

棒杆菌启动子片段的酶谱分析及定位

蒯 军* 颜望明

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘 要 用大肠杆菌启动子探测质粒 pSDS I (Ap^r, Tc^r) 从钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) 6282 染色体的 Hind III 酶切片段中, 克隆到两个具有启动功能的 DNA 片段, 分别将两个重组质粒命名为 pSDB5 和 pSDB21。含有这两个质粒的菌株均可以在含 300 μg/ml Tc 的平板上生长。通过酶切分析, pSDB5 的插入片段为 1.6 kb, pSDB21 的插入片段为 3.4 kb, 并分别作出了它们的限制性酶切图谱。对 pSDB21 利用其 EcoR I 和 Bgl II 位点, 通过亚克隆删除了与启动功能无关片段, 构建成 pSDB210 和 pSDB211, 从而使启动子定位于约 0.1 kb 的 Bgl II / Hind III 外源片段上。分子杂交实验证明所得到的这两个具有启动功能的 DNA 片段确实来源于钝齿棒杆菌 6282 的染色体 DNA。

关键词 棒杆菌, 启动子, 酶谱分析, 定位

棒杆菌是一类主要的氨基酸生产菌, 由于它在工业生产中的重要性, 利用 DNA 重组技术对有价值的生产菌进行改造, 构建高产的氨基酸生产工程菌, 具有重要的理论和实践意义。目前, 国外已经构建了大肠杆菌和棒杆菌之间的具有多种选择标记的穿梭质粒载体, 并建立起高频率的棒杆菌 DNA 转化系统, 利用这些载体和转化系统, 在棒杆菌中成功地克隆到多种氨基酸生物合成中的关键酶基因^[1], 有些已应用于生产。国内, 已有报道对谷氨酸棒杆菌质粒 pXZ10145 的酶切图谱进行了测定, 并与 pBR322 组成嵌合质粒, 同时还将其转化到钝齿棒杆菌 B9 和 T6-13 中^[2, 4]。但由于起步较晚, 这方面的工作才刚刚开始。

基因的表达主要受控于基因的转录, 而启动子在基因转录中起着重要的作用, 因此, 在棒杆菌中筛选合适的、具有强启动功能的启动子, 对棒杆菌启动子结构的研究和氨基酸合成中关键酶基因的有效表达, 都具有重要意义。我们利用大肠杆菌启动子探测质粒, 成功地从钝齿棒杆菌 T6-13 衍生株 6282 染色体上克隆到两个具有启动功能的 DNA 片段, 并通过亚克隆, 将其中一个的启动子活性片段定位于 0.12 kb 的 Bgl II / Hind III 片段上, 为进一步研究启动子结构和目的基因表达打下了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株: 钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) 6282 和大肠杆菌 (*Escherichia*

