

E. coli pBR322 质粒 DNA 在福氏志贺氏菌中的转化表达

邢念义 孙长柱 冯培军 郭素珍 尹 炜

(济南军区军事医学研究所)

质粒转化到异种细菌细胞是否能够存在、受体菌细胞能否接收异体 DNA 物质而进行遗传性状的表达,是基因工程的重要环节之一。我们将 *E. coli* pBR322 质粒用转化方法,引进福氏志贺氏 2a、3a 菌中,获得成功。

材料与 方法

(一) 材料

1. 菌株 大肠杆菌质粒(*E. coli* pBR322), 菌株号: 8021/pBR322, 上海生物化学研究所惠赠。福氏志贺氏菌 (ShF3a-Az; Sm^r、Met^r), 2a 菌 (ShF2a-A₁; Sm^r、Nic⁻、NiCA⁻), 是本室经 UV 诱变的营养缺陷型株^[1], 两种受体菌株的氨基苄青霉素 (Ap^r) 和四环素 (Tc^r) 敏感株是从营养缺陷型菌选出, 系来源于野生型标记。

2. 肉汤培养基 以 100 毫升容积中加入克数计: 蛋白胨 1, 胰胨 0.5, NaCl 0.5, 葡萄糖 0.1, 蒸馏水 100 毫升, 溶解后调 pH 7.2—7.4, 灭菌。

3. 营养琼脂培养基 以 100 毫升容积中加入克数计: 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5, 葡萄糖 0.1, 琼脂粉 1.8, 牛肉浸液 100 毫升, 调 pH 7.2—7.4, 灭菌。制成平板时内加四环素 20 微克/毫升, 氨基苄青霉素 25 微克/毫升。

4. 诊断用志贺氏菌属分型血清, 是北京生物制品研究所生产, 共 16 种。

(二) 方法

1. *E. coli* pBR322 质粒提取 取菌株接种 30 毫升肉汤液中, 37℃ 培养 12 小时, 取 15

毫升接种于 1,000 毫升容量的三角烧瓶 200 毫升肉汤液中, 37℃ 下 5 小时, 加氯霉素于 37℃ 下培养扩增 15 小时, 3,500rpm 离心沉淀 10 分钟, 沉积物用 0.05M Tris、0.01M EDTA、0.1M NaCl (pH8.0) 洗一次。再将沉积物悬浮在 10 毫升的 0.05M Tris、0.01M EDTA、0.1M NaCl (pH8.0) 溶液中。加溶菌酶 5 毫克和 RNase 500 微克, 置 37℃ 下 30 分钟, 在 -10℃ 下冻溶 3 次。用等量氯仿-异戊醇抽提三次。碱变性 (用 1N NaOH 缓缓滴定到 pH12.5, 停 3 分钟后, 用 1N HCl 滴定至 pH7.8)。再用氯仿-异戊醇抽提一次。上清液在 MAK 柱或强化磷灰石柱上层析。测 OD 值, 计算 DNA 含量。于 0.05M Tris、0.002M EDTA (pH8.0) 下透析过夜, 电泳分析。

2. 琼脂糖凝胶电泳 按文献 [1] 进行。

3. 转化步骤 取 ShF3a-A₂ 或 ShF2a-A₁ 一菌环接种普通肉汤活化, 再取此菌一环移种于含 30 毫升肉汤 100 毫升容量的三角烧瓶中, 置 37℃ 温育 15 小时, 取出放冰冷槽中冷却, 3,500rpm 离心沉淀 10 分钟, 弃去上清液, 用 0.01M NaCl 洗涤一次。将沉积物打匀, 用 0.5 毫升体积之冰冷的 0.1M CaCl₂ 溶液成悬液, 放 0℃ 下 20—30 分钟。3,500rpm 离心沉淀 10 分钟, 收集沉积菌体悬浮于 0.1 毫升体积已冷却的 0.1M CaCl₂ 溶液试管中, 加入 DNA 0.2

Xing Nianyi et al.: Transformation Expression of the *E. coli* pBR322 Plasmid DNA in *Sh. Flexneris*

毫升 (60 微克/毫升), 同时用 DNA 和受体菌作对照。置 0°C 60 分钟, 再放 42°C 3 分钟冷却后加入 5 倍体积的肉汤, 放 37°C 恒温水浴中摇动培养 75—120 分钟。然后离心沉淀, 用生理盐水洗涤两次。将沉积物稀释至原体积。取原液及 10 倍稀释各 0.1 毫升, 涂布平板, 放 37°C 培养 24—48 小时, 观察结果。

