

棒杆菌质粒 pXZ10145 复制功能区定位*

沈天翔 那淑敏 肖文中 贾盘兴

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 将棒杆菌质粒 pXZ10145 或 pNAT65 的不同酶切片段装入大肠杆菌质粒 pACYC177 中构建了 pTSK 系列重组质粒。转化棒状类细菌的实验结果确定了质粒 pXZ10145 上复制必需区的位置。质粒 pXZ10145 复制最小必需区定位在 *NaeI*-*NruI* 的 1.2kb 片段上,在这个片段上只有一个约 940 碱基的阅读框架。它编码一个质粒复制因子,以对位作用方式协助那些不能自我复制但复制起始区仍保持完整的 pTSK 质粒在棒状类细菌中复制。质粒 pXZ10145 复制起始区在一个 *NaeI*-*SalI* 的 0.3kb 片段上,位于已确定的复制因子编码框架中。

关键词 棒状类细菌,质粒,复制功能区

非致病性棒状类细菌(Coryneform bacteria)是目前氨基酸生产中应用最为广泛的菌种^[1]。近年来,研究人员开展了棒状类细菌的分子生物学研究,如构建新的载体、克隆氨基酸合成途径关键酶的基因等^[2],试图以基因工程手段来加强氨基酸生产菌种的选育。

棒杆菌天然质粒的筛选鉴定工作已进行了多年,其中一些已构建成棒状类细菌质粒载体^[2],但对这些质粒基本性质的研究尚不充分。Filpula 和 Archer 分别报道了 pBL1 和 pSR1 的核苷酸全序列^[3,4],而 3.0kb 的谷氨酸棒杆菌 pCG-100 复制必需区和复制起始区得到了定位^[5]。

质粒 pXZ10145 是上海工业微生物研究所雷肇祖等人于 1981 年报道的一种棒杆菌质粒^[6],它具有分子量小、多个限制内切酶单切点、以及带氯霉素抗性基因等特点^[7],是用来构建棒状类细菌质粒载体的良好出发株。本实验室已完成了该质粒 DNA 全序列的测定^[8]。本工作则对质粒复制必需区和复制起始区进行定位,为利用该质粒构建新的、功能良好的载体系统奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

谷氨酸棒杆菌 1014-6T 带有质粒 pXZ10145^[9],钝齿棒杆菌 B9 作为棒杆菌转化受体菌;大肠杆菌转化受体菌是 JM109(*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96rcIA1 thiΔ* (*lac-proAB*) *F'* [*traD36 proAB⁺ lacI^qlacZΔM15*]),还用于大肠杆菌质粒提取。

* 国家自然科学基金及中国科学院院重点项目。

本文于 1995 年 2 月 16 日收到。

质粒 pXZ10145 可赋予宿主以氯霉素抗性; pNAT65 是本实验室在做 pXZ10145 转化钝齿棒杆菌 T6-13 时, 从转化子中筛选到的 pXZ10145 的缺失突变体^[10]。pXZ10145 或 pNAT65 的酶切 DNA 片段被克隆到大肠杆菌载体 pACYC177 及它的衍生物 pSWY901 中(与 pACYC177 相比, pSWY901 增加了 EcoRI 切点)。构建出的重组质粒命名为 pTSK 系列。大肠杆菌质粒 pUC19 也用于 pXZ10145 某些 DNA 片段的克隆。

1.2 培养基和培养条件

棒杆菌和大肠杆菌均采用 LB 培养基培养, 大肠杆菌培养温度是 37℃, 棒杆菌则在 30℃ 进行培养。在菌体培养和转化筛选当中, 抗菌素施用浓度分别为: 氨苄青霉素 50~100 μg/ml, 卡那霉素 20 μg/ml, 氯霉素 20 μg/ml。

1.3 DNA 操作

大肠杆菌质粒采用 Birnbiom 和 Doly 的碱裂解法提取^[11], 并用 PEG 沉淀去除 RNA。棒杆菌质粒的提取则用改进的碱法操作^[8]。以氯化铯梯度超离心进行纯化^[12]。分子量不同的质粒再用蔗糖梯度离心进行分离, 铺制 5%、10%、15% 和 20% 四种浓度的蔗糖溶液梯度, SW28 转头 20 000r/min, 20℃, 18h。限制内切酶、T4 连接酶等工具酶的使用按制造商说明操作。琼脂糖凝胶电泳 (0.6%, TAE 缓冲液) 用于检查质粒提取及各种 DNA 体外操作的效果。

