

链霉菌高拷贝质粒 pIJ101 的研究

V. 两个拷贝数突变子及其与克隆片段的关系

邓 子 新

(华中农业大学农抗研究室, 武汉 430070)

T. Kieser and D. A. Hopwood

(美国约翰·英勒斯研究所, 诺里季)

在分离和定位链霉菌高拷贝质粒 pIJ101 上启动子活性区域的过程中, 我们将 BclI-E 片段经 MboI 进一步酶解后, 克隆到由 pIJ101 基本复制功能区所衍生的载体 pIJ425 的 BglII 位点上, 从转化了链霉菌 TK64 的原生质体所获得的链霉菌素抗性转化子中, 发现了两个拷贝数极其异常的衍生质粒, 命名为 pIJ2743 和 pIJ2744。与 pIJ425 相比, pIJ2743 的拷贝数增加约 10 倍, 而 pIJ2744 的拷贝数则降低约 10 倍。拷贝数的剧增和剧减不是由于质粒宿主的突变, 因为它们在重新转化的宿主中仍显示了突变型拷贝数特征。拷贝数的变化也不是由于载体的突变, 因为切除插入片段后, 载体区域再连接后的质粒仍与原始 pIJ425 的拷贝数相同。将高拷贝突变子中 0.63kb 的插入片段以两种不同的取向克隆到另一个类似于 pIJ425 的载体 pIJ486 的 BamHI 位点, 在一种取向插入时, 新衍生的质粒仍显示出极高的拷贝数, 而在另一种取向时, 质粒的拷贝数不发生变化, 说明拷贝数的剧增不仅只与插入片段有关, 而且其功用具有明显的方向性, 即为一顺式作用因子。

关键词 拷贝数突变子; pIJ101; 链霉菌

pIJ101 是在产链霉菌 ISP 5434 中发现的一个高拷贝、广宿主范围的质粒。除 pIJ101 以外, 该菌株还携带另外三个小一些的质粒, 即 pIJ102、pIJ103 和 pIJ104, 其限制内切酶图谱揭示, 它们可能是由 pIJ101 缺失而来。从不同菌种收藏中心的 ISP 5434 菌株中都检测到类似的质粒群体, 这证明四个质粒遗传都是稳定的^[1]。Kieser 等曾报道 pIJ101 及其衍生质粒的拷贝数范围在 40—300 之间^[1]。当时认为, 拷贝数的这种较大变异与培养物生长的生理菌龄有关, 然而, 在分析这些质粒及其衍生载体的拷贝数的过程中, 我们发现野生型 pIJ101 的拷贝数在 300 左右, 而有些缺失突变体(包括常用的载体如 pIJ702、pIJ425 和 pIJ486 等)的拷贝数则只达到 50—100, 这暗示 pIJ101 及其衍生物的拷贝数是由自身的遗传因子所控制的。本文报道在定位这种遗传因子的过程中, 利用克隆的方法产生两个拷贝数突变体的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和质粒

本文于 1991 年 6 月 20 日收到。

变铅青链霉菌菌株 TK64^[2] (无质粒, pro-6, str-6) 为链霉菌质粒的宿主。大肠杆菌质粒的宿主菌株为 ED8767 (recA56, dam⁺)^[3], 大肠杆菌质粒 pIJ2728^[4] 是 pIJ101 的 Bcl-E 片段插入在 pKK232-8 的 BamHI 位点衍生而来。pIJ425 和 pIJ486 的限制酶图谱及有关特征请见文献^[5]。