结果及讨论

以 *E. coli* pBR322 质粒 DNA 为供体, 分别以福氏志贺氏 3a 菌 (ShF3a-A₂) 和福氏志贺氏 2a 菌 (ShF2a-A₄) 为受体菌, 进行质粒 DNA 转化。结果见表 1。由表 1 中看出: ShF3a-A₂ 和 ShF2a-A₄ 为 Ap^r 和 Tc^r 菌, 在含 Ap 和 Tc 营养琼脂平板上先长出抗药性菌落, 对照组则无菌落生长。这样 ShF3a-A₂、ShF2a-A₄ 由对 Ap 和 Tc 敏感性变为对其抗药性, 表明 pBR322 质粒已引进两种受体菌细胞。转化频率分别为 0.43×10^3 和 0.4×10^2 。

表 1 *E. coli* pBR322 在 ShF3a-A₂、ShF2a-A₄ 中转化

供体 (DNA)	受体菌	菌落数	转化频率 (菌数计)
<i>E. coli</i> pBR322 (Ap ^r , Tc ^r)	ShF3a-A ₂ (Ap ^r , Tc ^r , Met, Sm ^r)	43	0.43×10^3
	ShF2a-A ₄ (Ap ^r , Tc ^r , Nic ⁻ , NiCA ⁻ , Sm ^r)	4	0.4×10^2

Ap = 氨基苄青霉素, Tc = 四环素, Sm = 链霉素, Met = 甲硫氨酸, Nic = 菸酰胺, NiCA = 菸酸。

将 *E. coli* pBR322 质粒, ShF3a-A₂、ShF2a-A₄ 受体菌, ShF3a-A₂ 和 ShF2a-A₄ 的 pBR322 质粒转化体菌, 分别提出 DNA, 作琼脂糖凝胶电泳分析。结果指出, ShF3a-A₂ 和 ShF2a-A₄ 的 pBR322 质粒 DNA 分带与 *E. coli* pBR322 DNA 分带在相同位置上。同时也观察到比 pBR322 质粒分子量大的其它的 DNA 物质, 这些分带是宿主细胞(菌细胞)中的 DNA。

可能是痢疾杆菌本身的质粒。

原核细胞 DNA 引进原核细胞进行无性繁殖, 表达其遗传功能性状, 已有许多实际例子, 如葡萄球菌 P128—pSC101, 大肠杆菌 λ DNA—Rdspc^[5], 大肠杆菌连接酶基因—RgtRB^[3], 大肠杆菌 F 因子—pSC101^[8], 枯草杆菌 Φ 3—Tfhg—pSC101·pMBg^[7], 和大肠杆菌 Lac 操纵基因(化学合成) pMBg^[4], 以及文献 [2, 6]。我们实验结果表明, *E. coli* pBR322 DNA 能够被引入 ShF3a-A₂ 和 ShF2a-A₄ 菌细胞内, 经数次转化和多次传代较稳定。pBR322 质粒在两种受体菌细胞中复制, 表达其遗传性状。由此还说明 pBR322 质粒与 ShF3a-A₂·ShF2a-A₄ 可能是相容性的。

E. coli pBR322 是人工改造的一种质粒, 含有 Ap、Tc 抗药性标记, 有近 40 余种限制性内切酶切割位点。位于 Tc^r 基因区内常用的主要限制性内切酶有 HindIII、BamHI。如果 ShF3a-A₂ 和 ShF2a-A₄ 菌细胞内含有这两种酶或含有 Tc^r 区的任何一种酶, 可能破坏 Tc^r 基因, 而不能表达 Tc^r 表型基因。在含 Tc 培养基中则不能生长。从转化结果来看, 并没有破坏 pBR322 的 Ap^r、Tc^r 区基因。

实验结果初步认为, *E. coli* pBR322 质粒, 作为遗传工程的基因运载工具可以在 ShF3a-A₂、ShF2a-A₄ 菌细胞进行无性繁殖或复制, 其受体菌有可能作为载体连接的外源 DNA 的无性繁殖细胞^[2, 6]。

参 考 文 献

- [1] 邢念义等: 1981. 遗传学报. 8(4): 294—301.
- [2] Bernhard, K. et al.: 1978. *J. Bact.*, 133(2): 897.
- [3] Comeron, J. R. et al.: 1975. *PNAS, USA*, 72: 3416.
- [4] Ehrlich, S. D. et al.: 1976. *ibid.*, 73: 4145.
- [5] Jasrunas, S. R. et al.: 1975. *ibid.*, 72: 6.
- [6] Roberts, M. et al.: 1978. *J. Bact.*, 134(1): 66.
- [7] Skurroy, R. A. et al.: 1976. *PNAS, USA*, 73: 64.
- [8] Stowinski, J. et al.: 1976. *Nature*, 363: 744.