

# 麦迪霉素产生菌具有启动功能的 DNA 片段的克隆和分析

金 红 王以光

(中国医学科学院 医药生物技术研究所 北京 100050)  
中国协和医科大学

**摘 要** 利用启动子探针质粒载体 pIJ486 从麦迪霉素产生菌总 DNA 中克隆得到了一段具有启动功能的 DNA 片段。通过限制性酶切分析,测定插入 DNA 片段大小为 2.3kb。又利用载体 pIJ486 和 pIJ487 的新霉素抗性结构基因上游有多酶切点方向相反的性质,分析了插入片段在两个不同方向上的启动能力。结果表明,在两个方向上均有启动功能,但强弱相差六倍。其中在 XbaI-HindIII 方向上具有较强的启动能力,在变铅青链霉菌中新霉素抗性水平可达 20mg/ml 以上。进一步对插入片段的三个 BamHI 小片段进行分析的结果表明,较强启动子区域集中在 BamHI-BamHI 0.79kb DNA 片段上。

**关键词** 链霉菌启动子, 启动子探针质粒载体, 麦迪霉素产生菌

随着对链霉菌启动子的分离及研究的深入<sup>[1]</sup>,链霉菌启动子在结构和功能上日益显现出多样性和特异性。不同来源的启动子在异种菌株中表现强启动活性的机率很低。近几年来,我们实验室克隆得到了一些与麦迪霉素生物合成有关的酶基因<sup>[2-4]</sup>。为了能使这些基因得到高效表达,我们试图从麦迪霉素产生菌总 DNA 中克隆具有强启动功能的 DNA 片段,通过对它的分析研究,进一步构建链霉菌高效表达载体。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

1.1.1 大肠杆菌 DH-5a (F<sup>-</sup>, Lac Z<sup>-</sup>), 为重组 DNA 大肠杆菌受体菌,本实验室保存。

1.1.2 变铅青链霉菌 (*S. lividans*) TK24, 为重组 DNA 链霉菌受体菌,为本实验室保存。

1.1.3 麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌 (*S. mycarofaciens*) 1748 为总 DNA 供体,为本所保存。

1.1.4 链霉菌质粒 pIJ486/7 以新霉素磷酸转移酶基因 neo 为揭示基因的启动子探针质粒载体<sup>[5]</sup>,由 Hopwood D. A. 教授提供。

链霉菌与大肠杆菌穿梭质粒 pWHM3<sup>[6]</sup>,由 Hutchinson C. R. 教授提供。

### 1.2 培养基

大肠杆菌用 LB 培养基<sup>[7]</sup>。链霉菌培养主要用改良的 R2YE 培养基<sup>[8]</sup>。卡那霉素抗性 Km 测定培养基 (合成 5 号),按文献<sup>[9]</sup>配制。

### 1.3 质粒 DNA 的分离纯化及 DNA 片段的分离

大肠杆菌质粒 DNA 提取采用 Maniatis T.<sup>[7]</sup>方法进行。

链霉菌质粒 DNA 提取按 Hutchinson C. R. 实验室的方法(未发表)略加改进而进行<sup>[8]</sup>。

大量 DNA 样品采用 CsCl 密度梯度离心法纯化<sup>[7]</sup>。

DNA 片段的分离按照 Schleicher & Schuell 公司产品说明书,用 DEAE 膜从琼脂糖凝胶中回收。

### 1.4 酶切反应及电泳

限制酶 BamHI、PstI、XbaI 和 HindIII 为中国医学科学院基础所产品;XhoI 为美国 BRL 公司产品。酶切反应条件按产品说明书进行。

T4 DNA 连接酶为 Biolabs 公司产品,连接反应在室温(22℃)下进行 4—16 小时。

碱性磷酸酶(CIAP)为华美公司产品,酶反应按 Biochemica 产品说明进行。

电泳采用 0.6%—1.2% 琼脂糖凝胶水平平板电泳。电泳缓冲液为 40 mmol/L Tris, 20 mmol/L NaAc, 2 mmol/L EDTA, pH8.0, 电压梯度 4 v/cm。

### 1.5 总 DNA 的制备

链霉菌总 DNA 的提取主要按 Chater K. F.<sup>[10]</sup>方法进行。

### 1.6 DNA 的转化

大肠杆菌 DNA 的转化按照 Maniatis T.<sup>[7]</sup>描述的方法进行。以 X-gal 鉴定平皿筛选氨苄青霉素 Amp 抗性,含重组 DNA 的白色菌落转化子。

