

插入烟草叶绿体启动基因片段的重组质粒转化大肠杆菌和枯草杆菌感受态与原生质体的比较

董金兰 张士文 王茜 李洪泉 刘国平

(哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨)

摘要 大肠杆菌 (*E. coli*) N100 携带的 pKO1-26 质粒插入烟草 (*Nicotiana tobacum* var.) 叶绿体启动基因片段的重组质粒。该质粒以大肠杆菌 HB101 为受体可以再转化, 转化频率为 4.93×10^{-6} , 以枯草杆菌 168 为受体不能实现转化。上述两种受体菌株的原生质体, 经处理, 再生细胞壁后, 分别获得转化子。经原生质体转化, 以大肠杆菌 HB101 为受体的转化频率为 2.7×10^{-4} , 而枯草杆菌 168 为受体也能转化, 转化频率为 2.6×10^{-5} 。以 HB101 为受体的转化子在麦凯凯半乳糖选择平板上呈红色菌落。证明 pKO1-26 质粒在新受体中叶绿体启动基因仍可启动半乳糖激酶基因表达。获得的转化菌株经测定, 以 HB101 为受体的, 遗传性稳定; 而以 168 为受体的, 部分菌株遗传性稳定。

关键词 烟草叶绿体启动基因; 原生质体; 转化

1979 年 Chang 和 Cohen 首次报道了质粒 DNA 对枯草杆菌原生质体的高频转化^[1]。用原生质体转化的方法可使原来不能进行 DNA 转化的种或菌株, 能进行转化, 既可提高转化频率又扩大了基因工程的受体范围。为基因转移和育种提供了新的途径。细菌以原生质体为受体的转化, 已报道了枯草杆菌的染色体或质粒 DNA 对枯草杆菌属的不同种间的转化^[1,2]。对于人为的体外构成的重组质粒, 一般转化频率较低。用原生质体进行转化, 也是提高转化频率, 在不同受体菌中获得转化子的较好方法, 对此方法有待于探索和应用。我们获得了一株大肠杆菌 N100, 该菌株中的 pKO1-26 质粒是在 EcoRI 酶切位点插入了烟草叶绿体启动基因片段。此片段连接在该质粒的半乳糖激酶基因的上游, 可以启动半乳糖激酶结构基因的表达。为了验证该质粒再转化到其他受体菌的可能性, 我们分别以大肠杆菌 HB101 和枯草杆菌 168 原生质体为受体进行了转化实验, 结果不仅在大肠杆菌中以较高频率得到了转化子。在枯草杆菌中也得到了转化子, 扩大了受体范围。本文报道 pKO1-26 质粒 DNA 对上述两菌株感受态细胞转化和原生质体转化的比较, 及转化子性状、稳定性测定和质粒检测等结果。

材料和方法

(一) 菌株

1. 大肠杆菌 (*E. coli*) N100 (galK^- , recA^-) 携带 pKO1-26 质粒, 该质粒是 pKO1 的衍生质粒, 在 pKO1 载体质粒上半乳糖激酶 (galk) 结构基因上游 EcoRI 酶切位点, 插入了烟草叶绿体启动基因片段。具有氨苄青霉素抗性 (Ap^R) 选择标记, 作为质粒 DNA 的供体。详见文献[3]。由美国马里兰州大学提供。

2. 大肠杆菌 (*E. coli*) HB101 (F^- , pro^- , Sm^R , lacY^- , $\text{galk}^- \text{recA}^-$) 具有链霉素抗性 (Sm^R) 标记, 是脯氨酸缺陷型、半乳糖激酶基因缺陷菌株, 对氨苄青霉素敏感 (Ap^S), 用作转化受体 (简称 HB101)。由复旦大学遗传所提供。

3. 枯草杆菌 (*B. subtilis*) 168 (trp^-) 是色氨酸缺陷型菌株, 对氨苄青霉素、链霉素敏感 (Ap^S , Sm^S), 用作转化受体 (简称 168)。由武汉大学生物系提供。

4. 枯草杆菌 (*B. subtilis*) BR151 ($\text{trp}^- \text{met}^- \text{lys}^-$), 携带 pPL603 载体质粒, 该质粒具有氯霉素抗性 (Cm^R) 和新霉素抗性 (Neo^R), 用作质粒 DNA 的供体。由中科院微生物研究所提供。

