

大肠杆菌抗药性质粒 pFD3 的链霉素抗性表达

陈孝康 张伯生 朱定良 朱建华

(复旦大学遗传学研究所)

Cohen 等^[1]研究大肠杆菌抗药性质粒 R6 (此质粒携带卡那霉素、新霉素、氯霉素、四环素、链霉素抗性), 发现在用卡那霉素抗性、新霉素抗性或氯霉素抗性作为选择性标记进行转化时, 极少数转化子失掉链霉素抗性。本文报道大肠杆菌抗药性质粒 pFD3 (此质粒携带四环素、链霉素、氯霉素、氨基青霉素、磺胺抗性) 在经结合转移或转化途径传递给大肠杆菌 C₆₀₀ 时, 所得的转移子、转化子中四环素、氯霉素、氨基青霉素及磺胺抗性都能正确表达, 而链霉素抗性则不能完全表达。

材料与方 法

(一) 细菌品系

1. 大肠杆菌 A₂ 是从人粪水中分离得到的^[1]。此菌株系抗四环素 (Tc)、链霉素 (Sm)、氯霉素 (Cm)、氨基青霉素 (Ap)、磺胺 (Su)。

2. 本文所用其余菌株见文献[2]。

(二) 培养基 见文献[2]。

(三) 抗药性质粒的结合转移, 抗药性质粒 DNA 的抽提, 抗药性质粒的转化 均见文献[2]。

结 果 分 析

(一) 抗药性质粒的结合转移

表 1 说明, 大肠杆菌 A₂ 可将四环素抗性转给染色体上带有组氨酸和异缬氨酸营养缺陷标记的大肠杆菌 K12W1485(F⁻) 庆大霉素抗性株。获得四环素抗性的大肠杆菌 K12W1485(pFD3) (F⁻) 庆大霉素抗性株又能将四环素抗性由结合转移传递给另一株大肠杆菌 K12W1177 利福平抗性株。经测定, 50 个获得四环素抗性的大肠

表 1 大肠杆菌 A₂ 四环素抗性标记的结合转移

实验组合	供 体	受 体	选择性标记	结合转移频率
1	<i>E. coli</i> A ₂ (pFD3)	<i>E. coli</i> K12 W1485 (F ⁻) 庆大 霉素抗性株	Tc Gm	2.4 × 10 ⁻⁶
2	<i>E. coli</i> K12 W1485 (pFD3) (F ⁻) 庆大 霉素抗性株	<i>E. coli</i> K12 W1177 利福平抗 性株	Tc Rif	1.3 × 10 ⁻⁴

杆菌 K12W1485(F⁻) 庆大霉素抗性株(营养缺陷型鉴定为组氨酸、异缬氨酸缺陷型)同时又抗链霉素、氯霉素、氨基青霉素、磺胺。说明大肠杆菌 A₂(pFD3) 多重抗性已转移到大肠杆菌 K12W1485(F⁻) 庆大霉素抗性株。试验表明 48 个获得四环素抗性的大肠杆菌 K12W1177 利福平抗性株(生长谱测定是亮氨酸、苏氨酸、维生素 B₁ 缺陷型), 对链霉素、氯霉素、氨基青霉素、磺胺也有抗性。第二个结合转移实验中用的两个菌株为大肠杆菌 K12W1485 (pFD3)(F⁻) 庆大霉素抗性株及大肠杆菌 K12W1177 利福平抗性株, 它们都是 F⁻ 菌株, 染色体遗传标记不可能发生转移。试验结果是抗性标记发生了转移, 可见抗性标记肯定不在染色体上, 根据五个抗性一起发生转移的事实说明, 五个抗性基因位于同一个质粒上。实验中供体菌及受体菌在选择性培养基上均不出现菌落。

缩写及使用剂量:

Gm. gentamycin (庆大霉素) 5μg/ml; Rif. rifampicin (利福平) 50μg/ml; Tc. tetracyclin(四环素) 50 μg/ml; Sm. streptomycin (链霉素) 100 μg/ml; Cm. chloramphenicol (氯霉素) 50 μg/ml; Ap. ampicillin (氨基青霉素) 50μg/ml; Su. sulfadiazine (磺胺) 3000 μg/ml; Ieu. leucine (亮氨酸) 0.01 g/ml; Thr. threonine (苏氨酸) 0.001 g/100ml; Thi. thiamine (维生素 B₁) 0.001 g/100ml; His. histidine (组氨酸) 0.01g/100ml; Ivl. isovaline (异缬氨酸) 0.01g/100ml.

