

枯草芽孢杆菌噬菌体载体的构建

沈天翔 余茂勋 贾盘兴

(中国科学院微生物研究所, 北京)

以 $\phi 105\text{DI}:1\text{t}$ 为原始株构建的重组噬菌体 $\phi 105\text{S35}$ 和 $\phi 105\text{S36}$ 具有自主侵染能力和溶源化特征。其基因组内插入的 1kb 片段上的 *cat*, 基因赋予二者所在宿主以氯霉素抗性, 在两株噬菌体中插入位点相同, 即原 $\phi 105\text{DI}:1\text{t}$ 的 *Sma*I 酶切片段 D、E 之间, 但插入片段在二者中的定向相反。与 *cat* 基因同时引入的单一 *Bam*HI 和 *Xba*I 位点提供了外源 DNA 的插入位置。重组噬菌体 DNA 可高效转染枯草芽孢杆菌原生质体。因此 $\phi 105\text{S35}$ 和 $\phi 105\text{S36}$ 可作为枯草芽孢杆菌系统的载体而被利用。

关键词 枯草芽孢杆菌; 噬菌体载体; 原噬菌体转化

与质粒载体相比, 以温和噬菌体构建的克隆载体具有高稳定性的特征, 此外, 由于能单拷贝地整合在宿主染色体中, 所以在一些遗传学研究中利用它可以避免由于基因及其产物高拷贝而带来的问题。1979 年, Kawamura 首创“原噬菌体转化法”(prophage transformation)^[1], 开始了利用温和噬菌体构建枯草芽孢杆菌克隆载体的工作。在以后数年中, 各实验室陆续构建了一系列克隆有不同基因的重组噬菌体^[2-10]。

国内利用噬菌体作为枯草芽孢杆菌克隆工具的报道很少。本文报道了以温和噬菌体 $\phi 105$ 缺失突变体 $\phi 105\text{DI}:1\text{t}$ 为原始株, 其 DNA 与带有 *cat* 基因 (来自金黄色葡萄球菌质粒 pC194) 和 *Bam*HI、*Xba*I 酶切位点的 DNA 片段进行重组, 得到携带选择性标记——*cat* 基因和单一 *Bam*HI、*Xba*I 位点的重组噬菌体 $\phi 105\text{S35}$ 和 $\phi 105\text{S36}$ 。

材料和方法

(一) 菌种、质粒和噬菌体(见表 1)

(二) 培养基

LB 用于细胞培养、噬菌体繁殖和检测; $4 \times \text{SP}$ 用于枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备^[11]; SMM 溶液, SMMP、PAB 和 DM3 培养基^[12]用于枯草芽孢杆菌原生质体转化。

(三) 试剂

限制内切酶、DNA 聚合酶 I 大片段, T4 连接酶购于 Boehringer, Biolabs; 溶菌酶, 牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品; 四种脱氧核苷酸和氯化铯购自华美生物工程公司(SABC); 丝裂霉素 C 为 Kyowa, Hakk-Koyyo 公司出品。

(四) 噬菌体裂解液制备和效价检测

按文献[6]所述方法, 用丝裂霉素 C 诱导产生噬菌体裂解液。取适当稀释的裂解液 0.1ml 和 0.2 ml 培养至对数中期的枯草芽孢杆菌 168M 混合, 37℃ 保温 10—15 分钟, 加入 45℃ 左右的 LB 上层培养基 (LB 培养基加入 1% 的琼脂粉), 并倒入已铺好底层 (LB 培养基加 1.7% 的琼脂粉)

本文于 1989 年 8 月 22 日收到。

本课题得到国家自然科学基金资助。

表1 菌株,质粒和噬菌体
Table 1 Bacterial Strains, plasmids and bacteriophages

	遗传标记 Genetic marker	参考文献/来源 Reference/origin
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)		
JM103	(lac pro) thi strA supE endA sbcB15 F' traD36 proAB lacI ZM15	[11]
枯草芽孢杆菌 (<i>B. subtilis</i>)		
168M	trpC	本实验室储备 from this laboratory
CU267*	trpC2 ilvB2 leuB16	Zahler, S. A.
质粒 Plasmid		
pC194	cat	[12]
pUC18	bla	[13]
pIS1	cat bla	本实验 this paper
pCMB5	cat bla	
噬菌体 Bacteriophages		
φ105DI:lt**	与 φ105 相比,在基因组非必须区内存在 4kb 的缺失 4kb deletion of non-essential DNA from wild type φ105	[4]
φ105S32 φ105S33 φ105S35 φ105S36	φ105DI:lt 基因组内插有 1 或 2kb 的带 cat 基因的 DNA 片段 with a insert of 1kb or 2kb fragment of DNA carrying cat gene in φ105 DI:lt	本实验 this paper

