

嗜热硫杆菌启动子的克隆及定位*

姚阿卿 颜望明

(山东大学微生物研究所、济南)

用 DNA 体外重组技术,将嗜热硫杆菌 (*Thiobacillus* sp.) 染色体 DNA 的 Hind III 片段插入启动子探测质粒 pSDSI (Ap^r , Tc^r) 的 Hind III 位点,在四环素平板上获得一批转化子。四环素抗性能力测定表明,有 12 个转化子可以在含 $240\mu\text{g/ml}$ 四环素的平板上生长,有 2 个可以在 $360\mu\text{g/ml}$ 的四环素平板上生长,对这二个抗性表达能力较高、分子量较小的质粒 pSDH7 和 pSDH11 作了限制性酶切图谱分析,并利用 Pst I 位点,通过亚克隆将 pSDH11 插入片段上的启动子定位在 0.25kb 片段内。分子杂交实验证明克隆的启动子活性片段确实来源于嗜热硫杆菌染色体 DNA。

关键词 嗜热硫杆菌染色体;启动子;四环素抗性

基因表达取决于转录、转译等几个步骤,在转录及调控中,启动子起着重要作用。要使目的基因有效表达,启动子的选择和使用相当重要,在异养细菌中,人们构建了许多启动子探测质粒,并利用这些载体对原核生物和真核生物的启动子进行了广泛的筛选和研究^[1-3]。在自养细菌中,启动子的研究报道甚少^[4],尤其是嗜热硫杆菌的启动子研究还未见报道。我们从云南腾冲地区含硫酸性热泉中分离得到一株嗜热硫杆菌 (*Thiobacillus* sp.) 是一种能利用元素硫和硫代硫酸盐作为能源的专性自养细菌,最适生长 pH 2.0—3.0,最适温度 45—50℃。本文利用启动子探测质粒 pSDSI^[5],克隆并分离出具有启动子活性的嗜热硫杆菌染色体 DNA 片段,通过四环素抗性能力测定,表明具有较高抗四环素能力。同时在酶切图谱分析的基础上进行了亚克隆,从而把启动子活性片段定位在 0.25kb 以内。

材料和方法

(一) 菌种及其培养

1. 菌种: 嗜热硫杆菌 (*Thiobacillus* sp.) 系我所从云南腾冲地区酸性热泉中分离得到,采用 Starky^[6] 无机盐培养基,以元素硫为能源,50℃ 静止培养。

大肠杆菌 C 600 由中国科学院微生物研究所提供;C600 (pSDSI) 系我所保藏,大肠杆菌用 LB 培养基,37℃ 回旋振荡培养。

2. 质粒和染色体 DNA 的分离和纯化方法同前^[5]。

3. 酶切、连接、转化: 参照 Maniatis^[7] 的方法。限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶均由中国医学科学院基础医学研究所提供。

4. 琼脂糖凝胶电泳: 采用 Tris-醋酸缓冲液 (40mmol/L Tris, 20mmol/L 醋酸, 2mmol/L EDTA) 0.7% 琼脂糖。DNA 分子量是根据 Meyers 等^[8] 方法测定的,以入 DNA Hind III 酶切片段作为标准。缺口翻译和 Southern blot 分子杂交均按文献^[9] 进行。

本文于 1990 年 8 月 8 日收到。

* 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目。

5. 不同菌株抗四环素能力测定：转化子在含不同浓度的四环素的 LB 平板上划线，37℃ 培养 24 小时，观察菌落生长情况，转化子能生长的最高四环素浓度即为转化子在固体培养基上的抗四环素能力。

液体培养的测定方法参照文献[3]，将含有不同质粒的过夜培养液，以 0.5% 接种量接入含不同浓度四环素的 LB 培养基中，37℃ 振荡培养 5 小时，以在 600nm 波长处光吸收的强弱表示细胞的生长情况。

结果和讨论

(一) 具有启动子功能的 DNA 片段的克隆

启动子探测质粒 pSDSI (Ap^r Tc^r) 由

pBR 322 衍生而来，该质粒具有完整的四环素抗性结构基因，但基因前的启动子已被切除，携带 pSDSI 的菌株在四环素 (5 μg/ml) 培养基的平板上不能生长，利用这一特点，可筛选出具有启动子功能的 DNA 片段。