链霉菌原生质体制备和转化基本按照 Hopwood D. A.<sup>[11]</sup>的方法进行。以 25 mg/ml 硫链丝菌素(Thiostrepton 简称 Thio)筛选抗性转化子。

### 1.7 卡那霉素(Km)抗性测定

Km 为上海市崇明制药厂制品。在不同 Km 浓度的合成 5 号培养基平皿上或梯度平皿上划线或单菌落点种,28℃培养三天。观察生长情况。

### 1.8 DNA 分子杂交

点原位杂交(dot blot),根据文献[11]的菌落原位杂交方法,略加改进,将 DNA 样品直接点于硝酸纤维膜上,将膜分别经过碱溶液(1mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl)和中和溶液(0.5mol/L Tris, 1.5 mol/L NaCl, pH7.2)处理后,在 90%乙醇中洗涤,置室温中干燥,膜在 80℃烘箱内烤 2 小时。

探针的<sup>32</sup>P 同位素标记基本按照文献[11]方法进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 从麦迪霉素产生菌总 DNA 中克隆具有启动功能的 DNA 片段

将麦迪霉素产生菌总 DNA 的 EcoRI 和 BamHI 双酶切酶解片段(约 8μg),与 pIJ486 的 EcoRI 和 BamHI 酶切线性载体(约 4μg),在 T4 DNA 连接酶作用下连接,连接 DNA 转化 *S. lividans* TK24 原生质体,共得到 8000—10000 个对 Thio 具有抗性的转化子。在含 100μg/ml Km 的 R2YE 培养基平皿上,筛选 Km 抗性菌落,共挑 810 个 Thio 抗性转化子,其中 Km 抗性菌落约占 13.3%,所采用的技术路线见图 1。有几株抗 Km 的水平

较高,达 20mg/ml,提取转化子质粒 DNA,均为重组质粒。选择重组质粒 p4EB363 进行了较深入的研究。

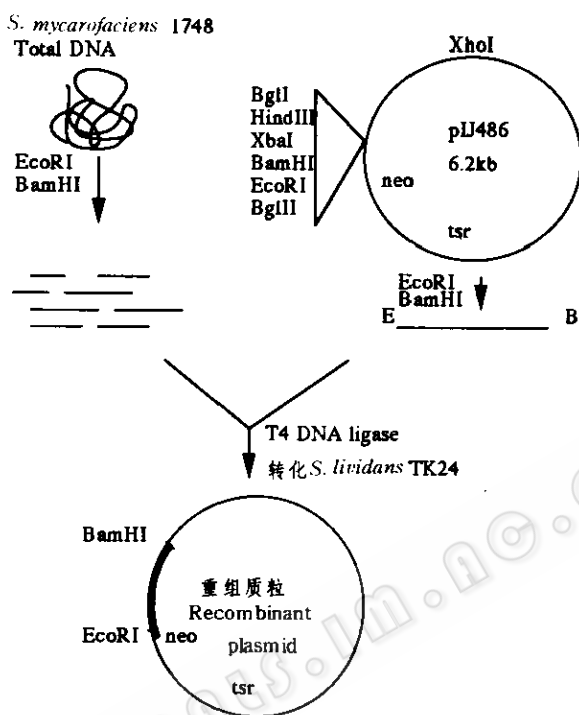


图 1 麦迪霉素产生菌总 DNA 中具启动功能 DNA 片段的克隆

Fig. 1 Cloning of DNA fragments containing promoter activity from *S. mycarofaciens* 1748

## 2.2 p4EB363 限制性内切酶酶切分析

用六种限制性内切酶分别单酶切,并以 **XbaI** 和 **EcoRI**, **BamHI** 和 **EcoR** 双酶切 p4EB363。酶切电泳结果见表 1。酶切分析结果表明,重组质粒 p4EB363 分子大小为 8.5kb,插入片段大小为 2.3kg,并含有两个 **BamHI** 位点和一个 **HindIII** 位点。其中有一个 **BamHI** 位点,经亚克隆,并用 **SphI** 酶切才确定其位点(从略)。绘制了重组质粒 p4EB363 的限制酶酶切图谱(图 2)。

## 2.3 重组质粒插入片段启动功能的分析

**2.3.1** 将 p4EB363 经 **HindIII** 酶切后的大片段自身环化,转化 *S. lividans* TK24 原生质体,转化子对 **Km** 没有表现出抗性,从而排除了 **EcoRI** (4)-**HindIII** (5) 220bp DNA 片段上具启动功能的可能性。

