

以报告基因分析霍乱弧菌噬菌体 VP1 的预测启动子

李燕萍^{1,2} 梁末丽² 王多春² 祁国明² 阚 飙^{2*}

(¹ 南昌大学中德联合研究院 南昌 330047)

(² 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京 102206)

摘 要 :VP1 为感染并裂解霍乱弧菌的噬菌体,全基因组为环状双链 DNA。通过测定该基因组序列,预测出 15 个可能的启动子区,利用报告基因质粒转化及全噬菌体共感染的策略分析了这些推测启动子在霍乱弧菌中的活性,将预测的启动子区分别克隆到启动子探测 *lacZ* 融合质粒载体 pRS1274,在转化于大肠埃希氏菌受体菌株 JM109 中时,所有克隆子均呈现兰斑。同时将质粒电击到缺失了 *lacZ* 基因的霍乱弧菌菌株 7743 Δ Z,然后用噬菌体 VP1 感染转化菌株。在转化成功的 13 个含预测启动子片段的重组质粒中,通过检测 β -半乳糖苷酶活性表达随感染后时间的变化,提示 P17 为早期启动子,P2、P3、P9 等为中期启动子,P18 为晚期启动子。

关键词 :霍乱弧菌,噬菌体,启动子,报告基因

中图分类号 :R394 Q78 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2005)06-0846-05

霍乱弧菌是霍乱的病原体。我国发展了噬菌体-生物分型方案,将霍乱弧菌埃尔托生物型区分为两类菌株,即流行株与非流行株。这两类菌株在致病力、分子遗传学特征和引起疾病的流行病学特点方面均有显著不同。流行株的致病力强,具有引起流行和大流行的潜力;非流行株一般不致病或引起散发的腹泻病例。在霍乱防制工作中,按两类菌株采取区别对待的策略和措施,集中力量加强对流行株进行监测和控制,对非流行株则按一般腹泻病处理,不仅提高防制效果,而且可节省大量人力物力。噬菌体-生物分型方案可作为追溯传染来源、传染途径和分析流行形式的流行病学工具之一。

噬菌体在分子生物学的发展中起着重要作用。许多生命科学的基本知识是在噬菌体研究中首先得到或受到启发的。对噬菌体的结构、遗传和复制等方面进行深入研究后,可利用噬菌体开展基因工程方面的研究^[1,2],如噬菌体基因组及其启动子等调控元件,已被广泛用于构建不同类型的基因工程载体。

本实验室采用鸟枪法随机测序的策略获得了霍乱弧菌两类菌株分型噬菌体 VP1 基因组的序列,并预测出 49 个开放阅读框以及 15 个启动子区(结果另发表)。本研究利用报告基因质粒转化及全噬菌体共感染的策略分析了这些推测启动子在霍乱弧菌中的活性,首先将预测的启动子区分别克隆到启动

子探测 *lacZ* 融合质粒载体 pRS1274,将重组质粒电击到缺失了 *lacZ* 基因的霍乱弧菌菌株 7743 Δ Z 中,然后用噬菌体 VP1 感染转化菌株。通过检测 β -半乳糖苷酶活性来了解启动子的转录时序。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、噬菌体、质粒 :本研究中所使用的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) 7743 Δ Z(Δ *lacZ*)、N53、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、分型噬菌体 VP1 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所保存保存。*E. coli* AR134、质粒 pRS1274(*bla*,*lacZ'*)由美国 Simons 博士赠送。

1.1.2 培养基和溶液 :LB 培养基 :1% 胰蛋白胨,0.5% 酵母粉,0.5% 氯化钠,pH 值 7.0 ~ 7.4。SM :NaCl 5.8g,MgSO₄ · 7H₂O 2g,1mol/L Tris · Cl(pH7.5) 50mL,2% 明胶 5mL,加水定容至 1000mL。H 电击缓冲液 :137mmol/L 蔗糖,1mmol/L Hepes(pH8.0),10% 甘油。

1.1.3 主要试剂和仪器 :限制性内切酶(*Bam*H I、*Eco*R I) Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、IPTG、X-Gal 均购自 TaKaRa(大连)有限公司;High Pure™ Lambda Isolation Kit 购自 Roche 公司; β -galactosidase Enzyme Assay System 购自 Promega 公司。

基金项目 :国家“973 项目”(G1999054102)、国家自然科学基金(30271169)

