

极端嗜盐古菌质粒 pSCM201 衍生穿梭表达载体的构建及应用

苗荻, 孙超岷, 向华*

(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 100101)

摘要 【目的】利用有自主知识产权的嗜盐古菌 θ 型复制质粒和启动子, 构建在极端嗜盐古菌模式菌株西班牙盐盒菌 (*Haloarcula hispanica*) 中方便使用、功能完善的基因表达载体。【方法】以 pSCM201 的最小复制子为基础, 通过引入莫维诺林抗性基因、大肠杆菌质粒复制子以及氨苄抗性基因, 构建了一个新的嗜盐古菌-大肠杆菌穿梭载体。利用定点突变和末端补平法依次将其中多余的酶切位点去除后, 再添加 *hsp5* 启动子核心序列、人工合成的多克隆位点以及蛋白纯化标签 His-Tag 等重要元件成功构建了嗜盐古菌表达载体 pSCM307。将报告基因 *bgaH* 插入到该载体的多克隆位点中并转化 *H. hispanica* AS2049, 通过 X-gal 平板筛选和 β -半乳糖苷酶酶活实验检测 pSCM307 的表达能力。【结果】pSCM307 具有独立的自主复制能力, 其多克隆位点方便实用, 报告基因 *bgaH* 在 *hsp5* 启动子控制下实现了高效表达。【结论】成功构建了嗜盐古菌领域中第一个方便使用的基因表达载体。

关键词: 嗜盐古菌; pSCM201; 穿梭载体; 表达载体

中图分类号: Q933 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)08-1040-08

极端嗜盐古菌相对于其他古菌来说, 易于实验室培养及遗传转化, 因此已成为研究古菌生命机制最重要的材料之一^[1]。嗜盐古菌富含质粒, 在某些菌株中各类质粒可占宿主菌 DNA 总量的 25%^[2], 这就为我们构建多样化的载体系统奠定了基础。加之 PEG 介导的原生质体转化方法的建立^[3]以及莫维诺林 (mevinolin, Mev) 等抗生素抗性选择标记基因的鉴定^[4], 都相应地推动了极端嗜盐古菌遗传操作系统的逐步完善, 促进了嗜盐古菌在分子生物学领域的快速发展。

在已描述的一些极端嗜盐古菌质粒中, 其复制方式可以分为两类, 一类是滚环型质粒, 如 pNB101、pZMX201^[5]等; 另一类如 pHV2、pHH1 等, 被推测可能属于 θ 型复制^[2], 但都没有直接的实验证据证明。以这些质粒为基础, 已发展了一系列的克隆载体, 这些载体均含有极端嗜盐古菌质粒复制子, 大肠杆菌

质粒复制子以及用于在极端嗜盐古菌和大肠杆菌中筛选转化子的抗性选择标记。例如 pHV2 和 pHH1 就分别被用于构建了目前在嗜盐古菌中普遍使用的穿梭克隆载体 pWL102^[6]和 pUBP2^[7]。

将极端嗜盐古菌的克隆载体与极端嗜盐古菌特殊的启动子及其他一些表达调控元件加以组合可构建成表达载体, 实现基因的同源或异源表达, 以进行基因功能的分析鉴定。目前, 已经有来自盐杆菌属 (*Halobacterium* sp.) 的细菌视蛋白基因 *bop* 启动子^[8]、来自盐沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*) 的铁氧还蛋白基因启动子^[9]以及来自沃氏富盐菌 (*Haloferax volcanii*) 的 tRNA 基因启动子^[10]等被用于嗜盐古菌基因表达的研究, 但是成熟的表达载体仍未见报道。

最近, 本实验室的孙超岷博士从盐盒菌属 *Haloarcula* sp. AS7094 中分离测序了一个新质粒

基金项目: 国家自然科学基金(30671141); 国家“863 计划”(2006AA09Z401)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807472; E-mail: xiangh@sun.im.ac.cn

作者简介: 苗荻(1983-), 女, 北京人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子遗传学研究。E-mail: miaous@163.com

收稿日期: 2009-03-16; 修回日期: 2009-04-03

pSCM201 通过透射电镜分析和复制起点作图等方法,证明该质粒为单向 θ 复制型质粒,并确定了其最小复制子和精确的复制起始位点^[11]。pSCM201 的最小复制子为 1.8 kb,包括复制起点 *ori201* 以及推测的复制蛋白基因 *rep201*,并且通过质粒稳定性实验证明该复制子的稳定性非常好^[12]。本文的研究工作就是在 pSCM201 这些遗传特性和研究进展的基础上,对其加以改造和完善,构建一个相对成熟的极端嗜盐古菌专用的基因表达载体。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:极端嗜盐古菌 *Haloarcula* sp. AS7094 为 pSCM201 的天然宿主,采用 AS-168 培养