* 由 Cornell 大学的 Zahler, S. A. 教授提供。
From Prof. Zahler, S. A., Genetics & Development, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
** 由 Oxford 大学的 Errington, J. 教授提供。
From Prof. Errington, J., Microbiology Unit, Department of Biochemistry, University of
Oxford, South Parks Road, OX1, 3QU, UK.

的平板上,凝固后倒置培养过夜,次日记录噬菌体的效价。

(五) 噬菌体 DNA 的制备

大量裂解物制备,纯化和噬菌体 DNA 提取参照文献 [6]。小量噬菌体 DNA 制备参照文献 [10],但改用丝裂霉素 C 诱导, DNase 和 RNase 加入的时间改为更换新鲜 LB 培养基后 40 分钟,裂解缓冲液中的 CDTA 以 EDTA 代替,浓度不变。

(六) 质粒 DNA 提取

大肠杆菌质粒提取采用常规碱法操作^[16];枯草芽孢杆菌质粒参照 Hardy^[14] 方法提取。粗提质粒可用氯化铯密度梯度离心或用 Sephacryl S1000 柱层析加以纯化^[17]。

(七) DNA 转化、转染实验

大肠杆菌 JM103,转化按常规氯化钙法^[16];枯草芽孢杆菌感受态细胞转化参

照文献[14],但 SPI 中水解酶素含量提高到 0.2%;枯草芽孢杆菌原生质体转化依 Chang 和 Cohen^[15] 方法进行。

(八) 限制内切酶和其它体外酶反应

所有操作均依照厂商说明。限制内切酶反应缓冲液采用文献[16]中所列核心缓

冲液。

结果与讨论

(一) 重组质粒 pIS1 和 pCMB5 的构建

如图 1 所示,质粒 pC194 上的氯霉素

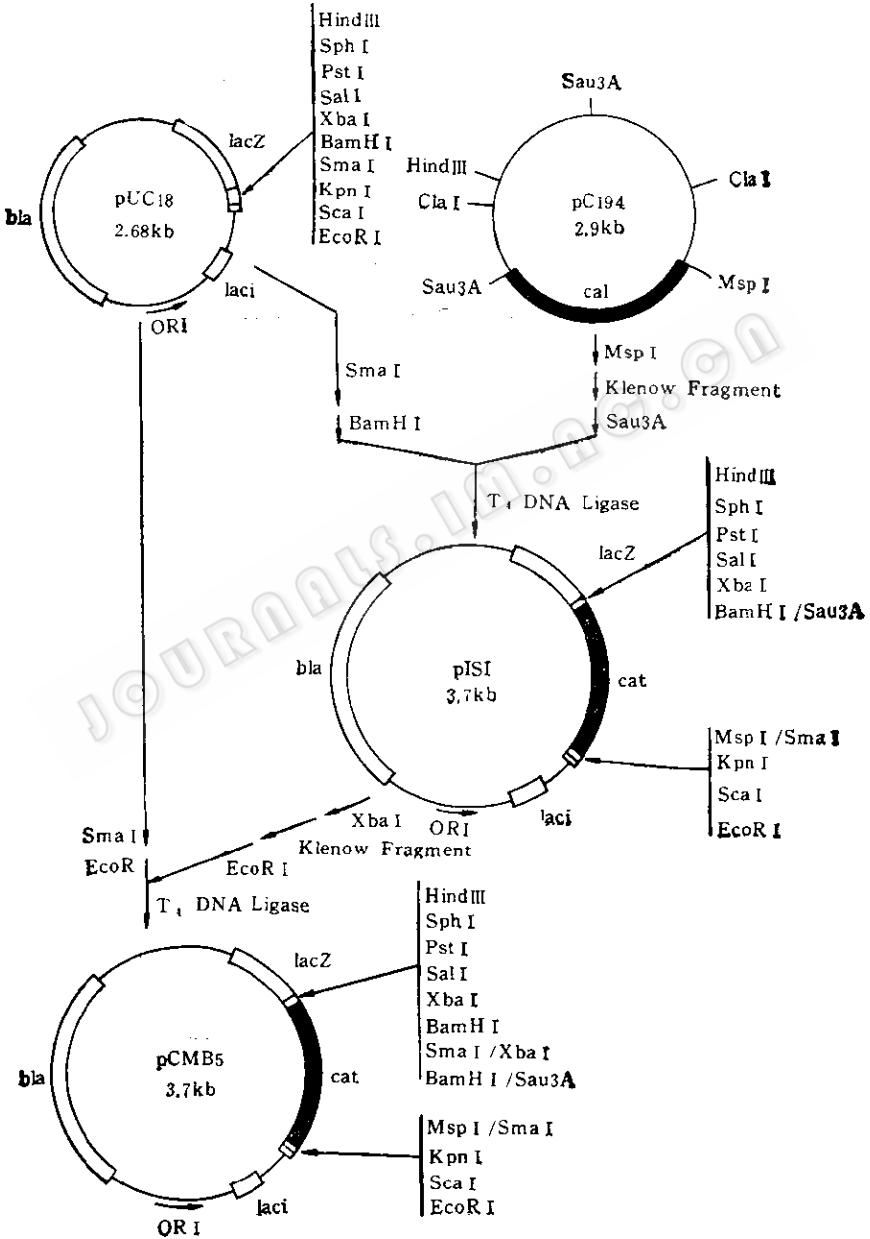


图 1 重组质粒 pIS1 和 pCMB5 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids pIS1 and pCMB5

抗性基因 *cat* 位于 *Msp*I-*Mbo*I (*Sau*3A) 双酶切的 1032bp 片段上^[12]。在本实验中, 首先将这个片段定向插入载体质粒 pUC18 聚合接头区的 *Bam*HI, *Sma*I 位点之间。连接混合物转化大肠杆菌 JM103 感受态细胞, 转化细胞涂布于含氯霉素 (Ap 20 μ g/ml) 的平板上, 转化子再转接到含氯霉素 (Cm 10 μ g/ml) 的平板上。提取双抗转化子中的质粒, 它的大小为 3.7kb 左右, 以这个质粒转化大肠杆菌 JM103, 转化子均具有双抗特性。