1.4 质粒 DNA 转化

大肠杆菌感受态细胞是以普通氯化钙处理制备^[12]。棒杆菌质粒 DNA 转化用电击法 (High Voltage Electroporation), 菌体在含 4% 甘氨酸的 LB 培养基中培养, 细胞制备过程和转化参考文献[13]。

2 结果和讨论

2.1 确定质粒 pXZ10145 复制最小必需区

大肠杆菌 pACYC177 上带有转座子 Tn903 的卡那霉素抗性基因, 可在棒状类细菌中用作筛选标记^[5]。将质粒 pXZ10145 的 DNA 片段装入载体 pACYC177 (或它的衍生物 pSWY901 中), 通过筛选棒杆菌的卡那霉素抗性转化子, 确定某一克隆片段是否带有能够在棒状类细菌中启动质粒复制的区域。

BamHI 和 PstI 分别单酶切的 pXZ10145 DNA 插入载体 pACYC177 的相应位点中, 构建出重组质粒 pTSKBH 和 pTSKP, 这两个重组质粒转化棒杆菌 10147 或 B9 均可以得到卡那霉素转化子。由棒杆菌转化子中提取的质粒酶切检查没有发现任何结构变化, 这说明 BamHI 及 PstI 不在质粒复制必需区中 (图 1)。

pTSK11、pTSK07、pTSK01 和 pTSK04 中分别带有 pXZ10145 的 BamHI-PstI (4.5kb)、BamHI-ScaI (3.5kb)、BamHI-EcoRI (3.0kb) 和 BamHI-XbaI (2.6kb) 片段 (图 1), 这四个 pXZ10145 片段缺失衍生质粒均可以在棒杆菌中自我复制 (筛选到卡那霉素抗性转化子)。由此推断 pXZ10145 上 BamHI-PstI-XbaI 一段 2.3kb 片段与复制无关。另外, 重组质粒 pTSK02、pTSK05、pTSK09、pTSK10、pTSK12 和 pTSK13 转化棒杆菌不能得到卡那霉素抗性转化子。综合上述实验结果可推断质粒 pXZ10145 复制区定位在 BamHI 至 XbaI 的 2.6kb 片段上。

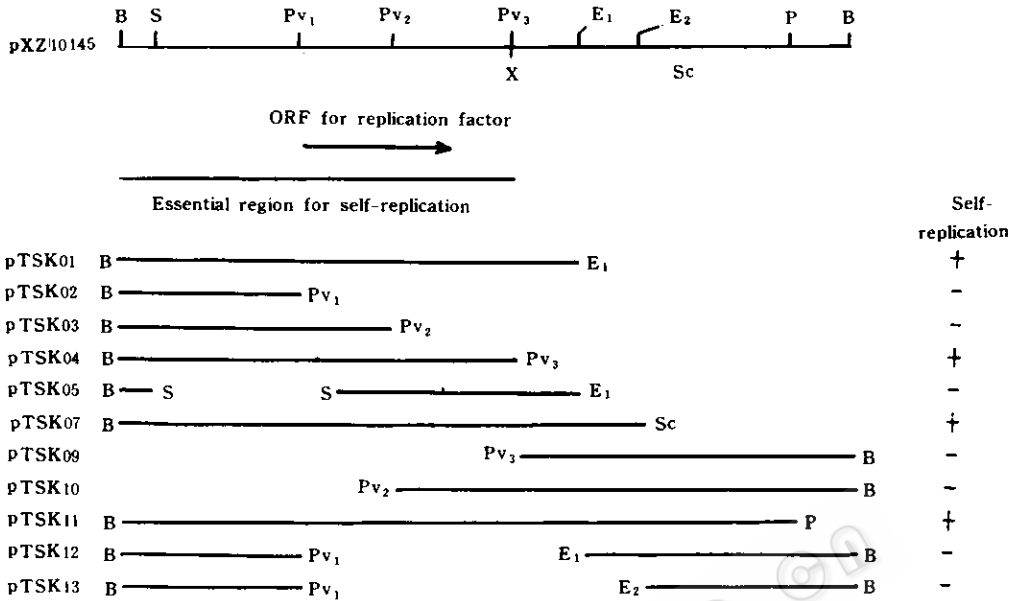


图1 质粒 pXZ10145 复制必需区定位

pTSK 系列质粒中克隆的 pXZ10145DNA 片段均标于图中。

Fig.1 Essential region for self-replication of plasmid pXZ10145

The DNA fragments cloned in the pTSK series were shown.