* 通讯作者。Tel 86-10-61739458;Fax 86-10-61739156;E-mail :kanbiao@icdc.cn

作者简介 :李燕萍(1972-)女,江西新干人,博士,从事微生物学研究。Tel 86-791-8334572;E-mail :yanpingli@126.com

其他作者 :高守一²,刘延清²

收稿日期 :2005-02-28,修回日期 :2005-06-22

1.2 噬菌体培养和纯化

取 10⁶ pfu 的噬菌体与 0.1 mL 宿主菌新鲜培养物混匀 ,37℃温育 10min ,加入 4 mL 融化并于 50℃水浴保温的半固体琼脂中 ,混匀后 ,迅速倾入含底层固体琼脂的平板中。37℃培养 10h 后 ,加入 5mL SM ,4℃静置几小时 ,回收 SM ,56℃作用 30min ,离心除菌。参照 λ 噬菌体纯化的标准方法 ,采用氯化铯密度梯度纯化噬菌体 VP5 ,具体见参考文献 [3]。

1.3 噬菌体 DNA 的提取

按试剂盒说明书进行。

1.4 基因操作

质粒 DNA 提取、DNA 酶切、电泳、胶回收和连接 ,感受态细胞制备和质粒 DNA 转化均参照文献 [3]。

1.5 PCR 反应

表 1 为本研究所用扩增启动子区的引物对序列。PCR 反应体系 (100μL): 10 × Buffer 10μL , 25mmol/L MgCl₂ 6μL , 2mmol/L dNTPs 10μL , 正向和反向引物 (10μmol/L) 各 5μL , ddH₂O 63.5μL , Taq DNA 聚合酶 (5U/μL) 0.5μL。PCR 反应条件为 :94℃ 10min ,94℃ 1min ,56℃ 或 58℃ 30s ,72℃ 1min ,30 个循环 ,72℃ 10min。

表 1 PCR 扩增启动子区所用引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR-amplified promoters

Promoter name	Primer sequences	
P1	Positive 5'-CGGGATCCGTCAGAGTCCAATTCG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCGCTTTCATCTCCGGATG-3'
P2	Positive 5'-CGGGATCCGTTGTTCAGTATGGGAG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCGCTACCATAAGGTACTCC-3'
P3	Positive 5'-CGGGATCCGAGTTTCTTATGGGAAGTG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCACATACTCTACACCTCCC-3'
P4	Positive 5'-CGGGATCCCTGAGGATTTGTGGAG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCCTCGTCTGCTCATCATT-3'
P5	Positive 5'-CGGGATCCGTGCAAGTCTGCTACGTC-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCGTTGCACGACTCATACTA-3'
P6	Positive 5'-CGGGATCCGGATAGAATACGAGGATGT-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCCTTTCATAGATTTCCTCAG-3'
P9	Positive 5'-CGGGATCCACTCATAACGTCGGAATT-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCATTTCATTGCTTACGGG-3'
P10	Positive 5'-CGGGATCCGTCGCGAAAGTATCATT-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCCTCTGTTGGCTGTACATC-3'
P12	Positive 5'-CGGGATCCATCGAGCTAACGCCTGTC-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCCTGCGATAGTAGCCATA-3'
P15	Positive 5'-CGGGATCCAGTTCACACGCTCTTCAG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCATGACTCACCCCACT-3'
P17	Positive 5'-CGGGATCCAGATGCGACGTTTGAC-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCAAAGCCATAAGCCCTCCT-3'
P18	Positive 5'-CGGGATCCGCACTGCCTACGTATTG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCACATGTATGTTATCAGCG-3'
P19	Positive 5'-CGGGATCCAGCTGTGCTTAAACAAGG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCGACCTGCGCAAGTATTCT-3'
P21	Positive 5'-CGGGATCCGTACTACCGACTAGCTCG-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCCTAGCCATGTTGAAACTC-3'
P28	Positive 5'-CGGGATCCGCTGCTGAGTACGTCTCTT-3' ;	Negative 5'-CGGAATTCCTCTCATTCAGACGC-3'

BamH I 或 EcoR I restriction site underline.

