

大肠杆菌抗药性质粒 R144drd3 温度敏感突变型的分离¹⁾

孔祥福 郑晓冬 聂晶 陈新

(哈尔滨师范大学生物系)

温度敏感突变型可用于研究 DNA 复制的控制机制,也可用于测定质粒的拷贝数,还可作为遗传分析研究的工具。抗药性质粒 R144drd3 是去阻遏、抗卡那霉素、 f_i^- 质粒,转移频率在 10^{-3} — 10^{-1} 之间,是国内外实验室在分子遗传学研究中常用的抗药性质粒。

我们用整体诱变的方法,获得了抗药性质粒 R144drd3 温度敏感突变型。对其中一菌株进行温度敏感效应测定,42°C 表现温度敏感。进行温度敏感部位测定,结果证明,大肠杆菌抗药性质粒 R144drd3 经诱变剂亚硝基胍处理后产生的温度敏感突变型属于抗性基因温度敏感突变型。回复突变频率为 4.5×10^{-8} 。

材料和方法

(一) 细菌菌株与质粒

菌株 *E. coli* J5-3 $met^- pro^-$ 由复旦大学遗传学研究所提供; *E. coli* 62^{Nal^r} 由中国科学院上海植物生理研究所提供。

质粒 R144drd3 由复旦大学遗传学研究所提供。

(二) 试剂与培养基

诱变剂 亚硝基胍 (NTG)。

培养基 LB 培养基(蛋白胨 10g、NaCl 5g、葡萄糖 2g、酵母膏 5g、琼脂 15g,蒸馏水 1000 ml, pH7.0)。

培养液 LB 不加琼脂, pH7.0。

筛选平板 LB 加入卡那霉素(30 μ g/ml)。

(三) 诱变及筛选

将 J5-3/R144drd3 接种于 5ml LB 培养液

中,30°C 培养至对数期,离心取沉淀悬于 5ml NTG (100 μ g/ml 溶于 pH = 7 磷酸缓冲液中)处理 2 小时。将细胞悬液离心去上清液,沉淀悬于 5ml LB 培养液中,30°C 培养 24 小时后将培养物作不同浓度稀释,涂于 LB 平板上,置 30°C 培养长出的菌落用灭菌牙签分别接种于含药与不含药平板上,置 42°C 和 30°C 培养 16 小时,选出在 42°C 含药平板上不能生长,而能在 42°C 无药平板和 30°C 含药平板上生长的菌落。

(四) 温度敏感突变性质粒 R144drd3 的转移

将温度敏感突变株 *E. coli* J5-3/R144drd3 ts 作为供体,以 *E. coli* 62^{Nal^r} 为受体,分别培养 16 小时后各取 0.5ml 加入到含有 4ml LB 肉汤中培养 6 小时,然后在含有嘌呤酮酸和卡那霉素的培养基上划线,30°C 培养 16 小时后取单菌落、获得转移子。

(五) 温度敏感突变部位测定

将对数生长期的 J5-3/R144drd3 ts 接种于 LB 培养液中,置 42°C 振荡培养,每隔 1 小时取样,分别涂于含药和不含药平板上,30°C 和 42°C 分别培养,以接种细菌于培养基时为零,统计不同时间的活菌总数及其中的耐药细胞数。

将在 42°C 无药平板上生长的同一菌株用灭菌牙签分别接种于含药和不含药平板上,置

Kong Xiangfu et al.: Isolation of Temperature-sensitive Mutants in Drug-resistant Plasmid R144drd3 of *Escherichia coli*

1) 在工作中曾得到复旦大学遗传学研究所陈孝康老师的热情指导,特此致谢!

30℃ 培养, 观察其生长情况。

将转移子 $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ 培养至对数期, 分别涂于含药和不含药平板上, 置 42℃ 培养 16 小时后观察, 然后将 42℃ 不含药平板上生长的菌落再分别涂于含药和不含药平板上, 置 30℃ 培养, 观察其生长情况。

(六) 温度敏感突变株回复突变频率的测定

将对数生长期的突变株 J5-3/R144drd3 ts 稀释成不同浓度, 分别涂于含药和无药平板上, 置 42℃ 培养, 统计含药平板上长出的菌落数。

结 果

(一) 大肠杆菌 J5-3/R144drd3 ts 温度敏感效应

在处理的存活细胞中, 随机挑出 1 万个菌落, 经温度敏感测定, 获得 7 个温度敏感突变株。这些突变株在 30℃ 含药培养基中能正常生长, 而在 42℃ 含药培养基中则不能生长。将其接种于无药培养基上, 即使 42℃ 时亦能正常生长 (见表 1)。

表 1 突变株 J5-3/R144drd3 ts 和转移子 $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ 温度敏感效应

| 菌 种 | 温 度 | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|
| | 30℃ | | 42℃ | |
| | (+) | (-) | (+) | (-) |
| <i>E. coli</i> J5-3/R144drd3 ts | + | + | - | + |
| <i>E. coli</i> $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ | + | + | - | + |

注: (+) 示加 Ka 30 μg/ml, (-) 示无药, + 示菌生长, - 示菌不生长。

(二) 突变型质粒的转移试验

为了进一步证明温度敏感突变部位发生在质粒 DNA 上, 我们又将突变体的质粒转移到新的寄主进行观察, 用细胞杂交的方法, 以大肠杆菌 62^{NaI^r} 为受体, 以 NaI 和 Ka 为选择标记, 获得转移子 $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ 。从转移子中随机挑出 50 个单菌落, 分别观察在不同温度下对药物

的敏感情况, 结果表明, 当 R144drd3 ts 转移到新的寄主后, 致使新的寄主也表现出与供体一样的温度敏感性状 (见表 1、2)。

(三) 突变株 J5-3/R144drd3 ts 和转移子 $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ 在不同温度下的耐药情况