基于 37℃ 培养^[13]。*Haloarcula hispanica* AS2049 为衍生载体的转化宿主,同样采用 AS-168 培养基于 37℃ 培养,在需要时添加终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的莫维诺林作为抗性选择^[13]。大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 为基因克隆的宿主,采用 LB 培养基于 37℃ 培养^[14];在需要时添加终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素作为抗性选择。pUCmT 载体是购自上海生工的 pUCmT 经平滑化后自身环化成的复制形式^[11]。质粒 pWL102 为莫维诺林抗性基因(*Mev^r*)的来源;质粒 pNP22^[15]为 *bgaH* 基因的来源。其他的中间衍生载体产物见表 1。

1.1.2 引物:本文涉及的所有引物见表 2。

1.1.3 主要试剂和仪器:常用的缓冲液均按照文献

表 1 本文所涉及的质粒

Table 1 The plasmids used in this study

Plasmids	Relevant features	References or sources
pWL102	10.5 kb shuttle vector; Amp ^r , Mev ^r	Lam et al., 1990
pMI101	6.5 kb remaining part of pWL102, from which pHV2 <i>ori</i> and <i>Hind</i> III site were removed; Amp ^r , Mev ^r	This work
pMI102	The <i>E. coli</i> replicon of pMI101 was replaced with <i>EcoR</i> I - <i>Sph</i> I fragment from pUCmT; Amp ^r , Mev ^r	This work
pMI103	<i>Hind</i> III site was removed from pMI102; Amp ^r , Mev ^r	This work
pMI104	<i>Nde</i> I site was removed from pMI103; Amp ^r , Mev ^r	This work
pSCM301	The 1985 bp pSCM201 minimal replicon digested by <i>EcoR</i> I and <i>Kpn</i> I was inserted into pMI104; Amp ^r , Mev ^r	This work
pSCM302	<i>Hind</i> III site was removed from pSCM301; Amp ^r , Mev ^r	This work
pSCM303	<i>Cla</i> I site was removed from pSCM302; Amp ^r , Mev ^r	This work
pSCM307	The 144 bp fragment including <i>P_{hsp5}</i> , MCS and His·Tag was inserted into pSCM303; Amp ^r , Mev ^r	This work
pSCM307-bgaH	The 1992 bp PCR product of <i>bgaH</i> gene digested by <i>Bam</i> H I and <i>Hind</i> III was inserted into pSCM307; Amp ^r , Mev ^r	This work

表 2 本文所涉及的引物

Table 2 The primers used in this study

Primers	DNA sequences (5'→3')	Restriction sites or mutation sites
218NF	ACGGT <u>ACCCGAGAAGCAGCAAGTAGC</u>	<i>Kpn</i> I
209NR	CTGAAT <u>TCCCAGACGGAACCACCATC</u>	<i>EcoR</i> I
HA2TF	GAATCGGGCAGTAGAA <u>T</u> GCTTCTGAGTTTCGG	A in <i>Hind</i> III replaced with T
HA2TR	CCGAAACTCAGAAGC <u>A</u> TTCTACTGCCCGATTC	T in <i>Hind</i> III replaced with A
CT6CF	TCACCCGGTATATCGA <u>C</u> GCCAGCCCACTAT	T in <i>Cla</i> I replaced with C
CT6CR	ATAGTGTGGGCTGGC <u>G</u> TCCGATATACCCGGTGA	A in <i>Cla</i> I replaced with G
BgaHF	ACGGATCCATGACAGTTGGTCTCTGCTATT	<i>Bam</i> H I
BgaHR	GTC <u>AAGCTT</u> TCTACTCGGACGCGAGTC	<i>Hind</i> III

The normal restriction sites are underlined. The mutated restriction sites are shown with dotted lines. The alternative nucleotides in mutated sites are boxed.

[4]中的相关要求配制。常用限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司。*Dpn* I 购自 NEB 公司。KOD-plus DNA 聚合酶购自 ToYoBo 公司,经该酶扩增出的

PCR 产物为平末端。DMSO 购自 Sigma 公司。RNaseA、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)购自欣经科公司。T-Gradient 96 PCR 仪购自 Biometra 公司,紫外/可见分光光度计 DU800 购自贝克曼库尔特

(中国)公司。双链 DNA 合成由北京擎科公司完成。

1.2 DNA 的提取与操作

按文献 [16] 的方法提取 AS7094 的总 DNA 作为模板,以 218NF 和 209NR 为引物扩增 pSCM201 的最小复制子;以 pNP22 为模板, BgaHF 和 BgaHR 为引物扩增 *bgaH* 基因。反应体系(25 μL): $10 \times Ex\ Taq$ DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL 、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL 、DMSO 1 μL 、正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1 μL 、反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)1 μL 、*Ex Taq* DNA 聚合酶 0.5 U。反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。极端嗜盐古菌质粒的快速提取:用牙签刮取少量划线培养物,在加入 100 μL 蒸馏水与 100 μL 酚/氯仿(pH 8.0)的 1.5 mL 离心管中振荡混匀,13400 $\times g$ 离心 5 min,其上清用于 PCR 检测以及回转大肠杆菌分析。其他的 DNA 操作按照标准的方法执行^[14]。

1.3 粘性末端平滑化及自连转化

末端平滑化反应体系(9 μL): $10 \times T4$ DNA 聚合酶缓冲液 1 μL 、dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL 、BSA (0.1%) 1 μL 以及带有突出末端的 DNA 片段(0.1 pmol 以上)。将反应体系于 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温,加入 T4 DNA 聚合酶 1 U,轻轻混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min。反应结束时用振荡器剧烈搅拌使酶失活,并马上置于冰上以便进行下一步连接反应。连接反应体系(5 μL): $10 \times T4$ DNA 连接酶缓冲液 0.5 μL 、末端平滑化反应体系 4 μL 、T4 DNA 连接酶 2 U。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜后转化 JM109 并挑取克隆进行酶切验证。

1.4 定点突变

本方法主要的依据是文献 [17]。以待突变的质粒为模板,设计两条互补的引物,其中包含待突变的位点,并且突变位点任何一侧都必须满足 $4 \times (\text{GC 碱基数}) + 2 \times (\text{AT 碱基数}) \geq 45$ 。反应体系(25 μL): $10 \times \text{KOD-plus}$ DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL 、dNTP (2 mmol/L) 2.5 μL 、 MgSO_4 (25 mmol/L) 1 μL 、DMSO 1 μL 、引物 1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、引物 2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、KOD-plus DNA 聚合酶 0.5 U。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,68 $^{\circ}\text{C}$ 8 min,18 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 反应后,直接在反应体系中加入 1 μL *Dpn* I 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 4 h 之后马上进行转化。每 100 μL 大肠杆菌感受态细菌中加入 10 μL 的 *Dpn* I 消化后的突变产物,在涂板前通过离心浓缩的办法,把所有被转化的细菌全部涂布到抗生素平板上。过夜培养后,对得到的克隆进行酶切

鉴定,以判断相应的酶切位点是否已被突变掉。

1.5 极端嗜盐古菌的转化

将构建好的质粒载体按文献 [3] 的方法转化到受体菌 *H. hispanica* AS2049 中。约 15 d 左右可以看到淡红色的转化子,20 d 左右可将转化子在含有莫维诺林的平板上划线培养,再生长 7 d 左右即可用于检测。

1.6 表达载体表达能力的鉴定

将不含自身启动子的嗜盐古菌报告基因 *bgaH* 插入到最终构建的表达载体中,在转化嗜盐菌和划线培养后,二次涂布在含有 X-gal(终浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$)的 AS-168 培养平板上,观察菌落颜色的变化。

1.7 报告基因 *bgaH* 的 β -半乳糖苷酶活性的检测

本方法主要的依据是文献 [18]。将阳性克隆接种于含抗性选择的 10 mL 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 生长至稳定期时,转接 1 mL 于另一新鲜培养基中,培养至对数生长末期左右,离心收集 1 mL 菌体。加入 500 μL 低盐缓冲液(50 mmol/L Tris pH 7.2,0.1% Triton X-100,0.1 mg/mL DNase)裂解。依次在 1.5 mL 离心管中加入:700 μL *bgaH* 缓冲液(2.5 mol/L NaCl,50 mmol/L Tris pH 7.2,10 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 ,0.1% 2-巯基乙醇),100 μL 完全裂解的粗酶液以及 100 μL 反应底物 ONPG(用 *bgaH* 缓冲液配制,8 mg/mL)快速振荡 3 s 后测定 405 nm 处的吸光值(OD_{405})。以 AS-168 培养基为空白对照,以含有空载体的转化子培养物为阴性对照,记录每 10 min 吸光值的变化。当吸光值达到 0.7~1 时停止测定,酶活的定义是每分钟内催化 1 μmol ONPG 所需要的酶量为一个酶单位。底物的消光系数为 $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

2 结果

2.1 中间衍生载体 pSCM303 的构建与验证

pSCM201 的穿梭表达载体的构建主要考虑以下几个方面。首先,为了能够在嗜盐古菌中复制扩增,必须具有嗜盐古菌质粒的复制子和抗性筛选标记,比如 pSCM201 的复制子和常用的 *Mev*^r 基因。其次,这个载体应当具备在大肠杆菌中的复制能力及相应的选择标记,例如 pUCmT 所包含的 pUC19 *ori* 和 *Amp*^r 基因两部分。第三,要实现目的基因的表达,还要添加嗜盐古菌基因表达所需的启动子和多克隆位点(Multiple Clone Sites, MCS)等必要元件。更进一步的,还可以加入像 6 个组氨酸(*His*·*Tag*)这样的纯化标签,以便于目的蛋白的提取纯化。因此,构建

工作的关键就在于一方面要把上述部分有效地整合起来;另一方面,尽可能地去载体其他部分中的酶切位点,使得 MCS 有更多的选择余地,并且要严格保证 MCS 中的所有酶切位点都是唯一的。

根据上述要求,从 10.5 kb 的 pWL102 出发,利用其复制子 pHV2 两侧的 *Hind* III 位点将 4 kb 的 pHV2 片段酶切去除,同时将剩余 6.5 kb 的 *Hind* III 片段的粘性末端补平后再环化自连形成 pMI101,这时原先的 *Hind* III 位点处会多出 4 个核苷酸,无法再被 *Hind* III 所识别。将这个中间载体 pMI101(表 1)用 *Eco* RI 和 *Sph* I 酶切后,正好能够完全切下其 3 kb 的大肠杆菌复制子及 *Amp^r* 基因,这时就可以将经同样酶切的 2.6 kb 的 pUCmT 替换进去形成 pMI102(表 1)。此时的 pMI102 已基本去掉了 pUCmT 上的 MCS,只保

留了一个 *Hind* III 位点和一个 *Nde* I 位点,通过上述的末端补平法依次将这 2 个位点失活后形成 pMI103 和 pMI104(表 1)。pMI104 具有大肠杆菌复制子 pUC19 *ori* 和 *Amp^r* 基因,同时还具有嗜盐古菌的抗性基因 *Mev^r*,只缺少嗜盐古菌质粒的复制子就可以成为一个完整的穿梭载体。

将 pSCM201 的最小复制子经 PCR 扩增后连入到 pMI104 的 *Kpn* I 和 *Eco* R I 位点之间形成 8.1 kb 的 pSCM301。在这段最小复制子内部,具有 *Nco* I、*Hind* III 和 *Cla* I 3 个较为常见的酶切位点,通过直接的定点突变方法,依次将 *Hind* III 和 *Cla* I 位点失活后形成 pSCM302 和 pSCM303(图 1-A)。pSCM303 的酶切实验表明,先前过程中去除的所有酶切位点已经全部失活,可以继续下一步的实验(图 1-C)。

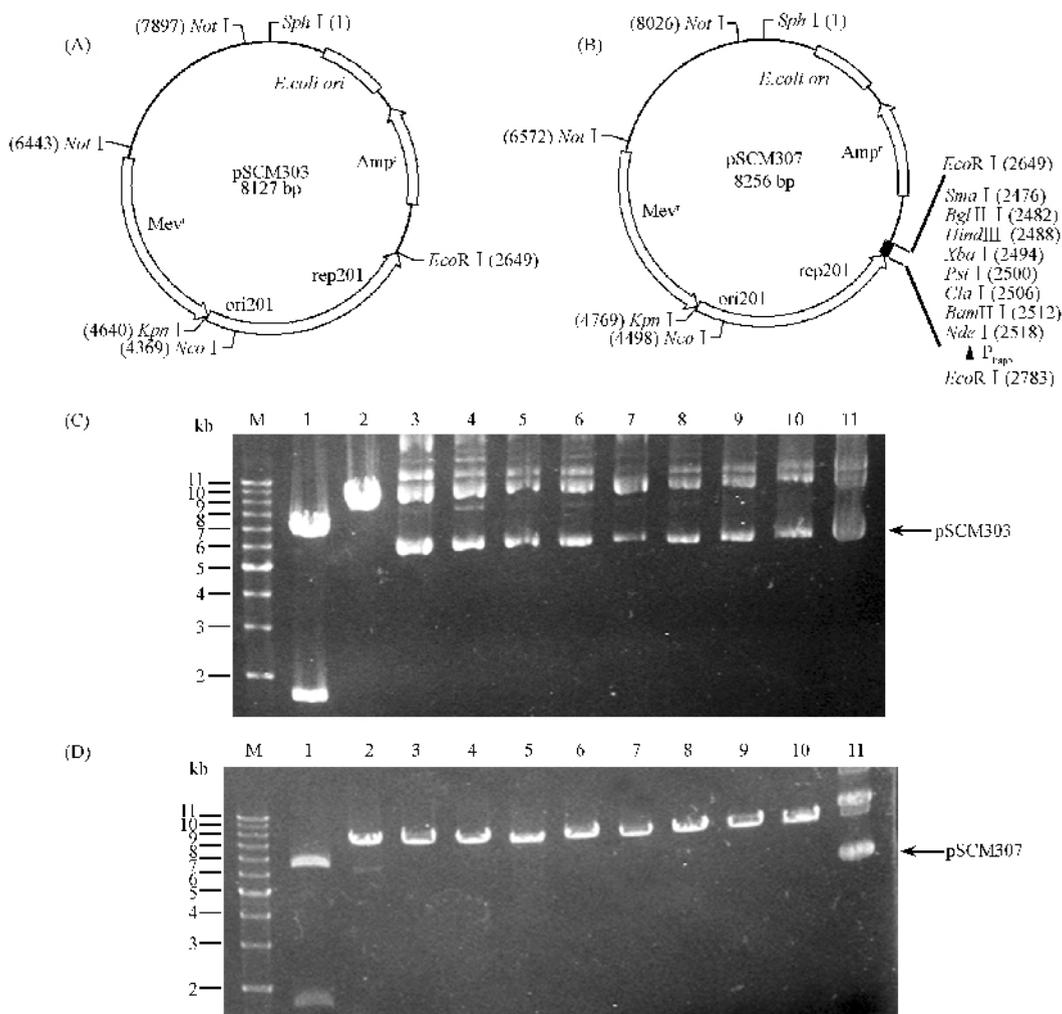


图 1 pSCM303 和 pSCM307 的质粒图谱及酶切图谱

Fig. 1 Physical maps and restriction digests of shuttle vector pSCM303 and pSCM307. A, B: Maps of pSCM303 (A) and pSCM307 (B); C, D: Agarose gel electrophoresis analysis of pSCM303 (C) and pSCM307 (D) digested with *Eco* RI / *Nco* I (lane 1), *Kpn* I (lane 2), *Nde* I (lane 3), *Bam* HI (lane 4), *Cla* I (lane 5), *Pst* I (lane 6), *Xba* I (lane 7), *Hind* III (lane 8), *Bgl* II (lane 9) and *Sma* I (lane 10), respectively; untreated plasmids as controls (lane 11). M, 1 kb DNA ladder.

