

不同培养时期的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌间 发生的跨属自然遗传转化

王小娟 李美菊 陈向东* 谢志雄 沈 萍

(武汉大学 生命科学学院 武汉 430072)

摘 要 携带穿梭质粒的大肠杆菌与作为受体的枯草芽孢杆菌分别培养至不同生长阶段混合均匀后静置 40 min , 涂布选择性平板 37℃ 培养 30 h 后得到一定数目的转化子 , DNase I 敏感实验证实质粒是通过自然遗传转化而非其它形式发生转移。实验发现大肠杆菌可以在特定生长时期向胞外分泌 DNA , 并且在对数期具有最高的提供质粒的能力 , 而生长后期的细胞因为体系中 DNase 量的增加转化频率下降。进一步的研究发现枯草芽孢杆菌在营养丰富的 LB 培养基中也具有与基本培养基中相当的转化能力 , 并且在对数生长前期具有较高的转化频率。

关键词 : 穿梭质粒 ; 大肠杆菌 ; 枯草芽孢杆菌 ; 自然遗传转化

中图分类号 : Q786 **文献标识码** : A **文章编号** 1001-6209 (2007) 06-0963-05

自然遗传转化(natural genetic transformation)是指同源或异源的“裸露”DNA 分子被自然感受态细胞主动摄取 , 并得到表达的水平基因转移过程^[1]。传统上实验室进行的自然遗传转化多采用提取的游离 DNA , 对转化的研究也历来只以受体为主体 , 一般不涉及 DNA 供体以及供体、受体细胞间的接触。自 20 世纪 80 年代以来 , 随着基因重组技术的迅速发展及遗传工程微生物在工业、农业、医药、环保等方面日益广泛的应用 , 出于生态和安全上的考虑 , 人们开始关注在环境中发生的自然遗传转化。现已有研究表明 , 在环境中发生的自然遗传转化过程多在固型物(土壤、沙子等) 表面进行 , 并且因与固型物结合而得到保护 , 免受 DNase I 的降解 , 并在较长时间内保持其生物活性^[2,3,4,5]。这些胞外 DNA 除了由细胞裂解或死亡释放外 , 还有不少是一些细菌在生长的特定阶段向胞外主动释放所致^[6]。此外 , 有研究表明 , 在不加外源游离 DNA 的情况下 , 转化不仅可在完整的供体和受体细胞间直接进行 , 而且细胞间接触大大促进转化活性 , 从而推测自然转化过程的进行并非完全仅取决于受体细胞 , 供体细胞也在一定程度上起着某种积极的作用^[7]。对包括 DNA 主动分泌及通过细胞间接触促进转化过程进行等在内的 DNA 供体功能的研究已成为自然转化研究的一个新的发展方向。

在研究证实枯草芽孢杆菌细胞-细胞间自然遗传转化现象的基础上^[8,9] , 本研究进一步发现在不添加外源 DNA 的情况下 , 大肠杆菌携带的穿梭质粒可通过细胞间自然遗传转化跨属转移到枯草芽孢杆菌中 , 并且这种细胞 - 细胞间自然转化在不利于枯草芽孢杆菌建立自然感受态的丰富培养基中也具有较高的频率。这不仅将有助于揭示自然转化过程在生物进化及环境生态方面的生物学意义 , 而且也可正确评估遗传工程微生物(GEMs) 的生态安全提供有价值的信息和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本研究所采用的菌株和质粒及其相关性状见表 1。pAPR8-1 是以大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pBE2^[10] 为载体克隆有地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶基因 106-1 片段 , 为本室构建保存。含有 pAPR8-1 的大肠杆菌(*Escherichia coli*) 表现为氨苄青霉素(Amp) 和卡那霉素(Km) 抗性 , 但在牛奶平板上不产生蛋白水解圈 , 枯草芽孢杆菌 DB104 为产蛋白酶缺陷菌株 , 在牛奶平板上也不产生蛋白水解圈 , 而含有 pAPR8-1 的 DB104 菌株表现为 Km 抗性 , 并可在牛奶平板上的形成蛋白水解圈。

基金项目 国家自然科学基金(30470032)

* 通讯作者。Tel 86-27-68754533 ; Fax 86-27-68754833 ; E-mail : xdchen@whu.edu.cn

作者简介 王小娟(1980 -) , 女 , 河北正定人 , 博士研究生 , 研究方向为微生物间水平基因转移。E-mail : xiaohyue80@yahoo.com.cn

收稿日期 2007-02-13 ; 接受日期 2007-04-04 ; 修回日期 2007-07-19

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 Bacteria and plasmid in this study