1.6 霍乱弧菌电击转化法^[4]

从 LBA 平皿上挑取 7743 单菌落接种于 5mL 的 LB 中 ,37℃振荡培养过夜。次日 ,按 1:50 的比例转种到另一新鲜 LB 中 ,37℃振荡培养至对数期 (约 2 ~ 3h) 。转移培养物至冰浴中 10min 后 ,离心集菌 ,用事先预冷的 H 电击缓冲液洗两次后 ,重悬于 20μL 的 H 电击缓冲液中。加入要转化的质粒 ,轻轻混匀 ,共同冰浴 5 ~ 10min ,转入预冷的电击杯中 ,按如下参数电击 :2.5kV ,200Ω ,25μF。加入 800μL 的 LB ,37℃振荡培养 2 ~ 3h。适当稀释后 ,涂 Ap^r LBA 平皿 ,置 37℃培养过夜。挑取单菌落 ,提取质粒 PCR 鉴定。

1.7 外膜蛋白的提取

采用 Filip 提取法 ,具体方法参考文献 [5]。

1.8 报告基因质粒转化及全噬菌体共感染

将 1.6 中的阳性转化子培养至 OD₆₀₀ = 0.5 ~

0.6 ,取 10mL 菌液 ,加入 4 × 10¹⁰ pfu 噬菌体 VP1 1mL ,混匀 ,此时开始计时 ,取 1mL 菌液待用。37℃温育 5min 后 ,加入 N53 OMP 0.4mL ,混匀 ,分别于 10、20、30、40、50、60min 取 1mL 菌液 ,按 β-半乳糖苷酶检测试剂盒说明书操作检测 β-半乳糖苷酶活性。实验重复 3 次。

1.9 β-半乳糖苷酶 (β-Gal) 活性的测定

按试剂盒说明书操作 ,略做改动 ,简述如下 :取 1mL 菌液于 1.5mL 离心管中 ,12000r/min 离心 1min ,弃上清 ,用 PBS 小心洗菌两次 ,吸尽上清。加 200μL 1 × Report Lysis Buffer (RLB) ,悬菌 ,室温孵育 15min。涡旋 10 ~ 15s ,高速离心 2min ,转移上清至新的离心管中。此裂解液可直接进行检测或 -70℃储存 2 个月以上。在酶标板中 ,用 1 × RLB 适当稀释裂解液及阳性对照 β-Gal 至 50μL ,加 50μL Assay 2 × Buffer 混匀 ,盖上盖子 ,37℃孵育 30min ,加 1mol/L

碳酸钠 150 μ L 终止反应,用 Tip 头混匀孔中液体,避免产生气泡。测 OD_{410} 值。参照标准曲线得出的回归方程,可得到每个样品的 β -Gal 活性单位 (Milliunits)。

2 结果

2.1 PCR 扩增启动子区

根据推测的启动子区域,设计寡核苷酸引物,扩增产物长度预计为 200~400bp 左右,该片段包括启动子区及其上游部分。考虑到质粒 pRS1274 中克隆位点为 *Bam*H I、*Eco*R I、*Sma* I,在设计引物时,上游及下游引物分别加 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点。图 1 显示扩增的 PCR 产物与预计大小相符,无非特异性条带。经 1% 琼脂糖凝胶电泳,割胶回收所需目的条带。

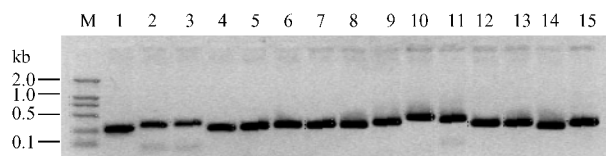


图 1 噬菌体 VP1 启动子区的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR-amplified promoter regions from phage VP1

M :DNA Marker DL2000 ; 1~15 : VP1 genome DNA for template ,PCR-amplified products of promoter P1 ,P2 ,P3 ,P4 ,P5 ,P6 ,P9 ,P10 ,P12 ,P15 ,P17 ,P18 ,P19 ,P21 and P28.

2.2 构建融合表达质粒

VP1 的预测启动子 PCR 产物分别经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶消化,纯化回收后,定向克隆在经同样酶切处理的质粒 pRS1274 中的相应位点上,阳性转化子在含氨苄青霉素、X-Gal、IPTG 的 LBA 平板上显兰色。挑取兰色单菌落,提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定。获得的重组融合表达质粒分别命名为:pLP1、pLP2、pLP3、pLP4、pLP5、pLP6、pLP9、pLP10、pLP12、pLP15、pLP17、pLP18、pLP19、pLP21、pLP28。

lacZ 融合质粒载体 pRS1274 在其克隆位点后携带有完整的大肠杆菌 *lacZ* 的编码序列,包括翻译起始位点,但没有 *lacZ* 启动子。在没有插入外源启动子时,融合载体表达的 β -Gal 活性非常低^[6],在克隆位点插入有启动子的外源片段后,下游的 *lacZ* 能在所插入片段中启动子的控制下进行表达。本研究中将 15 个启动子区克隆到 pRS1274 载体上,转化于大肠杆菌受体菌 JM109 中,所有克隆子均呈现兰斑,提示克隆的区域具有启动子活性,可为大肠杆菌的