**2.3.2** **HindIII** (11)-**HindIII** (5) 2.08kb 片段启动功能的分析:将 **HindIII** (11)-**HindIII** (5) 2.08 kb DNA 片段克隆到不含 **Km** 抗性基因的质粒载体 pWHM3 的 **HindIII** 位点上,得到 DNA 片段插入方向相反的两种重组 pCH2-1 和 pCH2-2(图 3)。将 pCH2-1 和 pCH2-2 分别转化 *S. lividans* TK24,并测定 **Thio** 抗性转化子的 **Km** 抗性水平,发现对 **Km** 没

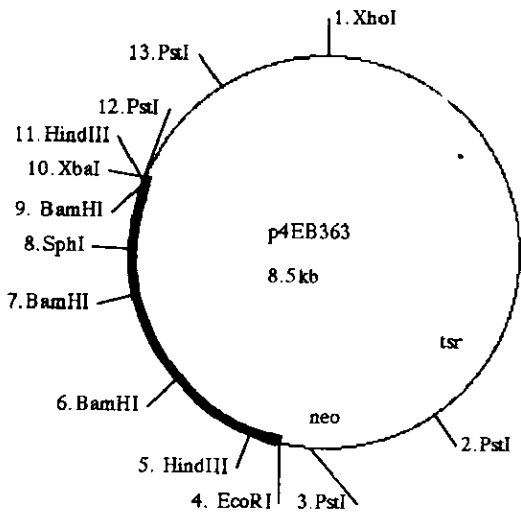


图 2 质粒 p4EB363 限制酶切图

Fig. 2 Restriction endonuclease map of plasmid p4EB363 Position of restriction sites in kb

1. 0.00; 2. 3.43; 3. 4.35;  
4. 4.56; 5. 4.78; 6. 5.40;  
7. 6.07; 8. 6.41; 9, 10, 11, 12. 6.86;  
13. 7.71.

有抗性,说明 HindIII (11) -HindIII (5) DNA 片段中,本身不含 Km 抗性基因。而在质粒 pIJ486 中 (p4EB363) 所表现的 Km 抗性,确实是由于 DNA 插入片段含有对指示基因 (neo) 的启动功能。

表 1 重组质粒 p4EB363 经酶切后所得片段数及分子量

Table 1 Number and Molecular sizes of plasmid p4EB363 DNA fragments after enzyme digestion

限制性内切酶 Restriction enzymes	片段数 Number of fragments	分子量 Molecular weight (kb)
EcoRI	1	8.5
XhoI	1	8.5
XbaI	1	8.5
HindIII	2	6.4, 2.1
PstI	4	4.1, 2.5, 0.95, 0.95
BamHI	3	7.03, 0.79, 0.67
EcoRI-XbaI	2	6.2, 2.3
EcoRI-BamHI	4	6.2, 0.84, 0.79, 0.67

2.3.3 为了测定插入片段上启动功能的方向,将该片段分别克隆到 pIJ486 和 pIJ487 的 XbaI 和 EcoRI 双酶切位点上,得到重组质粒 p46HX 和 p47HX (图 3)。抗性测定结果为,全有 p46HX 的 *S. lividans* TK24 抗 Km 的浓度为 3mg/ml,而含有 p47HX 的 *S. lividans* Tk24 抗 Km 的浓度则高达 20mg/ml,是只含载体 pIJ486 的 *S. lividans* TK24 对 Km 的抗性 (<100μg/ml) 的 200 多倍。表明 2.08kb DNA 插入片段在两个方向上都有启动能力,但强度明显不同。其中 XbaI (10) -HindIII (5) 方向的 (在 p47HX 上) 启动能力远大于 HindIII (5) -XbaI (10) 方向的 (在 p46HX 上) 启动能力。