* 现在农业部动物检疫所, 青岛 266032。

本文于 1993 年 8 月 28 日收到。

coli) ED8654, 均由本室保存。

1.1.2 质粒: pSDS I (Ap^r, Tc^r, 5.6 kb), 本室构建^[5]。

1.2 培养基和培养条件

钝齿棒杆菌用肉汤培养基, 33℃培养; 大肠杆菌用LB培养基, 37℃培养。

1.3 质粒的分离纯化

参照文献^[6]用碱法提取, 经1 mol/L NaCl 超离心纯化。

1.4 染色体的提取

在100ml 液体培养基中培养菌体至对数期, 离心收集菌体, 悬浮于4ml STE 溶液中(20%蔗糖, 50mmol/L Tris·HCl, 50mmol/L EDTA, pH8.0), 加入4mg 溶菌酶, 37℃水浴30分钟。加入10ml 裂解液(10mmol/L Tris·HCl, 0.1mol/L EDTA pH8.0, 0.5% SDS, 20μg/ml RNAase), 37℃保温30分钟。再加入胰蛋白酶(至终浓度100μg/ml) 37℃作用2小时, 并不时旋动。然后加入等体积苯酚, 缓慢颠倒离心管, 直到两相充分混合形成乳浊液。离心, 使两相分开, 上层水相用苯酚/氯仿抽提三次, 移入小烧杯中, 加入1/10体积的3mol/L 乙酸钠(pH5.2)及二倍体积预冷的无水乙醇沉淀DNA, 絮状DNA沉淀用玻璃棒轻轻挑出, 并用70%乙醇洗涤二次, 抽真空, 使乙醇挥发殆尽, 用适量TE溶解。再加入RNAase(至终浓度100μg/ml), 37℃作用30分钟, 加入ProteinaseK(终浓度为100μg/ml) 37℃作用30分钟, 并按上述方法, 用苯酚/氯仿抽提, 用无水乙醇沉淀DNA, 重新溶解于适量TE中, 4℃贮存备用。

1.5 酶切、连接、转化

限制性内切酶和T₄DNA连接酶均购自华美生物工程公司, 并按所提供条件作用。

转化参照Cohen^[7]方法进行。

1.6 DNA检测及分子量测定

0.7%琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲液TAE, 水平式电泳, 电压4—5V/cm, 紫外灯下观察。

分子量测定按照Meyers^[8]方法, 以λ/Hind III酶切片段作标准。

1.7 Southern blot 分子杂交

参照Maniatis T^[6]的方法, 采用缺口平移法, 以Biotin-7-dATP(美国BRL公司产品)标记探针, ABAP法染色。

2 结果

2.1 具有启动功能的DNA片段的克隆

启动子探测质粒pSDS I (Ap^r, Tc^r)是pBR322的衍生物, 其四环素抗性(Tc^r)基因保留有完整的结构基因, 而启动功能区被切除, 代之一不具有启动功能的外源DNA片段。该探测质粒Tc^r结构基因前有一Hind III位点, 若插入含有启动功能的DNA片段, 则Tc^r基因可得到表达, 利用这一特性来筛选棒杆菌染色体上具有启动功能的DNA片段。

6282染色体经Hind III完全酶切, 与Hind III酶切的pSDS I连接, 转化大肠杆菌ED8654感受态细胞, 在含有氨苄青霉素和四环素的平板上筛选转化子(图1), 共得到624个转化子。这些转化子中有4个可以在含240μg/ml Tc的平板上生长, 表现了较强抗性。

