

大肠杆菌 *araC* 突变基因的分子克隆及 DNA 序列分析

曾伟强

Ron G. W.

(中国科学院遗传研究所, 北京) (University of California, UCSB)

大肠杆菌 *araC* 基因 (L-阿拉伯糖调节基因) 的一些突变体已克隆到质粒 pBR322 的 *PstI* 位点。在转化 *araC* 基因缺失菌株 $\Delta 766$ 后, 阿拉伯糖变构酶活力重新获得表达。但突变对酶活力的影响是三种类型: (1) 削弱; (2) 无明显影响; (3) 增强。通过 DNA 序列分析并与野生型进行比较, 已找到缺失突变或点突变的位置。

关键词 阿拉伯糖调节基因; 突变体; 重组 DNA; 序列分析

大肠杆菌对 L-阿拉伯糖利用的酶是由六个基因编码的。 *araE* 基因编码渗透酶, *araF* 基因编码外周蛋白, *araB* 基因编码 L-核酮糖激酶, *araA* 基因编码变构酶, *araD* 基因编码 L-核酮糖-5-磷酸-4-变位酶, *araC* 是 *araBAD* 的调节基因。 *araBAD* 的表达受 *araC* 基因编码的、对该操纵子专一的调节蛋白的正与负所控制^[1-3]。 *araC* 基因位于 *araBAD* 操纵子的右端^[4]。 *araBAD* 和 *araC* 的转录起点都位于 *araB* 及 *araC* 之间的 DNA 序列, 但两者方向相反^[5]。 *araC* 基因的表达则受 *araC* 蛋白的自我负反馈调节。因此, *araC* 基因编码蛋白具有正负调节功能, 故该基因的突变可能改变其调节性能^[1,2,4]。所以研究结构上的变化对研究 *araC* 突变体的结构与功能的关系将大有益处。在此需要有野生型 *araC* 基因及突变体基因的结构知识。 Ron G. W. 等已克隆了野生型 *araC* 基因并做了序列分析^[3]。本文报导 *araC* 突变体的分子克隆及其与野生型 DNA 进行序列分析的比较结果。

材料和方法

(一) 菌株

大肠杆菌 *E. coli* K12 及噬菌体来自 Nancy Lee 实验室。 *E. coli* K12 $\Delta 766$ 系 *araC* 缺失菌株, 缺乏阿拉伯糖变构酶活性, 不能生长于阿拉伯糖培养基中, 因此选为受体菌。 λ *paraC* 系溶源性菌株, 组成型, 但有缺失或突变。

(二) 培养基

MAB1 培养基: 磷酸盐原液 (K_2HPO_4 140g, KH_2PO_4 60g, 加 H_2O 至 1L) 50ml, 硫酸盐原液 ($(NH_4)_2SO_4$ 20g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0g, 加 H_2O 至 1L) 50ml, 20% L-阿拉伯糖 10ml, 0.1% 维生素 B₁ 4ml, 10% 水解酪蛋白氨基酸 25ml, 加 H_2O 至 1L。

(三) 酶

T₄ 多核苷酸激酶是按 Richardson 及 Squires^[6] 方法稍加改进由 Nancy Lee 实验室制备的。 *EcoRI* 是 J. Carbon 实验室制备的。 *BamHI* 系 C. L. Squires 赠, 按 Wilson and Young^[7] 法制备。 *PstI*, *HaeIII*, *HpaII*, *MboII*, *HhaI*, *TaqI* 及 T₄ 连接酶等从 New England Biolabs Beverly, MA 购买的。 [γ -³²P] ATP 是按 Maxam 和 Gilbert^[8] 改进的 Glynn 和 Chappell^[9] 交换合成法制备的, 比活力 2000—3000 Ci/mmol。

