

短小芽孢杆菌质粒 pCJ3 转化 枯草杆菌的研究

罗进贤 周楨林 胡晋新 李镇林
廖武祥* 龙 华* 廖新民*
(生物学系)

摘 要

本文采用我国自己分离的短小芽孢杆菌抗四环素质粒 pCJ3 转化枯草杆菌的各种突变体。质粒 DNA 经氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心纯化后转化枯草杆菌的感受态细胞。结果表明枯草杆菌 BR151, SB202, 168, QB1130 及 QB1133 都可作为质粒 pCJ3 的受体, 转化效率在 10^3 左右, 其中以 SB202 这株突变体为最高, 从各种转化体中提取的质粒及经 BamHI 消化后的质粒的电泳图均与原质粒 pCJ3 及其 BamHI 酶切片段相同, 并具有 pCJ3 的抗四环素转化活性。将 pCJ3 DNA 经 BamHI 酶切后重新用 T₄-DNA 连接酶连接再转化枯草杆菌细胞, 其转化效率比原质粒高 1—2 个数量级。研究了二价金属离子、pH 及培养基成分对转化的影响, 结果证明: Ca^{++} 对枯草杆菌转化有促进作用, Cu^{++} , Zn^{++} 则有抑制作用, 转化的最适 pH 在 7.2—7.5 之间; 营养丰富培养能提高转化效率。

关键词 质粒转化, 枯草杆菌, 短小芽孢杆菌

芽孢杆菌属的质粒大多数缺乏选择性标记, 一般不适宜作基因载体, 自 Ehrlich 报导金黄色葡萄球菌的质粒能在枯草杆菌中复制和表达以后^[1], 枯草杆菌载体-受体系统和基因克隆的工作有了迅速的发展。我们从广东土壤中分离的短小芽孢杆菌 A₃ 中获得了具四环素抗性标记的质粒 pCJ3^[2], 并做了简单的限制酶切图谱^[3]。本文报导质粒 pCJ3 对几种枯草杆菌突变体的转化结果以及影响 pCJ3 DNA 转化枯草杆菌 BR151 的各种因素。

一、材料与方 法

1. 细菌菌株 本实验所用菌株列于表 1。

本文 1987 年 2 月收到

* 1986 届毕业生

表1 细菌菌株
Tab.1 Bacterial strains

菌 株	基 因 型	来 源
枯草杆菌BR151	Trp ⁻ , Met ⁻ , Lys ⁻	中科院微生物所
枯草杆菌168	Trp ⁻	巴黎生物物理化学所
枯草杆菌SB202	Trp ⁻ , His ⁻ , Tyr ⁻ , Phe ⁻	法国Monod/Jacob研究所
枯草杆菌QB1130	Met ⁻ , SacA ₃₂₁ , dal, amy ⁻	同上
枯草杆菌QB1133	Met ⁻ , SacA ₃₂₁ , aroI ₉₀₉ , amy ⁻	同上
短小芽孢杆菌A3	含质粒pCJ3	中山大学生物学系

2.培养基 L-B培养基: 蛋白胨10克, 酵母粉5克, NaCl 10克, pH 7.0, 加水至1000毫升, 固体平板另加1.8%琼脂。

10×Spizizen 盐溶液: K₂HPO₄·3H₂O 140克, KH₂PO₄ 60克, (NH₄)₂SO₄ 20克, 柠檬酸钠10克, MgSO₄ 2克, 加水至1000毫升。

GM I 培养基: 10×Spizizen 盐溶液10毫升, 酵母粉0.1克, 葡萄糖0.5克, 水解酪蛋白0.02克各种氨基酸5毫克, 加水至100毫升。

GM II 培养基: 10×Spizizen 盐溶液10毫升, 酵母粉0.05克, 葡萄糖0.5克, 水解酪蛋白0.004克, CaCl₂ 0.5mM, MgCl₂ 2.5mM, 各种氨基酸5毫克, 加水至100毫升。