用 Hind III 酶切嗜热硫杆菌染色体 DNA 和 pSDSI，体外重组后转化大肠杆菌 C600 受体细胞，涂布在含有 50 μg/ml 氨苄青霉素和 12 μg/ml 四环素的平板上 (图 1)，结果得到 387 株抗药菌落，在这些转化子中，有 12 个可以在 240 μg/ml 四环素平板上生长，有 2 个可以在高达 360 μg/ml 四环素平板上生长，表现了较强的抗性能力。快速提取质粒电泳检测表明，12 个

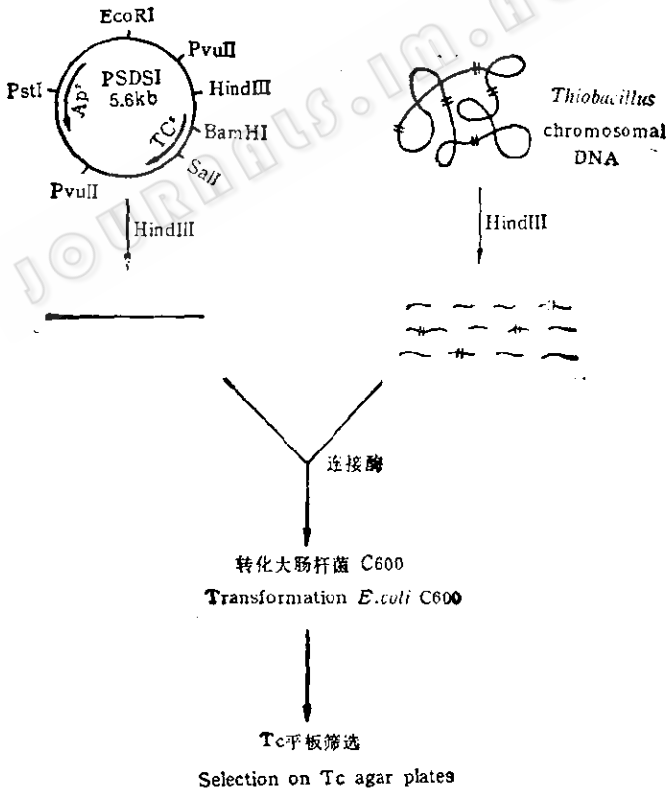


图 1 用 pSDSI 克隆具有启动子活性的硫杆菌染色体 DNA 片段

Fig. 1 Cloning of the DNA fragments harboring promoter activities in pSDSI from the chromosomal DNA of *Thiobacillus* sp.

抗 240 $\mu\text{g/ml}$ 四环素的转化子均含有比 pSDSI 大的质粒, 2 个抗性能力最强的分别命名为 pSDH7 和 pSDH11。

(二) 重组子抗四环素能力测定

为了更准确地测定重组质粒的抗四环素能力, 我们对抗性最强的几个重组子进行了液体培养四环素抗性能力测定。取不含四环素时菌体生长的光密度为 100%, 以不同四环素浓度下菌体生长的光密度下降百分数和四环素浓度关系作图, 如图 2 所示。如取光密度下降 50% 时的四环素浓度表示重组子的抗药水平, 那么在该实验中, 带有重组质粒 pSDH7 和 pSDH11 的菌株抗四环素能力在 180 $\mu\text{g/ml}$ 左右, pBR322 菌株在 100 $\mu\text{g/ml}$ 左右, 而克隆载体 pSDSI 菌株小于 2 $\mu\text{g/ml}$, 在四环素存在时不能生长。

(三) 重组质粒 pSDH7 和 pSDH11

的限制性酶切图谱

用八种限制性内切酶 (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, PvuII, Sall 和 XhoI) 对 pSDH7 进行酶切, 结果见图 3(I), 除 XhoI 无切点外, PstI、BamHI、EcoRI 和 Sall 都只产生一个片段, 大小为 7.05 kb。根据 pSDSI 酶切图谱可以知道 BamHI、EcoRI、PstI 和 Sall 在 pSDH7 的插入片段上也无切点。用 HindIII 酶切产生二个片段, 大小分别为 5.65 kb 和 1.4kb, 前者与载体 pSDSI 相一致, 后者为具有启动子功能的硫杆菌染色体 DNA 片段。PvuII 酶切产生三个片段, 大小分别为 3.25、2.35 和 1.45kb。原 pSDSI 上有二个 PvuII 位点, 酶切后有二个片段, 大片段为 3.20kb, 小片段为 2.45kb, 由于插入片段是从 HindIII 位点插入的, 而 HindIII 位于原载体 PvuII 的小片段中, 原载体