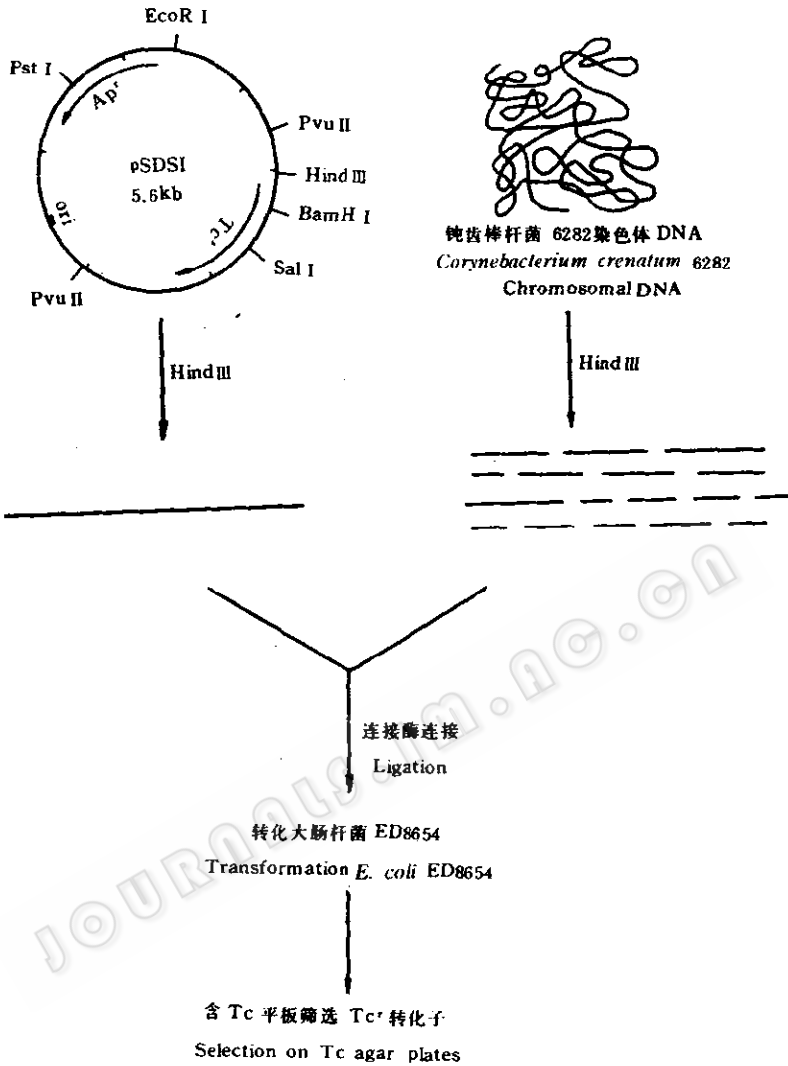


图1 利用 pSDS I 克隆具有启动功能的钝齿棒杆菌染色体 DNA 片段

Fig.1 Cloning of promoter functional fragments in pSDS1 from chromosomal DNA of *Corynebacterium crenatum*

提取质粒，经 Hind III 酶切，发现它们均含有外源 DNA。其中 2 个可以在含 300 μg/ml Tc 的平板上生长，分别将这两个质粒命名为 pSDB5 和 pSDB21。

2.2 重组质粒 pSDB5 和 pSDB21 限制性酶切图谱

对 pSDB5 进行 Hind III、Pst I、Pvu I、EcoR I、BamH I、Sal I、Xho I 单酶切和 Xho I + EcoR I 双酶切，酶切片段电泳图见图 2，分子量大小见表 1。根据酶切分析结果，可以计算出外源片段上各限制性内切酶的位点，并作出 pSDB5 的酶切图谱（图 3）。

由 pSDB5 的酶切图谱可知，其外源片段为 1.6 kb，其上含有 1 个 Pst I 位点，1 个 Xho I 位点，和 2 个 Pvu I 位点。

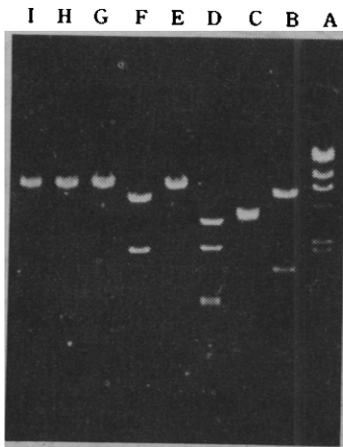


图 2 pSDB5 酶切电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic patterns of pSDB5

- A. λ /Hind III;
- B. pSDB5/Hind III;
- C. pSDB5/Pst I;
- D. pSDB5/Pvu I;
- E. pSDB5/Xho I;
- F. pSDB5/Xho I/EcoRI;
- G. pSDB5/EcoRI;
- H. pSDB5/BamHI;
- I. pSDB5/Sal I.

