微 生 物 学 报 36 (5): 401 ~ 404, 1996
Acta Microbiologica Sinica

质粒在大肠杆菌和沼泽红细菌之间的接合转移*

赵敬勇** 高 东 钱新民
(山东大学微生物系 济南 250100)

人们以光合细菌中的紫色非硫光合细菌如球形红细菌和荚膜红细菌等为模型,在阐明光合作用机制等方面取得了很多成果[1],但对于紫色非硫光合细菌中的沼泽红细菌报道较少。直到 1988 年 Harwood 等人发现沼泽红细菌可以利用多种芳香族化合物如木质素单体、苯甲酸和 4-羟基苯甲酸等作为唯一碳源进行光照厌氧生长或好氧生长[2],使沼泽红细菌成为研究该类化合物降解机制的一个良好模型。近年来,沼泽红细菌降解苯甲酸的途径已基本搞清[3]。目前,研究集中于两个方向,一是有关酶类的提纯及性质研究,二是有关基因的克隆。

本工作所用的沼泽红细菌 Y6 株是我室分离的一株光合细菌,并对其生理生化性质作了初步研究。目前,还未见有沼泽红细菌转化或转导系统的报道。鉴于许多广泛寄主型质粒如 RP4 等在其它光合细菌中的成功应用[4],本工作就 RP4 及两个广泛寄主型的质粒基因载体 pJRD215 和 pRK404 在大肠杆菌和沼泽红细菌之间的接合转移进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本工作所用的菌株与质粒列于表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	遗传性状或特性	来源或参考文献
沼泽红细菌 Y6	wild type	本实验室分离保存
大肠杆菌		
SM10	C600 recA,RP4-2--Tc, Mu integrated,Km^r	[5]
C600	F$^-$,thi,thr,leu	[6]
HB101	F$^-$,recA,thi,leu,pro,Sm^r	[7]
E8654	supE,supF,hsdR,MetB, LacY,gal,trp	[8]
质粒		
RP4	Ap^r,Tc^r,Km^r,IncP,tra+,mob+	[9]
pJRD215	Km^r,Sm^r,IncQ,mob+	[10]
pRK404	Tc^r,IncP,mob+	[11]
pRK2013	Km^r,IncP,tra+	[12]

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 大肠杆菌采用 LB 培养基[13],37℃培养。

1.2.2 沼泽红细菌采用 RCVBN 培养基[14],30℃培养,光照强度为 1000Lx。

* 山东省自然科学基金资助项目。

** 现地址:首都医科大学实验中心分子生物学室,北京100054

本文于 1995 年 9 月 25 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.3 接合条件及接合转移子的筛选

大肠杆菌于 LB 液体培养基中 37℃振荡培养过夜，沼泽红细菌于 RCVBN 培养基中 30℃光照厌氧培养或好养培养 48h。分别离心收集菌体，溶于适量生理盐水中，按一定比例取供体菌和受体菌，离心收集菌体，用生理盐水洗涤一次，菌体最后溶于 100μl 生理盐水，取 50μl 加到预先灭菌的滤膜上(直径 25mm，孔径 0.45μm)，待膜上水份吸干后，贴于接合培养基 RCVYE(RCVBN 补加 0.05%酵母粉)，30℃光照培养至适当时间，将滤膜上菌苔用生理盐水洗下，离心收集菌体，溶于适量生理盐水，作 1∶10 系列稀释，涂布含相应抗生素的 RCVBN 选择平板，同时涂布不含抗生素的平板，计算接合频率。

