

圈卷产色链霉菌 *lon* 基因的克隆及酶切分析*

刘 钢 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

圈卷产色链霉菌是从我国东北土壤中筛选的一株 Nikkomycin 产生菌。在固体基本培养基上具有典型的链霉菌发育分化特征。经诱变得到不产孢子的白色突变株和不能形成气生菌丝的光秃型突变株。部分白色突变株和全部光秃型突变株在形态分化受阻的同时,也失去了产生 Nikkomycin 的能力^[1]。表明在圈卷产色链霉菌中,参与形态分化的基因与抗生素生物合成基因可能密切相关。

lon 基因编码的产物是一种依赖 ATP 的丝氨酸蛋白酶。它存在于很多微生物乃至高等动物中。但在不同的种属中,其作用各异。在 *E. coli* 中,*lon* 基因是热休克基因(heat shock gene)家族的一员,参与粘蛋白的形成,异源蛋白和非正常蛋白的降解,以及调控蛋白的降解等^[2]。在链霉菌中,*lon* 基因可能与天蓝色链霉菌的形态发育和抗生素的生物合成有关^[3]。Southern 杂交显示圈卷产色链霉菌中存在 *lon* 的同源基因。*lon* 基因对圈卷产色链霉菌发育分化调控可能有重要作用,也可能与圈卷产色链霉菌的形态分化和 Nikkomycin 的生物合成有关。本文以天蓝色链霉菌 *lon* 基因的部分结构基因为探针,在构建的菌落文库中,通过点杂交和 Southern 杂交从圈卷产色链霉菌中克隆到一个含有完整 *lon* 基因的 4.6kb 的 DNA 片段,并对该片段进行了 *lon* 基因的基本定位和酶切图谱分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109、圈卷产色链霉菌(*Streptomyces ansochromogenes*)以及质粒载体 Bluescript M13⁻和 Bluescript M13⁺::P_{T14}均由本室保存。

1.2 培养基

大肠杆菌用 LB 培养基,按文献[4]方法配制。链霉菌液体生长培养基(YEME)按文献[5]配制。

1.3 酶、抗生素

所用限制性内切酶以及 T4DNA 连接酶为华美工程公司产品。所用抗生素浓度及使用均按文献[5]方法进行。

1.4 非同位素试剂盒

用于 DNA 探针标记的非同位素地高辛(Digoxigenin-11-dUTP)购于德国 Boehringer 公司。

1.5 质粒 DNA 和总 DNA 的提取

按文献[5]方法进行。

1.6 大肠杆菌感受态细胞的配制及转化

按文献[4]方法进行。

* 中国科学院“九五”重点项目基金资助。

本文于1997年4月14日收到。

1.7 DNA 点杂交和 Southern 杂交

按文献 [5] 方法进行。

2 结果和讨论

2.1 文库的构建

用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切 M13⁺:P_{TH} 重组质粒, 经琼脂糖凝胶电泳分离并用 DEAE 膜回收约 0.4kb

的含有部分天蓝色链霉菌 *lon* 基因的 DNA 片段, 用非放射性同位素地高辛进行标记, 制备成 DNA 探针。

用多种限制性内切酶酶切圈卷产色链霉菌的总 DNA, 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后转移到尼龙膜上, 用制备的探针进行 Southern 杂交, 结果见图 1。构建文库时选用 *Pst* I 酶切圈卷产色链霉菌总 DNA, 并用 DEAE 膜回收 4.6kb 区域的 DNA 片段, 将该片段连接到 M13⁺ 载体上, 转化大肠杆菌 JM109, 得到了约 4000 个菌落的文库。通过质粒的大量提

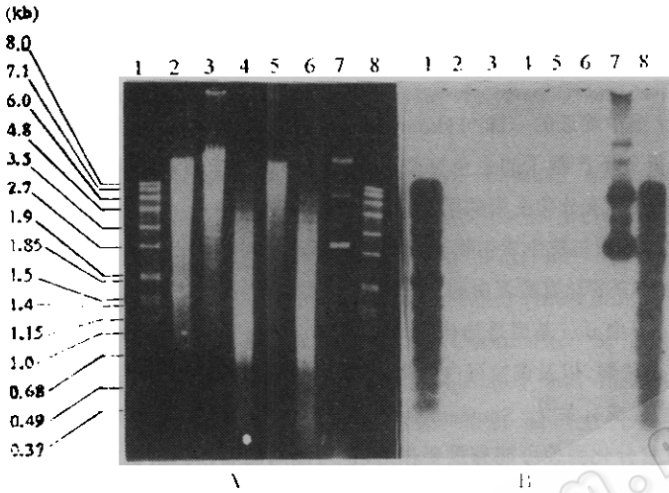


图 1 总 DNA 酶切的琼脂糖凝胶电泳 (A) 及 Southern 杂交 (B)