2.2 表达载体 pSCM307 的构建与验证

在 pSCM303 的基础上,需要继续引入启动子和多克隆位点等必要元件。首先,要选择一个适合在嗜盐古菌中表达的启动子。本实验室的陆秋鹤博士在对来自 *Halobacterium salinarum* 的热诱导基因 *hsp5* 的启动子(P_{hsp5})进行深入研究后发现,只要 P_{hsp5} 的核心元件即 BRE 和 TATA box 同时存在,就足以确保其在特定的嗜盐古菌中实现基础转录和热诱导转录^[19]。我们近期还发现,非热激条件下的该启动子在 *Haloarcula hispanica* 等宿主菌中的基础转录水平也相对较高,由此可见, P_{hsp5} 非常适合成为表达载体所需要的启动子。其次,在 MCS 的设计上,为方便今后使用,要尽可能多地选择 pSCM303 中已被去除的或者不存在的酶切位点,因此,对 pSCM303 进行全面的酶切检验是必不可少的一个重要环节(图 1-C)。

根据上述基本要求,人工合成了一段包括 P_{hsp5}

```

      EcoRI      BRE      TATA box
GGGAATTCGATAGAAAATTTTTTACGAAATGCGGACATAGTTTTGGCT ..... 48 bp
      NdeI      BamHI      ClaI      PstI      XbaI
GGAGTCAAGGTGATTAGCCCATATGGGATCCATCGATCTGCAGTCTAG ..... 96 bp
      HindIII   BglII   SmaI   His-tag   EcoRI
AAAGCTTAGATCTCCCGGGCACCACCACCACCACCTGAGAATTCAC .....144 bp
      M13/pUC Sequencing Primer(-20)
(TGGCCGTCGTTTTACAAC)
  
```

图 2 144 bp 合成片段的序列图谱

Fig. 2 The sequence of 144 bp synthesized fragment. The sequence (M13/pUC sequencing primer) located downstream of this synthesized DNA fragment in pSCM307 is shown in brackets.

2.3 表达载体 pSCM307 的嗜盐古菌转化与复制能力的鉴定

在 pSCM307 构建好以后,将其转化到受体菌 *H. hispanica* AS2049 中以检测其复制情况。由于这株受体菌的假阳性率很低,因此可以通过转化子的数量直接判定转化效率的高低。为了证实 AS2049 的莫维诺林抗性转化子中确实含有 pSCM307,以质粒 pSCM307 作为阳性模板对照,以未被转化载体的基因组 DNA 作为阴性模板对照,以转化子的总 DNA 为模板扩增 pSCM307 中约 2 kb 的古菌复制子序列。结果表明(图 3),从转化子的总 DNA 中能够得到 2 kb 左右的 PCR 产物,而从未被转化的菌株中没有扩增到该片段,证明 pSCM307 可以成功转化 AS2049,并且能够赋予转化子在抗性平板上生长的能力。进一步地,为了鉴定 pSCM307 是自我复制而不是整合到基因组上,可以通过将转化子的总 DNA 回转大肠杆菌来检测。结果发现,经过回转后再从大肠杆菌中提取的质粒与 pSCM307 的酶切图谱完

核心元件,包含 *Nde* I、*Bam*HI、*Cla* I、*Pst* I、*Xba* I、*Hind*III、*Bgl* II、*Sma* I 的多克隆位点以及组氨酸纯化标签(His·Tag)在内的 144 bp 的片段,并且在 6 个组氨酸密码子 CAC 之后又加上一个终止密码子 TGA(图 2)。这段序列的两端设计为各带有两个保护碱基的 *Eco*R I 位点,在用 *Eco*R I 酶切后可以连入到 pSCM303 的 *Eco*R I 位点中,由于是单酶切,最终得到了两个插入方向的克隆,将其中与 *rep201* 转录方向一致的克隆命名为 pSCM307(图 1-B)。pSCM307 即为最终的衍生表达载体,通过比较 pSCM303 和 pSCM307 的酶切结果可以发现, pSCM307 的 MCS 中引入的内切酶在单独切割 pSCM303 的时候都无法将其切开,反映在电泳图谱上都为质粒的构型(图 1-C);而 pSCM307 用同样的酶分别切割时,都只能产生长度相同的单一线性片段(图 1-D),说明 MCS 中的这些酶切位点确实是唯一的,也同时证明了 pSCM307 的构建是成功的。