(二) 培养基

1. 完全培养基(%)：蛋白胨 1，酵母膏 0.5，NaCl 0.5，葡萄糖 0.2，pH 7.2，(固体加 1.5 琼脂)。

2. N-培养基(%)：蛋白胨 1，酵母膏 0.1，NaCl 0.8，CaCl₂·2H₂O 0.03，用于转化实验^[4]。

3. 高渗培养基：固体 LB 培养基加 0.5 mol/L 蔗糖 20mmol/L MgCl₂。

4. 基本培养基(%)：K₂HPO₄ 0.7，KH₂PO₄ 0.2，(NH₄)₂SO₄ 0.1，柠檬酸钠 0.06，VB₁ 0.004，pH 7.2—7.5。再分别加以 0.8 kg/cm² 灭菌 30 分钟的 20% 葡萄糖 2ml，MgSO₄·7H₂O 0.01g。

(三) 有关溶液

1. 制备原生质体用 SMM 溶液：0.5mol/L 蔗糖，20mmol/L MgCl₂，0.2mol/L 顺丁烯二酸。

2. 聚乙二醇(PEG)溶液：40% PEG 溶于 SMM 溶液。

(四) 方法

1. 质粒 DNA 提取：按文献 [5] NaOH-SDS 碱法快速质粒 DNA 制备方法进行。

2. 感受态细胞转化：主要参照文献 [6] 等方法进行。将两种受体菌分别在 N 培养液中生长至对数期 ($A_{590nm} = 0.6-0.8$)，4000r/min 离心 10 分钟收集菌体，用生理盐水洗涤 1 次，细胞再悬浮于 5ml 预冷的 50mmol/L CaCl₂ (pH 8.4) 中。冰浴静置 30 分钟，再离心。重新悬浮于 0.5ml 的 50mmol/L CaCl₂ 溶液中，菌液浓缩 10 倍，取 0.2ml 感受态细胞与 0.1ml 的 pKO1-26 质粒 DNA (约含 1μg) 液混匀冰浴 60 分钟后移置于 42℃ 水浴 2 分钟，再冰浴 10 分钟。立即稀释至 10⁻¹—10⁻³，在含有氨苄青霉素 30μg/ml 的完全培养基上，37℃ 培养两天后观察统计转化子。两种受体菌株及 pKO1-26 质粒 DNA 液要进行对照试验。以同样条件观察在选择培养基上是否有菌生长。pPL603 质粒转化 168 菌株，与上述方法相同。在含新霉素 5μg/ml，氯霉素 5μg/ml 的完全平板上观察统计转化子。转化实验步骤前要测定总菌数。

3. 原生质体的形成及再生：原生质体制备参照文献 [7] 方法，略有改动。将上述分别在 N

培养基中培养至对数期的 HB101 和 168 菌悬液，经离心、洗涤、收集菌体后，再分别悬浮于 SMM 高渗溶液中，使菌体浓缩 5 倍。然后在 HB101 和 168 菌液中分别加入 0.5mg/ml 和 0.2mg/ml 的溶菌酶，42℃ 水浴保温破壁。定时镜检，以杆菌大多数变成球形原生质体为准。

原生质体悬浮液以 SMM 溶液稀释为 10⁻¹—10⁻⁷，取适当稀释度涂布于高渗培养基平板上，37℃ 培养 24—48 小时计数。测定形成原生质体数。原生质体悬浮液以无菌水稀释为 10⁻¹—10⁻³。取适当稀释液涂布于完全培养基平板上，同样培养条件下计数，测定经酶处理后剩余的菌数(即未形成原生质体数)。原生质体形成数及再生数的计算按文献 [7] 方法进行。

4. 原生质体转化：将 0.1ml 的 pKO1-26 质粒 DNA 分别与 0.2ml 的 HB101 和 168 原生质体制备液混合，再加 0.1ml 50mmol/L CaCl₂ 与之混匀，冰浴 1 小时，移至 42℃ 水浴 2 分钟。然后再冰浴 5 分钟，立即用高渗溶液稀释为 10⁻¹—10⁻³。取适当稀释液涂布于含有 30μg/ml 的氨苄青霉素高渗选择平板上。置于 37℃ 培养 24—48 小时观察、计数转化子。

