

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*

覃重军 邓子新 周 启 陈华葵

(华中农业大学微生物科学与技术系 武汉 430070)

摘 要 在改良质粒 DNA 提取方法的基础上,从三种农用抗生素的同一产生菌——吸水链霉菌应城变种中同时发现四个内源质粒,用双向电泳技术确定了它们均为 CCC 构型,根据分子量从大到小的顺序将它们分别命名为 pHZ1、pHZ2、pHZ3 和 pHZ4,与已知分子量的 CCC 质粒分子同步电泳估计它们的分子量依次分别为 61kb、4.7kb、4.1kb 和 3.3kb,基于这四个内源质粒中至少部分个体可能为接合性质粒,可在没有某个质粒的衍生菌株的菌坪上形成“麻点”的假设,我们分离和鉴定了三个质粒逐个消除的 10-22 衍生菌株,并在光学显微镜下确证了二种类型的麻点。

关键词 吸水链霉菌, 质粒, 接合转移

吸水链霉菌应城变种 10-22 能产生三种重要的农用抗生素^[1]。近年来,在对该菌株的遗传操作方面已取得了较快的进展^[2],发展了适用于该菌株的质粒和噬菌体载体,该菌株的原生质体制备、再生和转化技术已逐渐成熟,获得了对外源 DNA 的限制性缺陷型的菌株,成为比出发菌株更为优良的受体菌株。

在发掘该菌株自身的内源复制子以构建有用克隆载体的研究过程中,史贤明和周启^[3]曾揭示 10-22 菌株中一个质粒的存在,并曾命名为 pSH47,用吡啶橙处理未获得消除 pSH47 的 10-22 衍生菌株。我们在改良质粒 DNA 提取方法的基础上,进一步发现该菌株的内源质粒至少有四个。为了将这些质粒独立分开,以便对它们的生物学特征进行较为清晰的研究,我们尝试利用许多链霉菌接合性质粒在不含这种质粒的菌坪上形成可见“麻点”的特征进行了一系列的探索,获得和鉴定了分别丢失 1 个、2 个和 3 个内源质粒的 10-22 衍生菌株。本文详细报道这方面的试验结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

吸水链霉菌应城变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis*) 10-22 和 Q105^[4]为本室保藏菌种,吸水链霉菌应城变种 Q1513 为本实验获得,吸水链霉菌应城变种抗生素生物合成阻断突变株 N-103 为 NTG 诱变 10-22 后获得(梁蓉芳等,未发表),变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK24 由英国 John Innes 研究所提供,玉米小斑病

* 国家自然科学基金和国家教委资助项目。

本文于 1993 年 9 月 29 日收到。

原菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 为本室保藏菌种。

1.2 培养基

用吸水链霉菌应城变种进行平板杂交的培养基为 CM^[5], 液体培养基为 YEME (蔗糖浓度为 10%), 变铅青链霉菌原生质体转化和再生培养基为 R₂YE^[6]。

1.3 方法

质粒 DNA 提取、琼脂糖凝胶电泳、链霉菌平板杂交和原生质体制备、转化等参照文献 [6], 质粒 DNA 双向电泳技术参照文献 [7], 抗生素生物活性测定参照文献 [1]。

2 结果

2.1 吸水链霉菌应城变种 10-22 至少存在四个内源质粒

用碱性溶菌法提取 10-22 菌株质粒 DNA, 苯酚/氯仿抽提, 离心后的上清液经琼脂糖凝胶电泳后往往只能检测到一个比染色体随机片段迁移慢的较大质粒, 然而, 经反复沉淀纯化后的质粒提取物又难以检测到该质粒的存在。

我们对碱性溶菌法进行了一些修改, 即在 NaOH/SDS 处理后, 加入终浓度为 1mol/L 的 NaAc, 于冰上放置 1 小时, 离心取上清液, 加入等体积的中性苯酚溶液抽提, 离心取上清液, 再加入酸性苯酚/氯仿溶液抽提, 之后进行异丙醇、精胺和乙醇反复沉淀纯化, 该质粒 DNA 提取物在琼脂糖凝胶上不仅可以检测到清晰的较大质粒的荧光带, 同时还发现有三条比染色体片段迁移要快的质粒带。这项试验表明 10-22 菌株至少存在四个内源质粒。应提到的是, 在 10-22 菌株中最大的质粒很易检测到, 而同时检测三个较小质粒重复性则很差。

