

整合及游离状态的链霉菌质粒 pLE1 的研究

唐莉 王以光 龚利民

(中国医学科学院医药生物技术研究所,北京)

质粒 pLE1 以整合形式存在于宿主菌变青链霉菌染色体上,通过 DNA 转化宿主菌原生质体,导致了宿主染色体上的整合序列的环出而形成游离质粒 DNA 分子。初步探讨了质粒 pLE1 的理化特性,确认 pLE1 与质粒 pIJ101 是同一系列。

关键词: 链霉菌,质粒, DNA 转化, DNA 分子杂交, 整合及游离态 DNA

质粒存在于许多链霉菌中,一些质粒以自主复制的游离形式存在于宿主菌中,而有些质粒,如天蓝色链霉菌质粒 SCp1,则以自主复制子或染色体上整合序列存在,再如灰色链霉菌质粒 pSG1,也是以游离复制子或整合序列或两者并存于宿主菌中。而质粒 SLp1 系列则是染色体上的整合序列,在宿主菌天蓝色链霉菌与变青链霉菌(作为受体)接合转移过程中,整合序列通过 DNA 环出而形成游离质粒。类似的现象在其他链霉菌中也有发生。如质粒 pIJ110、pIJ480,则是小小链霉菌和 *S. glaucescens* 分别与变青链霉菌进行接合转移时在变青链霉菌中获得的。可以认为,这也是由供体菌染色体上整合序列的环出而形成的。

材料和方法

1. 菌株和质粒 变青链霉菌 W 1326、TK24、红霉糖多孢菌 NRRL 2338,生米卡链霉菌 1748 (pSMY1 宿主菌)。大肠杆菌质粒 pIJ30,链霉菌质粒 pIJ303, pSMY1。

2. 培养及 DNA 转化 斜面培养采用合成 5 号培养基,液体摇瓶培养及原生质体再生采用 R₂YE 培养基。原生质体的制备和 DNA 转化基本按照 Thompson 等(1982)报道的方法进行。

3. DNA 的制备及质粒拷贝数的确定

质粒 DNA 的分离纯化按照美国 Hutchinson 实验室的方法进行(未发表)。总体 DNA 的制备参照 Chater (1982)的方法进行。质粒 pLE1 拷贝数的测定,是利用携有游离形式的 pLE1 的受体菌总体 DNA 样品,经柱状琼脂糖凝胶(1.2%)电泳,凝胶经溴化乙锭染色,用日立 850 型荧光分光光度计扫描确定染色体与质粒 DNA 峰面积而计算得出。

4. 酶反应及电泳 限制性内切酶酶切反应及 T4 连接酶酶反应按产品说明条件进行。电泳用琼脂糖凝胶平板电泳和聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,以 λ /HindIII DNA 片段为分子量标准。

5. Southern blot 分子杂交 DNA 片段的膜转移和分子杂交主要是按照 Hopwood (1985)描述的方法进行。放射性探针的制备是以 α -³²P dCTP 通过缺刻翻译标记重组质粒 pLJ14 DNA,按照 BRL 公司的反应盒及说明书提供的反应条件进行的。分子杂交后的硝酸纤维素膜用 2 × SSC-0.1% SDS 溶液室温洗 2 × 15',再用 0.1 × SSC-0.1% SDS 溶液 65℃ 洗两次。

Tang Li et al.: Studies on Integrated and Free Streptomycete Plasmid pLE1

本文于 1988 年 9 月 16 日收到。

结 果

1. 质粒 pLE1 的发现 通过一般质粒提取, 在我们所使用的受体菌变青链霉菌 W1326 中未获得质粒 DNA, 在利用质粒 pSMY1 鸟枪克隆红霉素抗性基因的过程中, pSMY1 酶切片段与红霉素产生菌红霉糖多孢菌 DNA 片段连接后转化变青链霉菌 W1326 后获得一再生株, 该菌株携有重组质粒 pSMYR1 和另一较小质粒 pLE1 (图 1), 在相同的琼脂糖凝胶平板电泳条件下, 用 λ /HindIV 酶切片段的泳动距离对其分子量作对数曲线, 测得质粒 pLE1 的分子量为 8.2kb (图 2)。

