

# 变铅青链霉菌启动子活性片段的亚克隆及其顺序分析<sup>\*</sup>

蒋 红<sup>\*\*</sup> 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<sup>[1,2]</sup>;二、仅与原核生物典型启动子-10区相似的启动子<sup>[3]</sup>;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<sup>[3]</sup>。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<sup>[3]</sup>到24bp<sup>[4]</sup>长短不一。链霉菌中还常存在着串联的启动子<sup>[2,3,5,6]</sup>。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<sup>[7]</sup>。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、Bg1I、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Bg1I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。

Mannheim 公司的 DIG 标记和检测试剂盒, 标记 2.1kb 片段并对亚克隆重组质粒 pJH1 等进行 DNA 同源性分析。

### 1.6 DNA 序列分析

DNA 序列分析反应按美国 Applied Biosystems 公司的试剂盒的说明进行, 反应产物在 Applied Biosystems 公司 ABI-370 型测序仪上测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 启动子活性片段的亚克隆

亚克隆使用的载体为启动子探测质粒 pIJ4083, 载体上的儿茶酚加氧酶结构基因 (Xy1E) 为报告基因, 当 Xy1E 基因前插入一个具有启动子功能的 DNA 片段时, Xy1E 基因得到表达, 使无色的儿茶酚转变成黄色产物, 容易检测。载体上还具有完整的硫链丝菌素抗性基因 (tsr)。用碱性溶菌法提取质粒载体 pIJ4083<sup>[8]</sup>, 并用低熔点琼脂糖回收纯化, BamHI 酶切, 然后用 CIAP 脱磷, 同时提取质粒 pMG50-25, 并用 Bgl I 完全酶切, 回收纯化 2.1kb 启动子活性片段, 然后用 Sau 3A 部分酶切, 载体与外源片段以 1:3 混合, T4 DNA 连接酶连接, 转化变铅青链霉菌 TK54 的原生质体。经硫链丝菌素抗性初筛, 儿茶酚加氧酶基因 (xy1E) 的表达作复筛, 得到 32 个亚克隆转化子。根据加氧酶基因表达的黄色反应强弱可以定性检测启动子活性的强弱, 从中选取 5 株启动子活性最强的转化子。

提取转化子中的重组质粒 pJH1、pJH6、pJH15、pJH17、pJH41、pJH42、pJH86, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明确有外源片段的插入。提取重组质粒 pJH1 做进一步分析。

以 EcoRI-Xba I 双酶切 pJH1 质粒, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测载体和外源插入序列的区带。比较已知的分子量标记可估计插入的外源片段约为 220bp 左右。

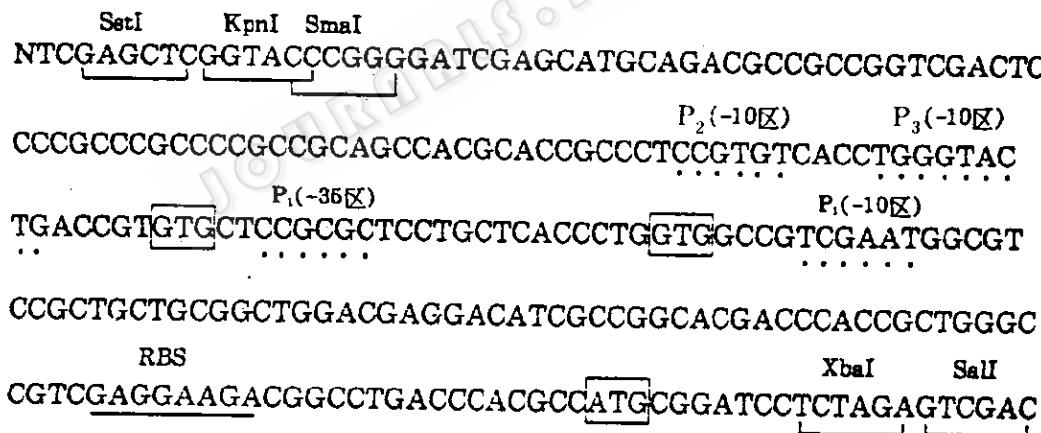


图 1 pJH1 中含有启动子活性片段的 DNA 序列

Fig. 1 DNA sequence of promoter active fragment in pJH1

下方标有“.”的碱基序列表示可能的启动子功能区; “□”表示可能的起始密码子;  
“—”表示可能的 SD 序列 (RBS); 另外图中还标出一些限制性内切酶位点。

### 2.2 DNA 杂交

用材料和方法中所述 DNA 杂交方法进行亚克隆片段的同源性分析, DNA 杂交结果显示, 2.1kb 启动子活性片段对载体 pIJ4083 及 M13mp19 没有可察觉的杂交区带, 而对重组质粒 pJH1 有明显杂交区带。说明 pJH1 的插入序列确实来自 pMG50-25 的 2.1kb Bgl I 片段。

### 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] Jasson 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, Fritsch 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** Random 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