我们将这个质粒命名为 pIS1。双酶切实验证实了约 1kb 外源 DNA 片段确实位于载体多聚接头区中, 另外, 克隆使原聚合接头区中的 *Bam*HI, *Sma*I 位点破坏。pIS1 DNA 依次以 *Xba*I、DNA 聚合酶 I 大片段和 *Eco*RI 处理, pUC18 用 *Sma*I、

*Eco*RI 酶切, T4 连接酶连接两个酶切后的质粒 DNA 片段(图 1)。连接产物转化大肠杆菌 JM103, 双抗转化子筛选与前述方法相同。由此获得的重组质粒 pCMB5 大小也是 3.7kb。双酶切实验表明, 与 pIS1 相比 pCMB5 中 *cat* 基因一侧增加了一个 *Bam*HI 酶切位点(图 1)。

(二) 重组噬菌体的构建

质粒 pCMB5 经 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切后, 用 DNA 聚合酶 I 大片段填平粘头 (3 μ g); 噬菌体 ϕ 105DI:1t DNA 以 *Sma*I 完全酶切。两个经过酶处理的 DNA 片段混合于 50 μ l 连接反应体系中, 连接产物转化溶源性枯草芽孢杆菌 168M (ϕ 105 DI:1t) 感受态细胞(图 2)。将总共 428 个氯霉素抗性转化子随机分成 38 组, 每组各含 11—12 个转化子。

表 2 由多组转化子中筛选具噬斑形成能力和氯霉素抗性特异转导能力的重组噬菌体
Table 2 Selection for plaque forming and Cm resistant transducing recombinant phages from several pools of transformants

Cm ^R /PFU 分组编号 Group number	筛选次数 Round of selection	I	II	III
25		34/128		
26		101/123	42/120	
27		104/128	56/139	
28		114/128	135/135	168/170
29		62/140	47/128	
30		51/140		
31		128/128	140/140	174/174
32		89/140	128/128	164/164
33		140/140	134/134	157/160
34		16/128		
35		65/128	128/128	170/170
36		128/128	136/136	171/171
37		36/128		
38		14/128		

Cm^R/PFU: 具有氯霉素抗性特异转导能力的噬菌体所占的比例。

The ratio between the chloramphenicol resistant transducing particles and total plaque forming units.

