类细菌, 以便于研究它们与异养细菌在基因的调控与表达方面的异同, 同时也使构建理想的工程菌株成为可能, 但至今尚未有成功的报道。^{(本文报道了 IncQ 类群的非转移性质粒载体 pJRD215和pKT230在 IncP 质粒的诱动下从大肠杆菌直接转移到了极端嗜酸性的专性自养细菌——氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*)}

中, 从而在大肠杆菌与氧化硫硫杆菌之间建立了一个接合转移系统。)

材料和方法

(一) 菌株与质粒

本文所使用的菌株与质粒列于表1。

(二) 培养基及培养条件

大肠杆菌用LB培养基^[11], 37℃培养。

氧化硫硫杆菌液体培养采用元素硫(S)为能源的 Starky-S 培养基^[4]。固体培养基采用 Na₂S₂O₃ 为能源的 Starky-Na₂S₂O₃ 培养基;

表1 菌株与质粒

菌株或质粒	遗传型或表型	参考文献或来源
<i>E. coli</i> C600	thr ⁻ leu ⁻ hsd	本室保藏
<i>E. coli</i> ED8654	metB ⁻ lacY ⁻ gal ⁻ trpR ⁻ hsdR	本室保藏
<i>T. thiooxidans</i> Tt-3	Wild-type (含pTt30质粒)	[4]
RP ₄	Ap ^r Tc ^r Km ^r IncP Tra ⁺	[7]
R68.45	Ap ^r Tc ^r Km ^r IncP Tra ⁺	[8]
RP ₄ :::Tn501	Ap ^r Tc ^r Km ^r Hg ^r IncP Tra ⁺	刘纯强博士惠赠
pUB307	Tc ^r Km ^r IncP Tra ⁺	[9]
pJRD215	Km ^r Sm ^r IncQ mob ⁺	[10]
pKT230	Km ^r Sm ^r IncQ mob ⁺	刘纯强博士惠赠

(A) (NH₄)₂SO₄ 2g, KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 0.001g; CaCl₂ · 2H₂O 0.25g, 蒸馏水 500ml, 自然 pH4.8, 加 2.4% 琼脂粉。(B) Na₂S₂O₃ 10g, 蒸馏水 50ml。将(A)、(B)分别高压灭菌, 冷却后混合, 制成平板。氧化硫硫杆菌 30℃ 培养。在 Starky-Na₂S₂O₃ 固体培养基中加入 0.05% 的酵母粉制成大肠杆菌和氧化硫硫杆菌的接合培养基。

(三) 接合条件

用LB液体 37℃ 振荡培养大肠杆菌供体菌至对数中期, Starky-S 液体培养基 30℃ 静止培

养 Tt-3 受体菌至稳定期 (约 7 天)。取等体积的供体菌与受体菌分别离心, 用生理盐水洗涤两次, 混合后取适量的菌悬液加到硝酸纤维素滤膜 (直径 25mm, 孔径 0.45μm) 上, 在接合平板上 30℃ 培养 48h, 使之接合。取下滤膜, 用生理盐水洗下菌体, 稀释后涂布选择性平板。同时在选择性平板上分别涂布供体菌与受体菌作为对照。

(四) 质粒的提取与检测

本文于 1991 年 6 月 29 日收到。
国家自然科学基金和高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

质粒的提取按照文献〔12〕的方法,略加修改。电泳及照相条件见文献〔4〕。

(五) 质粒稳定性测定

在含有Sm(50 μ g/ml)的Starky-Na₂S₂O₃固体平板上挑取一个 Tt-3(pJRD215) 转移接合子菌落,接种到不含抗生素的 Starky-S 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C 静止培养 6 天。然后按 1:1000 的比例转接。如此连续传代 5 次,稀释后涂布不含抗生素的Starky-Na₂S₂O₃固体平板,30 $^{\circ}$ C 培养 7 天。菌落长出后,用无菌牙签在含有 Sm(50mg/ml)的Starky-Na₂S₂O₃固体平板上点种100个菌落。计算抗性菌落与敏感菌落的比例,测出质粒在氧化硫硫杆菌中的稳定性。

结 果

(一) 广泛寄主范围的质粒载体在氧化硫硫杆菌中的转移

氧化硫硫杆菌是一种专性自养细菌,其最适生长 pH2.0—2.5,生长缓慢,周期长。该菌与大肠杆菌在营养需求和生长pH 等方面完全不同,因此要使这两种菌在一起接合非常困难。我们设计的含有0.05%酵母粉的 Starky-Na₂S₂O₃ (pH 4.8)培养基可以满足这两种菌的基本要求。在这种培养基上,通过膜接合的方法(30 $^{\circ}$ C, 48h)可获得较好的接合效果。

pJRD215和 pKT230 质粒载体具有广泛的寄主范围,它们均为非转移性质粒,但可以在转移性质粒的诱导下进行转移。用 pJRD215 和 pKT230 质粒载体分别转化含有 IncP 质粒: RP4, R