PEG 诱导的原生质体转化：是将 0.1ml 的 pKO1-26 质粒 DNA 分别与 0.2ml 的两种受体菌原生质体悬液混合后，立即加入 1.5ml 40% PEG (MW6000) 在 42℃ 处理两分钟，再以高渗溶液稀释至 10⁻¹—10⁻²，取各稀释液在含上述抗生素的高渗选择平板上观察、计数转化子。培养条件同上。

结果与讨论

(一) 感受态细胞转化

为了比较感受态细胞转化与原生质体转化两者的差别，我们首先以 pKO1-26 质粒 DNA 分别对 HB101 和 168 两种受体菌进行感受态细胞转化。并以枯草杆菌中质粒 pPL603 转化 168 感受态细胞作为对照。转化结果见表 1。pKO1-26 质粒尽管是插入了烟草叶绿体 DNA 外源基因片段，但由于它是大肠杆菌中的质粒，因而在另一大肠杆菌受体中以 10⁻⁴ 频率得到了

表 1 感受态细胞的转化

受体菌	质粒 DNA	细菌总数	转化子数活菌数/ml	转化频率
HB101	pKO1-26	7.95×10^8	3.92×10^3	4.93×10^{-6}
168	pKO1-26	5.51×10^8	0	0
168	pPL603	3.4×10^8	4×10^1	1.2×10^{-7}

转化子。而以 168 为受体进行转化, 没有得到转化子。但是枯草杆菌中 pPL603 质粒转化 168 菌株以 10^{-7} 频率得到转化子。说明枯草杆菌 168 菌株的感受态细胞不能做为大肠杆菌中质粒 DNA 转化受体。

(二) 原生质体的形成和再生

用 0.2mg/ml 溶菌酶处理 168 菌株 1 小时左右即可破壁。而 HB101 菌株用 0.5mg/ml 溶菌酶处理大约 2 小时方能破壁。在光学显微镜下观察大约 80% 左右由杆状变成圆球状, 还有些破壁不完全而近似于球形。原生质体的形成率和再生率见表 2。表 2 中两株原生质体的形成率均很高, 达 99%, 而直接观察到的原生质体形成率比表 2 计算的要低。原生质体再生率却较低, HB101 菌株仅 6.03%, 168 菌株为 23.5%。这种现象可能与部分菌体破壁不完全有关。因而在光镜下虽看到一些破壁不完全未

呈圆球形的菌体, 但在无菌水稀释液中由于受低渗液影响, 与原生质体一样被胀破, 不能存活, 只极少数未破壁的菌体存活下来。这样在计算形成率时数值自然偏高。而在高渗培养基中受高渗基质影响, 可能未完全破壁的细胞也不能存活和再生, 因而再生率较低(当然还有其他条件因子的影响)。原生质体在高渗培养基中再生后, 均形成透明露珠状菌落。

(三) 原生质体转化

以 pKO1-26 质粒 DNA 分别对 HB101 和 168 受体进行原生质体转化和 PEG 诱导的原生质体转化。在含氨基青霉素的高渗平板上, 别分获得转化子, 转化频率见表 3。

原生质体转化与 PEG 诱导的原生质体转化, 两者的转化频率, 后者比前者提高了 2.4 和 1.9 倍。与感受态细胞转化相比较, 转化频率提高了, HB101 菌株转化频率为 10^{-4} , 168 菌株

表 2 原生质体形成和再生

菌株	溶菌酶 毫克/ml	培养基	未经酶处理的总 菌数 活菌数/ml	经酶处理后剩余 的菌数 活菌数/ml	原生质体 (%)	再生菌	
						活菌数/ml	再生菌(%)
HB101	0 0.5	完全培养基 高渗培养基	7.95×10^8	5.08×10^4	99.9	4.8×10^7	6.03
168	0 0.2	完全培养基 高渗培养基	5.51×10^8	1.16×10^4	99.9	1.3×10^8	23.5

表 3 原生质体的转化

受体菌	大肠杆菌 质粒 DNA	原生质体再生菌 数 活菌数/ml	原生质体转化转化子数		PEG 诱导原生质体转化转化子数	
			活菌数/ml	转化频率	活菌数/ml	转化频率
HB101	pKO1-26	4.8×10^7	1.3×10^4	2.7×10^{-4}	3.2×10^4	6.7×10^{-4}
168	pKO1-26	1.3×10^8	3.4×10^3	2.6×10^{-5}	6.35×10^3	4.9×10^{-5}