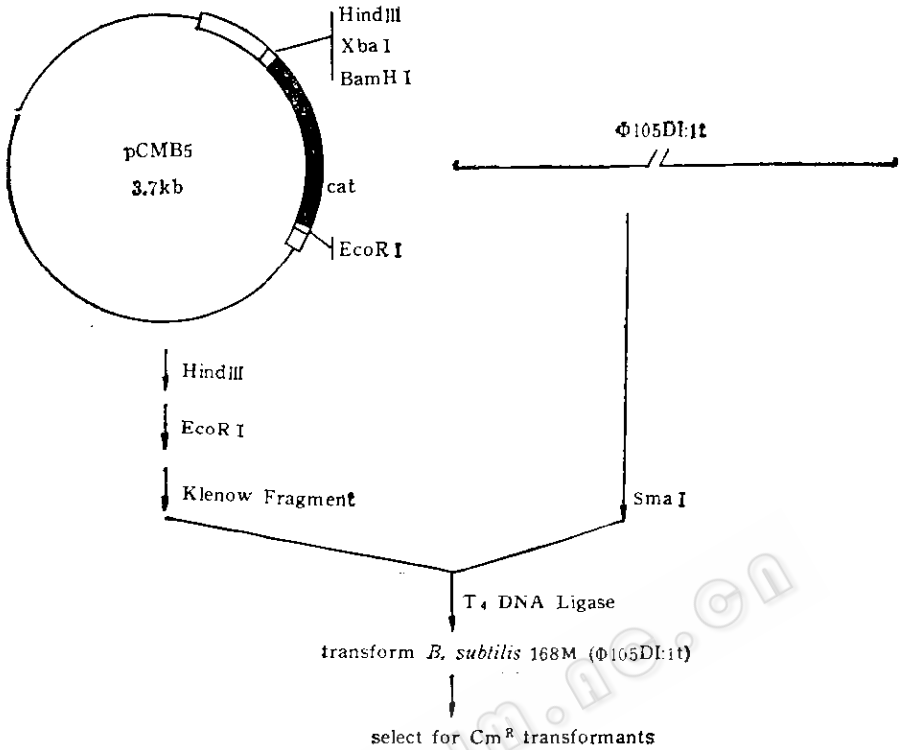


图2 以“原噬菌体转化法”将带有 *cat* 基因,单一 BamHI 和 XbaI 酶切位点的 DNA 片段引入噬菌体 φ105DI:lt 基因组内

Fig. 2 Protocol of “prophage transformation” in which a DNA fragment containing *cat* gene, unique BamHI and XbaI cutting sites was introduced into the genome of the φ105DI:lt

各组培养并经丝裂霉素C诱导产生裂解液,测定其效价在 $1.2 \times 10^7 - 2.0 \times 10^9$ 之间。对各组均挑取120—170个噬菌斑内的再生菌落转接到含氯霉素(Cm 20 μg/ml)的平板上,检测各组内氯霉素抗性菌落占总转移菌落的比例(Cm^R/PFU, PFU: plaque forming unit)。部分测定结果列于表2。对那些在初筛中 Cm^R/PFU 比值较高的组,在前一轮筛选的基础上重复筛选数次。最终得到10组(第1、7、8、19、28、31、32、33、35、36组)具有较高裂解释放量(PFU:8—12 × 10⁸/ml,这与原始株 φ105DI:lt 在相同条件下的释放量相当),并且各自裂解液氯霉素抗性转导能力稳定保持在100%。

以上得到的是一些具有自主侵染能

力,并保持溶源特性的特异转导噬菌体。而在其它组的转化子中,由于外源DNA片段的重组,造成原噬菌体基因组的缺陷,无法完成正常的侵染复制和裂解过程,或由于外源DNA片段在反复的侵染、诱导释放中不稳定而丢失,所以它们不能表现出上述特性。