B: BamHI, E: EcoRI, P: PstI Pv: PvuII, S: Sall, Sc: ScaI, X: XbaI.

pXZ10145 自发缺失突变体 pNAT65 与已确定的 2.6kb BamHI-XbaI 片段有很大重叠部分,它可以自我复制。为进一步缩小含复制必需区的区域,我们以 pNAT65 出发构建一系列重组质粒。重组质粒 pTSK21、pTSK24、pTSK26、pTSK28 和 pTSK29 分别带有单酶切的 pNAT65 片段(图 2),它们转化棒杆菌能够得到卡那霉素抗性转化子,说明这些切点在质粒复制必需区之外。而 NruI、Sall 和 BstEII 酶切片段(pTSK22, pTSK25, pTSK27)不能启动重组质粒在棒杆菌中的自我复制。这样可将复制区压缩在 NaeI-NruI 的 1.2kb 片段上。对这个片段的任何破坏,如在 pTSK22、pTSK25、pTSK27 中的克隆片段,都将损伤复制区导致重组质粒不能在棒杆菌中复制。另外,pTSK02 等(图 1)之所以转化棒杆菌没有获得卡那霉素抗性转化子,也是由于复制区被破坏。

NaeI-NruI 的 1.2kb 复制必需区内存在唯一的阅读框架,大约为 940 个碱基。编码区的 5' 端距已确定的复制必需区一端只有 100 个碱基。这个阅读框架可能编码一个复制必需因子,在其中任何位置的破坏都导致自我复制能力的丧失。

2.2 质粒 pXZ10145 复制起始区(oriV)的定位

pTSK22、pTSK25、pTSK27 以及 pTSK03 尽管不能在棒状类细菌中自我复制,但将它们分别转化到含 pXZ10145 的棒杆菌 10147 或 B9 时可以筛选到卡那霉素抗性转化子,提取其中的质粒做酶切检查,发现除宿主中原含有的 pXZ10145 外,另外一个恰好就是转化时所用的重组质粒。这表明在这些重组质粒中,克隆的 pXZ10145 或 pNAT65 片