1. spp I; 2. *Xho* I 单酶切; 3. *Pst* I 单酶切; 4. *Sma* I 单酶切; 5. *Not* I 单酶切; 6. *Sma* I + *Pst* I 双酶切; 7. P_{TH}; 8. spp I。

取, 从中得到了 88 个插入片段大小适合的转化子, 通过点杂交, 从中得到了 4 个具有阳性信号的转化子 (图略)。

2.2 Southern 杂交验证

得到的 4 个阳性转化子进行重组质粒 DNA 的提取, 并用 *Pst* I 进行酶切, 电泳结果表明 4 个转化子质粒中均插入 4.6kb 左右的片段。经转移到尼龙膜上进行 Southern 杂交, 其中来自 GL19 转化子的重组质粒中插入片段仍呈现阳性信号 (图 2)。由此进一步证明克隆到了圈卷产色链霉菌的 *lon* 同源基因。

2.3 酶切分析

用多种限制性内切酶对重组质粒 pGL19 进行酶切分析, 结果表明: *Eco*RI, *Eco*RV, *Pst* I,

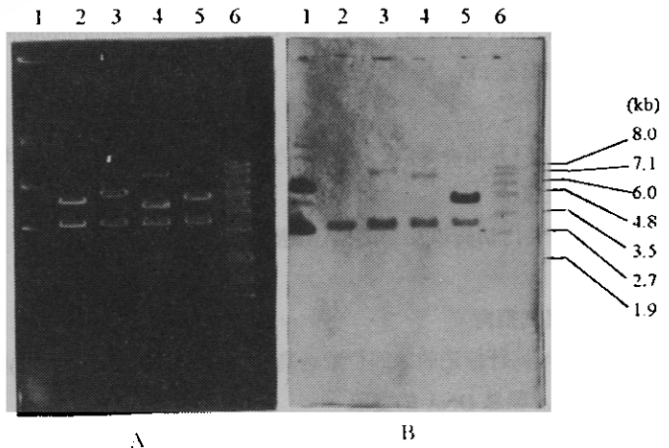


图 2 重组质粒的酶切 (A) 及 Southern 杂交 (B)

1. P_{TH}; 2. pGL71 / *Pst* I; 3. pGL36 / *Pst* I; 4. pGL10 / *Pst* I; 5. pGL19 / *Pst* I; 6. spp I。

Sac I 和 *Xba* I 在 4.6kb 的 DNA 片段内没有酶切位点(图略)。 *Bam* H I, *Kpn* I, *Not* I 和 *Xho* I 在该片段中分别有一个酶切位点, 由于

M13⁻ 载体的多克隆位点中有上述限制性内切酶的单一位点, 所以用上述限制性内切酶单酶切 pGL19 重组质粒酶切后分别出现两条泳带(图 3)。通过双酶切分析, *Bgl* II 酶切位点位于 *Bam* H I 和 *Xho* I 位点之间。 *Pvu* II 将 pGL19 质粒切成 4 个片段(图 3), 因 *Pvu* II 在 M13⁻ 载体上已有两个酶切位点, 所以 *Pvu* II 在该片段内有两个酶切位点。 *Sac* II 和 *Bgl* I 分别将 pGL19 质粒切成多个片段, 其中 *Sac* II 约有 6 个位点, *Bgl* I 约有 7 个位点(图 3)。

