

嗜热脂肪芽孢杆菌 *pgiB* 基因上游 452bp 序列的功能分析*

陈兰明 钱 吉 盛祖嘉 毛裕民**

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

摘 要 :用化学诱变剂 N-甲基-N'-硝基 N-亚硝基胍进行随机诱变,获得了穿梭启动子探测质粒 pPGV5 的温度抗性突变型 pPGV5(Tr65),序列分析发现质粒上卡那霉素核苷转移酶基因 *kan* 的 +238 位碱基发生了 G→T 的单点突变。以来自嗜热脂肪芽孢杆菌 FDTP-3 菌株的耐热邻苯二酚-2,3 双加氧酶基因 *pheB* 作为报道基因,构建了转录融合质粒 pPGVPB452,用高压电穿孔法将其转化嗜热脂肪芽孢杆菌,通过报道蛋白活性的分析,证明了嗜热脂肪芽孢杆菌 T521 菌株的 6-磷酸葡萄糖异构酶同工酶基因 *pgiB* 上游含启动子样序列的 425bp 片段在嗜热脂肪芽孢杆菌中不具有启动子功能。

关键词 :嗜热脂肪芽孢杆菌, *pgiB* 基因, 452bp 序列-*pheB* 基因融合

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2002)02-0175-06

嗜热细菌中表达受温度调控的基因的分析,对于揭示嗜热细菌耐热机制的分子本质以及认识温度作为基因调控因子这一普遍现象具有重要意义。

嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) T521 菌株在高温(65℃)和低温(45℃)中培养时产生不同的 6-磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucosomerase, Pgi)同工酶谱,在 65℃ 培养时出现额外的酶带(PgiC)^[1]。已克隆了在低温中表达的同工酶基因 *pgiA* 和 *pgiB*^[2]。抽提物互补实验结果说明高温中出现的耐热的同工酶 PgiC 是 *pgiA* 和 *pgiB* 基因编码产物的共聚物,于是提出了一个基因调控的假设,认为 *pgiB* 基因受温度调控,只在高温中才充分表达,从而导致由同工酶 PgiA 和 PgiB 组成的 PgiC 的出现^[1]。为了验证这一假设,本文通过随机诱变获得了穿梭启动子探测质粒 pPGV5 的温度抗性(temperature resistant, Tr)突变型,并以来自 *B. stearothermophilus* FDTP-3 菌株的耐热邻苯二酚-2,3 双加氧酶(catechol 2,3-dioxygenase, CatO₂ase)基因 *pheB*^[3] 作为报道基因,对 *pgiB* 编码区上游含启动子样序列的 452bp 片段的转录活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒(表 1)

细菌常规培养使用 LB 培养基^[4],培养基中添加抗生素的浓度一般为氨苄青霉素

* 国家自然科学基金重点项目资助课题(No. 39230020)

** 通讯联系人。

作者简介 陈兰明(1965-),女,江苏人,南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室博士,现为丹麦哥本哈根大学博士后,主要从事极端环境微生物分子生物学研究。

收稿日期 2001-04-09,修回日期 2001-10-18

(Amp) $100\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素(Km) $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain/plasmid	Genotype/phenotype	Reference/source
<i>E. coli</i> TG I	<i>supE hsd</i> $\Delta 5$ <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB F</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q</i>] <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>trpC2 lys-3 metB10</i>	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> BR151	<i>trpC2 lys-3 metB10</i>	Laboratory stock
<i>B. stearothermophilus</i>		
K1041		[5]
T521		[6]
pPGV5	Km ^r , Amp ^r (only in <i>E. coli</i>)	Laboratory stock
pG1211	Ap ^r pBR322 carrying the 1.86 kb <i>EcoR</i> I - <i>Pst</i> I fragment from T521 that codes for PgiB	Laboratory stock
pJLA503P	Ap ^r derived from pJLA503, carrying the 0.98kb <i>pheB</i> structural gene which codes for CatO ₂ ase	[7]
pPGVPB452	Km ^r , Amp ^r (only in <i>E. coli</i>), a 0.45kb upstream region of <i>pgiB</i> and <i>pheB</i> structural gene fusion in pPGV5	This study