3.质粒DNA的提取 将培养过夜的短小芽孢杆菌 A₃ 细胞悬浮于50mM Tris-HCl pH 7.5、25%蔗糖溶液中, 加入等体积的100mM EDTA、4 mg/ml 溶菌酶及0.1% TritonX-100, 室温下放置10分钟, 然后于70℃保温10分钟, 35000rpm 离心30分钟, 上清液加等体积的20%PEG6000、1MNaCl, 室温放置30分钟后于10000rpm 离心10分钟, 除去上清液, 沉淀溶于适量TE缓冲液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0) 中, 再用氯化铯—溴化乙锭密度梯度离心纯化质粒DNA^[4]。

4.质粒的快速检测采用Doly的方法^[5]

5.转化方法 感受态细胞转化按Spizizen的方法^[6], 将活化的单菌落接种至GM I 培养基37℃培养过夜, 按1/10量接种至新的GM I 培养液中, 培养3.5小时后按1/10接种量接种至GM II 中(培养基成分对转化的影响一项, 不用GM II, 而用GM I), 培养90分钟, 离心收集细胞, 重悬于1/10原体积的上清液中, 加入适量DNA, 再培养45分钟, 取0.1ml 涂布抗性平板, 次日观察结果。

6.DNA的酶切及电泳分析 DNA的限制酶切割及连接反应所用的酶均为BRL产品, 反应缓冲液按厂家提供配方配制。采用1%琼脂糖凝胶电泳, 电泳液为Tris-NaAc系统, 80—100伏室温下电泳3—4小时。溴化乙锭染色后在紫外光下照相。

二、结果与讨论

1.质粒pCJ₃转化枯草杆菌BR151, SB202, 168, QB1130及QB1133

用氯化铯—溴化乙锭密度梯度离心纯化的质粒pCJ₃按Spizizen的方法转化枯草杆菌BR

151、SB202、168、QB1130及QB1133,同时作不加DNA及不加受体菌的对照,结果都得到抗四环素的转化体,对照则未见四环素抗性菌落(表2)。

表2 质粒pCJ3转化不同枯草杆菌突变体的结果

Tab. 2 Transformation of different *B. subtilis* mutants with plasmid pCJ3

枯草杆菌	质粒DNA浓度 (微克/毫升)	转化体/毫升	转化效率 (转化体/微克DNA)
SB202	1	1690	1.69×10^3
BR151	1	1660	1.66×10^3
168	1	660	0.66×10^3
QB1130	1	2100	2.1×10^3
QB1133	1	1280	1.28×10^3

转化结果表明:各种枯草杆菌突变体都可作为质粒pCJ3的受体。

从这些转化体中各挑取一株,编号为BR151(pCJ3),SB202(pCJ3),168(pCJ3),QB1130(pCJ3)及QB1133(pCJ3),提取质粒进行琼脂糖平板凝胶电泳,其电泳图谱与对照pCJ3质粒相同,用BamH I酶切成一条带,也与pCJ3用BamH I切后的结果相同(图1)。

把从转化体BR151(pCJ3)提取的质粒DNA重新转化枯草杆菌BR151也获得四环素抗性的转化体,转化效率为 2.2×10^3 转化体/微克DNA。

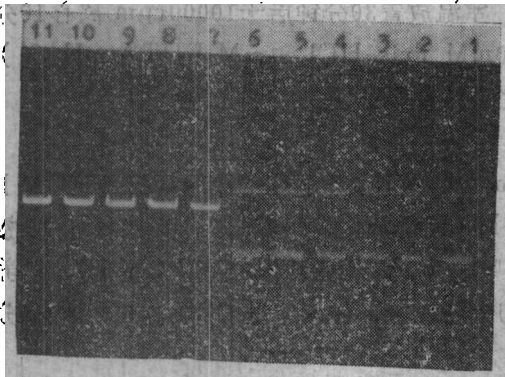


图1 从各转化体中提取的质粒及其BamH I酶切片段的电泳图

Fig.1 Gel Electrophoresis of plasmids from transformants and their BamHI fragments

图中(1)为 pCJ3, (2)–(6)分别为 BR151(pCJ3), SB202(pCJ3), 168(pCJ3), QB1130(pCJ3)及QB1133(pCJ3), (8)–(11)分别为 BR151(pCJ3) + BamHI, SB202(pCJ3) + BamHI, 168(pCJ3) + BamHI, QB1130(pCJ3) + BamHI