(四) 载体

质粒 pBR322 DNA 被选为运载体, 从 *E. coli*

本文于 1986 年 12 月 29 日收到。

作者对 Nancy Lee 教授的指导和支持深表感谢。

RRI 中提取,经氯化铯梯度离心纯化^[10]。

(五) DNA 序列分析

按 Maxam-Gilbert^[6] 化学法进行序列测定。

结 果

(一) λ para C^c DNA

所有各株溶源菌冰冻干燥后室温贮存。制备 DNA 时,首先接种干燥细胞于 5ml LB 培养基中,30℃ 摇床培养过夜。翌日晨取此培养菌 1ml 同 100ml TB 培养基混合,摇床培养 12—16 小时后,在一个体积 2L 的 Kluver 瓶中加入 900ml TB 培养基及 100ml 新鲜培养菌,置 30℃ 通气培养到 Klett 比色计上 $OD_{600nm} = 50$, 即把 Kluver 瓶转到 44℃ 水浴保温 30 分钟,再转到 37℃ 培养 3 小时,可见到细菌裂解起泡沫。培养液由乳白色混浊变为清亮,表明噬菌体已完全从细胞内释放到培养液中。留样测噬菌体滴度,应在 10^{10} PFU/ml 以上。用 1% 氯仿处理培养细胞 30 分钟,然后 $7,400 \times g$ 离心 30 分钟,除去细菌残渣。上清液中加入 NaCl 到 0.5mol/L 和聚乙二醇 (PEG-6000) 到 6% (W/V) 以沉淀噬菌体。离心收集噬菌体颗粒。将沉淀重新悬浮于 40—80ml 噬菌体缓冲液 (10m mol/L Tris-HCl pH7.5, 10m mol/L $MgSO_4$) 中。在 4℃ 缓慢搅动过夜,再离心除去不溶物。上层悬浮液通过氯化铯阶梯度 (CsCl ρ 1.6, RI 1.3902; CsCl ρ 1.4, RI 1.3713 及 36% 蔗糖) 22,500r/min 离心 2 小时 (20℃, Beckman SW 25.2 转头)^[11,12]。用塑料注射器吸出噬菌体带,并对噬菌体缓冲液透析 2 小时。用苯酚萃取 3 次以除去蛋白,然后用乙醇沉淀 DNA。为除掉少量染色体 DNA 污染,可把 DNA 再一次通过氯化铯等密度梯度离心纯化^[13]。所得 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检查呈单一条带,无 RNA 或染色体 DNA 污染。

(二) *araC*^c 突变基因的分子克隆化

1. 把 pBR322 DNA 及 λ para C^c DNA 用 *Pst* I 37℃ 消化 1 小时,然后 65℃ 加热 10 分钟,用乙醇沉淀 DNA。再把 DNA 溶于连接酶反应缓冲液中,于 12℃ 用 T4 连接酶连接过夜。经聚丙烯酰胺凝胶电泳检查连接前及连接后的反应情况 (图版 1-1)。

2. *E. coli* Δ 766 培养过夜,翌日接种 1% 量,培养 3—4 小时至 $OD_{600nm} = 0.6$ 时收集细胞,用 30mmol CaCl₂ 处理后再用连接好的重组 DNA 转化受体细胞^[13]。处理后的细胞涂布于含 12 μ g/ml 四环素及 1% L-阿拉伯糖的 MAB1 选择性平皿上。37℃ 培养二天后拣出平皿上的生长菌落,并用含四环素及 L-阿拉伯糖的 MAB1 液体培养基培养扩增。检测各转化体的 L-阿拉伯糖变构酶 (*E. C.* 5·3·1·4) 活性及进行快速质粒 DNA 制备^[14],并用 *Hae* III 切割重组体质粒 DNA,经琼脂糖凝胶电泳检查外源 DNA 插入情况 (图版 1-2)。

(三) 重组体 DNA 的制备及其序列分析

1. 经上述检验含有外源 DNA 且具变构酶活力的重组体单克隆培养于含 1% L-阿拉伯糖及 12 μ g/ml 四环素的 MAB1 培养基中。当细胞生长至对数中期,约 $OD_{600nm} = 0.9—1.0$ 时,加入氯霉素,使达 170 μ g/ml 以扩增质粒 DNA,并继续培养 12—16 小时。离心收集细胞。用清亮裂解法^[14]制备质粒 DNA,并用 CsCl-EtBr 等密度梯度离心进一步纯化质粒 DNA^[14,15]。从 1L 培养菌可获得 2—6mg 纯净质粒 DNA。

2. 限制性内切酶 *Hae* III 切割: 重组体质粒 pBR322-*araC*^c 的 DNA 用 *Hae* III 切割,以野生型重组体 pNL4 质粒 DNA

表 1 突变株 $araC^c$ 基因克隆后所得重组体的 L-阿拉伯糖变构酶活力^[17]Table 1 The activities of L-arabinose isomerase of cloned recombinants which contain $araC^c$ gene mutation

菌株 Strain	L-阿拉伯糖变构酶活力 The activities of L-arabinose isomerase	注 Note
空白 Blank	96	
野生缺陷型 WT- Wild type WT-	103	
野生组成型 WT+ Wild type constitutive WT+	850	
pBR322araC ₈₈	135	
pBR322araC ₁₁₃	190—410	Several clones tested
pBR322ara C ₁₂	540	
pBR322ara C ₅₄	660	
pBR322ara C _{54d}	670	
pBR322ara C ₁₀₀	750	C _{100a} —C _{100f} six clone tested
pBR322ara C ₆₇	800	
pBR322ara C _{6a} & 6b	900	
pBR322ara C ₁₀₃	975	
pBR322ara C ₁₀₈	200—250	Several clones tested