RNA 聚合酶所识别。

2.3 融合表达质粒转化 AR134、7743 Δ Z

重组融合表达质粒分别转化大肠杆菌 AR134,在含氨苄青霉素、X-Gal、IPTG 的 LBA 平板上培养时,除 pLP1 转化得到淡兰色菌落外,其余均得到兰色菌落,挑单菌落提取质粒,PCR 鉴定阳性克隆子。

AR134 菌株为 *penB* 突变株,能限制 pBR322 衍生质粒的拷贝数在很低的水平,从而最大程度减少质粒拷贝数对 *lacZ* 表达的影响。p1 的克隆子为淡兰色,其余均为兰色,这也证实克隆的区域具有启动子活性。

重组融合表达质粒分别电击转化 7743 Δ Z,在含 25 μ g/mL 氨苄青霉素、X-Gal、IPTG 的 LBA 平板上培养时,阳性转化子菌落中心显兰色,挑单菌落提取质粒,经 PCR 鉴定为阳性克隆子,除 pLP10 及 pLP15 未电击进 7743 Δ Z 后,其余均电击成功,分别命名为 VLP1、VLP2、VLP3、VLP4、VLP5、VLP6、VLP9、VLP12、VLP17、VLP18、VLP19、VLP21、VLP28。

2.4 启动子活性检测

分别取 0,1,2,3,4,5milliunits 的 β -半乳糖苷酶标品按检测试剂盒说明书操作检测酶活性。计算标准品 β -半乳糖苷酶的活性单位与 OD_{410} 值标准曲线,得线性回归方程: $y = 0.29709x + 0.06162$,相关系数 $r = 0.994$, $p = 0.00006$,其中 x 为 β -Galactosidase (milliunits), y 为 OD_{410} 值。

前期的研究工作提示噬菌体 VP1 的潜伏期为 58min 左右。VP1 感染霍乱弧菌转化株后,噬菌体基因组进行转录,所有基因产物均由宿主 RNA 聚合酶合成,噬菌体编码的一些转录因子修饰或影响宿主 RNA 聚合酶的结构和功能,其后这些宿主 RNA 聚合酶相继识别早、中、晚 3 类启动子,同时这些宿主 RNA 聚合酶也识别转录融合质粒上的启动子,从而 β -半乳糖苷酶的表达量受启动子的早晚识别的影响,这可从时间上反映出来。图 2 所示的是 VP1 潜伏期间 *lacZ* 基因在各霍乱弧菌转化菌株中的时序表达及 β -半乳糖苷酶活力变化,而 β -半乳糖苷酶活力变化就反映了启动子的时序性。

λ 噬菌体约有 40% 的右向立即早期转录物可一直通过几个延迟早期基因(编码参与 DNA 复制的蛋白质)而终止于 *tR2*,即立即早期启动子 P_R 在延迟早期仍有转录活性。在噬菌体感染 20min 时 VLP17 的 β -半乳糖苷酶活性最高(图 2),说明 P17 在感染开始持续转录直至 20min,如果 P17 与 λ 噬菌体右向立即早期启动子 P_R 功能类似,则推测 P17 为早期启

动子 ,否则 P17 为中期启动子。

VLP2、VLP4、VLP9、VLP12、VLP19、VLP21、VLP28 的 β -半乳糖苷酶活性在噬菌体感染 30min 时表达最高(图 2),VLP3 的酶活性在感染 10min 内活性没有上升,而在感染 20min 时表达最高(图 2),说明 P2、P3、P4、P9、P12、P19、P21、P28 在感染 20min 或 30min 时转录活性最强,提示推测上述启动子为中期启动子。

P_R 是 λ 噬菌体整个晚期区转录的唯一启动子,可在感染早期就有活性,VLP18 的 β -半乳糖苷酶活性在噬菌体感染 60min 时表达最高(图 2),说明 P18 在感染晚期转录活性最强,提示 P18 可能与 P_R 功能类似,推测其为晚期启动子。