同时，以供体菌和受体菌分别单独涂滤膜和平板，作为两组对照。

接合转移频率用以下公式计算：

$$\text{接合转移频率} = \frac{\text{接合子数}}{\text{受体菌数}} \times 100\%$$

1.4 质粒提取与检测

质粒提取采用碱变性方法，电泳检测按文献[13]进行。

1.5 外源质粒在沼泽红细菌中的稳定性测定

将在选择平板上生长的接合子纯化后，接种于不含抗生素的 RCVBN 培养基中，30℃培养 48h，按 1/1000 的比例转接数次，培养条件相同，培养液稀释后，涂布不含抗生素的 RCVBN 培养基，形成的单菌落点种含相应抗生素的平板，检测质粒稳定性。

2 结果和讨论

2.1 质粒 RP4 在大肠杆菌和沼泽红细菌 Y6 之间的接合转移

质粒 RP4 具有 tra 基因和 mob 区，具有自身接合转移的能力。以 *E. coli* C600(RP4)为供体菌，沼泽红细菌 Y6 为受体菌，进行滤膜接合，以 Km 作为选择标记，转移频率可达 10^{-3} 数量级(见表 2)。RP4 有 Ap、Km 和 Tc 三种抗性基因，在 Y6 中只有 Km 抗性得以表达，使 Y6 可以在含 Km50μg/μl 的培养基中生长。

为验证 RP4 确已进入 Y6 中，以接合子 Y6(RP4)为供体菌，*E. coli* HB101 为受体菌进行反向接合，结果以 Km 作为选择标记时，得到了 HB101 转移子，且 HB101(RP4)能表达 Km、Ap 和 Tc 抗性。该结果一方面证实了 RP4 确已进入了沼泽红细菌 Y6 中，另一方面也说明 RP4 在 Y6 中仍具有自身转移的能力。

2.2 质粒 pJRD215 由大肠杆菌到沼泽红细菌 Y6 的带动转移

质粒 pJRD215 是广泛寄主质粒 IncQ 组中 RSF1010 的一个衍生质粒，可被带动转移。以染色体上整合有 RP4 的 tra 基因的大肠杆菌 SM10 作为供体菌，Y6 为受体菌进行接合转移，以 Km 作为选择标记时，转移频率可达 10^{-3}。在 Y6 中，pJRD215 的 Sm 抗性基因没有表达。

对接合子 Y6(pJRD215)进行质粒提取检测，电泳结果显示 pJRD215 确以进入 Y6 中(见图 1)。

2.3 质粒 pRK404 由大肠杆菌到沼泽红细菌 Y6 的带动转移

质粒 pRK404 是广泛寄主质粒 RK2 的一个衍生质粒，可被带动转移。质粒 pRK2013 是一个具有推动作用的质粒。以 HB101(pRK404)作为供体菌，*E. coli* ED8654(pRK2013)为推动菌，沼泽红细菌 Y6 为受体菌进行三亲接合，以 Tc 为选择标记，转移频率可达 10^{-3}(见表 2)。

对接合子 Y6(pRK404)进行质粒检测，电泳结果显示 pRK404 确以进入沼泽红细菌 Y6 中(见图 2)。

2.4 质粒稳定性检测

将接合子 Y6(RP4)、Y6(pJRD215)和 Y6(pRK404)在无抗生素培养基中分别连续转接 15 代，三种外源质粒保存率均在 80%以上，说明这三种质粒在沼泽红细菌 Y6 中是比较稳定的。另外，还对影响接合转移频率的若干因素如培养条件、供受体菌的比例和接合时间等进行了探索。结果显示，供体菌

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

比受体菌为1：2，接合72h，质粒pJRD215和pRK404的转移频率可以达到10^{-2}数量级。

表2　接合转移频率

供体菌	受体菌	筛选标记	转移频率$\times 10^{-3}$
E. coli C600 (RP4)	Y6	Km	2.0
E. coli SM10 (pJRD215)	Y6	Km	4.2
E. coli HB101 (pRK404)	Y6	Tc	3.8
E. coli ED8654 (pRK2013)	Y6(RP4)	HB101	Ap	1.6

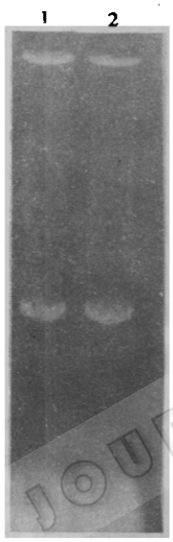

图1　供体菌及接合子的质粒检测
1. 供体菌 *E. coli* SM10(pJRD215)；
2. Y6接合子.