2.2 双向电泳确定四个内源质粒均为 CCC 构型

将第一向电泳后的凝胶取出, 经溴化乙锭染色后, 在 310nm 波长的紫外透射仪上照射 3—5 分钟, 然后在第一向电泳的方向上将凝胶水平转动 90 度, 进行第二向电泳。图 1 表明, 10-22 菌株存在的四个内源质粒均为 CCC 构型, 根据分子量从大到小的顺序, 将它们分别命名为 pHZ1、pHZ2、pHZ3 和 pHZ4, 与已知分子量的 CCC 质粒分子同步电泳, 估计它们的分子量依次分别为 61kb、4.7kb、4.1kb 和 3.3kb。

2.3 利用种间接合转移难以将 10-22 的四个内源质粒分开

同一菌株中四个内源质粒的存在严重干扰了对质粒生物学及其由质粒控制的遗传表型的研究, 因此, 必须把它们分开转入不同的宿主中才能排除这种干扰。在质粒遗传标记 (如药物抗性) 未知的情况下要达到这一目的可以有两种方法: 一是利用接合性质粒向异源菌株中的接合转移可以形成可见“麻点”的表型, 二是通过不同的遗传途径获得质粒逐个消除的一系列衍生菌株。

基于 10-22 菌株中至少有个别质粒具有接合转移特性的假设, 我们尝试了采用下述几种方法进行探索。第 1, 在 10-22 (供体) 和变铅青链霉菌 TK24 (受体) 之间进行平板杂交。结果表明, 经稀释后的 10-22 孢子在 TK24 孢子的菌坪上未观察到明显的“麻点”。第 2, 用 10-22 菌株四个内源质粒的混合物去转化 TK24 的原生质体, 在 R₂YE 平板上再生出孢子后, 也观察不到“麻点”的形成。第 3, 将本研究室收集的 21 株不同种的链霉菌在 R₂YE 平板上涂成约 1cm² 的菌坪, 然后在菌坪中央点上稀释的 10-22 孢子悬

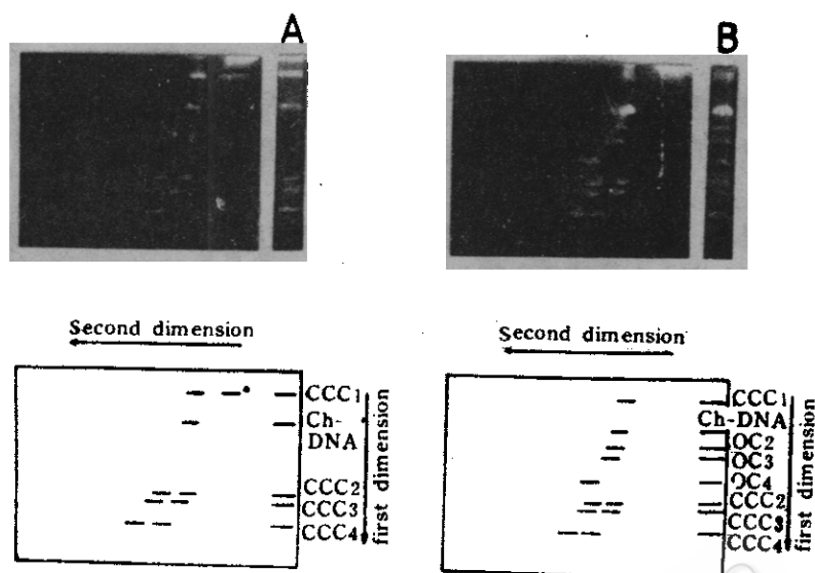


图1 双向电泳对吸水链霉菌 10-22 四个内源质粒的分离

A 和 B 下为第一向电泳, 大胶为第一向电泳后的 DNA 经溴化乙锭染色后在 310nm 紫外光下照射后的情形, A 为新鲜制备的 DNA, B 为室温下放置 1 天以后的 DNA 制备物, 凝胶下为各电泳带谱的图解。CCC, 共价闭合环; OC, 开环形; Ch, 为染色体; 1, 2, 3, 4 分别代表 pHZ1、pHZ2、pHZ3 和 pHZ4。

Fig. 1 Four indigenous plasmids DNA from *Streptomyces hygroscopicus* 10-22 separated by two dimensional agarose gel electrophoresis

The individual lanes under the letter A and B show the separation of the first dimension. The bigger gels show the same DNA run at a second dimension after nicking with 310nm UV in the presence of ethidium bromide. Panel A and B show fresh and aged plasmid preparations, respectively. Below the gel pictures are schematic representation of the banding patterns and their interpretation. CCC: covalently closed circular. OC: open circular. Ch: chromosome, 1, 2, 3 and 4 represent pHZ1, pHZ2, pHZ3 and pHZ4, respectively.

