

球孢链霉菌质粒 pSGL1 的性质研究*

洪 斌 李 元

(中国医学科学院 协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 链霉菌质粒 pSGL1 是本实验室在球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*) 中发现的新的质粒, 它可以在变铅青链霉菌中复制。用缺失分析确定了 pSGL1 的基本复制区位于一个 2.0kb 的片段上。pSGL1 能够与 pIJ101 相容。pSGL1 是一个高拷贝质粒, 拷贝数约为 70~250。在对质粒进行分析的过程中得到的一些衍生质粒如 pSGLN 和 pSGLS3 等可以作为新的链霉菌基因克隆载体, 并可用于构建新的高效分泌表达的链霉菌载体。

关键词 链霉菌 pSGL1, 基本复制区, 相容性, 拷贝数

分类号 Q939.13

链霉菌是革兰氏阳性细菌, 它是抗生素的主要产生菌, 在工业上具有重要意义。近年来对链霉菌分子生物学的研究逐步深入, 链霉菌的高效分泌机制吸引人们将其发展成为新的外源基因表达体系, 已有许多外源基因在链霉菌表达体系中获得了成功的分泌表达^[1]。目前用于克隆表达外源基因的载体绝大多数是从变铅青链霉菌 ISP5434 的质粒 pIJ101 (8.8kb) 衍生而来的, 其中较常用的有 pIJ486、pIJ680、pIJ702 等^[2]。

本实验室李晓平等^[3]于 1992 年报道在抗肿瘤抗生素 C-1027 产生菌球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*) C-1027 中发现了一个质粒 pSGL1, 它具有分离容易、分子量较小 (7.4kb)、带有多个限制性内切酶单酶切位点等特点, 有希望发展成为新的有用的链霉菌质粒载体。本文对质粒 pSGL1 进行研究, 确定了它的基本复制区, 检测了它和 pIJ101 的相容性, 测定了它的拷贝数, 为利用 pSGL1 构建新的功能良好的载体系统奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

球孢链霉菌 (*Streptomyces globisporus*) C-1027 带有质粒 pSGL1, 为本所保存菌种; 变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK54 [无质粒 his-2 leu-2 spc-1] 为链霉菌质粒受体菌, 由 Hopwood D A 教授惠赠。链霉菌质粒载体 pIJ680 和 pIJ702 由 Hopwood D A 教授惠赠。

1.2 培养基

1.2.1 球孢链霉菌 C-1027 生长培养基 (%): 糊精 2.0, 甘油 1.0, 蛋白胨 0.2, 玉米浆 0.5, pH7.0。斜面培养基在生长培养基中补加 1.5% 琼脂。

* 中国医学科学院基金资助项目。

收稿日期: 1997-01-30

1.2.2 YEME培养基(%): 酵母膏 0.3, 蛋白胨 0.5, 麦芽提取物 0.3, 葡萄糖 1.0, 蔗糖 34, 氯化镁 0.1, pH7.0。用于变铅青链霉菌的液体培养。

1.2.3 R2YE培养基(%): 酵母膏 0.4, 蛋白胨 0.4, 蔗糖 10.3, 酪蛋白水解物 0.01, 葡萄糖 1.0, 三羟甲基氨基甲烷 0.3, 硫酸钾 0.0025, 氯化钙 0.735, 氯化镁 1.012, 磷酸二氢钾 0.0025, 微量元素溶液 0.2ml(氯化锌 0.004, 氯化铁 0.002, 氯化铜 0.001, 硼酸钠 0.001, 氯化锰 0.001), 琼脂 1.5, pH7.5。用于变铅青链霉菌的斜面培养和再生培养。

1.3 酶和试剂

限制性内切酶和 DNA 修饰酶购自美国 Promega 公司、中国医学科学院友谊开发公司; 硫链丝菌素(Thio)由美国 Bristol-Myers Squibb 制药研究所赠送; 新霉素(Neo)为上海第三制药厂产品。

1.4 DNA 操作

链霉菌质粒的小量提取采用碱性溶菌法^[2]。链霉菌质粒的大量提取采用碱裂解法^[4]。DNA 片段的回收按 ISCO 公司的 Little Blue Tank 进行。

1.5 硫链丝菌素抗性基因(*tsr*)和新霉素抗性基因(*neo*)的获得

链霉菌质粒 pIJ680 用限制性内切酶 Bcl I 酶切, 从琼脂糖凝胶电泳上分离纯化出 1.08kb 的片段, 即为 *tsr* 基因片段。链霉菌质粒 pIJ680 用 XbaI 和 XhoI 双酶切, 从琼脂糖凝胶电泳上分离纯化出 1.34kb 的片段, 即为 *neo* 基因片段。

1.6 链霉菌的转化

链霉菌原生质体的制备与 DNA 转化按照文献[2]的方法进行。转化后, 待原生质体在 R2YE 培养基平板上再生约 20 h 后, 在平板上再加一层含有硫链丝菌素或(和)新霉素的 R2YE 软琼脂(琼脂 0.7%)至抗生素终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或(和)5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 继续培养至出现具有抗生素抗性的转化子。