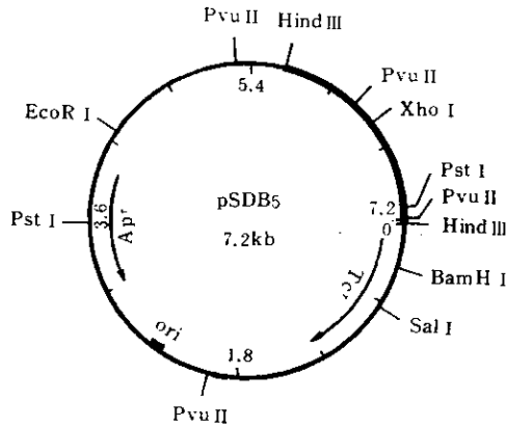


图 3 pSDB5 酶切图谱

Fig. 3 Restriction endonuclease map of pSDB5

表 1 重组质粒 pSDB5 的酶切片段分子量

Table 1 Molecular weights of recombinant plasmid pSDB5 restriction fragments

限制性内切酶 Restriction endonuclease	位点数 Number of site	分子量 (kb) Molecular weight
Hind III	2	5.6, 1.6
Pst I	2	3.7, 3.5
Pvu I	4	3.2, 2.1, 1.0, 0.9
Xho I	1	7.2
EcoRI	1	7.2
BamHI	1	7.2
Sal I	1	7.2
Xho I + EcoRI	2	5.2, 2.0

对 pSDB21 进行 Hind III、Pst I、BamHI、Sal I、Bgl I、EcoRI、Pvu I 酶切和 Bgl I + Pst I、Pvu I + Sal I 双酶切，酶切片段大小见表 2，电泳图见图 4。同样根据酶切结果，我们作出 pSDB21 的酶切图谱（图 5）。

表 2 重组质粒 pSDB21 的酶切片段分子量

Table 2 Molecular weights of recombinant plasmid pSDB21 restriction fragments

限制性内切酶 Restriction endonuclease	位点数 Number of site	分子量 (kb) Molecular weight
Hind III	2	5.6, 3.4
Pst I	1	9.0
Sal I	2	8.3, 0.7
BamHI	2	7.4, 1.6
Bgl I	2	6.4, 2.6
EcoRI	3	4.7, 2.15, 2.15
Pvu I	3	3.2, 3.2, 2.6
Bgl I + Pst I	3	3.7, 2.7, 2.6
Pvu I + Sal I	5	3.2, 3.2, 1.4, 0.7, 0.5

由酶切分析可知, pSDB21 的外源插入片段为 3.4kb, 其外源片段上 Pvu I、Sal I、BamH I 位点各具有 1 个, Bgl I、EcoR I 位点各具有 2 个。

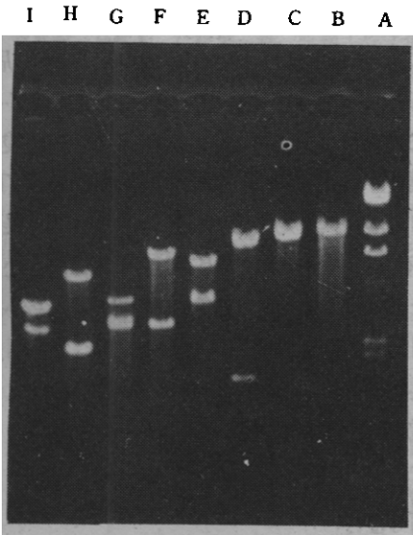


图 4 pSDB21 酶切电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoretic patterns of pSDB21

- A. λ /Hind III;
- B. pSDB 21/Pst I;
- C. pSDB 21/Sal I;
- D. pSDB 21/BamH I;
- E. pSDB 21/Hind III;
- F. pSDB 21/Bgl I;
- G. pSDB 21/Bgl I/Pst I;
- H. pSDB 21/EcoR I;
- I. pSDB 21/Pvu I.