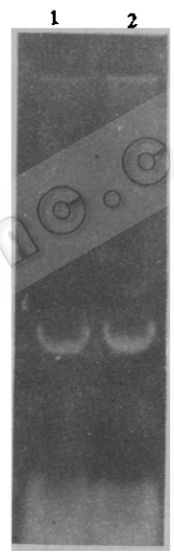

图2　供体菌及接合子的质粒检测
1. 供体菌 *E. coli* HB101(pRK404)；
2. Y6接合子.

本工作首次将三种广泛寄主型质粒RP4、pJRD215和pRK404引入了沼泽红细菌。曾有报道，质粒RP4能带动浑球红细菌的染色体转移，形成类似大肠杆菌的Hfr菌株，并以此对浑球红细菌的遗传图谱作了分析[15]。RP4在沼泽红细菌中是否有这种作用，还有待进一步研究。pJRD215是一个柯斯质粒，可方便地用于基因文库的构建。pRK404也是一个很好的基因载体，具有半乳糖苷酶兰／白筛选系统，易筛选重组子。这两种质粒引入到沼泽红细菌中，使基因的克隆与分析工作可以方便的在大肠杆菌中进行，然后将感兴趣的基因片断通过接合转移，引入沼泽红细菌。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

参 考 文 献

[1] Scolnik P A, Kaplan S. *Ann Rew Microbiol*, 1987, **41**: 703～726.
[2] Hawood C S, Gibson J. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 712～717.
[3] Perrota J A, Harwood C S. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 1775～1782.
[4] Pemberrom J N, Bowen A R. *J Bacteriol*, 1981, **147**: 110～117.
[5] Simon R, Priefer U, Puhler A. *Biotechnology*, 1983, **1**: 784～791.
[6] Appleyard R K. *Genetics*, 1954, **39**: 440～520.
[7] Boyeer, HW, Roulland-Dussoix D. *J Mol Biol*, 1969, **41**: 459～472.
[8] Borck K. *Mol Gen Genet*, 1976, **146**: 199.
[9] Datta N, Hedges R W, Shaw E J. *J Bacteriol*, 1971, **108**: 1244～1248.
[10] Davison J, Heusterspreute M, Chevalier N *et al. Gene*, 1987, **51**: 275～280.
[11] Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E *et al. Plasmid*, 1985, **13**: 149～153.
[12] Figurski D H, Helinski D R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 1648～1652.
[13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molicular Cloning: A larborotary manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laborotary Press, 1989.
[14] Weaver PF, Wall JD, Gest H. *Arch Microbiol*, 1975, **105**: 207～216.
[15] Suwanto A, Kaplan S. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 1135～1145.

TRANSFERING OF PLASMID BETWEEN *E. COLI* AND *RHODOBACTER PALUSTRIS*

Zhao Jingyong Gao Dong Qian Xinmin
(*Department of Microbiology, Shandong University Jinan* 250100)

Abstract The broad host range plasmid RP4 and two plasmid gene vecters, pJRD215 and pRK404, were transfered into *Rhodobacter palustris* strain Y6 by conjugation between *E. coli* and *Rb. palustris*. The Km resistance gene of RP4 and pJRD215 and the Tc resistance gene of pRK404 could express in *Rb. palustris*. The plasmid stability test showed the three plasmids could be maintained stabily in Rb. palustris. This work provide a possibility of the genetic engineering research of Rb. palustris.

Key words Broad host range plasmid, *Rhodobacter palutris*, Conjugation and transfering

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn