

弗兰克氏菌转化研究初报¹⁾曾王勇²⁾ 柏学亮¹⁾ 马庆生

(广西农学院分子遗传学研究室, 南宁·530005)

摘要 完成了弗兰克氏菌菌株 C101, Cc01, CcR03, At4, Hr16 和 CG01 的原生质体分离及 Cc01 原生质体的再生。将菌丝转化技术用于弗兰克氏菌的转化研究, 结果发现, pLAFRI 上的四环素抗性基因能在 Cc01 中表达。此外, Cc01 具有卡那霉素抗性。

关键词 原生质体, 分离, 再生(细胞), 基因表达, 放线菌 / 弗兰克氏菌, 转化

中图分类号 S154.32, Q939.132.03

将外源 DNA 导入受体细胞, 一般可通过转导、接合、转化和原生质体融合等四种方法。关于转导, 迄今为止, 还没有发现弗兰克氏菌中存在噬菌体⁽¹⁻²⁾。另外, 由于大多数弗兰克氏菌在平板上不形成“坪”, 因而很难发现噬菌斑。用接合法, 目前还没有迹象表明弗兰克氏菌中存在接合系统。有人曾用链霉菌质粒 pIJ702 转化弗兰克氏菌, 但未能成功。原生质体融合曾成功地在链霉菌中产生杂种细胞⁽³⁻⁶⁾。人们用变青链霉菌(带有质粒 pIJ702)与弗兰克氏菌的原生质体融合, 企图将 pIJ702 上的酪氨酸酶基因及硫链丝菌素抗性基因引入弗兰克氏菌, 结果在复杂培养基上, 无弗兰克氏菌再生菌落产生⁽⁷⁾。本文改进了弗兰克氏菌原生质体形成和再生的某些技术环节, 探索了弗兰克氏菌转化的新途径。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株	寄主	质粒	有关特征
Hr16	沙棘(<i>Hippophae rhamnoides</i>)	pBR322	Ap ^r , Tc ^r , ColE1 复制子
At4	色赤杨(<i>Alnus tincoria</i>)	pRK2073	Km ^r , Sp ^r , 由 pRK2013 衍生
Cc01	细枝木麻黄(<i>Casuarina cunninghamiana</i>)	pLAFRI	Tc ^r , 有 pRK290 来源的 cos 质粒
CG01	长骨木麻黄(<i>C. glauca</i>)	pSA30	Tc ^r , 6.9 kb nif HDK 克隆, pACYC184 上
CcR03	鸡冠木麻黄(<i>C. cristata</i>)	pKT230	RSF1010 / pACYC177 复制子, Km ^r , Sm ^r
C101	海滨木麻黄(<i>Allocasuarina littoralis</i>)	PCK1	nifA 克隆于 pKT230 上, Km ^r , Sm ^r
		PIJ666	Cm ^r , Km ^r
			pGx1252

1.2 培养基和培养条件 大肠杆菌在 LB 培养基中生长, 最适生长温度为 37℃。弗兰克氏菌在 BAP⁽⁸⁾ 培养基中培养, 生长温度为 28~35℃, 其中 Cc01 为 33~35℃, 培养时加入相应的抗菌素。弗兰克氏菌再生培养基见文献(7)。

文稿收到日期: 1991-05-27

1) 国家自然科学基金资助项目

2) 现在西北农业大学农化系微生物教研室工作

1.3 溶菌酶及抗菌素 溶菌酶购自中国科学院生物物理研究所。抗菌素见表2。

1.4 研究方法 ①原生质体制备及再生方法, 见文献〔9〕。②原生质体再生过程的观察: 将少许原生质体悬液加入含有0.8%~1%的低熔点琼脂糖的再生培养基中(低于37℃), 混

匀滴到无菌载玻片上, 然后盖上盖玻片, 放在无菌培养皿中, 25℃保温, 定时在相差显微镜下观察, 照相。③DNA制备: 大肠杆菌质粒的提取, 见文献〔9〕; 弗兰克氏菌质粒的提取, 见文献〔10〕。④弗兰克氏菌的菌丝转化, 参阅文献〔11,12〕。

2 结果

2.1 原生质体制备与再生 在含有0.1%甘氨酸的BAP培养基中培养的菌丝, 用250 μg/mL的溶菌酶处理2~2.5 h, 可形成大量原生质体, 此法可替代进口的无色肽酶(achromopeptidase)。我们在实验中, 曾采用无菌脱脂棉过滤原生质体悬液, 但厚度及松紧度不易掌握, 后改用8~10层纱布过滤。通过下述实验, 证明效果良好。①将过滤后的原生质体悬液加入BAP培养基中, 34℃保温, 一个月后, 无菌丝出现。②将原生质体悬液在震荡器上强烈震荡后, 涂布于再生培养基上, 25℃保温, 一个月后无菌落出现。③加10倍体积无菌蒸馏水于原生质体悬液中, 混匀, 涂布于再生培养基上, 25℃保温, 一个月后无菌落出现。此外, 用国产tris替代进口TES或MOPS作为缓冲剂, 也得到良好的结果。