1.7 质粒拷贝数的测定

根据文献[5]报道的方法, 提取含有质粒的链霉菌菌株的总 DNA, 取适量总 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 对电泳凝胶照片的负片进行密度扫描分析, 质粒拷贝数 = (质粒峰积分 \times 染色体分子量) / (染色体峰积分 \times 质粒分子量), 其中链霉菌的染色体 DNA 分子量约为 6.9×10^9 。

2 结果

2.1 携带抗生素抗性基因标记的 pSGL1 衍生质粒的构建

质粒 pSGL1 没有已知的选择性遗传标记, 为了对它进行生物学功能分析以及用作有效的基因克隆载体, 我们首先在这个质粒上组入筛选标记硫链丝菌素抗性基因(*tsr*)。把 *tsr* 基因片段补平后, 插入质粒 pSGL1 的单酶切位点 PvuII, 转化变铅青链霉菌 TK54, 得到具有硫链丝菌素抗性的转化子。提取 No.3 转化子中的质粒, 酶切分析结果表明该质粒大小为 pSGL1 和 *tsr* 基因的总和(图 1), 该质粒命名为 pSGLP3。实验结果表明质粒 pSGL1 可以在变铅青链霉菌中进行复制。

2.2 基本复制区的定位

我们利用缺失分析定位质粒 pSGL1 的基本复制区。用 Sau3AI 对质粒 pSGL1 进行部

分酶切,从琼脂糖凝胶电泳上分离纯化出 2.0~6.5kb 大小的片段,与 *tsr* 基因片段连接 (*Sau* 3AI 和 *Bcl*I 为同功酶),连接产物转化变铅青链霉菌 TK54,只有当衍生的小质粒仍然携带了完整的复制区时,才能得到具有硫链丝菌素抗性的转化子。我们对得到的硫链丝菌素抗性转化子中具有不同程度缺失的质粒进行进一步的酶切分析,确定了几个较小的重组质粒的限制性酶切图谱(图 2),结果表明质粒 pSGL1 的基本复制区可以定位在最小的质粒 pSGLS3 所具有 pSGL1 的 2.0kb 的片段上。

2.3 pSGL1 和 pIJ101 的相容性

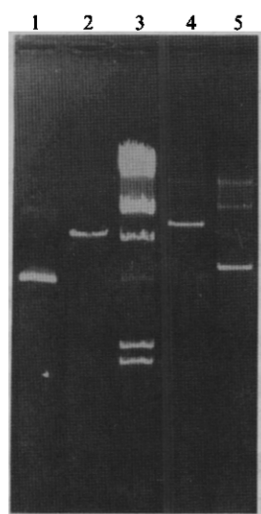


图 1 重组质粒 pSGLP3 的酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of pSGLP3

1. pSGL1; 2. pSGL1/Pvu II; 3. λ / Hind III;
4. pSGLP3 / Xba I; 5. pSGLP3.

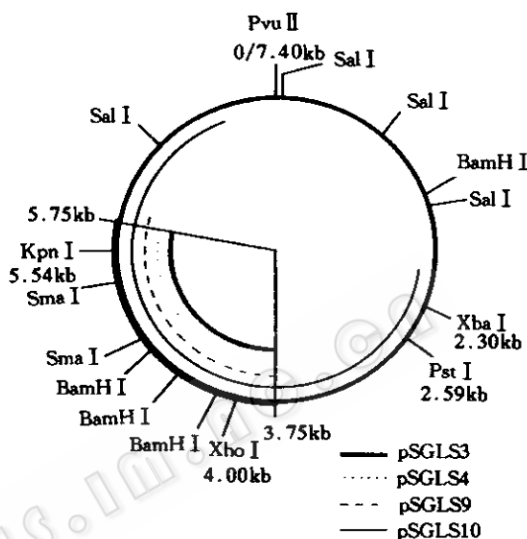


图 2 pSGLS3, pSGLS4, pSGLS9 和 pSGLS10 的限制性酶切图谱

(3.75kb~5.75kb 为 pSGL1 的基本复制区)

Fig.2 Restriction map of pSGLS3, pSGLS4, pSGLS9 and pSGLS10

(3.75kb~5.75kb represents the minimal replication region of pSGL1)

通过筛选同时具有 pSGL1 和 pIJ101 的衍生质粒的变铅青链霉菌菌株来检测这两种质粒的相容性,不同的抗生素抗性可以指示不同的衍生质粒的存在。我们用 *Xba*I 和 *Sal*I 双酶切 pSGL1 得到 4.12kb 的片段,这一片段具有 pSGL1 的基本复制区,与 *neo* 基因片段连接 (*Xho*I 和 *Sal*I 为同功酶),构建了一个具有新霉素抗性的 pSGL1 的衍生质粒 pSGLN。用 pSGLN(*Neo*^R)和 pIJ702(*Thio*^R)同时转化变铅青链霉菌 TK54,得到了同时具有硫链丝菌素和新霉素抗性的转化子,说明 pSGLN 和 pIJ702 同时存在于一个菌株中。与此类似,用 pIJ680(*Thio*^R, *Neo*^R)来转化含有 pSGLS3(*Thio*^R)的变铅青链霉菌菌株 TK54,得到了具有新霉素抗性的转化子,提取转化子中的质粒或总 DNA,可见同时含有 pSGLS3 和 pIJ680 两个质粒(图 3)。以上结果表明 pSGL1 和 pIJ101 是相容的。