(二) 通用技术

大肠杆菌、链霉菌的培养及 DNA 操作的方法见文献 [2]。质粒的分离方法见文献 [6]。

(三) 拷贝数的确定

用文献 [1] 描述的方法, 对电泳凝胶照片的负片进行密度扫描确定。要进行比较的 DNA 制备物总是在同一凝胶上电泳。

结 果

(一) 一个高拷贝突变体

我们曾经报道过 pIJ101 BclI-E 片段上启动子功能的存在^[7]。为了进一步定位启动子活性区域, 我们采用了启动子探针载体 pIJ425。将 pIJ425 用 BglII 酶解后, 与从 pIJ2728^[4] 中分离的 EcoRI-HindIII 片段(携带了 pIJ101 的 BclI-E 片段)经 MboI 进一步酶解后的产物相混合, 用 T4 连接酶连接后去转化变铅青链霉菌 TK64 的原生质体, 从抗硫链丝菌素的初级转化子中筛选到若干个进一步对卡那霉素显示抗性的转化子。从这些双抗转化子中提取质粒 DNA 时发现, 其中一个衍生质粒 (pIJ2743) 显示了极高的拷贝数(图版 I), 大约为 1000, 约为野生型 pIJ101 (约 300) 的 3 倍, 为载体 pIJ425 的 10 倍。从 50ml 培养 48 小时的菌丝体中可以提取获得总量约为 3mg 的质粒 DNA, 也说明这个质粒的拷贝数相当高。

(二) 高拷贝突变与质粒宿主无关

我们从高拷贝突变子中提取质粒 DNA, 再一次来转化变铅青链霉菌 TK64 的原生质体。从新获得的硫链丝菌素抗性转化子中挑取三个独立的菌落来提质粒, 结果 pIJ2743 都显示了极高的拷贝数。这项试验说明, 高拷贝突变不是宿主染色体 DNA 发生突变的结果。

(三) 高拷贝突变也不是载体 pIJ425 区域突变的结果

碰巧, 在 pIJ2743 中, 插入在载体 pIJ425 BglII 位点的 0.63kb 的 MboI 片段在两端连接点均再生出 BglII 酶切点, 可使这个片段得到回收。因此, 我们将 pIJ2743 用 BglII 酶切后, 使载体 pIJ425 部分再自我连接起来, 然后去转化 TK64 的原生质体。考察再连接后的质粒拷贝数发现, 它与原始作为载体的 pIJ425 没有差别, 说明拷贝数的剧变也不是载体 pIJ425 区域发生突变的结果。

(四) 高拷贝突变与克隆片段的关系及其顺式作用

上述两项试验可以证明高拷贝突变与克隆片段有关, 但不能证明唯有克隆片段与拷贝数的剧变有关。因为载体区域的突变有可能需要与克隆片段协同表达才能赋予超高拷贝的特征。为了测试这种可能性, 我们把 0.63kb 的插入片段用 BglII 切出来, 以彼此相反的方向插入到另一个质粒 pIJ486 的 BamHI 位点。拷贝数测定发现, 其中一个衍生

质粒 (pIJ2745) 仍然表现了极高拷贝数的特征(图 1), 而另一个质粒 pIJ2746 (只是插入片段与 pIJ2745 相反)的拷贝数则与没有插入片段的 pIJ425 相似, 约 100 (图 1)。这项试验也证明, 这种异常高的拷贝数并不是由于载体上启动子的转录通读所引起, 因为在所使用的两个载体 pIJ425 和 pIJ486 中, 来自噬菌体 fd 的转录终止子 (可有效地在链霉菌中表达) 分别处于片段的两端。说明拷贝数的这种变化完全是由插入片段所决定的。而且这个作用因子的功能具有明显的方向性, 可能为一顺式作用因子。

(五) 一个低拷贝突变子及其与克隆片段的关系

经过上面所述的克隆试验, 我们还获得了一个低拷贝突变体质粒 pIJ2744 (图 1)。它的拷贝数约为 10, 大约小于野生型 pIJ101 拷贝数的 30 倍, 小于载体 pIJ425 拷贝数的 10 倍。同理, 这种拷贝数的剧减即有可能是由于宿主的突变, 又有可能是载体质粒 pIJ425 区域的突变, 还有可能是来自 BclI-E 片段 0.68kb DNA 的插入所造成。我们把 pIJ2744 重新转化到 TK64 的原生质体, 从中提出质粒发现, pIJ2744 在新宿主中仍为低拷贝, 说明拷贝数的降低不是由于宿主的突变所引起。把 0.68kb 的插入片段切除, 使载体部分自我连接后再转入到 TK64 的原生质体。拷贝数测定发现, 这种转化子中质粒的拷贝数与做为原始载体的 pIJ425 一样, 这也说明不是载体部分的突变引起拷贝数的大大降低。显然, 这种拷贝数的降低也与插入片段有直接的关系。不过, 是否为唯一的关系, 尚未进一步确定。