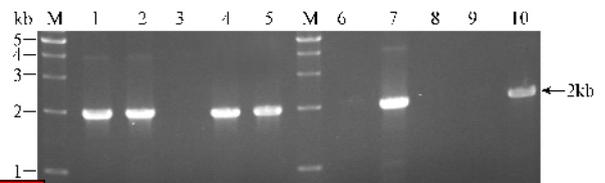


图 3 PCR 检测 pSCM307 以及 pSCM307-bgaH 的 AS2049 转化子

Fig. 3 Identification of *H. hispanica* AS2049 transformants with pSCM307 and pSCM307-bgaH by PCR. Lane 1-5: primer 218NF and 209NR; pSCM307 (lane 1), pSCM307-bgaH (lane 2), genomic DNA of untransformed *H. hispanica* AS2049 (lane 3), total DNA of *H. hispanica* AS2049/ pSCM307 (lane 4), total DNA of *H. hispanica* AS2049/ pSCM307-bgaH (lane 5); Lane 6-10: primer BgaHF and BgaHR; pSCM307 (lane 6), pSCM307-bgaH (lane 7), genomic DNA of untransformed *H. hispanica* AS2049 (lane 8), total DNA of *H. hispanica* AS2049/ pSCM307 (lane 9), total DNA of *H. hispanica* AS2049/ pSCM307-bgaH (lane 10). M, 1 kb DNA ladder.

全一致,说明 pSCM307 的复制能力没有受到突变改造的影响,其转化和复制都是符合载体构建的基本

要求的。

2.4 报告基因检测表达载体 pSCM307 的表达能力

bgaH 基因是分离自嗜盐古菌 *Haloferax alicantei* 的 β -半乳糖苷酶基因, 同大肠杆菌的 *lacZ* 一样, 它也具有分解底物 X-gal 并使菌落呈现为深蓝色的能力^[15]。将成功转化 pSCM307 的嗜盐菌克隆涂布在含有 X-gal 的 AS-168 抗性平板上(图 4-A), 结果表明 pSCM307 的转化子在该平板上仍为浅红色的菌落状态, 这说明野生型的 AS2049 没有表现出可以检测到的背景活性, 可以认为其本身并不具备本底水平的 β -半乳糖苷酶活性。因为只有在这样的前提下, 才可以利用这个报告基因来对表达载体的表达能力进行检测和评估。

通过 PCR 扩增出 1992 bp 的 *bgaH* 基因后用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切再插入到 pSCM307 中, 构建载体 pSCM307-*bgaH*。将 pSCM307-*bgaH* 转化 AS2049, 经 PCR 检测(图 3)和回转大肠杆菌分析后, 把挑出的阳性转化子先涂布在普通的抗性平板上后再二次划线到 X-gal 平板上。特别指出的是, pSCM307-*bgaH* 的转化子在 X-gal 平板上生长比较缓慢, 主要原因在于 X-gal 被分解后的蓝色产物是不可溶性的, 在细胞中积累到一定程度后会对菌体生

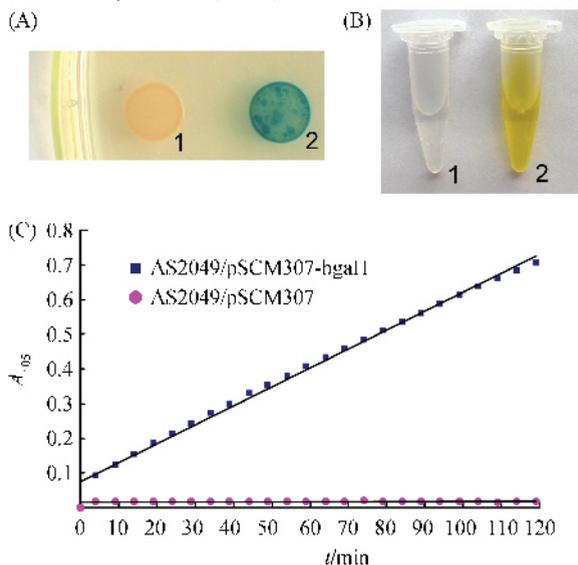


图 4 pSCM307 和 pSCM307-*bgaH* 的 AS2049 转化子的 β -半乳糖苷酶活性检测

Fig. 4 β -galactosidase detection and assay for AS2049 transformants with pSCM307 and pSCM307-*bgaH*. A: Detection of enzyme activity on solid media containing X-gal; 1: AS2049 colony with pSCM307; 2: AS2049 colony with pSCM307-*bgaH*; B: Assay of β -galactosidase activity; 1: AS2049/pSCM307 transformants; 2: AS2049/pSCM307-*bgaH* transformants; C: Expression of the reporter gene *bgaH* under the control of *hsp5* promoter.

长产生抑制作用。因此, 通常要经过一次划线培养后再添加 X-gal。

从图 4-A 中可以看到, 在 X-gal 存在的情况下, pSCM307-*bgaH* 的转化子呈现出明显的深蓝色, 可以初步判断其 *bgaH* 报告基因在受体菌内能够转录表达。

从酶活实验可以看到(图 4-B), 作为对照的 pSCM307 的 AS2049 转化子的粗酶液不能发生明显的颜色反应, 而 pSCM307-*bgaH* 的克隆则能够使整个反应体系变为鲜亮的橙黄色, 并且在一定时间范围内, 颜色的变化是逐渐加深的, 因此吸光值表现为随时间变化的线性关系(图 4-C)。经过计算后我们得到 *hsp5* 启动子下的 *bgaH* 基因的 β -半乳糖苷酶活(在粗酶液中)大约为 0.139 U/mg, 这个数值要远高于 *bop* 启动子下的酶活水平(0.04 U/mg)^[15]。通过菌落颜色变化以及酶活测定可以充分说明表达载体 pSCM307-*bgaH* 赋予了 AS2049 新的 β -半乳糖苷酶活性, 也从而证明了表达载体 pSCM307 具备良好的表达特性。据我们所知, 这是嗜盐古菌中第一个报道的较为成熟的表达载体。

3 讨论

pSCM201 是古菌域中第一个有实验证据的单向 θ 型复制质粒, 其完整的最小复制子非常稳定^[12], 基于这个复制子所构建的衍生表达载体 pSCM307 相较于克隆载体 pWL102 而言, 首先在古菌复制子上就缩短了将近 2 kb, 再加上大肠杆菌复制子的部分又减少了 400 bp 左右, 所以这个质粒总长大约只有 8.2 kb, 这样就相应地增加了其插入容量, 方便一些更长基因的克隆和表达。同时, 载体长度的缩减也有助于实验操作的简便易行。

pSCM307 的 P_{hsp5} 是一个强启动子, 在非热激条件下的转录活性就处于比较高的水平, 并且通过报告基因 *bgaH* 已经证明其具备良好的表达特性。MCS 的设计基本上选择的都是较为常见的酶切位点, 并且考虑到目的基因最好能直接从自身的起始密码子 ATG 开始翻译的要求, 所以特意将 *Nde* I (识别序列为 CATATG) 作为启动子后的第一个酶切位点, 这样如果选用 *Nde* I 位点插入载体的话, 就可以保证不会有多余的氨基酸残基出现在目的蛋白中。MCS 中的 *Cla* I (识别序列为 ATCGAT) 位点比较特殊, 因为 *Cla* I 受 *dam* 甲基化酶的影响, 一旦其识别序列被标记则 *Cla* I 就无法进行正常的切割反应。在 pSCM307 的 MCS 中, *Cla* I 与紧随其后的 *Pst*

I (识别序列为 CTGCAG)恰好能够形成 GATC (*dam* 甲基化酶的识别位点),因此如果只在 JM109 (*dam*⁺)中进行遗传操作,*Cla* I 位点是切不开的。如果将 pSCM307 转化到 JM110 (*dam*⁻)中再提取质粒问题就可迎刃而解。与 pWL102 的克隆位点在复制子两侧散在分布相比,pSCM307 的 MCS 都集中编排在一起,更为方便的是,MCS 下游紧邻原 pUCmT 的部分正好包含 M13 正向引物序列(图 2),可以对插入的目的片段进行直接测序。另外,我们在表达载体 pSCM307 中还引入了一个 C 末端的 His·Tag 蛋白纯化标签,可能为未来纯化特定的嗜盐古菌蛋白提供帮助。

在选择哪种方式进行载体酶切位点的改造时,主要基于一个思路,那就是,涉及复制子的关键区域尽可能通过单点突变去实现,如果是在 ORF 内可以利用密码子的摆动性改变一个碱基达到去除酶切位点的目的,比如 pSCM301 中的 *Cla* I 位点,恰好位于 *rep201* 内部,改变密码子的第三个碱基并不会影响氨基酸序列的翻译。而对于末端补平法来说,在非重要区段可以随意使用。这是由于在经过酶切和末端补平以后,序列本身会发生核苷酸增加或减少的改变,如果这种改变发生在重要区段,对于载体的影响可能就是致命的。

还有一个值得探讨的是和复制方式相关的问题。pSCM201 的复制子在导入到 pMI104 时曾经构建了两个克隆,一个是 pSCM301,其 *rep201* 的转录方向与莫维诺林抗性基因的转录方向是一致的;在另一个克隆里面,二者是正好相反的。但是这两个质粒在转化 AS2049 后的转化率有显著的差异,几乎达到两个数量级的差距(数据未显示)。由此联想到这可能与 pSCM201 的单向复制紧密相关。pSCM201 的复制方向与 *rep201* 的转录方向相同,就是说在 pSCM301 中,复制泡应当是朝着 *rep201* 下游的 pUCmT 部分移动的,但是,当复制子反向插入时,复制泡与莫维诺林抗性基因的转录泡相对行进,转录泡可能会干扰复制起始复合物的装配与复制进程,这就导致质粒的不稳定从而发生质粒丢失的情况^[20]。因此,在 144 bp 片段插入时,只选择了与 *rep201* 转录方向一致的克隆,就是为了这个原因。

最后要说明的是,在遗传操作相对较为成熟的嗜盐古菌受体菌当中,pSCM201 的衍生载体目前认为只能转化 *Haloarcula* 属的菌株,如 *Haloarcula hispanica*。也就是说,pSCM 系列载体可能是一种窄宿主范围的质粒。但是,*H. hispanica* 作为其受体菌

株,有着非常明显的技术优势,除了易培养、遗传操作简单、转化效率高以外,最重要的就是转化子的假阳性率很低,抗性筛选标记可靠,并且可以通过基因敲除获得特定基因的缺失突变株。因此,它已经成为重要的嗜盐古菌模式菌株之一。特别是本实验室近期已完成了 *H. hispanica* 全基因组的测序工作(未发表),意味着 pSCM 系列载体有望在嗜盐古菌生命机制研究中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Soppa J. From replication to cultivation: hot news from Haloarchaea. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8: 737 - 744.
- [2] Holmes ML, Pfeifer F, Dyall-Smith ML. Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene*, 1995, 153: 117 - 21.
- [3] Cline SW, Lam WL, Charlebois RL, et al. Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1989, 35: 148 - 52.
- [4] Wendoloski D, Ferrer C, Dyall-Smith ML. A new simvastatin (mevinolin)-resistance marker from *Haloarcula hispanica* and a new *Haloferax volcanii* strain cured of plasmid pHV2. *Microbiology*, 2001, 147: 959 - 964.
- [5] Zhou L, Zhou M, Sun C, et al. Precise determination, cross-recognition and functional analysis of double strand origin from the haloarchaeal rolling circle replication plasmids, pZMX201 and pNB101. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190, 16: 5710 - 5719.
- [6] Lam WL, Doolittle WF. Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86: 5478 - 5482.
- [7] Blaseio U, Pfeifer F. Transformation of *Halobacterium halobium*: development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 6772 - 6776.
- [8] Heymann JA, Havelka WA, Oesterhelt D. Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaeobacterium. *Molecular Microbiology*, 1993, 7: 623 - 630.
- [9] Danner S, Soppa J. Characterization of the distal promoter element of halobacteria in vivo using saturation mutagenesis and selection. *Molecular Microbiology*, 1996, 19: 1265 - 1276.
- [10] Long S, Salin ML. Archaeal promoter-directed expression of the *Halobacterium salinarum* catalase-peroxidase gene. *Extremophiles*, 2000, 4: 351 - 356.

- [11] Sun C , Zhou M , Li Y , et al. Molecular characterization of the minimal replicon and the unidirectional θ replication of pSCM201 in extremely halophilic archaea. *Journal of Bacteriology* , 2006 , 188 : 8136 – 8144 .
- [12] 孙超岷. 极端嗜盐古菌质粒 pSCM201 复制机制及嗜盐菌素 C8 抗性免疫机制的研究. 中国科学院研究生院博士学位论文 , 2006 .
- [13] Li Y , Xiang H , Liu J , et al. Purification and biological characterization of halocin C8 , a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* , 2003 , 7 : 401 – 407 .
- [14] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [15] Patenge N , Haase A , Bolhuis H , et al. The gene for a halophilic beta-galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum* . *Molecular Microbiology* , 2000 , 36 : 105 – 113 .
- [16] DasSarma S , Fleischmann EM. Halophiles. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1995 , 179 – 180 .
- [17] Li S , Wilkinson MF. Site-directed mutagenesis : a two-step method using PCR and *DpnI*. *Biotechniques* , 1997 , 23 : 588 – 590 .
- [18] Holmes ML , Scopes RK , Moritz RL , et al. Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloferax alicantei* . *Biochimica et Biophysica Acta* , 1997 , 1337 : 276 – 286 .
- [19] Lu Q , Han J , Zhou L , et al. Dissection of the regulatory mechanism of a heat-shock responsive promoter in haloarchaea : a new paradigm for general transcription factor directed archaeal gene regulation. *Nucleic Acids Research* , 2008 , 36 : 3031 – 3042 .
- [20] Donato JJ , Chung SCC , Tye BK. Genome-wide hierarchy of replication origin usage in *Saccharomyces cerevisiae* . *PLoS Genetics* , 2006 , 2 : e141. DOI : 10.1371/journal.pgen.0020141 .

Construction and application of a novel shuttle expression vector based on haloarchaeal plasmid pSCM201

Di Miao , Chaomin Sun , Hua Xiang *

(State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

Abstract [Objective] pSCM201 is the first unidirectional theta replication plasmid experimentally identified in the domain of archaea. For gene expression and function analysis of specific genes in model strain *Haloarcula hispanica* , a novel shuttle expression vector based on pSCM201 was developed. **[Methods]** By combining the minimal replicon of pSCM201 , the pUC19 replicon of *Escherichia coli* , and two antibiotic genes , a new shuttle vector between haloarchaea and *E. coli* was established. Furthermore , the *hsp5* core promoter , multiple clone sites and a C-terminal His·Tag sequence were added to construct the expression vector pSCM307. With the help of reporter gene *bgaH* , the replication ability and gene expression of pSCM307 were tested in *H. hispanica* AS2049 by PCR identification and β -galactosidase activity assay. **[Results]** pSCM307 could stably self-replicate in AS2049 , and *bgaH* was successfully expressed under the control of *hsp5* promoter. **[Conclusions]** A user-friendly expression vector was successfully constructed in haloarchaea.

Keywords : haloarchaea ; pSCM201 ; shuttle vector ; expression vector

(本文责编 : 张晓丽 , 谷志静)