

## 西藏土壤中分离的链霉菌含有丰富的 线型和环型质粒

代玉梅<sup>1</sup> 杨勇<sup>1</sup> 范云<sup>1</sup> 周敏<sup>1</sup> 沈美娟<sup>1</sup> 钟莉<sup>1</sup> 蔡晓布<sup>2\*</sup> 覃重军<sup>1\*</sup>

- (1. 中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所合成生物学重点实验室 上海 200032)  
(2. 西藏农牧学院资源与环境学院 西藏 林芝 860000)

**摘 要:** 【目的】研究极端自然环境对链霉菌线型和环型质粒分布的影响。【方法】从西藏高原采集了 20 份土壤样品, 分离和初步鉴定链霉菌, 提取和检测质粒 DNA。【结果】从中分离到 46 株链霉菌, 其中有 23 株菌含有 1-4 个线型质粒, 大小在 19-650 kb 之间, 8 个菌株含有 1-4 个环型质粒, 大小在 4-80 kb 之间。【结论】西藏土壤来源的链霉菌含有大量的、多样的线型质粒和环型质粒, 暗示极端环境中诸如强紫外辐射等可能会引发 DNA 损伤和修复, 进而造成质粒的多样性。

**关键词:** 链霉菌, 线型质粒, 环型质粒

## Abundance of linear and circular plasmids among *Streptomyces* strains from Tibet plateau of China

DAI Yu-Mei<sup>1</sup> YANG Yong<sup>1</sup> FAN Yun<sup>1</sup> ZHOU Min<sup>1</sup> SHEN Mei-Juan<sup>1</sup>  
ZHONG Li<sup>1</sup> CAI Xiao-Bu<sup>2\*</sup> QIN Zhong-Jun<sup>1\*</sup>

- (1. Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)  
(2. Department of Resources and Environment, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi, Tibet 860000, China)

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CBA00801); 国家自然科学基金项目(No. 31121001); 中国科学院知识创新工程项目(No. KSCX2-EW-G-13)

\*通讯作者: 覃重军: Tel: 86-21-54924171; 函: qin@sibs.ac.cn

蔡晓布: 函: caitw21@sohu.com

收稿日期: 2012-02-02; 接受日期: 2012-03-05

**Abstract: [Objective]** Investigation of occurrence of *Streptomyces* linear and circular plasmids in some extremely natural habitats. **[Methods]** Twenty soil samples from the Tibet plateau of China were collected, *Streptomyces* strains were identified and plasmids were isolated. **[Results]** Forty-six *Streptomyces* strains were obtained and, surprisingly, half of them harbored from one to four linear plasmids of 19–650 kb, and eight strains contained from one to four circular plasmids of 4–80 kb. **[Conclusion]** The abundance and diversity of linear and circular plasmids in *Streptomyces* strains from Tibet suggests that the extreme environmental stress, such as highly solar radiation, might induce DNA damage and repair to promote formation of varied plasmids.

**Keywords:** *Streptomyces*, Linear plasmid, Circular plasmid

链霉菌是一大类高 GC 含量、产生菌丝体的革兰氏阳性细菌。与其他细菌相似的是,链霉菌含有 3.7–163 kb 的环型质粒<sup>[1–2]</sup>,链霉菌的环型质粒通常都较小(8–14 kb),包括滚环复制的质粒和染色体整合/自主游离复制的质粒<sup>[3]</sup>;与其他细菌不同的是,链霉菌还含有线型质粒和线型染色体<sup>[4–5]</sup>,线型染色体和线型质粒的 5'端共价结合了端粒蛋白<sup>[6]</sup>,一般链霉菌线型质粒的大小在 12–500 kb 之间<sup>[7–8]</sup>。

为了研究极端自然环境对链霉菌质粒的丰度和分布的影响,我们选择青藏高原作为样品采集地点。青藏高原的独特性在于强辐射、低氧、低温以及干旱。有趣的是,从这些样品分离到的链霉菌含有丰富的线型质粒,其中一株菌含有的质粒多达 4 个。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株的分离和鉴定

采集的土壤样品用无菌水稀释后涂布在 YMS 培养基(可溶性淀粉 4 g, 麦芽膏 10 g, 酵母膏 4 g, 加水定容至 1 L, pH 7.0), 于 30 °C 培养 7 d, 进行分离和纯化。菌株用 Tryptone-Soya-Broth 液体培养基于 30 °C 培养 1–2 d 后, 离心收集菌丝体, 参照文献[9]的方法提取基因组的 DNA。利用