为对照^[5], 找出 PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 中相应的 D、E、J (或 j)^[3-14] 条带 (图版 I-3)。照相记下重组体中突变 DNA 片段的位置, 然后做大量 (毫克以上) DNA 的 *Hae* III 切割, 从制备胶切下所需条带 (图版 I-4)

3. DNA 序列分析: 用 Maxam-Gilbert^[8,16] 法从 PAGE 制备胶中的对应条带回收突变 DNA 片段。经碱性磷酸酯酶切除 5'-末端的 ³²P 以后, 用 T4 多核苷酸激酶及 ³²P- γ -ATP 标记 DNA 片段的 5' 末端。标记后的 DNA 片段再用 *Hpa*II 或

Hha I 等进一步切小。用 PAGE 分离 5'-末端带标记的单链 DNA (图版 II-5, 6)。所得 5'-³²P-DNA 单链小片段分成 5 个小管, 按 Maxam-Gilbert 碱基特异性反应测定序列^[8]。PAGE 浓度为 12% (内含尿素 42%)、胶厚 0.4mm。工作电压 2300V。将每组 5 个特异性反应物再各分成 3 等份。进行电泳时, 每隔 30—40 分钟走一组样品, 以便于直读 DNA 序列 (图版 II-7, 8)。

(四) 重组体的 L-阿拉伯糖变构酶活性

各重组体的单克隆都按 Nancy Lee^[4] 法进行酶活力测定。表 1 仅列出已经过 DNA 序列分析的突变重组体的酶测定结果。

(五) *araC*^c 诸突变体的序列分析结果

在分析各突变重组体的 *Hae* III 限制片段 *D.E.J* (或 *j*) 的 DNA 序列以后, 发现有的仅仅是点突变, 有的是缺失一段 DNA, 也有的是兼具两者^[17]。结果简述如下: C_i^c 在 -364 位 $\frac{A}{T}$ 突变成 $\frac{C}{G}$ 。 C_j^c 在 -367 位 $\frac{T}{A}$ 突变成 $\frac{A}{T}$ 。 C_8^c 在 -595 位 $\frac{G}{C}$ 变成 $\frac{A}{T}$ 。 C_9^c 在 -337 位 $\frac{T}{A}$ 突变成 $\frac{G}{C}$ 。 C_{10}^c 在 -777、-778 位 $\frac{CT}{GA}$ 突变成 $\frac{AG}{TC}$ 。 C_{11}^c 及 C_{12}^c 在 -331 至 -339 缺失 9 个核苷酸。 C_{13}^c 在 -351 位 $\frac{A}{T}$ 突变成 $\frac{C}{G}$ 。 C_{100}^c 在 -331 位 $\frac{A}{T}$ 突变成 $\frac{G}{C}$ 。 C_{101}^c 在 -300 至 -376 缺失一段 DNA。 C_{103}^c 在 -336 位 $\frac{C}{G}$ 突变成 $\frac{G}{C}$ 。 C_{108}^c 在 -375 位 $\frac{G}{C}$ 突变成 $\frac{T}{A}$ 。 C_{112}^c 在 -370 位 $\frac{T}{A}$ 突变成 $\frac{G}{C}$ 。 C_{100}^c 在 -366 另有一处点突变, $\frac{C}{G}$ 突变成 $\frac{A}{T}$ 。

讨 论

本工作开始时我们把 λ *para C*^c 突变体的 DNA 克隆到质粒 pBR322 的 *Bam* HI、*Eco* RI 或 *Eco* RI + *Bam* HI 的切点上, 都未能获得成功; 但克隆到 *Pst* I 切点上却很容易获得成功。除了 C_{108}^c 较难克隆(做了三次克隆实验才获得一个重组体)外, 在其余各突变体的克隆实验中, 一次就可获得数个至数十个重组体。大多数突变重组体都能在 *E*、*J* 带或 *D* 带的序列分析

中找到点突变或缺失, 或两者。阿拉伯糖调节基因发生突变的确影响阿拉伯糖变构酶活力, 其效应可分成三种类型: (1) 缺失或点突变极大地降低酶活力, 如 pBR322ara- C_8^c 、pBR322ara C_{11}^c 、pBR322ara C_{108}^c 。(2) 突变或缺失对酶活力影响很小或无影响, 如 pBR322ara C_j^c 、pBRara C_9^c 、pBR322ara C_9^c 及 pBR322ara C_8^c 等。(3) 突变导致酶活力增高, 如 pBR322ara C_{105}^c 。

在分析上述数据时, 我们发现, 阿拉伯糖调节蛋白氨基末端(对应 DNA 的 5' 末端) 突变对酶活力影响较小, 如 pBR322ara C_8^c 在 -337 突变(氨基末端)对酶活力无影响。而阿拉伯糖调节蛋白中心部位突变则强烈地降低酶活力, 如 pBR322ara C_8^c 在 -777、-778 (相应于 *araC* 蛋白中心部位) 突变, 则酶活力下降到近野生缺陷型 WT⁻, 只有 135 活力单位。

参 考 文 献

- [1] Englesberg, E.: *Metabolic Pathways: Metabolic Regulation*, Academic Press, New York, 5: 257—296, 1971.
- [2] Englesberg, E.: *Annu. Rev. Genet.*, 8: 219—242, 1974.
- [3] Ron, G. W. et al.: *Gene*, 12: 179—190, 1980.
- [4] Nancy, L.: *The Operon*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., p. 389—409, 1978.
- [5] Wilcox, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 3635—3639, 1974.
- [6] Richardson, C. C.: *Procedures in Nucleic Acid Research* (ed. Cantoni, G. L. and D. R. Davies), Harper and Row, New York. 2: 815—828, 1971.
- [7] Wilson, G. A. and F. E. Young: *J. Mol. Biol.*, 97: 123—125, 1975.
- [8] Maxam, A. M. and W. Gilbert: *Methods in enzymology*, Part I, Academic Press, New York, 65: 499—560, 1980.
- [9] Glynn, J. M. and J. B. Chappell: *Biochem. J.*, 90: 147—149, 1964.
- [10] Blair, D. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69: 2518—2522, 1972.
- [11] Robert, F. S. et al.: *Practical methods in molecular biology*, Springer-Verlag, New York Inc.,

- 33—35, 1981.
- [12] 曾伟强等: 遗传, 7(1): 41—42, 1985。
- [13] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., p. 247—251, 1982.
- [14] 曾伟强等: 遗传, 5(1): 39—40, 1983。
- [15] Robert, F. S. et al.: Practical Methods in Molecular Biology, Springer-Verlag, New York inc, 101—106, 1981.
- [16] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 164—165, 1982.
- [17] Zeng Weiqiang et al.: Annual Report of The Institute of Genetics, Academia Sinica, p. 167—168, 1981.

THE CLONING OF REGULATORY GENE MUTANTS OF ARABINOSE IN *E. COLI* AND THEIR DNA SEQUENCING

Zeng Weiqiang

Ron G. W.

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

(University of California, UCSB)

The pieces of *paraC^c* mutant chromosomal DNA were cloned into *E. coli* $\Delta 766\text{RecA}^-$. The regulatory function of *araC^c* mutant genes to the L-arabinose isomerase activity was studied. Through DNA sequencing analysis, the mutant genetic codons had been found. The results were as follows: C_1^c at —364

position $\begin{matrix} A \\ T \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} C \\ G \end{matrix}$; C_2^c at —367

position $\begin{matrix} T \\ A \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} A \\ T \end{matrix}$; C_5^c at —595

position $\begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} A \\ T \end{matrix}$; C_6^c at —337

position $\begin{matrix} T \\ A \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$; C_8^c at —777,

—778 $\begin{matrix} CT \\ GA \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} AG \\ TC \end{matrix}$; C_9^c and C_{17}^c

at —331 to —339 position deletion. C_{58}^c

at —351 position $\begin{matrix} A \\ T \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} C \\ G \end{matrix}$; C_{109}^c

at —331 $\begin{matrix} A \\ T \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$; C_{101}^c at —300

to —376 position deletion; C_{103}^c at —366

$\begin{matrix} C \\ G \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$; C_{108}^c at —375 position

$\begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} T \\ A \end{matrix}$; C_{112}^c at —370 position

$\begin{matrix} T \\ A \end{matrix}$ mutant into $\begin{matrix} G \\ C \end{matrix}$; C_{102}^c at —366 position

has another mutation $\begin{matrix} C \\ G \end{matrix}$ into $\begin{matrix} A \\ T \end{matrix}$.

Owing to the mutation of codons, the amino acids in protein also altered correspondingly. So the L-arabinose isomerase activity is influenced. Signs hint that the mutation at both sides of the regulatory gene effects on isomerase activity is somehow different.