液, 培养后也未观察到典型的“麻点”出现。

这些实验结果暗示 10-22 质粒在种间转移时不能形成典型的“麻点”, 然而, 这并不意味着 10-22 中没有接合性质粒的存在。

2.4 通过种内接合转移获得消除质粒的 10-22 衍生菌株

获得质粒逐个消除的衍生菌株是将质粒彼此分开的第二种考虑, 为此, 我们将 10-22 以及由它衍生的一些菌株彼此配对后测定了它们接合转移形成“麻点”的可能性。结果发现, 稀释后的 10-22 孢子明显可以作为供体在抗生素生物合成的阻断突变株 N-103 的菌坪上形成一种清晰透明的“麻点”(图 2-A), 暗示 N-103 中丢失了一个 10-22 的内源质粒。这个丢失的质粒不大可能是 pHZ1, 因为 N-103 的质粒提取物可在琼脂糖凝胶上明显检测到 pHZ1 的存在, 与来自 10-22 的 pHZ1 的电泳在同一水平上。随后, 我们又以稀释的 N-103 孢子为供体, 在 10-22 衍生菌株 Q105 的菌坪上也检测到一种清亮透明的“麻

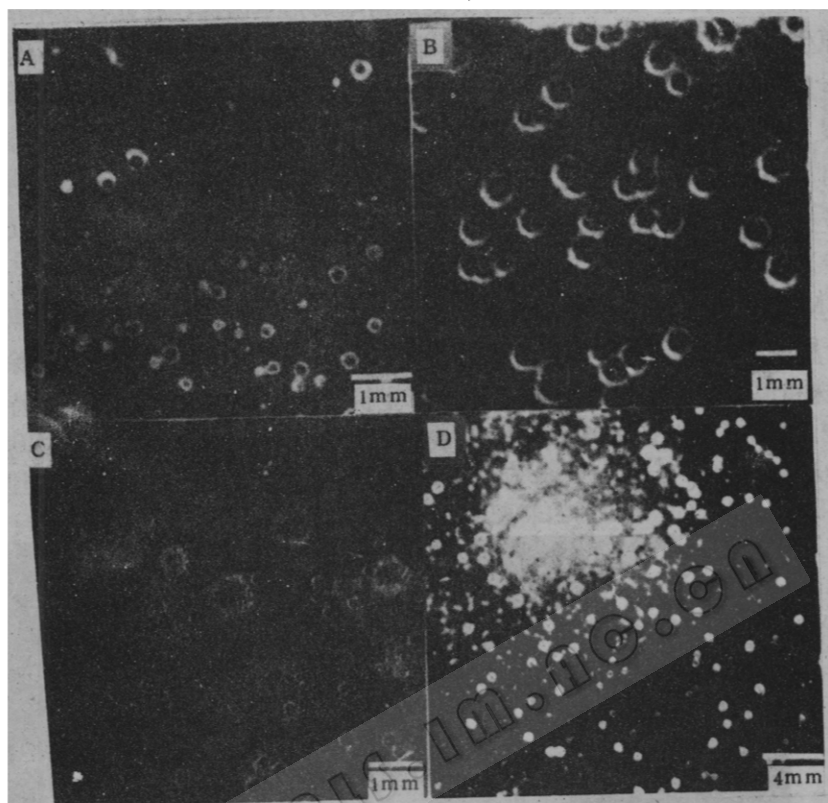


图2 吸水链霉菌 10-22 及其衍生菌株平板杂交形成的麻点

A: 供体 10-22, 受体 N-103; B: 供体 N-103, 受体 Q105;
C: 供体 10-22, 受体 Q105; D: 供体 Q105, 受体 Q1513.

Fig. 2 Pocks formation between *S. hygroscopicus* 10-22 derivatives

panel A: 10-22 (D), N-103 (R); panel B: N-103 (D), Q105 (R);
panel C: 10-22 (D), Q105 (R); panel D: Q105 (D), Q1513 (R).