16S rRNA 基因保守区设计一对引物(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 5'-TCAGGCTACCTGTTACGACTT-3'), 加入 dNTPs 和 *Taq* 聚合酶进行 PCR 扩增, 条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用试剂盒纯化后, 进行测序(上海基康公司)。序列比对使用美国生物信息中心的分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

### 1.2 质粒的提取和检测

链霉菌的菌丝体用 Tryptone-Soya-Broth 液体培养基于 30 °C 培养 1–2 d 后离心收集, 基因组总 DNA 和环型质粒提取方法参照文献[9], 线型质粒的提取则将菌丝体制成胶块后用蛋白酶 K 消化、进行脉冲场凝胶电泳<sup>[8]</sup>。为了确定线型质粒的大小和数目, 分别在 3 种条件下进行脉冲场凝胶电泳, 转换时间(Switch time)分别为 10–60 s、50–90 s 及 500 s, 电泳时间均为 24 h。

## 2 结果与讨论

### 2.1 青藏高原土壤中分离到的链霉菌菌株含有丰富的线型和环型质粒

从青藏高原的不同地区收集了 20 份土壤样品(表 1), 这些样品采集地区分布在北纬 29°39'–31°69'、东经 91°09'–97°56'、海拔在

3031 m–5191 m 之间。这些分离到的菌株的 16S rRNA 基因经过测序比对, 与其他已知的链霉菌菌株的同源性达 97% 以上, 因此初步归属于链霉菌属。从其中的 17 份土壤样品中分离得到了 46 株链霉菌, 从大部分的样品中只分离到 1–2 株菌, 在 3 份土壤样品中没有分离到链霉菌。用琼脂糖

凝胶电泳和脉冲场凝胶电泳检测了内源质粒的存在情况, 如表 1 所显示, 新分离到的链霉菌菌株中有 1/2 (即 23/46) 含有线型质粒, 8 株菌含有环型质粒。从高海拔(如 4 572 m–5 191 m)和沙石土壤中分离到的链霉菌含有线型质粒的比例高达 80% (8/10)。

表 1 总结土壤样品采集、链霉菌分离和质粒的检测

Table 1 Summary of collecting soil samples, isolating *Streptomyces* strains and detecting their indigenous plasmids

样品号 Sample numbers	采样地点 Collection places				分离到链霉菌数目 Isolation of <i>Streptomyces</i> strains	含有线型质粒的链霉菌 Strains harboring linear plasmids	含有环型质粒的链霉菌 Strains harboring circular plasmids
	北纬 North latitude	东经 East longitude	海拔 Elevation (m)	土壤特点 Soil character			
CD-2	29°40'	94°19'	3 031	Weedy land	6	1	2
CD-3	29°40'	94°19'	3 034	Watery and weedy land	0	–	–
NT-1	29°40'	94°19'	3 058	Agricultural field	2	1	1
NT-2	29°40'	94°19'	3 064	Agricultural field	5	4	0
NT-3	29°40'	94°19'	3 069	Agricultural field	0	–	–
CD-1	29°40'	94°18'	3 121	Weedy land	4	1	1
SL-1	31°49'	94°18'	3 161	Forest land	3	1	0
SL-2	31°49'	94°18'	3 206	Forest land	0	–	–
SL-3	31°49'	94°18'	3 224	Forest land	2	2	0
X2	29°39'	91°08'	3 650	Watery and weedy land	0	–	–
X4	31°05'	97°14'	4 334	Sandy and stony land	4	2	0
ZC	31°34'	91°49'	4 556	Sandy land	5	2	0
Q	31°34'	91°49'	4 559	Sandy land	1	0	1
Z	31°34'	91°49'	4 560	Sandy land	2	1	0
Y	31°34'	91°49'	4 561	Sandy land	2	0	0
X3	31°69'	97°56'	4 572	Sandy and stony land	4	4	2
ZC-4700	31°49'	91°43'	4 782	Stony land	2	1	1
Q-4700	31°49'	91°21'	4 789	Stony land	1	0	0
Y-4790	31°49'	91°43'	4 795	Stony land	2	2	0
X1	30°68'	91°09'	5 191	Sandy and stony land	1	1	0
					46	23	8

## 2.2 线型和环型质粒的多样性

如图 1 的脉冲场凝胶电泳所示, 大部分线型质粒带的大小不一, 仅有很少一部分相同, 并且在一些泳道上有多个 DNA 带。采用了 3 种脉冲场凝胶电泳条件来检测线型质粒大小和数目, 表 2 统计结果显示, 在 23 株含有线型质粒的菌株中, 12 株菌含有 1 个线型质粒, 而另外的 11 株则含有多个线型质粒, 其中 4 株含有 2 个、6 株含有 3 个、1 株含有 4 个线型质粒。线型质粒的大小在 19–650 kb 之间。