以上结果证明:枯草杆菌BR151, SB202, 168, QB1130及QB1133转化体中的质粒就是pCJ3。

2. 质粒DNA构型与转化关系

将质粒pCJ3用BamH I切开后再用T₄-DNA连接酶重新连接,可生成由几个分子组成的寡聚体(图2),将这些分子与酶切后不再连接的pCJ3 DNA分子及未酶切的pCJ3 DNA分别转化枯草杆菌BR151,得到结果如表3。

表3 不同构型的pCJ3分子转化枯草杆菌BR151
Tab.3 Transformation of *B. subtilis* BR151 with plasmid pCJ3

DNA 构型	DNA 浓度 (微克/毫升)	转化体/毫升	转化效率 (转化体/微克DNA)
pCJ3	1	940	9.4×10^2
pCJ3 + BamHI	1	12	0.12×10^2
pCJ3 + BamHI + T ₄ -DNA连接酶	0.5	12450	2.5×10^4

从表3可见,经BamHI酶切又重组的质粒DNA其转化效率比未酶切的要高10—10²倍,而线状分子则基本上无转化活性。

枯草杆菌感受态细胞转化机制与大肠杆菌是不同的,单体质粒DNA很难转化,寡聚型质粒DNA则能有效地转化^[7,8,9]。Canosi等认为,DNA是以单链形式进入枯草杆菌细胞的,由于没有另一条链与之配对,难有转化活性而寡聚型质粒进入细胞后,线状分子中的同源部分可发生分子内重组形成完整的质粒分子从而具有转化活性。通常的质粒样品中含有少量的寡聚体DNA,因而有转化活性,用限制酶切开后重新连接时会产生一定量的寡聚体因而能提高转化效率。

3. 二价金属离子对转化的影响

为了研究二价金属离子对转化的影响,以枯草杆菌BR151为受体,在GM I培养基中加入0.5mM的Ca⁺⁺、Mn⁺⁺、Co⁺⁺、Zn⁺⁺及Cu⁺⁺等离子,转化结果如表4。

表4 二价金属离子对转化的影响
Tab.4 The effect of divalent cations on transformation

金属离子	0	Ca ⁺⁺	Co ⁺⁺	Mn ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Cu ⁺⁺
浓度(mM)	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
转化体/毫升	560	1811	930	450	240	0
转化体/微克DNA	2.24×10^2	7.25×10^2	3.72×10^2	1.8×10^2	0.96×10^2	0

表4结果表明:Ca⁺⁺对pCJ3DNA转化枯草杆菌BR151有促进作用,Cu⁺⁺、Zn⁺⁺等则有抑制作用。

表5是不同浓度的钙离子对pCJ3DNA转化枯草杆菌BR151的影响,表中显示在0.05mM以下,Ca⁺⁺对转化有促进作用,最适浓度在0.05—0.1mM的范围内;1mM以上则表现抑制作用。

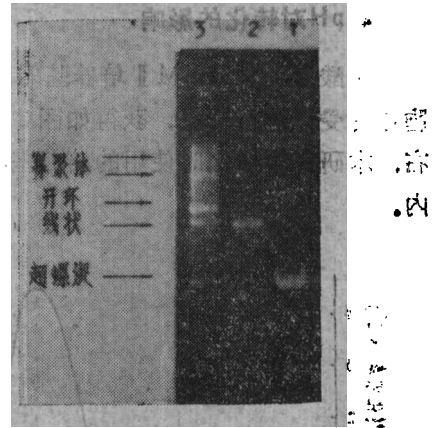


图2 质粒pCJ3及其BamHI酶切及重接片段的电泳图

Fig.2 Gel Electrophoresis of plasmid pCJ3 and its BamHI fragment and religated fragments

(1) pCJ3, (2) pCJ3 + BamHI, (3) pCJ3 + BamHI + T₄-DNA连接酶

表5 Ca⁺⁺浓度对转化的影响Tab.5 The effect of Ca⁺⁺ concentration on transformation

Ca ⁺⁺ 浓度 (mM)	0	0.05	0.1	0.3	1	3	5	10
转化体/毫升	1540	3690	3150	2250	2140	131	65	45
转化体/ 微克DNA	6.16×10^2	1.48×10^3	1.26×10^3	9×10^2	8.56×10^2	5.24×10^2	2.64×10^2	1.86×10^2