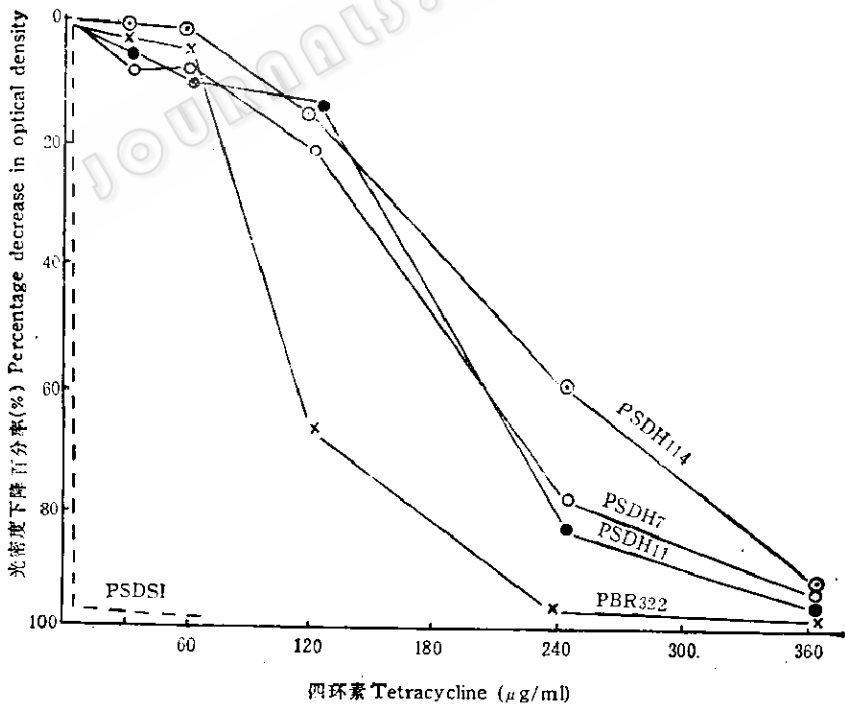


图 2 含有不同质粒的菌株在不同浓度四环素中的生长情况

Fig. 2 Growth of *E. coli* strains harboring different plasmids in different tetracycline concentration

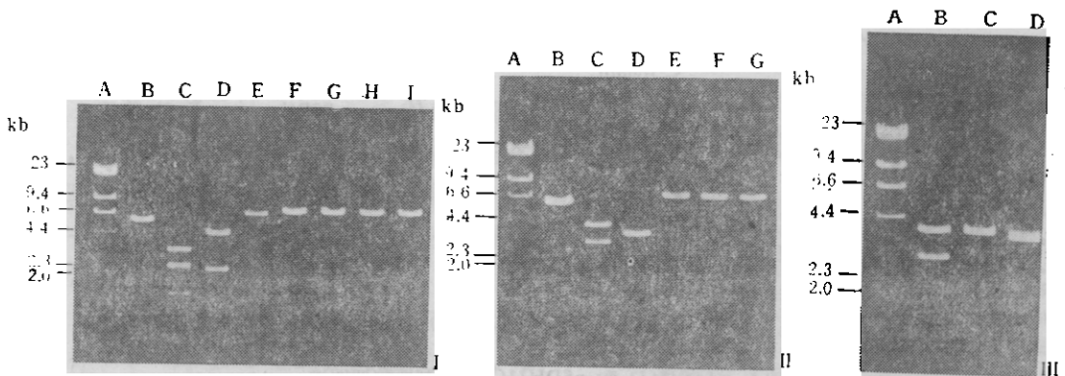


图3 pSDH7(I)、pSDH11(II)和pSDH114(III)酶切电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoretic patterns of pSDH7(I), pSDH11(II) and pSDH114(III)

- I. A. λ DNA/HindIII; B. pSDH7/HindIII; C. pSDH7/PvuII;
 D. pSDH7/KpnI/EcoRI; E. pSDH7/KpnI; F. pSDH7/EcoRI;
 G. pSDH7/BamHI; H. pSDH7/PstI; I. pSDH7/SalI
- II. A. λ DNA/HindIII; B. pSDH11/HindIII; C. pSDH11/PstI;
 D. pSDH11/PvuII; E. pSDH11/BamHI; F. pSDH11/EcoRI;
 G. pSDH11/SalI
- III. A. λ DNA/HindIII; B. pSDH11/PstI; C. pSDH114/PstI;
 D. pSDH114/PstI/HindIII