Bacteria and plasmid	Genotype	Source
<i>Escherichia coli</i>		
HB101(pAPR8-1)	<i>supE44 hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 Ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 Xyl-5 mtl-1 ,Amp^r , Km^r</i>	[11]
<i>Bacillus subtilis</i>		
DB104	His ⁻ <i>nprR2 nprE18 △nprA3</i> ,Km ^s	This study
Plasmid		
pAPR8-1	Amp ^r , Km ^r	[11]

1.1.2 培养基 :①LB 培养基 :每升水含胰蛋白胨 1.0g ,酵母粉 0.5g ,NaCl 0.5g ,pH 7.2 ;②Spizizen 基本培养基(SpMM) :每升水含葡萄糖 0.5g ,MgSO₄ · 7H₂O 0.02g , (NH₄) SO₄ 0.2g , K₂HPO₄ 1.4g , KH₂PO₄ 0.6g , 柠檬酸钠 · 2H₂O 0.1g。其中 MgSO₄ 和葡萄糖单独灭菌 ,冷却后再与其它成分混合。

卡那霉素(Km)使用终浓度为 30μg/mL ,氨基青霉素(Amp)使用终浓度为 100μg/mL ,组氨酸(His)使用终浓度为 50μg/mL。牛奶平板另加入终浓度 1.5% 的脱脂牛奶。加有 Km 的 MM 固体培养基平板作为选择平板 ,用于转化子的检测。

1.2 细菌属间自然遗传转化

将过夜活化的 DB104 转接于 MH(MM + His)和 LB 液体培养基中培养至不同生长阶段 ;同时将 HB101(pAPR8-1)接种于 LB(含 100μg/mL Amp)液体培养基中培养至不同生长阶段 ,各取 200μL 上述菌液混合于 Eppendorf 管中 ,振荡数秒混匀 ,立即涂布选择性平板(spMM + Km)或室温(28℃)放置 40min 后涂布选择平板。涂布量均为 50μL/板。实验重复两次或三次 ,结果采用几次实验的平均值或者某次代表实验的平均值。

1.3 转化子筛选

挑选部分抗性菌落点种含有 Km 的牛奶平板 ;根据质粒 pAPR8-1 所克隆的 106-1 片段结构基因设计引物 (上游引物 : 5'-AAAAAGGATCCCGACAA GACCGCAACCTC-3' 下游引物 : 5'-GGGGGAGCTC CCGCCGTTTCTCGTCAAG-3')进行菌落 PCR ,检测质粒。

1.4 DNase I 敏感实验

对照组在受体菌和供体菌的混合液中加入终浓度 250μg/mL 的 DNase I。

2 结果

2.1 细菌间发生的质粒跨属转移

将 HB101(pAPR8-1)的 LB 培养物每隔一定时间

取样 200μL ,与培养了 11h 的 200μL DB104 的 SpMM 培养物混合均匀 ,室温放置 40min 后涂布于含有 50μg/mL His 和 30μg/mL Km 的 SpMM 选择平板 ,37℃ 培养 30h 后在平板上长出一定数目符合枯草芽孢杆菌特征的 Km 抗性菌落(枯草芽孢杆菌的菌落呈不规则状 ,边缘不平滑 ,且菌落表面较干 ,大肠杆菌的菌落形态则为规则的圆形 ,呈半透明状 ,表面湿润)。随机挑取上述菌落点种至含有 30μg/mL Km 的脱脂牛奶平板 ,培养 20 h 均能观察到蛋白水解圈 ,而作为对照的大肠杆菌 HB101(pAPR8-1)在同样条件下在牛奶平板上不产生水解圈(图 1)。因此可以初步判断所得的抗性菌落确为通过属间遗传转化获得了大肠杆菌质粒的枯草芽孢杆菌重组子。

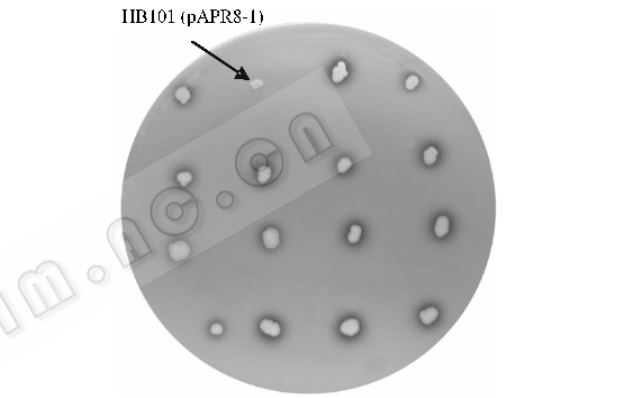


图 1 抗性菌落点种在牛奶和卡那霉素抗性平板上产生水解圈

Fig. 1 Transformants on km and milk-selecting plates. The strains were obtained by cell contact of *E. coli* strain HB101(pAPR8-1) and *B. subtilis* strain DB104. The arrow points to the negative control (HB101 (pAPR8-1)) and the rest are transformants.

