

乳酸菌启动子——信号肽探测载体 pZLB 的构建及应用*

陈秀珠 刘宗旨 还连栋**

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

关键词 乳酸菌 启动子——信号肽探测载体 DNA 序列分析

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2001)01-0101-04

一般来说,细菌中的蛋白质分泌大致可分为两个途径。一个是管孔途径(pore pathway),另一个是普通途径(general pathway)。普通途径依赖于信号肽和 SecA 将蛋白质输送到周质空间,短暂停留后,经过特异性反应将蛋白质分泌到胞外^[1]。本实验室曾利用 pGPB14 为启动子——信号肽序列探测载体,在大肠杆菌中克隆和表达了乳酸乳球菌总 DNA 中具有启动子——信号肽功能的 DNA 片段^[2]。为了进一步研究和了解乳酸菌基因表达、调控和蛋白质分泌机制,我们构建了乳酸菌启动子——信号肽探测载体 pZLB,利用该探测载体克隆到了启动子——信号肽功能片段,并在乳酸乳球菌中获得表达。现将实验结果简报如下。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本实验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	遗传型或性状	来源
菌株:		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	本组保存
<i>L. lactis</i> ATCC 7962	<i>nip</i> ⁺ , <i>nis</i> ^R	本组保存
LM0230	<i>nip</i> ⁻ , <i>nis</i> ^S	本组保存
质粒:		
pGPB14	Em ^R β -内酰胺酶结构基因	中山大学罗进贤教授惠赠
pMG36e	Em ^R 广泛宿主	Dr. J. Kok 惠赠 ^[3]
pZLB	Em ^R 广泛宿主	本工作构建
pZLBc7	Em ^R Ap ^R 广泛宿主	本工作构建

1.2 培养基与培养条件

大肠杆菌用 LB 培养基^[4] 37℃ 培养,乳酸乳球菌用 GM17 培养基^[5] 30℃ 培养。

1.3 酶与试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品, DNA 回收试剂盒购自北京原平生物技术公司, 氨苄

*国家自然科学基金资助项目(39570008) 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-01-05)

** 通讯作者

作者简介 陈秀珠(1944—),女,浙江宁波人,中国科学院微生物研究所副研究员,主要从事乳酸菌分子遗传学研究。

收稿日期 2000-03-27, 修回日期 2000-06-05 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

青霉素和红霉素均是国产试剂。

1.4 DNA 的提取

大肠杆菌质粒 DNA 提取按文献 [4] 乳酸乳球菌质粒 DNA 与总 DNA 提取分别按文献 [6] 和 [7]。

1.5 DNA 的酶切、DNA 片段回收、连接与转化

DNA 酶切、片段的回收及连接反应条件均按厂商产品说明书进行。大肠杆菌转化按文献 [4] 乳酸乳球菌转化按文献 [8]。

1.6 β -内酰胺酶活性测定

参照文献 [9]。

1.7 DNA 序列测定

依据双脱氧终止法,采用 DNA 自动测序仪进行 DNA 序列测定。

2 结果和讨论

2.1 乳酸菌启动子——信号肽探测载体 pZLB 的构建

以质粒 pMG36e 为基础与来自 pGPB14 β -内酰胺酶基因作报告基因构建了乳酸菌启动子——信号肽探测载体 pZLB(图 1)。pMG36e 的复制子来自乳酸乳球菌质粒 pWV01,它能在乳酸乳球菌、乳酸杆菌、枯草芽孢杆菌等多种革兰氏阳性菌和大肠杆菌中稳定复制、存在,是一个广泛宿主范围的质粒。这样既扩大了探测载体的宿主范围,又省去了重组质粒从大肠杆菌转移到乳酸菌等其他菌时的亚克隆步骤。另外, pZLB 具有多克隆位点,方便了对启动子——信号肽活性片段克隆和下一步的应用。