PvuII 大片段未变动。因此根据原载体 PvuII 小片段和插入片段大小可以推算出插入片段上 PvuII 的相对位置。用 KpnI 酶切,从凝胶中只见一个片段,但其大小只有 6.80kb 而不是 7.05kb。原载体 pSDSI 上无 KpnI 位点,因此可能在插入片段上有二个相距只有 0.25 kb 的 KpnI 位点。为了证实 KpnI 位点及其位置,进一步用 KpnI/EcoRI 双酶切,结果凝胶中出现二个片段,大小为 2.26 和 4.54kb,根据双酶切可以定出一个 KpnI 位点。但双酶切后两片段之和仍然只有 6.80kb,另一个 0.25 kb 小片段凝胶电泳时不能显示,由此可以推算出插入片段上有二个相距只有 0.25 kb 的 KpnI 位点。

根据上述结果,可以作出 pSDH7 的限制性酶切图谱(图 4-I)。

用同样八种常用的限制性内切酶对

pSDH11 进行酶切,结果见图 3-II。KpnI 和 XhoI 无切点, BamHI、EcoRI 和 SalI 酶切均只有一个大小为 6.60kb 的片段,说明 pSDH11 的插入片段上也无这些酶的切点。用 PvuII 酶切产生一个 3.28kb 大小的片段,实际上该片段是二个相近大小的片段重合在一起的一条带,插入片段上无 PvuII 酶切位点。用 HindIII 酶切产生二个片段,一个为 5.65kb 与载体 pSDSI 相同;还有一个 0.95kb 的插入片段。用 PstI 酶切产生二个片段,其大小分别为 3.75 和 2.85kb,表明在插入片段上有一个 PstI 位点。根据上述结果作出 pSDH11 的限制性酶切图谱(图 4-II)。

(四) 重组质粒 pSDH114 的构建和启动子的定位

pSDH11 有二个 PstI 位点,一个位于抗氨苄青霉素结构基因中,另一个位于插

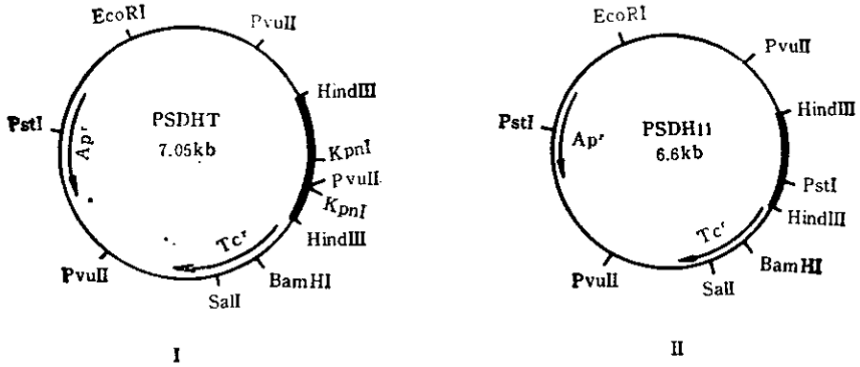


图4 pSDH7(I) 和 pSDH11(II) 限制性酶切图谱
Fig. 4 Restriction map of pSDH7(I) and pSDH11(II)

入片段内。用 PstI 酶切 pSDH11, 删去 2.85 kb 片段 (其中包括 2.15 kb 的载体 DNA 和 0.7kb 的插入片段), 连接后转化大肠杆菌 C600, 结果在四环素 (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 平板上得到一批转化子, 通过含有 Ap (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 LB 平板, 挑出在 Ap 平板上不能生长的重组子, 快速提取质粒, 经电泳检测证明有质粒存在, 并且分子量小于原质粒 pSDH11, 命名为 pSDH114。

进一步将 pSDH114 用 PstI 单酶切和 PstI/HindIII 双酶切, 结果如图 3-III 所示。PstI 酶切产生一个 3.75kb 的片段, 与 pSDH11/PstI 酶切的大片段相一致。用 PstI/HindIII 双酶切产生一个 3.50 kb 的片段, 该片段与载体 pSDSI 上的 PstI/HindIII 酶切片段相一致, 而另一个 0.25 kb 的小片段是插入的含有启动子活性的硫杆菌染色体 DNA 片段, 由于分子量较小, 在照片中未见到。

通过以上亚克隆构建成的一个大小为 3.75kb 的 pSDH114 质粒 (Ap^rTc^r), 仍表现了较强的抗四环素能力 (360 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 由此可以将插入片段的启动子定位在 0.25kb 以内。