2.2 重组子的革兰氏染色和菌落 PCR 检测

为了进一步确证所得为枯草芽孢杆菌转化子。随机挑取数十个获得的抗性菌株进行革兰氏染色 ,结果证实它们均为革兰氏染色阳性菌菌株。以 106-1 特定片段所设计的一对引物进行菌落 PCR 也均得到预期的 1.1 kb 的特定片段(图 2) ,证明这些抗性菌落确实为 pAPR8-1 质粒发生跨属细胞间转移后的枯草芽孢杆菌重组子。

2.3 DNase I 敏感实验

根据质粒 pAPR8-1 的构建过程我们可以初步判断上述过程应该为自然遗传转化 ,因为 pAPR8-1 来自于质粒 pBE2 ,而 pBE2 在构建过程中去掉了 mob 区^[10] ,可知其不是接合质粒 ;但为了进一步确证我们得到的上述重组子是转化子而不是接合子 ,我们进行了 DNase I 敏感性实验。由表 2 可见在反应体系中加入 DNase I 可以使重组子出现的频率有所下

降,这可能是在平板上也存在类似沙粒等表面的空间位阻效应,使 DNase I 并不能完全中止转化过程,类似现象我们在研究枯草芽孢杆菌的平板转化现象时也有发现^[8,9]。

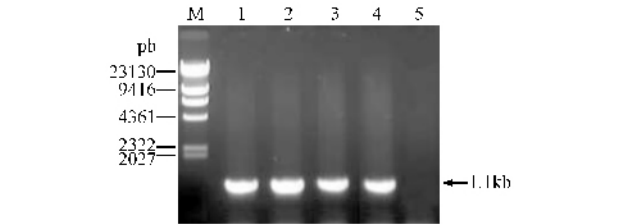


图2 菌落的PCR检测结果

Fig. 2 Detection of the plasmid using PCR. M. *Hind* III-cut lambda bacteriophage DNA molecular size marker; Lane 1 ~ 4. the 106-1 fragment of functional gene(1.1 kb); Lane 5. negative control.

表2 DNase 对受体菌株 DB104 与供体菌株 HB101 (pAPR8-1) 细胞间质粒转化的影响

Table 2 The effect of DNase on plasmid transformation between DB104 and HB101(pAPR8-1)

Donor strain	HB101(pAPR8-1) ^a	HB101(pAPR8-1) with DNase I treatment
Recipient strain DB104		
LB culture at exponential phase	3.16×10^{-5}	1.1×10^{-6}
MH culture at exponential phase	5.5×10^{-6}	1.2×10^{-6}

^a The transformation frequency was expressed as the number of transformants per recipient.

2.4 生长时期对转化的影响

在确定本实验中质粒转移是通过遗传转化实现后,我们初步研究了不同生长时期的受体菌和供体菌对转化频率的影响,首先以 LB 培养基中培养了 6 h ($OD_{600} \approx 2.5$) 的 DB104 为受体菌株,与培养到不同时期的供体菌株 HB101(pAPR8-1)混合后筛选转化子。如图 3 可知,HB101(pAPR8-1)在培养至 7.5 h (对数生长末期)后与 DB104 之间的转化能力下降,随着培养时间的延长转化频率进一步大幅度降低。然而通常认为在细菌生长后期由于细胞的死亡裂解会有大量的遗传物质释放至培养基中,这个时候的转化频率应该呈增高状态,这与我们的实验结果是冲突的,其原因有可能是包括胞内 DNase 在内的一些影响转化过程进行的物质也随着细胞破裂而释放,从而对体系的转化频率造成影响。为了验证这一推测,我们采用已知浓度的 pAPR8-1 与 HB101(pAPR8-1)不同生长时期的培养液的无细胞滤液充分混匀 37℃保温约 10 分钟后检测添加质粒的转化活性。结果证明在对数期后期和稳定期转化子数逐渐下降,由此说明在这一阶段的细菌培养体系中确实存在包括 DNase 在内的一些不利于转化进行的因