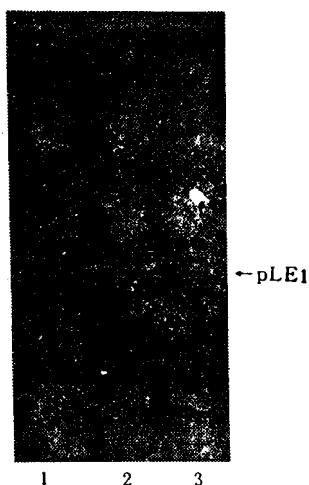


图 1 DNA 电泳图

1. 受体菌变青链霉菌总体 DNA;
- 2, 3. 受体菌再生株中含质粒 pLE1 总体 DNA。

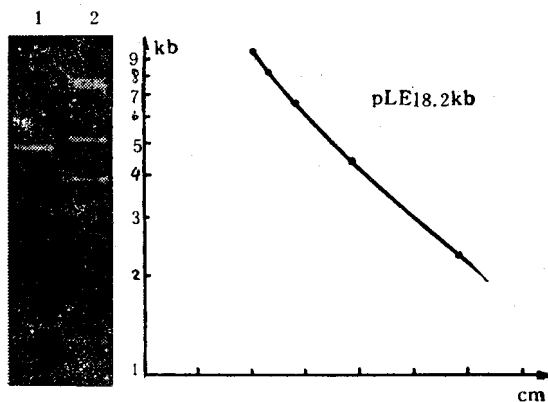


图 2 DNA 泳动距离与分子量的对数关系

1. pLE1/BamH1;
2. λ /HindIII。

2. 质粒 pLE1 拷贝数测定 根据质粒 DNA 及染色体 DNA 的荧光强度扫描, 测得质粒 DNA 与染色体 DNA 的峰面积之比为 25.9225% (见图 3), 假定链霉菌染色体 DNA 分子量为 10^4 kb, 则计算出质粒 pLE1 的拷贝数为 316, 表明质粒 pLE1 具有非常高的拷贝数。

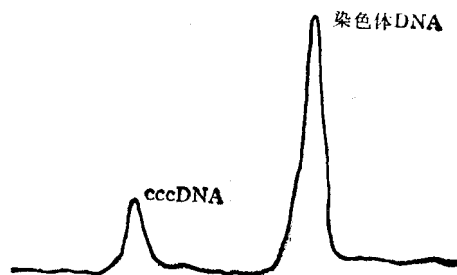


图 3 染色体与质粒 DNA 峰面积扫描图

3. 质粒 pLE1 DNA 的限制性内切酶酶切图谱的构建 用 7 种限制性内切酶分别对质粒 pLE1 进行酶切, 从电泳图谱上可看出酶切后 DNA 片段数, 以 λ /HindIII 片段作为分子大小对照, 可测出 pLE1 酶切后 DNA 片段的分子量。结果见表 1(1)。

为了确定各酶在质粒 pLE1 DNA 上的酶切位点之间的位置关系, 进行了双酶切实验, 结果见表 1(2)。根据以上结果, 我们可绘出 pLE1 DNA 分子 17 个

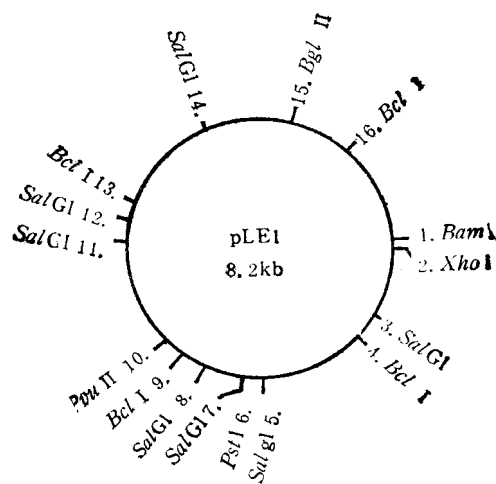


图 4 质粒 pLE1 DNA 分子酶切图谱

- 1.0.00/8.20; 2.0.03; 3.0.52; 4.0.80; 5.2.88; 6.2.99; 7.3.01; 8.3.20; 9.3.82; 10.4.27; 11.5.00; 12.5.14; 13.5.23; 14.5.79; 15.6.35; 16.6.99。

