

变铅青链霉菌启动子活性片段的亚克隆及其顺序分析^{*}

蒋 红^{**} 董可宁 还连栋

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

近年来,由于链霉菌启动子探测质粒的构建以及体外克隆技术的迅速发展,使得许多链霉菌启动子得到分离分析。已发现的链霉菌启动子大致可以分为三类:一、与原核生物典型启动子-10区和-35区类似的链霉菌启动子^[1,2];二、仅与原核生物典型启动子-10区相似的启动子^[3];三、无论在-10区还是在-35区与典型的原核生物的启动子都没有任何相似之处的启动子^[3]。链霉菌启动子的多样性还表现在-10区与-35区保守序列的间隔长短差异较大,从7bp^[3]到24bp^[4]长短不一。链霉菌中还常存在着串联的启动子^[2,3,5,6]。总之,链霉菌启动子比一般原核生物启动子具有更加复杂的多样性。对链霉菌启动子的深入研究有助于揭示链霉菌复杂的初级代谢和次生代谢的调控机制。

本实验室曾用链霉菌启动子探测质粒 pIJ486 在变铅青链霉菌 TK54 中克隆到一个具有强启动子活性的 2.1kb 片段,重组质粒命名为 pMG50-25^[7]。在此基础上,我们用另一个链霉菌启动子探测质粒 pIJ4083 对 2.1kb 的活性片段进行了亚克隆,测定了亚克隆片段的碱基顺序,并对其进行分析。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

变铅青链霉菌 TK54(pMG50-25)及天蓝色链霉菌 J1501(pIJ4083)由本组保藏。变铅青链霉菌 TK54 由 D. A. Hopwood 教授惠赠。顺序测定用菌株由本研究室沈天翔同志赠送。

1.2 试剂及培养基

限制性内切酶 BamHI、EcoRI、XbaI、Sau3A 为华美公司产品。CIAP、Bg1 I、T4DNA 连接酶为 Boehringer-Mannheim 产品,低熔点凝胶为 Sigma 产品,IPTG 和 X-gal 均为 BRL 产品,溶菌酶是中国科学院上海生物化学研究所产品,硫链丝菌素(Thiostrepton,以下简称 Thio)为 Squibb 公司惠赠。YEME 培养基、R2YE 培养基见文献 [8]。M9 培养基及 2×TY 液体培养基见文献 [9]。

1.3 DNA 的酶切与连接

酶切反应条件按产品说明书进行,酶切反应时间为 1.5—2 小时。连接反应在 16℃ 保温 12 小时以上。

1.4 转染与转化

1.4.1 *E. coli* JM109 的转染按照 Boehringer-Mannheim 公司产品说明进行。在含 X-gal 和 IPTG 的 H 培养基上选白色菌落。

1.4.2 链霉菌 TK54 的转化根据文献 [6] 所述方法进行,原生质体在 R2YE 培养基上再生 16—20 小时后,用含 3ml Thio (500μg/ml) 的 R2YE 软琼脂覆盖。筛选硫链丝菌素抗性的转化子。

1.5 DNA 杂交

用 Bg1 I 完全酶切 pMG50-25,纯化回收 2.1kb 启动子活性片段作为探针,使用 Boehringer-

* 国家自然科学基金会资助课题。

** 现在北京大学生命科学中心。

本文于 1993 年 7 月 5 日收到。

2.3. 启动子活性片段的碱基顺序分析

用 EcoRI-Xba I 双酶切 pJH1, 电泳回收 220bp 的亚克隆片段, 插入 M13mp19 中并对插入的 220bp EcoRI-XbaI 片段进行碱基顺序分析结果见图 1。

将碱基顺序分析结果与已发表的链霉菌的启动子的顺序相比较, 有 P1、P2 和 P3 三个可能的启动子结构区域, 在启动子序列下游处, 发现了一个很典型的 RBS 位点 GAGGAAGA, 而且在其后又找到了可能的起始密码子 ATG。由于链霉菌基因组 G+C 的百分比比较高, 起始密码子 GTG 比 ATG 更常见。该序列中有两个 GTG 也有可能是起始密码子, 但是尚需要通过以后的 SI 核酸酶定位及体外转录实验才能最后确定启动子区域及转录起始点。启动子所调控的结构基因也需通过碱基顺序分析才能探明。

致谢 薛禹谷研究员和谭华荣博士对本研究给予了许多热情支持和帮助, 在此深表感谢。

参 考 文 献

- [1] Bibb M J, Janssen G R, Ward J M. *Gene*, 1985, **38**: 215—216.
- [2] Smith C P. Ph. D thesis, University of East Anglia, Norwich, England. 1985.
- [3] Jassen G R, Bibb M J, Smith M J *et al.* Isolation and analysis of streptomyces promoters. In: Leive L. ed. Microbiology-1985. Washington D. C.: American Society for Microbiology, 1985. 392—396.
- [4] Brawner M, Ingram C, Fornwal D *et al.* Structure of the streptomyces galactose operon's catabolite controlled promoter. In: Okami Y *et al* ed. Biology of Actinomycetes '88. Tokyo: Scientific Societies Press, 1988. 35—40.
- [5] Buttner M J, Fearnley I M, Bibb M J. *Mol Gen Genet*, 1987, **209**: 101—109.
- [6] Deng Z, Kiesser T, Hopwood D A. *Gene*, 1986, **43**: 295—300.
- [7] 还连栋, 董可宁, 庄增辉, 等. 遗传学报, 1991, **18** (1): 82—89.
- [8] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual. Norwich England: John Innes Foundation, Printed by F. Crowe & Sons Ltd, 1985. 85—92, 107—114, 236.
- [9] Maniatis T, Fritsh E F, Sambrook J. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 440.

SUBCLONING AND SEQUENCING OF PROMOTER ACTIVE DNA FRAGMENT FROM *STREPTOMYCES LIVIDANS*

Jiang Hong Dong Kening Huan Liandong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Radom subfragments with strong promoter activities were isolated from 2. 1 kb fragment of pMG50-25 using a promoter-probe vector pIJ4083. One of the promoter-active region was narrowed down to a 220bp sequence. Putative promoter regions, SD sequence and start codons were found.

Key words *Streptomyces lividans*, Promoter, Subcloning, Sequencing