以上10组转化子划上的单菌落经诱导产生重组噬菌体,提取其DNA并进行 BamHI-EcoRI, BamHI-SmaI 酶切分析。由电泳图谱上的带型差异,我们将10株重组噬菌体分成4类,并选出各自的代表,分别命名为: φ105S32、φ105S33、φ105S35 和 φ105S36。

(三) 重组噬菌体基因组酶切图谱的确定

分别对四种重组噬菌体进行单双酶切, 琼脂糖凝胶电泳如图 3、4 所示。与图 5 所示 $\phi 105\text{DI:1t}$ 酶切图谱比较, 确定重组噬菌体基因组内插入片段的情况。根据对实验结果的分析, $\phi 105\text{S32}$ 和 $\phi 105\text{S33}$ 基因组内插入片段的大小在 2kb 以上, 这势必影响它们作为克隆载体荷载其它 DNA 片段的能力, 这里不做进一步讨论。

$\phi 105\text{S35}$ 、 $\phi 105\text{S36}$ 的 EcoRI , SmaI , EcoRI-BamHI , SmaI-BamHI 酶切分析结果表明: 在两个重组噬菌体基因组内, 在原 $\phi 105\text{DI:1t}$ SmaI 酶切片段 D、E 之间的位置上有一个约 1kb 的插入片段, 插入

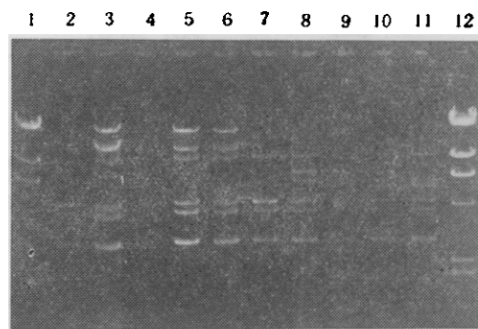


图 4 重组噬菌体 DNA 酶切琼脂糖凝胶电泳分析 (0.5%, W/V)

1,12. 均为 λ DNA Hind III 酶切标记; 2,7. $\phi 105\text{DI:1t}$; 3,8. $\phi 105\text{S32}$; 4,9. $\phi 105\text{S33}$; 5,10. $\phi 105\text{S35}$; 6,11. $\phi 105\text{S36}$; 2—6. 为 SmaI 酶切; 7—11. 为 SmaI-BamHI 双酶切。

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis (0.5%, W/V) of phage DNAs

2,7. $\phi 105\text{DI:1t}$; 3,8. $\phi 105\text{S32}$; 4,9. $\phi 105\text{S33}$; 5,10. $\phi 105\text{S35}$; 6,11. $\phi 105\text{S36}$; 2—6. DNAs were digested with SmaI or 7—11. double digested with SmaI and BamHI ; 1,12. Phage λ DNA was digested with Hind III as Mr marker.

破坏了原位置上 SmaI 切口。Jones 和 Errington 指出, 此点是 $\phi 105$ 基因组的一个非必需区, 在这点上的插入不影响噬菌体自身的特性^[10]。BamHI 酶切显示单一的 BamHI 位点恰好在插入片段一侧, 并表明两个重组噬菌体内插入片段方向相反。1kb 的外源片段来自于重组质粒 pCMB5, 所携带的 cat 基因赋予重组噬菌体所在宿主以氯霉素抗性, 而其上的 BamHI、XbaI 位点为 $\phi 105\text{S35}$ 和 $\phi 105\text{S36}$ 提供了两个单切位点(XbaI 酶切实验结果没有显示)。1988 年, Errington 和 Pughe 报道了 $\phi 105$ 噬菌体头部组装 DNA 的最大限度为 50.2kb^[18]。 $\phi 105\text{DI:1t}$ 基因组大小为 45.2kb, 而我们构建的两个重组噬菌体基因组是 46.2kb。由此可以推断, 由单切位点向两个重组噬菌体基因组引入外源 DNA 片段的极限值约为 4kb。另外, 由外源片段带入重组噬菌体基因组内