1.2 重组 DNA 操作

质粒 DNA 的抽提、酶切、片段回收、连接和大肠杆菌(*E. coli*)的转化按文献 [4] 中的方法进行。限制性核酸内切酶和连接酶购自 New English Biolabs 公司, 反应按 Biolabs 推荐的条件下进行。枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)感受态细胞制备和转化参考文献 [8] 中的方法; *B. stearothermophilus* 的高压电穿孔转化按文献 [5, 9] 中的方法, 在 BIO-RAD 基因脉冲仪上进行, 操作方法按说明书。

1.3 随机诱变

按文献 [10] 中的方法进行, 稍加改进: 将 T21(pPGV5) 于 48℃ 的过夜培养物以 5%(v/v) 的接种量转接新鲜的 Km + LB 液体培养基, 于 48℃ 振荡培养至 A_{600} 为 0.31, 离心收集菌体, 用 4mL 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0) 悬浮菌体沉淀, 取 1mL 菌液作对照, 另 3mL 中加入 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG, Aldrich 公司) 至终浓度为 $250\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 48℃ 轻摇 90min, 离心收集菌体, 用磷酸缓冲液洗涤三次后, 悬浮于 LB 液体培养基, 于 48℃ 培养 3h, 将菌液涂布于 Km + LB 平板, 置于 65℃ 培养。将对照和处理菌液适当稀释后涂布于 LB 平板作活菌计数。

1.4 DNA 序列的测定

采用双脱氧链末端终止法^[11], 使用 Perkin-Elmer Applied Biosystems 公司的试剂盒在 ABI377 自动测序仪上进行测序, 操作方法按说明书。采用 Qiagen 公司的试剂盒纯化质粒 DNA 和 PCR 产物。

1.5 PCR 扩增 DNA

采用常规方法, 按下列程序扩增: 94℃, 5min; 94℃, 30s-55℃, 30s-72℃, 45s-25cycles; 72℃, 5min。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.6 CatO₂ase 活性的测定

按文献 [3] 中的方法进行。

2 结果

2.1 穿梭启动子探测质粒 pPGV5(Tr65) 突变型的筛选和鉴定

穿梭启动子探测质粒 pPGV5(7.7kb) 是由适用于 *B. subtilis* 的启动子探测质粒 pPL703 和 *E. coli* 载体质粒 pUC4 通过各自单一 *EcoR* I 位点连接而成的 *E. coli*/*B. subtilis* 穿梭质粒 (P. Dhaese 未发表结果)。pPGV5 上编码卡那霉素核苷转移酶 (kanamycin nucleotidyltransferase, KNTase) 的基因 *kan* 来自常温菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 pUB110 质粒^[12]。

为了提高质粒上选择性标记的适用温度, 我们采用高压电穿孔转化方法将 pPGV5 导入了 *B. stearothermophilus* T521 菌株, 采用化学诱变剂 NTG 对 T521(pPGV5) 进行了随机诱变。根据对照和处理在 LB 平板上的活菌数计算出 NTG 处理 90min 的致死率为 50.9%。在 65℃ 培养的 Km + LB 平板上, 筛选到 138 个抗性菌株, 在不同温度下复测抗药性, 发现其中只有 17 个菌株在 61℃ 以上仍呈现 Km^r 表型, 其余则为 Km^s (表 2)。

表 2 T521[pPGV5(Tr)] 突变株在不同培养温度中的卡那霉素抗性

Table 2 Kanamycin resistance of T521[pPGV5(Tr)] mutants at different growth temperatures

Type of mutation	Number of mutants	Growth temperature/°C		
		48	61	65
I	13	+	+	+
II	4	-	+	+

+ : Km^r; - : Km^s.