D: Donor, R: Recipient

点”(图 2-B), 这种麻点的形态与 10-22 在 N-103 菌坪上形成的麻点似乎不同, 可能是由于不同质粒接合转移的结果, 因为 Q105 与 N-103 提取质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 前者已明显丢失了质粒 pHZ1, 所以 N-103 在 Q105 上形成的麻点可能与 pHZ1 的接合转移有关。

以上结果暗示, 在以 10-22 为出发菌株衍生获得 N-103 的过程中, 有一个内源质粒丢失, 而在衍生获得 Q105 的过程中, 有两个质粒丢失, 其中一个为 pHZ1。据此推测, 10-22 应该能够在 Q105 的菌坪上形成两种“麻点”, 实验结果完全证实了这一点, 以 10-22 为供体, Q105 为受体进行平板杂交出现了两种不同的“麻点”, 一种麻点较小但十分清晰, 而另一种麻点较大, 却相对模糊 (图 2-C)。

逐个消除 1 个和 2 个内源质粒的衍生菌株的获得引导我们利用麻点形成的可能性去

进一步消除多个质粒, 以获得遗传背景更加清晰的衍生菌株。在此设想中, 我们又尝试了应用原生质体再生的方法, 即将 Q105 制备成原生质体, 稀释后涂布到 R₂YE 平板上, 挑取原生质体再生后的单菌落 140 个, 分别在 CM 平板上涂成约 1cm² 的菌坪, 然后在菌坪中央点上一滴稀释的 Q105 孢子悬液, 生长 3—4 天后, 在一株编号为 Q1513 的菌坪上出现了明显可见的“麻点”(图 2-D), 而在其它编号菌株的菌坪上均没有发现这种麻点, 后来在平板杂交实验中反复证实了这个结果的可靠性, 这就表明 Q1513 在 Q105 的基础上进一步又消除了一个质粒, 即 Q1513 中已消除 3 个内源质粒。

在 CM 平板上进行培养特征观察和以玉米小斑病菌为指示菌检测抗生生活性, 发现消除 1 个质粒的 N-103 菌株不产生抗生素和产生的孢子堆无吸水特征。消除 2 个质粒的 Q105 菌株和消除 3 个质粒的 Q1513 菌株产生抗生素和产生孢子堆的吸水特征均与出发菌株 10-22 相同, 因此, 所消除的 3 个内源质粒(包括最大的质粒 pHZ1)与产生抗生素和分化产生孢子无关。

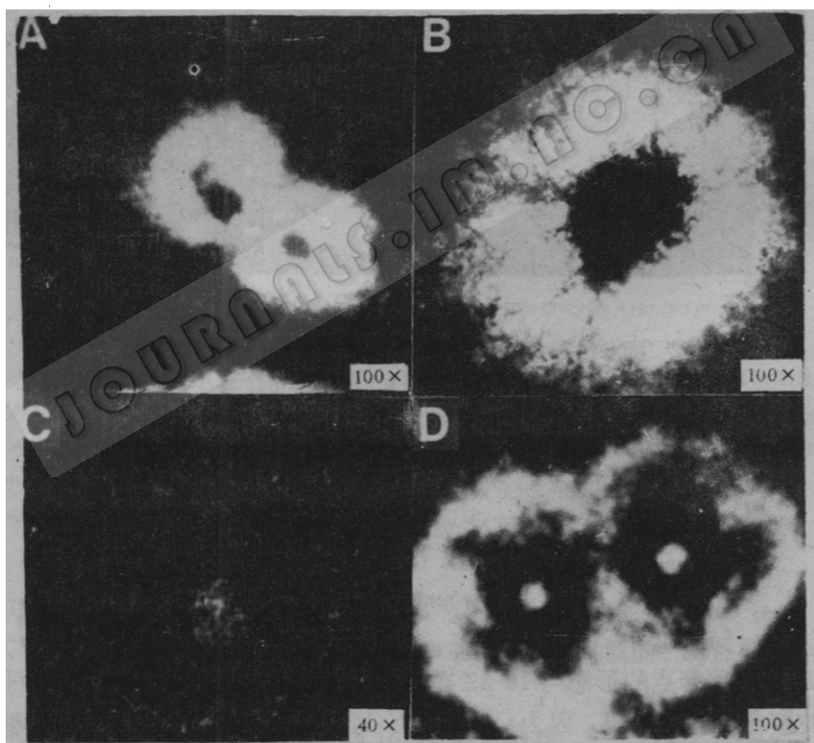


图 3 显微镜下的麻点形态

A: 供体 10-22, 受体 N-103; B: 供体 N-103, 受体 Q105;
C 和 D: 供体 10-22 受体 Q105.

Fig. 3 Characteristics of pocks under light microscope

panel A: 10-22 (D), N-103 (R); panel B: N-103 (D), Q105 (R);
panel C and D: 10-22 (D), Q105 (R). D: Donor, R: Recipient.