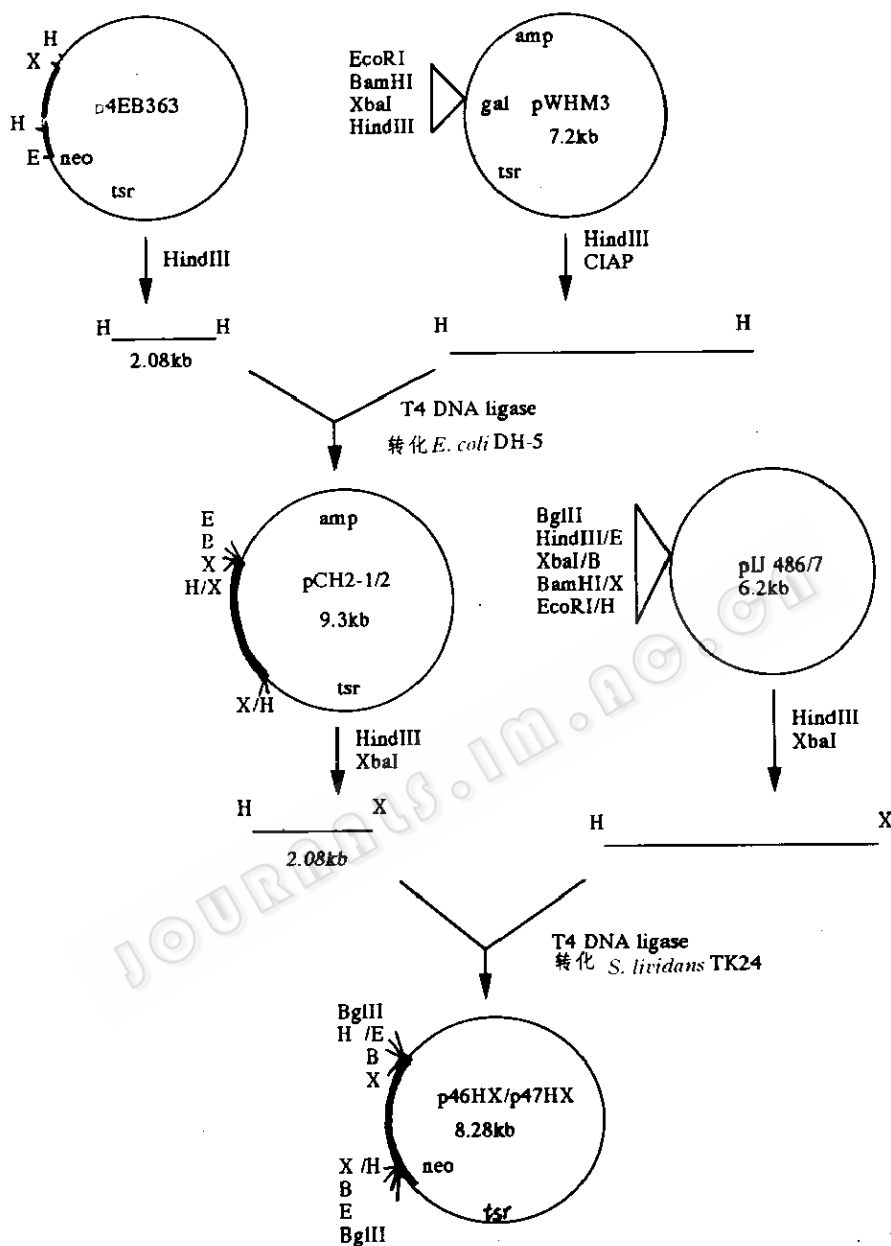


图 3 质粒 pCH2-1/2 和 p46HX/p47HX 的构建

Fig. 3 Construction of plasmids pCH2-1/2 and p46HX/p47HX

2.3.4 为进一步了解 2.08kb 插入片段上启动功能的分布情况, 将 2.08kb DNA 片段的三个小片段 A-0.79kb BamHI (7) -BamHI (9); B-0.67kb BamHI (6) -BamHI (7); C-0.62kb BamHI (6) -BamHI/HindIII (5) (图 2) 分别克隆到 pIJ486/7 的 HindIII 和 EcoRI 双酶切位点上 (先克隆到质粒 pWHM3) 上, 获得 EcoRI 和 HindIII 酶切位点, 得到重组质粒 p46B、p47A、p47B 和 p47C。对含这些质粒的 *S. lividans* TK24 进行的 Km 抗性测定结果, 列于表 2。只有含 p47A 的 *S. lividans* TK24 能够抗 Km 浓度高达 20mg/ml。

因此我们推测在 A-0.79kb DNA 片段上具有与 2.08kb 片段相当的较强的启动功能,在 A 片段上可能集中着较强的启动功能区。p46B 和 p47B 等均表达不同程度的 Km 抗性,表明这些片段中可能含有具不同启动能力的其他启动子,在链霉菌中启动子串联在一起是常见的<sup>[12]</sup>。未能得到重组质粒 p46A,其原因尚不清楚。

2.4 具有启动功能的 DNA 片段来源的确证

表 2 *S. lividans* TK24 含不同质粒时 Km 抗性测定结果

Table 2 Resistance level to Km of *S. lividans* TK24 containing different plasmids

Km 浓度 μg/ml	50	100	200	500	10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>3</sup>	3×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>4</sup>	1.5×10 <sup>4</sup>	2×10 <sup>4</sup>
<i>S. lividans</i> TK24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pCH2-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pCH2-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pIJ486	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p4EB363	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
p4H2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p46HX	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
p47HX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p46A	ND										
p46B	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
p46C	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
p47A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p47B	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
p47C	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—

+表示生长 Grow well; —表示不生长 No grow; ±表示生长极微弱 Grow weekly; ND 表示没有测 Not detected.