为验证共价闭合环型质粒, 分别用 1% SDS 中性方法提取总 DNA 和以碱法 (1% SDS, 0.15 mol/L NaOH) 提取质粒 DNA, 一起进行常规的凝胶电泳。在 8 株菌中发现了大小在 4–80 kb

之间的环型质粒, 其中 7 株菌含有 1–2 个, 而 X335 含有 4 个环型质粒 (表 2)。

## 3 讨论

已有报道链霉菌线型和环型质粒的丰富度和分布具有多样性, 如从随机采取的土壤样品分离到的 100 株链霉菌中有 12 株含有内源线型质粒, 有 8 株含有环型质粒<sup>[10–11]</sup>; 从农田土地和森林土壤分离的 147 株链霉菌中检测到 6 个环型质粒<sup>[12]</sup>。本研究中我们从西藏高原土壤样品中新分离到 46 株链霉菌, 其中 23 株含有线型质粒, 8 株含有环型质粒, 均高于前人报道的比例, 尤其是含有线型质粒的比例。对于含有线型质粒的链霉菌而言, 前人报道 12 株菌中只有 2 株含有多个 (2 个以

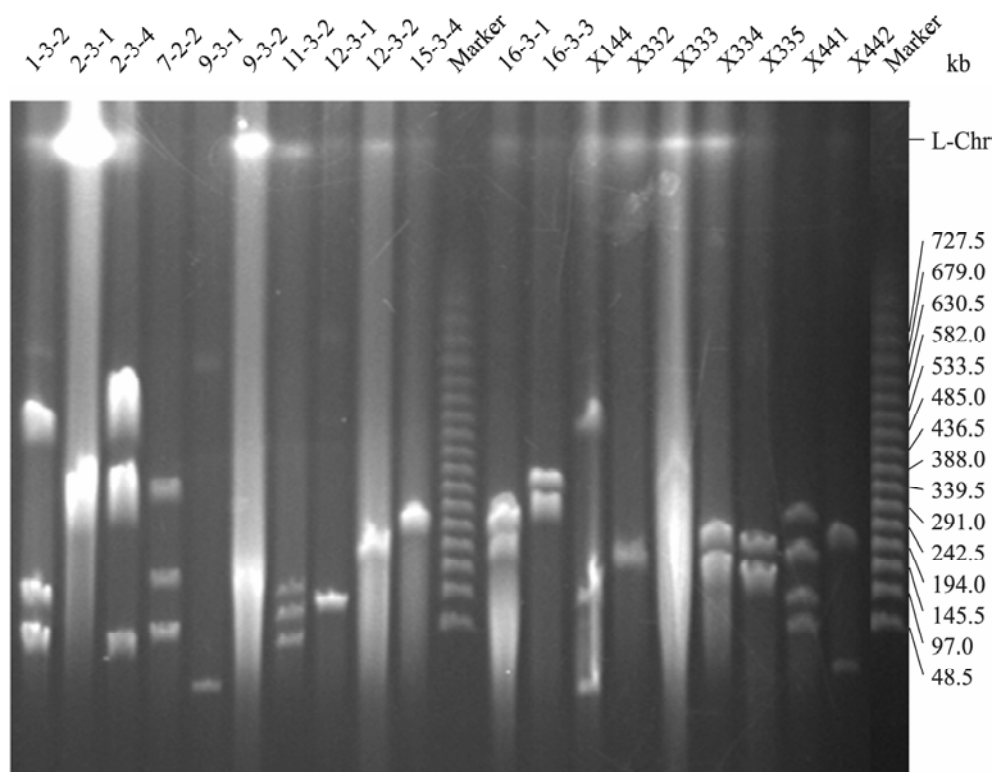


图 1 从链霉菌菌株中检测线型质粒 DNA

Fig. 1 Detection of linear plasmids among *Streptomyces* strains

Note: *Streptomyces* strains were cultured in liquid medium, and mycelium was harvested and embedded in plugs of low-melting-point agarose. After digestion with lysozyme followed by proteinase K/SDS, the plugs were electrophoresed on pulsed-field gel in a 1.0% agarose gel at 6 V/cm and 50–90 sec switch time for 24 h. Strain numbers and DNA markers are showed. DNA bands of possible linear chromosomes are indicated (L-Chr).