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

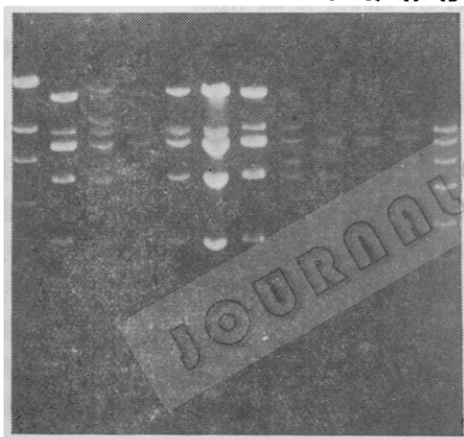


图 3 重组噬菌体 DNA 酶切琼脂糖凝胶电泳分析 (0.5%, W/V)

1. HindIII 酶切的 λ DNA; 12. EcoRI 酶切 SphI DNA, 此二者作为分子量标记; 2,7. $\phi 105\text{DI:1t}$; 3,8. $\phi 105\text{S32}$; 4,9. $\phi 105\text{S33}$; 5,10. $\phi 105\text{S35}$; 6,11. $\phi 105\text{S36}$; 2—6. 为 EcoRI 酶切; 7—11 为 EcoRI-BamHI 双酶切

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis (0.5%, W/V) of phage DNAs

2,7. $\phi 105\text{DI:1t}$; 3,8. $\phi 105\text{S32}$; 4,9. $\phi 105\text{S33}$; 5,10. $\phi 105\text{S35}$; 6,11. $\phi 105\text{S36}$; 2—6. DNAs were digested with EcoRI or 7—11. double digested with EcoRI and BamHI . As Mr marker, 1. phage λ DNA was digested with Hind III and 12. phage sphI DNA was digested with EcoRI .

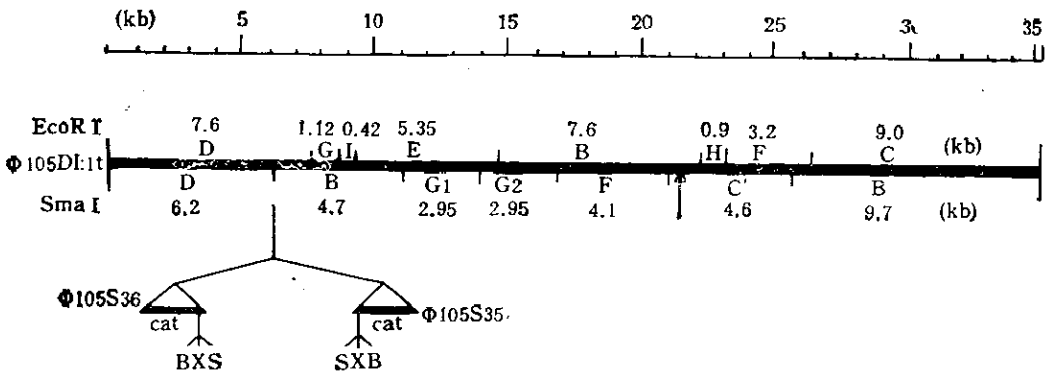


图5 噬菌体 $\phi 105DI:1t$ 及噬菌体载体 $\phi 105S35$, $\phi 105S36$ 的限制酶切图谱箭头所指之处是 $\phi 105DI:1t$ 中 4kb 非必须区 DNA 片段缺失的位置。重组噬菌体基因组内插入片段的位置和方向也标于图中 (B: BamHI, E: EcoRI, S: Sall, Sm: SmaI, X: XbaI)

Fig. 5 Restriction map of phage $\phi 105DI:1t$ and recombinant phages $\phi 105S35$, $\phi 105S36$.

The arrow indicates the approximate location of a 4kb deletion of non-essential DNA in these phages which were derived from $\phi 105$. The location and direction of the insert DNA fragment in two recombinant phages are showed in the figer.