以 HindIII (5)-HindIII (11) 2.08 kb DNA 片段为探针与麦迪霉素产生菌 *S. mycarofaciens* 1748 总 DNA 以非相关的硫霉素产生菌总 DNA *S. lividans* TK24 总 DNA 为阴性对照,质粒 P4EB363 为阳性对照,进行点原位杂交。杂交结果表明 2.08kb DNA 片断与 *S. mycarofaciens* 1748 总 DNA 和 p4EB363 DNA 均有同源性;与 *S. lividans* TK24 总 DNA 及硫酶素产生菌总 DNA 没有同源性(图略)。说明 2.08 kb DNA 插入片段来源于麦迪霉素产生菌。

利用启动子探针质粒载体曾从许多链霉菌不同种中获得具启动功能的 DNA 片段<sup>[12]</sup>,然而像我们所克隆的具如此强启动功能的 DNA 片段(Km 抗性达 20mg/ml 水平)确未见报道。从分子水平上阐明其结构,了解其功能是很有必要的。对 2.08kb DNA 片段核苷酸序列分析工作正在进之中。

参 考 文 献

[ 1 ] Hopwood D A, Bibb M J, Charter K F *et al.* Regulation of gene expression in antibiotic-producing streptomycetes. In: Booth I, Higgins C F eds. Regulation of gene Expression-25 Years on Symp Soc Gen Microbiol. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1986. 251—276.

[ 2 ] 王以光. 生物工程学报, 1989, 5 (4): 261—269.

[ 3 ] 朱学尉, 王以光, 金莲舫, 等. 生物工程学报, 1991, 7 (4): 291—299.

- [4] 王以光, 金莲舫, 金文藻, 等. 生物工程学报, 1992, 8 (1): 1—14.
- [5] Ward J M, Janssen G R, Kieser T *et al.* *Mol Gen Genet*, 1986, 203: 468—478.
- [6] Vara J, Lewandowska-Skarbek M, Wang Yiguang *et al.* *J Bact*, 1989, 171 (11): 5872—5880.
- [7] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor. 1982.
- [8] 唐 莉, 王以光. 生物工程学报, 1989, 5 (4): 270—278.
- [9] 龚利民, 王以光. 生物工程学报, 1986, 2 (2): 24—30.
- [10] Charter K F, Hopwood D A, Kieser T *et al.* Gene cloning in organism other than *E. coli*. In: Hofschneider P H, Goebel W eds. *Curr Topics Microbiol Immunol*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1982. 72—73.
- [11] Hopwood D A, Bibb M J, Charter K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory manual*. Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [12] Janssen G R, Bibb M J, Smith C P *et al.* Isolation and analysis of streptomyces promoters. In: Hegemon G, Hershberger C I. *Microbiology*. eds. Washington: ASM, 1985. 392—396.

## CLONING OF DNA FRAGMENTS CONTAINING PROMOTER ACTIVITY FROM *STREPTO- MYCES MYCAROFACIENS* 1748

Jin Hong Wang Yiguang\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS, TUMC, Beijing 100050)

**Abstract** A DNA fragment containing promoter activity has been cloned from midcamycin producing strain (*S. mycarofaciens* 1748)., using promoter-probe plasmid vector pIJ486. The molecular size of this fragment was 2.3kb as shown by restriction analysis. A HindIII-HindIII 2.08KB DNA fragment obtained from the original fragment has been analysed by subcloning it into polylinker of vector pIJ486/7 which have opposite direction. The result showed that HindIII-HindIII 2.08kb DNA fragment has promoter activity in both direction. Transformants of plasmid containing this fragment in vector pIJ487 in *S. lividans* TK24 were resistant to Km in the level of 20mg/ml, but in vector pIJ 486 were resistant to the level of 3mg/ml. It indicated that a rather strong promoter activity region was in the HindIII/XbaI-HindIII direction. BamHI fragments (A-0.79kb, B-0.67kb, C-0.62kb) in 2.08kb DNA fragment have been studied in regards of their promoter activity. The result suggested that A-0.79kb region has the same promoter activity as in HindIII-HindIII 2.08kb DNA fragment.

**Key words** Streptomyces promoter, Promoter-probe plasmid vector, Midcamycin producing strain

\* Correspondent author