4. pH对转化的影响

用酸度计调整GM I 培养基的pH, 以不用pH的GM I 中培养的枯草杆菌 BR151 细胞作为受体进行转化, 获得如图3的结果。从图中可见, 转化的最适pH在7.2—7.5左右。本研究中转化时使用的培养基的pH一般在pH7.0左右, 正是在转化的最适pH范围内。

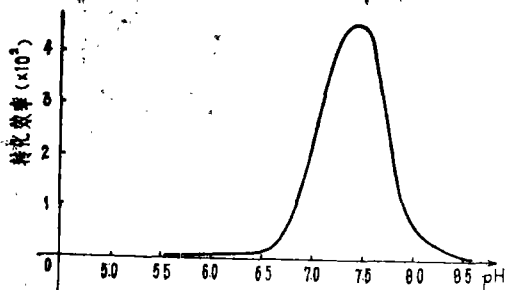


图3 pH对pCJ3质粒转化枯草杆菌BR151的影响

Fig.3 The effect of pH on transformation of *B. subtilis* BR151 with plasmid pCJ3

5. 培养基成分对转化的影响

在感受态形成过程中, 在GM I 中培养3.5小时后, 不转接至GM I 而是重新接种至GM I 中培养90分钟, 再加入DNA进行转化, 对照仍用GM I 培养基, 转化结果如表6。

表6 培养基成分对转化的影响

Tab.6 The effect of medium composition on transformation

培养基	DNA 浓度 (微克/毫升)	转化体/毫升	转化体/微克DNA
GM I	2.5	660	2.63×10^2
GM I	2.5	9820	3.93×10^3

从表6可以看出在GM I 中培养3.5小时后, 不转接营养成分较差的GM I 而是直接接种至新的GM I 中培养, 所得的转化体数目要高10倍以上, 说明营养丰富的培养基有利于感受态的形成, 提高质粒pCJ3对枯草杆菌BR151的转化率, 而且这种方法简便易行。

参 考 文 献

- [1] Ehrlich S. D., *PNAS. USA*, 74(1978), 4, 1680.
- [2] 周桢林等, 微生物学报, 22(1982), 3, 257.
- [3] 罗进贤等, 中山大学学报(自然科学版), 1985, 4, 81.
- [4] Maniatis T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp. 93.
- [5] Birnboim H. C. and Doly J., *Nucleic Acid Res.*, 1979, 7, 1513.
- [6] Anagnostopoulos G. and Spizien J., *J. Bacteriol.*, 81(1961), 74.
- [7] Canosi U. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 166(1978), 259.
- [8] Canosi U. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 181(1981), 434.
- [9] de Vos W. M. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 181(1981) 423.

Transformation of *Bacillus subtilis* with Plasmid pCJ₃ from *Bacillus pumilus*

Luo Jinxian · Zhou Zhenlin Hu Jinxin Li Zhenlin
Liao Wusiang Long Hua Liao Xinmin

Abstract

The Tc^R plasmid pCJ₃ from *B. pumilus* was used to transform competent cells of different *B. subtilis* mutants. It was shown that *B. subtilis* BR151, SB202, 168, QB1130 and QB1133 are suitable as the recipient of plasmid pCJ₃ with a transformation efficiency of 10³ transformants/μg DNA. Plasmids isolated from different transformants and their BamHI fragments have same electrophoresis pattern as plasmid pCJ₃ and its BamHI fragment and have the Tc^R activity as pCJ₃. The religated plasmid from BamHI fragment of pCJ₃ has a transformation efficiency 1—2 magnitude higher than the original plasmid. The effect of divalent cations, pH and medium composition on transformation was investigated. Ca⁺⁺ promotes while Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺ inhibit the transformation. The optimum pH for transformation is between 7, 2—7.5 and rich medium can increase the transformation efficiency.

Keywords · Plasmid transformation, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*