为了进一步鉴定上述两类 Tr 突变株, 分别抽提第 I 类突变株的质粒 DNA, 通过高压电穿孔分别转化 *B. stearothermophilus* K1041, 发现在 48℃ 得到的转化子在 61℃ 和 65℃ 也都呈现 Km^r 表型, 同样第 II 类突变株的质粒 DNA 转化 K1041, 在 61℃ 得到的转化子在 65℃ 都表现 Km^r 表型, 而在 48℃ 则为 Km^s。上述结果表明使 KNTase 热稳定性上升的突变发生在质粒上。

2.2 pPGV5(Tr65) 突变型 *kan* 基因的 DNA 序列测定

根据 *kan* 基因的全序列^[12], 我们在 *kan* 开放读框 (759bp) 上、下游分别设计了正、反向测序引物: KanP1(5'-CAAATATTCTTATTTAGAAAAGCAAATC-3') 和 KanP2(5'-CCAACATGAT-TAACAAATTATTAGAGGTC-3')。对第 I 类突变株中质粒 DNA 上 *kan* 基因的编码区分别进行了双向 DNA 序列的测定, 发现这类突变型均在同一位点发生了碱基的颠换突变: +238 碱基 G 突变为 T, 第 80 位氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 突变为酪氨酸 (Try)。我们把这类突变型记为 pPGV5(tr65)。

第 II 类 Tr 突变型质粒转化 *E. coli* TG I 后, 皆不能在 37℃ 培养的 Ap/Km + LB 平板上得到转化子, 提示 KNTase 热稳定性的上升很可能不是由 *Kan* 基因上改变蛋白质一级结构的突变所引起。

2.3 *pgiB* 基因上游 452bp 片段与 *pheB* 报道基因转录融合质粒 pPGVPB452 的构建

质粒 pGI211(4.5kb)带有 *B. stearothermophilus* T521 菌株 1.86kb 的 *pgiB* 基因,序列分析表明该基因 1.33kb 开放读框上游 452bp 序列中存在一个与 *B. subtilis* 中 σ^{43} 识别的启动子相类似的 -35 区:TTGAAG 和 -10 区:TTTTAA,两区之间距离为 16bp。在起始密码子 ATG 上游 9bp 处存在一个与 *B. stearothermophilus* 16s RNA 的 3'端互补的 9bp 的 SD 序列:AGAAAGGAG^[2]。

为了验证 *pgiB* 基因表达受温度调控的假设,我们以耐热 CatO₂ase 基因 *pheB* 作为报道基因替代穿梭启动子探测质粒上来自常温芽孢杆菌 *B. pumilus* 编码氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)基因 *cat-86*,构建了 452bp 序列-*pheB* 基因转录融合质粒 pPGVPB452(图 1)。根据 *pgiB* 基因的 DNA 序列^[2],在其 5'端和起始密码子 ATG 附近分别设计了正、反向引物:*pgiBP1*(5'-CGGGATCCTTAAGATTATGACTA-3')和 *pgiBP2*(5'-ATC-CTGCAGCCATATGACACTTC-3')。在 *pgiBP1* 引物的 5'端引入了一个 *Bam*H I 酶切位点,在 *pgiBP2* 引物的 5'端的引入了 *Nde* I 酶切位点,以 pGI211 为模板,进行 PCR 扩增,得到 0.45kb 左右的扩增产物,用 *Bam*H I 和 *Nde* I 双酶切并回收酶切后的 DNA 片段;质粒 pJLA503P 是 *pheB* 基因的高表达质粒,带有 981bp *pheB* 结构基因,用 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切 pJLA503P,凝胶电泳割胶回收 0.98kb 的小片段;用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切穿梭启动子探测质粒 pPGV5(tr65),凝胶电泳割胶回收酶切片段;上述回收得到的酶切片段经 T4 DNA 连接酶进行三因子连接后,转化 *E. coli* TG I。抽提 Ap + LB 平板上的转化子,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后电泳分析,将插入片段约为 1.43kb 的重组质粒,记为 pPGVPB452(9.1kb)。