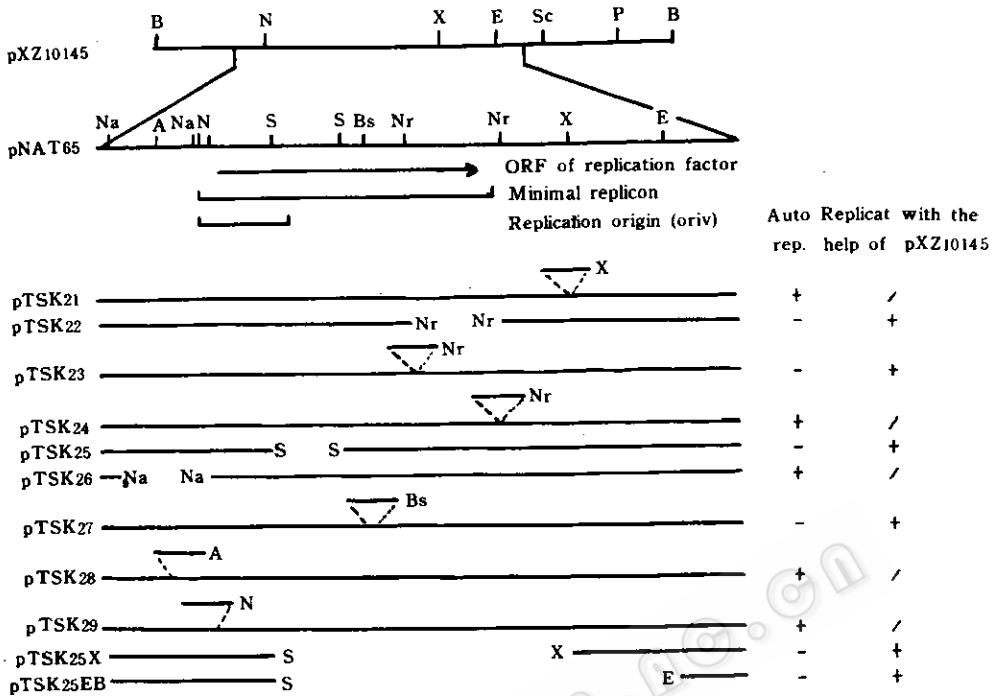


图2 质粒 pXZ10145 复制最小必需区以及复制起始区定位
pTSK 系列质粒中克隆的 pNAT65DNA 片段均标于图中。

Fig.2 Determination of minimal replicon and replicatoin origin of pXZ10145

The DNA fargment of pNAT65 in reccombinant plasmids pTSK series were shown in the figure.

A: ApaLI, B: BamHI, Bs: BstEII, E: EcoRI, N: NaeI, Na: NarI, Nr: Nrul, P:PstI, S: SalI, Sc: ScaI, X: XbaI.

段上复制必需区虽已被破坏,但复制起始区尚保持完整,在 pXZ10145 的帮助下能够复制。这也说明 pXZ10145 编码有对位作用方式(trans-acting)的复制因子,即由复制必需区中的阅读框架编码。

由 pTSK25 衍生出来的 pTSK25EB 和 pTSK25X 转化含 pXZ10145 的棒杆菌 B9 也可以得到卡那霉素抗性转化子,这便将含复制起始区(oriV)的 DNA 片段进一步缩小,结合已确定复制必需区的范围,我们将复制起始区(oriV)定在 NaeI-SalI 的 0.3kb 片段上。

参 考 文 献

- [1] Kinoshita S. Glutamic acid bacteria. In: Demain A L *et al*, eds. *Biology of Industrial Microorganisms*. London: Benjamin Cummings, 1985. 115.
- [2] Martin J F. Molecular genetics of amino acid-producing Corynebacteria. In: Baumberg S *et al* eds. *Society for General Microbiology Symposium 44*. Cambridge U K: Cambridge University Press, 1989. 25~29.
- [3] Filpula D, Ally A H, Nagle J. *Nucleic Acid Res*, 1986, 14: 5114.
- [4] Archer J A C, Follettie M T, Sinskey A J. *Biology of Corynebacterium glutamicum: A Molecular Approach*. In: Hershberger C L *et al*. eds. *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*. Washington D C:

ASM, 1989. 27.

- [5] Trautwetter A, Blanco C. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 2093.
- [6] 雷肇祖, 吴菊芬, 王景玉, 等. 工业微生物, 1981, 11(1): 1~4.
- [7] 郑兆鑫, 马楚平, 严维耀, 等. 生物工程学报, 1987, 3(3): 183~188.
- [8] 沈天翔, 贾盘兴, 那淑敏, 等. 生物工程学报, 1993, 9(3): 216~222.
- [9] 余红, 杨能, 应伟均, 等. 生物工程学报, 1989, 5(1): 51~56.
- [10] 那淑敏, 沈天翔, 贾盘兴. 生物工程学报, 1991, 7(4): 312~317.
- [11] Birnboim H C, Doly J. *Nucleic Acid Res*, 1979, 7: 1513.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] 沈天翔, 那淑敏, 贾盘兴, 等. 生物工程学报, 1995, 11(3): 245~249.

ESSENTIAL REGION FOR SELF-REPLICATION OF CORYNEFORM BACTERIA PLASMID pXZ10145

Shen Tianxiang Na Shumin Xiao Wenzhong Jia Panxing

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract A pTSK series of recombinant plasmids were constructed by cloning DNA fragments of pXZ10145 or its deleted derivative pATN65 into plasmid vector pACYC177 of *E. coli*. Experiment results of Coryneform bacteria transformation with these pTSK plasmids allowed us to localize the essential region for self-replication on plasmid pXZ10145. The minimal replication region of the pXZ10145 was located on a 1.2kb NaeI-NruI DNA fragment in which only one open reading frame was found. This ORF was believed to be encoded a trans-acting replication factor. The replication origin (oriV) was located on a 0.3kb NaeI-SalI fragment which was within the ORF region.

Key words Coryneform bacteria, Plasmid, Minimal replicon