表 4 转化子性状测定

菌 株	转化方式	基本培养基 (-)	补充培养基		抗 药 性		
			(-) + trp	(-) + pro	Sm	Ap. Sm	Ap
HB101		-	-	+	+	-	-
Ept 转化子 7 株	原生质体转化	-	-	+	+	+	+
Ep 转化子 5 株	PEG 诱导转化	-	-	+	+	+	+
168		-	+	-	-	-	-
Bpt 转化子 5 株	原生质体转化	-	+	-	-	-	+
Bp 转化子 4 株	PEG 诱导转化	-	+	-	-	-	+

Ept } 转化子: 分别代表以 *E. coli* HB101 和 *B. subtilis* 168 的原生质体转化获得的转化子。

Bpt }
Ep } 转化子: 分别代表上述两菌株 PEG 诱导原生质体转化所获得的转化子。
Bp }

Ap: 氨苄青霉素, Sm: 链霉素, (-): 基本培养基, trp: 色氨酸, pro: 脯氨酸, +: 菌株生长或对抗生素具有抗性, -: 菌株不生长或对抗生素敏感。

为 10^{-5} 。尽管后者转化频率不高,但也能做为受体实现转化。在高渗选择平板上以 168 菌株为受体的转化子再生菌落如图 1。

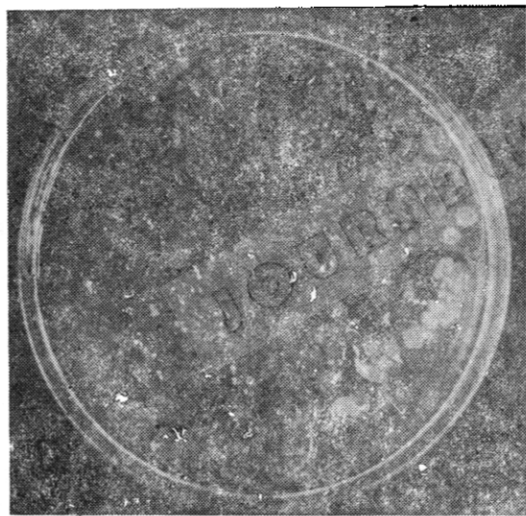


图 1 在高渗选择平板上以 168 菌株为受体的转化子再生菌

(四) 转化子的性状测定

从上述转化所获得的转化子中,随机挑选了 21 株,分别按表 4 的内容进行生长谱测定和抗药性测定。结果营养缺陷型标记分别与受体菌标记完全相符。并且均具有 pKO1-26 质粒的氨苄青霉素抗性标记。见表 4。

从中再随机挑选出转化子 9 株,快速抽提质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外光下检测,可见所有的转化子质粒 DNA

带与 pKO1-26 质粒 DNA 带在电泳图谱中迁移位置相同。而 HB101 和 168 受体菌中没有质粒 DNA 带(图 2)。

大肠杆菌 HB101 菌株是半乳糖激酶缺陷 (*galK*⁻) 菌株,以 HB101 为受体的转化子由于存在 pKO1-26 质粒 DNA,该质粒上的半乳糖激酶结构基因的上游连接着烟草叶绿体启动基因片段,如果该启动基因能启动 *galK* 基因在受体菌中表达,那么该转化子菌株应转变为 *galK*⁺ 菌株。我们将 HB101 菌株、N100(pKO1-26) 菌株及以 HB101 为受体的转化子 Ep3、Ep5 划线接种于麦康凯(MacConkey) 半乳糖选择平板上,在 37℃ 培养 24—48 小时,观察平板上菌落颜色反应。结果是: HB101 菌株呈白色菌落,表明为 *galK*⁻ 菌株,而 N100(pKO1-26) 及转化子 Ep3、Ep5 均为红色菌落,表明为 *galK*⁺ 菌株。这一结果证明 pKO1-26 质粒经转化在新的受体菌中叶绿体启动基因片段仍可启动半乳糖激酶基因表达。