素(数据未列出)。

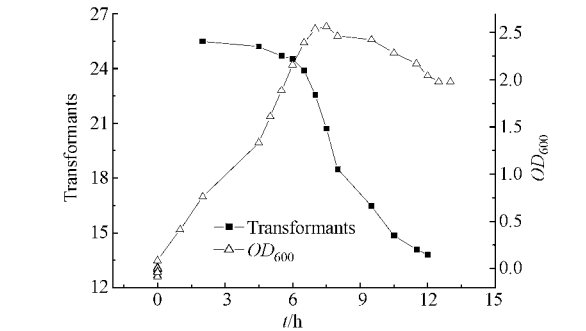


图3 不同生长阶段 HB101(pAPR8-1)与 DB104 质粒转化的转化子数的变化以及 HB101(pAPR8-1)的生长曲线

Fig. 3 Variety of transformant counts along with HB101(pAPR8-1) at different growth phase and the growth curve of HB101(pAPR8-1).

培养 7.5 h 的 HB101(pAPR8-1)作为质粒供体,以培养至不同生长阶段的 DB104 为质粒受体进行转化,结果显示(图 4),可知 DB104 在对数生长期以后转化能力急剧下降,在稳定期和后期基本不能发生转化,在对数生长期前期转化频率较高但波动也较大。而且 DB104 的 LB 和 MH 培养物均能与 HB101(pAPR8-1)发生遗传转化,且频率相当。

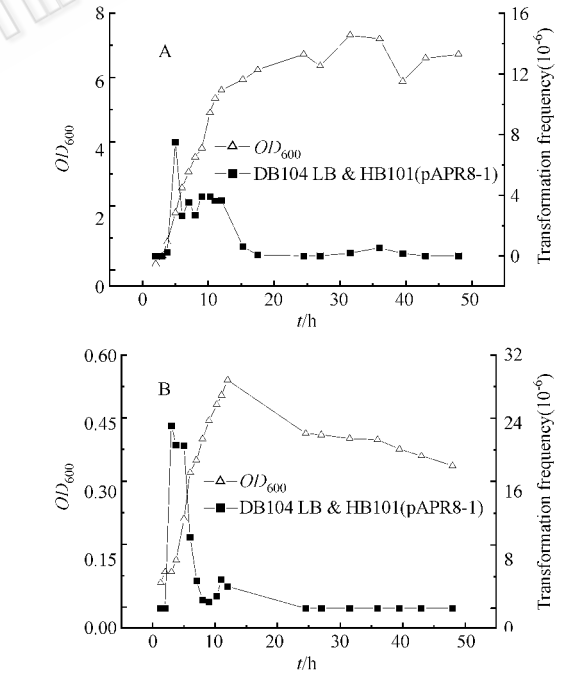


图4 DB104 LB 培养物 OD_{600} (A) 和 MH 培养物 OD_{600} (B) 及与 HB101(pAPR8-1)质粒转化频率随时间的变化规律

Fig. 4 The growth curve of DB104 in LB culture (A) and the growth curve of DB104 in MH culture (B) and transformation frequency between DB104 and HB101(pAPR8-1) at different growth phase.

3 讨论

可以确定在本实验中枯草芽孢杆菌 DB104 确

实通过细胞间自然遗传转化获得了大肠杆菌 HB101 (pAPR8-1) 的质粒,为了确定转化过程是发生在平板上还是液体环境中,我们将两种菌在 Eppendorf 管中混合均匀后室温放置 40min 后涂布选择平板与混合均匀后立即涂布选择性平板对照,得到的结果基本无差别,证明 DB104 获得质粒的过程主要发生在平板上,这与本实验室以前的研究结果也是一致的^[8,9]。若将两种菌分别取等体积(50 μ L)先后涂布于选择平板和混合均匀后涂布选择平板所得结果毫无差别,这也充分说明这一过程主要发生在平板上。

本研究在平板上进行了细菌属间自然遗传转化,实验中发现通常被认为不能建立感受态的枯草杆菌 LB 培养物^[1]也可很快具有转化能力,且转化频率与其在基本培养基中转化频率相当,甚至比其还要高。以前的研究结果通常以为枯草芽孢杆菌在营养缺乏的条件下易建立感受态^[1,12],而在营养较丰富的 LB 培养基中则很难建立感受态。这说明枯草芽孢杆菌在固型物表面包括感受态建立在内的整个自然转化过程都与传统的液体转化存在一定差异。Pauline 等曾观察到吸附于固相表面会引起细胞形态改变,并促使细菌代谢更为活跃,认为在固相表面的吸附是细菌在自然遗传转化中适应生存条件变化的一种策略^[13]。