的酶切位点还有 *sall*。

参照 $\phi 105DI:1t$ 限制酶切图谱,并根据上述实验结果,作者绘出了重组噬菌体 $\phi 105S35$ 和 $\phi 105S36$ 的限制酶切图谱(图5)。

(四) 重组噬菌体 DNA 转染枯草芽孢杆菌原生质体

由噬菌体颗粒中提取的 DNA 只能以很低的频率转染枯草芽孢杆菌感受态细胞,而用原生质体转化法,转化频率可以提高到 10^3 — 10^7 PFU/ μ g DNA。以往以 $\phi 105$ 构建的许多重组噬菌体如: $\phi 105Cm^R$, $\phi 105dlys$ 都是缺陷噬菌体,以它们的 DNA 转染枯草芽孢杆菌原生质体时,转染频率只 10^2 / μ g DNA。Errington 在分析这一现象时指出:转染原生质体最初导致噬菌体的烈性释放而非溶源化。由于缺陷噬菌体往往是不具备侵染能,所以在完成第一轮繁殖后,便因不能再次侵染而丢失^[9],表现为低频率转染。作者比较了 $\phi 105DI:1t$ 和 $\phi 105S35$, $\phi 105S36$ DNA 原生质体转染能力,结果发现转染频率均在 2.0×10^3 PFU/ μ g DNA 左右,即重组噬菌体 DNA

具有与原始株 $\phi 105DI:1t$ DNA 相同的转染能力。

本文所报道的重组噬菌体 $\phi 105S35$ 和 $\phi 105S36$ 具有以下特点: (1) 能够自主完成侵染、复制、组装和释放过程,并能实现溶源化; (2) 它们的基因组内带有可用作选择标记的 *cat* 基因; (3) 单一的 BamHI 和 XbaI 位点处于基因组非必需区; (4) 其 DNA 可高效转染枯草芽孢杆菌原生质体。这些特点使这两种重组噬菌体有可能作为克隆载体使用。

参考文献

- [1] Kawamura, F. et al.: *Gene*, 5: 87—91, 1979.
- [2] Birdsell, D. C. et al.: *J. Virol.*, 4: 264—270, 1969.
- [3] Bugaichuk, B. D. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 2165—2167, 1984.
- [4] Flock, J.: *Mol. Gen. Genet.*, 155: 241—247, 1977.
- [5] Ikerchi, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 154: 988—991, 1983.
- [6] Jekinson, J. S. & J. Mandelstem: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 2137—2145, 1984.
- [7] Savva, J. & J. Madelstem: *ibid.*, 130: 2137—2145, 1984.
- [8] Seki, T. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 32:

- 72—79, 1986.
- [9] Errington, J.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 2615—2628, 1984.
- [10] Jones, D. & J. Errington: *ibid.*, **133**: 483—492, 1987.
- [11] Messing, J. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **9**: 309—321, 1982.
- [12] Horinochi, S. & B. Weibum: *J. Bacterial.*, **150**: 815—825, 1982.
- [13] Yanish-Perron, C. et al.: *Gene*, **33**: 103—119, 1985.
- [14] Hardy, K. G.: In: "DNA Cloning: Vol. II", pp. 1—17, ed. by Glover, D. M., IRL Press, Oxford, 1985.
- [15] Chang, S. & S. N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.*, **165**: 111—115, 1979.
- [16] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [17] Gómez-Márquez, J. et al.: *Gene*, **54**: 255—259, 1987.
- [18] Errington, J. & N. Pughe: *Mol. Gen. Genet.*, **310**: 347—351, 1988.

CONSTRUCTION OF PHAGE VECTOR FOR *BACILLUS SUBTILIS*

Shen Tianxiang Yu Maoxiao Jia Panxing

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Recombinant phages $\phi 105S35$ and $\phi 105S36$, derived from phage $\phi 105DI:lt$, remain the ability to infect and be lysogenized in the host cell. In the their genome there is a 1 kb inset fragment which occurs between the DNA fragments D and E resulted from *Sma*I digested DNA of $\phi 105DI:lt$. But the orientation of this insert fragment is opposite in two recombinant phages, respectively. The *cat* gene on this fragment makes the host cell resistant to chloramphenicol. The unique *Bam*HI and *Xba*I sites which were introduced into the

genome of the recombinant phages provide inserting sites of foreign DNA fragment. DNA from these two recombinant phages can transfect protoplast of *Bacillus subtilis* at high frequency. Therefore, $\phi 105S35$ and $\phi 105S36$ are suitable as phage vectors in the molecular cloning of *Bacillus subtilis*.

Key words

Bacillus subtilis; Phage vector; Prophage transformation