EcoR I + Hind III 酶切分析, 证明该重组质粒确是 pSDB21 经 EcoR I 酶切删除后所得质粒, 将其命名为 pSDB210。pSDB210 同样可以在含 300 μ g/ml Tc 的平板上生长, 这说明 pSDB210 所保留的约 0.4kb 的 EcoR I /Hind III 外源片段上具有完整的启动功能。

为了进一步使启动子定位于更小的区域, 我们构建了另一亚克隆 pSDB211。pSDB21 经 Bgl I 酶切, 去掉 2.6kb 的外源片段, 然后连接, 转化 ED8654, 在 Tc 平板上筛选转化子, 结果也得到一批转化子, 提取质粒, 经酶切分析证明是所构建重组质粒, 命名为 pSDB211。含 pSDB211 的菌株仍可以在含 300 μ g/ml Tc 的平板上生长, 说明 pSDB211 同样含有完整的 Tc^r 基因启动子。因在 pSDB210 中我们已将启动子定位于 0.4kb 的 EcoR I /Hind III 片段上, 而在 pSDB211 中 0.7kb 的 Hind III /Bgl I 外源片段距 Tc^r 结构基因较远, 表现强启动功能的可能性很小, 因此, 我们认为完整的启动子存在于靠近 Tc^r 结构基因的约 0.1kb 的 Bgl I /Hind III 外源片段上。

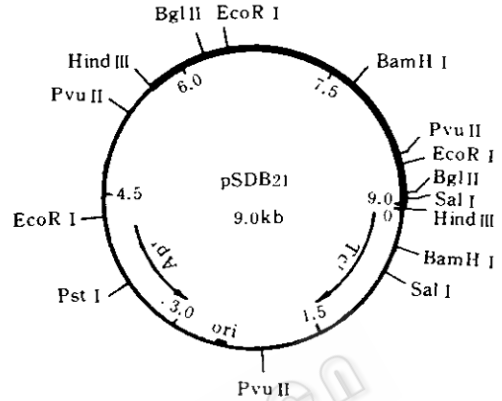


图 5 pSDB21 酶切图谱

Fig. 5 Restriction endonuclease map of pSDB21

2.3 pSDB210 和 pSDB211 的构建及启动子的定位

pSDB21 外源片段上, 靠近 Tc^r 结构基因有一个 EcoR I 位点, 探测质粒 pSDS I 上也有一个 EcoR I 位点, pSDB21 经 EcoR I 酶切, 删去两个 2.15kb 的小片段 (包括 1.3kb 载体 DNA 和 3.0kb 的插入片段), 连接, 转化 ED8654, 结果在含 Tc 平板上得到一批转化子。提取该转化子质粒, 经 EcoR I 和

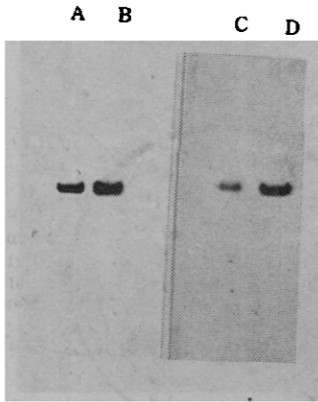


图 6 pSDB5 (左) 和 pSDB21 (右) 分子杂交图

Fig. 6 Hybridization of Hind III-digested chromosomal DNA with Biotin-7-dATP labelled inserted fragment of pSDB5 (left) and pSDB21 (right)

- A. Chromosome 6282/Hind III ;
 B. pSDB5/Hind III ;
 C. Chromosome 6282/Hind III ;
 D. pSDB 21/Hind III .

2.4 Southern blot 分子杂交

为了进一步验证我们所克隆的两个具有启动功能的 DNA 片段来源于钝齿棒杆菌 6282 的染色体, 我们作了 Southern blot 分子杂交实验。染色体 DNA 经 Hind III 酶切后, 酶切片段与 pSDB21 和 pSDB5 的 Hind III 酶切片段分别一起电泳, 然后, 转移到硝酸纤维素膜上, 以缺口平移法经 Biotin-7-dATP 标记的外源片段为探针, 进行杂交, 结果见图 6。在 pSDB5 和 pSDB21 的外源片段处均有一条明显杂交带, 染色体酶切片段在外源片段相应位置处也各有一条杂交带, 证明这两个具有启动功能的外源片段的确实来源于 6282 的染色体 DNA。