表 2 总结在新分离的链霉菌中检测到的线型和环型质粒

Table 2 Summary of detecting linear and circular plasmids among the newly isolated *Streptomyces* strains

样品号 Sample numbers	菌株号 Strain numbers	线型质粒 Linear plasmids (kb)	环型质粒 Circular plasmids (kb)
CD-2	5-3-2	38	12
	5-3-4		25, 15
NT-1	1-3-2	550, 120, 50	80
NT-2	2-3-1	350	
	2-3-2a	240	
	2-3-2b	160	
	2-3-4	650, 400, 45	
CD-1	4-3-1a		25
	4-3-1b	160	
SL-1	7-2-2	350, 150, 50	
SL-3	9-3-1	25	
	9-3-2	130	
X4	X441	300, 200, 100, 50	
	X442	250, 28	
ZC	16-3-1	270, 200	
	16-3-3	380, 330	
Q	13-3-1		15
Z	15-3-4	290	
X3	X332	200	
	X333	350	
	X334	230, 160	60
	X335	220, 159, 148	50, 40, 20, 4
ZC-4700	11-3-2	159, 114, 66	15, 5
Y-4790	12-3-1	100	
	12-3-2	200	
X1	X144	550, 130, 19	

上)线型质粒<sup>[10]</sup>, 而西藏土壤来源的含有线型质粒的 23 株链霉菌中有 11 株含有多个线型质粒。这些结果显示, 自然界中线型和环型质粒可能并不是随机分布的。西藏高原来源链霉菌中存在质粒的广泛性和多样性, 尤其是那些来源于沙、石和高海拔地域的更为明显, 这或许反应了质粒适应

特殊生境(如高辐射可能造成 DNA 损伤)的结果。

我们的实验(表 2)显示, 除了 X335 外, 菌株中同时含有线型质粒比含有环型质粒多。可能的原因是从一个线型质粒通过缺失或增加外源片段形成一个新的线型质粒, 只需要一次重组交换, 而从线型染色体或线型质粒环化出一个环型

质粒则需要两次重组交换, 显然后者的概率低于前者。在实验室培养条件下, 在线型质粒端粒损伤或者 DNA 断裂后, 一般可通过同源重组、非同源末端环化和非同源链内折返方式进行修复, 而这些修复方式将会在一个链霉菌群体中产生多种线型或环型质粒<sup>[13]</sup>。这或许可以解释我们上面看到的一个细胞中共存多个质粒的现象, 进一步的研究需要对这些质粒进行测序, 或许序列能提供质粒进化的有用信息。

致谢: 感谢龚瑞志为我们采集了部分土壤样品。

## 参 考 文 献

- [1] Bolotin AP, Sorokin AV, Aleksandrov NN, et al. DNA nucleotide sequence of the actinomycete plasmid pSB24.2[J]. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1985, 283(4): 1014-1017.
- [2] Yamasaki M, Ikuto Y, Ohira A, et al. Limited regions of homology between linear and circular plasmids encoding methylenomycin biosynthesis in two independently isolated streptomycetes[J]. Microbiology, 2003, 149(5): 1351-1356.
- [3] Hopwood DA, Kieser T. Conjugative plasmids of *Streptomyces*[A]//Clewell D B. Bacterial Conjugation[M]. New York: Plenum Press, 1993: 293-311.
- [4] Hayakawa T, Tanaka T, Sakaguchi K, et al. A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1979, 25(4): 255-260.
- [5] Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, et al. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear[J]. Molecular Microbiology, 1993, 10(5): 923-933.
- [6] Bao K, Cohen SN. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*[J]. Genes and Development, 2001, 15(12): 1518-1527.
- [7] Keen CL, Mendelovitz S, Cohen G, et al. Isolation and characterization of a linear DNA plasmid from *Streptomyces clavuligerus*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1988, 212(1): 172-176.
- [8] Kinashi H, Shimaji M, Sakai A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes[J]. Nature, 1987, 328(6129): 454-456.
- [9] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [10] Zhang R, Yang Y, Fang P, et al. Diversity of telomere palindromic sequences and replication genes among *Streptomyces* linear plasmids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5728-5733.
- [11] Zhang R, Zeng A, Fang P, et al. Characterization of replication and conjugation of *Streptomyces* circular plasmids pFP1 and pFP11 and their ability to propagate in linear mode with artificially attached telomeres[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(11): 3368-3376.
- [12] Koraki TG, Karagouni AD. Occurrence and diversity of plasmids in populations of streptomycetes in soil[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 78(3/4): 323-329.
- [13] Qin ZJ, Cohen SN. Survival mechanisms for *Streptomyces* linear replicons after telomere damage[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(3): 785-794.