为了进一步验证克隆的具有启动子功能的 DNA 片段来源于嗜热硫杆菌染色

体。我们作了 Southern blot 杂交试验, 硫杆菌染色体, 大肠杆菌 C600 染色体和质粒 pSDH11 经 HindIII 酶解后一起电泳, 然后转移到硝酸纤维素膜上, 与经缺口翻译标记 ³²P 的质粒 pSDH11 杂交, 结果见图 5。从图 5 中可以看出, 在与 pSDH11 的插入片段 (即 pSDH11/HindIII 小片段) 相一致的位置上, 硫杆菌染色体 DNA 的酶解产物有杂交条带, 而大肠杆菌染色体 DNA

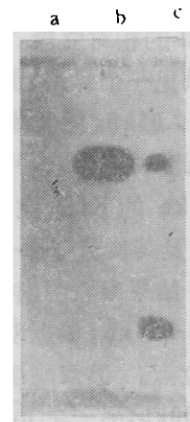


图5 Southern 杂交自显影
Fig. 5 Hybridization of HindIII-digested chromosomal DNA with ³²P-labeled pSDH11

- a. *E. coli* chromosomal DNA/HindIII
b. *Thiobacillus* sp. chromosomal DNA/HindIII
c. pSDH11/HindIII

的酶解产物没有杂交带。这就证明 pSDH 11 的插入片段确实来源于硫杆菌染色体 DNA。

自养细菌可以在完全无机的条件下生长,具有非凡的生物合成能力,我们克隆的启动子活性片段具有较强的启动能力,为进一步构建基因高效表达载体,实现基因高效表达提供了一个途径。

新构建的 pSDH114 质粒,在启动子后有一个 HindIII 位点,通过该位点,可用来插入外源高温目的基因,进一步观察外源基因的表达情况。

所克隆的启动子活性片段(0.25 kb)有待于进行 DNA 核苷酸顺序分析,并与异养细菌比较,这将有助于了解自养细菌,特

别是嗜热自养细菌在基因表达方面的特性。

参 考 文 献

- [1] Williams, D. M. et al.: *Gene*, 16: 199—206, 1981.
- [2] 李三堆等: 遗传学报, 12: 163—169, 1985.
- [3] 刘小明等: 遗传学报, 15: 102—110, 1988.
- [4] 颜望明: 遗传学报, 17(2): 143—147, 1990.
- [5] 颜望明: 生物工程学报, 6(4): 338—340, 1990.
- [6] 金松谟等: 微生物学通报, 15: 20—21, 1988.
- [7] Maniatis, T. et al. (余茂效译) 分子克隆操作指南, 第 75 页; 第 163 页, 科学出版社, 北京, 1985 年.
- [8] Meyers, T. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529, 1976.
- [9] 彭秀玲等: 基因工程实验技术, 第 119—142 页, 湖南科技出版社, 长沙, 1987 年.

JOURNALS.IM.AC.CN

CLONING AND ORIENTATION OF A PROMOTER OF THERMOPHILIC *THIOBACILLUS* SP.

Yao Aqing Yan Wangming

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan)

Thiobacillus sp. is an obligate autotrophic thermophilic bacterium which was isolated from an acidic hot spring in Yunnan Province. Its optimum growth temperature is 45—50°C and its optimum pH is 2.0—3.0.

Using DNA recombinant technique, we inserted the HindIII fragments of the *Thiobacillus* sp. chromosomal DNA into the HindIII site of promoter-probe plasmid pSDSI (Ap^rTc^r, 5.65 kb). Transformants resistant to tetracycline were obtained on Tc plates (12 µg/ml). Of these, twenty transformants were able to grow on 120 µg/ml Tc plates, and two of them, designated pSDH7 and pSDH11, were able to grow on plates containing Tc at concentration up to 360 µg/ml.

With HindIII, pSDH11 produced a 0.95kb fragment which had the function of promoter and a PstI site besides the 5.65 kb fragment of pSDSI. Southern blot hybridization showed

that the 0.95 kb insert was from the *Thiobacillus* sp. chromosomal DNA. After restriction mapping, a 2.85 kb fragment of pSDH11 (which contained 0.7 kb of the inserted fragment) was removed with the aid of PstI, and the remained fragment was used to construct a 3.75 kb plasmid (named pSDH114) which was resistant to a higher level of tetracycline (360 µg/ml) than for pBR322 (120 µg/ml). The remained 0.25 kb foreign fragment in pSDH114 still retained full function of the promoter contained in the original 0.95 kb. Thus we could orient the cloned promoter function fragment (0.25kb) from *Thiobacillus* sp. in pSDH114.

Key words

Thermophilic *Thiobacillus* sp. chromosome; Promoter; Tetracycline resistance