3 讨论

启动子在基因转录中起着重要的作用, 对于大肠杆菌启动子结构的研究发现, 其启动子具有两个保守区, “-10”区和“-35”区, 这两个区的保守性以及这两个区之间的距离决定了 RNA 聚合酶对启动子的识别和结合能力, 从而决定了启动基因转录的强弱。关于棒杆菌启动子, 目前研究还比较少, 还没有发现其独特的结构。

Martin 等^[9]曾把从乳酸发酵短杆菌中获得的启动子分为两类, 一类在大肠杆菌和乳酸发酵短杆菌中都具有启动功能, 认为这类启动子具有与大肠杆菌类似的结构, 包括“-10”区和“-35”区以及这两个序列之间的 17bp 的间隔。另一类, 则只在乳酸发酵短杆菌中具有启动功能, 在大肠杆菌中则不表现启动功能, 它们可能不具有与大肠杆菌类似的启动子结构。

我们所得到的这两个 DNA 片段在大肠杆菌中均表现启动子功能, 说明它们可能存在于与大肠杆菌相似的启动子结构。通过亚克隆、pSDB210 和 pSDB211 的构建, 我们将 pSDB21 的启动子定位于 0.1 kb 的 Bgl II/Hind III 外源片段上, 为进一步研究启动子的结构和棒杆菌基因在大肠杆菌中的表达提供了基础。

pSDB210 去掉了 pSDB21 与启动功能无关的 1.3kb 的载体和 3.0kb 的外源片段, 保留了 Ap^r 和 Tc^r 两个选择标记, 在 Tc^r 结构基因前只有一个 Hind III 位点, 是一个很好的基因有效表达的载体。

参 考 文 献

- [1] Martin J F. Molecular Genetics of Amino Acid-Producing *Corynebacteria*. In: *Microbial Products New Approaches*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 25—59.
- [2] 郑兆鑫, 马楚平, 严维耀, 等. 生物工程学报, 1987, 3 (3): 183—187.
- [3] 余 红, 杨 能, 应伟均, 等. 生物工程学报, 1989, 5 (1): 51—56.
- [4] 那淑敏, 沈天翔, 贾盘兴, 等. 生物工程学报, 1991, 7 (4): 312—317.
- [5] 顾望明. 生物工程学报, 1990, 6 (4): 338—340.
- [6] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Cohen S N, Chang A C Y, Hsu L. *Proc Natl Acad Sci*, 1972, 69: 2110.
- [8] Meyers J A, Sanchez D, Elwell L P *et al.* *J Bacteriol*, 1976, 127 (3): 1529—1537.
- [9] Martin J F, Cadenas R F, Malumbres M *et al.* *GIM90*, 1990 (Pt. I.), 283—293.

RESTRICTION MAPS AND ORIENTATION OF PROMOTER FUNCTIONAL FRAGMENTS FROM *CORYNEBACTERIUM*

Kuai Jun Yan Wangming

(Microbiology Institute of Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Two promoter functional fragments have been cloned from the chromosomal DNA of *Corynebacterium crenatum* 6282 using the promoter-probe vector pSDSI (Ap^r , Tc^r , 5.6kb). Two recombinant plasmids which resumed Tc resistance were named pSDB5 and pSDB21. The restriction maps of them have been determined. The strains harboring them all could grow on the plates containing $300\mu\text{g/ml}$ Tc . The inserted fragment of pSDB5 was 1.6kb, and of pSDB21 was 3.4kb. Two subcloned plasmids of pSDB21 were constructed with the aid of *EcoRI* and *Bgl I* sites respectively. By removing the non-promoter functional fragments of pSDB21, its promoter of Tc^r gene was oriented on the 0.1kb *Bgl I* / *Hind III* foreign fragment. Southern blot hybridization showed that both of the two promoter functional fragments were from the chromosomal DNA of *Corynebacterium crenatum* 6282.

Key words *Corynebacterium*, Promoter, Restriction map, Orientation.