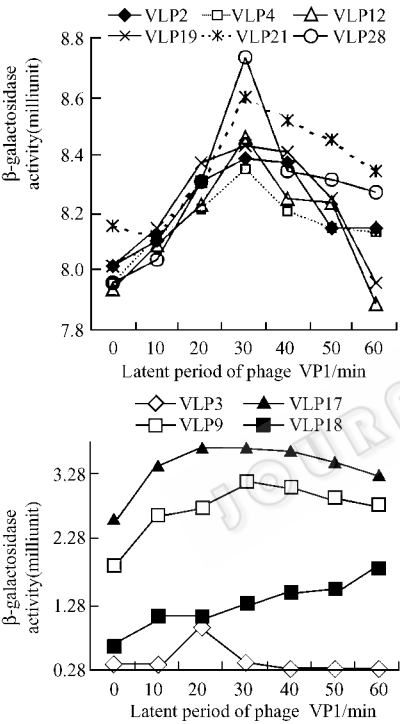


图2 VP1 潜伏期间 *lacZ* 基因在各霍乱弧菌菌株中的时序表达及 β -半乳糖苷酶活力

Fig.2 Time-course expression of *lacZ* gene and β -galactosidase activity in *Vibrio cholerae* transformants at latent period of phage VP1

3 讨论

因为 VP1 为 El Tor 型霍乱弧菌的烈性噬菌体,为充分考虑其启动子受霍乱弧菌 RNA 聚合酶的作用,我们将这些重组质粒又电击到 *lacZ* 缺失的霍乱弧菌 7743 Δ Z 中。同时,因为有可能 VP1 的不同启动子受 VP1 感染菌体后新合成蛋白的激活上调,在感染的不同阶段表现不同程度的活性,因此我们采取了含某个启动子活性报道质粒的霍乱菌株转化子

再用 VP1 感染和裂解的策略,以报告基因观察在 VP1 繁殖过程中、报道质粒上 VP1 的不同启动子在感染不同时间点上被共激活的活性,以此来反映启动子被激活上调的时序性。

在本研究中,为检测 VP1 预测启动子的活性,我们采用了报道质粒转化霍乱受体菌、然后再用 VP1 噬菌体共转染的策略。因为考虑有些噬菌体的启动子,尤其是中、晚期启动子受噬菌体自身表达蛋白的调控。单独含这个启动子的报道质粒在霍乱弧菌中可能没有启动活性、或启动表现与实际噬菌体感染时有不同。比如 λ 噬菌体早期启动子 P_R 的转录物之一的 Cro 蛋白,在感染的过程中逐渐积累,与两个操纵基因区结合,从而阻止 RNA 聚合酶与该区的结合,关闭从早期启动子 P_L 和 P_R 的起始转录。 λ 噬菌体早期合成的另一种调节蛋白 Q 蛋白是抗终止子,它的合成导致了晚期基因转录的起始,即促进晚期启动子 P_R 的开始转录。故采用噬菌体共感染策略,使得后感染进来的噬菌体的某些早期蛋白的表达、会促使检测的启动子表现活性,质粒上不同的启动子在噬菌体调控蛋白的作用下在感染的不同时间转录 *lacZ* 基因。重组质粒上的 β -半乳糖苷酶的表达在转录水平受启动子克隆片段的调控,在翻译水平受启动子克隆片段和 *lacZ* 自身的双重调节,当噬菌体 VP1 感染菌株 VLP1 等时,VP1 的早期启动子转录的基因产物不仅调节噬菌体 VP1 DNA 的中、晚期转录,同时还可调节质粒上的启动子从而影响 *lacZ* 的表达,*lacZ* 的表达随着时间的延长、随着启动子为中、晚期而发生变化。

噬菌体感染周期一般可分为早期、中期、晚期三期,或分为早期、早晚期、晚期。噬菌体早期转录 RNA 聚合酶或中期基因的调节因子等。裂解感染的晚期主要是完成 DNA 复制、DNA 包装及噬菌体颗粒的装配及裂解。晚期启动子转录噬菌体结构蛋白、装配蛋白及裂解蛋白。VP1 基因组是新的噬菌体序列,核酸和蛋白质同源检索发现,只有几个基因及产物的同源性较高。P3 启动子转录基因 6,其编码产物具有裂解细菌的功能。P21 转录基因 34,其编码产物具有 DNA 聚合酶的功能。P28 转录基因 35、36,而编码产物分别具有 DNA 聚合酶和外切酶的功能。感染中期转录基因编码参与 DNA 复制的蛋白质和晚期基因的调节因子。故 P3、P21、P28 是中期启动子。P18 转录基因 31、32 等,而噬菌体基因 31 编码产物参与维持细胞质膜的完整性,与噬菌体 VP1 的结构有关;基因 32 与噬菌体 T4、OX2、T2、