已发现有多种菌具有主动分泌 DNA 的现象^[14~16],枯草芽孢杆菌在一些特定生长阶段也能向细胞外主动分泌具有生物活性的 DNA^[17,18],本研究结果表明携带有质粒的大肠杆菌在其特定生长阶段也能分泌具有生物活性的 DNA,并且可以通过与枯草芽孢杆菌的细胞接触使后者获得它的质粒。而且此过程主要发生在固体平板上,暗示着固相物表面将是研究、揭示细菌自然遗传转化中给体功能的一个重要途径。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所郭兴华研究员为本实验室提供质粒 pBE2 作为载体构建质粒 pPAR8-1。

参 考 文 献

- [1] Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, 1994, **58**:563–602.
- [2] Stewart GJ, Garko KA. The effect of divalent cations on the frequency of natural transformation in *Pseudomonas Stutzeri* strain. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 1994, **74**:201–207.
- [3] Nielsen KM, Weerelt M, Berg TN, et al. Natural transformation and availability of transformation DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:1945–1952.
- [4] Khanna M, Stotzky G. Transformation of *Bacillus Subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(6):1930–1939.
- [5] Demaneche S, Jocteur-Monrozier, Quiquampoix H, et al. Evaluation of biological and physical protection against nucleic acid degradation of clay-bound plasmid DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**:293–299.
- [6] Paget E, Simonet P. On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 1994, **15**:109–118.
- [7] Stewart GJ, Carlson CA, Ingraham JL. Evidence for an active role of Donor cells in natural transformation of *Pseudomonas Stutzeri*. *J. Bacteriol*, 1983, **156**:30–35.
- [8] 陈向东, 陈琪, 谢志雄, 等. 枯草芽孢杆菌在琼脂平板上进行的自然遗传转化. *微生物学报*, 2000, **40**(1):95–99.
- [9] 李美菊, 陈向东, 谢志雄, 等. 通过 DNA 释放及感受态建立进行的枯草杆菌细胞间自然遗传转化. *武汉大学学报(理学版)*, 2003, **49**(4):514–518.
- [10] 郭兴华, 熊占周, 民等. 枯草杆菌-大肠杆菌多功能穿梭载体的构建. *生物工程学报*, 1991, **7**(3):224–229.
- [11] 李美菊, 陈向东, 刘国生, 等. aprE 基因表达的分子生物学和微量热法分析. *化学学报*, 2005, **63**(18):1646–1650.
- [12] Jarmer H, Berka R, Knudsen S, et al. Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **206**:197–200.
- [13] Pauline MD, Bailey JE. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnol Bioeng*, 1986, **28**:73–87.
- [14] Renelli M, Matias V, Lo R Y, et al. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, 2004, **150**(7):2161–2169.
- [15] Hara T, Ueda S. A study on the mechanism of DNA excretion from *P. aeruginosa* Kyu-1-effect of mitomycin-C on extracellular DNA production. *Agric Biol Chem*, 1981, **45**(11):2457–2461.
- [16] Nielsen KM, Van Weerelt MD, Berg TN, et al. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**:1945–1952.
- [17] Lorenz MG, Gerjets D, Wackernagel W. Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured bacteria. *Arch Microbiol*, 1991, **156**:319–326.
- [18] Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. *Microbiol Rev*, 1994, **58**(3):563–602.

Intergenous natural genetic transformation between *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* at different growth phase

WANG Xiao-juan , LI Mei-ju , CHEN Xiang-dong* , XIE Zhi-xiong , SHEN Ping

(College of Life Sciences , Wuhan Univerisity , Wuhan 430072 , China)

Abstract : The culture fluids of *Escherichia coli* with shuttle plasmid and *Bacillus subtilis* strains were mixed and coincubated for 40 minutes after culturing respectively in LB and minimal media. The steadily plasmid transfer by natural genetic transformation between these two gram-negative and gram-positive bacteria has been demonstrated by the methods of selective medium screening , DNase I sensitivity test and plasmid detection. In contrast to MM culture *B. subtilis* LB culture can be competent and has equivalent transformation frequency. Furthermore , the maximal transformation frequency was obtained when cells in exponential phase served as donors or recipients. It is suggested that *B. subtilis* solid transformation is different from liquid plasmid transformation including the whole process of DNA plasmid competence producing. Understanding the mechanisms of gene transfer between bacteria may aid in assessing the potential risk associated with the release of recombinant organisms into the environment.

Keywords : shuttle plasmid ; *Escherichia coli* ; *Bacillus subtilis* ; natural genetic transformation

Foundation item : National Natural Science Foundation of China (30470032)

* Corresponding author. Tel 86-27-68754533 ; Fax 86-27-68754833 ; E-mail : xdchen@whu.edu.cn

Received : 13 February 2007 / Accepted : 4 April 2007 / Revised : 19 July 2007