68.45, RP1::Tn501和pUB307的大肠杆菌 C600 菌株,构成两种质粒共存的大肠杆菌C600供体菌株。以氧化硫硫杆菌 Tt-3 菌株为受体,进行接合。在含有 Sm(50 μ g/ml)或 Sm(50 μ g/ml)+ Tc (36 μ g/ml)的 Starky-Na₂S₂O₃ 选择性平板上得到了大量的转移接合子,质粒转移频率见表 2。表 2 可见,除 R68.45 质粒以外,其它三个质粒均可以较高的频率诱导pJRD215和 pKT230 质粒从大肠杆菌转移到氧化硫硫杆菌中。质粒检测结果见图 1。

(二) pJRD215质粒从氧化硫硫杆菌反向转移到大肠杆菌中

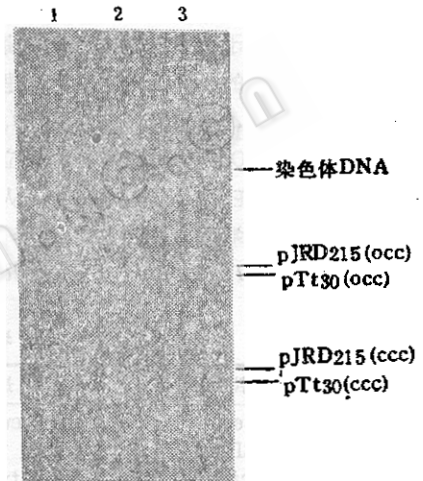


图 1 质粒检测结果

1. Tt-3受体菌(pTt30)
2. Tt-3转移接合子(pTt30, pJRD215)
3. E.coli C600(pJRD215)

表 2 质粒转移结果

供 体	受 体	转移频率 ⁽¹⁾	共转移频率 ⁽²⁾
C600(RP4, pJRD215)	Tt-3	4.5×10^{-4}	1.1×10^{-6}
C600(R68.45, pJRD215)	Tt-3	6.9×10^{-6}	/
C600(RP1::Tn501, pJRD215)	Tt-3	4.3×10^{-4}	3.3×10^{-6}
C600(pUB307, pJRD215)	Tt-3	3.2×10^{-4}	/
C600(RP4, pKT230)	Tt-3	2.0×10^{-4}	1.0×10^{-6}
C600(RP1::Tn501, pKT230)	Tt-3	5.7×10^{-4}	/
C600(pUB307, pKT230)	Tt-3	2.5×10^{-4}	/
Tt-3(RP4, pJRD215)	ED8654	2.1×10^{-4}	3.5×10^{-6}

(1) 选择标记均为Sm

(2) 诱导质粒RP4, RP1::Tn501与质粒载体的共转移频率,在Sm平板中加Tc以选择RP4或RP1::Tn501

质粒

以 Tt-3(RP4, pJRD215) 为供体, 在 Starkey-S 液体培养基中 30℃ 静止培养 5 天, 以大肠杆菌 ED8654 为受体菌, 37℃ LB 液体培养基振荡培养过夜。按前述方法, 在相同的接合平板上进行反向接合, 接合时间为 24h。在含有 Sm(50 µg/ml) 的平板上得到了转移接合子。质粒的转移频率见表 2。上述结果表明, 氧化硫硫杆菌对于大肠杆菌既是一个很好的受体菌, 又是一个很好的供体菌。

(三) pJRD215 质粒载体在氧化硫硫杆菌中的稳定性

对 pJRD215 质粒载体在 Tt-3 菌株中的稳定性进行了测定, 在不含抗生素的 Starkey-S 液体培养基中连续转接 5 次后, 有 88% 的菌体细胞仍保持 Sm 抗性。这一结果表明, pJRD215 质粒载体在 Tt-3 菌株中比较稳定, 可以作为氧化硫硫杆菌基因操作的载体。

参 考 文 献

- [1] Mao, M.W. H. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 8:121—125, 1980.
- [2] Rawlings, D. E., et al.: *J. Bacteriol.*, 158:737—738, 1984.
- [3] Barros, M. E. C. et al.: *J. Bacteriol.*, 164:1386—1389, 1985.
- [4] 金松谟等: 微生物学通报, 15(1):20—21, 1988.
- [5] 颜望明: 遗传学报, 17(2):143—147, 1990.
- [6] 颜望明: 生物工程学报, 6(4):338—340, 1990.
- [7] Datta, N. et al.: *J. Bacteriol.*, 108:1244—1249, 1971.
- [8] Haas, D., et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 144:243—251, 1976.
- [9] Bennett, P. M., et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 154:205—211, 1977.
- [10] John Davison, et al.: *Gene*, 51:275—280, 1987.
- [11] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.68, 1982.
- [12] Birnboim, H. C. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 7:1513—1523, 1979.

Development of a Conjugative Transfer System for *Thiobacillus thiooxidans*

Jin Songmo Yan Wangming Wang Zunong

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

The broad host range vectors pJRD215, pKT230 were mobilized into *Thiobacillus thiooxidans* from *E. coli* with the help of conjugative plasmids belonging to IncP group at frequencies of 10^{-4} — 10^{-6} per recipient. The vector pJRD215 was mobilized back to *E. coli* from *T. thiooxidans* with the help of RP4 at a frequency of 2.1×10^{-4} per recipient. The vector pJRD215 was stably maintained in *T. thiooxidans*. Based on these results we suggest that these vectors can be used as cloning vehicles in *T. thiooxidans*.

Key words *Thiobacillus thiooxidans*, conjugative transfer system; plasmid vector