表 2 pFD3 质粒在不同宿主中链霉素抗性的表达程度

项 目	菌 株 来 源	链霉素浓度微克/毫升				
		0	5	20	25	100
1	<i>E. coli</i> C ₆₀₀ (对照)	+	-	-	-	-
2	<i>E. coli</i> K12W1485 (pFD3) (F ⁻) 庆大霉素抗性株	+	+	+	+	+
3	<i>E. coli</i> K12 W1485 (pFD3)(F ⁻)庆大霉素抗性株与 <i>E. coli</i> C ₆₀₀ 结合转移得到的转移子	+	+	+	-	-
4	<i>E. coli</i> C ₆₀₀ 为受体, <i>E. coli</i> K12W1485 (pFD3) (F ⁻) 庆大霉素抗性株质粒 DNA 转化获得的转化子*14	+	+	+	-	-
5	<i>E. coli</i> C ₆₀₀ 为受体, <i>E. coli</i> K12 W1485 (pFD3) (F ⁻) 庆大霉素抗性株质粒 DNA 转化获得的转化子*15	+	+	+	-	-
6	从 4 得到的转化子 *14 与 <i>E. coli</i> K12 W1485 (F ⁻) 庆大霉素抗性株结合转移获得的转移子	+	+	+	+	+
7	从 5 得到的转化子 *15 与 <i>E. coli</i> K12 W1485 (F ⁻) 庆大霉素抗性株结合转移获得的转移子。	+	+	+	+	+

注：“+”表示生长，“-”表示不生长。

(二) pFD3 转化子分析

以大肠杆菌 C₆₀₀ 为受体, 对大肠杆菌 K12 W1485 (pFD3) (F⁻) 庆大霉素抗性株 DNA 进行转化实验, 结果获得的 54 个转化子在含有四环素、或氯霉素、或氨苄青霉素、或磺胺的 LB 培养基上都能生长, 而在含有链霉素 100 微克/毫升的 LB 培养基上都不能生长。

这种现象的产生是由于 pFD3 的链霉素抗性基因没有进入大肠杆菌 C₆₀₀, 还是链霉素抗性基因已进入大肠杆菌 C₆₀₀, 只是没有表达呢? 为了解决这个问题, 我们进一步测定了获得的转化子对链霉素的抗性水平。结果表明, 所测定的 54 个转化子在含有链霉素 20 微克/毫升 LB 培养基上是可以生长的, 受体大肠杆菌 C₆₀₀ 对链霉素抗性小于 5 微克/毫升, 供体大肠杆菌 K12W1485 (pFD3) (F⁻) 庆大霉素抗性株可抗浓度为 100 微克/毫升的链霉素。由此看来, 在 pFD3 DNA 转化时, 链霉素抗性基因已进入大肠杆菌 C₆₀₀, 只是没有完全表达而已。

为了进一步说明这一个问题, 我们在所得转化子中任意挑出两个, 命名为大肠杆菌 C₆₀₀ (pFD3)*14, 大肠杆菌 C₆₀₀ (pFD3)*15。将它们分别与大肠杆菌 K12W1485 (F⁻) 庆大霉素抗性株结合转移, 随机测定获得的 6 个结合转

移子的链霉素抗性水平。结果发现链霉素的抗性水平又达到 100 微克/毫升。但当大肠杆菌 K12 (pFD3)(F⁻) 庆大霉素抗性株与大肠杆菌 C₆₀₀ 结合转移时, 测定得到的转移子的链霉素抗性水平仍是 20 毫克/毫升。说明抗药性质粒 pFD3 无论是通过转化途径, 还是结合转移途径进入大肠杆菌 C₆₀₀, 链霉素抗性都不能完全表达。现将以上结果列入表 2。

上面提到过 Cohen 等报道在研究大肠杆菌抗药性质粒 R6 的转化时, 发现有极少数转化子失去链霉素抗性的情况, 但没有见他们进一步测定转化子的链霉素抗性水平的报道。因此无法知道这些转化子链霉素抗性是完全失去呢? 还是不能完全表达。我们所看到的 pFD3 抗药性质粒在大肠杆菌 C₆₀₀ 中链霉素抗性不能完全表达是通过进一步测定链霉素抗性水平才知道的。所以我们所见这一情况究竟与 Cohen 等看到的现象是否相同, 不能下最后结论。

参 考 文 献

- [1] 复旦大学生物系细菌耐药原理研究小组: 1973。医学研究通讯, 第 3 期。
- [2] 陈孝康等: 1979。遗传学报, 6(3): 255-260。
- [3] Cohen, S. N. et al., 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 69(8): 2110。