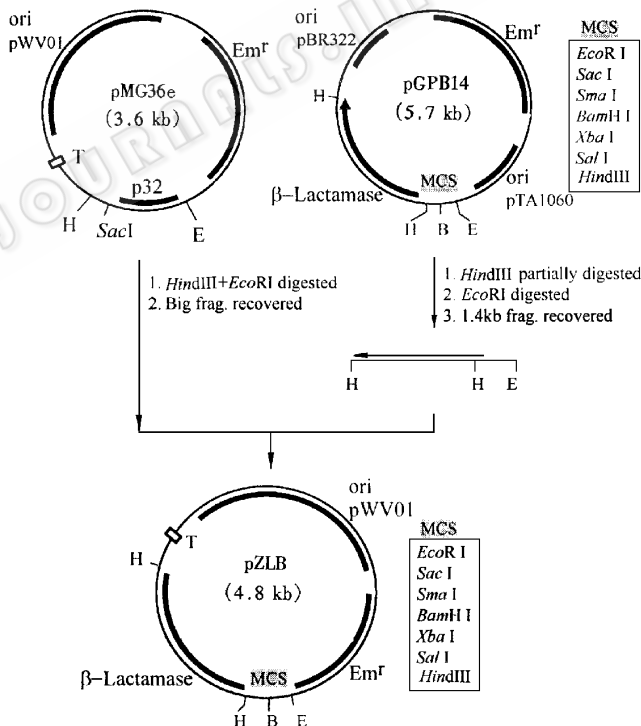


图 1 启动子—信号肽探测载体 pZLB 的构建

2.2 pZLB 的酶切鉴定

用 *EcoRI*、*Hind III* 双酶切 pZLB、pMG36e 和 pGPB14 结果(图 2)与预期相符, pZLB 的大片段与 ac. cn

pMG36e 一致,小片段与来自于 pGPB14 的 1.4kb 片段(β -内酰胺酶基因)一致。

2.3 启动子——信号肽探测载体 pZLB 功能的验证

2.3.1 启动子——信号肽功能片段的克隆;用 *Sau3A* 部分酶切 *L. lactis* ATCC 7962 总 DNA,回收 80~400bp 的片段,与 *Bam*HI 酶切并脱磷的 pZLB 连接,连接物转化 *E. coli* DH5 α 在加入 Amp 与 Em 的 LB 平板上筛选转化子。经质粒抽提、酶切鉴定、Amp 抗性测定,结果证明重组质粒(命名为 pZLBen)确实含有不同大小的外源插入片段,这些外源插入片段确能启动 β -内酰胺酶基因转录和产物外泌的功能。

2.3.2 启动子——信号肽功能片段在乳酸乳球菌中的功能分析:挑选若干胞外酶活性高的 pZLBen 转化 *L. lactis* LM0230 转化子经分析鉴定后测定 β -内酰胺酶在胞内外的活性。其中 pZLBe7 活力最高,胞外酶活为 885.5U/mL,胞内酶活为 384.4 U/mL,胞外酶活占总活力的 70%。

2.3.3 启动子——信号肽功能片段的 DNA 序列分析:对重组质粒 pZLBe7 中外源插入片段进行了

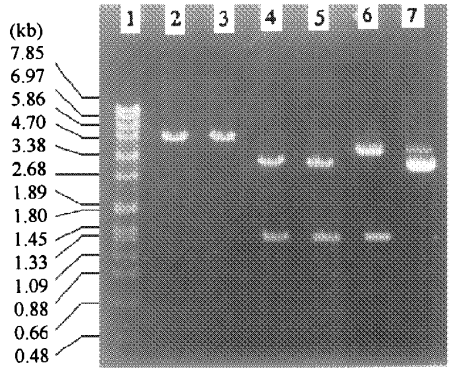


图2 pZLB 的酶切验证

1. *spp1/EcoR* I marker ; 2. *pZLB/EcoR* I ; 3. *pZLB/Bam*H I ; 4. *pZLB/Hind* III ; 5. *pZLB/EcoR* I + *Hind* III ; 6. *pGPB14/Hind* III ; 7. *pMG36e/EcoR* I + *Hind* III .