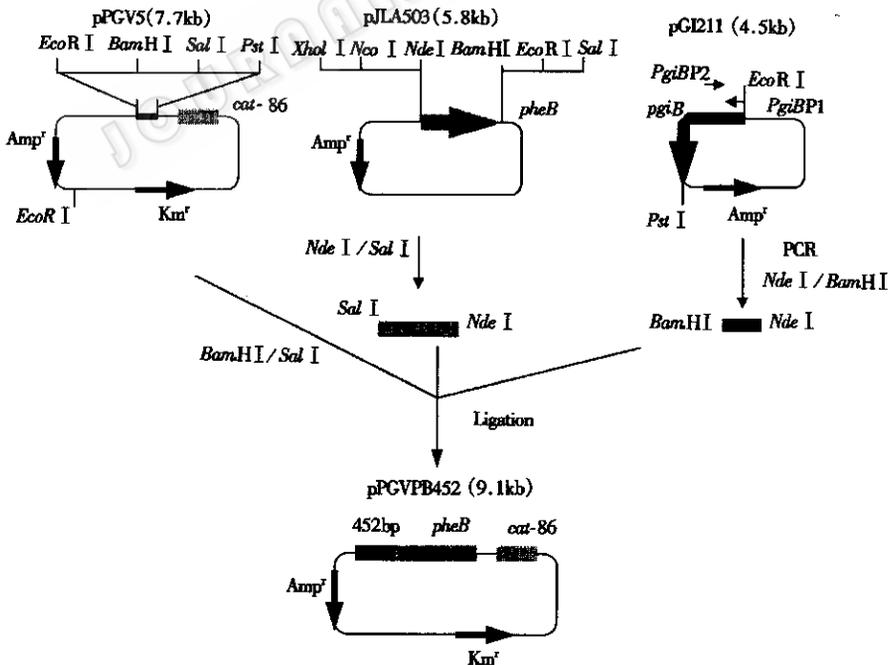


图 1 452bp 序列-*pheB* 报道基因转录融合质粒 pPGVPB452 的构建

Fig. 1 Construction of the transcriptional fusion between the 452bp sequence and *pheB* reporter gene

质粒 pPGVPB452 的酶切鉴定电泳图谱见图 2。

2.4 *pgiB* 基因上游 452bp 片段在不同宿主中的启动子功能

TG I (pPGVPB452) 于 Ap + LB 平板上的转化子于 37℃ 培养长成菌斑后用 0.5mol/L 邻苯二酚溶液喷雾检验,发现全部菌落均显黄色,对照为白色菌落。抽提转化子质粒 DNA 转化 *B. subtilis* BR151 感受态细胞,同样对转化子菌落作邻苯二酚溶液喷雾检验,结果所有转化子都显淡黄色,对照为白色菌落。上述结果表明在常温菌宿主中报道基因 *pheB* 能在 *pgiB* 基因上游 452bp 序列的启动下表达。

抽提 BR151(pPGVPB452)质粒 DNA,通过高压电击转化 *B. stearothermophilus* T521,将 Km + LB 平板上于不同温度生长的转化子,作邻苯二酚溶液喷雾检验,发现所有转化子不显黄色,皆为白色菌落;用不同培养温度及不同生长阶段的细胞粗提液测定 CatO₂ase 比活力,结果表明在 T521 宿主中 *pheB* 基因没有被表达。抽提 T521(pPGVPB452)质粒,经酶切鉴定,证明 pPGV5(tr65)上的插入片段并未发生缺失;进一步对抽提的 pPGVPB452 进行了 DNA 序列的分析,序列结果与文献[2]报道的序列完全一致(序列略),表明在穿梭转化和电击转化过程中 452bp 片段的核苷酸序列没有发生突变。此外,将 pPGVPB452 电击转化 *B. stearothermophilus* K1041 菌株,发现在 K1041 宿主中 452bp 片段也不能带动 *pheB* 基因的表达。上述结果证明在 *B. stearothermophilus* 宿主细胞中 *pgiB* 基因上游 452bp 序列没有启动子功能。

3 讨论

NTG 是引起随机突变的强诱变剂,但通过 NTG 诱变我们只得到 1 种 Tr 突变型,通过 DNA 序列分析证明了 *kan* 基因的 +238 位碱基发生了 G→T 的单点突变,从而显著地提高了 KNTase 的热稳定性,使得穿梭启动子探测质粒 pPGV5 适用于嗜热菌系统中调控序列的分析。采用本实验室克隆的 *pheB* 基因作为报道基因,其编码产物 CatO₂ase 的耐热性高于目前已知的报道基因编码的酶的热稳定性^[13]。CatO₂ase 催化邻苯二酚加氧开环反应,反应产物为黄色的 2-羟基己二烯二酸半醛,在 λ_{375nm} 处有最大吸收峰。不仅可用细胞抽提液定量地测出其比活力,而且可以用邻苯二酚喷雾法在琼脂平板上进行定性检测。