2.2 抗性的检测 用匀浆器将培养10 d左右的Cc01菌丝充分研磨至均匀的混浊液, 取0.1 mL涂布于含有抗菌素的BAP平板上, 34℃保温, 7 d后, 在含有卡那霉素的平板上长出了具紫红色色素的弗兰克氏菌菌落, 其余均无生长。为了检测Cc01原生质体的卡那霉素抗性, 我们将Cc01原生质体悬液加入液体再生培养基中, 使卡那霉素至终浓度为1 000, 5 000, 7 000, 10 000(μg/mL), 25℃保温。一个月后, 出现一个直径约1 mm的菌丝球。为了验证卡那霉素是否失效, 在BAP培养基中加入同等浓度的卡那霉素, 25℃保温。50 d后, 接入大肠杆菌HB101, 37℃振荡培养过夜(12~16 h)。结果培养基中无菌生长。这说明Cc01具卡那霉素抗性。

2.3 菌丝转化技术 在三角瓶中加入玻璃珠进行振荡培养, 结果得到均匀的菌丝片段混浊液。当培养至对数中期时, 离心收集菌丝, 用冰冷CaCl₂处理成感受态细胞, 结果pLAFRI上的四环素抗性基因在菌株Cc01中表达。继代培养6 d后, 在无四环素压力下, 未能提出质粒。

3 讨论

我们完成了6个弗兰克氏菌菌株的原生质体分离(代表三个不同交叉类群)和Cc01原生质体的再生。并发现Cc01具卡那霉素抗性。通过连续五代培养, Cc01仍保持卡那霉素抗性。这说明, 它可以用作遗传标记, 而且为弗兰克氏菌与其他放线菌的原生质体融合提供了材料, 但用基因文库未筛选到抗性基因。Akkermans等人也发现了一个卡那霉素抗性菌株AgpM2。奇怪的是, 它与弗氏链霉菌的新霉素磷酸转移酶基因无杂

表2 抗菌素

抗 菌 素	缩写	配制溶剂	母液 (mg/mL)	作用浓度 (μg/mL)
四 环 素	Tc	H ₂ O	1	15
卡 那 霉 素	Km	H ₂ O	5	50
壮 观 霉 素	Sp	H ₂ O	10	50
链 霉 素	Sm	H ₂ O	10	250
氯 霉 素	Cm	50%乙醇	10	100
氨基青霉素	Ap	H ₂ O	5	200

交信号。由此看来, 这种抗性的机制不同于一般的卡那霉素抗性基因。另外, 菌丝转化结果表明, 四环素抗性基因仅能在 Cc01 中瞬间表达, 其原因可能是, 我们用的载体 pLAFRI 是革兰氏阴性菌广谱载体, 它不能在革兰氏阳性菌中稳定复制。

本研究所用的菌丝转化技术, 与原生质体融合或电子穿孔(electroporation)技术相比, 有两个优点: ①省去了原生质体分离及再生的复杂程序, 排除了低再生率对转化率的影响; ②操作简便, 费时较少。原生质体再生 14 d 后, 方能看到菌落, 而菌丝转化后仅 7 d 就能得到转化子。

本文承蒙农化系微生物教研室朱铭哉副教授校阅, 谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Normand P, Lalonde M. The genetic of actinorhizal *Frankia*. *Plant and Soil*, 1986; 90: 492~453
- 2 Lechevalier M P. The taxonomy of the genus *Frankia*. *Plant Soil*, 1984; 78: 1
- 3 Baltz R H, Masushima P. Protoplast fusion in streptomycetes: condition for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J Gen Microbiol*, 1981; 127: 137
- 4 Baltz R H, Matsushima P. Advance in protoplast fusion and transformation in streptomycetes. *Experientia*, 1983; 46: 143
- 5 Ochi K, Hitchcock M J M, Katz E. High frequency fusion of streptomycetes parvulus or streptomycetes antibiotics protoplast induces by polyethylene glycol. *J Bacteriol*, 1979; 139: 984
- 6 Ochi K. Protoplast fusion permits high frequency transfer of a streptomycetes determinant which mediates actinomycin synthesis. *J Bacteriol*, 1982; 150: 592
- 7 Tisa, L S, Ensign J C. Formation and regeneration of protoplast of the actinorhizal nitrogen-fixing actinomycete *Frankia*. *Appl Environ Microbiol*, 1987; 53: 53
- 8 Murry M A, Fontaine M S, Torrey J G. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr13 grown in batch culture. *Plant and Soil*, 1984; 78: 61~78
- 9 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; 63~67
- 10 Normand P, Dowme J A, Johnston A W B *et al*. Cloning of a multicopy plasmid from the actinorhizal nitrogen-fixing bacterium *Frankia* sp. and determination of its restriction map. *Gene*, 1985; 34: 367
- 11 王 筠, 陈孝康, 周健鸣等. 螺旋链霉菌转化的研究. 中国抗生素杂志, 1989; 14(2): 81~85
- 12 Zhang Zhongze, Murry Marcia A, Torrey John G. Culture conditions influencing growth and nitrogen fixation in *Frankia* sp. HFPCc13 isolated from *Casuarina*. *Plant and Soil*, 1986; 91: 3~15

A Preliminary Study on Transformation of *Frankia*

Zeng Wangyong Bai Xueliang Ma Qingsheng

(Laboratory of Molecular Genetics of Guangxi Agricultural College, Nanning, 530005)

Abstract Protoplast formation of *Frankia* stain C101, Cc01, CcR03, At4, Hr16 and CG01, and protoplast regeneration of Cc01 were achieved. Transformation of hyphae was used in transformation of *Frankia*, and it was found that tetracyclin resistance gene can express in strain Cc01. In addition, stain Cc01 confers Kanamycin resistance.

Key words protoplast, separation, regeneration(cytology), gene expression, Actinomycetes / *Frankia*, transformation