Key words

Arabinose regulatory gene; Mutants; Recombinant DNA; Sequencing

图 版 说 明

1. 各重组体连接前 (A、B、C、D、E、和 F) 及连接后 (A'、B'、C'、D'、E' 及 F') 的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱。

2. pBR322ara C₅, pBR322ara C₇, pBR322ara C₁₀₀, 各重组体的单克隆分离及质粒 DNA 快速分析结果。A、K: pBR322 DNA *Hae* III 切割, 对照; B、G: 野生型 pNL₄ DNA *Hae* III 切割对照; A—D 只显示电泳后的上部。pNL₄ 经 *Hae* III 切割后, 电泳图谱中各 DNA 小片段按其大小由上至下为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N……; C 为 pBR322ara C₅ DNA 用 *Hae* IV 切割; D 为 pBR322ara C₇ DNA 用 *Hae* III 切割。E、F、H、I、J 为 pBR322 ara C₁₀₀ 的 5 个单克隆 DNA 经 *Hae* III 切割。

3. 重组体质粒 DNA 经 *Hae* III 切割的限制图谱分析。A、I 为野生型 pNL₄ 对照; E、J 为 pBR322 对照; B、K 为 pBR322ara C₅; C 为 pBR322ara C_{100d}; D 为 pBR322ara C_{100e}; F 为 pBR322ara C_{100f}; G 为 pBR322-ara C₇; H 为 pBR322ara C₇; L 为 pBR322ara C₁₁₀。

4. 重组体质粒 DNA 经 *Hae* III 切割后的 PAGE 制备胶电泳图(只示其中之一图谱)。

5. 5'-³²P-末端标记 C₁₀₀ *Hae* III D 片段(左边 4 行)及 C₁₁₀ D 片段(右边二行)的重链(HS)及轻链(LS) PAGE 胶分离及其放射自显影图。左边第 3、4 行为野生型的重链及轻链对照(WT)。

6. pBR322ara C₅, pBR322ara C₇, 及 pBR322ara C₁₁₀ 的 J 片段 DNA 经 5'-³²P-末端标记后, 再用 *Hpa* I 或 *Taq* I 切割后的单链 DNA 小片段的 PAGE 及自显影图。DS: 双链 DNA; HS: 重链 DNA; LS: 轻链 DNA。

7 和 8. pBR322ara C₅ 及 pBR 322ara C₁₀₀ 突变片段的 Maxam-Gilbert 化学法序列分析结果。7 为 pBR 322ara-C₅; 8 为 pBR322ara C₁₀₀ 的部分序列。

Explanation of plates

1. The patterns of agarose gel electrophoresis for recombinant DNAs before ligation (A, B, C, D, E, F) and after ligation (A', B', C', D', E', F').

2. The isolation for pBR322ara C₅, pBR322ara C₇, and pBR322ara C₁₀₀, recombinant single clones and the rapid analyses for their plasmid DNAs¹¹¹. A, K, is pBR322 DNA by *Hae* III digestion for control. B, G, is wild type pNL₄ DNA by *Hae* III digestion for control. A—D only upper parts are shown. pNL₄ DNA after *Hae* III digestion, the pieces in diagram according their sizes are as follows: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N...; C is pBR322ara C₅ DNA by *Hae* III digestion. D is pBR 322 ara-C₇ DNA by *Hae* III digestion. E, F, H, L, J are the 5 clones of pBR322 ara C₁₀₀, DNAs by *Hae* III digestion.

3. The restriction patterns for recombinant plasmid DNAs after *Hae* III digestion. A, I is wild type pNL₄ for control. E, J is pBR322 DNA for control. B, K is pBR322ara C₅; C is pBR322ara C_{100d}; D is pBR322ara C_{100e}; F is pBR322ara C_{100f}; G is pBR322ara C₇; H is pBR322ara C₇; and L is pBR322ara C₁₁₀.

4. The pattern of preparative PAGE for recombinant plasmid DNA after *Hae* III digestion (only one pattern is shown here).

5. The separation on PAGE and autoradiophotography for the heavy strand (HS) and the light strand (LS) of 5'-³²P-end labeled C₁₀₀ *Hae* III D fragment (the four lanes on left) and 5'-³²P-end labeled C₁₁₀ (the two lanes on right). Lane 3 and 4 is wild type for control.

6. The electrophoresis on PAGE and autoradiophotography for single strand small pieces of pBR 322ara C₅, pBR322ara C₇, and pBR322ara C₁₁₀ DNA, of which J fragments were re-cut with *Hpa* I or *Taq* I.

7—8. The diagrams of pBR322ara C₅ and pBR322ara C₁₀₀ mutant DNA (their small pieces) after sequencing by the chemical method of Maxam-Gilbert. 7 is the part sequence for pBR322-ara C₅ and 8 is the part sequence for pBR322ara C₁₀₀.