将获得的 J5-3/R144drd3 ts 和 $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ 温度敏感突变株分别接种在 30℃、37℃ 和 42℃ 的固体培养基上。观察其耐药情况, 发现这株突变体在 30℃、37℃ 的含药平板和 42℃ 无药平板上均能正常生长, 而在 42℃ 的含药平板上则不能生长, 这一结果表明, 此突变株的耐药性对温度是敏感的, 在非允许温度条件下, 其耐药性便会丧失 (见表 2)。

表 2 突变株 J5-3/R144drd3 ts 和转移子 $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ 在不同温度下耐药情况

| 菌 种 | 温 度 | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 30℃ | | 37℃ | | 42℃ | |
| | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) |
| <i>E. coli</i> J5-3/R144drd3 ts | + | + | + | + | - | + |
| <i>E. coli</i> $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ | + | + | + | + | - | + |

(四) 质粒突变部位的测定

质粒的温度敏感突变, 如果发生在抗性基因部位, 那么, 将高温无药平板上的突变株转接在 30℃ 含药和无药平板上都能生长。如果是复制部位的温度敏感, 则在 42℃ 不含药平板上生长的突变株, 转入 30℃ 含药平板上不能生长。取 42℃ 无药平板上的菌落转接在 30℃ 含药平板培养 24 小时后, 发现都能生长, 结果与抗性基因温度敏感突变型表现一致。 $62^{NaI^r}/$

表 3 温度敏感突变株 J5-3/R144drd3 质粒突变部位的测定

| 菌种 (在 42℃ 无药 平板上培养过的) | 温 度 | |
|--|-----|-----|
| | 30℃ | |
| | (+) | (-) |
| <i>E. coli</i> J5-3/R144drd3 ts | + | + |
| <i>E. coli</i> $62^{NaI^r}/R144drd3\ ts$ | + | + |

R144drd3 ts 用同样方法进行测定, 结果相同(见表 3)。

将对数生长期的 J5-3/R144drd3 ts 接种于 LB 培养液中, 置 42°C 振荡培养, 每小时取一次菌液, 分别涂于无药和含药平板上, 置 30°C、42°C 分别培养。无药平板上长出的菌落数代表活菌总数, 在含药平板上长出的菌落数代表耐药细菌数。经过 9 个小时, 测生长曲线。观察结果表明, 42°C 无药平板上长出的菌落数随着时间的增加而变化, 含药平板上均无菌落出现, 而 30°C 加药和无药的生长曲线基本一致(图 1)。这就进一步证明了温度敏感突变部位是发生在质粒 DNA 的抗性基因部位。

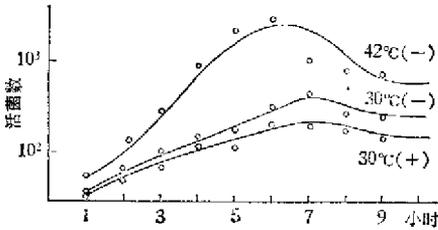


图 1 *E. coli* J5-3/R144drd3 ts 在 42°C、30°C 时的生长曲线
注: (+) 加 Ka30 µg/ml, (-) 无药。

讨 论

用 NTG (100 µg/ml) 2 小时处理 1 万个菌株中获 7 个温度敏感突变型, 突变频率为 10⁻⁶。我们用不同浓度的 NTG 和不同时间处理获得的突变频率均低于 10⁻⁶。把发生突变的质粒转

移到新的寄主细胞中, 新的寄主细胞也表现了抗药的温度敏感的性状, 这说明了温度敏感突变是发生在质粒 DNA 上。

把突变株 J5-3/R144drd3 ts 和 62^{NaI}/R144drd3 ts 菌株分别接种于 42°C 无药平板上, 12 小时后, 转接到 30°C 含药平板上, 表现了耐药性质。这又说明 J5-3/R144drd3 ts 突变部位是在质粒的抗性基因内部, 因为复制基因温度敏感突变株在非允许温度下, 质粒不能复制, 故菌株也就失去了抗药性, 因而 42°C 无药平板上生长的菌落转接到 30°C 含药平板上, 菌株不能生长。而抗性基因温度敏感突变株在非允许温度下, 不加药平板上质粒仍能复制, 但抗性基因处于敏感状态。当把 42°C 无药平板上生长的菌落接种在 30°C 加药平板上时, 由于质粒仍然存在, 而抗药基因处于非温度敏感状态, 故菌落仍能生长。由此我们认为突变株 J5-3/R144drd3 ts 属于抗性基因温度敏感突变型。

我们获得的温度敏感突变株回复突变频率是在 4.5 × 10⁻⁸, 这说明这一突变型比较稳定。

参 考 文 献

- [1] 王二力等: 1980. 遗传学报, 7(4): 307—311.
- [2] 松原謙一: 1976. 质粒, 第 92—96 页, 第 147—148 页.
- [3] Miller. J. H., 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, p. 235—245.
- [4] Meynell. E., 1967. *Nature*, 214:885.

《遗传》第五卷第二期要目

谈谈遗传学中若干基本问题: 四、胚胎发育与遗传信息

化学诱导水稻单性生殖的研究

马铃薯叶肉细胞再生植株初报

应用 Percoll 密度梯度离心分离不同类型花粉粒

用改良的酸酚法制备高纯度质粒 DNA

受照离体人血培养物 FPG 的细胞遗传学观察

支气管哮喘与遗传(附 265 个家系分析)

中国四个民族的 ABO 与 MN 血型分布

地方性克汀病遗传因素调查

植物遗传工程: (六)植物遗传工程技术的应用