讨 论

本文报道了通过克隆片段的插入使质粒的拷贝数剧增和剧减的两个例子。在一种情况下, 质粒的拷贝数比作为载体的质粒增加约 10 倍, 而在另一种情况下, 则降低约 10 倍。这样, pIJ101 及其衍生质粒的拷贝数范围大大开阔了, 在 10—1000 之间。而且这种拷贝数较大范围的变异与 pIJ101 上特异的 DNA 片段直接相关。

这两个突变体的出现, 暗示了克隆片段上与拷贝数控制有关的正或负因子的存在。对插入在 pIJ2743 的 0.63kb 片段进行了进一步的研究, 发现它为一顺式作用因子, 因为只在一种方向插入时使载体拷贝数剧增, 而在另一个方向则没有这种效果。可见, 这种突变体的分离为我们研究这个链霉菌高拷贝质粒的拷贝控制机理提供了工具。诚然, 这种拷贝数突变性载体也更开阔了 pIJ101 衍生载体在基因克隆试验中的用途, 有可能更为理想地根据需要来调节外源基因的表达水平。

参 考 文 献

- [1] Kieser, T. et al.: *M.G.C.*, 185: 223—238, 1982.
- [2] Hopwood, D.A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces: A laboratory Manual*, 1985.
- [3] Murray, N. E et al.: *M.G.C.*, 150: 53—61, 1977.
- [4] 郭新等: 华中农业大学学报, 9(1): 37—46, 1990.
- [5] Ward, J. et al.: *M. G. C.*, 203: 468—478, 1986.
- [6] Kieser, T.: *Plasmid*, 12: 151—160, 1984.
- [7] Deng zixin et al.: *Gene*, 65: 83—91, 1986.

图 版 说 明

pIJ101, pIJ2743, pIJ2745 和 pIJ425 的拷贝数。总 DNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 然后用溴化乙锭染色。pIJ101, pIJ2743 和 pIJ2744 的总 DNA 在上样时进行了二倍系列稀释以便选取适当的稀释度进行密度扫描。经 HindIII 酶解的 λ DNA 用作分子量大小的对照。pIJ425 和 pIJ2745 的同步电泳直观地显示了质粒拷贝数的差异。

Explanation of plate

Determination of the copy number of pIJ101, pIJ2743, pIJ2745 and pIJ425. Total DNA preparations were run on 1% agarose gels and stained with EB. Two-fold dilutions of the preparations were loaded to allow scanning (pIJ101, pIJ2743 and pIJ2744). phage lambda DNA digested with Hind III was loaded as standard. For pIJ425 and pIJ2745 samples with similar amounts of chromosomal DNA are shown to demonstrate the difference in plasmid copy number.

STUDIES ON THE MULTY-COPY *STREPTOMYCES* PLASMID pIJ101

V. TWO COPY-NUMBER MUTANTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH CLONED FRAGMENTS

Deng Zixin

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

T. Kieser and D. A. Hopwood

(John Innes Institute, Norwich, England)

In the process of isolating and localizing the promoter-active regions, the BclI-E fragment of pIJ101 digested with MboI was ligated with BglII-digested pIJ425, a vector derived from the basic replicon of pIJ101. Among the thiostrepton-resistant transformants obtained after transformation of *S. lividans* TK64, two plasmids were found to have unusual copy-number. They were designated as pIJ2743 and pIJ2744. While pIJ2743 has an extremely high copy-number, about ten times of that of the vector pIJ425, pIJ2744 has low copy-number, about ten times lower than that of the vector pIJ425. Two extreme copy-number were maintained when the two plasmids were introduced into fresh TK64 protoplasts and were thus not caused by host mutations. Removal of the 0.63 kb insert from pIJ2743 and 0.68 kb insert from pIJ2744 gave plasmids with the same copy-number as the original vector pIJ425. This suggested that it is not the mutation (s) in the vector which caused the changes of the copy-number. For pIJ2743, proof that the cloned piece of DNA was actually alone responsible for the increased copy-number came from subcloning the 0.63 kb BglII insert into the BamHI site of pIJ486, a vector similar to pIJ425. The extremely high copy-number was observed when the fragment was inserted in one orientation. With the same insert in the other orientation, a similar copy-number as for the vector without insert, pIJ425, was observed, suggesting that the effect of the insert might be cis-acting.

Key words Copy-number mutants; pIJ101; *Streptomyces*