表 1 质粒 pLE1 经不同限制性内切酶酶切所得片段数及分子量

限制性内切酶	片段数	分子量 (kb)							
<i>Xho</i> I	1	8.2 (1)							
<i>Bam</i> HI	1	8.2							
<i>Pst</i> I	1	8.2							
<i>Bgl</i> III	1	8.2							
<i>Pvu</i> II	1	8.2							
<i>Bcl</i> I	4	2.01	3.02	1.41	1.67				
<i>Sal</i> G1	7	2.93	2.36	1.8	0.65	0.19	0.14	0.13	
<hr/>									
<i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I	2	8.17 0.03 (2)							
<i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I	2	5.22 2.98							
<i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> III	2	6.35 1.85							
<i>Bam</i> HI- <i>Bcl</i> I	5	3.02 1.76 1.41 1.21 0.8							
<i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> G1	8	2.41 2.36 1.8 0.65 0.53 0.19 0.14 0.13							
<i>Bcl</i> I- <i>Xho</i> I	5	3.02 1.76 1.24 1.41 0.77							
<i>Bcl</i> I- <i>Bgl</i> III	5	3.02 2.01 1.41 1.12 0.64							
<i>Bcl</i> I- <i>Pst</i> I	5	2.19 2.01 1.76 1.41 0.83							
<i>Bcl</i> I- <i>Sal</i> G1	11	2.08 1.73 1.18 1.2 0.62 0.56 0.28 0.19 0.14 0.13 0.09							
<i>Bgl</i> III- <i>Xho</i> I	2	6.32 1.88							
<i>Bgl</i> III- <i>Pst</i> I	2	4.83 3.37							
<i>Bgl</i> III- <i>Sal</i> G1	8	2.37 2.36 1.8 0.65 0.56 0.19 0.14 0.13							
<i>Pst</i> I- <i>Xho</i> I	2	5.25 2.95							
<i>Pst</i> I- <i>Sal</i> G1	8	2.93 2.36 1.8 0.65 0.19 0.14 0.11 0.02							
<i>Sal</i> G1- <i>Xho</i> I	8	2.44 2.36 1.6 0.65 0.49 0.19 0.14 0.13							
<i>Pvu</i> II- <i>Bam</i> HI	2	4.27 3.93							
<i>Pvu</i> II- <i>Xho</i> I	2	4.24 3.96							
<i>Pvu</i> II- <i>Pst</i> I	2	6.92 1.28							
<i>Pvu</i> II- <i>Bgl</i> III	2	6.12 2.08							
<i>Pvu</i> II- <i>Bcl</i> I	5	3.32 2.01 1.76 0.96 0.45							

酶切位点的相对位置的酶切图谱(见图 4)。

4. pLE1 带硫链菌素抗性标记质粒的构建 质粒 pLE1 与重组质粒 pSMYR1 并存于同一转化子中,因 pLE1 无选择性标记,不易分离纯化与鉴别,因而利用质粒 pIJ30 的硫链菌素抗性基因 (*tsr*, 1.9kb *Bam*HI-*Bam*HI 片段) 与 pLE1 的 *Bcl*I 酶切后片段相连 (pSMYR1 无 *Bcl*I 酶切位点), 转化变青链霉菌 TK24, 获得了具有 Thio^r 选择性标记的质粒 pLJ14。酶切分析结果表明, pLJ14 是由质粒 pLE1 与 *tsr* 基因重组而成。

5. 质粒 pLE1 来源的确定 从理论上分析,质粒 pLE1 有可能来源于供体菌红霉糖多孢菌 NRRL 2338、pSMY1 宿主菌生米卡链霉菌 1748、受体菌变青链霉菌 W1326 或质粒

pSMY1。为了确证 pLE1 的来源, 我们利用缺刻翻译, 用 α -³²PdCTP 标记 pLE1 的衍生质粒 pLJ14 DNA 作为探针, 与红霉糖多孢菌总体 DNA、生米卡链霉菌总体 DNA、变青链霉菌 W1326 总体 DNA 及质粒 pSMY1 DNA 的酶切片段进行 Southern 分子杂交。实验结果(见图 5)表明, 衍生质粒 pLJ14 与质粒 pSMY1 无同源性, 与生米卡链霉菌及红霉糖多孢菌 DNA 也无同源性, 因而排除了是 pLE1 来源的可能性 (与红霉糖多孢菌的杂交结果未列出)。pLJ14 与受体菌变青链霉菌有明显杂交反应, 具有强同源性, 同时与 pIJ101 系列的质粒 pIJ303 也有强同源性。由此结果我们可以认为, 质粒 pLE1 是来源于受体菌变青链霉菌, pLE1 DNA 分子是以整合序列存在于变青