通过转录融合质粒 pPGVPB452 上报道蛋白的活性分析,我们发现在常温菌 *E. coli* 和 *B. subtilis* 宿主中 *pgiB* 基因上游 452bp 序列不仅能使嗜热菌基因 *pheB* 在常温中得到异源表达,而且也能带动 *cat-86* 基因的转录(结果略);但是在原宿主菌 *B. stearothermophilus* T521 以及 *B. stearothermophilus* K1041 中却不表现转录活性。为了进一步分析这一实验结果,我们采用基因步行法成功地克隆了 452bp 片段上游 1.77kb 序列,发现事实上 452bp 片

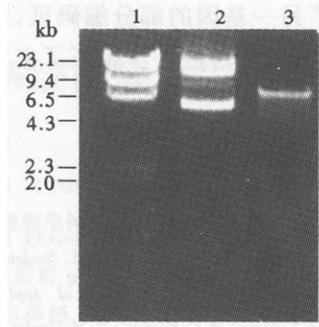


图 2 转录融合质粒 pPGVPB452 的酶切鉴定

Fig.2 The restriction analysis of transcriptional

fusion plasmid pPGVPB452

1. λDNA/ *Hind* III; 2. pPGVPB452;

3. pPGVPB452/ *Bam*HI - *Sal* I.

段中包含了另一基因的部分编码区,该基因与 *pgiB* 基因相间仅 135bp,两者属于同一操纵元(结果待发表),这进一步验证了本文的研究结果。

参 考 文 献

- [1] 盛祖嘉,陶无凡,王丽丽,等. 自然科学进展,1991,1:337~341.
- [2] Tao W F, Wang L L, Sheng R Q, et al. *Nucleic Acid Res*, 1989, 17:10107~10108.
- [3] Dong F M, Wang L L, Wang C M, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2531~2535.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Narumi I, Sawakami K, Nakamoto S, et al. *Biotechnol Techniques*, 1992, 6:83~86.
- [6] 陶无凡,沈仁权,盛祖嘉. 遗传学报,1987,14:200~205.
- [7] Schauder B, Blocker H, Frank R, et al. *Gene*, 1987, 52:279~283.
- [8] Anagnostopoulos C, Spizizen J. *J Bacteriol*, 1961, 81:741~746.
- [9] 陈兰明,盛祖嘉,毛裕民. 微生物学通报,2000,27:85~89.
- [10] Kironde F A, Parsonage D, Senior A. *J Bacteriol*, 1989, 259:424~426.
- [11] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74:5463~5467.
- [12] Masazumi M, Yoshio K, Tadayuki I, et al. *J Bacteriol*, 1984, 160:413~420.
- [13] Axel M, Richard H, Wolfgang S. *Gene*, 1996, 182:33~36.

Analysis of Function of the 452bp Sequence Proceeding the *pgiB* Gene in *Bacillus stearothermophilus* *

Chen Lanming Qian Ji Sheng Zujia Mao Yumin
(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: By random mutagenesis with chemical mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, a shuttle promoter probe vector mutant pPGV5(Δ tr65) was obtained. A single site mutation from G to T was discovered at nucleotide +238 of *kan* gene encoding kanamycin nucleotidyltransferase by sequence analysis. Using the gene *pheB* that encodes thermostable catechol 2'-3-dioxygenase from *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 as the reporter gene, a transcriptional fusion plasmid pPGVPB452 was constructed and electroporated into *B. stearothermophilus*. By analyzing the reporter protein, it proved that the 452bp sequence proceeding the coding region of phosphoglucosomerase *pgiB* gene from *B. stearothermophilus* T521, which contained a putative promoter by sequence analysis, but has no transcriptional activity in *B. stearothermophilus*.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, *pgiB* gene, 452bp sequence-*pheB* reporter gene fusion

* Project granted by Chinese National Natural Science Fund(39230020)