

简报

基因转移至小肠结肠炎耶氏菌的遗传途径

王雪松 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学室,北京)

关键词 基因转移, 小肠结肠炎耶氏菌, 质粒 pKT230, 诱动质粒 pRK2013

小肠结肠炎耶氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 是一种人畜共患腹泻病病原菌。1939年在美国首次被发现^[1]。1980年 Zink 等人从小肠结肠炎耶氏菌中发现一种毒力质粒 (Virulence plasmid)^[2]。此质粒编码多种性状。关于毒力质粒的酶切分析及基因定位等均有报道^[3,4]。本文报道了一种具有广泛寄主范围的质粒 pKT230 在诱动质粒 pRK2013 的帮助下被诱动转移至小肠结肠炎耶氏菌中。这一工作为进一步在小肠结肠炎耶氏菌中进行外源基因的克隆和表达的研

究提供了遗传途径。

材料和方法

1. 菌株

实验中使用的菌株见表 1。

2. 培养基

LB 培养基: 每升中含 NaCl 10g, 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g。

S. S 琼脂 (Serva 产品): 一种鉴别培养基。

表 1 实验中使用的菌株

菌株名称		质粒 DNA	表型	S. S 琼脂上菌落颜色	菌株来源
小肠结肠炎耶氏菌	L15 ⁺ *	毒力质粒 (50MD)	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	包幼迪教授惠赠
	L15 ⁺	毒力质粒	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	本室构建
	L15 ⁻	无	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	本室构建
	D29 ⁺ *	毒力质粒 (50MD)	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	包幼迪教授惠赠
	D29	毒力质粒	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	本室构建
	L15 ⁺ (pKT230)	毒力质粒与 pKT230 (7.7MD)	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	本室构建
	L15 ⁻ (pKT230)	pKT230	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	本室构建
	D29 ⁺ (pKT230)	毒力质粒与 pKT230	Amp ^r Str ^r Kan ^r	黄色	本室构建
大肠杆菌	803(pKT230) ^[5]	pKT230	Amp ^r Str ^r Kan ^r	不生长	D. R. Helinski 教授赠
	HB101(pRK2013) ^[6]	pRK2013 (31MD)	Amp ^r Str ^r Kan ^r	不生长	D. R. Helinski 教授赠

*为原始菌株。

小肠结肠炎耶氏菌在 S. S 琼脂上长出黄色菌落, 而大肠杆菌不能生长。

乏钙培养基^[7]。

3. 质粒 DNA 的检测

本实验中质粒 DNA 的检测采用 Kado 等人的方法^[8]。

4. 小肠结肠炎耶氏菌毒力质粒的消除

小肠结肠炎耶氏菌毒力质粒可以通过乏钙培养基 37℃ 培养予以消除^[9]。

5. 小肠结肠炎耶氏菌 Amp^r 自发突变株的筛选

将小肠结肠炎耶氏菌原始菌株接种于 LB 培养液中培养过夜, 离心浓缩菌液, 然后涂布在含 Amp (20μg/ml) 的 LB 固体培养基上, 培养一天, 长出少数 Amp^r 菌落, 再于 Amp 平皿上反复纯化 2-3 次。

6. 三亲交配

以小肠结肠炎耶氏菌菌株为受体菌, 大肠杆菌 803(pKT230) 为给体菌。大肠杆菌 HB101 (pRK 2013) 为诱动菌进行三亲交配。方法参照 Ditta 等人

的报道^[10]。

转移频率的测定,以三亲杂交物在非选择培养基上长出的菌落数作为分母,以它在选择培养基上出现的菌落数作分子,相除即得质粒 pKT230 对小肠结肠炎耶氏菌的接合转移频率。

结果与讨论

在三亲交配实验中,分别以三株小肠结肠炎耶氏菌菌株 L15⁺ (Amp^r Str^r Kan^r)、D29⁺ (Amp^r Str^r Kan^r) 和 L15⁻ (Amp^r Str^r Kan^r) 作为受体,以大肠杆菌菌株 803 (pKT230) Amp^r Str^r Kan^r 为给体菌 (pKT230 质粒分子量为 7.7Md), 以大肠杆菌菌株 HB101 (pRK2013) Amp^r Str^r Kan^r 菌株作为诱导体 (pRK2013 分子量 32Md)。经三亲交配,得到表型为 Amp^r Str^r Kan^r 三种相应的小肠结肠炎耶氏菌转移接合子:L15⁺ (pKT230)、D29 (pKT230) 和 L15⁻ (pKT230)。挑单菌落进行质粒 DNA 的检测,凝胶电泳结果分别见图 1、图 2 和图 3。

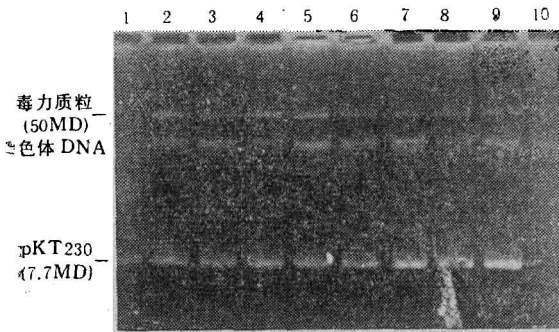


图 1 小肠结肠炎耶氏菌接合子 L15⁺(pKT230) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

1. 803 (pKT230), 2—9. L15⁺ (pKT230), 10. L15⁻

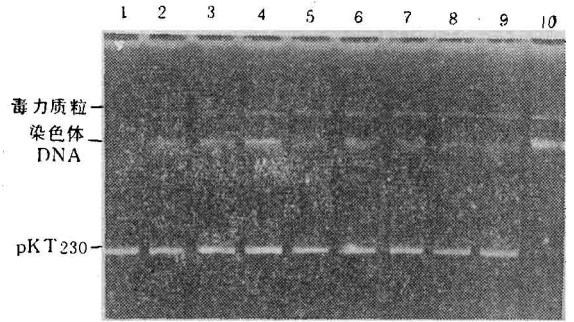


图 2 小肠结肠炎耶氏菌接合子 D29⁺(pKT230) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