2.5 光学显微镜下种内接合转移形成麻点的特征

我们尝试了用光学显微镜来观察麻点的形态, 结果见图3。很明显, 10-22 消除质粒的各衍生菌株之间确实形成了不同的麻点。这些麻点类型至少可归纳出二类: 一种是生长—抑制—生长的环带, 如 10-22 与 Q105 形成麻点中的一种, 该类麻点类似于 SCP2^{*} 接合转移形成的麻点类型^[8]。另一类是生长—“致死”环带, 或只形成一个透明的“致死圈”(中央部分无菌丝生长), 如 10-22 与 Q105 形成的第二种麻点, N-103 与 Q105 之间形成的麻点以及 10-22 与 N-103 之间形成的小而透明的麻点, 该类型类似于 SCP1^[9]、SQP1^[10] 接合转移形成的麻点, 曾被称为“致死接合”反应。

3 讨论

在通用的碱性溶菌法的基础上增加 NaAc 盐析、苯酚抽提等步骤, 使提取的 10-22 质粒 DNA 不但能在琼脂糖凝胶上检测到清晰的 pHZ1 质粒带, 而且还发现了 pHZ2、pHZ3 和 pHZ4 等另外三个较小的质粒。我们利用 10-22 菌株内源质粒可以通过种内接合转移形成麻点的标记, 鉴定了通过几种方法获得的逐个消除内源质粒的一些菌株。由于提取和检测到三个较小质粒的重复性极差(估计拷贝数低于 1 拷贝/细胞), 因此, 除大质粒 pHZ1 外, 我们难以通过提取质粒 DNA 电泳来确证这些菌株消除的是哪一个内源质粒。这类似于在变铅青链霉菌中, 提取内源质粒 SLP2 和 SLP3 的 DNA 电泳检测不到, 但通过该质粒提高遗传重组频率和接合转移形成麻点, 从而确证这两个质粒的存在, 并鉴定了消除质粒的菌株^[11]。

在提取 10-22 质粒 DNA 混合物中, 邓子新(未发表)在琼脂糖凝胶上检测到一条比 pHZ1 迁移快, 但比染色体随机片段迁移慢的荧光带, 这条带是一个新的质粒, 还是 pHZ1 的不同构型, 尚未定论。目前已知 10-22 四个内源质粒不携带抗生素生物合成基因簇和产生孢子有关的基因。这四个质粒相互之间是否存在衍生关系和编码的生物学功能尚不清楚, 这需要将各个质粒分别标记和转移到异源寄主中去研究。

参 考 文 献

- [1] 梁善芳, 周 启. 生物工程学报, 1987, 3 (2): 130—136.
- [2] 邓子新. 生物工程进展, 1992, 12 (2): 24—30.
- [3] 史贤明, 周 启. 中国抗生素杂志, 1992, 17 (1): 21—25.
- [4] 覃重军, 邓子新, 周 启, 等. 遗传学报, 1993, 20 (2): 180—184.
- [5] 袁丽蓉. 抗生素, 1993, 8 (6): 380—387.
- [6] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic manipulation of *Streptomyces*——A laboratory manual. Norwich, England: John Innes Foundation, 1985.
- [7] Hintermann G, Cramero R, Kieser T *et al.* Arch Microbiol, 1981, 130: 218—222.
- [8] Bibb M J, Hopwood D A. J Gen Microbiol, 1981, 126: 426—442.
- [9] Bibb M J, Freeman R F, Hopwood D A. Mol Gen Genet, 1977, 154: 155—166.
- [10] 郑幼震, 赵人俊. 遗传学报, 1984, 11 (6): 442—447.
- [11] Hopwood D A, Kieser T, Wright H M *et al.* J Gen Microbiol, 1983, 129: 2257—2269.

DETECTION OF FOUR PLASMIDS IN *STREPTOMYCES* *HYGROSCOPICUS* VAR. *YINGCHENGENSIS* 10-22 AND THEIR STEPWISE ELIMINATIONS

Qin Zhongjun Deng Zixin Zhou Qi Chen Huakui

(Department of Microbial Science & Technology, Huazhong Agricultural
University, Wuhan 430070)

Abstract Four indigenous plasmids were detected with the modified method of plasmid DNA isolation in *Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis* 10-22, which produces three different effective antibiotics against plant diseases. Two dimensional agarose gel electrophoresis revealed that all of them were CCC molecules. By parallel electrophoresis with plasmids of known sizes, the four plasmids were estimated to be approximately 61 kb, 4.7 kb, 4.1 kb and 3.3 kb in size, which were designated pHZ1, pHZ2, pHZ3 and pHZ4, respectively. Based on the assumption that conjugative plasmids would form "pocks" on the lawn of strains lacking corresponding plasmids, we isolated and characterized several 10-22 derivatives which had lost 1—3 plasmids, and confirmed two types of pocks under light microscope.

Key words *Streptomyces hygroscopicus*, Plasmid, Conjugation