根据上述限制性内切酶酶切

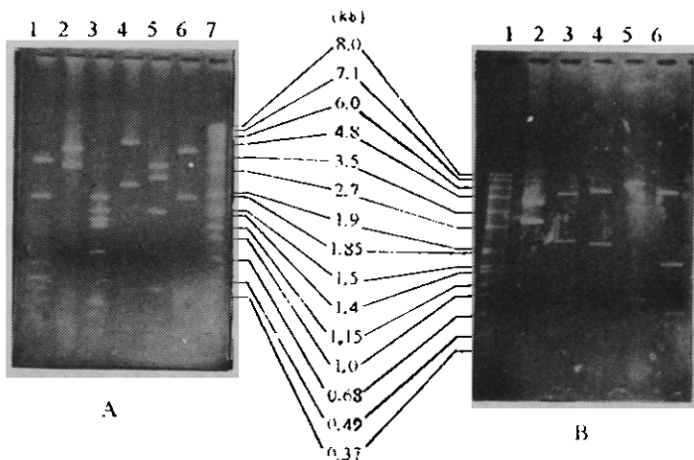


图 3 重组质粒 pGL19 限制性酶切的琼脂糖凝胶电泳

- A. 1. pGL19/*Apa* I; 2. pGL19/*Bam* H I; 3. pGL19/*Bgl* I; 4. pGL19/*Kpn* I; 5. pGL19/*Pvu* II; 6. pGL19/*Sac* II; 7. spp I.
B. 1. spp I; 2. pGL19/*Bam* H I; 3. pGL19/*Kpn* I; 4. pGL19/*Not* I; 5. pGL19/*Xho* I; 6. pGL19/*Bgl* II + *Kpn* I.

结果分析, 得到含有 *lon* 基因的 4.6kb DNA 片段的物理图谱(图 4)。

利用上述酶切结果, 并通过 Southern 杂交(图略)进一步分析, 可以初步将圈卷产色链霉菌 *lon* 基因定位于从 *Pst* I 到 *Xho* I

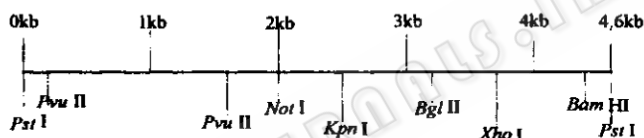


图 4 重组质粒 pGL19 的酶切图谱

的长约 3.7kb 的 DNA 片段内。

2.4 讨论

lon 基因所编码的 ATP 依赖性丝氨酸蛋白酶在不同的物种中作用有差异^[6,7]。在天蓝色链霉菌中, *lon* 基因对形态分化和生理分化都有一定影响^[3]。它的这种调控作用在链霉菌中是否普遍存在? *lon* 基因在圈卷产色链霉菌中的作用如何? 都需进一步研究。此外, 圈卷产色链霉菌作为 Nikkomycin 的产生菌是一株具有应用前景的生产菌株。Nikkomycin 专一性地抑制真菌细胞壁的几丁质合成, 对动植物无毒, 无公害, 被认为是理想的抗真菌抗生素。在农业上可用于多种经济作物, 如苹果的轮斑病, 番茄的叶霉病, 烟草红斑病, 人参黑斑病等真菌病害的防治^[8,9]。因此对该菌株遗传背景的研究具有深远的意义。根据本文对 *lon* 基因的定位, 含有圈卷产色链霉菌 *lon* 基因的 3.7kbDNA 片段的全序列测定即将完成, 该基因的功能研究亦在进行之中。

参 考 文 献

- [1] 谭华荣, 吴 畏, 田宇清, 等. 微生物学报, 1994, 34(5): 398~402.
[2] Maurizi M R, Trisler P, Gottesman S. *J Bacteriol*, 1985, 164: 1124~1135.

- [3] 杨海花, 田宇清, 谭华荣, 等. 科学通报, 1997, 42(3): 309~313.
- [4] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [5] Hopwood S A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual. Norwich, England: John Innes Foundation, 1985.
- [6] Tojo N, Inouye S, Komoano T. *J Bacteriol*, 1993, 175: 2271~2277.
- [7] Eastgate J A, Taylor N, Coleman M J *et al.* *J Bacteriol*, 1995, 177: 932~937.
- [8] Gaughran J P, Margaret H L, Donald R K *et al.* *J Bacteriol*, 1994, 176: 5857~5860.
- [9] Deker H, H Zahner, H Heitsch *et al.* *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 1805~1813.

CLONING AND ENDONUCLEASE DIGESTION OF *lon* GENE FROM *STREPTOMYCES ANSOCHROMOGENES*

Liu Gang Tan Huarong

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract *Streptomyces ansochromogenes* is a nikkomycin producer which has typical life cycle of *Streptomyces* differentiation on glucose asparagine medium. The *lon* gene product is an ATP-dependent serine proteinase. The *lon* gene might have some connection with physiological differentiation and also with the morphological differentiation in *S. coelicolor*. The *lon*-like gene of *S. ansochromogenes* was identified by hybridization and the *lon*-like gene in 4.6kb *Pst*I fragment was cloned. The physical map of this fragment and the localization of the target gene were preliminarily studied.

Key words *Streptomyces ansochromogenes*, *lon* gene cloning, Physical map