1. 803 (pKT230), 2—9. D29⁺(pKT230), 10. D29⁻

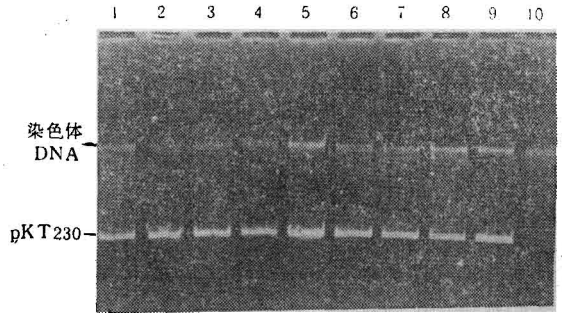


图 3 小肠结肠炎耶氏菌接合子 L15⁻(pKT230) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

1. 803 (pKT230), 2—9. L15⁻ (pKT230), 10. L15⁻

从图 1 中可以看出, 8 个 L15⁺ (pKT230) 转移接合子除了原有的毒力质粒外, 均增加了 pKT230 质粒带。图 2 显示所检测的 D29⁺ (pKT230) 转移接合子也都带有毒力质粒和 pKT230 两种质粒。图 3 表示不含毒力质粒的 L15⁻ 菌株亦得到了 pKT230 质粒。

表 2 接合转移频率

交配菌株	培养基	菌落数(个/ml)		转移*频率
		原液	稀释液(10 ⁻⁶)	
L15 ⁺ × 803 (pKT230) × HB101 (pRK2013)	LB + Amp	太多	163	~10 ⁻⁵
	LB + Amp + Str + Kan	165	0	
D29 ⁺ × 803 (pKT230) × HB101 (pRK2013)	LB + Amp	太多	141	~10 ⁻⁴
	LB + Amp + Str + Kan	110	0	
L15 ⁻ × 803 (pKT230) × HB101 (pRK2013)	LB + Amp	太多	220	~10 ⁻⁶
	LB + Amp + Str + Kan	125	0	

* 接合转移频率按“转移接合子/受体细胞数”计算

(下转第134页)

APPLICATION OF ELECTROPHORETIC ESTERASE ISOZYME PATTERNS IN THE IDENTIFICATION OF INSECTICIDE-RESISTANT OF ASIAN CORN BORER

Shang Zhizhen (Shang Chihchen)

(Institute of element organic chemistry Nankai university, Tianjin)

Xu Wenna

(Department of soil-chemistry, Beijing agricultural university)

ABSTRACT

Polyacrylamide gel electrophoresis was used to determine esterase isozymes of three strains of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenee). Two strains were insecticide-resistant and one was susceptible. It is suggested that there were distinct differences in the zymograms of the esterase isozymes among the three strains, especially carboxylesterase. The number of carboxylesterase bands of both resistant strains was more than that of the susceptible one, but there was no difference in their cholinesterase. The zymograms were taken as a criterion to differentiate the resistant strain from the susceptible one. The method is suitable for studying resistance of some other agricultural insects and some aspects of methodology were discussed. **Key words** *Ostrinia furnacalis* (Guenee), esterase isozyme, electrophoresis, resistant

(上接第156页)

以上结果表明,质粒 pKT230 通过三亲交配被转移至小肠结肠炎耶氏菌中。此外,在所检测的小肠结肠炎耶氏菌转移接合子中未发现 pRK2013 质粒的存在(材料未发表)。

在 pRK2013 的帮助下,质粒 pKT230 以大约 10^{-6} 的频率被诱动转移至大肠结肠炎耶氏菌中(见表2)。

pKT230 是具有广泛寄主范围的质粒运载体。它已被证明能够在诱动质粒的帮助下转移进多种革兰氏阴性菌属中,并带有可以克隆外源基因的限制性酶切位点^[9]。本工作将这一转移系统运用到小肠结肠炎耶氏菌中,得到满意的结果,说明这是以小肠结肠炎耶氏菌为受体进行基因转移一种有效的遗传途径。

有文献报道 pRK2013 在诱动转移的同时,自己也以一定的频率进入受体细胞^[10]。本实验在二十多个小肠结肠炎转移接合子中,只检测到 pKT230 质粒,而未发现 pRK2013 的转入,这一点与文献报道不同。

质粒 pKT230 可以在含有毒力质粒的小肠结肠炎耶氏菌接合子中稳定地复制,无丢失现象。说明 pKT230 与毒力质粒互容。

承蒙包幼迪教授惠赠小肠结肠炎耶氏菌菌株,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Swaminathan B *et al.* *J Appl Bacteriol*, 1982; 52: 151
- 2 Zink D L *et al.* *Nature*, 1980; 283: 224
- 3 Laroche Y *et al.* *Plasmid*, 1984; 12: 67
- 4 Bakour R *et al.* *Plasmid*, 1983; 10: 279
- 5 Bagdasrlian M *et al.* *Gene*, 1981; 16: 237
- 6 Figurski D H, Helinski D R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 1648
- 7 Higuchi K, Smith J L. *J Bacteriol*, 1961; 81: 605
- 8 Kado C I, Liu S T. *J Bacteriol*, 1981; 145: 1365
- 9 Gemski P *et al.* *Infect Immun*, 1980; 27: 682
- 10 Ditta G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 7347

[本文于1988年12月21日收到]