(五) 转化子的稳定性

将在选择平板上选出的四种初发转化菌株接种于完全培养液,培养过夜。在完全平板上分离单菌落,然后再分别逐个用牙签将单菌落点样于选择平板上,培养后观察生长情况。结果表明,以 HB101 为受体的 Ept、Ep 转化子 100% 均能在选择平板上生长(表 5)。说明重组质粒

表 5 转化菌株的稳定性初次测定

菌 株	转化方式	选择培养基	生长情况		
			点菌样数	生长菌数	百分比(%)
HB101		(+)+Ap+Sm	10	0	0
Ept 转化子	原生质体转化	(+)+Ap+Sm	300	300	100
Ep 转化子	PEG 诱导转化	(+)+Ap+Sm	100	106	100
168		(+)+Ap	10	0	0
Bpt 转化子	原生质体转化	(+)+Ap	100	13	13
Bp 转化子	PEG 诱导转化	(+)+Ap	200	115	58

(+)：完全培养基

表 6 转化菌株保存一年后的稳定性测定

菌株	选择培养基	生 长 情 况		
		测定菌株数	生 长 数	百分比(%)
HB101	(+)+Ap+Sm	1	0	
Ept、Ep 转化子	(+)+Ap+Sm	4	4	100
168	(+)+Ap	1	0	
Ept、Bp 转化子	(+)+Ap	6	6	100

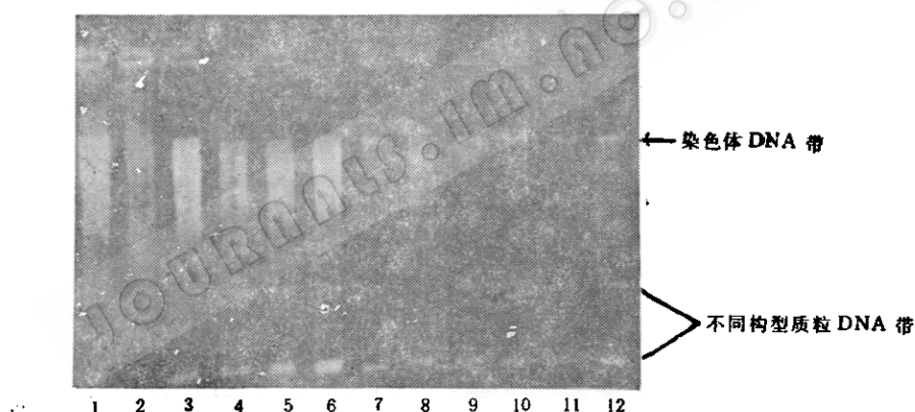


图 2 pKO1-26 质粒及转化子质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

1. *B. subtilis* 168 DNA; 2. *E. coli* HB101 DNA; 3—6. 以 168 原生质体为受体的转化子 DNA (即 Bpt 1 号 4 号和 Bp 1 号 8 号); 7—11. 以 HB101 原生质体为受体的转化子 DNA (即 Ept 1 号 7 号和 Ep 1 号 3 号 5 号); 12. N100 (pKO1-26) DNA

在新的 *大肠杆菌* 中是稳定的; 而以 168 为受体的 Bpt、Bp 转化子分别有 13% 和 58% 在选择平板上生长。说明有些菌株中重组质粒不稳定。但从选择平板上经过抗性检测而获得的转化菌株中选出 30 余株, 连续在选择平板上传四代, 再进行抗性测定均具抗性标记。一年后再次进行稳定性测定证明以 HB101 为受体的转化子遗传性稳定, 而以 168 为受体的转化中, 部分菌株遗传性稳定。

参 考 文 献

- [1] Chang, S. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **168**:111—115, 1979.
- [2] 郭兴华等: *微生物学报*, **22**: 263—268, 1982.
- [3] Kong, X. F. et al.: *Gene*, **31**:23—30, 1984.
- [4] 董可宁: *遗传学报*, **11**(6): 423—433, 1984.
- [5] Thoman, J. et al.: «Experiments with gene fusions» procedure **29**, 147—148, 1984.
- [6] 陈孝康等: *遗传学报*, **6**(3):255—260, 1979.
- [7] 江行娟等: *遗传学报*, **8**(1): 1—7, 1981.
- [8] Schaeffer, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**:2151—2155, 1976.