2.4 pSGL1 及其衍生质粒的拷贝数

通过比较质粒和染色体 DNA 的相对量来测定 pSGL1 及其衍生质粒的拷贝数,结果表

明, pSGL1 (7.4kb) 在原宿主球孢链霉菌中的拷贝数约为 70, pSGLP3 (8.4kb) 在变铅青链霉菌 TK54 中的拷贝数约为 110。具有新霉素抗性的衍生质粒 pSGLN (5.4kb) 在变铅青链霉菌 TK54 中的拷贝数约为 170, 具有硫链丝菌素抗性基因的衍生质粒 pSGLS3 (3.3kb) 在变铅青链霉菌 TK54 中的拷贝数约为 250。可见 pSGL1 及其衍生质粒是高拷贝质粒, 所以容易分离, 如用于构建克隆和表达载体, 可通过基因剂量效应使外源基因得到高表达。

3 讨论

链霉菌质粒 pSGL1 是本实验室在球孢链霉菌 C-1027 中发现的新质粒。本文利用缺失分析确定了它的基本复制区位于 2.0kb 的片段上。革兰氏阳性细菌中已经分离出大量的质粒, 而大部分质粒 (包括 pIJ101) 都是以滚环复制机制进行复制的^[6]。通过对这些质粒基本复制区的序列进行测定发现它们的复制起点和复制酶都具有很高的同源性。为了进一步探讨 pSGL1 的复制机制, 我们已对它的基本复制区进行序列测定 (结果将另行发表), 与已知的复制起点和复制酶进行序列分析比较后可以基本确定它的复制机制。

链霉菌质粒 pSGL1 是一个高拷贝质粒, 和目前链霉菌遗传操作中最常用的 pIJ101 的衍生质粒相容, 因此可以通过共转化的方法把两个不同的外源基因转入同一个菌株中进行表达。在对这个质粒进行分析的过程中得到的一些衍生质粒如 pSGLN 和 pSGLS3 等带有方便的筛选标记和限制性内切酶单酶切位点, 而且缩小了载体的分子量, 有利于提高载体所携带的外源片段的长度, 可以作为新的链霉菌基因克隆载体, 我们已用这些衍生质粒对外源基因进行了初步的表达工作。目前正在对这些衍生质粒进行进一步的改造, 分别插入链霉菌的强启动子和高效分泌信号肽及合适的多克隆位点, 以期将其构建成为新的高效分泌表达的链霉菌质粒载体。

参 考 文 献

- [1] Gilbert M, Morosoli R, Sharech F et al. *Crit Rev Biotechnol*, 1995, 15:13~39.
- [2] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F et al. *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. Norwich: The John Innes Foundation, 1985.50~55.
- [3] 李晓平, 李元. 中国抗生素杂志, 1992, 17(5): 326~332.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.1.38.
- [5] Wrigley-Jones C A, Richards H, Thomas C R et al. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41:148~155.
- [6] Gruss A, Ehrlich S D. *Microbiol Rev*, 1989, 53:231~241.

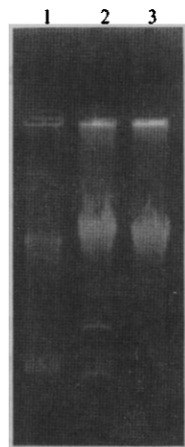


图3 含有 pSGLS3 与 pIJ680 的变铅青链霉菌 TK54 的总 DNA
Fig.3 Total DNA from *S. lividans* TK54 containing pSGLS3 and pIJ680
1. pIJ680; 2. pSGLS3 and pIJ680; 3. pSGLS3.

CHARACTERIZATION OF THE *STREPTOMYCES* PLASMID pSGL1

Hong Bin Li Yuan

(Institute of Medicinal Biotechnology Peking Union Medical College Chinese

Academy of Medical Sciences Beijing 100050)

Abstract The plasmid pSGL1(7.4kb) which was isolated from antitumor antibiotic C-1027 producing strain *Streptomyces globisporus* C-1027 was characterized. It could be introduced into *Streptomyces lividans* by transformation. Following a series of deletion experiments, the minimal replication region was located within a 2.0kb Sau 3AI fragment. pSGL1 is compatible with pIJ101. pSGL1 and its derivatives have a copy number of 70~250. Some of the derived plasmids such as pSGLN and pSGLS3 have suitable selectable antibiotic resistance marker and unique restriction endonuclease sites and may be potentially useful as cloning vectors. These plasmids may be used to design and construct efficient secretory expression vectors.

Key words *Streptomyces* pSGL1, Minimal replication region, Compatibility, Copy number