链霉菌的染色体上,在 DNA 转化过程中,导致 DNA 环出而形成游离的质粒 DNA。



图 5 DNA 分子杂交图 (pLJ14 为放射性标记探针)
1. pSMY1/BamHI; 2. 受体菌变青链霉菌 W1326 总体 DNA/PstI; 3. 红霉素链霉菌总体 DNA/PstI;
4. 生米卡链霉菌 1748 总体 DNA/PstI;
5. pIJ303/BclI。

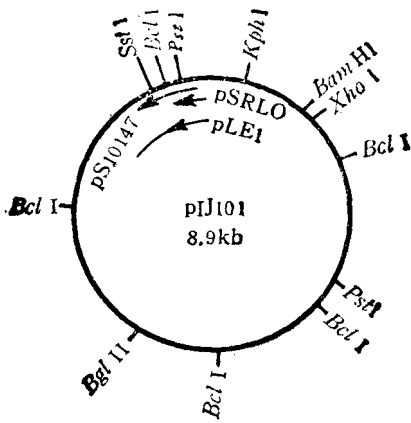


图 6 质粒缺失图谱

讨 论

我们从变青链霉菌的原生质体经 pSMY1 与红霉素产生菌的总体 DNA 酶切片段连接后转化的一株再生株中,发现了与重组质粒 pSMYR1 (pSMY1 携带红霉素抗性基因) 并存的一较小质粒 pLE1, 其分子量为 8.2kb, 拷贝数很高, 为 316。用 7 种限制性内切酶酶切分析构建了质粒 pLE1 的酶切图谱, 发现其酶切图

谱与 pIJ101 (8.9kb) 非常相似, 所不同的是 pLE1 缺少 SstI-PstI 的一段 0.7kb 的 DNA 片段(见图 6)。DNA 分子杂交的结果又表明, pLE1 与 pIJ101 有非常强的同源性, 因而 pLE1 与 pIJ101 可能是同一系列。DNA 分子杂交实验证明了质粒 pLE1 来源于变青链霉菌染色体上的整合序列。可以认为 pLE1 因 DNA 转化而导致整合序列的环出, 形成游离的能自主复制的质粒分子。有人报道质粒 pS10147 (约 8.9 kb) 和 pSRC0 (8.85kb) 也都是通过非相关性质粒转化天蓝色链霉菌 A3(2) 和变青链霉菌 1326, 在转化子中获得的。并且质粒 pS10147、pSRC0 的限制酶酶切图谱也与 pIJ101 相似, 也具有一小段 DNA 的缺失, 且缺失发生在同一区域(见图 6)。因此我们认为, pLE1 这段 DNA 作为链霉菌染色体上的整合序列非常活跃, 极易游离出来。但是, 文献中只报道了质粒 pS10147、pSRC0 的发现, 而对它们的来源没有给以准确的解释和证明。我们的实验工作为它们的来源提供了依据。并进一步证实了通过接合转移或 DNA 转化使染色体整合序列环出而形成游离的质粒 DNA 在链霉菌中是较为普遍的现象。pIJ101 是有广泛宿主范围、在链霉菌中普遍应用的质粒载体。关于它是否能以整合的形式存在于宿主菌中, 还未见报道。

参 考 文 献

- [1] Bibb M. J. et al.: 1981. *Mol. Gen. Genet.*, 184: 230—240.
- [2] Cohen A. et al.: 1985. *Plasmid*, 13:41—50.
- [3] Thompson C. J. et al.: 1982. *J. Bacteriol.*, 151(2): 668—677.
- [4] Chater K. F. et al.: 1982. *Curr. Topic. Micro. & Immuno.*, 96:74.
- [5] Hopwood D. A. et al.: 1985. *Genetic Manipulation in Streptomyces*.
- [6] Kado C. I.: 1981. *J. Bacteriol.*, 145(3): 1365.
- [7] Kieser T. et al.: 1982. *Mol. Gen. Genet.*, 185: 223—238.
- [8] Pernodet et al.: 1981. *Mol. Gen. Genet.*, 182(1): 53.
- [9] Yutaka Shindoh: 1984. *J. Antibiotics*, 37(5): 512.
- [10] Hopwood D. A. et al.: 1984. *Plasmid*, 11:1—76.