1	GAT CGA ATT CGA GCT CGC CCG GGG ATC TTT TCT GCT GTC ATT AGA CAT	48
	<i>EcoR</i> I <i>Sac</i> I <i>Sma</i> I <i>Sau</i> 3A	
49	TTA AAG GGG GGA CCT CCG TCC TTT TTA GAA TGT AAG TGC TTC ATT TAG	96
	-35	
97	ACA AAT TTA AAA ATA TGT CCA AAA CTG AAT GGA TAA TAA TTG TCA AAT	144
	-10	
145	TTT CTA AAA AGT TTA TAA TAC GTA TTG TAA CAG TTT TTG GAC GTG TTG	192
	SD	
1	Met Leu Lys Lys Glu Trp Gln Ala Ile	9
193	TCC ATA AAG AAA GGG GAA AAG ATG TTA AAA AAA GAA TGG CAA GCC ATT	240
10	Leu Lys His Lys Phe Phe Ile Ile Val Ile Ile Ala Leu Ala Leu Val	25
241	TTA AAG CAC AAA TTT TTT ATT ATT GTT ATT ATC GCT TTG GCA CTT GTA	288
26	Pro Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Phe Leu Gly Ser Met Trp Asp Pro Leu	41
289	CCA GCA ATT TAT AAC TAT ATT TTC TTA GGT TCT ATG TGG GAT CCT CTA	336
	<i>Sau</i> 3A <i>Xba</i> I	
	→ β -Lactamase	
42	Glu Ser Thr Ala Gln Ala Cys Pro Pro Glu Thr Leu Val Lys Val	56
337	GAG TCG ACC GCC CAA GCT TGC CCC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA	381
	<i>Sal</i> I <i>Hind</i> III	

图3 pZLBe7 中插入片段的 DNA 序列及其编码的氨基酸序列

DNA 序列分析。结果(图3)表明该片段具有典型的启动子结构:-35区(TTGTC A)和-10区(TATAAT)与乳酸菌高效启动子的一致序列高度同源;起始密码子 ATG 上游有典型的 SD 序列(GAAAGG);ATG 与成熟的 β -内酰胺酶 N 端间的序列符合信号肽序列的基本特征。

上述工作证实了我们成功地构建了乳酸菌启动子——信号肽探测载体 pZLB,并且此探测载体克隆

到了具有启动子——信号肽功能的 DNA 片段。我们用 *Hind*Ⅲ 酶切去掉 pZLBe7 中的 β -内酰胺酶基因片段,构建成乳酸菌分泌型表达载体,用此载体在乳酸菌中表达和分泌一些有价值的外源基因,以研究乳酸菌中基因产物表达和分泌的机制,该工作目前正在进行中。

致谢 北京大学生命科学院生物化学与分子生物学专业 1995 级学生吴茜参加部分工作,表示谢意。

参 考 文 献

- [1] 盛祖嘉,陈永青主编.微生物遗传学综述文集.上海:复旦大学出版,1993.180~184.
- [2] 还连栋,孙汉珍,陈秀珠,等.遗传学报,1997,24(5):471~479.
- [3] van der Guchte M, van der Vossen J M B M, Kok J *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(1):224~228.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- [5] Terzaghi B E, Sandine W E. *Appl Environ Microbiol*, 1975, 29:807~813.
- [6] Anderson D G, McKay L L. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46:549~552.
- [7] Lewington J, Greenaway S D, Spillane B L. *Letters in Applied Microbiol*, 1987, 5:51~53.
- [8] Wells J M, Wilson P W, Le Page R W F. *J Appl Bacteriol*, 1993, 74:629~636.
- [9] Dale J W, Smith J T. *Biochem J*. 1971, 123:493~500.

THE CONSTRUCTION AND APPLICATION OF PROMOTER-SIGNAL PEPTIDE PROBE VECTOR OF LACTIC ACID BACTERIA *

Chen Xiuzhu, Liu Zongzhi, Huan Liandong* *

(State Key Laboratory of Microbial Resources,
Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A promoter-signal peptide probe vector of lactic acid bacteria, designated pZLB based on pMG36e has been constructed. The vector contained a reporter gene encoding for β -lactamase, which lacked a promoter and a functional signal sequence. *Sau*3A restriction fragments (80–400bp) from *L. lactis* ATCC 7962 total DNA were cloned into *Bam*HI site of pZLB. A lot of different size fragments were selected. These fragments promoted transcription and secretion of β -lactamase in *L. lactis*. Sequence analysis revealed that inserted fragment in pZLBe7 contained typical promoter, SD sequence and atypical signal sequence.

Key words: Lactic acid bacteria, Promoter-signal peptide probe vector, DNA sequence analysis

* Project supported by Chinese National Natural Science Fund (39570008) and Chinese National Programs for Science and Technology Development (96-C03-01-05)

** Corresponding author