T3 的 *wac* 基因有一定的同源性,该基因产物与头部组装有关,这也说明 P18 是晚期启动子。以上序列分析与实验结果相互吻合。P17 是否为早期启动子还需进一步深入研究。

噬菌体转录水平调控机制通常有 3 种:①合成自身的 RNA 聚合酶,如 T7 噬菌体;②利用宿主菌的 RNA 聚合酶转录并合成一些调节蛋白,通过调节蛋白的作用,其他基因的转录或被激活或被阻遏,如 λ 噬菌体;③通过对 RNA 聚合酶 σ 因子的更换实现其早、中、晚基因表达的时序控制,如枯草杆菌噬菌体 SP01。VP1 的转录调控机制与 λ 噬菌体或 SP01 噬菌体同出一辙,或机制独特,这都需要深入研究。

参 考 文 献

[1] 贾盘兴,等.噬菌体分子生物学—基本知识和技能.第一版.北京:科学出版社,2001.

[2] 徐建国主译.医用细菌遗传学实验指南.第一版.北京:科学出版社,1998.

[3] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. 分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫,等译.第二版.北京:科学出版社,1999.

[4] Hilda M , Ketly J M , Kaper J B , et al. Effects of Dnase production , plasmid size , and restriction barriers on transformation of *Vibrio cholerae* by electroporation and osmotic shock. *FEMS Microbio Lett* ,1990 **68** :149 – 154.

[5] Tetsuyoshi I ,Shigenobu M ,Shuji T. A 26-kDa outer membrane protein ,OmpK ,common to *Vibrio* species is the receptor for a broad-host-range vibriophage ,KVP40. *FEMS Microbio Lett* ,1995 **125** :101 – 106.

[6] Simons R W , Houman F , Kleekner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* ,1987 **53** 85 – 96.

Functional analysis of promoters of *Vibrio cholerea* typing phage VP1 with reporter system

LI Yan-ping^{1,2} LIANG Wei-li² WANG Duo-chun² QI Guo-ming² KAN Biao^{2*}
(¹ Jiangxi-OAI Joint Research Institute ,Nanchang University , Nanchang 330047 ,China)

(² National Institute for Communicable Disease Control and Prevention ,Chinese Center for Disease Control and Prevention ,Beijing 102206 ,China)

Abstract : Phage VP1 infects and lyses *Vibrio cholerae*. The VP1 genome is a circular double-strand DNA and its size is 32176 base pairs. Analysis of the sequence of the VP1 genome revealed the presence of 15 putative promoter sequence. The activities of these putative promoters in *V. cholerae* were assayed by transformation of reporter gene plasmid and phage infection together. Promoter regions were ligated into pRS1274/*Bam*H I /*Eco*R I . Then transformed into *E. coli* JM109 and all of clone display blue. The recombinant plasmids were transformed into *V. cholerae* 7743 \triangle Z by electroporation , then bacteriophage VP1 infect transformant. The time-course expressing *lacZ* gene and detecting change of β -galactosidase enzyme activity in *V. cholerae* transformants at latent period , indicated P17 probably is a early promoter ; P2 and P3 and P9 etc are medium-term promoters ; P18 is a late promoter.

Key words : *Vibrio cholerae* ,Phage ,Promoter ,Reporter gene

Foudation item :Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Developmen(G1999054102) ;National Natural Science Foundation of China(30271169)

* Corresponding author. Tel 86-10-61739458 ,Fax 86-10-61739156 ; E-mail :kanbiao@icdc.cn

Other authors :GAO Shou-yi² ,LIU Yan-qing²

Received date 02-28-2005

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	北京先能技术开发有限责任公司	文前 V / VI
GE Healthcare Bio-sciences(原名 Amersham Biosciences)	封二	镇江达森发酵设备有限公司	文前 VII
尼康仪器(上海)有限公司	封三	上海保兴生物工程设备有限公司	文前 VIII
天根生化科技(北京)有限公司	文前 I / II	扬中威柯特生物工程设备有限公司	文后 I
上海国强生化工程装备有限公司	文前 III / IV	岛津(香港)有限公司	文后 II